

DYNAMIKA REZISTENCE POPULACÍ *VENTURIA INAEQUALIS* KE STROBILURINOVÝM FUNGICIDŮM

DYNAMICS OF RESISTANCE OF *VENTURIA INAEQUALIS* POPULATIONS TO STROBILURIN FUNGICIDES

Pavλίna Jaklová, Petra Lišková

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01, Holovousy

e-mail: pavlina.jaklova@vsuo.cz, ORCID ID: 0000-0001-7980-3188

ABSTRAKT

Venturia Inaequalis, původce strupovitosti jabloní, je významným patogenem, jehož přítomnost v sadech má dalekosáhlé ekonomické důsledky pro pěstitele jabloní, ať už se jedná o management postřiků fungicidy, nebo finanční ztráty při nezvládnutí efektivní chemické ochrany. Proto je vhodné sledovat rozvoj rezistence k používaným fungicidům v populacích *V. inaequalis*. Jednou skupinou látek využívaných v ochraně proti strupovitosti jsou strobiluriny blokující transport elektronů v dýchacím řetězci. Rezistence k těmto látkám je zprostředkována bodovou mutací v jedné z komponent elektron-transportního řetězce cytochromu b, v genu *cytb*, kterou lze snadno odhalit metodou real-time PCR. Pomocí této metody je stanoveno procentuální zastoupení mutované varianty v dané populaci, které určí, zda je daná populace citlivá či rezistentní ke strobilurinům. Míra rezistence populací byla sledována po dobu pěti let v 11 lokalitách s různým režimem ochrany jabloní proti strupovitosti. Lokality s historií použití strobilurinů udržovaly vysokou míru rezistence v populaci, která i po ukončení ošetření stoupala. Lokality, kde strobiluriny aplikovány po delší dobu nebyly, postupně proporci rezistentní alely genu snižovaly, zhruba o jedno procento za rok. Vzhledem k udržení vysokého procenta rezistentní alely *cytb* v populaci, kde po dobu alespoň pěti let nebyl využit selekční tlak používáním strobilurinů, je nutné vyzdvihnout nutnost důsledného dodržování metodik antirezistentních strategií.

Klíčová slova: Inhibitory Qo, rezistence, *Venturia Inaequalis*, real-time PCR

ABSTRACT

Venturia Inaequalis, the causative agent of apple scab, is an important pathogen whose presence in orchards has far-reaching economic consequences for growers, whether it concerns the management of fungicides or financial loss by fungicide-management failure. Therefore, monitoring of the resistance to used fungicides in *V. inaequalis* populations is advisable. Strobilurins are one group of substances used in the protection against scab acting by blocking the respiratory chain. Resistance to these substances is mediated by a point mutation in one of the components of the electron-transport chain of cytochrome b, in the *cytb* gene, which can be detected by the real-time PCR method. Using this method, the percentage of the mutated variant of the gene is determined, therefore whether the population is sensitive

or resistant to strobilurins. The rate of population resistance was monitored for 5 years in 11 locations with different regimes of protection of apple trees against scab. Sites with a history of strobilurin use maintained high rates of resistance in the population, which continued to rise after treatment was quit. Localities where strobilurins were not applied for a long period gradually reduced the proportion of the resistant gene, roughly by one percent per year. Due to the maintenance of a high percentage of the resistant *cytb* allele in the population, where the selection pressure using strobilurins has not been used for at least 5 years, it is necessary to highlight the necessity of rigorous adherence to anti-resistance strategies.

Keywords: Qo inhibitors, rezistence, *Venturia Inaequalis*, real-time PCR

ÚVOD

Vřeckatá houba *Venturia Inaequalis* (Cooke) G.Winter (1875) (anamorfa – konidiové stadium *Spilocea pomi* Fr., 1825) je závažným patogenem způsobující hospodářsky nejvýznamnější chorobu jableň – strupovitost. Toto onemocnění je celosvětově rozšířené ve všech oblastech, kde se jableň pěstují (*Malus x domestica* Borkh.) (MacHardy 1996). Ochrana proti původci této choroby patří k nejdůležitějším a finančně velmi náročným opatřením, které určují zejména kvalitu sklizně, výši sklizně a mají tak značný vliv na rentabilitu produkce. Intenzivní chemické ošetření (10–20 aplikací dle meteorologických podmínek v sezóně) je základem ochrany v konvenčních jableňových sadech. Neuspokojivé výsledky aplikovaných ochranných opatření mohou být způsobeny celou řadou faktorů, mezi které patří i vznik rezistence patogenu k fungicidům.

Fungicidy na bázi strobilurinů (Qo1 fungicidy) byly v Evropě zaregistrovány a uvedeny na trh poprvé v roce 1996. Cílovým místem účinku je respirační řetězec, kde blokují elektronový transport v místě oxidace chinolu (tzv. Qo centrum) v cytochromu b, což má za následek sníženou produkci ATP (Bartlett 2002, FRAC 2023a). Na konci 90. let byly strobilurinové fungicidy v České republice využívány ve velké míře a významně přispěly ke zlepšení ochrany proti původci strupovitosti jableň a dosahovaly velmi dobré účinnosti v ochraně proti této chorobě (Lánský *et al.* 2005). Výsledky monitoringu citlivosti *V. inaequalis* v letech 1998–2000 v České republice poukazyvaly na vysokou citlivost k strobilurinovým fungicidům (Kloutvorová *et al.* 2001). V okolních evropských zemích byla ale okolo roku 2000 zaznamenána první selhání ochrany ve výsadbách jableň, což bylo potvrzeno dalšími studii (Gisi *et al.* 2002, Kűng *et al.* 2002, Köller *et al.* 2004, Fiaccadori *et al.* 2005). První významné poklesy účinnosti strobilurinů v produkčních výsadbách jableň v České republice byly zaznamenány v letech 2004 až 2005. Selhání ochrany bylo nečekané, bez předchozího pozorování snížené účinnosti. Problém jednoznačně vznikl poddáváním fungicidů a nerespektováním zásad antirezistentní strategie a metodikou používání. Vzhledem k tomu, že Qo1 fungicidy jsou dlouhodobě používány v produkčních sadech v České republice, výzkumy potvrdily významné zastoupení rezistentních populací *V. inaequalis* (Kloutvorová *et al.* 2009, Vávra *et al.* 2011, Sedlák *et al.* 2013, Jaklová 2019, Jaklová *et al.* 2020).

Hlavní příčinou kompletní rezistence *V. inaequalis* ke Qo1 fungicidům je bodová mutace G143A. Úplná rezistence ke Qo1 fungicidům je založena na jednotlivém nukleotidovém polymorfismu, kdy dochází k záměně aminokyseliny glycin za alanin v pozici 143 v mitochondriálním genu cytochromu b (*cytb*). Úplnou ztrátu kontroly nad patogenem lze vždy pozorovat v populacích patogenu, u kterých je dominantní mutace G143A (FRAC 2023b, Gisi *et al.* 2002 Fontaine *et al.* 2009). Výskyt mutace G143A v genu *cytb* způsobuje

významnou ztrátu citlivosti k Qol fungicidům a nemá žádný či minimální vliv na fitness patogenu. U *V. inaequalis* problém rezistence ke strobilurinům zůstává lokalizován v určitých oblastech nebo dokonce v jednotlivých sadech po mnoho let, což může být vhodnou příležitostí pro následné řízení antirezistentních a ochranných opatření. Cílem studie je sledovat dynamiku rezistence ke Qol fungicidům u izolátů *V. inaequalis* v průběhu času a různých typech ošetřování u vybraných lokalit na území České republiky.

MATERIÁL A METODY

Suspenze konidií *V. inaequalis* byla získána smytím 50–60 listů s příznaky napadení strupovitostí sterilní vodou. Populace *V. inaequalis* byly odebírány celkem v 11 lokalitách s různým způsobem ošetření (konvenční sady, integrovaná produkce (IP), ekologické sady), jejichž status se ve sledovaných časových úsecích mohl změnit. Podrobnosti o odběru vzorků jsou uvedeny v tabulce 1. Suspenze byla filtrována přes sterilní gázu, aby se odstranily hrubé nečistoty. Poté byla zjištěna koncentrace spor v 1 mL pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Vzorek konidií byl zahuštěn pomocí centrifugace (1200 g, 30 min, 4 °C) na finální objem 150 µL tak, aby v každém vzorku bylo alespoň 10^7 konidií. Suspenze byly skladovány při -20 °C až do extrakce DNA. DNA byla izolována ze suspenze konidií *V. inaequalis* pomocí komerční soupravy Exgene Plant SV mini (GeneAII), který je vhodný pro izolace DNA z pletiv i mycelia, detailní postup izolace je popsán v návodu od výrobce soupravy. U takto zpracovaných izolátů *V. inaequalis* byla pomocí real-time PCR stanovena četnost mutace genu *cytb* (G143A), která udílí *V. inaequalis* rezistenční fenotyp ke strobilurinovým fungicidním látkám. Připravené vzorky DNA byly použity jako templát (2 µL) pro real-time PCR reakci s následujícími reakčními podmínkami: 2 µL směs standardů; PCR Blue reakční pufr (Top-Bio); dNTPs (Genaxxon) každý ve finální koncentraci 0,2 mM; 1U Combi Taq DNA polymeráza (Top-Bio); primery byly přidány ve finální koncentraci 0,25 µM; 1× EvaGreen (interkalační barvivo, Biotium) a PCR voda byla přidána do objemu 20 µL. Každý vzorek byl v oddělených zkumavkách otestován na přítomnost sekvence wild-type (WT) a mutované (MUT) sekvence G143A mitochondriálního genu *cytb*. Real-time PCR reakce probíhala v zařízení Rotor-Gene Q (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: 94 °C/5 minut; 45 cyklů: 94 °C/20 s; 58 °C/2 s; 72 °C/10 s, s odečtem fluorescence v HRM kanálu. Všechny vzorky byly provedeny v triplicátu. Pro kvantitativní vyhodnocení jsou do real-time PCR běhu přidány čtyři standardy Ultramer® ssDNA oligonucleotides (Integrated DNA Technologies) odpovídající WT a MUT variantě genu *cytb*, celkem čtyři standardy pro WT sekvenci a čtyři standardy pro mutovanou sekvenci G143A mitochondriálního genu *cytb* o známé koncentraci v desítkovém ředění pro sestavení kalibrační křivky. Po ukončení běhu byla pomocí Rotor-Gene Q softwaru sestrojena kalibrační křivka pro absolutní kvantifikaci varianty WT a MUT varianty mitochondriálního genu *cytb* v testované populaci *V. inaequalis*. Z absolutních koncentrací jednotlivých variant bylo provedení normalizace vypočteno zastoupení WT a MUT varianty mitochondriálního genu *cytb* jako procento v testované populaci *V. inaequalis*.

Tabulka 1. Četnost mutované varianty genu *cytb* u populace *V. inaequalis* izolované v jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech a typ ošetření daných výsadeb (konv. = konvenční, IP = integrovaná produkce, eko = ekologická produkce), historie použití ošetření strobilurinovými fungicidními látkami vyznačena hvězdičkou u typu výsadby, barevné odlišení stupně rezistence populace k strobilurinům: **rezistentní**, **snížená citlivost**, **citlivá populace**. N/A značí, že v daný rok v dané lokalitě analýza neproběhla.

Table 1. The frequency of the mutated variant of the *cytb* gene in the population of *V. inaequalis* isolated in individual locations in years of observation and the type of treatment of the given plantings (konv. = conventional, IP = integrated production, eko = ecological production), the history of the use of treatment with strobilurin fungicides marked with an asterisk in type of planting, color differentiation of the population's degree of resistance to strobilurins: **resistant**, **reduced sensitivity**, **sensitive population**. N/A means that the analysis did not take place in the given location in the given year.

Označení lokality ³⁾	Lokalita ⁴⁾	Typ výsadby ¹⁾				% MUT varianty genu <i>cytb</i> ²⁾			
		2019	2021	2022	2023	2019	2021	2022	2023
1	Lysice	konv.	konv. *	-	IP	73,4	98,6	N/A	99,4
2	Židovice u Hnojnic	IP	IP *	-	-	81,2	99,6	N/A	N/A
3	Ostrožská Nová Ves	konv.	-	konv.	konv.	99,4	N/A	97,7	99,4
4	Přítluky	IP	-	konv.	-	98,1	N/A	87,1	N/A
5	Krtely	IP	IP	-	-	96,7	93,8	N/A	N/A
6	Popice	IP	konv.	-	konv.	88,2	84,4	N/A	75,3
7	Němčovice	konv.	konv.	-	-	7,6	2,9	N/A	N/A
8	Karlov (Spálené Poříčí)	konv.	IP	-	IP	2,4	1,2	N/A	3,7
9	Děčín	eko	konv.	-	konv.	1,7	0	N/A	2,2
10	Pěnčín	konv.	IP	-	konv.	84,8	18,9	N/A	87,7
11	Synkov-Slemeno	IP	IP	IP	-	2,8	99,2	99,4	N/A

1) Planting type, 2) % MUT variants of the *cytb* gene, 3) Locality number, 4) Locality

VÝSLEDKY A DISKUSE

Lokalita 1 a 2 byly jediné z testovaných lokalit, ve kterých bylo výslovně uvedeno použití strobilurinů, konkrétně v roce 2021 (označeno v tabulce *). V obou zmíněných případech došlo v roce použití strobilurinů ke zvýšení četnosti mutantní alely *cytb*, tedy ke zvýšení míry rezistence ke strobilurinům. V ostatních lokalitách (3–11), dle dodaných údajů, strobiluriny alespoň od začátku monitoringu v roce 2019 využívány nebyly. Tomu odpovídá snižující se míra výskytu rezistenční alely *cytb* v lokalitách 4–6, postupně dochází ke snižování frekvence této mutace o jednotky procent během pětiletého období monitoringu. Lokality 3–6 zahrnovaly jak konvenčně ošetřované sady, tak sady v režimu integrované produkce. Využívání jiných skupin fungicidů tedy patrně na udržení rezistence ke strobilurinům nemá vliv, nejedná se o nespecifický selekční tlak, který by zvýhodňoval multirezistentní klony oproti citlivým klonům. V lokalitách 7–9 byla již na počátku sledování zaznamenána nízká míra výskytu rezistenční mutace, jednalo se o stabilně citlivé populace *V. inaequalis*. I zde však postupně docházelo ke snižování výskytu dané mutace *cytb* genu. Podrobnější informace o historii užívání strobilurinů v těchto lokalitách před začátkem pokusu bohužel nejsou dostupné. Nelze tedy s jistotou uzavřít, zda se jedná o sukcesní proces snižování frekvence mutované varianty

cytb po systematickém užívání strobilurinů v minulosti, nebo o náhodný výskyt zahrnující populace *V. inaequalis*, které byly do lokalit zavlečeny náhodně. Konvenční a IP výsadby v lokalitách 3, 10 a 11, kde také nebyla historie použití strobilurinů, neodpovídají žádné předpokládané tendenci. Jedná se o rapidní meziroční pokles četnosti výskytu mutované varianty *cytb* v případě lokality 10, jaký není možné sledovat v jiných lokalitách s původně rezistentní populací *V. inaequalis*, může se tedy jednat o chybu odběru nebo stanovení. V případě lokality 11 se jedná o prudký nárůst výskytu rezistenční alely *cytb*, který, při tvrzení, že se postřik strobiluriny v průběhu monitoringu nekonal, nelze vysvětlit. Mohlo dojít k chybnému odběru, případně k zanesení postřiků větrem z jiné lokality a z jiné plodiny. Podobný scénář možná nastal také v lokalitě 3, kde dochází k mírné fluktuaci četnosti v jinak vysoce zastoupené rezistentní alele *cytb* genu. V případě, že, k udržení a také rozvoji rezistence ke strobilurinům v neošetřené lokalitě dochází pouze nepřímým působením postřiku neseným větrem, by však takový nárůst výskytu rezistentní populace *V. inaequalis* byl alarmující.

Přetrvání rezistence a výskytu mutace G143A po vynechání selekčního tlaku v populaci *V. inaequalis* po dobu nejméně šesti let bylo potvrzeno ve studiích Fiaccadori (2018) a Frederick *et al.* (2014). V české výsadbě, kde více jak 10 let nebyly používány strobiluriny, bylo potvrzeno 97% zastoupení mutované varianty genu (Jaklová 2019). To, jak dlouho jsou rezistentní jedinci schopni přetrvávat v populaci *V. inaequalis* je zejména ovlivněno jejich fitness. Konidie *V. inaequalis* rezistentní ke strobilurinům nesoucí mutaci G143A, v populaci úspěšně přežívají a nebylo u nich zaznamenáno výrazné snížení fitness, dokonce se zdá, že rezistentní kmeny vůči strobilurinům mají vyšší fitness než citlivé kmeny této houby (Fiaccadori 2018).

Náhodné zavlečení mutované populace *V. inaequalis* do výsadby, která nikdy nebyla ošetřena strobilurinovými fungicidy je reálné hned několika způsoby. Tím prvním je donesení mutované populace ze školky či zahradnického centra, kdy konidie houby *V. inaequalis* mohou přezimovat v šupinách pupenů a na výhonech. Pokud jsou mírné zimy a je ve výsadbě vyšší výskyt strupovitosti, může přezimovat dostatek konidií, které pak mohou být zdrojem primárních infekcí ještě před askosporami. Množství přezimujících konidií je pak závislé na režimu pěstování a intenzitě ošetřování (Holb *et al.* 2004, 2005). Dalším způsobem je rozšíření rezistentní populace z blízkých výsadeb, kterými je sad obklopen. Askospory jsou schopny, za příznivých podmínek, ze sadu, kde byl vysoký výskyt strupovitosti v minulé sezóně, překonat vzdálenost 2–5 km od zdroje inokula. K takovému rozptýlení dochází zejména během deště, kdy mortalita spor není tak významně ovlivněna vyschnutím a slunečním zářením, ovšem přesný počet askospor, který přežije na takové vzdálenosti a v jaké míře je schopen způsobit infekce není znám (Aylor 1998, MacHardy *et al.* 2001). Poslední možností je selekční tlak způsobený úletem během aplikací fungicidů v okolních výsadbách či přilehlých polích. Vliv fungicidního úletu závisí na mnoha faktorech, jako jsou meteorologické podmínky, terén, pracovní rychlost, velikost kapek a vlastnosti postřikové kapaliny, typ a nastavení použité mechanizace. Ztráty úletem do ovzduší a mimo cíl se mohou pohybovat v rozmezí 8–15 %. Pokud fouká vítr o rychlosti $1,4 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ a velikost kapek je $20 \text{ }\mu\text{m}$ rozsah úletu může být až 330 m. Optimální rychlost větru vhodná pro aplikaci postřiků daná vyhláškou je max. $3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ a pěstitel by se měl řídit dalšími nařízeními, aby omezil úlet postřiku, ne vždy tomu tak ovšem je (Harašta 2018).

ZÁVĚR

V rámci studie byla sledována dynamika rezistence izolátů *V. inaequalis* ke strobilurinovým fungicidům používaným v pěstitelské praxi. Je žádoucí zpřesnění systému ochrany jabloňových výsadeb na základě získaných poznatků o perzistenci rezistentních izolátů houby *V. inaequalis*. Na základě výsledků bylo prokázáno, že v některých produkčních výsadbách jabloní, i přes nepoužívání strobilurinových fungicidů, existují izoláty *V. inaequalis* se sníženou citlivostí ke strobilurinům. Je vhodné, aby pěstitelé dodržovali zásady antirezistentní strategie, jejichž cílem je zachovat citlivost cílových patogenů a oddálit vznik rezistence, prodloužit používání při zachování účinnosti strobilurinových fungicidů a zabránit tak ztrátám na výnosech a kvalitě produkce. Pěstitelé by také měli věnovat pozornost nechemickým, preventivním, agrotechnickým a fyto-sanitárním opatřením v sadu (jako je např. výběr rezistentních odrůd, omezení zdroje primárního inokula, vyrovnaná výživa, řez, výsadba ve vhodné lokalitě), které jsou základem v integrované ochraně rostlin a v integrované produkci ovoce. Případně lze využít alternativních a pomocných prostředků na ochranu rostlin, pokud dosahují dobré účinnosti.

Organizace FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) doporučuje výrazně omezit počet aplikací strobilurinových fungicidů během sezóny, jelikož čím častěji jsou tyto fungicidy používány, tím vyšší je potom selekční tlak vedoucí k vytvoření rezistentní populace patogenu. Čím méně se tyto fungicidy budou používat, tím více se prodlouží možnost jejich použití. V případě potvrzení rezistence je nutné vyřadit strobilurinové přípravky ze systému ochrany po dobu několika let (Vincelli 2002). Aplikovat by se měly maximálně 3 ošetření strobilurinových fungicidů na plodinu. Maximálně 4 ošetření strobilurinovými fungicidy lze použít tam, kde se provádí 12 nebo více aplikací ošetření plodiny. Doporučují se maximálně 2 po sobě jdoucí aplikace strobilurinových fungicidů. Další základní strategií je střídání fungicidů s odlišným mechanismem účinku v průběhu postřikového sledu a využívání tank-mix kombinací přípravků z odlišných skupin a využívání tank-mix kombinací přípravků s kontaktním a systémovým účinkem v rámci jedné aplikace. Hlavní zásadou při použití kombinací je neaplikovat ve směsi současně takové účinné látky, které jsou vzájemně ohroženy tzv. křížovou rezistencí, to znamená, že není žádoucí kombinovat ve směsi dva přípravky, které jsou oba založeny na bázi strobilurinů, ale je vhodné je kombinovat např. s kontaktní účinnou látkou (metiram, kaptan, ditianon). Dávky, interval mezi ošetřeními a počet aplikací jednotlivých přípravků by měl být dodržen dle etikety. Nejvhodnější je preventivní použití strobilurinových fungicidů a směřovat jejich aplikace mimo období nejsilnějšího infekčního tlaku. (FRAC 2023c).

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla realizována za finanční podpory projektu RO1523. Autorky děkují Laboratornímu komplementu VŠÚO Holovousy s.r.o., RNDr. Radkovi Čmejlovi, Ph.D., za expertízu, paní Lence Tůmové a paní Janě Kupkové za excelentní technický servis.

LITERATURA

AYLOR, D.E. *The aerobiology of apple scab*. Online. Plant Disease. 1998, 82(8): 838–849. Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1998.82.8.838>. [citováno 2023-07-17].

- BARTLETT D.W., J.M. CLOUGH GODWIN, A.A. HALL, M. HAMER a B. PARR-DOBRZANSKI. *The strobilurin fungicides*. Online. Pest Management Science. 2002, 58: 649–662.
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.520>. [citováno 2023-08-16].
- FIACCADORI, R. *Persistence of Venturia Inaequalis Populations Resistant to Strobilurins in the Field and in the Glasshouse*. Online. American Journal of Plant Sciences. 2018, 9(4): 552–560.
Dostupné z: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=82842>. [citováno 2023-09-11].
- FIACCADORI, R., E. CICOGNANI, M. COLLINA, a Scénce. BRUNELLI. Study On The Sensitivity Of *Venturia Inaequalis* to Strobilurin Fungicides In Italy. *Communications in Agricultural and Applied Biological Science*. 2005, 72(4): 997–1001. PMID: 18396841.
- FONTAINE, S., F. REMUSON, a L. FRAISSINET-TACHET. *Monitoring of Venturia Inaequalis harbouring the QoI resistance G143A mutation in French orchards as revealed by PCR assays*. Online. Pest Management Science. 2009, 65(1): 74–81.
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1649>. [citováno 2023-09-02].
- FRAC a. *QoI fungicides – Introduction and General Information*. Online. Fungicide action committee. frac.info. Dostupné z: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qoI-fungicides>. [cit. 2023-07-17]. [citováno 2023-08-10].
- FRAC b. *Impact of Position 143 Intron on Resistance Risk to QoI Fungicides in Some Pathogens*. frac.info. Online. Dostupné z: <https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/qoi-quick-references/impact-of-intron-at-g413-on-qo-resistance-development.pdf>. [citováno 2023-07-27].
- FRAC c. *QoI Guidelines: Pome fruit. Fungicide action committee – QoI Working Group*. frac.info. Online. Dostupné z: <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qoI-fungicides/recommendations-for-qoi>. [citováno 2023-07-25].
- FREDERICK, Z.A., S.M. VILLANI, D.R. COOLEY, A.R. BIGGS, J.J. RAES, a K.D. COX. *Prevalence of quinone outside inhibitor resistance and the stability of qualitative QoI resistance in Venturia Inaequalis*. Online. Plant Disease. 2014, 98(8):1122–1130.
Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-13-1042-RE>. [citováno 2023-10-07].
- GISI, U., H. SIEROTZKI, A. COOK a kvalitativně. McCAFFERY. *Mechanisms influencing the evolution of resistance to QoI inhibitor fungicides*. Online. Pest Management Science. 2002, 58(9): 859–867.
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.565>. [citováno 2023-07-07].
- HARAŠTA, P. *Nežádoucí úlet postřiku – lze jej omezit?* Online.
Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/mechanizace/nezadouci-ulet-postriku-lze-jejomezit>. [cit. 2023-09-06].
- HOLB, I.J., B. HEIJNE a M.J. JEGER. *Overwintering of conidia of Venturia Inaequalis and the contribution to early epidemics of apple scab*. Online. Plant Disease. 2004, 88(7): 751–757.
Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2004.88.7.751>. [citováno 2023-08-01].
- HOLB, I.J., B. HEIJNE a M.J. JEGER. *The widespread occurrence of overwintered conidial inoculum of Venturia Inaequalis on shoots and buds in organic and integrated apple orchards across the Netherlands*. Online. European Journal of Plant Pathology. 2005, 111(2): 157–168.
Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-004-1883-z>. [citováno 2023-10-07].
- JAKLOVÁ, P. *Integrovaná ochrana jabloní proti Venturia Inaequalis (Cke.) Wint. s využitím nových postupů a detekce rezistence patogenu proti fungicidům*. Doktorská disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2019.
- JAKLOVA, P., J. KLOUTVOROVA a R. CMEJLA. *A real-time PCR quantitative analysis of the Venturia Inaequalis cytb gene G143A mutation and its prevalence in the Czech Republic*. Online. European Journal of Horticultural Science. 2020, 85(3): 169–175.
Dostupné z: https://www.pubhort.org/ejhs/85/3/4/85_3_4.pdf. [citováno 2023-07-25].
- KLOUTVOROVÁ, J., M. LÁNSKÝ a J. KUPKOVÁ. *Hodnocení citlivosti vybraných izolátů V. inaequalis Cke. Aderh. K některým fungicidům v podmínkách in vitro. Vědecké práce ovocnářské*. 2001, (17): 29–36. ISBN: 80-902636-2-3.

- KLOUTVOROVÁ, J., M. LÁNSKÝ, J. KUPKOVÁ, R. VÁVRA, A. SVOBODA a S. BOČEK. Monitoring citlivosti populací houby *Venturia Inaequalis* k vybraným pesticidům. *Vědecké práce ovocnářské*. 2009, (21): 37–43. ISBN: 978-80-87030-01-1.
- KÖLLER, W., D.M. PARKER, W.W. TURECHEK, C. AVILA-ADAME a W.K. CRONSHA. *A two-phase resistance response of Venturia Inaequalis populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin*. Online. *Plant Disease*. 2004, 88(5): 537–544.
Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>. [citováno 2023-07-14].
- KÜNG, FÄRBER, R. B., K.M. CHIN a N. LEADBITTER. *Sensitivity of Venturia Inaequalis to trifloxystrobin*. Online. *Pest Management Science*. 2002, 58(3): 261–267.
Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.443>. [citováno 2023-07-20].
- LÁNSKÝ, M., V. NEČESANÝ, J. KLOUTVOROVÁ a J. KUPKOVÁ. Vyvolání rezistence houby *Venturia Inaequalis* Cke. Aderh. ke strobilurinovým a DMI fungicidům při ochraně jablek proti strupovitosti. *Vědecké práce ovocnářské*. 2005, (19): 35–43 ISBN: 80-902636-4-X.
- MacHARDY, W.E. *Apple scab: biology, epidemiology, and management*. American Phytopathological Society, 1996. ISBN: 0-89054-206-6.
- MacHARDY, W.E., D.M. GADOURY a C. GESLLER. *Parasitic and biological fitness of Venturia Inaequalis: relationship to disease management strategies*. Online. *Plant Disease*. 2001, 85(10): 1036–1051. Dostupné z: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2001.85.10.1036>. [citováno 2023-09-08].
- SEDLÁK, P., R. VÁVRA, P. VEJL, S. BOČEK a J. KLOUTVOROVÁ. *Efficacy loss of strobilurins used in protection against apple scab in Czech orchards*. Online. *Horticulture Science*. 2013, 40(2): 45–51. Dostupné z: https://hortsci.agriculturejournals.cz/artkey/hor-201302-0001_efficacy-loss-of-strobilurins-used-in-protection-against-apple-scab-in-czech-orchards.php. [citováno 2023-09-14].
- VÁVRA, R., P. SEDLÁK, P. VEJL, S. BOČEK a J. KLOUTVOROVÁ. Charakterizace *Venturia Inaequalis* v produkčních výsadbách jablek v České republice. *Úroda, vědecká příloha*. 2011, 652–661. ISSN: 0139-6013.
- VINCELLI P. *QoI (Strobilurin) Fungicides: benefits and risks*. *The plant health instructor*. Online. In: The American Phytopathological Society. Dostupné z: <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Pages/StrobilurinFungicides.aspx>. [citováno 2023-07-17].