

VĚDECKÝ
ČASOPIS

NÁRODNÍ KNIHOVNA



1001913557

13662
NKF

OCHRANA ROSTLIN

557764

2 5. května 1994

P II 170



1
ROČNÍK 27 (LXIV)
PRAHA
ÚNOR 1991
CS ISSN 036-5394

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Řídí redakční rada: Ing. Václav Kúdela, DrSc. (předseda), ing. Josef Huszák, DrSc., ing. Petr Ackermann, CSc., ing. Pavel Bartoš, DrSc., doc. ing. Ján Danko, CSc., RNDr. Bruno Gábel, CSc., prof. ing. Václav Kohout, DrSc., ing. Ján Lanák, ing. Aleš Lebeda, CSc., ing. Cyprián Paulech, CSc., ing. Jaroslav Polák, CSc., ing. Vlastimil Rasocha, CSc., ing. Tibor Roháček, CSc., ing. Vladimír Řehák, ing. Prokop Šimrouš, CSc., doc. ing. Vladimír Táborský, CSc. ing. Marie Váňová, CSc.

Vedoucí redaktorka: RNDr. Marcela Braunová

OBSAH

Polák Z., Branišová H.: Viry některých opadavých druhů lesních dřevin	1
Benada J.: Podstata odolnosti rostlin k obligátním parazitům	9
Filigarová M., Čeřovská N., Žák P.: Využití zkráceného postupu metody ELISA při detekci A viru bramboru a viru mozaiky tabáku	15
Polák Z., Procházková Z.: Starček hajní a starček celolistý přírodními hostiteli viru černé kroužkovitosti rajčete	21
Křístek J., Polák J.: Příprava antiséra proti viru latentní kroužkovitosti jahodníku a izolace protilátek vhodných pro ELISA	25
Smrčka K.: Dynamika reprodukce viru mozaiky huseníku v rostlinách <i>Petunia hybrida</i> cv. Lavina	35
Zakopal J.: Analýza spektra patotypů padlí travního na ječmeni jarním	43
Herman M., Dvrtěl J.: Vztahy mezi výnosem pšenice ozimé a napadení houbou <i>Gaeumannomyces graminis</i>	53
Kováčiková E., Fojtík A., Vlasáková A., Jakešová H.: Rezistence jetele lučního vůči původcům kořenových hnilob	63
Rotrek J.: Moření vojtěšky seté (<i>Medicago sativa</i> L.) proti listopasům (<i>Sitona</i> spp.)	73

KRÁTKÁ SDĚLENÍ

Chod J., Jokeš M.: Etiologie nekrotické kroužkovitosti hlíz brambor	85
Kodarová L.: Citlivost <i>Erysiphe graminis</i> spp. k přípravkům triazolového typu ..	89

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Čača Z.: VIII. celostátní vědecká mykologická konference	82
Polák J.: VIII. mezinárodní virologický kongres a 3. setkání mezinárodní pracovní skupiny pro viroidy v Berlíně	92

ŽIVOTNÍ JUBILEA

Polák J.: K šedesátinám ing. Jiřího Choda, DrSc.	52
---	----

CONTENT

Polák Z., Branišová H.: Viruses in some deciduous forest trees	1
Benada J.: The nature of resistance of plants to obligate parasites	9
Filigarová M., Čeřovská N., Žák P.: Utilization of shortened ELISA technique at the process of detecting potato and tobacco mosaic virus	15
Polák Z., Procházková Z.: Groundsels (<i>Senecio nemorensis</i> ssp. <i>fuchsii</i> and <i>S. integrifolius</i>) as natural hosts of tomato black ring virus	21

VIRUSES IN SOME DECIDUOUS FOREST TREES

Zdenko POLÁK, Hana BRANIŠOVÁ

*Institute of Experimental Botany of the Czechoslovak
Academy of Sciences, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6, Czechoslovakia*

Investigating virotic phenomena in deciduous forest trees on the territory of the ČSFR, the following viruses were recovered:

- Acer pseudoplatanus* L. - cucumber mosaic virus
- Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. - cucumber mosaic virus
- Betula verrucosa* Ehrh. - cherry leaf roll and arabis mosaic viruses
- Fagus sylvatica* L. - unidentified viruses resembling potex - and potyvirus groups
- Liriodendron tulipifera* L. - cucumber mosaic virus
- Populus tremula* L. - unidentified virus of potyvirus group
- Quercus cerris* L. - tobacco mosaic virus
- Q. robur* L. - virus resembling tobamovirus group
- Sambucus nigra* L. - elderberry carlavirus, arabis mosaic, cherry leaf roll, tomato black ring, cucumber mosaic and tomato bushy stunt viruses
- S. racemosa* L. - elderberry carlavirus and/or nepoviruses
- Sorbus aucuparia* L. - apple chlorotic leafspot and/or tomato black ring viruses

forest trees; virus diseases

Viruses are widespread pathogens in agricultural crops, in weeds and wild plants; the latter are considered important reservoirs of viruses (B o s , 1981; P o l á k , 1985). Consequently, it can be expected that they are also present in forest ecological systems.

Forests, especially in Europe, have been changed from complex mixtures of woody and herbaceous species to intensively managed plantations consisting of only one or a few species and are no longer wild places. As they become monocultures and as they suffer from mismanagement they become more vulnerable to the impacts of biotic and abiotic stress. Therefore the spread of forest decline in the last decade is associated with the complex interaction of abiotic and biotic factors that lead to stress and to gradual or sudden degeneration of trees (N i e n h a u s , C a s t e l l o , 1989).

According to M a n i o n (1981) and N i e n h a u s (1985) a decline syndrome may be caused by three or more sets of interchangeable factors of predisposing, inciting and contributing categories interacting in a decline disease spiral. According to Nienhaus' concept viruses and primitive procaryotic

organisms such as mycoplasma-like organisms and Rickettsia-like bacteria are considered as predisposing stress factors along with genetic potential, old age, environmental conditions (climate change, wrong soil type or site conditions, poor fertility, air pollutants leading to soil acidification and direct action on the leaves, low soil moisture or poor soil drainage, soil compaction etc.). The experimental proof of this fact was given for instance by K o n t z o g et al. (1990) who demonstrated the predisposing influence of virus infections on plant injury from immissions as synergistical interaction with crucial effect on plant growth and survival of virus infected plants.

Virus diseases of forest trees have been intensively studied in the last few years. The reason is that until recently the interest of research in forest pathology was traditionally focused on insect damage and fungal diseases. The economic importance of the loss of forest trees due to virus infection has been considered as negligible compared with agricultural crops, fruit trees etc.

Technical difficulties to isolate the viruses from, or to detect them in, woody hosts are another reason.

Now, we are confronted with a widespread decline in our forests. This fact and recent findings of viruses and virus-like phenomena in forest trees stimulated us to try to discover the epiphytological situation and the role of viruses also in forest ecosystems in the territory of the ČSFR.

This paper summarizes our results presented at international conferences held in Prague (P o l á k et al., 1989) and in Eberswalde, FRG (P o l á k et al., 1990) and the new findings obtained in 1990.

MATERIAL AND METHODS

The origin of virotic plant material used in our identification trials was as follows:

Fagus sylvatica L. - State nature reserve "Voděradské bučiny" close to Jevany, Central Bohemia, landscape preserve "Javorníky" close to Lysá pod Makytou, West Slovakia; *Acer pseudoplatanus* L. - Vysoká Pec u Příbramě, Central Bohemia; *Alnus glutinosa* L. - valley of Hamerský brook, Jindřichův Hradec, South Bohemia; *Liriodendron tulipifera* L. - garden of the castle Sychrov, North Bohemia; *Betula verrucosa* Ehrh. - locality Pecný in the vicinity of the observatory Ondřejov, Central Bohemia; *Populus tremula* L. - the same locality; *Quercus cerris* L. - Vrapice at Kladno, Central Bohemia; *Quercus robur* L. - Trnová at Jíloviště, Central Bohemia; *Sambucus nigra* L. and *Sambucus racemosa* L. - Nebušice, Prague 6; *Sorbus aucuparia* L. - Přední Kopanina, Prague 6.

The presented results are based mostly on the positive transmissions and response of herbaceous differential species - *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste et Ryn., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana tabacum* cvs. Samsun, Xanthi-nc., White Burley, *Petunia hybrida* L., *Tetragonia expansa* Murr. and *Crotalaria juncea* L.

For investigations of morphology of virions by electron microscopy both negatively stained preparations of crude infectious sap or purified virus and ultrathin sections of buds or leaves of infected woody or herbaceous plants were used. Serodiagnosis in agar gel double diffusion tests was performed with standard homologous antigens and healthy host plant extracts as controls. For ELISA the isolated IgG were conjugated with alkaline phosphatase. Antisera against arabis mosaic and cherry leaf roll viruses were prepared by Ing. M. Filigarová, CSc., of the Institute of Experimental Botany CAS, antisera against cucumber mosaic, tobacco mosaic and tomato black ring viruses by RNDr. Z. Procházková of the same Institute. Tomato bushy stunt and apple chlorotic leaf spot virus antisera were obtained from Ing. L. Albrechtová of the Institute of Plant Production, Praha-Ruzyně. Antiserum against elderberry carlavirus was sent by courtesy of Dr. J. Dijkstra, University of Wageningen, The Netherlands, and against tobacco necrosis virus by courtesy of Prof. Dr. J. Richter, Institute for Phytopathology, Aschersleben, FRG.

RESULTS AND DISCUSSION

During the last two years our attention has been focused on identification of virotic phenomena in beech, *Fagus sylvatica* L., maple, *Acer pseudoplatanus* L., alder, *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., aspen, *Populus tremula* L. and tulip-tree, *Liriodendron tulipifera* L.

Beech - Decline of beech trees seems to be a serious problem in many localities of the Czech and Slovak Republics. Virotic phenonena consist mostly of decolorations (both marginal and yellow flecking) and deformations of leaf blades followed the next year by dieback of branches or whole trees. Using electron microscopy we succeeded to visualize rod shaped and thread-like particles in homogenates of young leaves and ultrathin sections of buds of virotic material from Jevany. Similar findings were reported recently from the Federal Republic of Germany by N i e n h a u s et al. (1985) and W i n t e r, N i e n h a u s (1989). Up to now we have failed to transmit the virus-like entity to differential host plants except *C. quinoa* which exhibited only a few chlorotic local lesions as a result of inoculation with leaf homogenate.

From the locality in the Javorníky mountains we investigated soil samples dug out from the rhizosphere of symptomatic trees by transplanting *Samsun tobaccos* in them as bait plants. Type of the necrotic reaction of these tobaccos and positive results in a serological double diffusion gel test with root homogenate verified the infection of soil with tobacco necrosis virus (TNV). However, all our attempts at transmission of TNV from beech rootlets have failed and so have the trials to detect the virus in the rootlets. The only hopeful result with this material comes from ultrathin sections of buds of closely watched symptomatic trees, showing sporadic occurrence of spherical virus-like particles regularly arranged into crystalline cytoplasmic inclusion bodies. Occurrence of virus entities with spherical particles in beech trees as tobacco necrosis, brome mosaic and cherry leaf roll viruses was the topic of report by Winter, Nienhaus (1989). Identification of our findings is not yet finished.

M a p l e - Very common syndrome in *Acer pseudoplatanus* is severe yellow mosaic or flecking and deformation of leaves. After many unsuccessful attempts to transmit the causal agent from trees from various localities or to visualize the possible virus by electron microscopic techniques the positive transmissions were obtained from three symptomatic trees. From each of these plants cucumber mosaic virus (CMV) was isolated in accordance with results of Derevyankin and Keldysh (1987) who searched for viruses in arid zones of the USSR and in West Kazakhstan.

A l d e r - During the complex search for causal agent of serious decline of *Alnus glutinosa* trees, which occurred recently in South Bohemia mostly along creeks and ditches, the same virus (CMV) was repeatedly isolated from young plants. These plants exhibited very mild, sometimes hardly perceptible, decolorations appearing as light green spots of various sizes in leaves. The virus was not isolated from older declining trees. Therefore we do not take the virus as a causal agent of decline of alders, as the problem of decline in alder is more complex, associated mainly with mycoses in connection with abiotic stress.

A s p e n - In homogenates of *Populus tremula* leaves carrying chlorotic necrotizing spots 2-3 mm in diameter we revealed thread-like particles with normal length of 77 nm which seem to belong to potyvirus group. Our attempts to transmit the virus to a number of differential host plants failed. In the literature there is only one report from the U.S.A. by Martin et al. (1982), describing also non-identified potyvirus from clones of the genus *Populus* suffering from very similar foliar symptoms.

From our former results there should be mentioned viruses isolated from other deciduous trees or shrubs such as elderberry, *Sambucus nigra* L. and *S. racemosa* L., mountain-ash, *Sorbus aucuparia* L., oak, *Quercus cerris* L. and birch, *Betula verrucosa* Ehrh.

Elderberry - As far as etiology of very frequent leaf decolorations in *Sambucus nigra* is concerned most common seem to be infections caused by nepoviruses such as the arabis mosaic (AMV), cherry leaf roll (CLRV) and tomato black ring (TBRV) viruses and by tomato bushy stunt virus (Novák and Lánzová, 1980). These viruses are responsible for relatively severe symptoms in the form of ring spotting and vein clearing in elderberry trees. As a virus new to the territory of the ČSFR elderberry carlavirus (ECV), formerly described by van Lent and Dijkstra (1983) in the Netherlands, was isolated and determined by us (Polák, Procházková, 1988) both from *S. nigra* and *S. racemosa*. ECV occurs in elderberry usually in mixed infections with AMV. Polák and Procházková (1988) succeeded also in isolating cucumber mosaic virus (CMV) from *S. nigra* plants found in surroundings of Prague. This virus was first described from elderberry by Uymoto and Gilmer (1971) in the United States. Single infections with both ECV and CMV cause very mild symptoms in elderberry leaves.

Mountain ash - Ring and fleck disease of *Sorbus aucuparia* which is widespread in the territory of Bohemia and evidently also in other parts of our country (Králík, 1961) was found by us to be caused by apple chlorotic leaf spot virus in accordance with the data by Spáar and Kleinhempel (1985). Besides this virus we isolated TBRV and one more spherical virus which has remained unidentified until now.

Oak - Growth and leaf changes in oak are one of the most serious problems. From many papers previously published it follows that various species of oak suffer from infection by strains of tobacco mosaic virus (TMV). They can be transmitted mechanically (Nienhaus, 1975) or by oak powdery mildew (Nienhaus, 1971). Yarwood and Hecht-Poinar (1970) speak about possible direct transmission of TMV in a very low percentage from oak to herbaceous indicators. From dried leaves of *Quercus cerris* L. we succeeded to transmit TMV to *Samsun tobaccos*. The appearance of the tree from which TMV was isolated was bushy and stunted, the leaves were small with chlorotic mottling and serious deformations. Similar symptoms were described by Horváth et al. (1975). We attempted many times to isolate TMV from leaves of oak, *Q. robur* L. with typical symptoms indicating possible infection with TMV. In experiments

using the method of gel filtration and fractionation as recommended by Nienhaus and Yarwood (1972) we revealed single virus particles but failed to transmit the virus.

Birch - Decline and little leaf accompanied with decoloration in birch, *Betula verrucosa* Ehrh. seem to be very frequent in our country. CLRV used to be isolated from such trees (Schmeltzer, 1972; Cooper, 1976). We also succeeded in isolating this virus from trees with yellow mottling or yellowing along the edge of the leaf blade from more than ten localities. In one case we determined infection with AMV. Up to now we have not found in our territory any virus with threadlike particles responsible for the little leaf disease of birch in the Rhineland area (Nienhaus et al., 1985).

The viruses so far detected in forests are a heterogenous group with regard to their mode of spread, host range and stability. To date little is known about the frequency of distribution of these viruses in forests. In addition there is also a serious lack of information regarding interactions among viruses and between viruses and other biotic factors as well as a lack of understanding of direct impacts of virus infection. It seems likely that all stress factors, including viruses, become more important in disturbed ecosystems and are likely to be especially disruptive under such conditions in managed forests. Therefore further intensive virus research in forest ecosystems is inevitable.

References

- BOS, L.: Wild plants in the ecology of virus diseases. In: MARAMOMOROSCH, K. - HARRIS, K. F. (Eds): Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology. Academic Press, London 1981: 1-33.
- COOPER, J. I.: The possible epidemiological significance of pollen and seed transmission in the cherry leaf roll virus (*Betula* spp.) complex. Mitt. BBA, 170, 1976: 17-22.
- DEREVYANKIN, P.-KELDYSH, M.: Formirovanie vidovogo sostava virusov v ekosistemakh aridnoi zony RSFSR i zapadnogo Kazakhstana. Virusy rasteni i nasekomykh, Trudy LSCHA, 236, 1987: 26-42.
- HORVÁTH, J. - EKE, I. - GÁL, T. - DEZSÉRY, M.: Demonstration of virus-like particles in sweet chestnut and oak with leaf deformations in Hungary. Z. PflKrankh. PflSchutz, 82, 1975: 498-502.
- KONIZOG, H. G. - KLEINHEMPEL, H. - MATSCHKE, J.: Combined effects of environmental stress and virus infections on the growth of forest trees. In: Recent Results in Plant Virology, Symp. Eberswalde 1989: 53-54.
- KRÁLÍKOVÁ, K.: Krůžkovitost' jarabiny v ČSSR. Biologie (Bratislava), 16, 1961: 835-838.
- LENT, J. W. M. van - DIJKSTRA, J.: Elderberry carlavirus. C. M.I./A.A.B. Description of plant viruses Nr. 263, 1983: 1-4.
- MANION, P. D.: Decline diseases of complex biotic and abiotic origin. In: Tree disease concepts. Prentice Hall, 1981: 324-339.

- MARTIN, R. R. - BERBEE, J. G. - OMUEMU, J. O.: Isolation of potyvirus from declining clones of *Populus*. *Phytopathology*, 72, 1982: 1158-1162.
- NIENHAUS, F.: Tobacco mosaic virus strains extracted from conidia of powdery mildews. *Virology*, 46, 1971: 504-505.
- NIENHAUS, F.: Viren und virus-verdächtige Erkrankungen in Eichen (*Quercus robur* und *Quercus sessiliflora*). *Z. PflKrankh. PflSchutz*, 82, 1975: 739-749.
- NIENHAUS, F.: Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria. *Experientia*, 41, 1985: 597-603.
- NIENHAUS, F. - CASTELLO, J. D.: Viruses in forest trees. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 27, 1989: 165-186.
- NIENHAUS, F. - EBRAHIM-NESBAT, F. - FRICKE, M. - BÜTTNER, C. - WELTER, K.: Investigations on viruses from declining beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in Rhineland and Westphalia, Federal Republic of Germany. *Eur. J. For. Path.*, 15, 1985: 402-411.
- NIENHAUS, F. - YARWOOD, C. E.: Transmission of virus from oak leaves fractionated with sephadex. *Phytopathology*, 62, 1972: 313-315.
- NOVÁK, J. B. - LANZOVA, J.: Důkaz viru zakrslosti rajčete (tomato bushy stunt virus) v některých lesních dřevinách a bylinách. *Lesnictví*, 26, 1980: 1009-1016.
- POLÁK, Z.: Contribution to the knowledge of the role of wild hosts in the incidence of plant viruses. *Meded. Fac. Landb. - Wet. Rijksuniv. Gent*, 50, 1985: 1301-1304.
- POLÁK, Z. - PROCHÁZKOVÁ, Z.: Carlavirus bezu černého, virus mozaiky okurky a virus mozaiky huseníku v bezu černém, *Sambucus nigra* L. *Ochr. Rostl.*, 24, 1988: 5-8.
- POLÁK, Z. - PROCHÁZKOVÁ, Z. - BRANIŠOVÁ, H.: Nové nálezy virů lesních dřevin na území České republiky. In: *Plant Virology. Proc. 10th Conf. Czechoslovak Plant Virol.* Praha 27. 6. - 30. 6. 1989: 159-160.
- POLÁK, Z. - PROCHÁZKOVÁ, Z. - BRANIŠOVÁ, H.: Recent findings of viruses of forest trees in the territory of the Czech Republic. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*, Berlin, 26, 1990: 389-393.
- SCHMELZER, K.: Das Kirschenblattroll-Virus (cherry leaf-roll virus) aus der Birke (*Betula pendula* Roth.) *Z. Bakt., Abt. II*, 127, 1972: 10-12.
- SPAAR, D. - KLEINHEMPPEL, H.: Bekämpfung von Viruskrankheiten der Kulturpflanzen, Berlin, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag 1985: 353 pp.
- UYEMOTTO, J. K. - GILMER, R. M.: Sap transmissible viruses from elderberries in New York. *Phytopathology*, 61, 1971: 132.
- WINTER, S. - NIENHAUS, F.: Identification of viruses from European beech (*Fagus sylvatica* L.) of declining forests in Northrhine-Westphalia (FRG). *Eur. J. For. Path.*, 19, 1989: 111-118.
- YARWOOD, C. E. - HECHT - POINAR, E.: A virus resembling tobacco mosaic virus in oak. *Phytopathology*, 60, 1970: 1320.

Received for publication October 10, 1990

Z. Polák, H. Branišová (Ústav experimentální botaniky ČSAV, Praha)

Viry některých opadavých druhů lesních dřevin

Při výzkumu příčin virotických jevů u některých druhů lesních dřevin na území ČSFR byla prokázána přítomnost těchto kauzálních agens: U javoru, *Acer pseudoplatanus*, a olše, *Alnus glutinosa*, byla opakovaně

dokázána infekce virem mozaiky okurky. Bříza, *Betula verrucosa*, je často infikována virem svinutky třešně. V jednom případě byla prokázána též infekce virem mozaiky huseníku. V listech a pupenech buku, *Fagus sylvatica*, byla prokázána přítomnost dosud blíže neurčených částic morfologií připomínajících viriony skupiny potex- nebo potyvírů. U liliovníků, *Liriodendron tulipifera*, byl identifikován virus mozaiky okurky. Dosud neidentifikovaný virus skupiny poty byl zjištěn v listech osiky, *Populus tremula*. Z dubu, *Quercus cerris*, byl izolován virus mozaiky tabáku, jehož částice byly vizualizovány též v homogenátech *Q. robur*. U bezu černého, *Sambucus nigra*, kromě nepovírů mozaiky huseníku, svinutky třešně, černé kroužkovitosti rajčete byly izolovány virus mozaiky okurky a virus zakrslosti rajčete. Jako nový virus pro území našeho státu byl izolován carlavirus bezu černého. Posledně jmenovaný virus byl zjištěn též v bezu hroznatém, *S. racemosa*, spolu s nepoviry infikujícími bez černý. Z jeřábu, *Sorbus aucuparia*, byly izolovány virus chlorotické skvrnitosti listů jabloně, virus černé kroužkovitosti rajčete a dosud neidentifikovaný virus se sférickými viriony.

lesní dřeviny; virové choroby

THE NATURE OF RESISTANCE OF PLANTS TO OBLIGATE PARASITES

Jaroslav BENADA

Cereal Research Institute, 767 41 Kroměříž, Czechoslovakia

The nature of disease resistance is a basic problem of plant pathology and knowledge about it relates to breeding resistance, to epidemiology and the economic use of fungicides. In spite of the attention paid to this problem by plant pathologists over many years it is surprising that there still are missing general explanations or hypotheses about the nature of resistance although there are many data that could contribute to elucidation of the problem as summarized in compendia such as those by Heitefuss and Williams (1976), Vanderplank (1982) and Horsfall and Cowling (1980).

First it is necessary to mention the different types of resistance, race specific, race non-specific resistance, non-host resistance. They all may have similar physiologic base. Diseases of cereals caused by obligate parasites such as powdery mildew and rusts provide very suitable models. But most of the models used up to now have been based on race specific resistance, in which a cultivar was or was not severely infected by a physiologic race. The use of different cultivars in these studies has made the understanding of the mechanism and nature of resistance difficult.

Therefore it may be better to use the race non-specific resistance, especially if we suppose that its nature is similar. Changes in race non-specific resistance depend on both the host and environment (Benada, 1966a); they also are dynamic and may alter rapidly (Shaw, 1967), and different organs of the plant may have different resistance (Benada, 1970b, c).

Studies of the biophysical states of the host plants in relation to the development of the diseases (Benada, 1965, 1966a, b, 1967, 1969) suggest that resistance may depend on enzymes involved in energy production via respiration. Increased respiration occurs in most diseases except virus diseases (Daly, 1976).

In seeking to explain resistance and other related phenomena, we need first to decide which enzyme operates as the terminal oxidase in plants in general. Present opinion is that only the cytochrome oxidase acts in this way. Most experiments with this enzyme were done with cell-free homogenates

(Douce and Day, 1985). The enzyme is bound to mitochondria to which oxygen is translocated through the protoplasm. However, oxygen is known to poison some cell systems by inhibiting anaerobic reactions. Unfortunately, insufficient data are available on translocation of oxygen in the protoplasm. In our experiments, the electrical potential measured in leaves of cereals decreased after intensive illumination which stimulated photosynthesis and oxygen production. In contrast, in the presence of free oxygen, electrical potential increased, mainly in disintegrated tissues. Thus, it seems that oxygen does not diffuse in intact cells from chloroplasts in the free molecular form, but it is bound to certain chemical substances. Oxygen is released apparently only from the cell surface being loosened from the bound form. The possible existence of free molecular oxygen in intact living cells is decisive in the following consideration of the nature of resistance.

Further considerations are based on the assumption that the functional terminal oxidase in living intact cells is not cytochrome oxidase, even when it is present as a non-functional enzyme which becomes active only after damage. The terminal oxidase function in living cells depends on another enzyme which must be soluble (Bonner, 1957), so that it penetrates to the surface of the cell membrane. The most promising candidate seems to be a polyphenoloxidase (Frič, 1976) such as o-diphenoloxidase, monophenoloxidase or laccase, but in relation to resistance the specificity of such enzymes is too low. Thus specificity would require a highly specific phenol oxidase such as the terminal oxidase.

The nature of resistance

The mechanism of resistance may be based on the ability of the parasite to gain energy by respiration in host cells. Parasites with haustoria or similar intracellular structures may use the terminal oxidase with a flavone-type phenolic substance as substrate, in soluble form probably as a glycoside and the carrier of electrons. The quinone produced by oxidation may be reduced at sites of energy consumption by a reductase to restore the original substrate. The oxidase is "soluble" and penetrates to the cell membrane where it reacts with oxygen as a terminal oxidase. The specific reductase may be bound to inner cell structures (probably mitochondria).

The redox status of the cell and pH influences these redox reactions. Also, changes in the physical state of cells can disturb the coupling of the enzyme systems of host and parasite in which the parasite uses the terminal oxidase of the host but it has its own substrate and reductase (Benda, 1971).

An obligate parasite may not have a terminal oxidase active enough to secure its energy requirements. For example, conidia of powdery mildews germinate on leaf surfaces and the infection hypha grows mainly above the septa of cells where the highest accumulation of host oxidase may be expected (B e n a d a , 1970a). Appressoria form where oxidation of the respiratory substrate and energy gain are high enough to sustain further growth and development of the parasite.

Rust in cereals penetrates through stomata and haustoria form in mesophyll cells. The hypothesis requires that a mesophyll cell has its own specific terminal oxidase different from that of an epidermal cell, although both are phenoloxidases.

The hypothesis will now be applied to some examples.

1. After non-specific oxidation of substrate by the host, the product cannot be used for energy gain by a reductase of the parasite. Also, phenolic substance from the parasite enters the host cell and causes damage by competition with the indigenous phenolic substance and by inhibition of oxidation. This results in increased respiration.

2. The substrate is oxidised non-specifically; it cannot be recovered by the reductase; the non-specific compounds accumulate and consumption of the oxygen increases, but without gain of energy.

3. Hosts for mono- and dikaryotic states are different. Therefore, the respiratory substrate must be different in the two stages, and the parasite must be able to grow on different hosts with different oxidases.

4. Compatibility in pistil-polen relationship and between host and parasite is probably similar in origin.

5. Accumulation of starch in green islands caused by powdery mildews. The respiratory substrate of the parasite is a phenolic substance, e. g. a glycoside. This is hydrolysed by host enzymes after infection, and the sugar accumulates as starch.

6. An obligate parasite has its own terminal oxidase probably of low efficacy, so that its growth must be coupled with terminal oxidase of the host. A facultative parasite has its own terminal oxidase probably with higher efficacy, but the terminal oxidase of the host is still more effective. The relation between the host and the parasite through the terminal oxidase of the host is, therefore, as in an obligate parasite.

The specific substrate for terminal oxidation is assumed to be present in very low concentrations with continual change between the oxidised and reduced state. When this decreases or stops, the substance begins to accumulate. Phenolic substaces present in higher concentrations are not the

respiratory substrates. The specific phenolic substrates for respiration will be related closely to the substances for chemotaxonomy (H a r b o r n e , 1964, 1968).

The system of specific oxidation - specific phenol - specific oxidase - specific reductase confirms the relationship postulated by the "gene for gene" theory (F l o r , 1942). The substances involved may be flavonoids and related compounds based on benzene structure with OH and O groups on the side chains fitted for oxidation and reduction, and should be present in soluble forms.

The diversity of phenolic compounds could explain the many relationships between parasites and their hosts.

In summary the following is proposed:

1. Resistance is based on the energy relations between the parasites and their host cells.

2. Parasite uses the terminal oxidase of the host which is a specific phenolic flavone-type oxidase.

3. The function of this enzyme is influenced by the redox potential and pH of the cell.

4. Oxidation and reduction of this substance is specific and reversible.

Experimental work to support this hypothesis would be as follows.

1. To verify the presence of free oxygen in the protoplasm of living intact plant cells and the penetration of oxygen to mitochondria.

2. To identify the substrate for the terminal oxidase among the phenolic compounds such as flavones, if data on the penetration of free oxygen through protoplasm are obtained showing that cytochromoxidase is not the functional terminal oxidase. The substance will be present in low concentration and be reversibly oxidizable and reducible. In cereals the substances in mesophyll and epidermal cells will probably be different.

3. To isolate the enzymes and to study their location in cells, the effects of redox potential and pH and their influence on the change of substrates.

4. To apply the hypothesis to resistance in different types of diseases.

References

- BENADA, J.: The influence of pH of barley tissues on the symptoms caused by powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.). *Phytopath. Z.*, 54, 1965: 185-192.
- BENADA, J.: The gradients of oxidation-reduction potentials in cereals and the dependence of obligate parasites on the redox potentials of the host tissues. *Phytopath. Z.*, 55, 1966a: 265-290.

- BENADA, J.: The occurrence of telia of rusts and of cleistothecia of powdery mildew on cereals and an attempt to find a factor conditioning it. Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskrank. Hyg. Abt. 2, 120, 1966 b: 427 - 433.
- BENADA, J.: The dependence on the pH of the host tissue for the production of uredia and telia in *Uromyces pisi* (Pers.) De Bary. Čes. Mykol., 21, 1967: 89-91.
- BENADA, J.: Brown patches on leaves of barley in the relationship to powdery mildew. Phytopath. Z., 65, 1969: 288-290.
- BENADA, J.: Observation on early phases of infection by powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.). Phytopath. Z., 68, 1970a: 181-187.
- BENADA, J.: Effect of different conditions of cultivation of powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.) on the infectivity. Phytopath. Z., 69, 1970b: 273-276.
- BENADA, J.: Chlorotic spots on cereal leaves as the expression of resistance against powdery mildew. Phytopath. Z., 67, 1970c: 89-92.
- BENADA, J.: The testing of correlation between the biophysical states in the host tissues and the susceptibility of cereals to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC.). Phytopath. Z., 70, 1971: 127-136.
- BONNER, W. D.: Soluble oxidases and their function. Ann. Rev. Pl. Physiol., 8, 1957: 427-452.
- DALY, J. M.: The carbon balance of diseased plants: changes in respiration, photosynthesis and translocation. In: HEITEFUSS, R. - WILLIAMS, P. H. (Eds): Physiological Plant Pathology. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976: 450-479.
- DOUCE, R. - DAY, D. A. (Eds): Higher Plant Cell Respiration. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 18. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1985.
- FLOR, H. H.: Inheritance of pathogenicity of *Melampsora lini*. Phytopathology, 32, 1942: 653-669.
- FRIČ, F.: Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R. - WILLIAMS, P. H.: (Eds): Physiological Plant Pathology. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976.: 617-631.
- HARBORNE, J. B.: Biochemistry of Phenolic Compounds. Academic Press, New York-London 1964.
- HARBORNE, J. B.: The use of secondary characters in the systematics of higher plants. In: HAWKES, J. G. (Ed.): Chemotaxonomy and Serotaxonomy. Academic Press, London-New York 1968: 173-192.
- HEITEFUSS, R. - WILLIAMS, P. H. (Eds): Physiological Plant Pathology. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1976.
- HORSFALL, J. G. - COWLING, E. B. (Eds): Plant Disease Treatise. Vol. 5, How plants defend themselves. Academic Press, New-York-London 1980.
- SHAW, M.: Cell biological aspects of host-parasite relations of obligate fungal parasites. Can. J. Bot., 45, 1967: 1205-1220.
- VANDERPLANK, J. E.: Host-pathogen Interaction in Plant Disease. Academic Press, New York-London 1982.

Received for publication September 14, 1990.

J. Benada (Výzkumný ústav obilnářský, Kroměříž)

Podstata odolnosti rostlin k obligátním parazitům

Podstata odolnosti rostlin proti chorobám je základním problémem rostlinné patologie, protože úzce souvisí se šlechtěním na odolnost, s epidemiologií chorob a ekonomikou chemických zásahů proti nim. V poslední době nabyla tato otázka zvlášť závažného významu v souvislosti s genovými manipulacemi a snahou využít pro šlechtění na odolnost tzv. odolnosti nehostitelských rostlin. I když se jedná o problematiku, která byla v centru pozornosti fytopatologů již velmi dlouhou dobu, je udivující, že dosud nebylo podáno obecné vysvětlení podstaty odolnosti.

Úvaha o podstatě odolnosti rostlin proti chorobám je založena na následujících vztazích:

1. Základem parazitního vztahu je možnost získávání energie parazita v hostitelské buňce.
2. Parazit využívá terminální oxidázu hostitele, což je vysoce specifická oxidáza složitých fenolických látek flavonového typu, pro oxidaci vlastních substrátů stejného druhu.
3. Funkce tohoto enzymu je ovlivňována redoxním potenciálem buňky a jejím pH.
4. Oxidace a redukce těchto substrátů musí probíhat přísně specificky a reversibilně.
5. Podstata odolnosti k chorobám má stejný základ jako kompatibilita rostlin.
6. V neporušených rostlinných buňkách cytochromoxidáza nefunguje jako terminální oxidáza, protože uvnitř buněk není volný kyslík.

VYUŽITÍ ZKRÁCENÉHO POSTUPU ELISA TESTU PŘI DETEKCI A VIRU BRAMBORU A VIRU MOZAIKY TABÁKU

Marie FILIGAROVÁ, Noemi ČEŘOVSKÁ, Petr ŽÁK

Ústav experimentální botaniky ČSAV, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6

Při zkrácení doby inkubace jednotlivých složek ELISA testu na 60 minut (případně až na 30 minut) jsme při detekci viru mozaiky tabáku získali 70 % (příp. 34 %) výše hodnot absorbance oproti standardnímu postupu. Přítomnost PVA v surové šťávě je u obou zkrácených postupů prokazatelná, ale při zkrácení doby jednotlivých kroků na 30 minut je vhodnější prodloužit dobu inkubace substrátu z 30 na 60 minut.

A virus bramboru (PVA); virus tabákové mozaiky (TMV); ELISA

Pro běžnou diagnostiku virů se používá rutinně dvojité sendvičové metody ELISA ve standardním uspořádání (Clark, Adams, 1977). Možnostmi různého zkrácení postupu ELISA se podrobněji zabývali např. Korpraditskul et al. (1979), McLaughlin et al. (1981) a další. Autoři mimo jiné zjistili, že výsledky zkrácení doby jednotlivých kroků ELISA testu mohou být ovlivněny i typem testovaného viru. Zkrácený postup ELISA testu použili např. Hill et al. (1981), Torrance (1987) a Maat, De Bokx (1978), ale bez srovnání se standardním postupem.

Cílem naší práce bylo porovnat vliv zkrácení doby celého testu na možnost spolehlivé detekce A viru bramboru a viru mozaiky tabáku a stanovit procentuální snížení výše hodnot absorbance oproti běžně používaného postupu.

MATERIÁL A METODY

K pokusům jsme použili jednak listy rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) a rostlin brambor infikované A virem bramboru (PVA) a dále listy *N. tabacum* cv. Samsun infikované virem mozaiky tabáku (TMV).

Šťávu jsme získali rozetřením rostlinných pletiv s extrančním roztokem (0,02M fosfátovým pufrům pH 7,4 obsahujícím 0,8 % NaCl, 0,05 % Tweenu 20, 2 % polyvinylpyrrolidonu a 0,2 % hovězího sérového albuminu). V testech jsme šťávu použili v ředění 1:5, 1:20, 1:100

Z polyklonálního králičího antiséra proti *A* viru bramboru jsme izolovali IgG protilátky srážením kyselinou kaprylovou a z antiséra proti viru mozaiky tabáku precipitací síranem amonným. Značené protilátky s alkalickou fosfátasou (Boehringer) jsme připravili jednostupňovou glutaraldehydovou metodou (A v r a m e a s , 1969).

Koncentrace obou sérologických reaktantů vhodných pro standardní ELISA test byla stanovena experimentálně. Optimální koncentrace IgG protilátek pro vazbu na pevnou fázi byla $1 \mu\text{g/ml}$ a pro enzymem značené protilátky v ředění 1:1000 (při výchozí koncentraci IgG 1 mg/ml).

Dvojitou sendvičovou metodu ELISA jsme dělali ve standardním uspořádání v postatě tak, jak navrhli C l a r k a A d a m s (1977):

Adsorpce IgG protilátek na pevnou fázi probíhala po dobu dvou hodin při 37°C , vazba antigenu 18 hodin při 4°C a vazba IgG protilátek značených alkalickou fosfátasou tři hodiny při 37°C . Výslednou reakci s enzymovým substrátem (p-nitrophenylfosfát) jsme změřili po 30, 60 a 120 minutách inkubace. Hodnoty absorbance jsme odčítali na fotometru Dynatech při vlnové délce 405 nm.

S tímto standardním postupem jsme porovnali vliv zkrácení doby inkubace všech jednotlivých složek testu (tj. vazby IgG protilátek, antigenu a značených IgG) na 30 a 60 minut na důkaz přítomnosti obou výše uvedených virů.

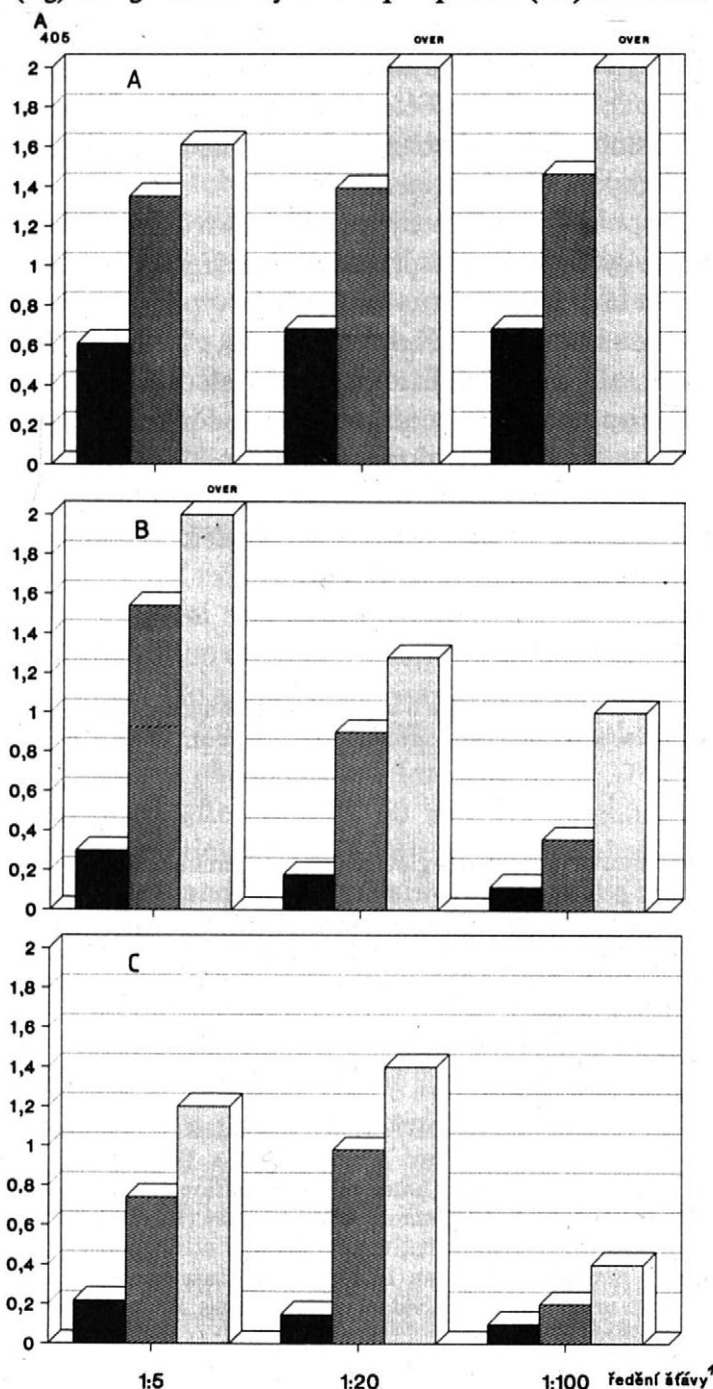
Uvedené výsledky jsou průměrné hodnoty absorbancí ze tří opakovaných paralelních pokusů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve srovnávacích pokusech jsme zjistili, že při zkrácení doby inkubace jednotlivých kroků ELISA testu na 60 minut je možné spolehlivě prokázat v surové šťávě z testovaných rostlin přítomnost jak TMV, tak PVA. Po 30minutové inkubaci substrátu jsou hodnoty absorbance u vzorků z nemocných rostlin tabáku infikovaných TMV při všech použitých ředěních vzorků vysoce průkazné (okolo 1,4) a dosahují 70% výše hodnot absorbance oproti standardnímu uspořádání testu (obr. 1A). Též přítomnost PVA v infikovaných rostlinách tabáku a brambor je prokazatelná, a to zejména při ředění šťávy 1:5 a 1:20 (obr. 1B, C).

Při zkrácení doby inkubace na 30 minut (bez použití třepačky v jednotlivých krocích ELISA testu) jsme u antigenu TMV získali oproti standardnímu uspořádání postupu v průměru 34% výše hodnot absorbance. Vzhledem k tomu, že hodnoty absorbance negativních kontrol se ve všech testech a u obou virů pohybovaly v rozmezí 0,00-0,02, je tato 34% výše hodnot

1. Vliv doby inkubace IgG protilátek, antigenu (Ag) a IgG značených alkalickou fosfataseou (AP) na výsledky ELISA testu: A - šťáva z rostlin tabáku infikovaných virem mozaiky tabáku; B - šťáva z rostlin tabáku infikovaných A virem bramboru; C - šťáva z rostlin bramboru infikovaných A virem bramboru - The effect of incubation period of IgG antibodies, antigen (Ag) and IgG marked by alkaline phosphatase (AP) on the ELISA test results: A - sap from tobacco plants infected by potato virus A; C - sap from tobacco plants infected by tobacco mosaic virus; B - sap from potato plants infected by potato virus A



tobacco plants infected by potato virus A; C - sap from tobacco plants infected by tobacco mosaic virus; B - sap from potato plants infected by potato virus A

■ adsorpce IgG pevnou fází 30 min/37 °C, vazba Ag 30 min/37 °C a IgG značených AP 30 min/37 °C - adsorption of IgG to solid base for 0 min/37 °C, linkage Ag for 30 min/37 °C and marked by AP for 30 min/37 °C

▨ adsorpce IgG na pevnou fází 60 min/37 °C, vazba Ag 60 min/37 °C a IgG značených AP 60 min/37 °C - adsorption of IgG to solid base for 60 min/37 °C, linkage of Ag for 60 min/37 °C and IgG marked by AP for 60 min/37 °C

▩ adsorpce IgG na pevnou fází 2 h/37 °C, vazba Ag 18 h/4 °C a IgG značených AP 3 h/37 °C - adsorption of IgG to solid base for 2 h/37 °C, linkage of Ag for 18 h/4 °C and IgG marked by AP for 3 h/37 °C

¹sap dilution

absorbance (kolem 0,60) více než postačující k prokázání viru, a to jak při ředění šťávy 1:5, 1:20, tak i 1:100. A virus bramboru ve šťávě z rostlin tabáku byl sice prokazatelný, zejména při nižších zředěních šťávy (1:5), ale hodnoty absorbance byly poměrně nízké (kolem 0,30). Avšak s prodloužením doby inkubace substrátu z 30 minut na 60 je možné i PVA zjistit spolehlivě. V tomto případě se při zředění šťávy 1:5 hodnoty absorbance zvýšily z 0,30 na 0,90 a při zředění 1:20 z 0,18 na 0,60. Též při detekci PVA ve šťávě z rostlin bramboru prodloužením doby inkubace substrátu na 60, případně 120 minut se pozitivní hodnoty zvýšily dvou až třinásobně.

Z literatury je známé, že spolehlivá detekce jednotlivých virů zkráceným postupem ELISA testu může být ovlivněna např. koncentrací IgG protilátek použitých k vazbě na pevnou fázi, ředěním značených IgG, typem virových částic, koncentrací viru ve zkoumané šťávě (Korpraditskul et al., 1979; McLaughlin et al., 1981) atd. Z našich výsledků vyplývá, že experimentálně stanovené optimální koncentrace IgG a ředění značených IgG pro standardní postup lze použít i pro zkrácený postup.

Přítomnost jak TMV, tak PVA je možné prokázat oběma zkrácenými pokusy ELISA testu. Při detekci A viru bramboru je však výhodnější prodloužit dobu inkubace substrátu z 30 na 60 minut.

Poděkování

Autoři děkují Renátě Hadámkové a Evě Hanusové za technickou spolupráci a ing. Petru Dědičovi, CSc., za poskytnutí pokusných rostlin brambor.

Literatura

- AVRAMEAS, S.: Coupling of enzymes of protein with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, 6, 1969, s. 43-48.
- CLARK, M. F. - ADAMS, A. N.: Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 1977, s. 475-483.
- HILL, J. H. - BRYANT, G. R. - DURAND, D. P.: Detection of plant virus by using purified IgG in ELISA. *J. Virol. Meth.*, 3, 1981, s. 27-35.
- KORPRADITSKUL, P. - CASPER, R. - LESEMANN, D. I.: Evolution of short reaction times and some characteristics of enzyme-conjugation in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Phytopath. Z.*, 96, 1979, s. 281-285.
- McLAUGHLIN, M. R. - BARNETT, O. W. - BURROWS, P. M. - BAUM, R. H.: Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. *J. Virol. Meth.*, 3, 1981, s. 13-25.
- MAAT, D. Z. - De BOKX, J. A.: Potato leafroll virus: antiserum preparation and detection in potato leaves and sprouts with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Neth. J. Pl. Path.*, 84, 1978, s. 149-156.
- TORRANCE, L.: Use of enzyme amplification in an ELISA to increase sensitivity of detection of barley yellow dwarf virus in oats and in individual vector aphidis. *J. Virol. Meth.*, 15, 1987, s. 131-138.

Došlo dne 1. 2. 1990

M. Filigarová, N. Čeřovská, P. Žák (Institute of Experimental Botany of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia)

Utilization of shortened ELISA technique at the process of detecting potato virus A and tobacco mosaic virus

The aim of the work was to compare the effect a reduction of the time of ELISA steps might exert on the possibility of the reliable detection of potato virus A and tobacco mosaic virus and to determine percentual reduction of absorbance values in comparison with the standard process. In our experimental investigation, we used tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) infected by potato virus A (PVA) and tobacco mosaic virus (TMV) and potato plants (*Solanum tuberosum* L.) infected by the PVA. The sap was obtained by the homogenization of plant tissues with an extractive solution (0.02 M of phosphate buffer, pH 7.4, contained 0.8% of NaCl, 0.05% of Tween 20, 2% of PVP and 0.2% of BSA). In assays, the sap was used in the following dilution: 1:5, 1:20, 1:100. The concentration of both the serologic reactants, suitable for standard ELISA (Clark, Adams, 1977), was determined experimentally. An optimal IgG concentration for the coating was 1 µg/ml and dilution 1:1000 for enzyme-labeled antibodies (initial concentration of IgG for conjugation was 1 mg/ml). The adsorption of IgG antibodies to a solid phase was proceeding for 2 hours at 37° C, the linkage of antigen - for 18 hours at 4° C and the linkage of IgG antibodies labeled by alkaline phosphatase - for 3 hours at 37° C. The result reaction was measured after the 30, 60 and 120 minutes of incubation. When the incubation time of ELISA steps is reduced to 60 minutes, the presence of both TMV and PVA is reliably proved in the crude sap of examined plants. After the 30 minutes of substrate incubation, the absorbance values are highly significant in the injured tobacco plant samples infected by the TMV at all used sample dilutions (about 1.4) and get 70% of absorbance values in comparison with the standard assay arrangement (Fig. 1). The presence of PVA in infected tobacco and potato plants is also significant especially when sap dilution is 1:5 and 1:20 (Fig. 2 and 3). When the incubation time of ELISA was reduced to 30 minutes (without using a shaker in single ELISA steps) we obtained, in TMV antigen, absorbance values 34% higher in average than in the standard assay arrangement. With regard to the fact that the absorbance values of negative controls in all tests and both viruses kept within 0.00 and 0.02, this 34% height of absorbance values (about 0.60) is still sufficient for virus detection and at all sap dilutions (1:5, 1:20 and also

1:100). Though potato virus *A* was significant in the tobacco plant sap, especially at lower sap dilutions (1:5), absorbance values were relatively low (about 0.30). However, when the time of substrate incubation is extended from 30 to 60 minutes, also the PVA is possible to detect reliably. In this case the absorbance values increased, at sap dilution 1:5, from 0.30 to 0.90 and the dilution 1:20 from 0.18 to 0.60. Also when the PVA is detected in potato plant sap the positive values increase two or three times by extension of substrate incubation to 60 conceivably to 120 minutes. On the basis of literature we know that the reliable detection of single viruses by reduce ELISA is affected e.g. by the concentration of IgG used for coating to a solid phase, by the dilution of labeled IgG, by the type of virus elements, virus concentration in examined sap (K o r p r a d i t s k u l et al., 1979; M c - L a u g h l i n et al., 1981) etc. It is clear from our results that experimentally determined optimal IgG concentrations and dilution of labeled IgG used for standard arrangement could be used for the reduced one, too.

potato virus *A* (PVA); tobacco mosaic virus (TMV); ELISA

STARČEK HAJNÍ A STARČEK CELOLISTÝ PŘÍRODNÍMI HOSTITELI VIRU ČERNÉ KROUŽKOVITOSTI RAJČETE

Zdenko POLÁK, Zdenka PROCHÁZKOVÁ

Ústav experimentální botaniky ČSAV, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6

Spontánní ochuravění starčku hajního Fuchsova, *Senecio nemorensis* ssp. *fuchsii*, a starčku celolistého, *S. integrifolius*, vyskytující se v lesních ekosystémech, je způsobeno infekcí virem černé kroužkovitosti rajčete. Zjistili jsme, že u starčku hajního jde o masový výskyt infekce tímto virem prakticky na všech lokalitách, kde starček hajní roste, tj. od 200 až po 1500 m n. m. Přenos viru semenem této rostliny jsme prokázali u 6, resp. 8 % semenáčů vypěstovaných ze semen rostlin projevujících silně jasně žluté mozaikové změny na listech. Infekce starčku celolistého jsme prokázali pouze ve sběrech ze tří lokalit v kladenské oblasti. Oba druhy starčku jsou novými hostiteli tohoto viru.

Senecio nemorensis ssp. *fuchsii*; *S. integrifolius*; virus černé kroužkovitosti rajčete

Při výzkumu fytovirů provázejících syndrom odumírání lesních dřevin jsme v lesních ekosystémech pozorovali v letech 1984-1988 značný výskyt mozaikového ochuravění starčku hajního Fuchsova, *Senecio nemorensis* L. ssp. *fuchsii* (Gmel.) Dur. Expres příznaků byla nejsilnější v měsíci květnu a červnu, kdy napadené rostliny projevovaly na listech silnou jasně žlutou mozaiku, často provázenou kroužky a nepravidelnými kresbami nebo celkovou chlorózu. V pozdějších měsících, v období chronické fáze infekce, se příznaky zmírňují, nově přirůstající listy bývají pak zcela bez příznaků, i když jsou stále infekční.

V té souvislosti jsme zjistili též ojediněle se vyskytující mozaikové ochuravění starčku celolistého *Senecio integrifolius* (L.) Clairv. ssp. *campester* (Retz.) Brig. et Cavill., projevující se nevýraznou světlezelenou mozaikou spojenou s deformací listů.

Podle dostupných literárních údajů mozaiková ochuravění obou druhů starčku dosud nebyla identifikovaná. Pouze N o v á k (1969) při výzkumu ochuravění bezu černého a bezu hroznatého, u kterých jako příčinné agens zjistil virus černé kroužkovitosti rajčete (tomato black ring virus - TBRV), upozornil na možnost infekce rostlin *S. nemorensis* tímto virem.

MATERIÁL A METODY

Virus černé kroužkovitosti rajčete jsme jako kausální agens obou mozaikových ochuravení určili na základě reakcí diferenčních hostitelských rostlin, specifických precipitačních linií v testech dvojité difúze v agaru a elektronomikroskopickým zjištěním izometrických virionů o průměru 30 nm.

Jako diagnostické jsme použili následující druhy hostitelských rostlin s těmito reakcemi:

Chenopodium amaranticolor Coste et Reyn. - chlorotické nekrotizující lokální léze, provázené systémovou vrcholovou nekrózou a chlorotickou skvrnitostí, někdy odumírání vrcholu;

Chenopodium quinoa Willd. - podobné příznaky jako u *C. amaranticolor*;
Cucumis sativus L. - systémová chlorotická skvrnitost;

Nicotiana tabacum L. cv. Samsun - chlorotické a nekrotické skvrny a kresby na inokulovaných listech a systémové nekrotické skvrny, linie a kresby, později slábnoucí a symptomatické uzdravení;

Petunia hybrida hort. ex Vilm. - chlorotické lokální léze s tmavými nekrotickými okraji a systémové prosvětlení nervatury s nekrózami.

Kontrolní izolát viru jsme získali ze sbírky Fytopatologického ústavu v Aschersleben, který na diagnostických druzích vyvolával příznaky shodné s výše uvedenými a byl též použit pro přípravu antiséra. Purifikace viru jsme provedli metodou, kterou navrhli H a r r i s o n, N i x o n (1960) a K e n - t e n (1972). Podle posledně jmenovaného autora jsme připravili antisérum a upravili test dvojité difúze v agaru.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Rozšíření TBRV v populacích starčku hajního Fuchsova jsme původně prokázali v kladenské oblasti. V lesních porostech ve Vrapici, v okolí Dolu Ludmila, v Rozdělově, Lubušíně a Vinařicích bylo v letech 1984 a 1985 napadení starčku prakticky stoprocentní. Tato zjištění stimulovala výzkum rozšíření ochuravení na dalších lokalitách v pásmu doubrav (200 - 500 m n.m.), v submontánním pásmu (500 - 1000 m n.m.), montánním pásmu (650 - 1200 m n.m.) a subalpinském pásmu. Experimentálně byly vyšetřeny vzorky odebrané celkem ze 16 lokalit na území Československa z oblasti středních Čech, Krkonoš, Šumavy, Orlických hor a na Slovensku z oblasti Vysokých Tater. Na všech lokalitách jsme zjistili symptomatické rostliny

starčku a v nich prokázali TBRV. Ve Vysokých Tatrách se infikované rostliny vyskytovaly ve velkém množství jedinců na Štrbském plese (1355 m n.m.) a na svazích nad Popradským plesem (1494 m n.m.). Lze tedy konstatovat, že TBRV je rozšířen ve starčku hajním prakticky všude, kde se nachází, tj. od 200 m n.m. až po 1500 m n.m.

Vpravdě masový výskyt TBRV v populacích starčku hajního Fuchsova lze vysvětlit přenosem viru semenem. Pozitivní přenos TBRV jsme prokázali semeny odebranými z rostlin, které projevovaly v akutní fázi infekce silné mozaikové příznaky. TBRV se podařilo detekovat v opakovaném pokuse v šesti, resp. osmi procentech semenáčů. S ohledem na vytrvalost a jeho značné rozšíření v lesních ekosystémech se lze domnívat, že je významným rezervoárem TBRV a hostitelem přispívajícím k perzistenci tohoto ekonomicky závažného viru v přírodních podmínkách. Výskyt mozaikového ochuravění *S. nemorensis* způsobeného TBRV se ve spontánních podmínkách nápadně kryje s výskytem tohoto viru na malinících, *Rubus idaeus*, rostoucích v bezprostřední blízkosti rostlin starčku (S m r ě k a , 1990).

V souvislosti s výzkumem rozšíření TBRV v porostech *S. nemorensis* byly zjištěny na třech lokalitách v kladenské oblasti (Rozdělov, Kamenné Žehrovice, okolí Dolu Nosek) ojedinělé rostliny *S. integrifolius* s nevýraznou světle zelenou mozaikou. Důkaz infekce těchto rostlin TBRV byl podán stejnými metodickými přístupy jako u *S. nemorensis*. Přítomnost TBRV nebyla prokázána v habituálně zdravých rostlinách.

Význam *S. integrifolius* z hlediska perzistence TBRV ve srovnání s *S. nemorensis* nebude patrně značný. Infekční rostliny se dosud nepodařilo zjistit na jiných lokalitách.

S. nemorensis a *S. integrifolius* jsou novými spontánními hostiteli TBRV.

L i t e r a t u r a

- HARRISON, B. D. - NIXON, H. L.: Purification and electron microscopy of three soilborne plant viruses. *Virology*, 12, 1960, s. 104-117.
 KENTEN, R. H.: The purification and some properties of cocoa necrosis virus, a serotype of tomato black ring virus. *Ann. appl. Biol.*, 71, 1972, s. 119-126.
 NOVÁK, J. B.: Isolation of a virus from *Sambucus* spp. and *Ligustrum vulgare* resembling the tomato black ring virus. *Rostl. Výr.*, 15, 1969, s. 517-520.
 SMRČKA, L.: Virus mozaiky huseníku a virus černé kroužkovitosti rajčete ve spontánně infikovaných rostlinách maliníku (*Rubus idaeus* L.). *Ochr. Rostl.*, 26, 1990 (4): 263-269.

**Z. Polák, Z. Procházková (Institute of Experimental Botany of
Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia)**

**Groundsels (*Senecio nemorensis* ssp. *fuchsii* and *S. integrifolius*)
as natural hosts of tomato black ring virus**

Spontaneous infection of the two groundsels, *Senecio nemorensis* ssp. *fuchsii* and *S. integrifolius*, occurring in forest ecosystems, is caused by the tomato black ring virus (TBRV). In the former species, the infection with this virus occurs in almost all localities where the groundsel grows, i.e. from 200 to 1500 m above sea level. The dissemination of the disease in forests should be caused by seed transmission of the virus. In our repeated experiments with seedlings grown from seeds from severely infested plants 6 and 8 % of young plants were demonstrated to be infectious. TBRV infection of *S. integrifolius* was demonstrated only in plants found in three localities close to the city of Kladno. Both groundsel species are new hosts of the virus.

Senecio nemorensis ssp. *fuchsii*; *S. integrifolius*; tomato black ring virus

PŘÍPRAVA ANTISÉRA PROTI VIRU LATENTNÍ KROUŽKOVITOSTI JAHODNÍKU A IZOLACE PROTILÁTEK VHODNÝCH PRO ELISA

Jan KŘÍSTEK, Jaroslav POLÁK

Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6-Ruzyně

Metoda purifikace viru latentní kroužkovitosti - strawberry latent ringspot virus (SLRV) vhodná pro přípravu specifického antiséra je založena na čerění št'ávy n-oktanoem a diferenciální centrifugací. Při purifikaci viru touto metodou bylo získáno 5 až 10 mg viru ze 100 g infikovaných listů rostlin *Chenopodium quinoa* Willd. Antisérum proti SLRV bylo získáno imunizací králíků kombinací intravenózních injekcí antigenu a intramuskulárních injekcí s Freundovým adjuvans. Slabá nespecifická reakce byla odstraněna vysycením antiséra afinitní chromatografií se Sepharosou 4B, aktivovanou bromkyanem. Titr protilátek připravených antisér stanovený metodou dvojité radiální difúze v agaru byl 1:512, resp. 1:1024. Z antisér byly izolovány imunoglobuliny proti SLRV a konjugovány se křenovou peroxidasou a alkalickou fosfátasou. Oba enzymy byly ke konjugaci protilátek stejně vhodné. Minimální koncentrace spolehlivého stanovení viru byla 7,8 ng/ml. Pro elektronomikroskopické stanovení SLRV byla vhodnější purifikační metoda s použitím n-butanolu a chloroformu k čerění št'ávy. Výťažnost viru byla podstatně nižší (0,5 mg/100 g). Elektronomikroskopické preparáty obsahovaly izometrické částice 30 nm, typické pro SLRV.

virus latentní kroužkovitosti jahodníku; purifikace; imunizace; antisérum; afinitní chromatografie; izolace protilátek; DAS-ELISA; elektronová mikroskopie

Virus latentní kroužkovitosti jahodníku - strawberry latent ringspot virus (SLRV), patří do skupiny nepovirů a infikuje řadu druhů kulturních rostlin, především drobné ovoce a révu vinnou (např. M u r a n t , 1981). V Československu byl SLRV prokázán v kulturách třešně (N o v á k , L a n z o v á , 1975), jahodníku (N o v á k , L a n z o v á , 1979) a meruněk (Č e c h et al., 1979). Patří proto mezi hospodářsky významné viry, k jejichž diagnóze je účelné uplatnit sérologické a imunoenzymatické metody. Účinný způsob purifikace nepovirů vypracovali H a r r i s o n a N i x o n (1960).

Virus latentní kroužkovitosti jahodníku purifikovali např. L i s t e r (1964), R i c h t e r , P r o l l (1970) a M a y o et al. (1974). Virus byl po vyčerění št'ávy koncentrován diferenciální centrifugací, vysrážen polyetylglykolem, nebo separován gelovou giltrací na Sepharose 2B.

K dalšímu čištění byla použita ultracentrifugace na sacharózovém gradientu. Uvedenými metodami purifikace lze získat 1-2 mg SLRV ze 100 g rostlinného materiálu. Preparáty viru byly použity k imunizaci a přípravě antiséra, příp. k jiným účelům. V sérodiagnóze SLRV se dosud používaly testy radiální difúze v agaru.

Cílem naší práce bylo připravit preparát SLRV vhodný pro imunizaci pokusných zvířat a získat specifické antisérum a protilátky vhodné pro uplatnění v imunoenzymatických testech.

MATERIÁL A METODY

Udržování a množení viru

Pracovali jsme s izolátem viru latentní kroužkovitosti jahodníku ROT-2 z Fytopatologického ústavu v Aschersleбену. Virus byl získán z infikovaných listů okurky seté, které byly dlouhodobě uchovávány nad chloridem vápenatým v sušeném stavu. Virus byl nejprve pasážován na okurce seté odrůda Pálava, k purifikačním účelům byl množen na merlíku čilském *Chenopodium quinoa* Willd. Virus jsme přenášeli mechanickou inokulací. Listy infikovaných rostlin jsme homogenizovali v 0,066M fosfátovém pufru podle Sørensenů pH 7,0. Na jeden gram listů jsme použili 2 ml pufru. Rostliny merlíku čilského jsme inokulovali ve stadiu 8-10 pravých listů. Listy byly před inokulací poprášeny karborundem 600 mesh. Příznaky systémové mozaiky se objeví během sedmi dní. Infikované listy jsme za 10 až 14 dní po inokulaci rostlin použili k purifikaci SLRV.

Virový antigen a testování protilátek

K testování připravených protilátek jsme jako antigen použili šťávu z rostlin merlíku čilského infikovaných virem a jako kontrolu šťávu ze zdravých rostlin *C. quinoa*. Listy rostlin jsme homogenizovali v extrakčním pufru, na 1 g listů jsme použili 10 ml pufru.

Při zjišťování citlivosti imunoenzymatického testu jsme jako antigen použili purifikovaný SLRV a virus ředili extrakčním pufrem geometrickou řadou. Citlivost testu jsme stanovili protilátkami značkovánými křenovou peroxidázou čs. produkce. Výsledky testu jsme hodnotili fotometrem (microelisa reader, fy Dynatech). Při použití IgG značkových křenovou peroxidázou jsme hodnoty odečítali při 488 nm, při použití IgG značkových alkalickou fosfatázou při 405 nm.

Elektronová mikroskopie

Částečně purifikovaný SLRV jsme ředili 4% roztokem fosfowolframanu sodného pH 7,5 1:2 až 1:5 a inkubovali 30 až 60 vteřin. Potom jsme vzorky nakápli na elektronomikroskopické sítky fy Tesla Brno potažené formwarovou membránou. Přbytek suspenze jsme odsáli filtračním papírem a po vysušení prohlíželi elektronovým mikroskopem Tesla BS 500.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Purifikace viru

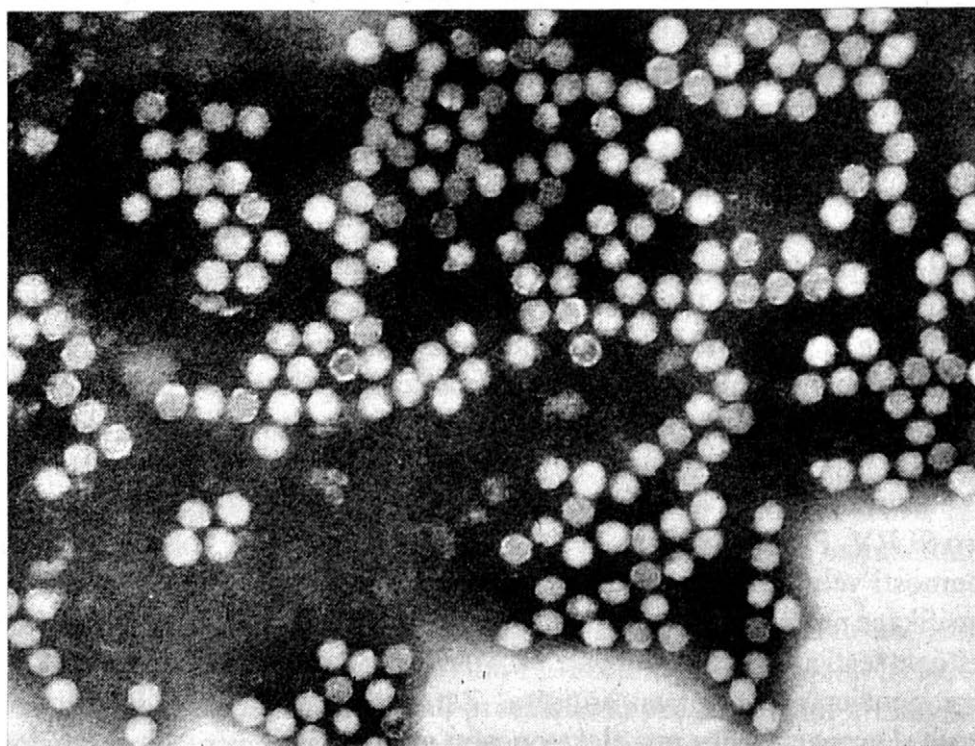
Při purifikaci SLRV za účelem imunizace pokusných zvířat jsme použili modifikaci metody, kterou popsal P o l á k (1972). Sto gramů listů rostlin merlíku čilského infikovaných SLRV s příznaky systémové mozaiky jsme homogenizovali v 0,02M fosfátovém pufru pH 8,0 s přísadou 10 mM dvojsodné soli kyseliny etylendiaminotetraoctové (EDTA) v poměru 1 g listů a 2 ml pufru. Homogenát jsme zfiltrovali přes nylonovou tkaninu a odstředili při 4 °C na odstředivce MLW (Janetzki) K 24 10 minut při 10 000 g. K supernatantu jsme přidali 10 hmotnostních procent sacharózy a tři objemová procenta n-oktanolu. Po protřepání (tři minuty) v dělicí nálevce jsme virus ze suspenze koncentrovali ultracentrifugací 1,5 hodiny při 105 000 g v rotoru 30 ultracentrifugy L-8-55 Beckman při 4 °C. Flotovaný chlorofyl a supernatant jsme odstranili. Sediment jsme resuspendovali ve 12 ml 0,02 M fosfátového pufru pH 8,0 obsahujícího 10 % sacharózy a pak odstředili 10 minut při 10 000 g. Supernatant jsme odstředili 90 minut při 105 000 g a 4 °C. Sediment jsme resuspendovali v 1 až 2 ml 0,02M fosfátového pufru pH 8,0. Po krátkém odstředění při 10 000 g jsme preparát uchovávali jako částečně purifikovaný virus při 4 °C pro imunizaci pokusných zvířat.

Stanovení množství viru jsme provedli na základě extinkčního koeficientu pro SLRV. Poměr extinkce $E_{260/280}$ byl roven 1,6 až 1,7, což svědčí o přítomnosti velmi čistého nukleoproteinu. Virus připravený touto metodou purifikace neztrácel biologickou aktivitu. Preparát byl dlouhodobě infekční ještě po šesti měsících skladování při 4 °C. Proto byla tato metoda purifikace viru použita pro přípravu antiséra. Zároveň se však nedařilo připravit kvalitní preparáty viru pro elektronovou mikroskopii.

Pro přípravu elektronogramů jsme použili metodu purifikace viru (H a r r i s o n, N i x o n, 1960). Listy *C. quinoa* (40 g) infikované SLRV jsme homogenizovali ve 200 ml směsi pufru a organických rozpouštědel

ve složení: 20 ml 0,2M hydrogen fosforečnanu sodného, 20 ml 0,1M kyseliny askorbové a 160 ml n-butanolu a chloroformu v poměru 1:1. Homogenát jsme odstředili 20 minut při 1000 g a 4 °C. Supernatant jsme inokubovali 20 hodin při pokojové teplotě a vysrážené nečistoty odstranili krátkým odstředěním při 1000 g. Virus jsme koncentrovali ultracentrifugací při 105 000 g po dobu 90 minut. Konečný preparát v 0,03M fosfátovém pufru pH 7,0 o objemu 1 až 2 ml jsme uchovávali při 4 °C a použili pro elektronovou mikroskopii.

Ze 100 g listů infikovaných rostlin merlíku čilského bylo získáno 0,5 mg viru latentní kroužkovitosti jahodníku. Poměr extinkce $E_{260/280}$ byl roven 1,7. Preparáty byly vhodné pro kontrastování částic fosfowolframanem sodným. Na elektronogramu (obr. 1) je možné pozorovat množství částic SLRV hexagonálního tvaru, velikosti cca 30 nm, z nichž některé neobsahují nukleovou kyselinu. Tvar a velikost částic odpovídá literárním údajům (Lister, 1964; Murrant, 1974, 1981).



1. Elektronogram částečně purifikovaného viru latentní kroužkovitosti jahodníku (Celkové zvětšení 136 000x) - Electrogram of partly purified virus of strawberry latent ringspot (Total magnification 136 000x)

Imunizace pokusných zvířat a příprava antiséra

- 1. den - 1 mg antigenu intravenózně
- 58. den - 9 mg antigenu (v 1 ml) + 1 ml kompletního Freundova adjuvans intramuskulárně
- 78. den - 2 mg antigenu (v 1 ml) + 1 ml nekompletního Freundova adjuvans intramuskulárně
- 96. den - 2,5 mg antigenu (v 1 ml) + 1 ml nekompletního Freundova adjuvans intramuskulárně
- 103. den - krvácení

Byla imunizována celkem dvě pokusná zvířata (králíci). Antisérum jsme připravili oddělením séra od krevního koláče po inkubaci 2 hodiny při 37 °C a 16 hodin při 4 °C a odstředěním 30 minut při 3000 ot./min.

Imunodifúzní testy jsme stanovili metodou dvojité radiální difúze do agaru podle Ouchterlonyho. Imunodifúzní testy jsme prováděli v Petriho miskách v 1% agarovém gelu. Agar byl připraven v 0,5M K_2HPO_4 , 0,01M EDTA a 0,02 % azidu sodného. Antisérum jsme ředili geometrickou řadou fyziologickým roztokem a pipetovali po 5 ml do jamek kolem centrální jamky s antigenem. Titr protilátek připravených antisér byl 1:512 u prvního pokusného zvířete a 1:1024 u druhého pokusného zvířete. Antisérum připravené z druhého pokusného zvířete reagovalo do zředění 1:4 se šťávou ze zdravé rostliny merlíku čilského.

Afinitní chromatografie připraveného antiséra

Nespecifickou reakci jsme eliminovali vysycením antiséra afinitní chromatografií se Sepharosou 4B, aktivovanou bromkyanem. Deset gramů Sepharosy jsme míchali v 80 ml HCl ($c = 0,001$ mol/l) do vzniku gelu. Po promytí přebytkem 0,1M borátového pufru pH 8,3 s NaCl ($c = 0,5$ mol/l) a odsátí do sucha jsme Sepharosu míchali tři hodiny s 6,5 ml odstředěné šťávy ze zdravých rostlin *C. quinoa*, kterou jsme zředili fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem (PBS) v poměru 1:1. Nenavázané proteiny spolu se zbytky rostlinné šťávy jsme vyplavili přebytkem borátového pufru a PBS. Takto upravenou Sepharosou 4B jsme naplnili kolonu. Antisérum (6,5 ml) jsme vysytili průchodem přes kolonu se Sepharosou. Vysycené antisérum jsme použili k izolaci specifických imunoglobulinů SLRV.

Izolace protilátek

Z antiséra zbaveného afinitní chromatografií nespecifických protilátek jsme izolovali imunoglobuliny srážením nasyceným roztokem síranu amonného. Antisérum bylo nejprve ředěno ekvivalentním objemem fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem (PBS) a pak jsme přidávali za stálého míchání po kapkách nasycený roztok síranu amonného v poměru 1 ml antiséra : 0,8 ml síranu amonného. Precipitát jsme odstředili 10 minut při 1000 g a sediment rozpustili v původním neředěném objemu antiséra v PBS. Precipitaci jsme dvakrát opakovali. Zbytky síranu amonného jsme odstranili dialýzou proti 1 l 0,03M acetátového pufru pH 7,0 s pěti výměnami pufru. Imunoglobuliny jsme pak čistili mícháním s 0,6 g DEAE celulózy (Whatman) po dobu 45 minut. Celulózu jsme z roztoku imunoglobulinů odstranili filtrací přes fritu S-3 a roztok dialýzovali proti 0,005M Na_2HPO_4 . Imunoglobuliny jsme lyofilizovali a uchovávali při 4 °C.

Konjugace protilátek enzymy

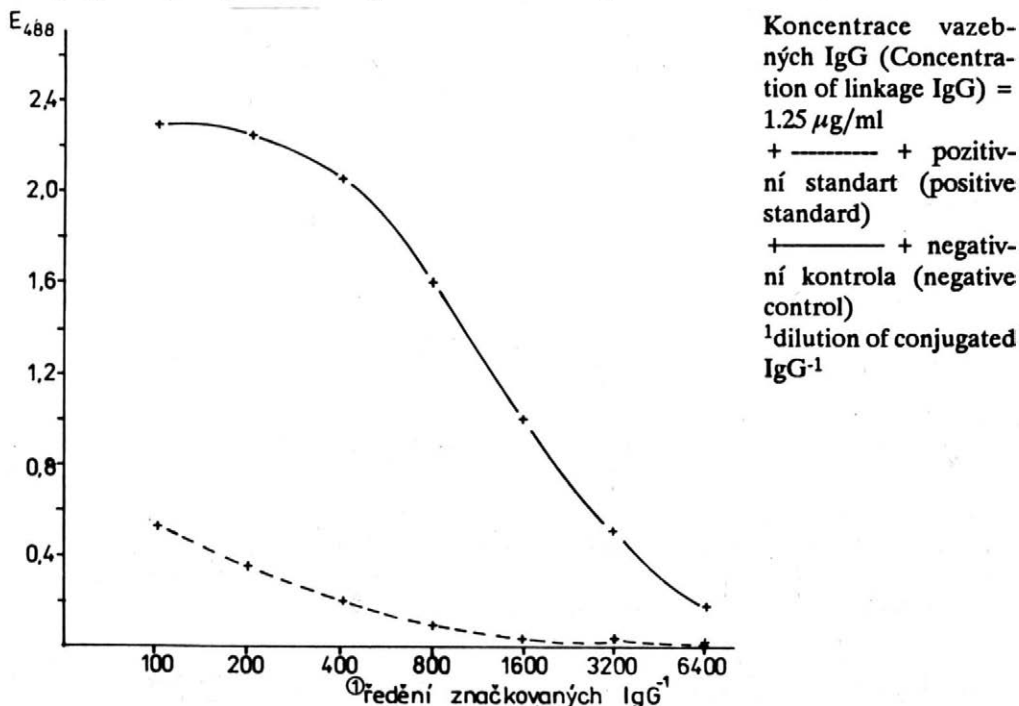
Konjugaci protilátek alkalickou fosfatázou jsme prováděli metodou, kterou popsali Clark a Adams (1977). Použili jsme alkalickou fosfatázu fy Boehringer-Manheim s enzymatickou aktivitou 2500 U/mg. K 1 mg IgG rozpuštěných v PBS jsme přidali 2 mg alkalické fosfatasy. Po promíchání jsme přidali 20 μl 2,5 % glutaraldehydu ředěného PBS. Po protřepání jsme směs inokulovali čtyři hodiny při pokojové teplotě. Glutaraldehyd jsme pak odstranili dialýzou proti 500 ml PBS s trojnásobnou výměnou pufru. Značkové IgG jsme stabilizovali 1% hovězím sérovým albuminem a konzervovali 0,02% azidem sodným.

Konjugaci protilátek peroxidázou z křenu jsme prováděli oxidační jodistanovou metodou (Wilson, Nakane, 1978). Použili jsme peroxidasu z křenu čs. výroby (Ústav sér a očkovacích látek, o.p.) s enzymatickou aktivitou $\text{RZ} = 2,85 \pm 210$ U/ml. Ke konjugaci jsme použili 5 mg IgG a 7,5 mg peroxidasy. Postup konjugace je uveden v práci Pollák a Křístek (1988). Značkové IgG jsme stabilizovali 1% hovězím sérovým albuminem a konzervovali 0,001% merthiolátem sodným.

Testování protilátek SLRV pomocí ELISA

Optimální koncentrace IgG SLRV pro potažení desek byla 1,25 $\mu\text{g/ml}$ a optimální ředění IgG konjugovaných křenovou peroxidásou 1 : 800 až

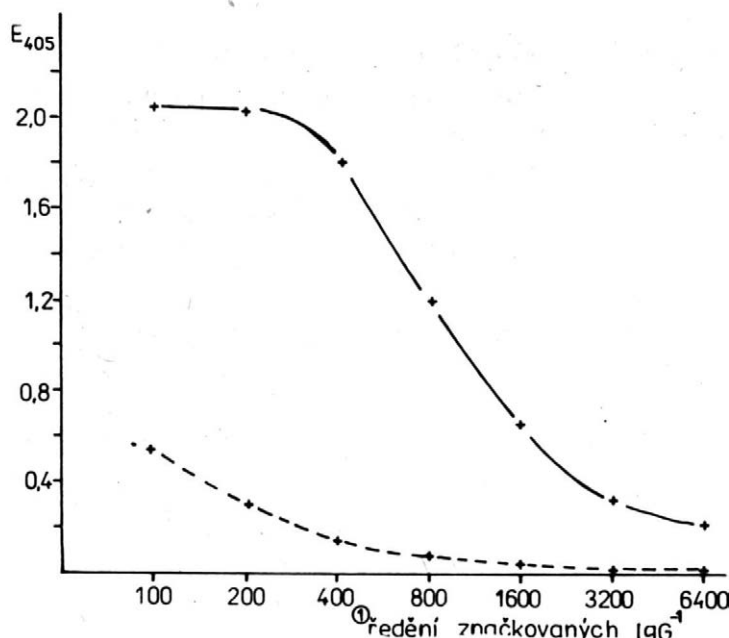
1 : 1600 (obr. 2). Při vyšší koncentraci IgG než $2,5 \mu\text{g/ml}$ stoupla extinkce vzorků ze zdravých kontrolních rostlin, stejně tak i při nízkém ředění konjugovaných protilátek (1 : 100 až 1 : 400).



2. Stanovení optimálního rozsahu ředění IgG značkových křenovou peroxidasou pro detekci viru latentní kroužkovitosti jahodníku imunoenzymatickým testem - Determination of the optimum extent of IgG dilution by horse-radish peroxidase for detection of strawberry latent ringspot by the immunoenzyme assay

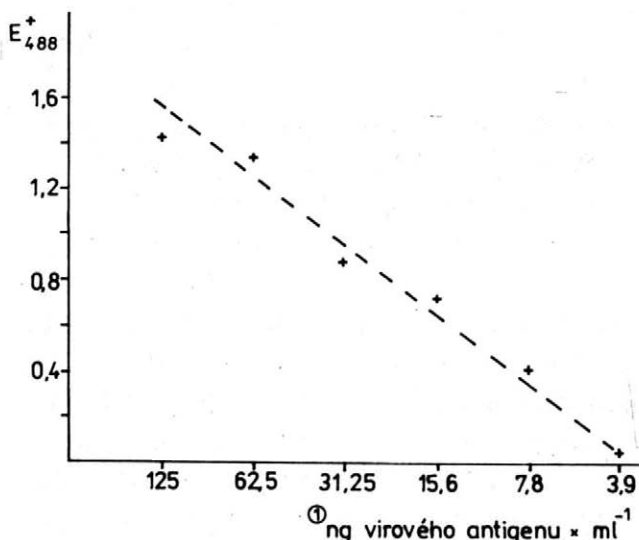
Optimální koncentrace IgG SLRV pro potažení desek byla $2,5 \mu\text{g/ml}$ a optimální ředění IgG konjugovaných alkalickou fosfatasou 1 : 400 až 1 : 800 (obr. 3). Vyšší koncentrace IgG pro potažení desek a nižší ředění konjugovaných protilátek mělo za následek vyšší hodnoty extinkce vzorků ze zdravých kontrolních rostlin.

Získané výsledky dokazují, že použití křenové peroxidasy nebo alkalické fosfatasy ke konjugaci protilátek je rovnocenné a poskytuje dobře reprodukováné výsledky. Při zajišťování citlivosti testu jsme použili purifikovaný virus latentní kroužkovitosti jahodníku. Virus jsme ředili v extrakčním pufru geometrickou řadou. Výchozí koncentrace byla 128 ng/ml , konečná koncentrace $0,24 \text{ ng/ml}$. Do koncentrace viru $62,5 \text{ ng/ml}$ byla extinkce vyšší než 1,0. Nejnižší koncentrace viru, kterou bylo možné spolehlivě stanovit, byla $7,8 \text{ ng/ml}$, kdy byla extinkce 0,42 (obr. 4).



3. Stanovení optimálního rozsahu ředění IgG značkových alkalickou fosfatázou pro detekci viru latentní kroužkovitosti jahodníku imunoenzymatickým testem - Determination of the optimum dilution of IgG conjugated by alkaline phosphatase for detection of strawberry latent ringspot virus by the immunoenzyme assay

Dosaženými výsledky jsme prokázali, že připravené antisérum proti SLRV a izolované protilátky jsou vhodné ke stanovení viru latentní kroužkovitosti jahodníku imunoenzymatickým testem.



4. Citlivost detekce viru latentní kroužkovitosti jahodníku imunoenzymatickým testem - Sensitivity of detection of strawberry latent ringspot by the immunoenzyme assay

Literatura

- CLARK, M. F. - ADAMS, A. N.: Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. gen. Virol.*, 33, 1977, s. 165-167.
- ČECH, M. - FILIGAROVÁ, M. - POZDĚNA, J. - BRANIŠOVÁ, H.: Strawberry latent ringspot and cucumber green mottle mosaic viruses with bare twigs and unfruitfulness disease syndrome. In: XIth Intern. Symp. Fruit Virus Dis. 1979, s. 84.
- HARRISON, E. D. - NIXON, H. L.: Purification and electron microscopy of three soil-borne plant viruses. *Virology*, 12, 1960, s. 104-117.
- LISTER, R. M.: Strawberry latent ringspot virus: a new nematode borne virus. *Ann. appl. Biol.*, 54, 1964, s. 167-176.
- MAYO, M. A. - MURANT, A. F. - HARRISON, B. D. - GOOLD, R. A.: Two protein and two RNA species in particles of strawberry latent ringspot virus. *J. gen. Virol.*, 24, 1974, s. 29-37.
- MURANT, A. F.: Strawberry latent ringspot virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant viruses, No 126, 1974.
- MURANT, A. F.: Nepoviruses. In: KURSTAK, E. (Ed.): Handbook of plant viruses infection. Elsevier North Holland Biomedical Press 1981, s. 198-224.
- NOVÁK, J. B. - LANZOVÁ, J.: K etiologii zhoubné rakoviny třešně. In: Sbor. Vys. Šk. zeměd. Praha, Fak. agron., 23, 1975, s. 205-223.
- NOVÁK, J. B. - LANZOVÁ, J.: Dva v Československu nově izolované latentní viry jahodníku. In: Sbor. Vys. Šk. zeměd. Praha, Fak. agron., 31, 1979, s. 203-207.
- POLÁK, J.: Příprava specifického antiséra s vysokým titrem proti viru žloutenky řepy. *Ochr. Rostl.*, 8, 1972, s. 113-116.
- POLÁK, J. - KRÍSTEK, J.: Use of horseradish-peroxidase labelled antibodies in ELISA for plant virus detection. *Phytopath. Z.*, 122, 1988, s. 200-207.
- WILSON, M. B. - NAKANE, P. K.: Recent development in the periodate method of conjugating horse-radish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W. - HOLUBAR, K. - WICK, G. (Eds.): Immunofluorescence and related staining techniques. Elsevier North-Holland Biomed. Press, 1978, s. 215-224.

Došlo dne 15. 3. 1990

J. Křístek, J. Polák (Research Institute for Crop Production,
Praha-Ruzyně, Czechoslovakia)

The preparation of antiserum against strawberry latent ringspot virus and isolation of antibodies suitable for ELISA

Virus isolate ROT-2 (from the Institute for Phytopathology Aschersleben, Germany) was used in the investigation of the purification of the strawberry latent ringspot virus (SLRV). The virus was maintained on cucumber and was propagated on Chilean goosefoot. Leaves of *C. quinoa* with symptoms of systemic infection were used for purification of the virus. For electron microscopy the preparations of partially purified SLRV were negatively stained with a 4% solution of sodium phosphowolframate, pH 7.5. The prepared antibodies were tested in sap from the virus-infected and healthy plants of *C. quinoa*. Purified SLRV was used as antigen in the determination of ELISA sensitivity. Procedure of SLRV purification: 100 grammes of

leaves of SLRV -infected *C. quinoa* plants showing symptoms of systemic mosaic were homogenized in 0.02M phosphate buffer at a pH of 8.0 with an addition of 10 mM ethylenediamino tetraacetic acid (EDTA) disodium salt at a ratio of 1 g of leaves per 2 ml of buffer. The homogenate was filtered through a nylon cloth and separated by means of a MLW Janetzki K 24 centrifuge for 10 minutes at 10 000 g at 4°C. Ten percent (by volume) of sucrose and 3 % (by vol.) of n-octanol were added to the supernatant. After shaking in a separating funnel, the virus was concentrated from the emulsion by ultracentrifugation (1.5 h at 105 000 g in rotor 30 of the L 8-55 Beckman centrifuge at 4°C). The floated chlorophyll was removed together with the supernatant. The sediment was resuspended in 12 ml of 0.02M phosphate buffer at pH 8.0, containing 10 % sucrose; then it was centrifuged at 10 000 g for 10 min. The supernatant was centrifuged for 90 min at 105 000 g and at 4°C. The sediment was resuspended in 1 to 2 ml of 0.02M phosphate buffer at pH 8.0. After a short centrifugation at 10 000 g, the preparation was kept as a partially purified virus at 4°C for immunization of animals. Virus determination was performed on the basis of extinction coefficients for SLRV. The $E_{260/280}$ extinction ratio was 1.6 to 1.7, which indicates the presence of a very pure nucleoprotein. The virus preparation remained infectious for a long time, still after six months of storage at 4°C. This is the reason why the method was used to prepare the antiserum. However, the electron microscopy of these preparations failed to be performed at a good quality. Therefore the virus purification method after Harrison and Nixon (1960) was used for the preparation of the electronogrammes. The virus yield was smaller (0.5 mg of SLRV per 100 g of infected *C. quinoa* plants). Nevertheless, high quality SLRV electronogrammes were obtained. The experimental animals were immunized by means of a combination of intravenous injections and intramuscular injections of antigen with Freund's adjuvant. The titre of the antibodies of the prepared antisera, determined by the double radial diffusion method, was 1 : 512 and 1 : 1024, respectively. The slight non-specific reaction was removed by saturation of the antiserum by means of affinity chromatography with Sepharose 4 B, activated by means of bromine cyanide. From the antisera, immunoglobulins against SLRV were isolated and were conjugated with horse radish peroxidase and alkaline phosphatase. Both enzymes showed the same suitability for conjugation of antibodies. The minimum concentration for a reliable virus determination was 7.8 ng/ml.

strawberry latent ringspot virus; immunization; antiserum; affinity chromatography; isolation of antibodies; DAS-ELISA; electron microscopy

DYNAMIKA REPRODUKCE VIRU MOZAIKY HUSENÍKU V ROSTLINÁCH *PETUNIA HYBRIDA* CV. LAVINA

Luboš SMRČKA

Ústav experimentální botaniky ČSAV, Na Karlovce 1, 16000 Praha

Změny reprodukce použitých izolátů viru mozaiky huseníku (AMV) v nadzemních pletivech rostlin *Petunia hybrida* cv. Lavina od 3. do 12. dne po inokulaci rostlin jsem sledoval metodou DAS ELISA s IgG značenými peroxidasou z křenu. Zjistil jsem, že izolát z ptačího zobu obecného a oba použité izoláty z maliníku dosahují maximální reprodukci viru ve vzorku 8. den, kdežto izolát z révy vinné 9. den po inokulaci rostlin. Nejvyšší koncentraci viru v rostlinách jsem zjistil po inokulaci AMV pocházejícím ptačího zobu obecného.

virus mozaiky huseníku; koncentrace; ELISA

Virus mozaiky huseníku - arabis mosaic virus (AMV) náleží do skupiny nepovírů a je v přírodě značně rozšířeným virem, který napadá jak hospodářsky významné, tak i planě rostoucí rostliny (M u r a n t, 1970; S c h m e l - z e r, 1963).

Podle literárních údajů se nepoviry vyskytují v hostitelích v nízké koncentraci. Např. H a n s o n a C a m p b e l l (1979) dosáhli při purifikaci viru latentní kroužkovitosti jahodníku průměrný výtěžek viru 0,1 mg na 100 g listů. W a t e r w o r t h (1975), který množil AMV v rostlinách *Chenopodium quinoa* a porovnával různé purifikační postupy, dosáhl výtěžků viru v rozmezí 0,22 - 1,05 mg na 100 g listů v závislosti na použité metodě. F i l i g a r o v á a P o l á k (1983) dosáhli při použití jedné purifikační metody a různých odrůd rostlin *P. hybrida* výtěžků, které se pohybovaly v rozmezí od 0,08 do 1,78 mg viru na 100 g infekčního materiálu v závislosti na použité odrůdě. Tito autoři rovněž zjistili, že s prodlužující se dobou infekce dochází k poklesu obsahu viru v rostlinách. Je tedy zřejmé, že maximální výtěžek viru je ovlivněn nejen zvolenou purifikační metodou a použitou hostitelskou rostlinou, ale též vhodně zvolenou dobou sklizně infekčního rostlinného materiálu.

Cílem práce bylo porovnat dynamiku reprodukce izolátů AMV z různých hostitelů v nadzemních částech rostlin *P. hybridum* cv. Lavina a stanovit, který den po inokulaci kulminuje reprodukční křivka viru za účelem optimalizace podmínek při purifikaci viru, a rovněž zjistit, zda se koncentrace viru v rostlinách výrazně neliší v závislosti na použitém izolátu viru.

MATERIÁL A METODY

Použité izoláty AMV

K přenosům jsem použil izoláty různé geografické provenience. Dva vlastní izoláty AMV jsem získal přenosem z listů spontánně ochuravělých maliníků, *Rubus ideaus* L. (izoláty jsou označeny 1AMV a 2AMV). Pro srovnání jsem použil izolát z révy vinné, *Vitis vinifera* L. (izolát, PV45) a z ptačího zobu, *Ligustrum vulgare* L. (izolát PV46). Oba tyto izoláty mi poskytl dr. G. A d a m z Biologische Bundesanstalt v Braunschweigu v SRN.

Stanovení obsahu AMV

Stanovení obsahu AMV jsem prováděl sérologicky metodou DAS-ELISA. Pro sestavení kalibračních křivek koncentrace AMV jsem použil izolát viru, který byl užít k přípravě antiséra. Jedná se o izolát maďarského původu z *Forsythia suspensa* Vahl. Virus jsem purifikoval podle návodu, který uveřejnila F i l i g a r o v á (1982). Koncentraci viru jsem určil z naměřené hodnoty absorbance při 260 nm a známého absorpčního koeficientu pro AMV (W a t e r w o r t h, 1975). Z virového purifikátu o známé koncentraci jsem připravil ředící řadu, kterou jsem nanášel na stejnou destičku pro ELISA společně s vyšetřovanými vzorky. Používal jsem výhradně destičky firmy Dynatech.

Kalibrační křivky závislosti obsahu viru na absorbanci jsem vyhodnocoval na každé destičce tak, že jsem získanými hodnotami proložil pomocí metody nejmenších čtverců polynom 3. řádu (ten nejlépe vystihoval sigmoidní závislost koncentrace AMV na absorbanci) a z této křivky jsem pak ke zjištěné hodnotě absorbance odečetl odpovídající obsah AMV v testovaném vzorku. Použitý polynom měl tvar $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, kde hodnota y udávala zjištěnou absorbanci při vlnové délce 490 nm a hodnota x byla vyjádřena jako přirozený logaritmus koncentrace AMV (Š í m a et al., 1985). K výpočtům jsem používal počítač IBM PC a program firmy ÚSOL "Kvantitativní imunochemické analytické metody".

V pokusech jsem pracoval s rostlinami *P. hybrida* cv. Lavina, který jsem pěstoval v klimatizačním boxu Heraeus-Vötsch při teplotě 18-22 °C, osvětlení 10 000 luxů, délce dne 10 hodin a vlhkosti 80 %. Tyto rostliny jsem inokuloval homogenátem připraveným z listů rostlin *P. hybrida* cv. Lavina infikovaných jednotlivými sledovanými izoláty AMV v 0,02M fosfátovém pufru o pH 7,2. Odběry jsem prováděl od 3. do 12. dne po inokulaci. Každý den jsem odebíral nadzemní části ze tří infikovaných rostlin. Tyto vzorky jsem

jednotlivě uložil do hliníkové fólie a uchovával v mrazícím boxu při -20°C až do zpracování. Takto konzervovaný materiál jsem zpracovával týden po ukončení odběrů.

Vzorky pro imunoenzymatická stanovení jsem připravoval homogenizací zmražených rostlinných pletiv v extrakčním pufru. Používal jsem ředění vzorku 32, 128, 512 a 1024. Jednotlivá ředění jsem nanášel ve dvou opakováních.

Hranice pozitivní reakce jsem určil z naměřených hodnot absorbance negativní kontroly při 490 nm podle vzorce $x + 3s$, kde x je aritmetický průměr a s je směrodatná odchylka (S u t u l a et al., 1986).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při sledování dynamiky reprodukce AMV v nadzemních pletivech *P. hybrida* cv. Lavina jsem dosáhl prvních pozitivních výsledků, tzn. hodnot absorbance vyšších než byla vypočtená hranice negativní kontroly, ve vzorcích odebraných třetí den po inokulaci rostlin. Tyto hodnoty se však při ředění šťávy z infekčních rostlin 1 : 32 pohybovaly ve spodní části kalibračních křivek, tedy mimo oblast doporučenou pro výpočet koncentrace viru ve vzorku (H i l l, 1984; M a n ě a l, 1987). Proto jsou uvedené koncentrace AMV ve vzorku třetí den po inokulaci rostlin pouze orientační. Pro dosažení přesnějších výsledků by bylo nutné použít v těchto fázích infekce menšího ředění vzorků. Jinak použité ředění šťávy z infekčních pletiv *P. hybrida* cv. Lavina (32, 128, 512 a 1024) bylo vyhovující.

Nalezené hodnoty koncentrace použitých izolátů AMV ve vzorcích připravených z nadzemních částí rostlin *P. hybrida* cv. Lavina od 3. do 12. dne po inokulaci přehledně uvádí tab. I a průběh křivek reprodukce použitých izolátů viru je zachycen na obr. 1.

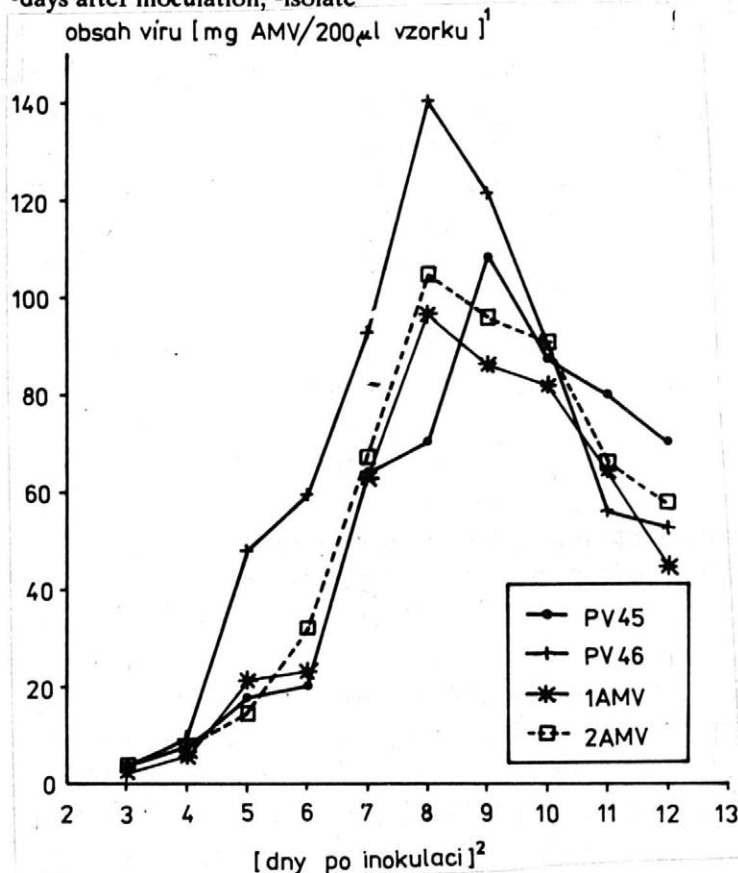
Pokusy se sledováním dynamiky reprodukce viru v rostlinách prováděli ELISA testem např. D a n i e l, M u n z e r t (1982), W i e d e m a n (1984), T a m a d a, H a r r i s o n (1980) a W e t t e n et al. (1983). Ve všech případech autoři použili konjugátu IgG s alkalickou fosfatase a změnu reprodukce odvozovali ze zjištěných hodnot absorbance. S e l a a R e i c h - m a n (1984) porovnávali dynamiku reprodukce viru mozaiky tabáku v discích z listových pletiv *N. tabacum* stanovenou metodou ELISA s hodnotami zjištěnými technikou "dot" hybridizace. Autoři dosáhli metodou ELISA prvních pozitivních výsledků již 24 hodin po inokulaci listových disků.

Zjištěná maxima reprodukce AMV ve vzorku osmý den (u izolátu 1AMV, 2AMV a PV46) a devátý den po inokulaci (u izolátu PV45) jsou

I. Dynamika reprodukce AMV ve šťávě z *Petunia hybrida* cv. Lavina od 3. do 12. dne po inokulaci rostlin v μg na 200 μl vzorku (výsledky jsou vyjádřeny jako $x \pm s_x$) - AMV reproduction pattern in the juice of *Petunia hybrida* cv. Lavina from the 3rd to 12th day after inoculation of the plants in μg per 200 μl of sample (results expressed as $x \pm s_x$)

Den po inokulaci ¹	Izolát ²			
	PV45	PV46	1AMV	2AMV
3.	4,0 $\pm$ 0,15	2,9 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,13	3,7 $\pm$ 0,15
4.	7,2 $\pm$ 0,26	9,2 $\pm$ 0,58	5,6 $\pm$ 1,86	7,8 $\pm$ 0,33
5.	17,6 $\pm$ 0,73	48,0 $\pm$ 1,24	21,3 $\pm$ 0,55	14,4 $\pm$ 1,00
6.	20,0 $\pm$ 0,77	59,2 $\pm$ 2,96	23,2 $\pm$ 0,44	32,0 $\pm$ 1,20
7.	64,0 $\pm$ 2,23	92,8 $\pm$ 4,27	63,0 $\pm$ 3,32	67,2 $\pm$ 2,63
8.	70,4 $\pm$ 2,35	140,8 $\pm$ 6,40	96,8 $\pm$ 1,84	104,8 $\pm$ 4,87
9.	108,8 $\pm$ 2,54	121,6 $\pm$ 6,00	86,4 $\pm$ 1,30	96,0 $\pm$ 5,15
10.	87,6 $\pm$ 2,05	89,6 $\pm$ 3,10	82,0 $\pm$ 2,52	90,8 $\pm$ 0,48
11.	80,0 $\pm$ 3,70	56,0 $\pm$ 2,33	64,6 $\pm$ 1,72	66,2 $\pm$ 2,28
12.	70,4 $\pm$ 4,27	52,8 $\pm$ 1,92	44,8 $\pm$ 1,95	58,0 $\pm$ 1,69

¹days after inoculation; ²isolate



¹virus content (mg AMV/200 μl of the sample); ²days after inoculation

1. Porovnání křivek reprodukce použitých izolátů AMV v nadzemních pletivech *P. hybrida* cv. Lavina od 3. do 12 dne po inokulaci - Comparison of the curves of reproduction of the used AMV isolates in the above-ground tissues of *P. hybrida* cv. Lavina from the 3rd to 12th day after inoculation

v souladu se závěry, které publikovali Filigarová a Polák (1983). Uvedení autoři ve srovnávacích pokusech prováděných s rostlinami *P. hybrida* cv. Lavina inokulovaných AMV zjistili, že obsah viru se mění podle doby odběru materiálu k purifikaci. Nejvyšší výtěžek získali z infekčních listů odebraných devátý den po inokulaci rostlin. S prodlužující se dobou infekce docházelo k poklesu obsahu viru v rostlinách, a tedy i k poklesu výtěžku viru v preparacích prováděných z materiálu odebraného 12. a 15. den po inokulaci rostlin. Vzhledem k tomu, že v uvedených pokusech byly použity izoláty AMV různé proveniencí (izolát PV45 byl získán z *Vitis vinifera*, PV46 z *Ligustrum vulgare*, 1AMV a 2AMV z *Rubus idaeus* a Filigarová s Polákem pracovali s izolátem z *Humulus lupulus*) je možné se domnívat, že AMV dosahuje maxima reprodukce v rostlinách *P. hybrida* cv. Lavina osmý, popř. devátý den po inokulaci rostlin a je tedy vhodné odebírat infekční materiál k purifikačním účelům nebo k sérologickým testům vyžadujícím vyšší koncentraci viru v tomto období.

Výrazně vyšší koncentraci AMV jsem zjistil u rostlin inokulovaných izolátem z ptačího zobu obecného, a to o 32 μ g v porovnání s izolátem z révy vinné, 44 a 36 μ g v porovnání s izoláty z maliníku. Z těchto údajů lze usuzovat, že výtěžek viru je ovlivněn nejen zvolenou purifikační metodou (Waterworth, 1975), použitou hostitelskou rostlinou a vhodně zvolenou dobou sklizně infekčního materiálu (Filigarová, Polák, 1983), ale i použitým izolátem viru.

Literatura

- DANIEL, G. - MUNZERT, M.: Nachweis des Blattrollvirus an sekundärinfizierten Kartoffelpflanzen mit ELISA. Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.-Schutzdienst (Stuttgart), 34, 1982, s. 51-54.
- FILIGAROVÁ, M.: Purifikace viru mozaiky huseníku. Ochr. Rostl., 18, 1982, s. 241-246.
- FILIGAROVÁ, M. - POLÁK, Z.: Množství viru mozaiky huseníku v odrůdách petunie po umělé infekci. Ochr. Rostl., 19, 1983, s. 1-4.
- HANSON, M. C. - CAMPBELL, R. N.: Strawberry latent ringspot virus from "Plain" parsley in California. Pl. Dis. Rept., 63, 1979, s. 142-146.
- HILL, S. A.: Methods in plant virology. Oxford, Blackwell Scie. Public. 1984, s. 11-123.
- MANČAL, P.: Metody enzymové imunoanalýzy. Praha, ÚSOL 1987, s. 45-51.
- MURANT, A. F.: Arabis mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses, 1970, č. 16.
- SELA, I. - REICHMAN, M.: Comparison of dot molecular hybridization and enzyme linked immunosorbent assay for detecting tobacco mosaic virus plant tissues and protoplasts. Phytopathology, 74, 1984, s. 385-389.
- SCHMELZER, K.: Untersuchungen und Viren der Zier- und Wildgehölze. 2. Mitteilung, Virose der Forsythia, Lonicera, Ligustrum und Laburnum. Phytopath. Z., 46, 1963, s. 105-138.

- SUTULA, Ch. L. - GILLET, J. M. - MORRISSEY, S. M. - RAMSDELL, D. C.: Interpreting ELISA data and establishing the positive - negative threshold. *Pl. Dis.*, 70, 1986, s. 722-726.
- ŠÍMA, I. - MANČAL, P. - BOUZEK, J.: Numerické zpracování výsledků kvantitativních imunoenzymatických analytických metod na mikropočítači. Praha, ÚSOL 1985, S. 5-23.
- TAMADA, T. - HARRISON, B. D.: Factor affecting the detection of potato leafroll virus in potato foliage by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. appl. Biol.*, 95, 1980, s. 209-219.
- WETTEN, H. J. - EHLERS, U. - PAUL, H. L.: Detection of potato viruses X and Y in tubers by enzyme-linked immunosorbent assay after natural and artificial break of dormancy. *Phytopath. Z.*, 108, 1983, s. 41-53.
- WATERWORTH, H. E.: Purification of arabis mosaic virus isolated from a jasmine plant introduction. *Phytopathology*, 65, 1975, s. 927-928.
- WIEDEMAN, H. L.: Die Kartoffel-Virus-Y (PVY^N)-Konzentration in Knollen verschiedener Kartoffelsorten. *Nachr.-Bl. Dtsch. Pfl.-Schutzdienst. (Stuttgart)*, 36, 1984, s. 25-37.

Došlo dne 16. 3. 1990

L. Smrčka (Institute of Experimental Botany of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, Czechoslovakia)

Reproduction pattern of the Arabis mosaic virus in the plants of *Petunia hybrida* cv. Lavina

For the experiments I used isolates of arabis mosaic virus - AMV, which were of different geographic origin. Two own isolates of AMV I gained from spontaneously infected raspberries. *Rubus idaeus* L. (isolates are marked 1AMV and 2AMV). For comparison I used isolates originated from *Vitis vinifera* L. (PV45) and *Ligustrum vulgare* L. (PV46), which provided me Dr. G. Adam from Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, Germany. The changes of reproduction of the isolates of AMV mentioned above I observed in the overhead tissues of *Petunia hybrida* hort. cv. Lavina from 3th to 12th day after inoculation by means of DAS-ELISA with IgG conjugated with horseradish peroxidase. I cultivated *P. hybrida* in air-condition box Heraeus-Vötsch under temperature 18-22° C, lighting 10 000 L, long of day 10 hours and humidity 80%. Every day I took away the overhead parts from three infected plants. For testing I used solution of samples 32, 128, 512 and 1 024 in two recapitulation. For construction of calibrating curves I used isolate originated from *Forsythia suspensa* Vahl, which was used for production of antisera too. Virus concentration I found commonly in a manner by means of absorption coefficient 8,45 (Waterworth, 1975) and from virus purificate with known concentration I prepared a dilution row, which was piled up to the desk with testing samples. The finding values of

concentration of using AMV's isolates in samples preparing from the overhead parts of *P. hybrida* cv. Lavina from 3th to 12th day after inoculation are in Table I and the course of curves of concentration of using virus isolates of AMV is caught on Fig. 1. The maximum of concentration of AMV in samples were found 8th day after inoculation (isolates 1 AMV, 2 AMV and PV46) and 9th day after inoculation (PV45). These results are in the correspondence with findings of Filigarová and Polák (1983). These authors found in comparison experiments with *P. hybrida* cv. Lavina inoculated of AMV, that the contents of virus is changed according time of the harvest of the material for purification. The highest yield they gained from the infected leaves taking away 9th after inoculation. Considering that in described experiments the isolates of difference geographical origin were used (1 AMV, PV45, PV46 are above and Filigarová and Polák worked with isolates from *Humulus lupulus*), it's possible to suppose, that AMV is reaching of the maxima of the reproduction in *P. hybrida* cv. Lavina 8th or 9th after inoculation. I found expressively higher concentration of AMV in plants inoculated with isolates from *Ligustrum vulgare* - by 32 μg in comparison with isolate from *Vitis vinifera*, 44 μg and 36 μg in comparison with isolates from raspberry. From these dates it's possible to suppose, that yield of virus is affected not only methods of purification (W a t e r - w o r t h , 1975), the using host plants and the suitable time for a harvest of a infected material (F i l i g a r o v á and P o l á k , 1983), but using virus isolates too.

Arabis mosaic virus; concentration; ELISA

MEDZINÁRODNÁ VIROLOGICKÁ KONFERENCIA NA POČESŤ D. I. IVANOVSKÉHO

V roku 1992 bude sto rokov čo vyšla práca, v ktorej ruský biológ D. I. Ivanovskij zverejnil, že existujú nižšie infekčné jednotky než baktérie. Tým sa stal zakladateľom virológie. Pri výskume mozaiky tabaku objavil aj existenciu inklúzií. Posledné roky svojho života pracoval na Univerzite v Rostove na Donu.

Z úcty k jeho prácam Univerzita v Rostove na Donu v spolupráci s inými inštitúciami, pripravuje na prvú polovicu septembra 1992 medzinárodnú vedeckú konferenciu.

Hlavnými témami konferencie budú:

- Vírus mozaiky tabaku a ním spôsobované choroby rastlín
- Inklúzie - cytologické a patofyziologické zmeny po vírusových a viroidných infekciách

Záujemci o konferenciu z celého sveta (s referátmi či bez referátov alebo panelov) nech sa prihlásia na adresu:

Dr. Vitold PARSHIN

Pushkinskaja 107-24

344 007 ROSTOV NA DONU, ZSSR

Záujemci z Českej republiky a Slovenskej republiky sa môžu prihlásiť na adresu: Doc. ing. Vít Bojňanský, DrSc., Žukovova 30, 851 01 BRATISLAVA.

* * * * *

INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIROLOGY IN HONOUR OF D. I. IVANOVSKI

By the year 1992 it will be 100 years since the work of the Russian biologist D. I. Ivanovski was published. This work revealed that there exist infectious units lower than bacteria. Thus he became founder of virology. He also found the presence of inclusions in the Tobacco mosaic. He spent the last years of his life at the Rostov University.

The State University of Rostov-on-Don prepares in co-operation with other institutions an International Conference on Virology in the first half of September 1992.

The main topics of the Conference will be:

- the tobacco mosaic virus and the associated plant diseases
- inclusions - cytological and pathophysiological changes after virus and viroid infections.

All who are interested in the Conference (with or without papers or posters) are invited to direct their applications to:

Dr. Vitold PARSHIN

Pushkinskaya 107-24

344 007 Rostov-on-Don, Soviet Union

ANALÝZA PATOTYPŮ PADLÍ TRAVNÍHO NA JEČMENI JARNÍM

JIŘÍ ZAKOPAL

Výzkumný ústav obilnářský, 697 41 Kroměříž

V práci je podán rozbor populace padlí travního v letech 1987 a 1988 v Československu. Z populací padlí travního odebraných na jednotlivých lokalitách jsme získali metodou jednokupkových izolací čisté patotypy padlí travního. Identifikaci jednotlivých patotypů jsme provedli pomocí námi upraveného testovacího sortimentu, který se skládá z 23 odrůd a současně pomocí testovacího sortimentu podle Frauensteinové. V prvním roce jsme získali z populací odebraných na jednotlivých lokalitách 11 patotypů a v druhém roce 25 patotypů padlí travního. Všechny patotypy překonávají odolnost řízenou geny *MI-g*, *MI-h*, *MI-41/145* a *MI-c* a za překonané můžeme považovat odolnosti řízené geny *MI-a₆*, *MI-a₇*, *MI-a₁₃* a odvozené odolnosti od *Nepal 81*, *Hordeum leavigatum*, Spiti, C.I. 7672. Za perspektivní můžeme považovat odolnosti řízené genem *ml-0*, *MI-a₁* a *MI-a₃*. V současnosti je však třeba stávající odrůdy dostatečně prostřídat tak, aby bylo na menší ploše zastoupeno více odrůd s různými specifickými odolnostmi, a tím lépe využít odolnosti, které v našich odrůdách máme.

Erysiphe graminis DC. f. sp. *hordei* Marchal; odolnost; geny rezistence

Významnou vlastností moderních odrůd ječmene jarního je vedle výnosu a kvality jejich odolnost proti hospodářsky významným chorobám. Ve šlechtění na odolnost byla největší pozornost doposud věnována padlí travnímu (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal). Každá povolená odrůda ječmene jarního má specifickou odolnost řízenou některým genem odolnosti. V našich povolených odrůdách jsou použity odolnosti řízené geny *MI-a₁*, *MI-a₇*, *MI-a₆*, *MI-a₁₃* a odolnosti odvozené od *Hordeum leavigatum*, KM-1192 a C.I. 7672 (Dreiseitl, 1989). V současné době jsou i přes tuto rozmanitost odolností všechny naše odrůdy padlím travním napadány. Příčinou tohoto stavu je přizpůsobivost patogena. Na zavedení nové odrůdy s novou rezistencí reaguje patogen tvorbou nových patotypů, které jsou schopny po určité době tuto rezistenci překonat. Doba, za kterou je padlí travní schopno novou odolnost překonat, je určena vedle vhodných podmínek pro vývoj patogena plošným zastoupením odrůdy s touto novou odolností. Např. v roce 1977 povolená odrůda Spartan s vysokou rezistencí odvozenou od odrůdy Monte Cristo se stala v roce 1980 nejrozšířenější odrůdou. Již

v témže roce byla odrůda Spartan napadána padlím (B r ů c k n e r , 1982) a v následujících letech byla odolnost této odrůdy zcela překonána. Podobně tomu bylo s překonáním rezistence řízené genem *Ml-a₁₃*, kterou využívá sedm odrůd z šestnácti našeho sortimentu. Tyto odrůdy se staly vedoucími odrůdami čs. sortimentu a v posledních letech se pohybuje plocha osévaná těmito odrůdami kolem 60 % všech ploch ječmene jarního. Patotyp padlí travního, který překonává tuto rezistenci, byl vyizolován ve skleníku již v roce 1980 (B r ů c k n e r , 1982). Později byly nalezeny patotypy schopné překonávat tuto rezistenci v terénu (B r ů c k n e r , 1986). V současné době jsou odrůdy s touto rezistencí napadány padlím travním běžně. Proto musíme ve šlechtění na rezistenci hledat nové zdroje genetických odolností a rychle je uplatnit v nových odrůdách.

Zatím nejspolehlivější a zároveň dostatečně rychlá metoda k zajištění rezistence a její podstaty ve šlechtitelském materiálu je testování souborem patotypů padlí travního se známou virulencí. K identifikaci patotypů padlí travního jsme dosud používali testovací sortiment upravený Frauensteinovou (F r a u e n s t e i n et. al., 1983), který se skládá z 18 rozlišovacích odrůd. S uplatněním nových donorů odolností ve šlechtitelských programech např. C.I. 7672, C.I. 8503, Nepal 81, Esperance aj. (B r ů c k n e r , 1986) bylo třeba testovací sortiment upravit tak, aby bylo možné nové virulentní patotypy k těmto odolnostem správně identifikovat a získané patotypy využít pro testování. Souběžně se šlechtěním na odolnost provádíme průzkum populace padlí travního. V tomto příspěvku se zabýváme rozbořem populace patogena v Československu v uplynulých dvou letech.

MATERIÁL A METODY

Odběry padlí travního jsme prováděli na našem pracovišti v Kroměříži (A) a na šlechtitelské stanici Sládkovičovo (H) a odrůdových zkušebnách ÚKZÚZ v Rýmařově (B), Čáslavi (C), Kujavách (D), Sedlci (E), Pustých Jakartcích (J). (Písmeny v závorkách jsou označeny lokality v tabulkách.) Na šlechtitelských stanicích a odrůdových zkušebnách je soustředěn veškerý u nás dostupný materiál ječmene jarního. Odebrané padlí z terénu jsme namnožili odděleně z každé jednotlivé lokality na mladých rostlinách ječmene jarního v izolátorech. Z populací padlí travního odebraných na jednotlivých lokalitách byly metodou jednokupkových izolací získávány čisté patotypy padlí travního. Padlí bylo odebráno, když na čepelích listů mladých rostlin narostly dobře vyvinuté jednotlivé kupky. Odebrali jsme vždy jednu kupku a naočkovali na izolovanou mladou rostlinu. V zájmu

docílení co největší čistoty patotypu jsme každou izolaci stejným způsobem dvakrát přeočkovali. Získané patotypy padlí jsme namnožili v izolátorech na mladých rostlinách těch odrůd, ze kterých byla daná populace odebrána v terénu. Identifikaci jednotlivých patotypů jsme provedli pomocí námi upraveného testovacího sortimentu a současně podle testovacího sortimentu podle Frauensteinové.

I. Patotypy padlí travního izolované v roce 1987: A. identifikace podle Frauenstein et al. (1983); B. identifikace podle VŠÚO Kroměříž - Powdery mildew pathotypes isolated in 1987: A. identification after Frauenstein et al. (1983); identification after Cereal Research Institute, Kroměříž

Poř. ¹	Odrůda ²	Gen rezistence ³	Lokalita ⁴								
			A						B	D	
A. Podle Frauenstein et al. 1983											
1.	Weihenstephan CP 127/422	<i>MI-g MI-CP</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Weihenstephan 37/136	<i>MI-h</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	Weihenstephan 41/145	<i>MI-41/145</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	Voldagsen 8141/44	<i>MI-a₆</i>	+	+	-	+	+	+	x	+	+
5.	Gat. Mut. 511	<i>MI-n</i>	-	-	+	+	-	-	x	-	-
6.	Gat. Mut. 501	<i>MI-h 2 dom</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	HOR 1063	<i>MI-a₄</i>	-	+	+	+	x	x	+	x	-
8.	HOR 1657	<i>MI-c</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.	HOR 1036	<i>MI-a₃</i>	+	x	+	-	+	+	x	-	x
10.	Atlas	<i>MI-at</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	x
11.	Rabat	<i>MI-a₁</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12.	HOR 1402	1 dom	-	-	-	+	+	-	-	-	-
13.	Amsel	<i>MI-g</i> , <i>MI-a₇</i> , 1 dom.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14.	Emir	<i>MI-a₁₂</i>	x	x	+	x	x	x	x	x	+
15.	Monte Cristo	<i>MI-a₄</i> , <i>MI-a₉</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16.	Rupal	<i>MI-a₁₃</i>	+	+	x	+	+	+	+	+	x
17.	Karát	<i>MI-a₁₃</i>	+	+	x	+	+	+	+	+	x
18.	Haisa M 66	<i>mi-0</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B. Podle VŠÚO Kroměříž											
1.	Favorit	<i>MI-g</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Rabat	<i>MI-a₁</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3.	HOR 1036	<i>MI-a₃</i>	+	x	+	-	+	x	x	-	+
4.	Gopal	<i>MI-a₅</i>	-	+	x	+	x	x	+	+	-
5.	Orbit	<i>MI-a₆</i>	+	+	-	+	+	+	x	+	-
6.	Horál	<i>MI-a₇</i>	+	+	x	+	+	+	+	+	x
7.	Spartan	<i>MI-a₉</i> (<i>MI-k</i>)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.	Zefír	<i>MI-a₁₂</i>	x	x	+	x	x	x	x	x	+

Pokr. tab. I.

Poř. ¹	Odrůda ²	Gen. rezistence ³	Lokalita ⁴								
			A			B			D		
9.	Zenit	<i>Ml-a₁₃</i>	+	+	x	+	+	+	+	+	x
10.	Kwan	<i>Ml-k</i>	-	+	+	+	x	x	+	x	-
11.	Nepal 81	<i>Ml-nepal 81</i>	+	+	x	+	+	x	+	+	x
12.	Kredit	<i>Ml-KM 1192</i>	+	+	x	+	+	+	+	-	x
13.	Malvaz	<i>Ml-C.I. 7672</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	x
14.	KM-UH-545	<i>Ml-esperance</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.	Vada	<i>Ml-La</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16.	Atlas	<i>Ml-at</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17.	Gat. Mut. 511	<i>Ml-n</i>	-	-	+	+	-	-	x	-	-
18.	HOR 1402	1.dom	-	-	-	+	+	-	-	-	-
19.	Psaknon	<i>Ml-psaknon</i>	x	+	+	x	x	-	+	x	-
20.	Sara	<i>Ml-sara</i>	x	x	+	+	x	x	x	x	-
21.	Spiti	<i>Ml-spiti</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22.	KM-s.18	<i>ml-0</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23.	C.I. 8503	<i>Ml-C.I. 8503</i>	x	-	x	+	x	x	x	x	-

Pro tab. I až III - For Tab. I to III

+ napadené = na listech jsou dobře vyvinuté jednotlivé až slité kupky - infested = well developed individual to merging heaps occur on the leaves

- středně odolné = zřetelně žluté až rezavé skvrny až slabě vyvinuté zasychající kupky - moderately resistant = marked yellow to rusty spots up to slightly developed drying heaps

x odolné = zelené listy až světlé skvrny - resistant = green leaves to yellow spots

¹rank, ²cultivar, ³resistance gene, ⁴locality

VÝSLEDKY A DISKUSE

Z populací získaných na jednotlivých lokalitách jsme získali v prvním roce 11 patotypů (tab. I) a v následujícím roce 25 patotypů padlí travního (tab. II a III).

Z přehledu získaných patotypů padlí travního v obou letech je patrné, že všechny patotypy překonávají odolnost řízenou geny *Ml-g*, *Ml-H*, *Ml-41/145* a *Ml-c*. Stejně můžeme považovat za překonané odolnosti řízené geny *Ml-a₆*, *Ml-a₇*, *Ml-a₁₃* a odvozené odolnosti od odrůd Nepal 81, *Hordeum leavigatum*, Spiti, KM-1192, C.I. 7672, které byla schopna překonat většina patotypů vyzolovaných na různých lokalitách ve sledovaném období.

Z celé řady specifických odolností, se kterými jsme pracovali, nebyla překonána pouze odolnost řízená genem *ml-0*. Perspektivní jsou však i odolnosti *Ml-a₁*, *Ml-a₃*, Sara a C.I. 8503. Z těchto odolností můžeme považovat za nepřekonanou odolnost odvozenou od odrůdy C.I. 8503. V Kroměříži, kde se tímto materiálem pracuje, jsme našli pouze jeden patotyp schopný tuto odolnost překonat. Běžně se vyskytující populace padlí

II. Patotypy padlí travního izolované v roce 1988 (identifikace podle Frauenstein et al., 1983) - Powdery mildew pathotypes isolated in 1988 (identification after Frauenstein et al., 1983)

Poř. ¹	Odrůda ²	Gen rezistence ³	Lokalita ⁴																						
			A												B	C	D			E		H			J
1.	Weihenstephan CP 127/422	<i>MI-g</i> <i>MI-CP</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	Weihenstephan 37/136	<i>MI-h</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	Weihenstephan 41/145	<i>MI-41/145</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4.	Voldagsen 8141/44	<i>MI-a₆</i>	+	x	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	x	x	+	+	+	+
5.	Gat. Mut. 511	<i>MI-n</i>	-	x	x	x	-	-	x	-	x	x	-	-	x	-	-	-	x	x	+	x	x	-	x
6.	Gat. Mut. 501	<i>MI-h</i> , 2 dom.	+	+	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+
7.	HOR 1063	<i>MI-a₄</i>	-	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
8.	HOR 1657	<i>MI-c</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9.	HOR 1036	<i>MI-a₃</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
10.	Atlas	<i>MI-at</i>	+	-	x	x	-	+	+	+	x	x	+	+	x	x	x	x	x	-	+	-	+	-	
11.	Rabat	<i>MI-a₁</i>	+	x	+	x	x	x	+	x	+	x	x	x	+	x	x	+	+	x	x	x	+	+	
12.	HOR 1402	1 dom.	+	+	+	+	-	x	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	
13.	Amsel	<i>MI-g</i> , <i>MI-a₇</i> , 1 dom.	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	
14.	Emir	<i>MI-a₁₂</i>	+	+	x	x	+	+	x	+	+	+	+	+	-	x	+	+	+	+	+	+	x	+	
15.	Monte Cristo	<i>MI-a₄</i> , <i>MI-a₉</i>	+	x	-	+	+	+	+	x	x	+	+	+	x	+	+	+	x	+	+	+	x	+	
16.	Rupal	<i>MI-a₁₃</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	x	
17.	Karát	<i>MI-a₁₃</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+	+	+	+	+	x	
18.	Haisa M 66	<i>ml-0</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

III. Patotypy padlí travního izolované v roce 1988 (identifikace podle VŠÚO Kroměříž) - Powdery mildew pathotypes isolated in 1988 (identification after Cereal Research Institute Kroměříž)

[illegible]

není schopna odolnost odvozenou od odrůdy C.I. 8503 zatím překonat. Pokud se jedná o odolnosti řízené geny *Ml-a₁* a *Ml-a₃*, není jejich stabilita již tak přesvědčivá. Z patotypů vyizolovaných z terénních sběrů z prvního roku z obou sledovaných let nepřekonal ani jeden odolnost řízenou genem *Ml-a₁*, a z patotypů z následujícího roku nepřekonal žádný odolnost řízenou genem *Ml-a₃*. Tento výsledek je však náhodný, neboť patotypy, které překonávají zmíněné odolnosti byly vyizolovány z běžné populace patotypů. Přesné perzistence jednotlivých patotypů v populaci patogena na určité lokalitě v terénu je otázka kvantitativní analýzy, což nebylo předmětem tohoto výzkumu. Účelem bylo získat obraz o existenci patotypů v současné populaci patogena, tedy o vztahu současné populace patogena k odolnostem použitým jak ve stávajících odrůdách, tak ve šlechtitelském materiálu v různém stupni rozpracování.

Přesto, že počet izolovaných patotypů není velký, všechny izolované patotypy překonávají velké množství odolností. Vývoj patogena tedy směřuje k tvorbě vysoce virulentních patotypů k většině odolností. Co se týká skladby patotypů v populaci patogena, nebyly mezi jednotlivými lokalitami shledány podstatné rozdíly.

Hledání nových donorů specifické odolnosti bude stále obtížnější. Za perspektivní můžeme dosud považovat odolnosti řízené geny *Ml-a₁*, *Ml-a₃*, *ml-0* a odvozenou odolnost od odrůd Sara a C.I. 8503. V nových odrůdách je třeba využít více odolností. Sortiment odrůd rozšířit o nové odolnosti, tak aby byla v sortimentu odrůd zastoupena dostatečná škála odolností. Toto je však dlouholetá perspektiva. Pro současnou dobu je třeba stávající odrůdy dostatečně prostřídat, tak aby bylo na menší ploše zastoupeno více odrůd s různými specifickými odolnostmi, a tak lépe využít odolnosti, které máme v současné době k dispozici.

Literatura

- BRÜCKNER, F.: Nález rasy padlí na ječmeni (*Erysiphe graminis* DC. var. *hordei* Marchal) překonávající geny rezistence *Ml-a₉* a *Ml-a₁₄*. Ochr. Rostl., 18, 1982, č. 2, s. 101-106.
- BRÜCKNER, F.: Možnosti využití odrůdy Nepal 81 ve šlechtění jarního ječmene na odolnost proti padlí travnímu. Genet. a Šlecht., 22, 1986, č. 2, s. 97-102.
- DREISEITL, A.: Odolnost československých odrůd ječmene jarního vůči padlí travnímu (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). Genet. a Šlecht., 25, 1989, č. 1, s. 57-64.
- FRAUENSTEIN, K. - MEYER, H. - WALTER, U. - WOLFRAM, H.: Neue Testsortimente und Rassenbezeichnungen bei Mehltau (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici*, *hordei* und *secalis* Marchal) und Zwergrost (*Puccinia hordei* Otth.). Arch. Phytopath. Pfl.-Schutz, 19, 1983, s. 239-246.

Došlo dne 31. 1. 1990

J. Zakopal (Cereal Research Institute, Kroměříž, Czechoslovakia)

Analysis of pathotypes of powdery mildew on spring barley

Breeding for the resistance of barley to economically important diseases, the greatest attention has been paid until now to powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal.). All our varieties use some of genetic resistances *Ml-a₁*, *Ml-a₇*, *Ml-a₆*, *Ml-a₁₃* and resistances derived from *Hordeum leavigatum*, KM-1192 and C.I. 7672. By influence of the adaption of pathogen all present resistances were overcome by creation of new pathotypes. To find out resistance and its nature, the method of testing the set of pathotypes of powdery mildew is used along with the known virulence. To identify pathotypes of powdery mildew, until now used has been the testing assortment adjusted by Fraustein (1983), with 18 distinguishing varieties. Applying the new donors of resistance in the breeding programmes, e.g. C.I. 7672, C.I. 8503, Nepal 81, Esperance and so on (Brückner, 1986), the testing assortment ought to be adjusted in such a way to identify correctly new virulent (to these resistances) pathotypes and to use them in testing. Simultaneously with the breeding for resistance, the investigation of powdery mildew population is carried out, too. This paper deals with an analysis of the pathogen population in Czechoslovakia in 1987-1988. At the breeding stations and variety testing stations, powdery mildew has been sampled during the period under study. Out of the powdery mildew population at the individual sites, by single-coup isolations method were obtained pure pathotypes of powdery mildew. Individual pathotypes were identified by the testing assortment (adjusted by us) composed of 23 varieties, and at the same time by the testing assortment after Fraustein (Table I and II). In the first year 11 pathotypes were obtained from the sampled populations at different sites and 25 pathotypes of powdery mildew were sampled in the second year. The resistance controlled by the *Ml-g*, *Ml-h*, *Ml-41/145* and *Ml-c* genes is found out to be the best one. As overcome resistances may be considered those ones which are controlled by the *Ml-a₆*, *Ml-a₇*, *Ml-a₁₃* genes and the derived resistances from Nepal 81, *Hordeum leavigatum*, Spiti, C.I. 7672, which were controlled by all pathotypes obtained in the studied period. Out of the specific resistances which were used in our investigations, only the resistance controlled by the *ml-0* gene was not overcome. The resistance derived from C.I. 8503 was overcome only by one pathotype. The commonly spread pathogen population is not yet able to overcome this resistance. Along with these resistances as a prospective

resistance may be considered the resistance controlled by the *Ml-a₁* and *Ml-a₂* genes. Their stability is not so convincing as far as pathotypes capable of resistance controlled by these genes occur at a limited rate in the common pathogen population. All pathotypes, isolated during the studied period, overcome a large amount of resistances. The development of pathogens tends to formation of pathotypes virulent to most resistances. Finding the donors of specific resistance will be more and more difficult. More resistances should be used in new varieties. The assortment of varieties should be extended by new resistances. However, nowadays present varieties need to be rotated in order to use a higher number of more varieties in the smaller area having the different specific resistances, and thus to use better the resistances which we have in our varieties.

powdery mildew (*Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* Marchal); resistance;
resistance genes; pathotypes

ŽIVOTNÍ JUBILEA

K ŠEDESÁTINÁM ING. JIŘÍHO CHODA, DrSc.

V letošním roce se dožívá na vrcholu tvůrčí aktivity šedesátí let náš přední rostlinný virolog, ing. Jiří Ch o d , DrSc. Narodil se 20. března 1931 v Plzni, kde vychodil obecnou školu. V roce 1940 se přestěhoval do Prahy, kde absolvoval reálné gymnázium a v roce 1950 byl přijat ke studiu na Vysokou školu zemědělskou v Praze. Po promoci v roce 1954 nastoupil do Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, kde pracuje dosud na problematice výzkumu virových chorob hospodářsky důležitých plodin. V roce 1964 ukončil v Biologickém ústavu ČSAD externí aspiranturu u akademika C. Blatného.

Ve své výzkumné činnosti se zejména věnoval problematice výzkumu odolnosti kulturních rostlin k virům a výzkumem virových chorob mrkve, cukrovky a bramboru. V letech 1965 až 1980 zastával funkci koordinátora státního výzkumného úkolu *Výzkum nových virů*. V roce 1970 obdržel resortní vyznamenání "Vynikající pracovník MZVŽ" a v roce 1976 cenu ministra pro technický a inverstiční rozvoj. V tomto období byl členem redakční rady časopisu Sborník ÚVTI - Ochrana rostlin a zastával pět let funkci tajemníka subkomise ochrany rostlin ČSAZV. V roce 1982 byl přeřazen do funkce vedoucí vědecký pracovník.

V roce 1987 ing. Jiří C h o d , DrSc., obhájil doktorskou disertační práci na téma: *Laboratorní metody diagnózy virů u kulturních rostlin a možnosti jejich využití ve šlechtění na odolnost*. Jubilant je činný v řadě vědeckých a odborných orgánů a komisí. Je členem koordinační komise státního úkolu rozvoje vědy a techniky "Intenzifikace výroby cukrovky" ve VŠÚ v Semčicích, členem koordinační rady hlavního úkolu "Výzkum vlastností, funkcí a zdrojů fytopatogenních virů" řešeného v Ústavu experimentální botaniky ČSAV a členem koordinační komise státního úkolu RVT "Ochrana zemědělských plodin proti škodlivým činitelům" ve VÚRV Praha-Ruzyně. Je členem vědecké rady odboru ochrany rostlin VÚRV Praha-Ruzyně a vědecké rady Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, dále členem stálé pracovní skupiny pro koordinaci výroby a využití antisér a protilátek komise ochrany rostlin ČSAZ. Spolupracuje se šlechtitelskými stanicemi v Čechách a na Moravě.

Ing. Jiří C h o d , DrSc., publikoval ve více než 200 příspěvcích výsledky výzkumu virových chorob rostlin a rostlinných virů. Nejvíce sdělení bylo s tematikou virových chorob řepy cukrové, bramboru, zeleniny a chmelu a problematikou výzkumu odolnosti kulturních rostlin k virům. Je spoluautorem pěti knižních publikací, z nichž jedna byla odměněna cenou Státního zemědělského nakladatelství. Během své vědecké činnosti oponoval 78 výzkumných závěrečných zpráv, 36 metodik vědecko-výzkumných úkolů, 21 kandidátských disertačních prací a recenzoval více než sto vědeckých sdělení pro vědecké a odborné časopisy.

Do dalších let tvořivé práce na oddělení virologie odboru ochrany rostlin VÚRV Praha-Ruzyně, při výchově nových vědeckých pracovníků i při spolupráci s dalšími pracovišti přejeme jubilantovi, který je spolupracovníky a spolupracovnicemi i ve vědeckých kruzích oblíben pro svoji mírnou a veselou povahu, pevné zdraví, životní elán a optimismus. Jménem celé odborné veřejnosti přejeme ing. Jiřímu C h o d o v i , DrSc., do dalších let mnoho úspěchů ve vědeckém i osobním životě a radosti ze svých dětí.

Ing. Jaroslav Polák, CSc.

VZTAHY MEZI VÝNOSEM PŠENICE OZIMÉ A NAPADENÍM HOUBOU *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS*

Miroslav HERMAN, Jan DOVRTĚL

Výzkumný ústav ekoagrotechniky,
664 62 Hrušovany u Brna

Na základě rozboru výsledků z různých pokusů z let 1979 - 1988 byly zkoumány vztahy mezi výnosem pšenice ozimé a napadením černáním pat stébel působením houbou *Gaeumannomyces graminis*. Rostliny byly rozděleny podle symptomů choroby do pěti skupin (stupeň napadení 0 - 4). Pro každý stupeň byl stanoven úbytek výnosu jednotlivé rostliny (hlavního stébla) a vyjádřeno snížení výnosu porostu. Tato výše ztrát se značně liší podle zastoupení vysokých stupňů napadení a při indexu napadení $I\% = 50$ může kolísat od snížení výnosu o 11 % až po přírůstek výnosu o 3,1 %. Z výsledků vyplývá, že přímý vztah mezi výnosem a napadením je ovlivňován u této choroby jinými faktory více než v případě stéblolamu. Průběh choroby u rostlin, které přežijí napadení do plné zralosti, ovlivňuje výnos nejvíce v závěru vegetace a do fáze mléčné zralosti neumožňuje předpověď výše výnosu, ale ani jeho relativní snížení.

černání pat stébel; úbytek výnosu; předplodiny

Černání kořenů a pat stébel způsobené houbou *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx et Olivier var. *tritici* Walker je po pravém stéblolamu druhou nejvýznamnější chorobou komplexu chorob stébel obilnin. Kontrola této choroby zůstává jedním z nejobtížnějších problémů v ochraně obilnin, protože se prozatím nepodařilo najít vhodné geny rezistence a také chemická ochrana není dostatečně efektivní pro nedostatečně dlouhodobý účinek fungicidů použitelných pro moření osiva nebo vysokou cenu přípravků aplikovatelných do půdy (L u c a s et al., 1986).

Nezbytným předpokladem k posouzení efektivnosti ochranných zákroků je kvantifikace škod působených chorobou. Poškozovány jsou všechny výnosotvorné komponenty, tj. počet zrn v klasu, hmotnost tisíce semen i počet plodných stébel. První dva jmenované souvisí s poškozením konkrétního stébla a lze je poměrně snadno kvantifikovat (Z a k o p a l et al., 1970; B o c k m a n n, K n o t h, 1965). Hustota porostu však může být ovlivněna úbytkem rostlin přes zimu a na jaře, intenzitou odnožování i redukcí odnoží během vegetace (W ä c h t e r et al., 1978). Intenzita napadení porostu pak nebývá přiměřená jeho hustotě (Z i m m e r m a n n, 1984).

Vztah mezi výnosem a napadením obilnin hubou je ovlivňován řadou dalších faktorů, jak jsme uvedli v naší předcházející práci (H e r m a n,

D o v r t ě l, 1986), týkající se stéblolamu. Proto jsme se pokusili stanovit také míru škodlivosti černání kořenů a pat stébel a poukázat na některé jevy komplikující vztah mezi výnosem a napadením.

MATERIÁL A METODY

Pro hodnocení škodlivosti jsme použili materiál z pokusů, které jsme dělali v Hrušovanech u Brna a Ivanovicích na Hané.

Hrušovany u Brna řadíme do klimatického regionu VT, který je charakterizován jako velmi teplý a suchý. Průměrné roční srážkové úhrny v letech 1955-1969 činily 532,6 mm, průměrná teplota 8,8 °C. V pokusných letech 1979-1988 byla většinou pozorována snížená srážková činnost, především pak v letech 1982, 1983 a 1988. Po teplotní stránce se jednalo o ročníky buď normální, nebo mírně nadnormální. V pokusech byly použité odrůdy Iljičovka (1979-1981) a Vala (1982-1988).

Ivanovice na Hané zařazujeme do klimatického regionu T₃, který je charakterizován jako teplý, mírně vlhký, s průměrnou hodnotou srážek 533,3 mm a průměrnou teplotou 8,3 °C (1955-1969). Rok 1983 byl srážkově slabě podnormální, teplotně nadnormální, rok 1984 srážkově slabě podnormální, teplotně normální a rok 1985 byl srážkově nadnormální a teplotně podnormální. V letech 1983-1984 byla použita odrůda Slavia a v roce 1985 odrůda Odra.

Půdní typ na obou stanovištích je černozem. Na vzorcích pšenice ozimé odebraných ve fázi mléčné zralosti a v plné zralosti byl stanoven stupeň napadení černáním pat stébel a vyjádřen index napadení (I%) (N i l s s o n, 1969).

$$I\% = \frac{\sum 100 f_i x_i}{4 n}$$

- kde: f_i - četnost rostlin napadených v daném stupni
 x_i - stupeň napadení kořenového systému rostliny (0 - zcela zdravé, 1 - do 1/3, 2 - 1/3-1/2, 3 - 1/2-3/4, 4 - více jak 3/4)
 n - počet hodnocených rostlin

Pro stanovení poškození výnosu byly v plné zralosti odebrané rostliny rozděleny do skupin podle jednotlivých stupňů napadení a zjištěna celková délka rostliny, délka klasu, počet zrn v klasu, hmotnost zrna v klasu a hmotnost tisíce semen.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Škodlivost čerpání pat stébel jsme sledovali na materiálu z Ivanovic na Hané. V tab. I jsou uvedeny změny v délce rostliny, délce klasu, počtu zrn v klasu, hmotnosti zrna v klasu a hmotnosti tisíce semen při napadení pšenice ozimé v rozmezí jednotlivých stupňů použité stupnice. Zjišťované znaky rostlin zdravých a napadených stupněm 1 se nelišily (délka rostlin o 3 mm, délka klasu o 0,5 mm, počet zrn v klasu o 0,1, hmotnost zrna v klasu o 0,01 g). Počet rostlin napadených stupněm 0 (zdravých) tvořil jen necelá 3 % z počtu všech analyzovaných rostlin a proto rostliny napadené stupněm 1 a rostliny zdravé byly sloučeny do jedné skupiny a vzaty za základ.

I. Poškození rostlin pšenice ozimé (%) napadených houbou *Gaeumannomyces graminis* -
Damage to winter wheat plants (%) infested by the fungus *Gaeumannomyces graminis*

Stupeň napadení ¹	Délka rostliny ²	Počet zrn v klasu ³	Délka klasu ⁴	Hmotnost zrn v 1. klasu ⁵	Hmotnost tisíce zrn ⁶
0-1	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
2	-0,5a	-2,0a	4,6a	-3,1a	-0,3a
3	1,6a	-0,3a	5,5a	3,9a	5,0b
4	6,2b	14,3b	12,4b	22,0b	11,5c

¹ rate of infection; ² plant length; ³ grain number per spike; ⁴ spike length; ⁵ grain weight in the first spike; ⁶ 1000-grain weight

Statisticky významné poškození sledovaných znaků bylo prokázáno při napadení chorobou ve stupni 4, s výjimkou hmotnosti tisíce semen, která byla průkazně snížena již při napadení stupněm 3.

V literatuře uváděné ztráty jsou často vyšší než námi zjištěné. Z a k o p a l et al. (1970) uvádějí u silně napadených rostlin snížení délky klasu o 28 %, počtu zrn v klasu o 44 %, hmotnost zrna v klasu o 57 % a hmotnost tisíce semen o 22 %. Podobné údaje uvádějí C u n n i n g h a m et al. (1986). Naproti tomu M ö g l i n g et al. (1978) zjistili snížení výnosu o 22 %.

Těsnost vztahu mezi napadením rostlin pšenice ozimé čerpáním pat stébel a jejím výnosem byla testována na materiálu z Hrušovan u Brna. Výnosy jsou uvedeny v tab. II a napadení chorobou v tab. III. Korelační koeficienty mezi těmito charakteristikami (tab. IV) jen výjimečně dosahovaly hranice statistické významnosti. Jejich kladné i záporné hodnoty ukázaly, že při napadení rostliny může dojít nejen k očekávanému snížení výnosu, ale i k jeho zvýšení.

II. Výnos pšenice ozimé [t.ha⁻¹] - Winter wheat yield [t.ha⁻¹]

Předplodina ¹	1979	1980	1981	1982	1983	1984
V _o - V _o	1,744	6,698	4,400	5,463	3,068	4,793
V _o - V _o - P	1,583	6,065	4,105	5,835	3,805	4,964
K _z - K _z	2,650	6,832	5,870	7,118	7,469	x
K _z - K _z - P	2,987	7,042	4,988	5,521	7,417	4,945
Předplodina ¹	1985	1986	1987	1988	$\bar{x}$ 1979-1988	
V _o - V _o	7,018	4,858	7,605	5,408	5,106	
V _o - V _o - P	7,045	5,422	7,306	5,505	5,156	
K _z - K _z	6,578	4,647	6,935	6,383	6,053	
K _z - K _z - P	7,316	4,556	6,569	5,736	5,751	

For Table II - V: 1 preceding crop

V_o - vojtěška (lucerne); P - pšenice ozimá (winter wheat); K_z - kukuřice na zrno (grain maize)III. Napadení pšenice ozimé houbou *Gaeumannomyces graminis* (index napadení I%) - Infestation of winter wheat by the fungus *Gaeumannomyces graminis* (infestation index I%)

Předplodina ¹	1979	1980	1981	1982	1983	1984
V _o - V _o	14,5	3,5	3,8	3,8	8,3	3,7
V _o - V _o - P	25,8	3,5	9,1	5,3	12,8	9,3
K _z - K _z	8,7	1,6	1,2	10,7	7,3	-
K _z - K _z - P	17,4	2,3	3,8	10,0	6,4	9,4
Předplodina ¹	1985	1986	1987	1988	$\bar{x}$ 1979-1988	
V _o - V _o	9,4	5,5	11,1	5,1	6,9	
V _o - V _o - P	3,5	9,9	10,4	6,9	9,6	
K _z - K _z	2,3	5,7	10,7	1,0	5,5	
K _z - K _z - P	2,1	9,3	9,8	4,2	7,5	

IV. Vztah mezi výnosem pšenice a napadením houbou *Gaeumannomyces graminis* (korelační koeficienty r) - Relationship between wheat yield and infestation by the fungus *Gaeumannomyces graminis* (correlation coefficients r)

Předplodina ¹	1979	1980	1981	1982	1983
V _o - V _o	-0,2828	-0,6192 ^x	0,0676	-0,3042	0,3487
V _o - V _o - P	-0,3170	0,0874	0,1359	0,4927	0,6948 ^{xx}
K _z - K _z	0,2298	0,1553	-0,2153	-0,6311 ^x	-0,3151
K _z - K _z - P	-0,1865	-0,5987 ^x	-0,2337	-0,7198 ^{xx}	-0,7048 ^{xx}

Pokr. tab. IV.

Předplodina ¹	1984	1985	1986	1987	1988
$V_o - V_o$	0,1266	0,4493	0,3538	0,2883	-0,4218
$V_o - V_o - P$	-0,0998	0,1926	-0,1231	-0,3242	0,6959 ^{xx}
$K_z - K_z$	-	0,0809	-0,5980 ^x	0,3803	0,4614
$K_z - K_z - P$	0,0413	-0,1919	0,4257	-0,0596	-0,4394

Vztahy mezi napadením a výnosem sledovali četní autoři, ale závislost mezi oběma veličinami byla zjišťována jen nepravidelně (S l o p e , 1967; K o s , 1982). V našich předchozích sledováních, týkajících se stéblolamu (H e r m a n , D o v r t ě l , 1986), jsme našli tento vztah jen v případě, že choroba byla hlavní příčinou snížení výnosu. Při napadení rostliny černáním pat stébel jde především o poškození nebo zničení části kořenového systému. Přísun živin a vody do rostliny může být uskutečňován v dostatečné míře dosud funkční částí kořenového systému, zvláště při příhodných vláhových poměrech.

Zvýšení výnosu při slabším napadení chorobou je známo i u jiných plodin a škodlivých činitelů, např. u bavlníku při napadení květopasem (*Anthonomus grandis*), čiroku při napadení květilkami a bejdomorkami, nebo při napadení pšenice rží pšeničnou v určité fázi (B u r l e i g h et al., 1972). Tyto případy mohou být způsobeny vyšším větvením, odnožováním apod., nebo i stimulací biofyzikálních a biochemických procesů v rostlině.

Pro úbytek výnosu zrna (U) z porostu byl z indexu napadení I (N i l s s o n , 1969) odvozen vzorec

$$U (\%) = \frac{\sum f_i u_i}{n}$$

kde: f_i - četnost rostlin napadených v daném stupni
 u_i - procentuální úbytek výnosu zrna pro daný stupeň
 n - počet hodnocených rostlin

Vzhledem ke způsobu výpočtu indexu napadení ($I\%$) může být jeho stejná výše získána rozdílným zastoupením jednotlivých stupňů napadení. Snížení výnosů zrna z porostů napadených podle indexu napadení stejně může být různé vzhledem k nelineárnímu vztahu mezi stupni napadení a velikostí úbytku zrna. Proto byly odvozeny obecné rovnice pro horní a dolní meze úbytku výnosu zrna pro index napadení 0-100. Pro parametry u_i , které splňují podmínku, že $u_4 > 4/3u_3 > 2u_2$, tj., že úbytek výnosu vzrůstá strměji než stupně napadení (pro stupeň 2-4), je maximální úbytek výnosu

$$U_{\max} = \frac{I \cdot u_4}{100}$$

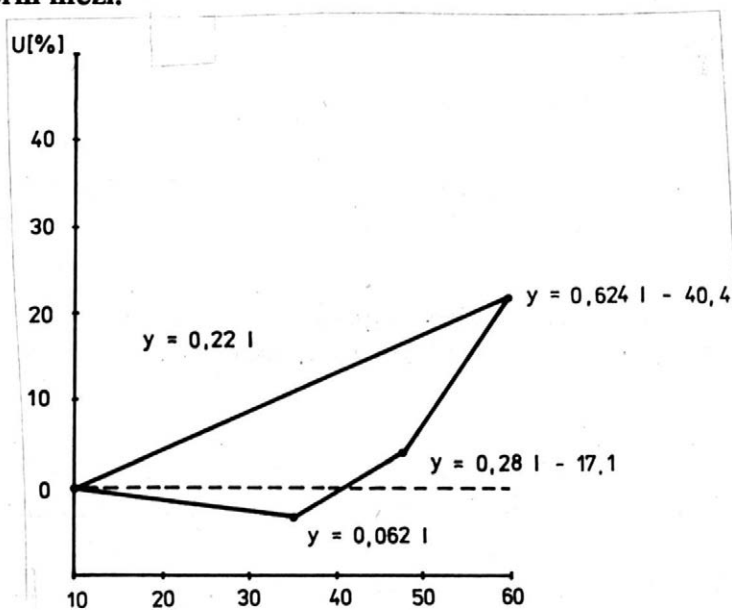
a nejmenší úbytek výnosu pro intervaly I dán rovnicemi

$$0 \leq I \leq 50 \quad U_{\min} = \frac{2I \cdot u_2}{100}$$

$$50 \leq I \leq 75 \quad U_{\min} = \frac{4(u_3 - u_2) \cdot (I - 50)}{100} + u_2$$

$$75 \leq I \leq 100 \quad U_{\min} = \frac{4(u_4 - u_3) \cdot (I - 75)}{100} + u_3$$

Pro námi nalezené parametry u_i , které splňují uvedenou podmínku je vyobrazení těchto maximálních a minimálních mezí na obr. 1. Hodnoty úbytku výnosu pro všechny možné indexy napadení se musí nacházet v sestrojeném grafu. Při vyšším zastoupení nízkých stupňů napadení v dané hodnotě indexu napadení se hodnoty nacházejí u dolní meze úbytku výnosu. Zastoupením vysokých stupňů se hodnota úbytku zvyšuje a přibližuje se k jeho horní mezi.



1. Úbytek výnosu zrna pšenice ozimé (U) způsobený napadením houbou *Gaeumannomyces graminis* (index napadení I), dolní a horní meze - Loss of winter wheat grain yield (U) caused by infestation by the fungus *Gaeumannomyces graminis* (infestation index I), lower and upper limits

V. Vztah mezi úbytkem výnosu pšenice ozimé (U) a napadením houbou *Gaeumannomyces graminis* (korelační koeficienty r) - Relationship between the winter wheat yield loss (U) and infestation by the fungus *Gaeumannomyces graminis* (correlation coefficients r)

Předplodina ¹	1979	1980	1981	1982	1983
$V_o - V_o$	-0,6313 ^x	-0,1477	-	-0,7453 ^{xx}	-0,5772 ^x
$V_o - V_o - P$	0,3777	-0,7927 ^{xx}	-0,7250 ^{xx}	-0,7471 ^{xx}	0,4992
$K_z - K_z$	-0,6570 ^x	-0,6059 ^x	-	-0,8103 ^{xx}	-
$K_z - K_z - P$	-0,82336 ^{xx}	-	-0,3581	0,1117	-
Předplodina ¹	1984	1985	1986	1987	1988
$V_o - V_o$	-	-0,9137 ^{xx}	-0,5937 ^x	-0,3774	-0,9713 ^{xx}
$V_o - V_o - P$	-	-0,5646 ^x	-0,0306	0,8052 ^{xx}	-0,7907 ^{xx}
$K_z - K_z$	-	-0,5356	-0,8817 ^{xx}	0,1245	-
$K_z - K_z - P$	-	-0,8647 ^{xx}	-0,9348 ^{xx}	0,3045	-0,8064 ^{xx}

VI. Vztahy mezi napadením rostlin houbou *Gaeumannomyces graminis* ve fázi zralosti (I_1), plné zralosti (I_2), úbytkem výnosu ve fázi mléčné zralosti (U_1) a plné zralosti (U_2) a výnosem (V) (korelační koeficienty) - Relationships between the infestation of plants by the fungus *Gaeumannomyces graminis* in the stage of milk ripeness (I_1), full ripeness (I_2), loss of yield in the stage of milk ripeness (U_1) and full ripeness (U_2), and the yield (V) (correlation coefficients)

	I_1	I_2	U_1	U_2	V
I_1	1,0000	0,3520 ^x	0,1031	0,2062	-0,2923
I_2	0,3520 ^x	1,0000	0,0347	0,8464 ^{xx}	-0,0558
U_1	0,1031	0,0347	1,0000	0,0546	0,0020
U_2	0,2062	0,8464 ^{xx}	0,0546	1,0000	0,0551

Vztahy mezi napadením a úbytky výnosu jsou uvedeny v tab. V. Úbytky byly vypočteny jako suma ztrát výnosů jednotlivých rostlin při daném stupni napadení (tab. I). Korelační koeficienty jsou vesměs statisticky významné, často však v záporné hodnotě, což signalizuje přírůstek výnosu při napadení chorobou. Sled předplodin se ukázal bezvýznamný.

K objasnění tohoto jevu jsme vyhodnotili materiál z pokusu s monokulturou pšenice ozimé z Ivanovic na Hané. Zjistili jsme, že v období od mléčné zralosti lze očekávat asi zdvoj až ztrojnásobení intezity choroby ($I\%$). Provedli jsme vzájemné testování vztahu mezi napadením rostlin pšenice ozimé ($I\%$) ve fázi mléčné zralosti a plné zralosti, příslušným úbytkem výnosu ($U\%$) a výnosem (tab. VI). Byl zjištěn významný vztah mezi napadením rostlin v mléčné a plné zralosti ($r = 0,352^x$) a zejména mezi úbytkem výnosu a napadením ve fázi plné zralosti ($r = 0,846^{xx}$). Vztah mezi výnosem a ostatními testovanými znaky zjištěn nebyl.

Napadené rostliny, které přežívají až do sklizně, poskytují snížený výnos. Černání pat stébel poškozuje kořenový systém obilnin, a tím omezuje možnost rostliny čerpat vodu a živiny, podobně jako v případě pravého stéblolamu, působeného houbou *Pseudocercospora herpotrichoides*, poškozujícího stébla a jeho vodivé dráhy a limitujícího přísun vody a živin do nadzemní části rostliny. V případě stéblolamu (H e r m a n , D o v r t ě l , 1986) byl zjišťován těsnější vztah napadení chorobou a výnosu rostliny, než v případě černání pat stébel. Poškození stébla v době vegetace trvale omezuje možnost příjmu vody a živin a patrně nemůže dojít ke kompenzaci zvýšenou účinností nepoškozených pletiv. Účinek poškození kořenového systému obilnin působením černání pat stébel není tak výrazný a může být kompenzován zvýšením činnosti jeho zbývajících částí, o němž svědčí i zjištěný přírůstek výnosu zrna při slabém napadení.

Rozhodujícím obdobím pro ovlivnění výnosu černáním pat stébel je období mezi fází mléčné a plné zralosti pšenice ozimé. Podmínky rozvoje choroby (zejména vlhkosti) v tomto období určují míru škodlivosti černání pat stébel. Průběh choroby do tohoto období (nedojde-li k odumření rostliny vůbec) neposkytuje možnost odhadu relativního snížení výnosu porostu ani výnosu samotného.

L i t e r a t u r a

- BOCKMANN, H. - KNOTH, K. E.: Der verstärkte Getreidebau aus pflanzen-pathologischer und pflanzenhygienischer Sicht. Z. Pfl. - Krankh. Pfl.-Path. Pfl.-Schutz, 72, 1965, č. 7, s. 385-398.
- BURLEIGH, J. R. - ROELFS, A. P. - EVERSMEYER, M. G.: Estimating damage caused by *Puccinia recondita tritici*. Phytopathology, 62, 1972, č. 9, s. 944-946.
- CUNNINGHAM, P. C. - SPILLANE, P. A. - FOREMAN, B. T. - CONNIFFE, D.: Effects of infection of *Ophiobolus graminis* Sacc. on grain yields, baking characteristics of winter wheat and quality of malting barley. Ir. J. agric. Res., 7, 1968, č. 2, s. 183-193.
- HERMAN, M. - DOVRTĚL, J.: Vztahy mezi výnosem pšenice ozimé a napadením houbou *Pseudocercospora herpotrichoides*. Ochr. Rostl., 22, 1986, č. 3, s. 207-216.
- KOS, M.: Zhodnocení ozimé pšenice stéblolamem (*Pseudocercospora herpotrichodes*) v osevních postupech na černozemních půdách řepařské oblasti. Acta Univ. Agric. (Brno), Ř. A, 30, 1982, s. 183-185.
- LUCAS, P. - MONFORT, F. - CAVELIER, N. - CAVELIER, A.: Attempts to combine different methods of control of foot and root diseases of winter wheat. In: Proc. E. C. Integrated Crop Protection in Cereals, Littlehampton, U.K., 25. - 27. 11. 1986.
- MÖGLING, R. - WACHTER, V.: Befallsverlauf und Schadwirkung von *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* an ausgewählten Weizensorten und -stämmen. (Dissertacion). Rostock 1978. - Wilh.-Pieck-Univ.
- NILSSON, H. E.: Studies of root and foot rot diseases of cereals and grasses. In: On resistance to *Ophiobolus graminis* Sacc. Lantbrukshögsk. Ann., 35, 1969, č. 3, s. 275-807.
- SLOPE, D. B.: Disease problems of intensive cereal growing. Ann. appl. Biol., 59, 1967, s. 317-319.

WÄCHTER, V. - MÖGLING, R. - SEIDEL, D.: Beeinflussung der Ertragsstruktur von Winterweizen durch den Erreger der Schwarzbeinigkeit. Rostocker Agrarwiss., 1978, č. 1, s. 121-126 (Beitrage).

ZAKOPAL, J. - KOPA, K. - SYCHROVÁ, E.: Příspěvek ke škodlivosti původce černání pat stébel *Ophiobolus graminis* Sacc. Ochr. Rostl., 6, 1970, č. 4, s. 245-252.

ZIMMERNANN, A.: Wurzerfaule an Weizen durch *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* - Interaktionen zwischen Pflanzendichte und Wasserversorgung bei der Ertragsbildung im Gewachshausversuch. Z. Pfl.-Krankh. Pfl.-Path. Pfl.-Schutz, 91, 1984, č. 6, s. 657-668.

Došlo dne 16. 2. 1990

M. Herman, J. Dovrtěl (Research Institute of Agrolcology and Soil Management, Hrušovany u Brna, Czechoslovakia)

Relations between winter wheat yields and infestation by fungus *Gaeumannomyces graminis*

On the basis of result analyses of various experiments from the period 1979 - 1988, we studied relations between winter wheat yields and infection by take-all caused by the fungus *Gaeumannomyces graminis*. The plants were divided according to disease symptoms into five groups (degree of infection 0-4). Yield reduction of individual plants (the main culm), 1000-seed weight, grain number per spike and the length of plant and spike were estimated for each degree (Tab. I). Crop yield reduction was expressed by such estimation of the yield loss of plant. Fig. 1 shows the graph of crop yield losses when attacked by the disease. A possible loss range at a certain infection index (e.g. at $I\% = 50$, the yield can vary from reduction by 11 % up to increase by 3.1 %) is caused by a different representation of the plants attacked by individual degrees of infection. Relations between the yield and infection (Tab. IV) were statistically significant only sporadically. The given values of correlation coefficients are in both positive and negative values; this testifies the fact that a presupposed reduction but sometimes also a yield increase, affected by the disease, did occur. In the period from milk ripeness to full ripeness, a twice or three times higher intensity of disease could be expected. Verifying mutual relations between infection of plants in milk and full ripeness, corresponding yield reduction and the yield, we found out that the infection intensity did not significantly influence yield reduction in the period of milk ripeness but did so in the full one (Tab. VI). The infection in the full ripeness was higher at a higher infection in the milk one (correlation coefficient = 0.3520). As revealed in the previous work, grain yield at the

attack of plants by *Gaeumannomyces graminis* is influenced by other factors than the disease itself to a higher extent than in the case of eyespot disease (*Pseudocercospora herpotrichoides*). It is possible that the replacement of the function of a damaged root system part by the one still healthy could happen if conductive tissues are not yet broken.

take-all; yield loss; forecrops

REZISTENCE JETELE LUČNÍHO VŮČI PŮVODCŮM KOŘENOVÝCH HNILOB

Eva KOVÁČIKOVÁ, Antonín FOJTÍK¹, Hana JAKEŠOVÁ¹,
Anna VLASÁKOVÁ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha 6

¹Šlechtitelská stanice, 742 47 Hladké Životice

Kmeny tetraploidního jetele lučního (*Trifolium pratense* L.), z odrůdy Kvarta, novošlechtění HŽ-III, HŽ-IV, HŽ-V a některé odrůdy světového sortimentu jsme testovali na rezistenci vůči *Fusarium oxysporum* Schlecht. a *F. solani* (Mart.) Appel., ve třech fázích ontogenetického vývoje rostlin. Testováním rostlin v juvenilní fázi jsme zjistili vyšší rezistenci vůči *F. oxysporum* než vůči *F. solani*. Po společné inokulaci osm týdnů starých rostlin jsme zjistili posun reakce k vyšší rezistenci téměř u všech kmenů. Po tříletém hodnocení rostlin v přirozeném infekčním tlaku jsme získali kmeny s vyšší rezistencí než zkoušené odrůdy světového sortimentu.

Trifolium pratense L.: *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; rezistence; ontogenetický vývoj

Práce navazuje na výsledky získané expeditivní metodou testování kmenů tetraploidního jetele lučního vůči původcům krčkových a kořenových hnilob (Kováčiková et. al., 1987b). Zajímala nás otázka, jak se tyto kmeny, různě citlivé v juvenilní fázi vůči jednotlivým patogenům, budou chovat po testování směsí patogenů v různých ontogenetických fázích rostlin.

Cílem této práce je zjistit rezistenci vybraného souboru kmenů pocházejících z odrůdy Kvarta a ze tří novošlechtění ze Šlechtitelské stanice Hladké Životice k jednotlivým patogenům, porovnat zjištěnou rezistenci s rezistencí vůči směsi patogenů v definovaném prostředí, jako i v prostředí přirozené infekce. Dále jsme chtěli vybrat kmeny, které splňují kritéria rezistence k dalšímu šlechtitelskému využití.

MATERIÁL A METODY

K pokusům jsme použili tetraploidní jetele luční, *Trifolium pratense* L., odrůda Kvarta (12 kmenů), novošlechtění HŽ-III (11 kmenů), HŽ-IV (8 kmenů), HŽ-V (10 kmenů) a odrůda Perenta, které jsme testovali třemi metodami.

Laboratorní metoda testování rostlin v juvenilní fázi

K inokulaci rostlin jsme použili ověřené patogenní izoláty *Fusarium oxysporum* Schlecht. (*Fox*) a *F. solani* (Mart.) Appel. (*Fs*) získané z napadených rostlin jetele lučního v roce založení pokusu. K přípravě inokula jsme použili izoláty hub po pětidenní inkubaci na plotnách se sladinkovým agarem (SA). Vodní suspenzi o hustotě 1×10^6 konidií v 1 ml jsme inokulovali kořeny mladých rostlin. Způsob inokulace rostlin, inkubace, hodnocení četnosti a stupně napadení, podle bonitační stupnice 0-3 jsou uvedena v práci K o v á č i k o v á et al. (1987a). Po dvou týdnech inkubace jsme u každé rostliny na základě průměrného stupně napadení stanovili reakci, vyjádřenou čtyřmi stupni rezistence: R-rezistentní, SR-středně rezistentní, SN-středně náchylný, N-náchylný (K o v á č i k o v á et al., 1987b).

Testování rostlin ve skleníku

K přípravě inokula jsme použili stejné izoláty patogenních hub (*Fox* a *Fs*), které jsme po pětidenní inkubaci na plotnách se SA přeočkovali (disk houby s agarem o průměru 5 mm) do tekutého média (K e r r, 1963) k pětidennímu provzdušňování na horizontální třepačce v optimálních podmínkách pro tvorbu mikrokonidií. K inokulaci rostlin jsme použili suspenzi mikrokonidií (po filtraci) o hustotě 1×10^4 konidií v 1 ml suspenze (ředění sterilní destilovanou vodou - SDV). K inokulaci jedné rostliny jsme použili 1 ml suspenze, kde poměr *Fox* : *Fs* = 2 : 1.

Kmeny uvedených novošlechtění, dále nšl. DO-3 a odrůdy Tempus, Matri, Teroba, Perenta, Trifomo, Novosibirskij, pěstované osm týdnů v inertním prostředí (perlit), jsme opatrně vytáhli, zbavili zbytků perlitu a nadzemní část i kořeny zkrátili na jednu třetinu délky. Konce sestřižených kořenů jsme ponořili na 16 hodin do vodní suspenze mikrokonidií směsi hub *Fox* a *Fs*, kontrolní rostliny do SDV. Pro každou variantu jsme použili 30 vizuálně zdravých rostlin.

Po inokulaci jsme rostliny vysázeli do van (200 x 120 x 45 cm) s perlitem nasyceným vodovodní vodou. Vany jsme umístili na parapety ve skleníku při teplotě 20 ± 3 °C. Po 10 dnech jsme perlit dosycovali živným roztokem (K o v á č i k o v á et al., 1989). Zdravotní stav rostlin jsme hodnotili po 16 týdnech od inokulace. Rostliny jsme vytáhli a kořeny zbavili zbytků perlitu. U každé rostliny jsme hodnotili stupeň napadení (od 0 do 3) a to: a) nadzemní části: 0 - zdravá, 1 - zakrňelá a vadnoucí, 2 - silně zakrňelá a vadnoucí, 3 - zaschlá; b) korových pletiv hlavního a vedlejších kořenů:

0 - povrch kořene zdravý nebo skvrny zabírají maximálně 3 % povrchu, 1 - na povrchu kořene hnědé skvrny zabírají 3 - 25 % povrchu, 2 - více než 25 % povrchu kořene pokryto hnědými až tmavě hnědými skvrnami, 3 - více než 50 % povrchu kořene pokryto hnědými až tmavěhnědými skvrnami, které splývají; c) **hnědnutí vodivých pletiv na příčném řezu kořenovým krčkem a na podélném řezu kořenem:** 0 - bez příznaků, 1 - lokalizovaná diskolorace vaskulárního cylindru, 2 - diskolorace zasahující přibližně jednu polovinu vaskulárního cylindru a šířící se od kořenového krčku směrem k vrcholu kořene, 3 - intenzivní diskolorace zasahující téměř celý obvod vaskulárního cylindru a šířící se od kořenového krčku k vrcholu kořene.

Podle získaného průměrného stupně napadení jsme rostliny rozdělili do čtyř skupin rezistence, jako při testování rostlin laboratorní metodou (Kováčiková et al., 1987b).

Testování polní rezistence rostlin

Odrůdy Kvarta, Tempus, Matri, Teroba, Trifomo, Novosibirskij, nšl. DO-3, kmeny odrůdy Kvarta a kmeny nšl. HŽ-III, HŽ-IV až HŽ-V, použité v laboratorních a skleníkových pokusech, jsme vysázeli na pole šlechtitelské stanice Hladké Životice v dubnu 1987, po 50 rostlinách z každé odrůdy a kmene. Každý rok jsme hodnotili stav procentem přežitých rostlin (podzim 1987 - 16. 10., jaro 1988 - 20. 4. a jaro 1989 - 29. 3.). Podle procenta přežitých rostlin jsme stanovili čtyři skupiny rezistence (R - rezistentní, SR - středně rezistentní, SN - středně náchylný, N - náchylný) pro roky 1987, 1988 a zvlášť pro rok 1989 (tab. I).

I. Procento přežitých rostlin v jednotlivých letech - Percentage of surviving plants in each year

Rok ¹		Reakce kmene a odrůdy ²	
1987 - 1988	1989		
95 a více	40 a více	rezistentní ³	R
94 - 91	39 - 35	středně rezistentní ⁴	SR
90 - 87	34 - 25	středně náchylné ⁵	SN
86 a méně	24 a méně	náchylné ⁶	N

¹ year; ² reaction of the strain and cultivar; ³ resistant; ⁴ moderately resistant; ⁵ moderately susceptible; ⁶ susceptible

VÝSLEDKY A DISKUSE

Laboratorní metoda testování rostlin v juvenilní fázi prokázala rozdíly v reakci kmenů a odrůd vůči zkoušeným patogenům. Většina zkoušených kmenů odrůdy Kvarta a nšl. HŽ-III, HŽ-IV a HŽ-V, která byla rezistentní až středně rezistentní vůči *Fusarium oxysporum*, byla středně rezistentní a středně náchylná až náchylná vůči *F. solani*. Vyrovnanou reakci kmenů

II. Testování rezistence v juvenilní fázi rostlin - Testing resistance in the juvenile stage of the plants

Původ a číslo kmene ¹	Počet kmenů ²	Reakce rostlin po inokulaci ³		Procento kmenů ⁴	
		<i>Fox</i>	<i>Fs</i>	100 % = kmenů celkem v původu ⁵	R - SR
Kvarta 24, 25, 36 31 Perenta 11, 21, 53, 54, 56 46	3 1 1 5 1	R R SR SR SN	SR SN SR SN R	27,27 9,09 9,09 45,45 9,09	27,27
HŽ - III 8 9,21,23,25 7,10,14,22,28 58	1 4 5 1	R R R SR	R SR SN SN	9,09 36,36 45,45 9,09	45,45
HŽ - IV 14,23,24,26,27 7 11 9	5 1 1 1	R SR SR SN	SN SR SN SR	62,50 12,50 12,50 12,50	12,50
HŽ - V 8 32,35,38,44 43 40 11	1 4 1 1 1	R R SR SR R	SR SN SR SN N	12,50 50,00 12,50 12,50 12,50	25,00

¹origin and number of the strain; ²strain number; ³plant reaction after inoculation; ⁴percentage of strains; ⁵100 % = total strain number in origin

Reakce rostlin (Reaction of the plants): R - rezistentní (resistant); SR - středně rezistentní (moderately resistant); SN - středně náchylná (moderately susceptible); N - náchylná (susceptible)

III. Testování rezistence rostlin ve skleníku - Greenhouse testing of the plants' resistance

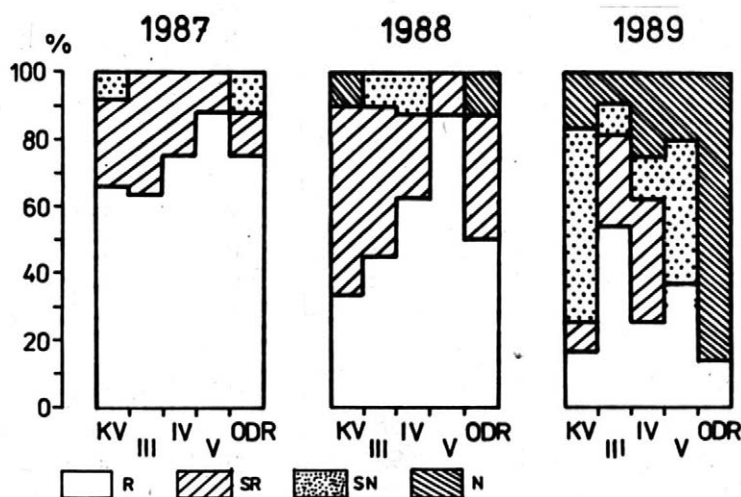
Odrůdy a číslo kmene ¹	Počet kmenů ²	Reakce rostlin po inokulaci ³ <i>Fox + Fs</i>		Procento kmenů ⁴	
		POŘ	PŘ	100 % = kmenů celkem v původu ⁵	R - SR
Kvarta 46, 53, 54, 64, 85 56 11, 21, 24, 31 25, 36,	5 1 4 2	R SR SN N	R SR SN SN	45,45 9,09 36,36 18,18	54,54
HŽ - III 7, 8, 9, 21, 22 23, 25, 28 10, 14 58	5 3 2 1	R SR SR N	R R SR R	45,45 27,27 18,18 9,09	90,90
HŽ - IV 7, 24, 26 9, 11, 23, 27 14	3 4 1	R SR SN	R R R	37,50 50,00 12,50	87,50
HŽ - V 35 8, 11, 32 38, 44 Perenta 40 43, Teroba	1 3 2 1 1 2	R SR SR SR SN SN	R R SR SN SR SN	10,00 30,00 20,00 10,00 10,00 20,00	60,00
Matri, Tempus Trifomo Nšl. DO-3, Novosibirskij	2 1 2	R SR SN	R R R	40,00 20,00 40,00	60,00

¹cultivars, origin and number of the strain; ²strain number; ³plant reaction after inoculation;⁴percentage of strains; ⁵100 % = total strain number in origin

Reakce rostlin (Reaction of the plants): POŘ - na podélném řezu kořenem (on the longitudinal section through the root); PŘ - na příčném řezu kořenem (on the cross section through the root); R - rezistentní (resistant); SR - středně rezistentní (moderately resistant); SN - středně náchylná (moderately susceptible); N - náchylná (susceptible)

vůči *Fox* jsme zjistili u nšl. HŽ-III a HŽ-V. Shodnou rezistentní, nebo středně rezistentní reakci k oběma patogenům *Fox* a *Fs* měly: odrůda Perenta a některé kmeny odrůdy Kvarta (27 %), nšl. HŽ-III (45 %), HŽ-IV (12 %) a HŽ-V (25 %) - tab. II.

Testování rostlin ve skleníku hodnocené stupněm napadení podélného řezu (POŘ) a příčného řezu (PŘ), vyjádřené reakcí rostlin na směs patogenů (*Fox* a *Fs*), posunulo sledované kmeny všech zkoušených původů směrem k rezistentnější reakci. Procento rezistentních až středně rezistentních kmenů vzrůstá po směsné inokulaci vzrostlých rostlin v porovnání s procentem rostlin zařazených do stejných kategorií po inokulaci jednotlivými patogeny. Nejvyšší procento ve skupině R a SR mají kmeny novošlechtění HŽ-III (91 %), HŽ-IV (87 %), HŽ-V (60 %) a kmeny odrůdy Kvarta (54 %)



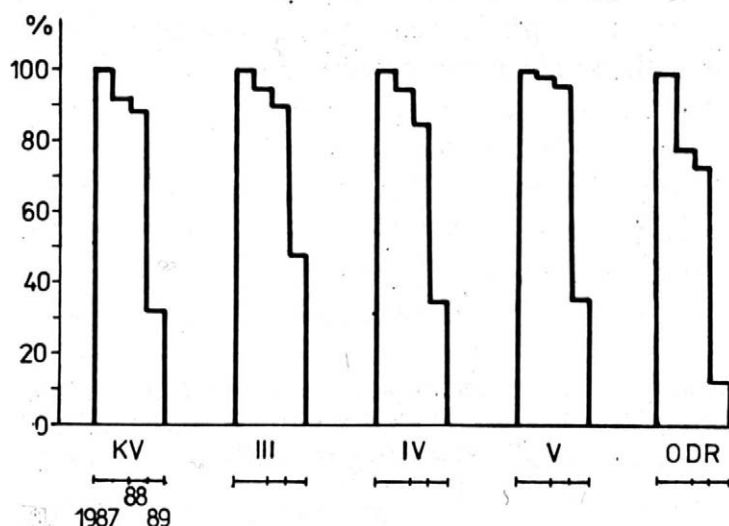
1987 - procento skupin rezistence = počet přežitých rostlin ve skupině k počtu rostlin vysázených = 100 % (percentage of resistance groups = number of surviving plants in the group in relation to the number of plants originally planted = 100 %)

1988, 1989 - procento skupiny rezistence = počet přežitých rostlin ve skupině k počtu rostlin v roce předcházejícím = 100 % (percentage of resistance groups = number of surviving plants in the group in relation to the number of plants in the preceding year = 100 %)

1. Polní rezistence kmenů tetraploidního jetele lučního odrůdy Kvarta (KV), novošlechtění HŽ-III (III), HŽ-IV (IV), HŽ-V (V) a odrůd Tempus, Matri Teroba, Trifomo, Novosibirskij (ODR) ve čtyřech skupinách (R-rezistentní, SR-středně rezistentní, SN-středně náchylný, N-náchylný), v procentech přežitých rostlin v jednotlivých letech. - Field resistance of the strains of the Kvarta cultivar (KV) of tetraploid red clover, the HŽ-III (III), HŽ-IV (IV) and HŽ-V (V) tentative cultivars and the Tempus, Matri, Teroba, Trifomo, and Novossibirsky (ODR) cultivars in for groups (R-resistant, SR-moderately-resistant, SN-moderately susceptible, N-susceptible), as percentages of surviving plants in each year

(tab. III.). Neshledali jsme přímou závislost v reakci kmenů k jednotlivým patogenům (tab. II) s reakcí kmenů ke směsi patogenů (tab. III). V prvním případě jsme hodnotili stupeň napadení 17 dní starých rostlin, ve druhém případě jsme hodnotili symptomy napadení vodivých pletiv na POŘ a PŘ u rostlin v době tvorby květů. Hodnocení rezistence v juvenilní fázi rostlin vůči jednotlivým patogenům je kvalitativně přesnější.

Testování polní rezistence rostlin jsme hodnotili procentem přežívajících rostlin v letech 1987, 1988 a 1989. Rezistence kmenů odrůdy Kvarta a novošlechtění HŽ-III, HŽ-IV a HŽ-V je patrna po jejich zařazení do čtyř skupin rezistence. Vzestup rezistence kmenů je významný v porovnání s testovanými odrůdami. Dokumentuje to procentuální podíl kmenů zařazených do skupiny R a SR v porovnání s procentem odrůd zařazených do skupiny SN a N, zejména v posledním roce hodnocení - 1989 (obr. 1). Procento přežívajících rostlin bez ohledu na skupiny rezistence (získané z počtu vysázených rostlin = 100 %), bylo u všech kmenů vyšší než u sledovaných odrůd v uvedených



2. Procento přežívajících kmenů tetraploidního jetele lučního odrůdy Kvarta (KV), novošlechtění HŽ-III (III), HŽ-IV (IV), HŽ-V (V), DO-3 a odrůd Kvarta Tempus, Matri, Teroba, Trifomo, Novosibirskij (ODR) k procentu rostlin vysázených = 100 % v letech hodnocení 1987, 1988 a 1989 - Percentage of surviving strains of the tetraploid red clover cultivar Kvarta (KV), the HŽ-III (III), HŽ-IV (IV), HŽ-V (V) and DO-3 tentative cultivars and the Kvarta Tempus, Matri, Teroba, Trifomo and Novosibirsky (ODR) cultivars in relation to the percentage of plants planted = 100%. Evaluated in 1987, 1988 and 1989

letech hodnocení (obr. 2). Nejvyšší stupeň rezistence v prvních dvou letech porovnání jsme zaznamenali u novošlechtění HŽ-V.

Po uvedených metodách testování rostlin v různých fázích ontogeneze, včetně tříletého hodnocení polní rezistence v přirozeném infekčním tlaku na poli, jsme získali kmeny v rámci zkoušených novošlechtění rezistentní až středně rezistentní.

Výsledky získané po inokulaci jednotlivými patogeny odděleně však potvrzují hypotézu rezistence řízenou různými geny nebo dokonce minorgeny vůči *Fusarium oxysporum* a vůči *F. solani*. Z hodnocení rezistence po směsné inokulaci můžeme však také předpokládat, že geny, případně minorgeny účinné k jednomu druhu patogena mohou spomalovat postup choroby, na které se podílejí jiné druhy patogena tohoto rodu.

Kromě genetických aspektů se však uplatňují i další faktory. Je to především dlouhodobý infekční tlak, podmiňován prostředím na poli (Leath et al., 1971; Kováčiková, Kúdela, 1983).

Uvedené metody umožňují šlechtění na rezistenci vůči chorobám kořenu a kořenových krčků jetele, které způsobují houby z rodu *Fusarium*. Selektují šlechtitelský materiál podle reakce vůči jednotlivým patogenům, vůči směsi určitých patogenů a vůči přirozenému infekčnímu tlaku. Konečný efekt lze očekávat u nových odrůd s polní rezistencí (obr. 1 a 2).

Literatura

- KERR, A.: The root rot *Fusarium* wilt complex of peas. Aust. J. Biol. Sci., 16, 1963, s. 55-69.
- KOVÁČIKOVÁ, E. - KÚDELA, V. - JAKEŠOVÁ, H. - ORÁLEK, J. - VLASÁKOVÁ, A.: Využití zkumavkové metody pěstování rostlin při studiu interakcí jetele - druhy rodu *Fusarium*. Ochr. Rostl., 23, 1987a, č. 2, s. 141-148.
- KOVÁČIKOVÁ, E. - KÚDELA, V. - JAKEŠOVÁ, H. - VLASÁKOVÁ, A.: Kritéria rezistence a tolerance odrůd jetele vůči krčkovým a kořenovým hnilobám způsobovaným houbami rodu *Fusarium*. Ochr. Rostl., 23, 1987b, č. 4, s. 269-278.
- KOVÁČIKOVÁ, E. - JAKEŠOVÁ, H. - NOVOTNÝ, F.: Obsah aminokyselin v odrůdách jetele lučního a různou rezistencí k patogenním houbám rodu *Fusarium*. Rostl. Vyr., 35, 1989, č. 11, s. 1169-1174.
- KOVÁČIKOVÁ, E. - KÚDELA, V.: Příčiny špatného přezimování jetele lučního. Rostl. Vyr., 30, 1984, č. 2, s. 201-208.
- LEATH, K. T.: The *Fusarium* root rot complex of selected forage legumes in the northeast. Pa. Agric. Exp. Sta. Res. Bull., 777, 1971, 64 s.

Došlo dne 26. 4. 1990

E. Kováčiková, A. Fojtík, A. Vlasáková, H. Jakešová
(Research Institute for Crop Production, Praha - Ruzyně;
Breeding Station, Hladké Žitovice, Czechoslovakia)

Testing red clover for resistance to causal agents of root rots

Original strains of the tetraploid cultivar Kvarta, tentative cultivars HŽ-III, HŽ-IV, HŽ-V and some cultivars of world collection of red clover (*Trifolium pratense* L.) were selected for study, in three ontogenetic stages, for resistance to *Fusarium oxysporum* Schlecht. and to *F. solani* (Mart.) Appel., the most virulent species. In laboratory tests, inoculations with pathogenic fungi were carried out in 3 days old plants by the test-tube method (Kováčiková et al., 1987). Reaction was evaluated in 17 days old plants. Reaction of each plant was ranked on a subjective scale as follows: 0 (resistant), 1 (moderately resistant), 2 (moderately susceptible) and 3 (susceptible). By evaluating the disease severity rating of all plants we could characterize the whole strain. After inoculation with *F. oxysporum* (Tab. II.), all strains of the tentative cultivars HŽ-III and HŽ-V were resistant (R) or moderately resistant (SR); the strains of the tetraploid cultivar Kvarta and tentative cultivar HŽ-IV were, in most cases, moderately resistant (SR) or moderately susceptible (SN) and only in sporadic cases resistant (R). For the most part all original strains, we found moderately resistant (SR) and moderately susceptible (SN) reactions and only exceptionally resistant (R) reaction after inoculation with *F. solani* (Tab. II). In the cultivar Perenta, in 27% of the strains of the cultivar Kvarta, in 45% of the strains of the tentative cultivar HŽ-III, in 12% of HŽ-IV and in 25% of the strains of HŽ-V, a similarity of reaction to both fungi was recorded after separate inoculation with *F. oxysporum* and *F. solani* (Tab. II). In glasshouse (pot) trials, inoculations with the mixture of the same pathogenic fungi (*F. oxysporum* and *F. solani* in the ratio 2 : 1, respectively) were carried out in 8 weeks old plants by dipping wounded roots in spore suspension (10^6 /ml). Reaction of the plants was evaluated in 6 months old plants on a subjective scale as in the test-tube method. Evaluation was based on the cross (PŘ) and longitudinal (POŘ) sections that exhibited yellowish or brownish vascular tissues of roots and crowns in diseased plants. The strains were ranked into four categories (R, SR, SN, N). The proportion of resistant (R) and moderately resistant (SR) strains increased to 54 % of the strains of the cultivar Kvarta, to 90 % of the tentative cultivar HŽ-III, to 87% of HŽ-IV, to 75% of HŽ-V. In world cultivars the proportion of resistant (R)

and moderately resistant (SR) plants was only 42% (Tab. III). Six months old plants had not the same reaction after inoculation with the mixture of fungi as 17 days old plants after single *F. oxysporum* or *F. solani* inoculation (Tab. II, III). In field trials, reaction of plants to natural infection was applied for ranking the strains of the cultivar Kvarta and the strains of the tentative cultivars HŽ-III, HŽ-IV, HŽ-V and the collection of the world cultivars Tempus, Matri, Teroba, Trifomo, Novosibirsky (ODR) into various (R, SR, SN, N) categories. Disease severity was evaluated by comparing the number of surviving plants each year with the number of survived plants in the preceding year (= 100%). The highest number of strains in resistant (R) categories was found in the first two years in the tentative cultivar HŽ-V. In the last year (the 3rd one) we ascertained a high proportion of the strains of all tentative cultivars resistant to natural infection pressure (strains of HŽ-III 56%, HŽ-IV 24%, HŽ-V 38%) and a low resistance of collection cultivars, namely 12% (Figs. 1, 2).

Trifolium pratense L.; *Fusarium oxysporum*; *F. solani*; methods; resistance; ontogenetic development

MOŘENÍ VOJTĚŠKY SETÉ (*MEDICAGO SATIVA* L.) PROTI LISTOPASŮM (*SITONA* SPP.)

Jiří ROTREKL

Výzkumný a šlechtitelský ústav pícninářský, 664 41 Troubsko u Brna

Insektofungucidní moření osiva je zatím nejspolehlivější způsob ochrany vzcházející vojtěšky před listopasy a houbovými chorobami. V laboratorních, skleníkových a provozních pokusech byly ověřeny insekticidní složky mořící suspenze na bázi carbofuranu a furathiocarbů spolu s fungicidy účinnou látkou thiram a inkrustační látkou Hydrokol 30. Bylo prokázáno, že složky mořící suspenze nepůsobí negativně na biologickou hodnotu osiva a uchrání vzcházející vojtěšku před žírem listopasů. Na základě výsledků byl zpracován a provozně ověřen technologický postup insektofungucidního moření osiva vojtěšky s tím, že se předpokládá postupná náhrada dosud doporučené složky moření (Furadan 35 ST - carbofuran) za méně toxickou formulaci nového přípravku s účinnou látkou furathiocarb.

vojtěšky; listopasy; insekticidy; fungicidy

Vzcházející porosty vojtěšky jsou kromě houbových chorob napadány brouky rodu *Sitona* - listopasy. Tito nosatci ožírají vzcházející vojtěšku a v závislosti na jejich početnosti a průběhu povětrnostních podmínek mohou založený porost vážně poškodit. Zabránit škodám, které způsobují, můžeme aplikací granulovaných insekticidů při seti (P o l e v š č i k o v a , S t e p a n o v , 1971), foliárním ošetřením insekticidy (B o u r n o v i l l e , 1983), nebo mořením osiva. Aplikace granulovaných insekticidů je problematická, protože nejsou v zemědělské praxi běžně k dispozici speciální aplikátory a biologická účinnost granulátů je velmi závislá na průběhu povětrnostních podmínek v období vzcházení (R o t r e k l , 1978). Přímou, represivní ochranu lze použít u porostů, které jsou napadeny listopasy v období děložních lístků až prvního trojlístku v počtu 5 až 10 brouků na 100 rostlin. Při této početnosti a vývojovém stadiu vojtěšky způsobí listopasy během několika dnů stoprocentní poškození rostlin (R o t r e k l , 1979). Na základě poloprovozních pokusů byl doporučen přípravek Decis 2,5 EC v dávce 0,5 l/ha ve 300 l vody. Účinně hubí listopasy a nepůsobí fytotoxicky na mladou vojtěšku (R o t r e k l , 1984). Zásadní nedostatek této metody ošetření je, že vlastním zásahem nehubíme jen listopasy, ale i užitečné druhy

hmyzu. Jedná se zejména o příslušníky čeledi střevlíkovitých (Carabidae), kteří působí jako predátoři různých škůdců a konzumují i velké množství vajíček listopasů (R o t r e k l, 1978).

V současné době za nejvhodnější ochranu vzcházející vojtěšky před listopasy, ale i před houbovými chorobami považujeme insektofungicidní moření. Zajistí ochranu vojtěšky bez ohledu na průběh povětrnostních podmínek v době vzcházení a zahubí pouze ty druhy hmyzu, které jí poškozuji. Toto chemické ošetření je ekonomicky nenáročné a chrání užitečné druhy hmyzu v nově zakládaném porostu vojtěšky. Z tohoto důvodu jsme se touto metodou ochrany nejvíce zabývali. První výsledky jsme dosáhli již dříve (R o t r e k l, 1981) a do současné doby jsme pracovali na výběru dalších vhodnějších insekticidních složek moření a na technologickém postupu moření osiva vojtěšky.

MATERIÁL A METODY

Pokusy s mořením osiva vojtěšky probíhaly v letech 1987 až 1989 v laboratorních, skleníkových i polních podmínkách. Jako fungicidní složka moření byly použity přípravky na bázi thiramu (Wolfen Thiuram 85, výrobce VEB Berlin Chemie nebo Pomarsol forte 80 WP, výrobce Bayer AG) s 85 nebo 80 % účinné látky. Snížená dávka fungicidního přípravku 2 kg/t byla aplikována při použití inkrustační látky Hydrokol 30. Hydrokol 30 je směsí polymerních látek, dispergovaných ve vodním prostředí a obsahující barvivo a stabilizátor. Insekticidní složku mořící suspenze tvořily tyto přípravky:

Přípravek	Účinná látka a její obsah	Dávka na 1 t osiva	Výrobce
Furadan 35 ST	carbofuran - 350 g.l ⁻¹	5 l	FM Chemicals SA, Švýcarsko
Diafuran 35 ST	carbofuran - 350 g.l ⁻¹	5 l	Mitsubishi Corporation, Japonsko
Promet 300 EW	furathiocarb - 300 g.l ⁻¹	6 l	Ciba Geigy, Švýcarsko
Promet 400 CS	furathiocarb - 400 g.l ⁻¹	5 l	Ciba Geigy, Švýcarsko
Oncol 40 SC	40 % benfuracambu	5 l	Otsuka Chemical Co, Japonsko

Osivo vojtěšky odrůdy Palava bylo mořeno na laboratorní mořičce Mini Rotostat 150, navržená technologie se v provozních podmínkách ověřovala na mořičce Gustafson 100 SS na čistících stanicích Osevy. V laboratorních a skleníkových pokusech byl hodnocen vliv použitých mořidel na energii klíčení, klíčivost, vzházivost, žír listopasů a výnos zelené hmoty. Klíčivost byla sledována na Jakobsenovém klíčidle a hodnocena podle ČSN 46 0610, tj. energie klíčení za čtyři dny a klíčivost za 10 dní. Žír listopasů byl sledován v izolovaných miskách, do kterých byli při vývojovém stadiu děložních lístků až prvních pravých lístků vojtěšky nasazeni brouci listopasů v poměru jeden brouk na 10 rostlin. Hodnotilo se poškození rostlin okusem listopasů ve třech stupních (R o t r e k l, 1979). V laboratorním testu byl také hodnocen vliv inkrustačního přípravku Hydrokol 30 na biologickou hodnotu osiva vojtěšky. Byla sledována energie klíčení, klíčivost a délka klíčků vojtěšky u kontroly a varianty. Osivo bylo máčeno ve vodě (kontrola) a v 1 % vodní suspenzi Hydrokolu po dobu 24 hodin.

Získané výsledky byly hodnoceny analýzou variance a *t*-testem na počítači Robotron A 5120.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Laboratorní pokusy

Vliv moření na energii klíčení, klíčivost a žír listopasů je vyhodnocen v tab. I.

V roce 1987 se energie klíčení použitím mořidel průkazně nesnížila ($F = 1,23$). Nejnižší byla u varianty s přípravkem Furadan 35 ST a inkrustační látkou Hydrokol 30 (85,5 %), nejvyšší u varianty Diafuran 35 ST (91,8 %) a Promet 300 EW (90,8 %). Klíčivost se pohybovala od 93,0 do 97,8 % bez průkazného rozdílu mezi sledovanými variantami ($F = 2,12$). Během 24 hodin poškodili listopasi v nemořené kontrole 26,8 % rostlin, v mořených variantách pouze 3,0 až 4,3 % ($F = 149,9$). V roce 1988 nebyly zjištěny průkazné rozdíly v energii klíčení ani v klíčivosti. Rozdíly těchto hodnot mezi jednotlivými lety (výrazně nižší energie klíčení v roce 1988) jsou způsobeny kvalitou osiva z různých sklizňových ročníků. Při sledování žíru brouků na vojtěšce odpovídaly získané výsledky poznatkům z minulého roku (1987). Nejvíce byla poškozena kontrola (57,3 %), poškození rostlin mořených variant bylo jednotlivými okusy od 10,7 do 13,3 % ($F = 60,8$). V roce 1989 byla energie klíčení u mořených variant průkazně

vyšší než u nemořené kontroly. Nejvyšší hodnoty byly dosaženy s insekticidní složkou obsahující furathiocarb (Promet 300 EW 94,0 % a Promet 400 CS 93,0 %) s vysoce průkazným rozdílem oproti kontrole s hodnotou 84,3 % ($F = 8,82$). Klíčivost osiva byla vysoká ve všech variantách s hodnotami 98,3 až 99,8 % bez průkazného vzájemného rozdílu ($F = 1,89$).

I. Laboratorní pokusy s mořením osiva vojtešky - Laboratory experiments with lucerne seed dressing

Rok ¹ Varianta ²	Energie klíčení [%] ³	Klíčivost [%] ⁴	Poškozené rostliny listopasy ⁺ [%] ⁵
1987			
Kontrola (neošetřená) ⁶	89,3	97,8	26,8
Furadan 35 ST + thiran + Hydrokol	85,5	93,0	4,3
Diafuran 35 ST + Thiran + Hydrokol	91,8	95,3	3,5
Promet 300 EW + thiram + Hydrokol	90,8	94,0	3,0
1988			
Kontrola (neošetřená) ⁶	41,3	82,8	57,3
Furadan 35 ST + thiram + Hydrokol	42,3	83,3	10,7
Diafuran 35 ST + thiram + Hydrokol	48,5	84,8	13,3
Promet 300 EW + thiram	44,3	80,3	12,0
1989			
Kontrola (neošetřená) ⁶	84,3	98,3	nehodnoceno ⁷
Furadan 35 ST + thiram + Hydrokol	87,5	98,3	
Diafuran 35 ST + thiram + Hydrokol	87,7	98,8	
Promet 300 EW + thiram	94,0	99,3	
Promet 400 CS + thiram	93,0	99,8	
Oncol 40 SC + thiram	87,3	99,5	

+ listopas pruhovaný (*Sitona humeralis*)

¹year; ²variant; ³energy of germination [%]; ⁴germinating ability [%]; ⁵plants damaged by *Sitona* beetle [%]; ⁶control (untreated); ⁷nonevaluated

Před zavedením inkrustačního přípravku Hydrokol 30 do technologie moření osiva jsme ověřovali možný negativní vliv tohoto přípravku na osivo vojtěšky. Energie klíčení byla o 5,3 % vyšší u osiva máčeného v Hydrokolu 30 ($t = 5,09$), rozdíly v klíčivosti ve srovnání s kontrolou byly minimální a neprůkazné (kontrola 94,8 %, Hydrokol 30 95,5 %). Průměrná délka klíčku v době, kdy se hodnotila energie klíčení, byla u kontroly 29,3 mm a u varianty Hydrokol 30 28,9 mm ($t = 0,35$). Za deset dní byla délka klíčků průměrně 33,2 mm u kontroly a 31,5 mm u varianty s Hydrokolem 30 ($t = 1,29$). Tento inkrustační přípravek i při delším působení na osivo výrazně nesnižoval jeho biologickou hodnotu.

Skleníkové pokusy

Souhrnné výsledky skleníkových pokusů přináší tab. II. Žádná z mořených variant nepůsobila negativně na vzcházivost vojtěšky. V roce 1987 se pohybovala v rozmezí 79,4 do 85,4 % (Promet 300 EW), v roce 1988 od 65,7 do 69,4 % (Promet 300 EW) a v roce 1989 od 50,3 do 62,3 % (Promet 300 EW). Uvedené rozdíly nebyly první dva roky statisticky průkazné ($F = 2,09$; $F = 0,81$). V roce 1989 byly nejlepší výsledky dosaženy s přípravky na bázi furathiocarbu ($F = 4, 26$). Průkazně největší poškození rostlin listopasy bylo zjištěno vždy u nemořené kontroly a pohybovalo se v jednotlivých letech od 94,2 do 100 % ($F = 25,3$; $F = 50,4$). Poškození jednotlivých rostlin v mořených variantách bylo pouze prvním stupněm (ojedinělé okusy) ve srovnání s kontrolou, kde okusy byly četnější a většina rostlin byla poškozena druhým a třetím stupněm. Hmotnost nadzemní části rostlin byla statisticky významně vyšší v mořených variantách než v nemořené kontrole, kromě některých variant v roce 1989 (Oncol 40 SC a Diafuran 35 ST). V roce 1987 dosahovaly mořené varianty o 24,8 až 49,1 % vyšší výnos oproti kontrole ($F = 20,0$); v roce 1988 o 28,1 až 44,4 % ($F = 5,42$). Hmotnost píce měly v roce 1989 na úrovni kontroly (16,7 g) varianty mořené přípravky Diafuran 35 ST a Oncol 40 SC; nejvyšší výnos zaznamenala varianta mořená přípravkem Promet 300 EW.

Provozní pokusy

Na základě získaných výsledků a zkušeností s insektofungicidním mořením osiva vojtěšky jsme navrhli technologický postup tohoto moření a ověřili jej v provozních podmínkách. Výsledky zjištěné energie klíčení a klíčivosti osiva z vybraných zemědělských podniků v letech 1987 a 1988 jsou uvedeny

II. Skleníkové pokusy s mořením osiva vojtěšky - Glasshouse experiments with lucerne seed dressing

Rok ¹ Varianta ²	Vzcházivost [%] ³	Poškození rostlin listopisy ⁺ [%] ⁴	Hmotnost nadzemních částí rostlin [g] ⁵
1987			
Kontrola (neošetřená) ⁶	83,8	96,8	16,9
Furadan 35 ST + thiram + Hydrokol	79,4	12,6	22,9
Diafuran 35 ST + thiram + Hydrokol	80,6	38,5	21,1
Promet 300 EW + thiram + Hydrokol	85,4	31,0	24,5
1988			
Kontrola (neošetřená) ⁶	68,7	94,2	15,3
Furadan 35 ST + thiram + Hydrokol	68,7	72,9	21,7
Diafuran 35 ST + thiram + Hydrokol	65,7	75,4	21,2
Promet 300 EW + thiram	69,4	72,0	19,6
1989			
Kontrola (neošetřená) ⁶	51,1	100,0	16,7
Furadan 35 ST + thiram + Hydrokol	50,3	40,0	18,6
Diafuran 35 ST + thiram + Hydrokol	56,3	nehodnoceno ⁷	16,9
Promet 300 EW + thiram	62,3	40,6	20,2
Promet 400 CS + thiram	60,7	34,1	18,5
Oncol 40 SC + thiram	55,3	40,2	16,8

+ listopas pruhovaný (*Sitona humeralis*)¹year; ²variant; ³emergence rate [%]; ⁴plants damaged by Sitona beetle [%]; ⁵above-ground matter weight [g]; ⁶control (untreated); ⁷nonevaluated

III. Pokusy s mořením osiva vojtěšky v provozních podmínkách - Experiments with lucerne seed dressing in operating conditions

Rok ¹ Varianta ²	Zemědělský podnik ³	Energie klíčení [%] ⁴	Klíčivost [%] ⁵
1987			
Nemořené osivo ⁶	JZD Hustopeče	75,8	98,0
Mořené osivo ⁷		73,8	97,5
Nemořené osivo ⁶	KOSS Velké Pavlovice	75,5	97,5
Mořené osivo ⁷		73,8	97,0
Nemořené osivo ⁶	ČSSS Znojmo	52,3	98,0
Mořené osivo ⁷		59,0	96,0
1988			
Nemořené osivo ⁶	ČSSS Znojmo	54,3	89,5
Mořené osivo ⁷		71,8	95,5

Osivo namořeno na mořičce Gustafson 100 SS. Mořicí suspenze připravena rozmícháním 2 kg fungicidu na bázi TMTD (Wolfen Thiuram 85 nebo Pomarsol forte 80 WP) ve 2 l vody s přidáním 5 l Furadanu 35 ST a 2 l Hydrokolu 30. Na jednu tunu osiva aplikováno 10 l uvedené suspenze - Seeds were treated in a seed dresser Gustafson 100 SS. Dressing suspension was prepared by mixing 2 kg of TMTD based fungicide (Wolfen Thiuram 85 or Pomarsol Forte 80 WP) in 2 l of water with the addition of 5 l of Furadan 35 ST and 2 l of Hydrokol 30. 10 l of the suspension was applied per 1 ton of seeds

¹year; ²variant; ³agricultural enterprise; ⁴energy of germination [%]; ⁵germinating ability [%]; ⁶untreated seeds; ⁷treated seeds

v tab III. V prvním roce sledování nebyly zjištěny statistické rozdíly ($F = 2,93$). V roce 1988, kdy bylo osivo vojtěšky inkrustováno se zlepšeným dávkováním (místo odkapávání rozstřík suspenze), byl zjištěn průkazný rozdíl v energii klíčení ($t = 5,0$) i u klíčivosti ($t = 3,67$) u partie osiva z ČSSS Znojmo. U této partie osiva, která byla ze sklizňového roku 1986, byl vyšší podíl tvrdých semen (až 18 %) a v nemořené kontrole 10,5 % nabobtnalých, neklíčivých semen.

Řešení problému likvidace listopasů na vzcházející vojtěšce cestou kombinovaného moření insekticidy a fungicidy se podle dostupných literárních údajů nikde nesledovalo. Námi navrhovaný způsob ochrany je výhodný po ekonomické i ekologické stránce. Aplikace granulovaných insekticidů v našich podmínkách je v současné době asi 30krát dražší než kombinované moření v přepočtu na jednotku plochy porostu. Kromě toho dáváme od půdy mnohonásobně vyšší množství účinné látky než při moření. Aplikace postřikových přípravků v boji proti škůdcům na vzcházející vojtěšce je

levnější ve srovnání s granuláty, ale pět až šestkrát dražší než moření. Tento způsob však velmi negativně působí na užitečný hmyz budoucího vojtěškového porostu. Z tohoto pohledu se zdá kombinované moření insekticidy a fungicidy perspektivním způsobem ochrany vzházející vojtěšky. Působí selektivně na škůdce, cena 25 až 35 Kčs za 1 ha je nízká a při využití inkrustační látky typu Hydrokol a přípravků s nižší toxicitou pro teplokrevné živočichy (např. vhodná formulace furathiocarbu) lze toto opatření hodnotit pozitivně.

Literatura

- BOURNOVILLE, R.: Cultures fourragères. Les principaux ravageurs des luzernières. Phytoma-Defense des cultures, 1983, č. 5, s. 43-36.
- POLEVŠČIKOVA, V. N. - STEPANOV, F. A.: Granulirovannyj fosfamid protiv vreditelej vschodov ljucerny. Zašč. Rast., 16, 1971, č. 12, s. 17-18.
- ROTREKL, J.: Škodlivost larev rodu *Sitona* a *Ditylenchus dipsaci* na jetelovinách. I. část: Škodlivost brouků rodu *Sitona* na vzházející vojtěšce a ochrana proti nim. (Závěrečná zpráva.) Troubsko, VŠÚP 1978, 43 s.
- ROTREKL, J.: Škodlivost listopasů na vzházející vojtěšce. Ochr. Rostl., 15, 1979, č. 2, s. 139-144.
- ROTREKL, J.: Insektofungicidní moření osiva vojtěšky. Agrochémia (Bratislava), 21, 1981, č. 6, s. 176-178.
- ROTREKL, J.: Poškození vojtěšky listopasy a ochrana proti nim. Zprávy ÚKZÚZ, 25, 1984, č. 2, s. 47-50.

Došlo dne 14. 2. 1990

J. Rotrekl (Fodder Crop Research and Breeding Institute,
Troubsko u Brna, Czechoslovakia)

Lucerne seed dressing against *Sitona* beetle

The treatment of lucerne seeds with insecticides and fungicides is, at the present time, the most reliable way of the *Sitona* beetle and fungal diseases control in the emerging stands. In laboratory, glasshouse and field experiments insecticidal ingredients of seed treatment suspension on the basis of carbofuran and furathiocarb together with the active substance thiram and incrustive substance Hydrokol 30 were verified. Seed treatment effects on germination energy, germination, and feeding of *Sitona* beetles under laboratory conditions are summarized in Table I. Germination energy was not lowered by the applied ingredients of seed treatment suspension. Treatments with insecticidal ingredients containing furathiocarb (Promet 300 EW, Promet 400 CS) demonstrated a germination energy which was

insignificantly higher during the first two years ($F=1.23$; $F=2.1$) and significantly ($F=8.82$) in the year 1989. Germination was without significant difference between tested treatments ($F=2.12$; $F=0.23$; $F=1.89$). Untreated control was always significantly most damaged by feeding of *Sitona* beetles ($F=149.9$; $F=60.8$); the treated plants were damaged only by sporadic feeding. Results of glasshouse experiments are summarized in Table II. The emergence rate of lucerne stands was not affected by any of the treatments. Within the first two years the differences given in Table II. were not statistically significant ($F=2.09$; $F=0.81$); in 1989 the best results were achieved with preparations on the basis of furathiocarb ($F=4.26$). Significantly greatest damage in lucerne plants caused by *Sitona* beetles was observed in untreated control and it ranged, in different years, between 94.2 and 100 percent ($F=25.3$; $F=50.4$). The weight of above-ground plant parts was statistically significantly higher in treated plots than in untreated control, with the exception of some treatments in 1989 (Oncol 40 SC and Difuran 35 ST). On the basis of the results, the technological method of lucerne seed treatment with insecticides and fungicides was worked out and tested under the field conditions. In 1987-1989 lucerne seeds were treated with the suspension containing 2 kg of fungicidal preparation on the basis of thiram, 2 l of water, 5 l of Furadan 35 ST and 2 l of the incrustive preparation Hydrokol 30 in the seed-treating machine Gustafson 100 SS. The obtained results concerning germination energy and germination of lucerne seeds in some agricultural enterprises are given in Table III. Within first year of observing, no statistical differences were found out ($F=2.93$); in the year 1988 there was found significant difference both in increased germination energy ($t=5.0$) and in germination ($t=3.67$) of the treated seeds. In the future the insecticidal substance Furadan 35 ST is to be replaced by a less toxic formulation of a new preparation with furathiocarb as active substance in the technological method of fungicidal and insecticidal seed treatment of lucerne.

alfalfa; *Sitona* beetle; insekticides; fungicides

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

VIII. CELOSTÁTNÍ MYKOLOGICKÁ KONFERENCE

Ve dnech 28. srpna až 1. září 1989 se konala na Vysoké škole zemědělské v Brně VIII. celostátní vědecká mykologická konference Československé vědecké společnosti pro mykologii při ČSAV. Spolupořadatelem této konference byla Vysoká škola zemědělská v Brně a Moravské museum v Brně. Tato konference se konala v Brně u příležitosti oslav 70. výročí vzniku VŠZ v Brně. Záštitu nad ní převzal prof. ing. Stanislav P r o c h á z k a, DrSc., rektor VŠZ, člen korespondent ČSAV a předseda Vědeckého kolegia teoretických základů zemědělství ČSAV. Jmenovaný se účastnil slavnostního plenárního zasedání a přednesl pozdravný projev. Ústřední heslo konference znělo: *Genofond hub, jeho ochrana a využití*. Konference se účastnilo na 150 odborníků mykologů, pracovníků vědy, výzkumu, školství a kultury, ochrany životního a přírodního prostředí apod. Jelikož mykologie zasahuje významně do řady biologických a technických oborů, byly mezi účastníky konference botanikové, taxonomové, mykofloristé, ale i fyziologové, biochemici, genetici, ekologové a ochránci ŽP a PP z různých organizací a institucí (ČSAV, SAV, resortních výzkumných ústavů, vysokých škol biologického zaměření a aplikované biologie - zemědělské a lesnické mykofytopatologie, lékařské mykologie a mykotoxikologie, ale i zástupce praxe apod.). Na plenárním zasedání, které zahájilo vlastní konferenci, byly předneseny čtyři stěžejní referáty. Prof. RNDr. Zdeněk U r b a n, DrSc., z Přírodovědecké fakulty KU v Praze zhodnotil vývoj československé mykologie od jeho počátku do současné doby. Na závěr svého objektivního hodnocení vývoje v posledních desetiletích konstatoval, že v současné době nejsou nijak zvlášť příznivé poměry pro rozvoj základního badatelského mykologického výzkumu na stávajících pracovištích a v organizacích. Doporučuje koncentrovat úsilí i iniciativu odborníků i celospolečenské prostředky ke konstituování laboratoře nebo ústavu základního mykologického výzkumu. Velmi zajímavé, avšak i celospolečensky užitečné perspektivy biotechnologického využití mykromycetů načrtl v kolektivním referátu RNDr. V. M u s í l e k, DrSc., člen korespondent ČSAV z Mikrobiologického ústavu ČSAV v Praze. Zaměřil se především na možné využití houbové biomasy v potravinářství, výživě lidí a hospodářských zvířat, dále na využití celé řady komplexů enzymů v potravinářství, krmivářství, průmyslu, dále v ochraně ŽP a PP, jakož i na využití metabolických aktivních i neaktivních produktů hub, primárního a sekundárního charakteru. Jde zejména o celou řadu antifungálních nebo antibiotických nativních nebo synteticky vyráběných sloučenin využívaných v humánním nebo veterinárním lékařství. V referátu autor dále hodnotil perspektivy biotechnologického využití biosyntetických a biodegradačních kapacit hub, jakož i možnosti přenosu žádaných znaků do rychleji rostoucích mikroorganismů na podkladě buněčného a genového inženýrství. O některých aspektech vývoje genofundu hub pojednala ve svém příspěvku RNDr. L. M a r v a - n o v á, CSc., z Československé sbírky mikroorganismů UJEP v Brně. Autorka poukázala na významný vliv člověka na vývoj přirozených a umělých biocenóz a genofond hub. Zhodnotila závažný vliv průmyslových intoxikací na narušení mykogenofundu a v této souvislosti zdůraznila význam genových bank a mykothek, tj. sbírek kultur hub v současnosti i v budoucnu pro biosféru a její normální funkci. O současném stavu a perspektivách ochrany hub hovořil tajemník Československé vědecké společnosti pro mykologii při ČSAV S. Š e b e k. Autor zhodnotil současný výzkum změn v mykoflóře v ČSFR, jakož i nutnost prosazení řady opatření k ochraně mykoflóry z hlediska komplexní ochrany přírody a zdraví člověka. Rovněž nastínil perspektivní problémy a úkoly na úseku ochrany hub a jejich životního prostředí. Informoval plénium o přípravě vydání Červeného seznamu ohrožených druhů hub v ČSFR, která vychází na podkladě zmapování a inventarizace vybraných druhů.

Další den navazovalo na plenární zasedání jednání účastníků ve čtyřech sekcích. V první sekci byly projednány problémy taxonomie, ekologie, mykofloristiky a ochrany hub. V rámci sekce bylo předneseno 19 příspěvků jednotlivých autorů nebo kolektivů z různých mykologických pracovišť. Za významné z hlediska ochrany hub lze považovat příspěvky pojednávající o druzích hub, zařazených do Červené knihy ČSFR a problematice právní ochrany hub v ČSFR. V další sekci se příspěvky zaměřily na problematiku fyziologie, biochemie a na genetiku hub. Pozornost účastníků se především zaměřila na poznatky s využitím schopností hub vytvářet symbiosu s rostlinami a s jejich výběrem pro umělou mykorrhizaci sadby především lesních dřevin, dále na aspekty ligninolytické aktivity především dřevokazných hub, využití řady antifungálních látek, vztahů mezi nimi a chemickými strukturami fenolů, alifatických, aromatických a jiných kyselin. Současně byly sděleny zkušenosti s pěstováním dosavadního sortimentu hub u nás a některých nových druhů na syntetickém substrátu. Další sekce byla orientována na mykotoxikologii a lékařskou mykologii. Tematicky byly referáty různorodé, avšak byly vesměs velmi aktuální a hospodářsky významné. Pozornost byla zaměřena na problematiku otrav houbami, antimykotik a antibakteriálních antibiotik a navození rezistence vůči nim, na vznik, stanovení a biodegradaci mykotoxinů v potravinách a krmivech. Podobně byly sděleny významné údaje o stanovení a významu aflatoxinu v potravinách a krmivech. Zajímavé byly údaje o dermatomykózách a oportunních mykózách, jakož i skladbě mikromycetů v prostorách panelových domů, bytech, stájích aj., jejich toxigenním, alergickým a dalším působením na lidské populace a chovné a drobné zvířectvo.

Nejvíce příspěvků bylo předneseno v sekci fytopatologické mykologie, a to jak z oblasti zemědělské, tak i lesnické. V rámci lesnické fytopatologie se pozornost autorů soustředila na výskyty nových dřevokazných chorob u nás a možnosti biologické ochrany proti některým z nich. Zajímavé údaje byly sděleny o testování obranných reakcí tkáňových kultur modelovou houbou. V rámci zemědělské fytopatologie byl posouzen vliv ekologických činitelů, jakož i zásahu pěstitele na změny spektra a rozšíření parazitických hub na pěstovaných zemědělských plodinách. Současně byla zdůrazněna nutnost experimentálně studovat škodlivost jednotlivých škodlivých činitelů a po jejím vyhodnocení pak teprve rozhodovat o způsobu ochrany a zejména nutnosti šlechtit na rezistenci. Závažné údaje byly sděleny o rozšíření významu a ekologii houby *Tilletia contraversa*, zastoupení druhů z čeledě *Erysiphaceae* na rostlinách čeledě *Cucurbitaceae*, citlivosti některých druhů rodu *Cucumis* k houbě *Didymella bryoniae*. Pojednáno bylo i o fyto toxických metabolitech hub, napadajících pěstované rostliny, o fytopatogenních houbách jako indikátorech fytoalexinů v rostlinách, o problematice epidemiologické a možnostech šlechtění rostlin na rezistenci vůči půdním fytopatogenním a některým obligátním parazitům. Zvláštní pozornost byla věnována možnostem využití prvků biologické ochrany proti chorobám rostlin. Série přednášek se týkala hub z rodu *Trichoderma*, a to jak typizace kmenů, vlivu různých živin na růst a antagonistické vlastnosti, tak i poznatku z jejich využívání vůči hospodářsky významným fytopatogenům. Na toto významné téma navázaly příspěvky o účinnosti vybraných perspektivních fungicidů na původce rakoviny jetele a posouzení vztahů pesticidů k některým antagonistickým houbám.

Nedílnou součástí konference se staly připravené exkurze na vybrané zajímavé a významné lokality v Jihomoravském kraji. První den se uskutečnila celodenní exkurze do oblasti školního lesního podniku Křtiny, Lesnické fakulty VŠZ v Brně a do Státní přírodní rezervace Josefské údolí - část Slovenská stráň a do Státní přírodní rezervace Habrůvecká bučina. Druhý den byla realizována celodenní exkurze na zajímavé lokality Jižní Moravy, a to do Státní přírodní rezervace Cáhnov a Ranšpurk spadající do Lesní správy Lanžhot. Jde o vzácné lokality lužních lesů. Dále byla navštívena oblast Radezvous v Lesní správě Lanžhot

a některé lokality v oblasti Lesního závodu Židlochovice. Třetí den se uskutečnila celodenní exkurze do Jihlavských vrchů, především na lokality Velký Špičák a Mučírna. Všechny navštívené lokality, jak se prokázalo podle ohlasu v kruzích návštěvníků, byly zvoleny vhodně a přispěly k dobré odborné úrovni celé konference.

Na závěr VIII. celostátní vědecké mykologické konference, konané v Brně ve dnech 28. srpna - 1. září 1989, byla přijata na základě plenárního zasedání a jednání v sekcích rezoluce, hodnotící současný stav rozvoje mykologie u nás a vytyčující hlavní problémy i návody jejich řešení z hlediska perspektivních závazných celospolečenských úkolů v nejbližších letech. Účastníci konference považují za nutné vypracovat zodpovědný a kvalifikovaný rozbor významu hub pro naše národní hospodářství, přínos i negativní dopad v hlavních odvětvích, jako je zemědělství, lesnictví, humánní i veterinární lékařství, potravinářství, průmysl, biotechnologie aj. Konference poukázala na současný nedobrá stav kádrového zabezpečení mykologického výzkumu zapříčiněný vysokým věkovým průměrem současných aktivních mykologů a nedostatečným rozsahem a možnostmi výuky mykologie na všech typech škol. Jeví se nutné, i s ohledem na obecnější zvýšení úrovně mykologických vědomostí širokých vrstev, vypracovat kvalifikovaný rozbor a navrhnout adekvátní rozsah a obsahovou náplň výuky mykologie pro základní, střední školy a pro biologicky zaměřené směry na vysokých školách. Současný stav národního hospodářství nutně vyžaduje propojovat a racionálně využívat všech dostupných kádrových a materiálně-technických prostředků. Jako naprosto nutné se jeví zajistit soustředění sil a prostředků a zvýšit efektivnost mykologického výzkumu vytvořením centrálního vědeckého pracoviště, nejlépe Mykologického ústavu ČSAV. Z jednání vyplynulo, že dosavadní činnost v ochraně přírody dostatečně nezahrnuje ochranu mykogenofundu a nedoceňuje jej z hlediska jeho významu pro biosféru. Jeví se nezbytné účinněji chránit zbývající mykogenofond, ať již jde o chráněná území při současném docenění udržování a budování mykologických sbírek, tj. herbářů a živých kultur hub jako genových bank a zdrojů tkáňových kultur.

Závěrem této informační zprávy lze konstatovat, že VIII. celostátní vědecká mykologická konference splnila předpokládaný odborný cíl i celospolečenský úkol. Zařadila se tak v historii vývoje Československé vědecké společnosti pro mykologii při ČSAV ke zdařilým setkáním členů této společnosti, kteří svou činností a celospolečensky významnou badatelsko-výzkumnou prací přispívají nejen k rozvoji československé mykologie, ale i celé společnosti.

Prof. ing. Zdeněk Č a ě a, DrSc.

KRÁTKÁ SDĚLENÍ

ETIOLOGIE NEKROTICKÉ KROUŽKOVITOSTI HLÍZ BRAMBOR

Jiří CHOD, Milan JOKEŠ

Výzkumný ústav rostlinné výroby, 161 06 Praha-Ruzyně

V Maďarsku popsali příznaky choroby *Becznér* et al. (1982) z odrůd *Mona* a *Rosalina*. U těchto odrůd brambor během tříletého pozorování zjistili až 20 % napadení. Příznaky na hlízách byly velmi podobné těm, které vyvolává mop top virus a virus nekrotické kadeřavosti tabáku. V roce 1984 stejní autoři zjistili v souvislosti s výskytem nekrotické kroužkovitosti hlíz brambor (*tuber necrotic ringspot disease*) ještě *X* a *Y* virus bramboru. *Novák* et al. (1986) příznaky choroby našli u brambor odrůdy *Nicola* a pojmenovali ji podle příznaků puchýřkovitost hlíz a prokázali jako možný jev onemocnění sérologicky a přenosem na indikátorové rostliny obecný kmen YVB.

V roce 1989 jsme obdrželi vzorky hlíz brambor odrůdy *Radka* z jižní Moravy s příznaky silné deformace a nekrotické kroužkovitosti. Kroužkovitá místa se barevně lišila od ostatních částí slupky, při uložení hlíz při teplotě 5 °C slupka tmavla a propadávala se. Povrch hlíz měl podobné příznaky puchýřkovitosti, které popsali *Novák* et al. (1983) - obr. 1. Rostliny, z nich vzešlé, vykazovaly metlovitý vzhled, listy horních pater se svinovaly a zbarvovaly do růžova. Pro elektronomikroskopické vyšetření jsme připravili preparáty smáčecí metodou, odběrem ze suspenze a ultratenké řezy zhotovené z kořínků a listů rostlin bramboru. Ze sérologických metod jsme použili kapkovou precipitační metodu. Mechanickou inokulaci jsme provedli na indikátorové rostliny: *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*, *N. tabacum* cv. *White Burley*, *N. debney* a *Physalis floridana*. Preparáty jsme vyšetřovali elektronovým mikroskopem Tesla 500. Elektronomikroskopické vyšetření listů prokázalo přítomnost flexibilních částic o délce 730 nm a vyšetření ultratenkých řezů z kořenů a listů přítomnost flexibilních částic podobné délky v cytoplazmě (obr. 2). V některých preparátech jsme kromě toho zjistili

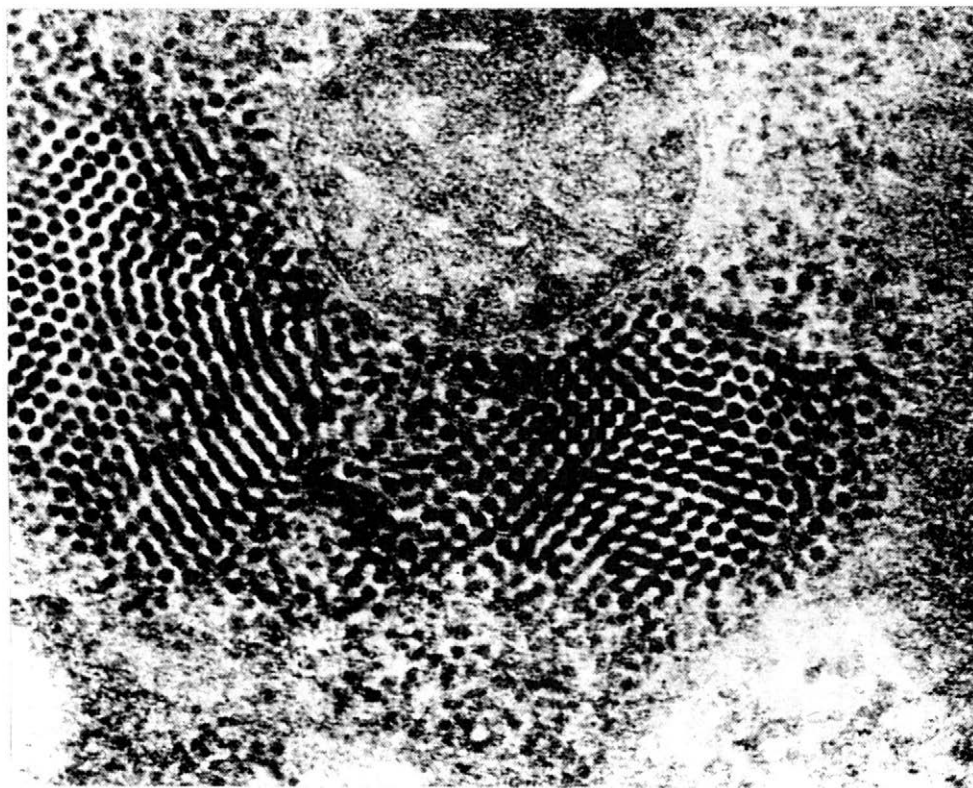


1. Hlízy brambor s příznaky deformace a nekrózy - Potato tubers with deformation and necrosis symptoms



2. Elektronogram YVB, zhotovený z ultratenkého řezu kořenů rostlin bramboru (celkové zvětšení 45 000x) - Electronmicrograph YVB, made of ultra-thin section of potato roots (total enlargement 45 000 times)

i kulovité částice o velikosti 28-30 nm akumulované v krystalických inkluzích (obr. 3). V těchto preparátech se vyskytovala také vřetenovitá tělíska typu pinwheel inclusions (obr. 4). Mechanickou inokulací jsme docílili pozitivní přenos na listy indikátorové rostliny *N. tabacum* cv. Samsun, na kterých se objevilo prosvětlení žilek a jejich lemování, na *N. debneyi* difúzní mozaika spojená s kadeřavostí listů a na *Physalis floridana* systémová nekrotická skvrnitost. Vzhledem na výskyt izometrických částic jsme izolát přenášeli mechanicky ještě na *N. tabacum* cv. White Burley a na *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa. U tabáku (obr. 5) se objevily velké nekrotické lokální léze a na listech fazolu drobné nekrotické léze (obr. 6). Šťáva z listů bramboru a tabáku vykazovala sérologickou pozitivní reakci s antisérem vůči YVB. Naše zjištění potvrdily nálezy, které zjistili B e c z n e r et al. (1984) a N o v á k et al. (1986). Kromě toho jsme našli vřetenovité inkluze, morfologicky podobné těm, které ve spojitosti s přítomností XVB a YVB našli také M a y e e a S a r k a r (1982). Mechanický přenos na fazol a tabák a výskyt kulovitých izometrických částic potvrdil zároveň výskyt viru nekrózy tabáku, který popsal v Holandsku N o o r d a n (1957) ve spojitosti s chorobou hlíz bramboru ABC. Choroba se vyskytla na odrůdě Erstling. Podle ústního sdělení (S a l a m o n, 1986) se choroba vyskytuje u některých odrůd brambor v jižní části Maďarska a v Dánsku (E n g s b r o, 1987, ústní sdělení).

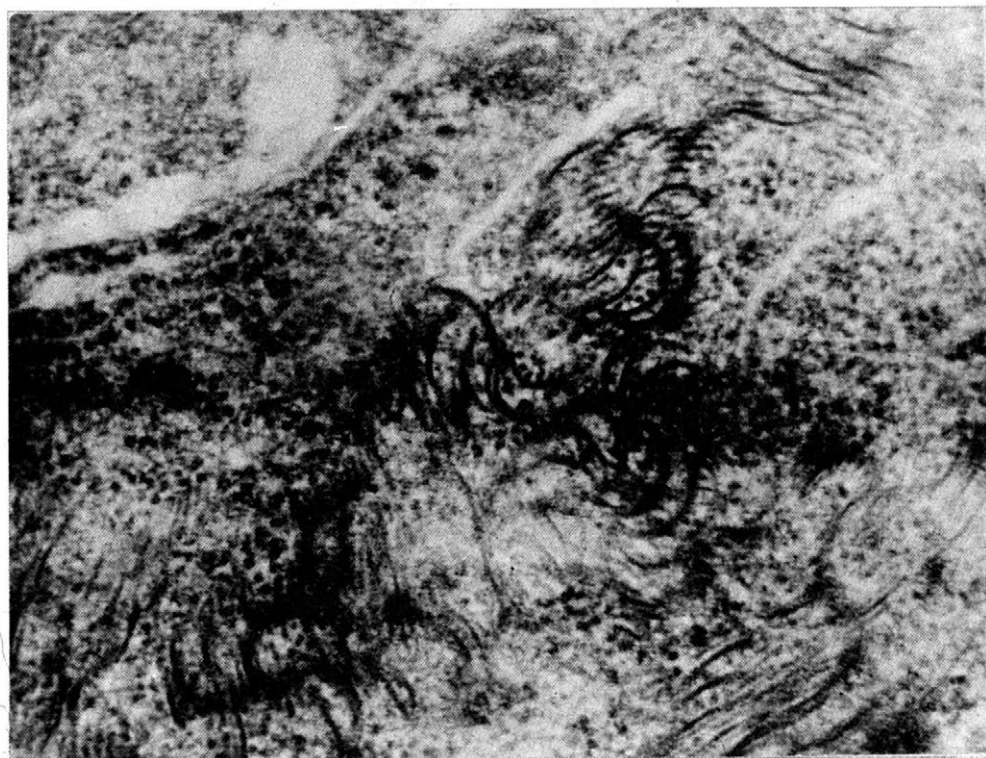


3. Elektronogram viru nekrózy tabáku zhotovený z ultratenkého bramboru (celkové zvětšení 45 000x) - Electronmicrograph of tobacco necrosis virus obtained from ultra-thin potato section (total enlargement 45 000 times)

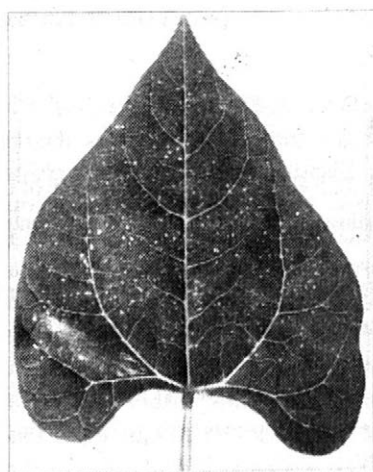
Literatura

- BECZNER, L. - FÖRSTER, H. - ROMHANYI, I. - DEZSERY, M.: The occurrence of tuber necrotic ringspot disease of potato in Hungary. Budapest, Növényvedelmi Tudományos Napok 1982.
- BECZNER, L. - HORVATH, J. ROMHANYI, E. - FÖRSTER, H.: Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Res.*, 27, 1984, 1982, s. 339-352.
- MAYEE, C. D. - SARKAR, S.: The ultrastructure of *Nicotiana tabacum* cells infected with potato virus X and potato virus Y. *J. ultrastruct. Res.*, 81, 1982, s. 124-131.
- NOORDAM, D.: Tabaknecrose virus in samenhang met sen oppervlakkige aantasting van aardappelknollen. *Tijdschr. Pl.-Ziekt.*, 63, 1957, s. 237-241.
- NOVÁK J. B. - RASOCHA, V. - LANZOVA, J.: Důkaz viru nop-top bramboru v Československu. *Ochr. Rostl.*, 19, 1983, č. 3, s. 161-167.
- NOVÁK, J. B. - RASOCHA, V. - LANZOVÁ, J.: Neznámá choroba bramboru - zduřelá kroužkovitost hlíz a její pravděpodobná etiologie. *Ochr. Rostl.*, 22, 1986, č. 1, s.1-9

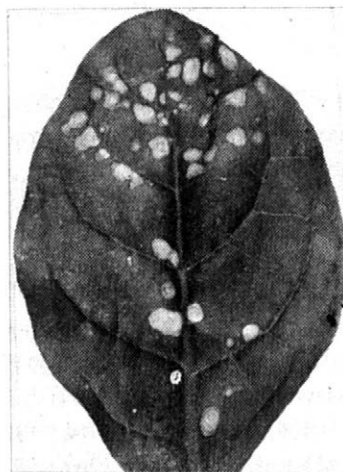
Došlo dne 20. 4. 1990



4. Elektronogram vřetenovitých inkluzí - pinwheel inclusions - zhotovený z ultratenkého řezu kořenů rostlin bramboru - Electronmicrograph of pinwheel inclusions made of ultra-thin slice of potato roots



5. Velké lokální léze na tabáku odrůda White Burley po infekci virem nekrózy tabáku - Large local lesions in the tobacco variety White Burley after the infection by the virus of tobacco necrosis



6. Lokální nekrotické léze na listu fazolu odrůdy Saxa po infekci virem nekrózy tabáku - Local necrotic lesions in bean leaves of the Saxa variety after the infection by the virus of tobacco necrosis

J. Chod, M. Jokeš

(Research Institute for Crop Production, Praha-Ruzyně, Czechoslovakia)

Etiology of necrotic ringspot disease of potato tubers

In the tubers and plants of potato, the Radka variety, with the symptoms of necrotic ringspot of tubers we found out by the method of indicator plants, mechanical inoculation on the leaves of the plant *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *N. Debneyi* and *Physalis floridana* potato virus -Y. The virus finding was confirmed also serologically and through electron microscope. In ultrathin slice from epiderm of tubers, the pinwheel inclusions were found which are in some cases accompanied by the occurrence of Y-potato virus. In ultra-thin sections from roots and tubers, further isometric particles have been found of the size 28-30 nm accumulated in the crystalline inclusions. Transferring to the indicator plants *N. tabacum* cv. White Burley and Samsun and on *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa, the tobacco necrosis virus was proved in the tubers having the symptoms of ringspot disease of potato tubers.

ZJIŠŤOVÁNÍ CITLIVOSTI ERYSIPIHE GRAMINIS SPP. K PŘÍPRAVKŮM TRIAZOLOVÉHO TYPU

Ludmila KODAROVÁ

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský - správa ochrany rostlin, 658 37 Brno

Účinná ochrana obilovin proti padlí travnímu (*Erysiphe graminis* DC) závisí do značné míry na použití fungicidů. K aplikaci jsou používány především dvě významné skupiny přípravků - hydroxypyrimidiny (ethirimol) a DMI fungicidy (triadimefon, triadimenol, propiconazol). V průběhu jejich užívání se však začala objevovat snížená citlivost patogena, tedy padlí travního. Určitým přínosem v této situaci je prokázána existence negativní cross-rezistence mezi ethirimolem a triazoly (Wolfe, 1985; Wade, 1987).

Poměr četnosti izolátů *E. graminis* s různým stupněm snížené citlivosti se mění každým rokem, v závislosti na životním cyklu hostitele. V pokusech, které dělali Hollomon et al. (1984) a Butters et al. (1986), byly determinovány čtyři fenotypy s různou úrovní citlivosti k DMI fungicidům. Vysvětlení spočívá v genetické povaze tohoto typu rezistence. V případě padlí travního se jedná o polygenní typ a nástup rezistence v populaci je stupňovitý. Změna v jednom genu může snižovat senzitivitu dané populace patogena, ale totální selhání ochrany odpovídá změnám v mnohem větším komplexu. Počet genů, které jsou zapojeny, není zcela přesně znám (minimálně tři). Nebezpečím zde však zůstává fakt, že u některých rezistentních populací byla vysoká četnost kombinována s vysokou patogenitou i fitness, což vytváří reálné nebezpečí při dalším, opakovaném používání těchto fungicidů. Polní testy prokázaly, že problematika rezistence je spojena rovněž s regionem, infekčním tlakem, plodinou, resp. odrůdou a výskytem dalších patogenů. Situaci rovněž komplikuje široké spektrum účinnosti DMI fungicidů a tedy jejich časté aplikace v průběhu vegetačního období.

DMI fungicidy jsou užívány k ochraně velkého počtu plodin proti řadě patogenů. Monitoring a testování citlivosti populací *E. graminis* je třeba koncentrovat na stanovení korektních strategií ochrany v případech, kdy byla rezistence zjištěna, nebo je reálné nebezpečí, že se co nejdříve vyskytne. Obecným a základním principem, který nejlépe zabrání vzniku rezistence, jsou preventivní zásahy. Stupňovitý, pomalý vznik rezistence *E. graminis* k DMI fungicidům působí těžkosti při její determinaci, ale naopak umožňuje při přísném dodržování strategie aplikace fungicidů návrat k mnohem citlivější populaci. Rovněž je velmi nesnadné určit, kdy se rezistence k DMI vytvoří, nebo zda je zjištěná nedostatečnost chemické ochrany zapříčiněna jinými faktory.

Právě v případě vztahu *E. graminis* k DMI fungicidů je naprosto nezbytný monitoring specifické patogenity a senzitivity, ze kterých by měla vycházet doporučení systému ochrany pro každé vegetační období, pro danou oblast a pro každou odrůdu.

V poslední době se i v naší republice začaly objevovat určité náznaky nedostatečnosti triazolů v ochraně obilovin proti padlí travnímu. Na ÚKZÚZ - SOR OZAM v Brně byla v roce 1989 vypracována a ověřena rychlá, orientační metoda laboratorního testování citlivosti izolátů *E. graminis* k triadimenolu a zahájeno předběžné sledování. V principu se jedná o semikvantitativní metodu plovoucích segmentů listových čepelí v roztoku fungicidní látky (Hollomon, 1977, 1982). Testem je zjišťována celková citlivost směsných vzorků populací padlí v daném čase a prostoru.

Izolace *E. graminis* spp. je prováděna z přirozeně infikovaných listů, resp. rostlin, na nichž dochází k intenzivní sporulaci patogena. Infikovaný materiál je sbírán v polních podmínkách a izolát je v případě potřeby udržován na infaktních rostlinách ječmene jarního (odrůda Krystal) nebo pšenice (odrůda Viginta) ve skleníku. Konidie z infikovaných listů jsou přenášeny mechanicky (poprášením).

K vlastnímu testování jsou použity segmenty listových čepelí rostlin ječmene (odrůda Krystal) nebo pšenice (odrůda Viginta) chemicky neošetřených, neinfikovaných, plně turgescenčních. Odstříhané a zcela suché segmenty listových čepelí v délce cca 3 cm inokulujeme mechanicky (Sadisivan, Ellingboe, 1962), současně pro všechny pokusné varianty jednoho vzorku. Přípravu inokula jako vodnou suspenzi konidií nelze použít, protože konidie ve vodném prostředí špatně klíčí. Byl tedy použit kvalitativní způsob inokulace, který je pro tento orientační test plně vyhovující.

Infikované segmenty jsou po pěti vloženy (svrchní stranou nahoru) do Petriho misek o průměru 9 cm, ve kterých je 12 ml roztoků různých koncentrací triadimenolu. U metod používajících plovoucí segmenty je třeba užít samotné účinné látky, poněvadž komerční formulace přípravků obsahují smáčedla, která by zapříčinila potopení segmentů.

Petriho misky jsou umístěny do světelného termostatu při devítihodinovém světelném režimu, intenzitě osvětlení 10 000 luxů a při teplotě 18-20 °C. Po sedmi dnech je provedeno vyhodnocení. Varianty: kontrola - destilovaná voda; 0,01, 0,1, 0,3, 3,0 a 30,0 ppm triadimenolu. Každá varianta je minimálně třikrát opakována.

Mezní hranice citlivosti (ED_{50}) byla určena na základě různých literárních údajů pro 0,1 ppm triadimenolu (např. Schlosser, 1988; Wolfe, 1985). Hodnocení je prováděno srovnáním velikosti infikované listové plochy spolurulujícím padlím jednotlivých variant s kontrolou.

Jak již bylo uvedeno výše, jedná se orientační, kvalitativní test, který se však při hodnocení citlivosti subpopulací *E. graminis*, jak na ječmeni, tak na pšenici osvědčil jako dostačující. Je logické, že metodu bude nutné dále rozpracovat, event. upravit, aby bylo možné sledovat úroveň citlivosti padlí travního i kvantitativně a charakterizovat jednotlivé kmeny.

Výsledky předběžného testování prokázaly existenci citlivých i rezistentních izolátů, odebraných z provozních ploch ječmenů jarních i pšenic ozimých. Znovu tedy byla potvrzena potřeba průběžného sledování citlivosti houbových patogenů k systémovým fungicidům, aby bylo možné včas zabránit selhání chemické ochrany pěstovaných plodin a následným hospodářským ztrátám.

Literatura

BUTTERS, J. - CLARK, J. - HOLLOMON, D. W.: Recombination as a means of predicting fungicide resistance in barley powdery mildew. In: 1986 Brit. Crop Protect. Conf. Pests and Diseases, 1986, Vol. 2, s. 561-565.

- HOLLOMON, D. W.: Laboratory evaluation of ethirimol activity. In: McFARLANE, N. R. (Ed.): Protection agents. London, Academia Press 1977, s. 505-515.
- HOLLOMON, D. W.: The effects of tridemorph on barley powdery mildew: its mode of action and cross-sensitivity relationships. *Phytopath. Z.*, 105, 1982, s. 279-287.
- HOLLOMON, D. W. - BUTTERS, J. - CLARK, J.: Genetic control of triadimenol resistance in barley powdery mildew. In: 1984 Brit. Crop Protect. Conf. 1984, Vol. 2, s. 477-482.
- SADISIVAM NAIR, K. R. - ELLINGBOE, A. H.: A method of controlled inoculations with conidiospores of *Erysiphe graminis* var. *tritici*. *Phytopathology*, 52, 1962, s. 714.
- SCHLOSSER, E.: Fungal strains with reduced sensitivity to fungicides. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 53/2b, 1988J, s. 557-559.
- WADE, M.: The aims and activities of industry's fungicide resistance action committee. *Pl. Dis.*, 71, 1987, s. 652-653.
- WOLFE, M. S.: Dynamics of the response of barley mildew to use of sterol synthesis inhibitors. *EPPO Bulletin*, 15, 1985, s. 451-457.

Došlo dne 23. 4. 1990

L. Kodarová

(Central Control and Testing Institute for Agriculture, Brno, Czechoslovakia)

Tests of *Erysiphe graminis* spp. sensitivity to chemicals of triazole type

The control of powdery mildew in cereals depends largely on the use of fungicides. Of the chemicals these are first of all DMI fungicides. But the longer use of these chemicals brought about a decrease in sensitivity, resulting from the formation of strains resistant to the chemically controlled pathogen. In the case of powdery mildew (*Erysiphe graminis* spp.) we speak about the polygenic type of resistance, that means the increase in the population resistance is gradual. There are determination difficulties due to the slow pace of resistance formation, on the other hand it is possible to recover the much higher sensitivity of the population if the strategy of fungicide application is observed. These are the reasons why the sensitivity of *E. graminis* spp. must be longitudinally investigated. The results of monitoring should be used for formulating the system of control for each growing season, for the given region, or even for each variety. Recently certain signals have appeared that the control of powdery mildew by means of triazole application has failed also in this republic. Sometimes it is very difficult to determine if the failure of chemical control arises from the presence of resistant strains or of other factors. Therefore an expeditious preliminary method of testing the sensitivity of *E. graminis* spp. isolates to triadimenol has been worked out and checked, and preliminary investigations have been started. In principle this is a semiquantitative method of floating leaf blade segments in a fungicide solution. By means of this test the sensitivity of mixed samples of powdery mildew populations is determined in the given time and space. ED₅₀ was given by 0.1 ppm triadimenol and the evaluation consists in a comparison of the size of sporulating pathogen-infected leaf area in individual variants with the control. This test was found to be good with respect to the evaluation of the sensitivity of *E. graminis* spp. subpopulations in the conditions of agricultural practice.

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

VIII. MEZINÁRODNÍ VIROLOGICKÝ KONGRES A 3. SETKÁNÍ MEZINÁRODNÍ PRACOVNÍ SKUPINY PRO VIROLIDY V BERLÍNĚ

VIII. mezinárodní virologický kongres se konal ve dnech 26.-31. srpna 1990. Jednání kongresu probíhalo v sálech západoberlínského veletržního kongresového centra. Zúčastnilo se ho přibližně 4 000 virologů z celého světa, z toho bylo asi 500 rostlinných virologů. Kongres se konal pod patronací pana dr. Richarda von Weiszäckera, spolkového prezidenta Spolkové republiky Německo. Předsedou sekretariátu kongresu byl prof. K. O. Habermehl z Ústavu klinické a experimentální virologie Svobodné univerzity Berlín. První mezinárodní virologický kongres se konal v roce 1968 v Helsinkách a od té doby se tato setkání virologů konají pravidelně každé tři roky. O naši izolaci od světové vědy svědčí skutečnost, že se v období totalitního režimu žádný československý rostlinný virolog tohoto kongresu nezúčastnil. Doufejme, že účast alespoň jednoho pracovníka na virologickém kongresu v Berlíně znamená obrát k lepšímu. Vždyť mezi téměř pěti sty rostlinnými virology byli i účastníci z rozvojových zemí Asie a Afriky.

Jednání VIII. mezinárodního virologického kongresu probíhalo ve společných plenárních zasedáních, v sekcích a v posterových sekcích. Plenární zasedání byla věnována problematice kódování genomů virů, membránovým bílkovinám a imunitě, expresi a regulaci retrovirových virů, molekulárním základům patogeneze chorob a ochrany proti virové infekci. Ze 24 přednesených referátů byly tři věnovány rostlinné problematice.

Prof. H. L. Sänger z Mnichova hovořil na téma **Viroidy, virusoidy a satelitní ribonukleové kyseliny**, dr. T. Hohm z Brazílie na téma **Posttranskripční regulace viru mozaiky kvěťáku** a prof. R. N. Beachy ze St. Louis na téma **Obalový protein zprostředkující rezistenci proti virové infekci v transgenních rostlinách**. Jednoznačné závěry měla přednáška prof. Sängera: **Viroidy, virusoidy a satelitní ribonukleové kyseliny**. Tyto nejmenší rostlinné patogeny mají šest společných rysů:

1. Jsou spojeny s přenosnými onemocněními vyšších rostlin.
2. Jejich jedinečné charakteristiky a jejich ekonomický význam byly zjištěny teprve nedávno.
3. Jsou to jednopramenné cirkulární nebo lineární molekuly RNK složené ze 200-400 nukleotidů.
4. Jsou replikovány mechanismem rotujícího kruhu.
5. Mechanismus jejich patogenity není ještě vyřešen.
6. Mohou být považovány za žijící fosily předbuněčného světa RNK.

Pokud jde o rozdíly, viroidy, známé v současnosti jako nejmenší patogeny jsou infekční neenkapsidované a netranslatované ribonukleové kyseliny replikované enzymy hostitele. Satelitní RNK jsou neinfekční, replikačně závislí molekulární parazité pomocného viru, v jehož obalovém proteinu jsou enkapsidovány. Některé satelitní RNK mají vlastnosti podobné ribosomům a některé jsou schopné modulovat příznaky vyvolané jejich pomocným virem tak, že mírná onemocnění mění na devastující a naopak. Virusoidy jsou cirkulární satelitní ribonukleové kyseliny.

Důležitým poznatkem o úloze obalového proteinu proti virové infekci v transgenních rostlinách je vícekrát potvrzené zjištění, že expresí genů kódujících obalové proteiny rostlinných virů v transgenních rostlinách vzrůstá rezistence k infekci virem, ze kterého byl gen izolován, a k virům blíže příbuzným.

Zvláštní sekce rostlinné virologie byla věnována přenosu rostlinných virů vektory, replikaci RNK rostlinných virů, reakci hostitele na rostlinné viry, diagnóze a identifikaci

roslinných virů, potyvirům - molekulární struktura a taxonomie, rostlinným DNK virům, geneticky řízené rezistenci, satelitním virům tropických kultur. Problematice viroidů a složení jejich RNK byly věnovány příspěvky v sekci molekulární biologie. Pro rostlinné virology bylo rovněž významné jednání v sekci diagnostika, které se zabývalo sondami nukleové kyseliny v diagnóze, rychlou diagnózou virové infekce, syntetickým peptidem v diagnóze složek virové replikace.

Ke každému tématu sekce pro rostlinné viry bylo předneseno osm referátů. Prezentované výsledky významně posunuly vpřed stav vědeckého poznání v rámci jednotlivých témat. Na úseku diagnózy a identifikace rostlinných virů dr. T. A. Jones et al. (Velká Británie) referovali o citlivé metodě detekce izolátu viru západní žloutenky řepy a viru mírného žloutnutí řepy v rostlinách řepy, řepky a *Montia perfoliata* založené na polymerázové řetězové reakci (polymerase chain reaction - PCR). Metoda je mnohem citlivější než hybridizace (DNK sonda) nebo ELISA a ISEM. Tato metoda je nejnovější generací diagnostického testu, vypracovaného v posledních dvou letech. Jedná se o jedno z prvních použití PCR v diagnóze rostlinných virů. Metodu jako první rozpracoval pro diagnózu rostlinných patogenů dr. A. Haddi (USA), který referoval o podmínkách detekce viroidu jabloně (apple scar skin viroid) pomocí PCR. Dr. H. Czosnek et al. (Izrael) informovali o rychlých diagnostických testech rostlinných RNK tobamov a potyvírů a ssDNK geminivírů pomocí radioaktivních a neradioaktivních DNK sond. Dr. R. Dietzgen a dr. J. E. Thomas (Austrálie) prokázali virový původ onemocnění banana bunchy top, izolovali jedny z nejmenších virových částic (18 nm) obsahující ssDNK a připravili specifické antisérum vhodné pro ELISA stanovení viru.

Na úseku geneticky řízené rezistence zaujala informace, kterou přednesli dr. W. Kaniowski et al. (fy Monsanto, USA), o rezistenci transgenních rostlin bramboru odrůdy Russet Burbank k viru svinutky bramboru. Po umělé inokulaci rostlin mšicemi infikovanými PLRV bylo infikováno jen málo rostlin a titr viru v infikovaných rostlinách byl nízký. V transgenních rostlinách byl vyjádřen gen obalového proteinu PLRV. I některé další referáty obsahovaly výsledky přípravy transgenních rostlin odolných k virům. Dr. C. Anderson et al. (Francie) připravili transgenní rostliny tabáku s genem nepoviru (Grapevine chrome mosaic virus), dr. P. Tien et al. (Čína) transgenní rostliny rajčete a tabáku odolné k viru mozaiky okurky a ve Francii (dr. J. Kallero et al.) připravují transgenní rostliny řepy rezistentní k rhizomanii.

V rámci tématu reakce hostitele na rostlinné viry zaujaly výsledky, o nichž referovali dr. I. M. Hayese a dr. A. J. Maule (Velká Británie), kteří zjistili, že odpovědi jednoděložných a dvouděložných rostlin na systémovou infekci RNK je indukce vysokomolekulárních proteinů. Tyto proteiny jsou spojené s membránovou frakcí. Dr. K. B. Goldberg et al. (USA) prokázali, že vyjádření genu viru mozaiky kvěťáku nebo viru mozaiky krtičníku v transgenních rostlinách, které jsou systémovými hostiteli viru, vede k rezistenci těchto rostlin, zatímco transgenní rostliny, které nejsou systémovými hostiteli viru, byly virem infikovány.

Ve výzkumu DNK virů prokázali dr. P. W. G. Chu et al. (Austrálie), že onemocnění subterranean clover stunt (SCS) je způsobeno mšicemi přenosným virem s částicemi 19 nm v průměru, obsahujícími ssDNK. Byl tak potvrzen předpoklad, že SCSV reprezentuje nový typ rostlinné DNK viru s genomem odlišné organizace od geminivírů. Dr. Olszewski et al. (USA) charakterizovali novou taxonomickou skupinu rostlinných virů, badnaviry. Jejich baciloformní částice obsahují cirkulární dsDNK. Do této skupiny rostlinných virů byly zařazeny: commelina yellow mottle virus (CoYMV), kalanchoe top spot virus (KTSV) a sugarcane bacilliform virus (ScBV). Dr. W. Rohde et al. (NSR) charakterizovali a purifikovali coconut foliar decay virus (CFDV). Prokázali, že CFDV je 20 nm ikosaedrický

virus způsobující letální onemocnění kokosové palmy ve Vanuatu. CFDV nemá žádnou podobnost s gemini nebo caulimoviry a reprezentuje novou taxonomickou skupinu rostlinných virů. Dr. D. M. Bisaro et al. (USA) zjistili, že tomato golden mosaic virus (TGMV) patří do skupiny geminivirů přenášených molicemi, má genom rozdělený mezi dvě ssDNK složky, jejichž přítomnost je nutná pro infektivitu.

Na úseku výzkumu přenosu rostlinných virů vektory použili dr. R. W. Briddon et al. (Velká Británie) chimérické viry ke zjištění specifčnosti přenosu geminivirů molicemi a křisi. Dr. P. Waterhouse et al. (Kanada) provedli molekulární analýzu genů zodpovědných za přenos luteovirů - viru zakrslosti sóji, viru svinutky bramboru a viru žluté zakrslosti ječmene mšicemi *Aulacorthum solani*, *Myzus persicae* a *Rhopalosiphum padi*. Zdá se, že přenos je spojen s genem 22 kd obalového proteinu. Dr. T. Piron et al. (USA) studovali virové geny a genové produkty, které regulují přenos potyvirů mšicemi. Je známo, že mšice, aby mohly přenést potyviry, musí získat virus a virem kódovaný protein - "pomocný komponent", který je produkován v rostlinách infikovaných potyvirem. Srovnáním sekvencí nukleotidu cistronů pomocného komponentu a obalového proteinu potyvirů přenosných mšicemi a nepřenosných mšicemi zjistili rozdíly v pozicích v jednom případě dvou aminokyselin a ve druhém pouze jedné aminokyseliny. Další výzkum povedou konstrukcí chimérických genomů. Dr. T. Tamada et al. (Japonsko) studovali genetické determinanty pro patogenitu a přenosnost houbou *Polymyxa betae* v RNK komponentech viru nekrotické žluté žilkovitosti řepy. Virové částice obsahují čtyři nebo pět RNK komponent (7,1 kb, 4,8 kb, 1,85 kb, 1,5 kb, event. 1,4 kb). Dvě větší RNK jsou potřebné pro virovou infekci, zatímco menší druhy RNK se chovají jako satelity. Jsou však zodpovědné za vývoj choroby (rizomanie) a účinnost přenosu houbou.

Z výsledků dosažených na úseku výzkumu molekulární struktury a taxonomie potyvirů zaujaly následující příspěvky: dr. J. L. Riechmann et al. (Španělsko) připravili infekční *in vitro* transkripty z cDNK klonu viru šarky švestky. RNK genom viru šarky švestky byl klonován z plné délky cDNK (9 786 nt); dr. S. Kasai et al. (Japonsko) charakterizovali genom viru žluté mozaiky ječmene jako odlišný od potyviru. Genom je bipartitní, obsahuje ssRNK - 1,76 kb a ssRNK - 2,3,6 kb. Virus je přenášen houbou *Polymyxa graminis*. Značné odlišnosti o organizaci genomu dokazují, že virus žluté mozaiky ječmene by měl být vyloučen ze skupiny potyvirů; dr. I. Ueda et al. (Japonsko) prokázali značnou příbuznost sekvencí RNK viru žluté zakrslosti jetele a viru žluté mozaiky fazolu. Jedná se však o dva odlišné viry, které jsou si blízké v rámci skupiny potyvirů. Dr. C. W. Ward et al. Dr. D. D. Shukla (Austrálie) se zabývali molekulárními náklady pro taxonomii potyvirů. Výsledky nových metod jako cDNK hybridizace, sérologie částí obalových proteinů získaných ošetřením virových částic trypsinem nebo imunochemické analýzy s použitím syntetických peptidů ukázaly, že status virus - kmen některých potyvirů musí být znovu definován, což si vyžádá změny v nomenklatuře potyvirů. Tento nový vývoj si vyžádá přehodnocení starší literatury, týkající se symptomatologie, křížové ochrany, morfologie cytoplazmatických inkluzí i sérologie.

Výzkumem replikace RNK rostlinných virů byly dosaženy tyto nejdůležitější výsledky: dr. R. Kormelink et al. (Nizozemsko) vypracovali replikační strategii genomu viru bronzovitosti rajčete. Viriony tohoto viru jsou sférické 80-110 nm a obsahují čtyři strukturální proteiny - nukleokapsidární protein, dva membránové glykoproteiny a velký protein ve spojení s nukleokapsidami. Genom viru se skládá ze tří ssRNK molekul, které kódují specifickým způsobem jednotlivé proteiny viru. Dr. M. E. Talianski a prof. J. G. Atabekov (SSSR) zjistili, že pohyb viru v rostlině od buňky k buňce je řízen určitými geny. Transportní proteiny různých rostlinných virů umožňují zařadit viry do několika transportních skupin. Transportní proteiny kódované nepříbuznými rostlinnými viry jsou

v mnoha případech funkčně zaměnitelné. Dr. R. J. Hayes a dr. K. W. Buck (Velká Británie) provedli úplnou replikaci RNK viru mozaiky okurky *in vitro*. CMV má genom tří ssRNK, které kódují tři nestrukturální proteiny. RNK 3 kóduje též obalový protein, který je vyjádřen prostřednictvím RNK 4. Dr. J. C. Johnston et al. (Kanada) zjistili, že virus nekrózy okurky (tombus virus) tvoří bifunkční subgenovou RNK. Ta syntetizuje dva funkční proteiny, 20 a 21 kDa.

Výzkum satelitních virů se soustředil především na satelitní RNK viru mozaiky okurky, viru nekrózy tabáku a nepoviry. Dr. M. A. Aranda et al. (Španělsko) zjistili rychlou evoluci satelitní RNK viru mozaiky okurky během epidemie CMV na rajčatech a paprice v jižním Španělsku na jaře 1989. Dr. D. E. Sleat a dr. P. Palukaitis (USA) lokalizovali domény patogenity satelitní RNK viru mozaiky okurky. Dr. J. I. Cooper et al. (Velká Británie) zjistili, že přítomnost RNK 3 a RNK 4 v částicích tří izolátů viru mozaiky huseníku je spojena s hydrovirulencí. Struktura a sekvence satelitní RNK viru latentní kroužkovitosti jahodníku jsou odlišné od ostatních satelitních RNK nepovirů. Dr. X. Danthine et al. (Belgie) určili úplnou sekvenci nukleotidů RNK satelitu SV 2 viru nekrózy tabáku. Prokázali rozsáhlou homologii mezi strukturami RNK dvou satelitů TNV, SV 2 a STNV.

Velkého pokroku bylo dosaženo i ve výzkumu virů tropických kultur. Např. dr. R. M. Hardin et al. (Austrálie) zjistili malou (1 kb) ssDNK v mšicemi přenosným viru banánovníku, banana bunchy top virus. Virus původně zařazený mezi luteoviry má izometrické viriony 20 nm. Dr. B. E. L. Lockhart a dr. N. E. Olszewski (USA) referovali o dsDNK baciliformních viřech tropických kultur. Do nové skupiny badnavirů bylo zařazeno 13 možných členů, dsDNK genom byl potvrzen v sedmi případech. Čtyři badnaviry jsou přenosné červci, rice tungro bacilliform virus je přenášen křísy. Tři badnaviry jsou přenosné semenem. Badnaviry se vyskytují především na kakaovníku, banánovníku, třtině cukrové, sladkém bramboru a kolokasii jedlé. Dr. R. Hull et al. (Velká Británie) provedli molekulární charakterizaci dvou virů komplexní choroby rýže - rice tungro. Rice tungro spherical virus (RTSV) je přenosný křísy a způsobuje slabé příznaky, zatímco rice tungro bacilliform virus (RTBV) způsobuje silné příznaky, ale sám není přenosný křísy. RTBV je přenášen křísy jen společně s RTSV a pak vyvolávají těžkou chorobu. RTSV částice obsahují dva, možná tři druhy polypeptidů a ssRNK ca 10 kb. Dr. D. D. Shukla et al. (Austrálie, USA) provedli identifikaci a klasifikaci potyvírů infikujících tropické kultury. Podle jejich výsledků navrhuji, že azuki bean mosaic, bean common mosaic NY 15, blackeye cowpea mosaic, peanut blotch, peanut mild mottle, peanut stripe a Soybean - PM, PN, 74 jsou kmeny jednoho viru. Naproti tomu odlišné potyviry by měly být bean mosaic common, bean yellow mosaic, blackeye cowpea mosaic, clover yellow vein, cowpea aphid-borne mosaic, pea mosaic, peanut mottle a soybean mosaic. Dr. A. C. de Avila et al. (Nizozemsko) referovali o výskytu, diferenciaci a detekci izolátů viru bronzovitosti rajčete. Tento virus bude možná jako první z rostlinných virů zařazen do rodu *Bunyaviridae*, přenášeného členovci. Virus je přenášen třísněnkami a infikuje na 50 botanických rodů a více než 400 druhů rostlin. Použitím ELISA bylo možné zařadit 20 izolátů TSWV do tří hlavních skupin.

Současný stav výzkumu viroidů byl prezentován osmi referáty, které se zabývaly především autoreprodukci RNK viroidů, ale i detekci sekvencí nukleotidů viroidů. Dr. H. Puchta a prof. H. L. Sänger (Švýcarsko, SRN) demonstrovali *in vivo* rekombinaci RNK mezi viroidy na příkladu viroidů citrus exocortis, bop stunt a citrus viroid IV vyskytujících se v některých odrůdách grapefruitu v Izraeli. Dr. R. P. Singh et al. (Kanada) zkoumali možnou *in vivo* enkapsidaci viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru částicemi Y viru bramboru. Dr. D. Hanold a dr. J. W. Randles (Austrálie) zjistili v kokosových a olejových palmách a dalších jednoděložných rostlinách v oblasti Pacifiku přítomnost malých cirkulárních molekul RNK se sekvencemi nukleotidů příbuznými coconut cadang-cadang viroidu (CCCVd). Tento viroid způsobuje letální onemocnění kokosové palmy v centrálních Filipínách, kde odumřelo asi 30 miliónů palm. Způsob přenosu onemocnění a možnosti ochrany nejsou dosud známy. Existuje tedy určitá hrozba podobného onemocnění rostlin i v dalších oblastech Pacifiku.

Další výsledky výzkumu viroidů byly prezentovány na třetím setkání Mezinárodní pracovní skupiny pro viroidy, které se konalo v předvečer VIII. mezinárodního virologického kongresu. Na sympoziu bylo předneseno 22 referátů a prezentováno 14 posterů. Většina příspěvků byla věnována charakterizaci molekulární struktury viroidů, další mechanismu autoreprodukce viroidů, modelu patogeneze viroidů, transformaci rostlin cDNK viroidů, novým viroidům a jejich klasifikaci, původu viroidů. Pro nás zajímavý byl příspěvek dr. B a r b a r y z Velké Británie o rozšíření latentního viroidu chmele v anglických chmelnicích. Vzhledem k tomu, že byla prozkoumána molekulární struktura cirkulární RNK většiny viroidů, bylo možné vypracovat taxonomickou charakteristiku viroidů, založenou na jejich předpokládané evoluci. Viroidy byly rozděleny do tří skupin.

I. s k u p i n a - **apple scar skin viroidu**: apple scar skin viroid (ASSVd), Australian grapevine viroid (AGVd), grapevine yellow speckle viroid (GYSVd).

II. s k u p i n a - **potato spindle tuber viroidu**: potato spindle tuber viroid (PSTVd), citrus exocortis viroid (CEVd), hop stunt viroid (HSVd), hop latent viroid (HLVd), coconut cadang-cadang viroid (CCCVd), coconut tinangaja viroid (CTiVd), tomato apical stunt viroid (TASVd), tomato plants macho viroid (TPMVd), chrysanthemum stunt viroid (CSVd).

III. s k u p i n a - **avocado sun blotch viroidu**: avocado sun blotch viroid (ASBVd), Cassava stunt viroid (CaSVd).

Dále byly výsledky výzkumu rostlinných virů a viroidů prezentovány v deseti sekcích posterů: diagnóza a identifikace virových chorob rostlin - 57 prezentací, mezi nimi i poster ing. J. P o l á k a : **Příprava antiséra a detekce latentní kroužkovitosti jahodníku v révě vinné a chmelu pomocí ELISA v Československu**; geneticky řízená rezistence - 24 příspěvků; hostitelská reakce na rostlinné viry - 36; rostlinné DNK viry - 25; přenos rostlinných virů vektory - 12; potyviry - molekulární struktura a taxonomie - 22; replikace RNK rostlinných virů - 49; satelitní viry - 21; viry tropických kultur - 15 posterů; viroidy a formování jejich RNK - 11 posterů.

Největšího pokroku bylo dosaženo na úseku molekulárního mapování rostlinných virů a viroidů, kde jsou dnes známy kompletní sekvence RNK i DNK řady rostlinných virů většiny taxonomických skupin a téměř všech viroidů, na úseku genetického řízení rezistence rostlin k virům, kde byly do genomů rostlin zabudovány části obalových proteinů několika virů a získány transgenní rostliny odolné k virové infekci. Transgenní rostliny jsou zároveň okamžitě zaváděny do pěstitelské praxe. Na úseku výzkumu reakce hostitele na virovou infekci byla zjištěna indukce vysokomolekulárního proteinu kódovaného hostitelskou RNK. Velkého pokroku bylo dosaženo ve výzkumu rostlinných virů obsahujících DNK, které jsou dnes již rozděleny do čtyř taxonomických skupin: caulimoviry a badnaviry obsahující dsDNK, geminiviry s bipartitním ssDNK, malé izometrické viry (cca 19 nm) obsahující cirkulární ssDNK, reprezentované virem zakrslosti jetele. Množství nových poznatků bylo získáno při výzkumu molekulární struktury satelitních virů. Ve výzkumu přenosu rostlinných virů vektory byly identifikovány geny odpovědné na přesnost viru vektorem.

Základní výzkum rostlinné virologie především na molekulární úrovni se rozvíjí závratným tempem a jeho výsledky se rychle promítají do strategických směrů aplikovaného výzkumu a zemědělské praxe. Naše odtržení od západního světa se v současnosti projevuje velmi negativně ve výzkumu i praxi. Souvisí to i se skutečností, že Československo nemá základní výzkum rostlinné virologie. Na pracovištích ČSAV se řeší problematika strategického a aplikovaného výzkumu, jak o tom svědčí dosahované výsledky a výstupy. V diagonále zaostáváme o dvě generace diagnostických prostředků a od začátku 70. let ztrácíme kontakt se světovou úrovní. V ostatních vědních disciplínách ochrany rostlin je na úseku diagnózy situace ještě horší. Chybí nám především ekonomické, materiální zázemí pro rozvoj vědy (paradox materialistické společnosti) a osobní kontakty se špičkovými vědci a pracovišti.

Ing. Jaroslav P o l á k , CSc.

Křístek J., Polák J.: The preparation of antiserum against strawberry latent ringspot virus and isolation of antibodies suitable for ELISA	25
Smrčka L.: Reproduction pattern of the Arabis mosaic virus in the plants of <i>Petunia hybrida</i> cv. Lavina	35
Zakopal J.: Analysis of pathotypes of powdery mildew on spring barley	43
Herman M., Dovrtěl J.: Relations between winter wheat yields and infestation by fungus <i>Gaeumannomyces graminis</i>	53
Kováčiková E., Fojtík A., Vlasáková A., Jakešová H.: Testing red clover for resistance to causal agents of root rots	63
Rotrekl J.: Lucerne seed dressing against <i>Sitona</i> beetle	73

SHORT COMMUNICATION

Chod J., Jokeš M.: Etiology of necrotic ringspot disease of potato tubers	85
Kodarová L.: Tests of <i>Erysiphe graminis</i> spp. sensitivity to chemicals of triazole type	89

INHALT

Polák Z., Brajšová H.: Viren einiger abfallender Waldholzarten	1
Benada J.: Wesen der Resistenz der Pflanzen gegen obligate Parasiten	9
Filigarová M., Čeřovská N., Žák P.: Nutzung der verkürzten ELISA-Methode bei der Delektion des A-Kartoffelvirus und des Tabakmosaikvirus	15
Polák Z., Procházková Z.: Greiskraut als Wirtspflanze des Virus der schwarzen Ringfäule der Tomaten	21
Křístek J., Polák J.: Purifikation des Virus, Vorbereitung von Antiserum gegen das Virus der latenten Ringfäule des Virus der Erdbeerpflanze und Isolation der für den ELISA-Test geeigneten Antikörper	25
Smrčka K.: Reproduktionsdynamik des Arabis-Mosaik-Virus an den Pflanzen <i>Petunia hybrida</i> cv. Lavina	35
Zakopal J.: Analyse des Spektrums von Mehltaupathotypen an der Sommergerste	43
Herman M., Dovrtěl J.: Beziehungen zwischen dem Winterweizenenertrag und dem Befall von dem Pilz <i>Gaeumannomyces graminis</i>	53
Kováčiková E., Fojtík A., Vlasáková A., Jakešová H.: Testung der Resistenz des Wiesenklees gegen die Wurzelfäulniserreger	63
Rotrekl J.: Beizung der Luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.) gegen den Blattrendkäfer (<i>Sitona</i> spp.)	73

KURZE MITTEILUNG

Chod J., Jokeš M.: Ein Beitrag zur Ätiologie der nekrotischen Ringfäule der Kartoffelknollen	85
Kodarová L.: Empfindlichkeit von <i>Erysiphe graminis</i> spp. gegen Mittel vom Triazoltyp	89

Rukopis odevzdán k tisku 12. 11. 1990 - Podepsáno k tisku 21. 3. 1991

Vědecký časopis OCHRANA ROSTLIN ■ Vydává Československá akademie zemědělská - Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství ■ Vychází čtyřikrát ročně ■ Redaktorka RNDr. Marcela Braunová ■ Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 25 75 41 ■ Vytiskla Grafia Kyjov ■ © Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1991.

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS-ÚED Praha, ACT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS-ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS-ÚED Praha, závod 03, Gottwaldova tř. 206, 709 90 Ostrava 9. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS - ústřední expedice a dovoz tisku Praha, administrace vývoz tisku, Kovpakova 26, 160 00 Praha 6.