

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Techniky kultivace a izolace plísňě slunečnicové

Tereza Doudová

Bakalářská práce
předložená

Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Jako součást požadavků
na získání titulu: Bc. v oboru
Ochrana a tvorba životního prostředí

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Zuzana Trojanová

Olomouc 2013

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autorky: Tereza Doudová

Název práce: Techniky kultivace a izolace plísně slunečnicové

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP v Olomouci
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice, Česká republika

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium technik používaných při kultivaci a izolaci plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*) a na optimalizaci metodiky vytváření monozoosporických izolátů. Literární rešerše obsahuje přehled technik monosporické a monosporangiální izolace používaných u různých druhů mikroskopických organismů a zabývá se problematikou biologie *P. halstedii*, jejíž pochopení je pro úspěšnou kultivaci a izolaci tohoto patogenu klíčové.

Podle výsledků experimentální části práce byl navržen optimální postup pro tvorbu monozoosporických izolátů *P. halstedii* kapilární technikou. Zoospory uvolněné z čerstvě vypěstovaných zoosporangií kultivovaných ve tmě při 19 °C na 1% vodním agaru lze pomocí kapiláry připevněné k mikromanipulátoru odchyťovat již po 1 h kultivace. Odchycené zoospory je poté vhodné dále kultivovat na listových discích ze 12-14 dní starých děložních lístků slunečnice, *Helianthus annuus* cv. Peredovik, při teplotě 19 °C a fotoperiodě 12/12 h (světlo/tma), bez zatemnění po dobu prvních 12-16 h po inokulaci, v jamkách kultivačních destiček s 1 ml destilované vody. Popsanou metodou bylo vytvořeno celkem 7 monozoosporických izolátů *P. halstedii*, což dokazuje, že metoda je využitelná pro další práci.

Klíčová slova: *Plasmopara halstedii*, *Helianthus annuus*, inokulace, kapilární technika, listový disk, zoospóra

Počet stran: 46

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Tereza Doudová

Title: Techniques of cultivation and isolation of sunflower downy mildew

Type of thesis: Bachelor work

Workplace: Dept Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holic, Czech Republic

Supervisor: Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

Techniques used for *Plasmopara halstedii* cultivation and preparation of its single-zoospore isolates are studied and optimized in this work. Single spore isolation techniques applied in studies of various types microscopic organisms are compared, and aspects of *P. halstedii* biology important for successful cultivation and maintenance of the pathogen are reviewed in the initial part of this thesis.

Based on experimental verification the optimal method of capillary technique for single zoospore isolation of *P. halstedii* is proposed as follows. First, fresh zoosporangia are cultivated on 1% agar plates in dark at 19 °C. Zoospore isolation under inverted microscope using capillary tube connected to micromanipulator can be started after 1 hour of zoosporangia cultivation. Isolated zoospores are then cultivated on cotyledon discs prepared from 12-14 days old sunflower, *Helianthus annuus* cv. Peredovik, at constant temperature of 19 °C, and 12/12 h (light/dark) photoperiod, omitting initial dark period of 12-16 hpi. Leaf discs are best cultivated in cultivation plates containing 1 ml of distilled water. Suitability of the proposed method was proven by successful isolation of 7 single zoospore isolates.

Keywords: *Plasmopara halstedii*, *Helianthus annuus*, capillary technique, inoculation, leaf disc, zoospore

Number of pages: 46

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením pracovníků KB PŘF UP s použitím odborné literatury, které jsem řádně citovala a uvádím je na konci v seznamu literatury a internetových zdrojů.

V Olomouci, červenec 2013

.....

Obsah

Seznam tabulek	VII
Seznam obrázků	VIII
Seznam zkratk	IX
Poděkování.....	X
1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. <i>Plasmopara halstedii</i>	3
3.1. Rozšíření, variabilita a hostitelský okruh	3
3.2. Biologie, anatomie, morfologie.....	4
3.3. Životní cyklus.....	5
3.4. Symptomy a šíření.....	8
4. Metody tvorby monosporických izolátů	10
4.1. Izolace MZS izolátů.....	10
4.1.1. Zředovací techniky	11
4.2. Semi-mechanické techniky	12
4.3. Mechanická izolace	13
5. Materiál a metody.....	16
5.1. Rostlinný materiál	16
5.2. Izoláty <i>P. halstedii</i>	17
5.3. Inokulace, udržování a množení izolátů <i>P. halstedii</i>	19
5.4. Kapilární metoda izolace zoospor	19
5.5. Kultivace monozoosporických izolátů.....	24
5.6. Optimalizace kultivace listových disků.....	26
5.6.1. Stanovení nejvhodnějšího náchylného genotypu slunečnice pro tvorbu monozoosporických izolátů	26
5.6.2. Stanovení optimálního množství vody v jamce při kultivaci listových disků	27
5.6.3. Stanovení optimální teploty kultivace inokulovaných listových disků	27
5.6.4. Stanovení vlivu zatemnění na úspěšnost infekce	27
5.6.5. Stanovení doby potřebné pro uvolnění zoospor	28
6. Výsledky	30
6.1. Optimalizace kultivace listových disků.....	30
6.1.1. Stanovení nejvhodnějšího náchylného genotypu slunečnice pro tvorbu monozoosporických izolátů	30
6.1.2. Stanovení optimálního množství vody v jamce při kultivaci listových disků	32
6.1.3. Stanovení optimální teploty kultivace inokulovaných listových disků	34
6.1.4. Stanovení vlivu zatemnění na úspěšnost infekce	35
6.1.5. Stanovení doby potřebné pro uvolnění zoospor	36
6.2. Vytvořené monozoosporické izoláty.....	37
7. Diskuze	38
8. Souhrn	41
9. Seznam použité literatury	42

Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Pracovní kolekce izolátů *P. halstedii* použitá v této práci, mateřské izoláty vytvořených monozygotických izolátů *P. halstedii* a izoláty využití pro optimalizaci metodiky tvorby monozygotických izolátů. 18
- Tabulka 2:** Srovnání počtu infikovaných listových disků u různých náchylných genotypů *Helianthus annuus* provedené ve třech nezávislých opakováních 6, 9 a 12 dní po infekci. 32
- Tabulka 3:** Porovnání zdravotního stavu infikovaných listových disků u různých náchylných genotypů *Helianthus annuus* provedené ve třech nezávislých opakováních 6, 9 a 12 dní po infekci. 32
- Tabulka 4:** Vliv množství destilované vody při kultivaci na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dnů po infekci 33
- Tabulka 5:** Vliv množství destilované vody při kultivaci na zdravotní stav listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dnů po infekci 33

Seznam obrázků

Obrázek 1: Sporangiofor se sporangii (©Trojanová, 2008).....	5
Obrázek 2: Životní cyklus <i>P. halstedii</i> (Trojanová, 2010 - překresleno podle Spring, 2001)	6
Obrázek 3: Příprava nakapáním destilované vody na agarovou plotnu pro odlov zoospor	20
Obrázek 4: Naprášení zoosporangií na agarovou plotnu	20
Obrázek 5.: Zoospory pohybující se v kapkách v těsné blízkosti zoosporangií, které dopadly mimo vodní kapky na povrchu agarové plotny	23
Obrázek 6.: Zoospory pohybující se ve vodních kapkách vytvořených na povrchu agarové plotny před naprášením zoosporangií.	23
Obrázek 7: Přenos narostlých sporangioforů se sporangii za pomoci sterilní pinzety z listových disků pod binokulární lupou	25
Obrázek 8: Detail odebrání sporangioforů se sporangii z listových disků pod binokulární lupou	25
Obrázek 9: Vodnaté pletivo cv. <i>Giganteus</i> s bílými sporangioforami <i>P. halstedii</i> ve středu při kultivaci se 1,5 ml destilované vody	31
Obrázek 10: Porovnání zdravotního stavu po ukončení experimentu 15 dní po infekci (zprava: cv. <i>Giganteus</i> , HA 304 a Peredovik).....	31

Seznam zkratek

BZ - beze změn (asymptomatické pletivo)

CLI – infekce na děložních lístcích (cotyledon-limited infection)

DPI – den/dny po infekci

HLI – infekce na hypokotylu (hypocotyl-limited infection)

HN- hniloba

KONT - kontaminace

LD – listový disk

LDI – inokulace listových disků (leaf disc inoculation)

MPI – minutes/minuty po infekci

MSGI – monosporangiální izolát

MSI – monosporický izolát

MZSI – monozoosporický izolát

SUCH - vysychání (pletiva)

VOD - vodnatění (pletiva)

WSI – metoda inokulace semenáčků (whole seedling inoculation)

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení a rady, Mgr. Zuzaně Trojanové za poskytnuté studijní materiály a konzultace během mé práce, dalším pracovníkům laboratoře fytopatologie KB PŘF UP v Olomouci za pomoc při práci v laboratoři.

Děkuji také své rodině a nejbližším přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

1. Úvod

Plasmopara halstedii, původce závažné karanténní choroby plísně slunečnice je biotrofním houbovým organismem, který se vyznačuje takřka celosvětovým rozšířením (Gulya, 2007), diskutabilním hostitelským okruhem (Virányi a Spring, 2011) a výraznou vnitrodruhovou patogenní variabilitou (Trojanová, nepublikováno). Přestože poměrně intenzivní studium tohoto patogenu probíhá od 60. let 20. století, kdy byly objeveny první fyziologické rasy schopné překonávat rezistenci u pěstovaných hybridů slunečnic (Zimmer, 1974), mnoho zůstává skryto. Některé z otázek, např. jaký je původ a šíření *P. halstedii* ve světě (Ahmed et al., 2012), skutečný hostitelský okruh a pojetí druhu (Virányi a Spring, 2011) nebo vznik a rozsah vnitrodruhové variability (Sakr, 2013), mohou být zodpovězeny za pomoci technik molekulární biologie. Genetické analýzy ale přinášejí uspokojivé výsledky pouze tehdy, používá-li se geneticky homogenní výchozí materiál. Z toho důvodu je nutné vyvíjet a optimalizovat jednoduché a dostupné metody pro tvorbu geneticky homogenního materiálu, v našem případě monozoosporických izolátů, které mohou sloužit dalšímu studiu daného organismu. Práce s biotrofními patogeny přináší mnohá úskalí, a proto je nutné používat takové postupy, které vychází z biologických nároků daného organismu a umožní jeho bezproblémovou izolaci, kultivaci a uchovávání.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši a optimalizovat techniky pro izolaci plísňě slunečnicové.

Cílem literárního úvodu bylo 1/ srovnat různé techniky používané při tvorbě monosporických, monosporangiálních, jednobuněčných a dalších kultur mikroorganismů, jejichž společným znakem je homogenita potomstva, vzniklého z izolované propagule; 2/ shrnout údaje o *Plasmopara halstedii*, které mají praktický význam při práci s tímto patogenem v laboratorních podmínkách.

Praktickými cíli této práce bylo 1/ naučit se kapilární metodu tvorby monoosporických izolátů *P. halstedii*; 2/ optimalizovat a uvést tuto metodu do praxe na našem pracovišti; 3/ vytvořit monoosporické izoláty z mateřských směsných izolátů *P. halstedii* pocházejících z České republiky z roku 2012.

3. *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. & De Toni (1888) „sunflower downy mildew“ a česky vřetenatka slunečnicová je biotrofní parazit a houbový organismus ze skupiny tzv. peronosporálních plísní (říše Chromista) (Sedlářová et al., 2010). Způsobuje chorobu zvanou plíseň slunečnice (Kůdela et al., 2012), což jsou devastující, ekonomicky významné systémové infekce (Wehtje a Zimmer, 1978), které se vyznačují výraznými symptomy jako je zakrslost, chlorotické léze na listech nebo deformace květenství (Spring, 2001). K největším ekonomickým ztrátám dochází na semenech, která se u infikovaných rostlin často tvoří v malém množství nebo vůbec (Anonym, 2008). Zralá semena infikovaných rostlin pak bývají malá, deformovaná a neživotaschopná (Spring, 2001) a do jisté míry mohou napomáhat k šíření infekce (Döken, 1989). Na ochranu rostlin před infekcí *P. halstedii* se používá fungicid metalaxyl pro moření a postřik, navíc se využívají hybridy slunečnic, které jsou rezistentní vůči tomuto patogenu (Sackston, 1981), což je způsob, který se v momentální době nejvíce celosvětově využívá.

3.1. Rozšíření, variabilita a hostitelský okruh

P. halstedii pravděpodobně pochází ze Severní Ameriky, ale v současnosti se vyskytuje prakticky na všech kontinentech (Anonym, 2008) s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu (Constantinescu a Thines, 2010) a to především v oblastech, kde je pěstována slunečnice (www.eppo.org). Výskyt *P. halstedii* byl zaznamenán i v České republice, a to konkrétně na sedmi lokalitách v nejteplejších oblastech ČR (Sedlářová et al., 2013). První výskyty onemocnění ve světě byly zaznamenány v Severní Americe (Indiana, Iowa, Minnesota a New York) (Young a Moriss, 1927). V Evropě byly poprvé hlášeny v Rusku, odkud se později rozšiřovaly do dalších evropských států (Virányi, 2002). Na území bývalého Československa byly infikované rostliny poprvé nalezené na jižní Moravě a jižním Slovensku (Sedlářová et al., 2013).

P. halstedii se vyznačuje značnou vnitrodruhovou variabilitou na úrovni ras, která se bouřlivě rozvíjí od 60. let 20. století (Zimmer, 1974). V roce 2006 bylo na světě rozpoznáno 36 ras (Gulya, 2007) a je velmi pravděpodobné, že další budou postupně popisovány. Mezi celosvětově nejvíce rozšířené patří rasy

100, 300, 700, 710, 730 (Gulya, 2007), v rámci České republiky jsou to pak rasy 700 a 710 (Trojanová, nepublikováno).

Do hostitelského okruhu patří jak pěstované kultivary slunečnice, tak i planě rostoucí hostitelé (Virányi, 2002). Vedle zástupců rodu *Helianthus* patří mezi hostitele i víceletky *Ambrosia artemisifolia* (Virányi, 2011), *Artemisia vulgaris* (Virányi, 2002) a *Xanthium strumarium* (Virányi, 2002). Jednoletými druhy slunečnic náchylnými k napadení *P. halstedii* jsou *Helianthus annuus*, *H. agrophyllus*, *H. debilis*, *H. petiolaris*. Víceletými druhy, které měly podle Virányiho (2002) náchylnost k infekci jsou *H. divaricatus* a *H. grosseserratus* (Virányi, 2002).

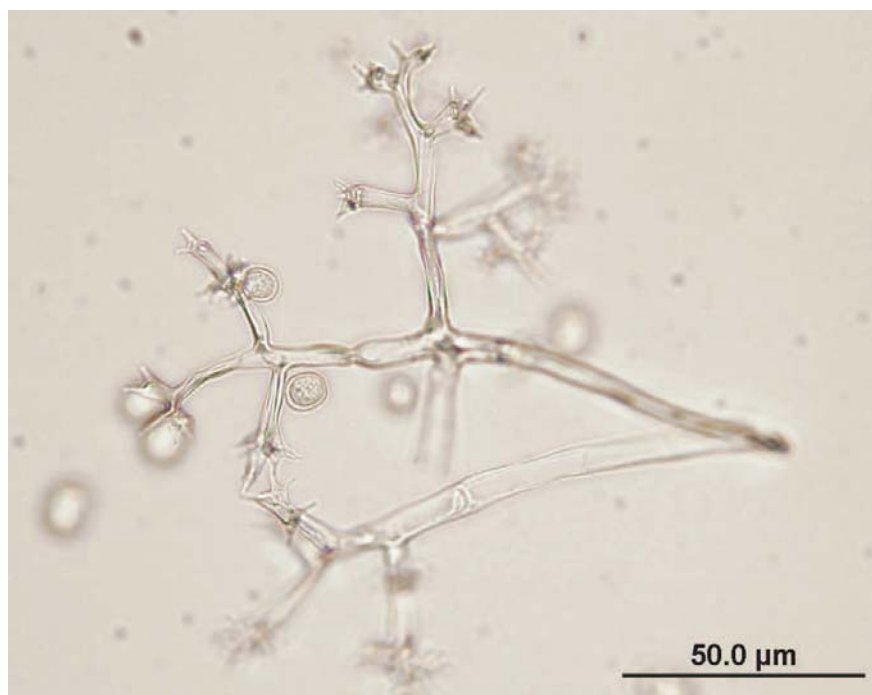
3. 2. Biologie, anatomie, morfologie

P. halstedii je organismus, u kterého je známé jak pohlavní tak nepohlavní rozmnožování. Samičí pohlavní orgán označovaný oogonium je větší oválný, bezbarvý o velikosti 30-40 μm (Anonym, 2008). Samčí pohlavní orgán se nazývá anteridium, je kyjovitého tvaru (Anonym, 2008) a velikostně menší než oogonium 12-30 μm (Nishimura, 1922a). Splynutím těchto dvou útvarů vznikají zygoty a později kulovité tlustostěnné oospory, které po odumření mycelia přezimují v půdě těsně pod epidermis odumřelé hostitelské rostliny (Anonym, 2008) a na jaře jsou připraveny klíčit (Nishimura, 1922a). Nepohlavní rozmnožování probíhá za pomoci zoospor, což jsou dvoubíčíkaté buňky o rozměru 14-30 μm , schopné ve vodním prostředí pohybu (Bouterige et al., 2003). Zoospory se tvoří v zoosporangíích v počtu 20-30 (Spring et al., 1998), které mají vejčitý až elipsoidní tvar (www.eppo.org; Anonym, 2008), mající rozměry často různé velikosti (Hall, 1989). Přibližně mají délku 18-30 μm a šířku 14-20 μm . Podle Springa (2000) obsahuje jedno zoosporangium cca 30 zoospor schopných infikovat rostlinu. Zoosporangia jsou nesena keříčkovitě rozvětvenými sporangiofory (Obr. 1), které prorůstají u nakažené rostliny z průduchů ven (www.eppo.org). Jeden sporangiofor je dělen na 2-5 sterigmat, které nesou jednotlivá sporangia (Bouterige et al., 2003).

Vegetativní část stélky je tvořena intercelulárními hyfami, které vytváří malá zaoblená haustoria (Anonym, 2008), která intracelulárně prorůstají rostlinné buňky a odebírají z nich živiny pro vlastní růst (www.eppo.org). Mladší haustoria *P.*

halstedii jsou aktivnější než starší a prorůstají mezofyly v listech a parenchym ve stoncích a kořenech (Nishimura, 1922b).

P. halstedii patří mezi tzv. homothalické organismy (Spring, 2000), což znamená, že oogonia i anteridia vyrůstající ze stejného mycelia spolu mohou splývat za vzniku oospor. Heterothalické organismy (např. *Bremia lactucae*) takovéhoho splynutí schopné nejsou, tj. splývající anteridium a oogonium musí pocházet z odlišných mycelií.



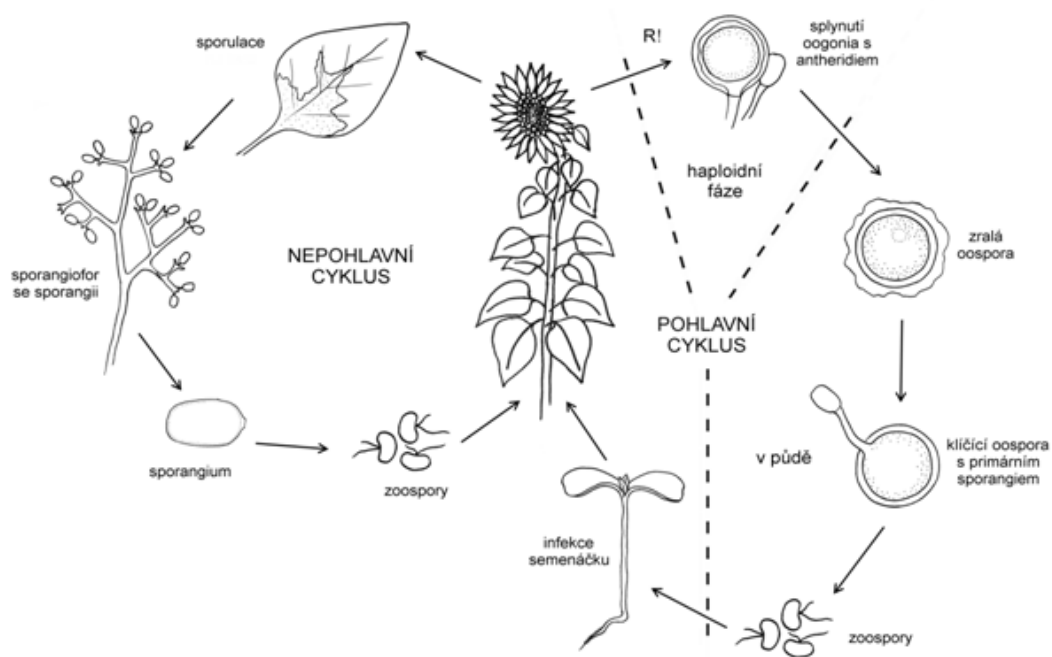
Obrázek 1: Sporangiofor se sporangii (©Trojanová, 2008)

Patogen proniká do hostitelské rostliny nejčastěji skrz kořenové vlásky, rhizodermis kořene nebo epidermis hypokotylu (pokud se jedná o primární infekci), méně často může v případě sekundární infekce pronikat i skrz epidermis listů nebo apikální pupeny (Cohen and Sackston, 1973). U *H. divaricatus* byla dokonce prokázána penetrace patogenu skrz průduchy (Nishimura, 1922a, b).

3.3. Životní cyklus

Životní cyklus *P. halstedii* je rozdělen na pohlavní a nepohlavní fázi. Organismus se po většinu vegetační sezóny hostitelské rostliny nachází v nepohlavní fázi, kdy produkuje značné množství nepohlavně vzniklých tenkostěnných a krátce

životných zoosporangii, které se šíří vzdušným prouděním a slouží k rozšiřování infekce v porostu hostitele. Na konci vegetační sezóny vstupuje *P. halstedii* do pohlavní fáze životního cyklu, jejímž výsledkem je produkce pohlavně vzniklých oospor (tlustostěnných, vytrvalých a přežívajících v půdě), díky nimž patogen překoná nepříznivé zimní podmínky.



Obrázek 2: Životní cyklus *P. halstedii* (Trojanová, 2010 - překresleno podle Spring, 2001)

Podle schématu životního cyklu *P. halstedii* (Obr. 2) zralá oospora vyskytující se na jaře vyklíčí s primárním sporangiem. Toto primární sporangium uvolňuje primární zoospory, které vedou často k primární infekci rostlinek přes kořenový systém. *P. halstedii* je biotrofním druhem, proto buňky napadené plísní jsou minimálně poškozené (Mendgen a Hahn, 2002). Rostlina je schopná i s infekcí růst a patogen tak může koncem sezóny vytvořit znovu oospory, což ukončuje její pohlavní cyklus. Oospora může až deset let přežít v půdě (Sedlářová et al., 2010). Nepohlavní fáze probíhá lokálněji (nadzemní část rostliny), často přímo na listech, které mohou být náchylné na sekundární typ infekce. Uvolňované zoospory se při vhodných podmínkách (viz metodika) mohou zachytávat na listech a vytvářet sporangiofory se sekundárními zoosporangii, které jsou uvolňovány do ovzduší a infekce se šíří dál (Spring, 2001).

Symptomy *P. halstedii* jsou popsány v následující kapitole „Symptomy a šíření“. U *P. halstedii* rozlišujeme dva základní typy infekce, primární a sekundární. Tyto dvě infekce se od sebe odlišují. Rostliny s primární infekcí jsou napadány v době vzházení přes pokožku kořenového vlášení. *P. halstedii* prorůstá směrem vzhůru od kořenového systému do hypokotylu rostliny, kde může být infekce zastavena (Wehtje a Zimmer, 1978). Primárně jsou infikovány zejména semenáčky a mladé rostliny slunečnic a to zoosporami z primárního zoosporangia vyrostlého z přezimující oospory (Spring, 2001). Podstatné je, že patogen vstupuje do mladé hostitelské rostliny kořenovým systémem a způsobuje systémovou infekci hostitelské rostliny.

Sekundárně jsou infikovány již vzrostlé hostitelské rostliny, a to zoosporami uvolněnými z nepohlavně vzniklých zoosporangií. Ke vstupu infekce dochází na nadzemní části rostliny, zejména na listech a typickým symptomem jsou ohraničené lokální léze. Méně často může dojít k semisystémové infekci, kdy je rostlina napadena systémově od místa infekce vzhůru.

Podle Dökena (1989) existuje systémová infekce způsobená myceliem patogenu přežívajícím pod osemením infikovaných semen. Takto infikovaná semena jsou schopná přenášet nákazu, ale pouze málo z těchto semen způsobuje systémovou infekci na rostlinách (Döken, 1989).

V některých případech může docházet k latentní infekci. Rostlina vypadá jako zdravá bez běžných symptomů vyskytujících se běžně u napadených rostlin (Spring, 2001). Nicméně se vyskytuje sporulace u tohoto typu infekce na hypokotylu a děložních lístcích (Heller et al., 1997). Dochází při ní ale k sexuálnímu rozmnožení *P. halstedii* a vzniku oospor, které mohou znovu několik let přežívat v půdě a na jaře infikovat systémovou infekcí nový semenáček. Avšak rostlina nemusí na tuto infekci vůbec reagovat, záleží na vhodných podmínkách a růstové fázi rostliny. Rostlina je pak často schopná zamezit rozšíření *P. halstedii* do dalších pletiv nad hypokotyl (Spring, 2001).

3.4. Symptomy a šíření

Infekce *P. halstedii* je doprovázena celou řadou jak makroskopických tak mikroskopických symptomů. Existují tři typy symptomů: systémová infekce, lokální infekce a latentní infekce.

Systémová infekce se projevuje na všech částech napadené rostliny. Způsobuje zakrslost, chlorotické skvrny na listech a snižuje výnosnost až o 50% (Wehtje a Zimmer, 1978). Navíc rostlina ztrácí cca třetinu velikosti nenapadených rostlin (Spring, 2001). Při vhodných podmínkách jako je zvýšená vlhkost, se vyskytují sporangiofory ve formě bílých povlaků na spodní straně listů (Anonym, 2008). K tomuto druhu infekce může docházet jak při primární tak sekundární infekci. Tato sekundární nákaza se projevuje jako pozdní systémová infekce, která často produkuje infikovaná semena. Častější je ale výskyt primární infekce z půdy nebo napadených semen (Spring, 2009).

Lokální infekce je často omezena malou plochou, vyskytuje se na nadzemních částech rostlin (např. listy). Je doprovázena symptomy jako jsou ohraničené chlorotické léze na listech (Spring, 2001). Rostlina, ale nevykazuje zakrslost jako v případě systémové infekce (Heller et al., 1997), na rozdíl od zdravých rostlin ztrácí na velikosti a listech cca 20-40% ze své velikosti (Spring, 2001).

Posledním symptomem, který se může vyskytovat, je latentní fáze, která se málo vyskytuje. Rostlina vypadá nenakažená, ale sporulace je patrná na děložních lístcích (typ CLI) nebo na hypokotylu nebo kořenech (typ HLI), kde se infekce omezí (Heller et al., 1997; Spring, 2001). Na pravých lístcích ani na epikotylu už patrný patogen není (Heller et al., 1997), rostlina je bez příznaků. To umožňuje dokončení sexuální části životního cyklu *P. halstedii* a vytvoření oospor (Spring, 2001).

Plísňovitost slunečnice se může šířit pomocí zoosporangií (Spring, 2001), oospor (Wehje a Zimmer, 1978) nebo kontaminovaného osiva (Döken, 1989). Zoosporangia se za příznivých podmínek vytváří na koncích sterigmat sporangioforů a do okolí infikované rostliny se šíří pomocí proudění vzduchu (Spring, 2009). Mohou tak infikovat zdravé rostliny v blízkém okolí (netuším, kde zjistit vzdálenost doletu), u kterých způsobují sekundární infekce.

Člověk může *P. halstedii* uměle rozšiřovat pomocí rostlinných zbytků nebo zeminy obsahující oospory. Přenáší se vzduchem, osivem, ale zůstává i několik let

v půdě (Sedlářová, 2010). Nejzávažnější z hlediska ekonomického jsou primární infekce způsobené oosporami, které se tvoří na konci vegetační sezóny na myceliu a spolu s rozpadajícím se rostlinným pletivem se dostávají do ornice (Spring, 2001).

4. Metody tvorby monosporických izolátů

MSI obecně jsou izoláty nebo kmeny mikroorganismů, které vyrostly z jedné propagule (buňky, spory, konidie) a pokud se i nadále množí nepohlavně, vzniká klonální linie, která sdílí vlastnosti původní mateřské propagule. Monosporangiální izoláty (MSGI) jsou analogicky izoláty vzniklé z jednoho sporangia. Tyto typy izolátů již ale nemusí být zcela homogenní, pokud sporangium obsahuje směs geneticky odlišných spor, jak je tomu i v případě *P. halstedii*. (Dick, 2001). MZSI/MSI se podobají MSI, ale mají ještě menší jednotku izolace. Odchytávají se pouze životaschopné zoospory, které byly původně obsaženy v (zoo)sporangíích. Zoospory jsou pohyblivé bičíkaté (v případě *P. halstedii* dvoubičíkaté) buňky, které napomáhají šíření patogenu v určitých fázích životního cyklu (Dick, 2001). Ty se za pomoci různých metod (viz metodika „příprava MZSI“ a izolace MZSI) oddělují od ostatního genetického materiálu (Heldebrand, 1938).

Pro získání geneticky homogenního materiálu u *P. halstedii* se využívají MZSI. Jde o spolehlivý způsob, jak následně získat co nejpřesnější výsledky o rase daného izolátu. Zoospory vyrůstající ve sporangíích totiž nemusí být vždy z genetického hlediska homogenní a mohou se lišit mimo jiné v patogení variabilitě (Spring a Zipper, 2006; Spring et al., 1998).

4.1. Izolace MZS izolátů

Obecně vytváření MZSI/MSI slouží pro určování druhů jednotlivých organismů, u kterých se nedá spoléhat pouze na morfologickou nebo anatomickou strukturu (www.fnca.mext.go.jp). Molekulární metody jsou často jedinou možností určování např. druhů v rámci rodů *Fusarium* a *Collectotrichum* (Choi et al., 1999). U dalších rodů jako např. *Plasmopara* nebo *Plasmodiophora* se v rámci populace často vyskytují směsi různých kmenů, ras nebo patotypů (Xue a Cao, 2008; Some, 1996). Tvorba MZSI/MSI je proto často spojena se získáním geneticky homogenního materiálu pro následné genetické rozborů (www.fnca.mext.go.jp).

Pro tvorbu MZSI/MSI se používají dva typy kultur: kultury čisté a smíšené. Čistá kultura se dá chápat soubor organismů se stejným původem (často z jedné buňky), potomstvo vzniklé z takovéto kultury však nemusí být nutně geneticky homogenní.

Čisté kultury se tvoří proto, aby se izoloval pouze organismus, se kterým chceme pracovat, a zabránilo se kontaminaci nebo napadení cizími organismy (Hildebrand, 1938). Jednou z možností jak získat čistou kulturu je i vytváření MZSI/MSI (Goh, 1999). Čistá kultura v některých případech odpovídá homogennímu materiálu, který se používá pro studium různých druhů. Kultury smíšené jsou v přírodě přirozené a jedná se heterogenní materiál, který v jednom izolátu obsahuje několik patotypů/ras (Xue a Cao, 2008). Z nich se také odděluje čistá kultura v podobě MZSI/MSI. Dalším důležitým krokem při tvorbě MSI je oddělování nečistot. Ty se ve vzorcích nacházejí anebo se jimi kontaminují při špatném zacházení v rámci kultivace nebo při chybné izolaci a vedou k výskytu kontaminace např. kvasinek, bakterií (Hildebrand, 1938; Choi et al., 1999). Ke zvýšenému výskytu kontaminace v kultuře může docházet už při zvýšeném množství spor ve vzorcích (www.fnca.mext.go.jp).

Metody tvorby MSI se obecně dělí na zřed'ovací metody, částečně mechanické (semi-mechanické) a mechanické metody izolace (Hildebrand, 1938).

4. 1. 1. Zřed'ovací techniky

Tyto poměrně jednoduché a na přístroje nenáročné techniky vychází z předpokladu, že při dostatečném naředění izolovaných propagulí v unášecí kapalině se při určité pravděpodobnosti v kapce unášecí kapaliny umístěné na vhodný materiál (sklíčko, agar) objeví právě jedna propagule. Místo unášecí kapaliny, kterou může být nejčastěji destilovaná voda, lze použít i teplý agar, se kterým se po zatuhnutí lépe manipuluje (Hildebrand, 1938; Goh, 1999). Kapky unášecí kapaliny umístěné na sklíčko nebo na agarovou plotnu jsou poté prozkoumány pod mikroskopem a ty kapky, které obsahují právě jednu propaguli jsou přemístěny na čisté médium.

Tato technika se využívá zejména u nekrotofních nebo hemibiotrofních druhů schopných růst na umělém médiu, jako je např. *Alternaria*, *Corynespora* a

Helminthosporium, které jsou pro použití této metody vhodnější, protože mají poměrně velké a snadno zjistitelné konidie. Nevhodné pro tento typ izolace jsou např. druhy *Aspergillus* a *Penicillium* (Goh, 1999), které produkují velké množství poměrně malých spor.

4.2. Semi-mechanické techniky

Pro částečně mechanické (semi-mechanické) izolační techniky je využíván mikroskop. Spory se kultivují na tuhém médiu jako je např. agarová plotna, sklo, nebo želatina. Organismy je poté jednodušší izolovat např. kapičkami vody, aby se nekupily do nepřehledných struktur a byly odděleny od vedlejších kolonií (Hildebrand, 1938). Další možností je rozprostřít organismy rovnoměrně po celém povrchu agaru na Petriho misce, čímž se usnadní se odlov MZSI/MSI. Hildebrand (1938) zařazuje do částečně mechanických (semi-mechanických) metod: techniku suchou jehlou, techniku „Cylinder loop-needle“, kapičkovou metodu, využití mikrokolonie a kapilární techniku.

TECHNIKA SUCHOU JEHLOU – Na ztuhlé agarové plotně se rozvrství množství konidií, které by měly být dobře rozprostřené a vzdálené od sebe, aby bylo možné je snadno izolovat. Špička krejčovské jehly se přiblíží ke konidii, která je pozorována buď pod binokulární lupou, nebo pod mikroskopem. Konidie přilne ke špičce jehly a může být přenesena na čerstvé médium (Hildebrand, 1938; Hildebrand, 1950).

CYLINDER LOOP-NEEDLE METODA (METODA OUŠKEM JEHLY) – Jde o obdobu techniky se suchou jehlou (Hildebrand, 1938). Množství mikroorganismů na agarové plotně by mělo být poměrně nízké a rozmístění rovnoměrné. Tato metoda se používá nejnáze, když jsou jednotlivé buňky vzdáleny od sebe. Izolace probíhá ouškem jehly, nebo drobnou očkovací kličkou, kterou se nabírají organismy. Jehlu nebo očkovací kličku je vhodné zapíchnout do korku a opatřit držadlem nebo násadkou, díky níž je práce snazší a přesnější (www.collections.infocollections.org)

KAPIČKOVÁ METODA S VYUŽÍVÁNÍM INKOSTU – Používá se pro bakterie. Inkoust se ředí do rozpětí mezi hnědou a černou barvou (Hildebrand, 1950). Na agaru jsou kapky bakterií, které se zakápnou inkoustem (Hildebrand, 1938) a poté se za pomoci metody suché jehly izolují.

MIKRO-KOLONIE – Podle Hildebranda (1950) se na speciálním substrátu agaru nechá vyrůst kolonie organismů cca týden až dva. Po této době se agar v plotně znovu rozpustí a mrtvé mycelium se odstraní. Tekutý agar se nalévá na krycí sklíčka a kultivuje. Pod mikroskopem se poté zjišťuje, která izolace je pouze s jednou sporou (Hildenbrand, 1938).

MERCURY-SHIELD (RTUŤOVÝ ŠTÍT) – obdoba předchozí techniky. Izolované organismy se zakápnou tuší a zbytek organismů nepřežije UV záření (Hildenbrand, 1938), kterým se agar osvítí.

KAPILÁRNÍ TECHNIKA – má využití jak pro spory hub, bakterie, tak i v izolaci řas. Průměr kapiláry se upravuje podle velikosti buněk, které jsou izolovány (Fröhlich a König, 1999). Izoluje se s pomocí unášecí kapaliny např. vody nebo oleje, která vhání pod tlakem buňky do kapiláry (Fröhlich a König, 1999). Více o této metodě je popsáno v kapitole 5.4. Tato technika však není vhodná pro některé mikroorganismy (často bakterie), které se zachycují na skle (Fröhlich a König, 1999). Kapilární techniku je možno používat v kombinaci s mikromanipulátory, které upevňují staticky kapiláru na stolku mikroskopu (Hildenbrand, 1938).

4.3. Mechanická izolace

Techniky mechanické izolace pracují přímo se sporami, využívají řadu různých přístrojů. Po technické stránce bývají obtížnější na ovládání, ale naopak zkracují čas práce (Hildebrand, 1938). Mechanická izolace zahrnuje Barberovu metodu, automatické mikromanipulátory (mechanickou ruku), izolátory, zvlhčovací komoru, izolaci na povrchu buněk a využití světelného zdroje.

BARBEROVA METODA – využívá malých jehliček nebo pipet, které napomáhají izolaci propagulí.

AUTOMATICKÉ MIKROMANIPULÁTORY – Mikromanipulátory jsou manipulační zařízení, které se používají při práci s mikroskopickými objekty. Využívají se pro studium genetiky, mikrokolonií, rozvoje kolonií apod. (Skerman, 1968). Existuje velká škála výběru různých mikromanipulátorů, např. límcový objektiv, magnetový nosič a další (Skerman, 1968). Mikromanipulátory se stále vyvíjí a používají se např. v kombinaci s využitím laserů (Fröhlich a König 2000), pak mluvíme o tzv. optických pinzetách a technikách laserové mikrodisekce. Mikromanipulátory jsou poměrně

nákladná zařízení a pro práci s nimi je nutné pořizovat speciální jednorázové komponenty a instrumenty.

V roce 1925 vymyslel Hurst druh mechanického mikromanipulátoru, který se mohl pohybovat ve třech různých směrech a měl staticky upevněnou kapiláru, který se v kombinaci s invertovaným mikroskopem používá pro izolaci spor ve fytopatologických laboratořích prakticky dodnes (Hildebrand, 1938). Mikromanipulátory používají řadu specializovaných příslušenství, kterými jsou izolátory a zvlhčovací komůrky, jejichž různé kombinace se využívají při manipulaci s různými druhy mikroorganismů.

IZOLÁTORY jsou obecně nástroje používané k přímé manipulaci s objekty, který pomáhají vytvářet MZSI/MSI. Často se využívají kromě kombinace s mikromanipulátory používají i s mechanickými pracovními postupy izolace. Příkladem jsou kapiláry, kličky, jehly, kapky, pipety a další jako např. nůžky, nože (Hildebrand, 1938). Technicky jde o stejné nástroje, které se liší materiálem, tvarem a velikostí jednotlivých forem izolátorů.

Mikropipety se v biologických laboratořích využívají pro izolaci buněk hub, bakterií a kvasinek (Hildebrand, 1938). Kapiláry jsou podobné mikropipetám, avšak pro použití tohoto izolátoru je vhodné používat tzv. invertovaný mikroskop s objektivy umístěnými dole pod pracovním stolem (Hildebrand, 1938). Dále se také používají jehly z nejrůznějších materiálů jako např. z kovu, štetin nebo skla (Hildebrand, 1938). Podle Goha (1999) není těžké využít pro vytvoření skleněné formy jehly Pasteurovy pipety. Skleněná jehla pro izolaci by měla mít cca 2cm dlouhý úzký hrot a delší rukojeť, aby byla manipulace co nejpohodlnější a nejjednodušší (Goh, 1999). Izolace pak probíhá přenesením spory nebo částí mycelia z agarové plotny za pomocí úzké špičky jehly. Speciálním typem jehly je např. harpuna, která se používá na mikrokolonie (Hildebrand, 1938). Kličkový izolátor je na konci zakončený očkem nebo ouškem. Využití má pro izolaci bakterií, spor a také např. prvoků (Hildebrand, 1938). Problémem tohoto izolátoru je, že se vyrábí ze skla poměrně složitým způsobem. Obyčejné krycí sklíčko si našlo využití při izolaci kvasinek. Po nárůstu kolonií kvasinek se krycím sklíčkem odřežou nadbytečné organismy a zbytek se přenáší se do nové kultury. Dalšími typy izolátorů jsou např. elektrické dráty, mikronůžky a další (Hildebrand, 1938).

ZVLHČOVACÍ KOMORY je třeba v kombinaci s mikromanipulátorem a izolátory používat tehdy, pokud jsou izolovány mikroorganismy primárně žijící ve vodě nebo jsou jejich mycelia či spory náchylná k vyschnutí. Často se jedná o nádobku uzavřenou krycím sklíčkem nebo má jeden otvor pro vkládání izolátů. Nutností je, aby plocha zakrytí byla rovnoměrná a celá komůrka se dala zkoumat i pod mikroskopem (Hildebrand, 1938), podle typu izolovaných mikroorganismů. Zvlhčovací komory udržují stabilní vysokou vlhkost a svým uzavřením také zabraňuje kontaminaci vzorků dalšími mikroorganismy z ovzduší. Hildebrand (1938) zmiňuje, že tato metoda se ukázala být vhodná pro kvasinky. Buňky byly z krycího sklíčka (Petriho misky) přenášeny za pomoci např. techniky suché jehly (www.zor.zut.edu.pl) a dále se kultivovaly se na agarových plotnách.

Jednou z poměrně nových technik v oblasí mikromanipulací jsou tzv. OPTICKÉ PINZETY, které využívají laserového svazku pro přenos mikro a nanoobjektů (<http://www.isibrno.cz>). Tato technika se využívá pro izolaci virů, bakterií, kovových částic, ale i izolaci buněk z tkání a pletiv (<http://www.fbmi.cvut.cz>).

Nejvhodnějším typem izolační techniky pro tvorbu MZSI *P. halstedii* je mechanická izolace je tzv. kapilární technika za pomoci kapiláry umístěné na rameni mikromanipulátoru. Na agarové plotně se kultivují zoosporangia a po vylíhnutí zoospor se za pomoci kapiláry odchyťávají jednotlivé živé zoospory (viz kapitola metodika). Spring et al. (1998) se zmiňuje o problému s množstvím vylíhnutých zoospor, který se nedá regulovat ani uspěchat. Může se stát, že jednotlivá sporangia uvolní zoospory až po mnoha hodinách anebo vůbec.

5. Materiál a metody

5.1. Rostlinný materiál

Pro udržování izolátů a provedení experimentů byly použity náchylné genotypy slunečnice roční postrádající geny rezistence vůči *P. halstedii*. Konkrétně se jednalo o *Helianthus annuus* cv. Giganteus, cv. Peredovik a HA-304 (první linii z diferenciačního souboru pro určení rasy *P. halstedii*). Kultivar Giganteus (Benary, Han. -Münden, Německo) byl používán především k přemnožení polních izolátů a v poslední fázi namnožení MZSI pomocí metody tzv. whole seedling inoculation (WSI - inokulace klíčících rostlin). Kultivar Peredovik (původní osivo poskytl Prof. Ing. K. Veverka, DrSc., VÚRV Praha-Ruzyně; regenerace osiva v letech 2008, 2010 a 2012 na Katedře botaniky PŘF UP v Olomouci) se používal především k produkci listových disků jak pro samotnou tvorbu MZSI tak pro namnožení nově vytvořených MZSI pomocí metody tzv. leaf disc inoculation (LDI – inokulace listových disků). Diferenciační linie HA-304 (původní materiál poskytl Dr. Thomas J. Gulya, Department of Plant Pathology, NDSU, Fargo, USA; regenerace osiva v roce 2012 na Katedře botaniky PŘF UP v Olomouci) byla pěstována pouze pro účely experimentů.

Semena náchylných kultivarů slunečnice, která byla používána jak pro inokulaci semenáčků, tak pro produkci listových disků byla vždy povrchově dezinfikována roztokem složeným z 10% roztoku Sava Original (Bochemie a.s., Bohumín, Česká Republika) v destilované vodě a několika kapek kuchyňského detergentu pro zvýšení smáčivosti. Dezinfekce ponořením probíhala minimálně 15 minut, aby se při naklíčování a dalším pěstování zamezilo kontaminaci nežádoucími organismy (bakterie, plísňe). Poté byla semena důkladně propláchnuta proudem čisté vody, aby byla zbavena zbytků dezinfekčního roztoku. Propláchnutá semena byla umístěna do Petriho misek na dno pokryté filtračním papírem, a byla zalita takovým množstvím destilované vody, aby byla téměř ponořená. Takto byla semena kultivována cca 3 hodiny ve tmě při pokojové teplotě, aby osemení dostatečně nabobtnalo a umožnilo klíčení. Po třech hodinách byla přebytečná voda slita z misek a semena byla naklíčována ve tmě při pokojové teplotě cca 2–3 dny. Pro další práci byla používána naklíčená semena, která měla kořínek 0,5–1,5 cm dlouhý a nebyla kontaminovaná nežádoucími mikroorganismy, poškozená nebo deformovaná.

Naklíčená semena byla zbavena osemení a byla použita buď při inokulaci, nebo pro další pěstování a produkci listových disků. Naklíčené neinfikované semenáčky byly rovnoměrně vysázeny do květináče naplněným do $\frac{3}{4}$ perlitem (Agroperlit, Nový Jičín, Česká Republika). Poté byly zasypány 12 cm perlitu a důkladně zalaty. Pěstování probíhalo odděleně od inokulovaných rostlin ve skleníku při 22-25 °C 12–18 dní. V průběhu pěstování byly rostliny 1x týdně přihnojovány hnojivem zn. Kristalon (Agro CS a. s., Říkov, Česká Republika).

Většina rostlin dosáhla optimální velikosti pro přípravu listových disků mezi 12. a 15. dnem po vysazení do perlitu. Z vyrostlých slunečnic byly používány pouze děložní lístky. Odebrané děložní lístky byly na dřevěné podložce rozřezány žiletkou na listové disky čtvercového tvaru o hraně cca 7 mm. Takto připravené disky byly ponořeny do destilované vody, aby při práci nedocházelo k vysychání pletiva. Těsně před použitím byly listové disky opatrně vyjmuty z destilované vody a jemně osušeny buničinou z obou stran.

5.2. Izoláty *P. hasltedii*

Pro práci byly použity izoláty z roku 2012 (1201-1208), uvedené v Tabulce 1, které pochází z infikovaných rostlin slunečnic (blíže neurčeného genotypu) z provokačního pole Katedry botaniky PřF UP v Olomouci-Holici. Dále byly použity izoláty 1210, 0001, 1009, 1108, 1112, 1114, 1115, 1124 a 1125, pocházející ze sběrových expedic pracovníků Katedry botaniky PřF UP v Olomouci (Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.; doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.), které proběhly v minulých letech v rámci projektu QH71254 „Inovace metod ochrany slunečnice“ (MZe ČR, NAZV). Originální vzorky jsou dlouhodobě uchovávány v -80 °C, pracovní kolekce, která z nich byla vytvořena, je uchovávána v -20 °C.

Tabulka 1: Pracovní kolekce izolátů *P. halstedii* použité v této práci, mateřské izoláty vytvořených monoosporických izolátů *P. halstedii* a izoláty využité pro optimalizaci metodiky tvorby monoosporických izolátů.

Označení izolátu	Rok sběru	Název lokality	Rasa ¹⁾	Využití
1201	2012	Olomouc – Holice	710	mateřský izolát
1202	2012	Olomouc – Holice	710	
1203	2012	Olomouc – Holice	710	mateřský izolát
1204	2012	Olomouc – Holice	710	mateřský izolát, optimalizace metodiky
1205	2012	Olomouc – Holice	710	
1206	2012	Olomouc – Holice	neurčeno	mateřský izolát
1207	2012	Olomouc – Holice	710	mateřský izolát
1208	2012	Olomouc – Holice	710	mateřský izolát
1210	2012	Lednice	704	
0001	poskytnuto r. 2007 ²⁾	Maďarsko ²⁾	710	
1009	2010	Podivín	710	
1108	2012	Brno – Chrlice	700	optimalizace metodiky
1112	2011	Podivín	704	
1114	2011	Podivín	700	
1115	2011	Podivín	704	
1124	2011	Olomouc – Holice	710	
1125	2011	Olomouc – Holice	710	

¹⁾ Stanovil Bartůšek (2013) metodou inokulace semenáčků (WSI).

²⁾ Referenční izolát ze sbírky prof. Ference Virányiho přivezený z Maďarska v roce 2007, bližší data nebyla poskytnuta.

5.3. Inokulace, udržování a množení izolátů *P. halstedii*

Metoda inokulace semenáčků byla používána pro udržování a množení testovacích (1204, 1108) a mateřských izolátů stejně tak jako v pozdějších fázích namnožení vytvořených MSI *P. halstedii*. Inokulum bylo připravováno buď z čerstvých sporangií narostlých na děložních lístcích infikovaných rostlin cv. Giganteus nebo ze sporangií uchovávaných na děložních lístcích cv. Giganteus v alobalových sáčkích v -20 °C. Do plastové falkonky s 2-5 ml destilované vody (objem vody byl upravován podle množství materiálu a intenzity sporulace) byl vložen rostlinný materiál se sporangii. Převedení sporangií do destilované vody se provádělo šetrným protřepáním na třepačce. Sterilní pinzetou byly poté odstraněny zbytky rostlin a pod mikroskopem byla zkontrolována koncentrace a životnost inokula. Pro namnožení a udržení izolátů metodou inokulace semenáčků byla používána koncentrace 10 000 životaschopných zoosporangií v 1 ml.

Do připraveného inokula byly vloženy předem naklíčené semenáčky cv. Giganteus šetrně zbavené osemení tak, aby byly zcela ponořené pod hladinou inokula. Inokulace probíhala 3 hodiny ve tmě při 19 °C. Po inokulaci byly semenáčky inokulované jednotlivými izoláty vysázeny do oddělených květináčů naplněných perlitem (viz kapitola Rostlinný materiál). Inokulované rostlinky byly pěstovány při 18/19 °C, fotoperiodě 12/12 hodin (noc/den) cca 9-13 dní do doby, než byly první pravé listy infikovaných rostlinek cca 0,5 cm dlouhé. Poté byly odstřiženy nadzemní části rostlinek infikovaných jednotlivými izoláty a ty byly vloženy do samostatných plastových krabiček s buničinou navlhčenou destilovanou vodou na dně. Kultivace probíhala ve tmě, při 19 °C, 100% vlhkosti cca 16-24 hodin nebo do doby než se na povrchu rostlinek objevila sporulace *P. halstedii*.

Čerstvě vytvořená sporangia byla používána k přípravě MSI, inokula nebo je bylo možné spolu s děložními lístky zamrazit v označeném alobalovém sáčku v -20 °C pro další použití.

5.4. Kapilární metoda izolace zoospor

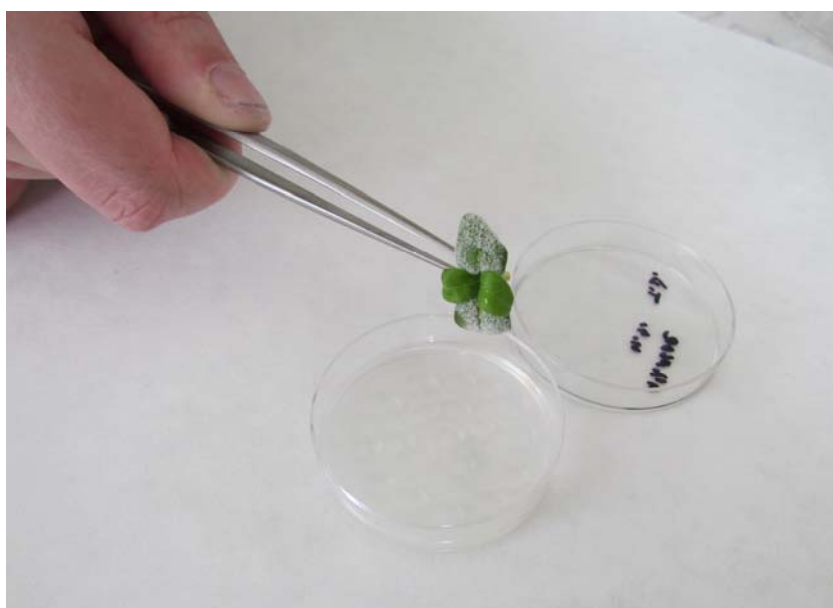
Kultivace sporangií, z nichž jsou uvolňovány zoospory, které se izolují pro tvorbu monozoosporických izolátů, probíhalo na 1% agaru. Pro kultivaci sporangií a

odchyt zoospor byly používány agarové plotny vytvořené rozlitím 3,5 ml 1% nebo 1,2% agaru na Petriho misku o průměru 6 cm.



Obrázek 3: Příprava nakapáním destilované vody na agarovou plotnu pro odlov zoospor

Na připravenou agarovou plotnou byly nakapány kapky destilované vody, tak aby se nedotýkaly (Obr. 3). Na ně byla z cca 5cm výšky naprášena zoosporangia z čerstvě nasporulovaných děložních lístků (viz kapitola 5.3.) (Obr. 4).



Obrázek 4: Naprášení zoosporangií na agarovou plotnu

Misky se zoosporangii byly poté uzavřeny parafilmem tak, aby kapky nebo agar nevyschly a poté byly kultivovány ve tmě, při 19 °C, 1-2 hodiny což je doba potřebná k uvolnění zoospor (viz kapitola 6). Misky byly pravidelně kontrolovány, aby byl zachycen předpokládaný moment, kdy se začnou objevovat první zoospory, v té chvíli se začíná s vlastním odchytem zoospor.

Odchyt zoospor probíhal kapilární metodou pod mikroskopem při stonásobném zvětšení. Před vlastním odchytem bylo nutné pro usnadnění orientace a další práce umístit kapiláru doprostřed zorného pole. Kapilára byla naplněna unášecí kapalinou, v našem případě destilovanou vodou, kterou bylo nutné mezi jednotlivými pokusy o odlov zoospor odpouštět např. na připravené podložní sklíčko nebo na tampón z buničiny. Tím bylo zabráněno nebezpečí, že by v kapiláře zůstaly nečistoty nebo zoospory z předchozí manipulace.

Zoospory se uvolňovaly po prasknutí jednotlivých sporangií a na agarové plotně se zpravidla vyskytovaly v blízkosti prasklých zoosporangií. Při odchytu zoospor v zásadě docházelo k jedné ze tří situací. V prvním případě zoospory vyrejdily ze zoosporangia, které leželo na agaru mimo vodní kapky nanesené na agar před naprášením zoosporangií. Tyto zoospory zůstaly namačkané v těsné blízkosti prasklého sporangia v kapičce vody, která jej obklopovala (Obr. 5). V druhém případě zoospory vyrejdily ze zoosporangia, které dopadlo do vodní kapky na povrchu agaru. Zoospory se proto mohly pohybovat v celém objemu kapky a nezůstávaly v těsné blízkosti zoosporangia, ze kterého vyrejdily (Obr. 6). Ke třetí situaci docházelo při postupném vysychání větších vodních kapek, ve kterých se vyskytovalo menší množství zoospor. Na agaru se přechodně tvořily drobné kapičky, které uvěznily jednotlivé zoospory daleko od sebe.

Oddělování zoospor obecně probíhalo opatrným přiblížením kapiláry k vodní kapce obsahující zoospory a snahou nasát do kapiláry právě jedinou životaschopnou, pohybující se zoosporu. Odchytu jednotlivých zoospor značně napomáhala kapilarita, adheze a koheze vody. Ústí kapiláry, které neobsahovalo unášecí kapalinu, se nasměřovalo k okraji kapky obsahující pohybující se zoospory. Díky adhezi a kohezi se kolem ústí kapiláry dotýkajícího se povrchu agaru vytvořila drobná kapička vody. Tuto kapičku bylo poté možné pohybem kapiláry spojit s kapkou obsahující zoospory. V okamžiku spojení obou kapek začala fungovat

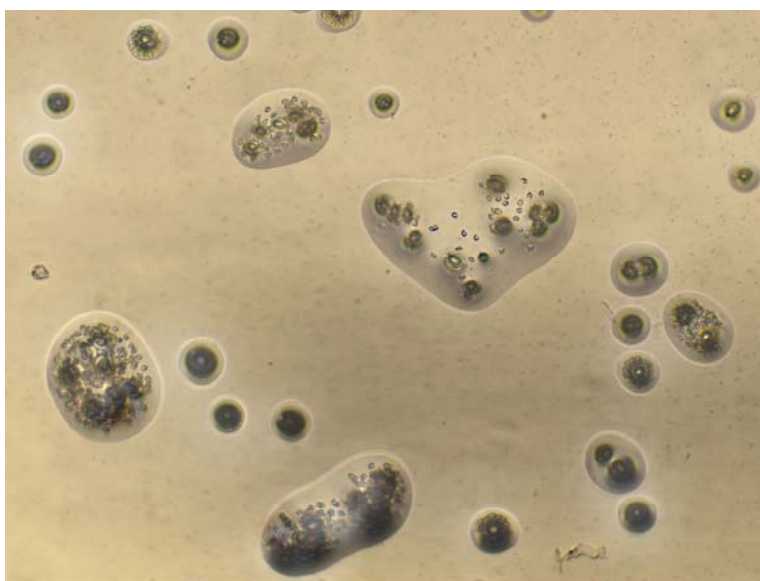
kapilarita, což vedlo k tomu, že zoospory se okamžitě začaly poměrně rychle pohybovat směrem ke kapiláře. V tu chvíli bylo nutné vzdálit se rychle od okraje kapky obsahující zoospory zpět do výchozí pozice. Při troše štěstí a zručnosti se podařilo oddělit jednu nebo pouze několik zoospor aniž by se dotkly kapiláry. Postup bylo možné několikrát opakovat, do té doby, než se podařilo oddělit právě jednu živou zoosporu nebo než se oddělované zoospory přestaly definitivně pohybovat a díky ztrátě vody praskly. Z toho důvodu bylo nutné pracovat poměrně rychle a precizně a po cca pěti neúspěšných pokusech bylo nutné zaměřit se na novou kapku obsahující životaschopnější zoospory. Obecně bylo možné odchyťvat zoospory na jedné agarové plotně po dobu maximálně 40 minut. Po uplynutí této doby všechny kapky na povrchu agaru definitivně vyschly a zoospory vlivem ztráty vody popraskaly.

Nejsnáze bylo možné odchyťvat jednotlivé zoospory neschopné pohybu, oddělené od sebe a uvězněné v drobných kapičkách vzniklých při vysychání větších kapek na povrchu agaru. Vzhledem k tomu, že drobné kapky kolem zoospor velmi rychle vysychaly, bylo možné využít tento způsob odchyty pouze po velmi omezenou a krátkou dobu. Tento způsob odchyty zároveň s sebou nese největší riziko přenesení již mrtvé nebo málo životaschopné zoospory na listový disk.

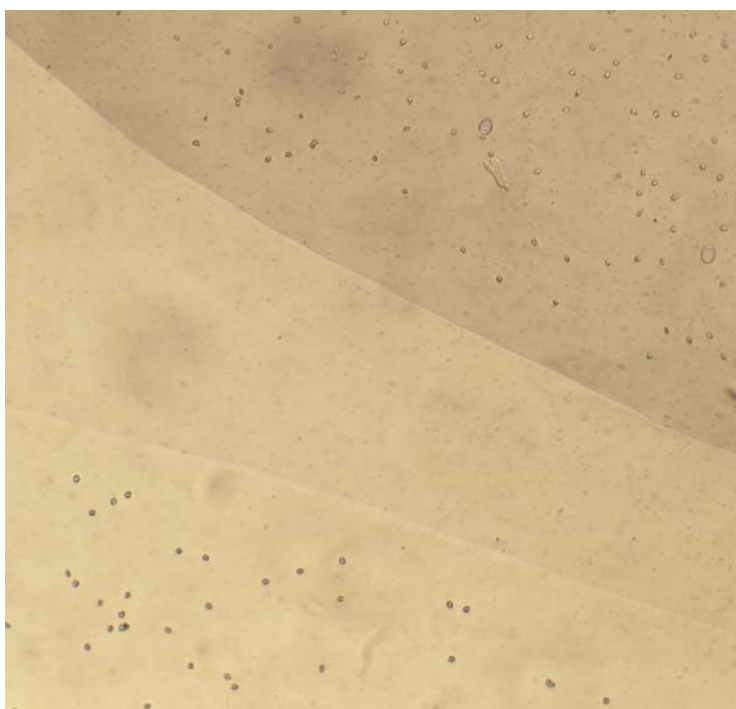
O něco náročnější byl postup zoospor pohybujících se ve velkých kapkách nebo v těsné blízkosti prasklých zoosporangíí. Pro odchyt bylo vhodné vybírat kapky se zoosporami ležící samostatně a mající kolem sebe velký manipulační prostor neporušeného agaru prostého nečistot a další zoospor nebo sporangíí. Výše popsaným postupem se za pomoci kapilárních sil oddělovaly jednotlivé zoospory. Pro odchyt zoospor se osvědčily zejména drobné kapky obklopující prasklá zoosporangia a přeplněné pohybujícími se zoosporami. Menší prostor vodního obalu napomáhal efektivnějšímu oddělování jednotlivých zoospor.

Právě jedna zoospora, která byla odchycena a vtažena spolu s unášecí kapalinou do kapiláry, byla později umístěna na listový disk. Zoospora byla na disk přenášena v kapce unášecí kapaliny o objemu přibližně 20 μ l. Kapka se zoosporou byla umístěna ideálně do středu abaxiální strany připraveného listového disku na narušenou epidermis. Listový disk spolu se zoosporou v kapce na jeho povrchu byl

pomocí zahnuté pinzety opatrně přenesen do jamky kultivační destičky s 1 ml destilované vody.



Obrázek 5.: Zoospory pohybující se v kapkách v těsné blízkosti zoosporangií, které dopadly mimo vodní kapky na povrchu agarové plotny.



Obrázek 6.: Zoospory pohybující se ve vodních kapkách vytvořených na povrchu agarové plotny před naprášením zoosporangií.

5.5. Kultivace monozoosporických izolátů

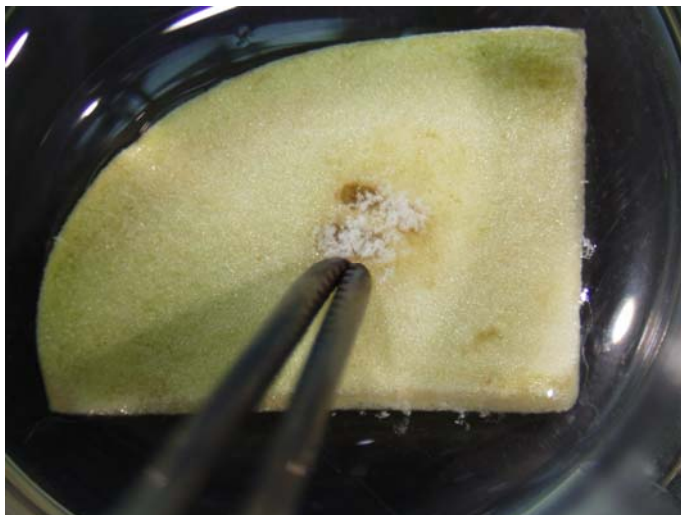
Po optimalizaci podmínek probíhala kultivace inokulovaných listových disků v jamkách kultivačních destiček, které obsahovaly vždy 1 ml destilované vody, při teplotě 18/19 °C a fotoperiodě 12/12 h (noc/den). Prvních 12-16 hodin (do druhého dne) byly disky kultivovány ve tmě, po odtemnění probíhala kultivace při stejné teplotě s fotoperiodou 12/12 hodin (noc/den) až 12 dnů.

Mezi 5.-12. dnem po inokulaci v některých případech docházelo k výskytu bílých chomáčků sporangioforů v místě inokulace, které značí úspěšnou infekci listového disku zoosporou. Proto bylo nutné od 5. dne po inokulaci disky pravidelně kontrolovat pod binokulární lupou. V případě výskytu sporangioforů bylo nutné nově vzniklý MZSI přeočkovat na nové LD nenapadené *P. halstedii*.

Přeočkování nově vyrostlého MZSI na čisté LD probíhalo pod binokulární lupou pomocí jemné pinzety. Do jamek kultivační destičky obsahujících vždy 1 ml destilované vody se po jednom, abaxiální stranou vzhůru vložily čisté listové disky kultivaru Peredovik nebo Giganteus. Za pomoci sterilní pinzety s jemnými hroty byly sporangiofory se zoosporangii odebrány z povrchu infikovaného disku a přeneseny do destilované vody v jamkách kultivační destičky, ve které byly připraveny čisté LD (Obr. 7, 8). Podle našich zkušeností vystačí jedna generace sporangioforů nově vytvořeného MZSI na inokulaci 2-4 čistých LD (obr. 8). Pokud se na LD infikovaném jednou zoosporou objeví další generace sporangioforů, lze přeočkování stejného MZSI několikrát opakovat do doby, než pletivo původního napadeného LD začne vykazovat známky rozkladu (vodnatění, změny zbarvení).

S nově inokulovanými listovými disky se zacházelo stejným způsobem jako s disky inokulovanými jednou zoosporou. Po 7-10 dnech se na okrajích disku po úspěšné inokulaci objevily sporangiofory se sporangii a ty sloužily jako zdroj inokula pro inokulaci dalších čistých LD. Druhé přeočkování probíhalo tím způsobem, že narostlá sporangia se zatřesením kultivační destičky smyla do destilované vody v jamce s úspěšně inokulovaným listovým diskem. Tím bylo získáno inokulum, které bylo napipetováno do jamek prázdné kultivační destičky a doplněno destilovanou vodou do požadovaného objemu. Do jamek s naředěným inokulem byly poté vloženy nové listové disky abaxiální stranou vzhůru. Po 7-10 dnech kultivace se při úspěšné inokulaci na discích znovu objevily sporangiofory. Setřepáním

sporangioforů ze 3-4 intenzivně sporulujících listových disků do vody v jamkách bylo znovu připraveno inokulum, které již bylo dostatečně koncentrované pro inokulaci semenáčků. Listové disky byly vyjmuty z jamek destičky a inokulum bylo přepipetováno do zkumavky s cca 5-10 semenáčky cv. Giganteus vhodnými pro inokulaci. Další postup kopíruje metodu používanou při přemnožování izolátů *P. halstedii* (viz kapitola 5.3). MZSI lze dále množit a uchovávat obvyklým způsobem.



Obrázek 7: Přenos narostlých sporangioforů se sporangii za pomoci sterilní pinzety z listových disků pod binokulární lupou



Obrázek 8: Detail odebrání sporangioforů se sporangii z listových disků pod binokulární lupou

Po celou dobu práce bylo nutné dbát na zachování sterility použitých nástrojů a nádobí, aby nešlo ke kontaminaci nebo smíchání klonů. Pro dezinfekci kovových nástrojů byl používán 96% etanol a vyžihání v plameni, kultivační destičky byly propláchnuty jarovou vodou, destilovanou vodou a poté umyty v myčce a kapilára byla před a po skončení práce vždy propláchnuta alespoň 10 ml destilované vody.

5.6. Optimalizace kultivace listových disků

Pro inokulaci LD bylo u všech experimentů použito čerstvé inokulum z izolátu 1204 (rasa 710), pouze v případě stanovení optimální teploty kultivace inokulovaných listových disků a vlivu zatemnění na úspěšnost infekce bylo pro porovnání použito také čerstvé inokulum z izolátu 1108 (rasa 700). Inokulum bylo připraveno způsobem, který je popsán v kapitole 5.3. Pomocí Bürkerovy komůrky byla stanovena koncentrace inokula a poté byl vypočítán objem inokula, který při dané koncentraci obsahuje právě 10 000 zoosporangií. Koncentrace inokula byla upravena tak, aby 10 000 zoosporangií bylo přítomno v 10-15 μ l. Inokulace vždy probíhala přenesením kapky inokula obsahující 10 000 zoosporangií v příslušném objemu na epidermis listového disku narušenou vpichy jehlou.

Pokud není uvedeno jinak, listové disky příslušných kultivarů byly kultivovány v jamkách obsahujících 1 ml destilované vody abaxiální stranou vzhůru, která byla před vložením disku do jamky narušena několika vpichy. Po inokulaci byly destičky s listovými disky kultivovány při 19 °C, prvních 16-24 hodin ve tmě a potom s fotoperiodou 12/12 h (světlo/tma).

Vyhodnocování experimentů probíhalo vždy 6, 9, 12 a 15 DPI. Všechny níže uvedené experimenty byly provedeny ve třech opakováních, vždy s novou čerstvou generací zoosporangií uvedených izolátů.

5.6.1. Stanovení nejvhodnějšího náchylného genotypu slunečnice pro tvorbu monozoosporických izolátů

Pro test byly použity náchylné kultivary slunečnic dostupné na našem pracovišti a to *Helianthus annuus* cv. Peredovik, cv. Giganteus a HA 304. V průběhu jednoho opakování byl příslušný náchylný kultivar slunečnice testován celkem v 1 kultivační destičce (tj. ve 12 jamkách). V každé jamce kultivační destičky byl

pěstován 1 listový disk příslušného kultivaru, který byl inokulován kapkou inokula. Makroskopické pozorování a hodnocení výskytu sporulace *P. halstedii* a stavu listových disků probíhalo v příslušných intervalech.

5.6.2. Stanovení optimálního množství vody v jamce při kultivaci listových disků

Stanovení optimálního množství destilované vody v jamce kultivační destičky při kultivaci MZSI proběhlo testováním tří objemů destilované vody v jamce: 0,5 ml, 1 ml a 1,5 ml. V průběhu jednoho opakování bylo příslušné množství vody testováno ve 2 kultivačních destičkách současně (tj. ve 2 x 12 jamkách). Jedna kultivační destička obsahovala pouze listové disky kultivaru Giganteus a druhá destička pouze listové disky kultivaru Peredovik, které byly inokulovány kapkou inokula. Pozorování a hodnocení množství vody v jamce, výskytu sporulace *P. halstedii* a stavu listových disků probíhalo v příslušných intervalech.

5.6.3. Stanovení optimální teploty kultivace inokulovaných listových disků

Určení optimální teploty pro kultivaci inokulovaných listových disků proběhlo testováním tří teplot, konkrétně 16 °C, 19 °C a 21 °C. V průběhu jednoho opakování byla příslušná teplota testována u 4 kultivačních destiček (tj. u 4 x 12 jamek). Destičky č. 1 a 2 obsahovaly listové disky kultivaru Giganteus zatímco destičky č. 3 a 4 obsahovali listové disky kultivaru Peredovik. Listové disky v destičkách č. 1 a 3 byly inokulovány kapkou inokula izolátu 1204 (rasa 710), podobně listové disky v destičkách č. 2 a 4 byly inokulovány kapkou inokula izolátu 1108 (rasa 700). Čtveřice destiček poté byla kultivována v příslušné teplotě. Pozorování a hodnocení, výskytu sporulace *P. halstedii* a stavu listových disků probíhalo v příslušných intervalech.

5.6.4. Stanovení vlivu zatemnění na úspěšnost infekce

Pro zjištění, zda zatemnění inokulovaných disků prvních 16-24 h po inokulaci ovlivňuje úspěšnost infekce, byl použit následující postup. V průběhu jednoho opakování byl příslušný vliv (světlo nebo tma) testován ve 2 kultivačních destičkách

současně (tj. na 2 x 12 jamkách). Jedna kultivační destička obsahovala pouze listové disky kultivaru Giganteus a druhá destička pouze listové disky kultivaru Peredovik. Vždy jedna polovina listových disků v každé destičce byla inokulována kapkou inokula izolátu 1204 (rasa 710), stejně tak zbývající polovina listových disků v každé destičce byla inokulována inokula izolátu 1108 (rasa 700). Dvojice destiček, u kterých byl testován vliv „tma“ byla prvních 16–24 hodin kultivace zakryta černou fólií, zatímco dvojice destiček, u kterých byl testován vliv „světlo“, byla umístěna přímo do osvětleného fytotronu bez zatemnění. Pozorování a hodnocení, výskytu sporulace *P. halstedii* probíhalo v příslušných intervalech.

5.6.5. Stanovení doby potřebné pro uvolnění zoospor

Pro experiment byly použity izoláty uvedené v tabulce 10. Pro měření této doby nutné pro uvolnění zoospor ze zoosporangií byly současně použity dvě metody. První metodou bylo naklepání čerstvých zoosporangií přímo na agarovou plotnu (postup je popsán v kapitole 5.5). Druhou metodou byla kultivace 10 000 čerstvých zoosporangií v destilované vodě rozlité na agarové plotně. Inokulum bylo připraveno způsobem popsáním v kapitole 5.6. Vypočtený objem inokula obsahující 10 000 zoosporangií byl doplněn destilovanou vodou na 500 μ l a naředěné inokulum bylo rovnoměrně rozlito na agarovou plotnu. Obě parafilmem uzavřené Petriho misky byly po celou dobu experimentu kultivovány ve tmě při 19 °C mimo cca 2-3 minutové intervaly, ve kterých byly kontrolovány pod invertovaným mikroskopem.

Misky byly po 15 minutách kultivace a pak vždy v patnáctiminutových intervalech kontrolovány pod mikroskopem, s cílem zachytit moment, kdy se ze sporangií uvolní první zoospory. Pravidelné kontroly agarových ploten jak s volně naprášenými zoosporangii tak ze zoosporangií ve zředěném inokulu na povrchu agarové plotny skončily ve chvíli, kdy se objevily první zoospory.

Pouze Petriho misky obsahující zoosporangia ve zředěném inokulu byly po skončení pravidelných kontrol znovu zatemněny a kultivovány přes noc při 19 °C. Poté bylo při stonásobném zvětšení v 10 zorných polích invertovaného mikroskopu spočítáno množství prasklých (životaschopných) a neprasklých (neživotaschopných)

zoosporangií. Z těchto hodnot byla později stanovena životaschopnost daného izolátu podle vzorce:

$$V = \frac{l}{N} \cdot 100$$

kde V = životaschopnost izolátu, l = celkový počet životaschopných zoosporangií a N = celkový počet všech zoosporangií.

6. Výsledky

6.1. Optimalizace kultivace listových disků

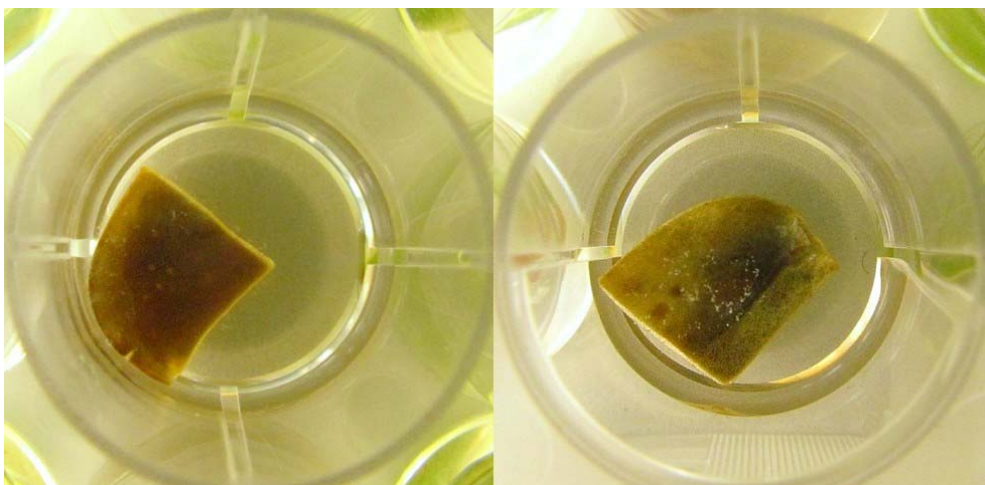
Sledování a hodnocení jednotlivých experimentů probíhalo 6, 9, 12 a 15 DPI, ale pro přehlednost jsou uváděny pouze výsledky z 6. a 12., respektive 9. dne pozorování. Úspěšná infekce jedinou zoosporou se na listových discích projeví nejdříve po 5 dnech a původní listové disky se pro kultivaci monozyosporických izolátů používají 12, maximálně 14 dní po inokulaci. Po uplynutí této doby se zvyšuje riziko kontaminace MZSI dalšími patogeny. Právě proto a kvůli větší přehlednosti je prezentována pouze tato část výsledků, protože se jedná o časový interval, který má pro kultivaci monozyosporických izolátů největší význam.

6.1.1. Stanovení nejvhodnějšího náchylného genotypu slunečnice pro tvorbu monozyosporických izolátů

Tři porovnávané náchylné genotypy slunečnice roční *H. annuus* cv. Peredovik, cv. Giganteus a HA-304 se lišily jak počtem úspěšných infekcí, tak strukturou a odolností pletiva listových disků, které výrazně ovlivňují růst monozyosporických izolátů. První úspěšné infekce byly pozorovány po 3–5 dnech a *P. halstedii* nejdříve začala sporulovat na listových discích cv. Giganteus. Výrazně nejnižší počet úspěšných infekcí pohybující se mezi 7 až 9 z 12 listových disků po 12 dnech kultivace se vyskytoval u kultivaru HA-304. Zbývající kultivary naopak po 12 dnech vykazovaly vyšší počet úspěšných infekcí, konkrétně 5 až 12 u cv. Peredovik a 8 až 11 u cv. Giganteus jak je patrné z tabulky 2.

První změny na listových discích byly pozorovány po 6 DPI. Změny se nejprve projevovaly jako hnědnutí pletiva v místě narušení epidermis, později na řezných ranách na okrajích listových disků a v místech drobných poranění (např. otlak způsobený pinzetou nebo nešetrným zacházením). Hnědnutí pletiva poté dále postupovalo ke středu listového disku a pletivo začalo vodnatět. V závěru docházelo k rozkladu celého listového disku a výskytu kontaminujících organismů (bakterie, plísně). LD zhotovené z děložních lístků cv. Giganteus se ukázaly být v průběhu kultivace jako nejméně odolné (viz tabulky 3 a 5). Změny pletiva se objevily záhy po inokulaci a s nástupem sporulace se ještě prohloubily.

Na konci experimentu bylo pletivo vodnaté, jevílo známky kontaminace plísněmi a sporangiofory *P. halstedii* začaly odumírat spolu s diský (obr. 9, 10). Naopak kultivary Peredovik a HA-304 vykazovaly pouze nepatrné změny, jejich pletivo nemělo sklon k vodnatění a hnědnutí se projevovalo pouze v malé míře a na okrajích disků. Na konci experimentu byly listové diský obou kultivarů zelené a sporangiofory *P. halstedii* vitální a bez známek kontaminace dalšími organismy (obr. 10).



Obrázek 9: Vodnaté pletivo cv. Giganteus s bílými sporangiofory *P. halstedii* ve středu při kultivaci se 1,5 ml destilované vody



Obrázek 10: Porovnání zdravotního stavu po ukončení experimentu 15 dní po infekci (zprava: cv. Giganteus, HA 304 a Peredovik)

Tabulka 2: Srovnání počtu infikovaných listových disků u různých náchylných genotypů *Helianthus annuus* provedené ve třech nezávislých opakováních 6, 9 a 12 dní po infekci.

Genotyp	5.3. 2013			8.3. 2013			12.3. 2013		
	6 DPI	9 DPI	12 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI
Peredovik	4	10	12	3	4	5	10	11	12
Giganteus	4	5	8	6	7	8	9	11	11
HA-304	4	9	9	7	7	7	6	6	7

Tabulka 3: Porovnání zdravotního stavu infikovaných listových disků u různých náchylných genotypů *Helianthus annuus* provedené ve třech nezávislých opakováních 6, 9 a 12 dní po infekci.

Genotyp	5.3. 2013			8.3. 2013			12.3. 2013		
	6 DPI	9 DPI	12 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI	6 DPI	9 DPI	12 DPI
Peredovik	BZ	BZ	BZ	BZ	BZ	SUCH	BZ	BZ	BZ
Giganteus	HN	BZ	SUCH	BZ	VOD	VOD	BZ	BZ	KONT
HA-304	BZ	BZ	VOD	BZ	VOD	VOD	BZ	BZ	BZ

BZ - beze změn; HN- hniloba LD; KONT - kontaminace jinými organismy (bakterie, plísně); SUCH - vysychání pletiva; VOD - vodnatění pletiva

6.1.2. Stanovení optimálního množství vody v jamce při kultivaci listových disků

Tento experiment byl založený a probíhal současně s předchozím (Stanovení nejvhodnějšího náchylného genotypu slunečnice pro tvorbu MZSI). Porovnávány tedy byly tři náchylné genotypy cv. Giganteus, Peredovik a HA 304 a tři množství destilované vody v komůrkách, ve kterých byly pěstovány, konkrétně 0,5 ml, 1 ml a 1,5 ml vody.

První změny při kultivaci nastaly cca 6 DPI, kdy začaly vysychat jamky kultivačních destiček u genotypu Giganteus s objemem destilované vody 0,5 ml (viz tab. 5). U genotypů Peredovik a HA-304 se vysychání jamek kultivační destičky s objemem 0,5 ml objevilo až 12 DPI. U všech tří porovnávaných genotypů se na discích v jamkách s 0,5 ml objevila kontaminace dalšími organismy 12 DPI. Pouze u cv. HA-304 byla zaznamenána nejvyšší sporulace na kultivovaných LD s objemem vody 0,5 ml (tab. 4), zbylé dva kultivary vykazovaly nejvyšší sporulaci u disků v jamkách s 1 ml vody.

U disků kultivaru Giganteus pěstovaných v 1 ml vody často docházelo k poškození pletiva hnilobou a disky kultivarů HA-304 a Giganteus po delší době kultivace začaly vodnatět. U disků cv. Peredovik pěstovaných v 1 ml destilované vody nedocházelo k závažnému poškození pletiva.

U disků cv. Giganteus a HA-304 pěstovaných v 1,5 ml vody docházelo k vodnatění pletiva 12 DPI, zatímco u cv. Peredovik se taková reakce nedostavila.

Tabulka 4: Vliv množství destilované vody při kultivaci na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dnů po infekci

Genotyp	množství d H ₂ O	5.3. 2013		8.3. 2013		12.3. 2013	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	0,5 ml	9	9	7	7	11	12
	1,0 ml	4	12	3	5	10	12
	1,5 ml	5	10	4	7	11	12
Giganteus	0,5 ml	5	7	7	7	10	10
	1,0 ml	4	8	6	8	9	11
	1,5 ml	3	8	7	7	9	9
HA-304	0,5 ml	8	9	8	8	9	9
	1,0 ml	4	9	7	7	6	7
	1,5 ml	5	5	4	5	3	3

Tabulka 5: Vliv množství destilované vody při kultivaci na zdravotní stav listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dnů po infekci

		5.3.		8.3.		12.3.	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	0,5 ml	BZ	SUCH	BZ	SUCH	BZ	KONT
	1,0 ml	BZ	BZ	BZ	BZ	BZ	BZ
	1,5 ml	BZ	BZ	BZ	BZ	BZ	BZ
Giganteus	0,5 ml	SUCH	SUCH	SUCH	SUCH	BZ	KONT
	1,0 ml	HN	SUCH	BZ	HN	BZ	VOD
	1,5 ml	BZ	VOD	BZ	VOD	BZ	VOD
HA-304	0,5 ml	BZ	SUCH	BZ	SUCH	BZ	KONT
	1,0 ml	BZ	VOD	BZ	VOD	BZ	VOD
	1,5 ml	BZ	VOD	BZ	VOD	BZ	VOD

BZ - beze změn; HN- hniloba LD; KONT - kontaminace jinými organismy (bakterie, plísňe); SUCH - vysychání pletiva; VOD - vodnatění pletiva

6.1.3. Stanovení optimální teploty kultivace inokulovaných listových disků

První sporulace se začínala objevovat již 6 DPI a to zejména u listových disků pěstovaných při 21 °C nezávisle na použitém izolátu (tabulky 6 a 8). Počet infekcí byl obecně nejvyšší u LD pěstovaných při 21 °C. Listové disky však již po 12 dnech nebyly použitelné pro další kultivaci – vodnatěly, objevovaly se kontaminace (data neuvedena). Druhý nejvyšší počet úspěšných infekcí se vyskytoval v teplotě 16 °C, zatímco v 19 °C se úspěšné infekce objevovaly dříve. Použité izoláty *P. halstedii* neměly vliv na výsledky experimentu.

Tabulka 6: Vliv teploty kultivace na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dní po infekci u izolátu 1108 (rasa 700)

	teplota	14.3.		26.3.		28.3.	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	16°C	1	1	0	2	0	3
	19°C	1	2	1	2	1	1
	21°C	1	3	0	1	1	5
Giganteus	16°C	0	3	0	1	0	2
	19°C	0	1	0	1	1	4
	21°C	1	4	0	1	2	3

Tabulka 7: Vliv teploty kultivace na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dní po infekci u izolátu 1204 (rasa 710)

	teplota	14.3.		26.3.		28.3.	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	16°C	0	4	0	5	0	3
	19°C	1	2	1	1	1	2
	21°C	1	1	1	2	0	3
Giganteus	16°C	0	1	0	1	0	2
	19°C	1	1	0	2	1	4
	21°C	0	1	0	3	2	3

6.1.4. Stanovení vlivu zatemnění na úspěšnost infekce

Infekce listových disků se vyskytovaly nezávisle na použitém izolátu. Celkem ve 24 případech byla vyšší nebo rychlejší sporulace u LD, u kterých proběhlo zatemnění, zatímco pouze v šesti případech převažovala infekce nezakrývaných LD. V ostatních případech nedošlo ke sporulaci nebo byly záznamy o množství infekcí totožné (data nepublikována). Vzhledem k velmi nízkému počtu infekcí nejsou výsledky příliš průkazné, můžeme však říci, že zakrývání prvních 16-24 hodin podporuje uchycení infekce na LD nikoli množství celkových infekcí na LD.

Tabulka 8: Vliv zatemnění listových disků prvních 16-24 dní po infekci na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dní po infekci u izolátu 1108 (rasa 700)

		14.3.		26.3.		28.3.	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	zatemnění ano	1	1	1	2	0	1
	ne	0	1	0	0	0	1
Giganteus	zatemnění ano	0	3	0	0	0	0
	ne	0	1	0	0	1	4

Tabulka 9: Vliv zatemnění listových disků prvních 16-24 dní po infekci na počet infikovaných listových disků náchylných genotypů *Helianthus annuus* sledovaný ve třech nezávislých opakováních 6 a 12 dní po infekci u izolátu 1204 (rasa 710)

		14.3.		26.3.		28.3.	
		6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI	6 DPI	12 DPI
Peredovik	zatemnění ano	1	2	0	0	0	1
	ne	1	2	0	1	0	1
Giganteus	zatemnění ano	0	1	0	1	0	1
	ne	0	0	0	2	1	4

6.1.5. Stanovení doby potřebné pro uvolnění zoospor

V průběhu tohoto experimentu byly srovnány dva typy kultivace zoosporangii. Kultivace v inokulu na povrchu agaru pomohla lépe odhadnout skutečný počet zoosporangii, které uvolní zoospory, zatímco kultivace přímo na agaru lépe simulovala skutečné podmínky při izolaci zoospor. U zoosporangii kultivovaných přímo na agaru hrozí riziko, že kapka okolo zoosporangia vyschne rychleji, než se zoospory stačí uvolnit. Obecně se zoospory uvolňovaly rychleji přímo v inokulu, doba nutná k uvolnění zoospor se pohybovala mezi 45–60 minutami. U izolátu 1114 došlo k uvolnění zoospor v extrémně krátké době, už po 15 minutách, zatímco u izolátu 1207 došlo k uvolnění zoospor až po 75 minutách (tabulka 10). Doba nutná k uvolnění zoospor ze zoosporangii přímo na agaru se obvykle pohybovala mezi 60–75 minutami, došlo ale i k několika odchylkám (tabulka 11). Celkové množství zoosporangii, které uvolnily zoospory, bylo poměrně vysoké, kromě izolátů 1203 a 1009 vždy převýšilo 80% všech zoosporangii kultivovaných na agarové plotně.

Tabulka 10: Doba nutná k uvolnění prvních zoospor ze zoosporangii kultivovaných v destilované vodě rozlité po povrchu agarové plotny a životaschopnost jednotlivých izolátů.

Izolát	Rasa izolátu	Uvolnění prvních zoospor					procento ZsUZ ¹⁾
		15 MPI	30 MPI	45 MPI	60 MPI	75 MPI	
1201	710	-	-	-	x		96,84
1202	710	-	-	X			84,62
1203	710	-	-	X			68,32
1204	710	-	-	-	X		84,71
1205	710	-	-	-	X		85,96
1206	neurčeno	-	-	X			89,32
1207	710	-	-	-	-	X	95,65
1208	710	-	-	-	X		95,81
1210	704	-	-	-	X		84,68
1108	700	-	-	-	X		86,72
1112	704	-	-	-	X		84,71
1114	700	X					96,23
1115	704	-	-	-	X		96,40
1124	710	-	-	-	X		88,24
1125	710	-	-	-	X		97,22
1009	710	-	-	-	X		74,67
0001	710	-	-	-	X		96,23

- zoospory nepřítomny

x zoospory přítomny

¹⁾ Procento zoosporangii z celkového počtu zoosporangii na agarové plotně, které prokazatelně uvolnily zoospory po 24hodinové kultivaci.

Tabulka 11: Doba nutná k uvolnění prvních zoospor ze zoosporangií kultivovaných na povrchu agarové plotny.

Izoláty	Rasa izolátu	Uvolnění prvních zoospor						
		15 MPI	30 MPI	45 MPI	60 MPI	75 MPI	90 MPI	105 MPI
1201	710	-	-	-	X			
1202	710	-	-	-	-	X		
1203	710	-	-	-	-	X		
1204	710	-	-	-	-	-	-	_a)
1205	710	-	-	-	-	X		
1206	neurčeno	-	-	-	-	X		
1207	710	-	-	-	X			
1208	710	-	-	-	-	-	-	X
1210	704	-	-	-	-	X		
1108	700	-	-	-	-	X		
1112	704	-	-	-	X			
1114	700	-	-	X				
1115	704	-	-	-	-	X		
1124	710	-	-	-	X			
1125	710	-	-	-	-	X		
1009	710	-	-	-	-	-	X	
0001	710	-	-	-	-	-	X	

Pozn.: a) nedošlo k výskytu živých zoospor ani na po 120 min. kultivace

6.2. Vytvořené monozoosporické izoláty

MZSI s homogenní genetickou informací byly vytvářeny z izolátů posbíraných v letech 2012 (tabulka 1). Za cca půl roku se povedlo vytvořit 7 klonů z mateřských izolátů 1201 (rasa 710), 1203 (rasa 710), 1204 (rasa 710), 1206 (neurčená rasa), 1207 (rasa 710) a 1208 (rasa 710). V případě izolátu 1201 byly vytvořeny dva klony.

Všechny mateřské izoláty pocházely z lokality Olomouc-Holice. Dva MZSI (izoláty 1201 a 1207) byly testovány mým spolužákem, T. Bartůškem (BP, KEŽP UP v Olomouci, 2013), ale prozatím není rasa určena.

7. Diskuze

Tvorba MZSI je náročný proces s nejasným výsledkem, který lze ovlivnit dodržáním optimálního postupu, cvikem a zkušenostmi pracovníka, který MZSI připravuje. Úspěšnost izolace je přesto při dodržení všech nezbytných podmínek poměrně nízká. V průměru je pro získání jednoho MZSI nutné izolovat cca 100 zoospor (Spring, 2012, osobní komunikace).

V průběhu optimalizace metod pro kultivaci MZSI *P. halstedii* bylo stanoveno, že nejvhodnějším genotypem pro přípravu LD je náchylný kultivar slunečnice roční Peredovik. Nejlépe ze všech porovnávaných genotypů odolával drobným poraněním a otlakům na pletivu. Neprojevily se na něm výrazné patologické změny typu vodnatění nebo hniloba jako u ostatních zkoumaných genotypů. Nejméně vhodný pro kultivaci na listových discích je kultivar Giganteus – jako první podléhá patologickým změnám, pletivo je křehké, snadno poranitelné a brzy vodnaté. Kultivar HA-304 je v tomto směru odolnější, ale *P. halstedii* na těchto discích nejméně ochotně sporuluje. Zjištěné výsledky jsou v rozporu s poznatky Springa et al. (1997), který používá k tvorbě listových disků právě cv. Giganteus. Přestože se výsledky ze třetího opakování mírně lišily od dvou předchozích, obecný trend je stejný. Ke zkreslení výsledků mohlo dojít vlivem použití mírně koncentrovanějšího inokula, nebo inokula, u kterého se téměř ze 100 % zoosporangií uvolnily zoospory. V tomto ohledu je práce s biotrofními patogeny problematická; i přes veškerou snahu není možné zajistit naprosto shodné opakovatelné podmínky.

Testováním bylo zjištěno, že optimální objem vody pro pěstování inokulovaných disků je 1 ml. 0,5 ml velmi snadno vysychá i v uzavřené destičce a listový disk nepřežije potřebně dlouhou dobu, aby umožnil sporulaci plísně. Kultivar HA-304 sice je schopen přežít i v malém objemu vody, ale počet úspěšných infekcí je v porovnání s cv. Peredovik nižší. Mohlo by se zdát, že objem 1,5 ml odstraní problém s vysycháním pletiva. V tomto případě však často docházelo k vodnatění pletiva. Vodnaté pletivo neposkytuje vhodné podmínky pro růst plísně a zároveň je náchylnější ke kontaminaci bakteriemi. Výsledek odpovídá předchozím poznatkům, Spring et al. (1998) používá objem 750 µl. Tento objem ale není optimální v našich podmínkách – na rozdíl od Springa et al. (1998) jsme používali kultivační destičky

s 12 jamkami, které jsou větší než na 25 jamkových destičkách, které jsou použité v původní metodice. Objem destilované vody je příliš nízký aby zcela pokryl dno 12 jamkových destiček a listový disk kultivovaný v tomto objemu má tendenci vysychat. Musíme však konstatovat že nižší objem vody v menší jamce kultivační destičky v kombinaci s listovými disky z cv. *Giganteus* může poskytovat dobré výsledky. Problém kontaminace listových disků jinými organismy byl v minulosti řešen přidavkem antibiotik (Sackston a Anas, 1991). Vliv antibiotik na klíčení zoospor ale není dostatečně probádán a tato problematika vyžaduje další studium.

V literatuře je uvedena teplota vhodná pro inokulaci 15 °C, teplota vhodná pro kultivaci inokulovaných rostlin je 20 °C (Cohen and Sackston, 1973). Tento přístup však vyžaduje fytokomory nebo kultivační skříně nastavené na různé teploty. Z toho důvodu bylo naší snahou stanovit teplotu, která je vhodná jak k inokulaci, tak ke kultivaci listových disků. Z experimentu vyplývá, že při žádné z testovaných teplot *P. halstedii* ani listové disky nerostly výrazně lépe. Předpokládaná optimální teplota 19 °C, při které jsou inokulované listové disky běžně pěstovány (Spring, ústní sdělení) vyhovuje kultivaci stejně jako v literatuře uváděná teplota 16 °C (Spring et al., 1997). Pěstování listových disků při 21 °C nebylo tolik vhodné, vzhledem k tomu, že díky vyšší teplotě se urychlovala infekce a LD byly v horším stavu než při 16 °C a pletivo se v posledních dnech experimentu (15 DPI) začínalo rozpadat. Na rozdíl však u teploty 16 °C bylo pletivo hostitele delší dobu nepoškozené a *P. halstedii* proto měla delší časový úsek ke kolonizaci pletiva produkci sporangioforů. První sporangiofory se na pletivu objevovaly po 6 dnech, což odpovídá poznatkům z literatury, která uvádí rozmezí 6-10 DPI (Spring, 1998).

Spring (1998) uvádí, že zatemnění LD po inokulaci napomáhá ujímání zoospor. Náš experiment však ukázal, že zatemnění LD po inokulaci nemá vliv na množství úspěšných infekcí, ale spíše urychluje výskyt prvních infekcí. Tento rozdíl mohl být způsoben tím, že zatímco my jsme k inokulaci používali přímo zoospory, Spring et al. (1998) používal sporangia, která vyžadují kultivaci ve tmě právě pro uvolnění zoospor.

V posledním z experimentů, který probíhal, se stanovovala doba nutná k uvolnění zoospor ze zoosporangií, která je klíčová maximální využití co největšího množství zoospor při jejich odchytu kapilárou. Průměrná doba potřebná k uvolnění

zoospor se pohybovala kolem 60-75 minut. Pozorovali jsme obecný trend, že ze sporangií přímo na povrchu agaru se zoospory uvolňují méně ochotně a až po delším časovém intervalu. Zoospory se uvolňovaly cca o 15 minut dříve, pokud se zoosporangium vyskytovalo v destilované vodě. Podle našich zkušeností je ale odchyt zoospor z velkých kapek vody na povrchu agaru problematičtější, a proto rychlejší uvolnění zoospor nemá pro tvorbu MZSI větší význam.

Podle zkušeností z vlastní tvorby MZSI k objevení prvních zoospor docházelo skutečně po 60 minutách kultivace. Při práci s izoláty ale nikdy nedocházelo k výskytu takhle opožděně. Pravděpodobně to bylo způsobeno přenášením agarových ploten mezi kultivační skříní a mikroskopem. Zoospory nebyly neustále zakryté kvůli jednotlivým kontrolám po 15 minutách, a proto se pravděpodobně doba potřebná k uvolnění zoospor prodloužila cca o 15 minut.

Izoláty číslo 1204 a 1114 nereagovaly standardně, u izolátu 1204 se i po několika opakováních nepodařilo zjistit výskyt zoospor ani po 120 minutách i přes to, že při přeočkovávání a množení tohoto izolátu se žádné problémy nevyskytovaly a také v průběhu experimentů optimalizace metodiky reagoval srovnatelně s druhým použitým izolátem. Izolát 1114 zase reagoval naprosto opačným způsobem, zoospory byly zaznamenány už po 15 minutách kultivace. To mohlo být způsobeno tím, že izolát 1114 byl testován jako poslední v pořadí a protože děložní lístky s inokulem jsou skladovány ve vlhkém prostředí, mohlo k uvolnění zoospor dojít ještě před přípravou inokula. Co se týče poměru zoosporangií které uvolnily zoospory a zoosporangií, které byly pravděpodobně mrtvé, ani jeden z izolátů se významně neodchyluje od ostatních.

V průběhu tohoto experimentu také bylo prokázáno, že u všech izolátů zoospory uvolňuje přibližně 70% a více zoosporangií, což je více než dostačující počet zoospor pro efektivní izolaci zoospor a následnou kultivaci MZSI.

8. Souhrn

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala technikami kultivace a izolace plísně slunečnicové a úpravou kultivace listových disků pro vytváření MSI. Kapilární technika monosporické izolace se ukázala jako jediná vhodná pro *Plasmopara halstedii* z důvodů pohyblivých zoospor, které je těžké izolovat jiným způsobem a nepoškodit. Dále byla optimalizována metodika pro kultivaci monosporických izolátů pro fytopatologickou laboratoř Katedry botaniky PŘF UP v Olomouci. Pro odvození listových disků lze doporučit kultivar Peredovik, následnou kultivaci v objemu vody 1 ml/jamka destičky s 12 jamkami, teplotu pro pěstování inokulovaných listových disků v rozmezí 16-19°C. Naopak zatemnění listových disků 16-24 hodin po inokulaci pravděpodobně nemá tak velký vliv na úspěšnou inokulaci pletiv jako u peronospor, které netvoří zoospory.

V rámci práce se podařilo se vytvořit 7 monosporických izolátů (klonů) z mateřských izolátů: 1201 (dva klony), 1203, 1204, 1206, 1207 a 1208, které budou využity pro další práci s *Plasmopara halstedii*.

9. Seznam použité literatury

- Ahmed S., Denis Tourvieille de Labrouhe D. a Delmotte F. (2012): Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genetics and Biology* 49(10): 847–855.
- Bartůšek T. (2013): Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii* a rezistence vůči metalaxylu v České republice. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, s. 44.
- Bouterige S., Tronchin G., Lesourd M., Marot-Leblond A., Molinéro M., Bouchara J.-P. a Robert R. (2003): Ultrastructural and Immunochemical Changes During the In Vitro Development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology* 93(8): 1023-1030
- Cohen Y. a Sackston W. E. (1973): Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. *Canadian Journal of Botany* 51(1): 15-22.
- Constantinescu O. a Thines M. (2010): *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. *Polish Botanical Journal* 55(2): 293-298.
- Dick M. W. (2001): Straminipilous fungi: Systematics of the Peronosporomycetes, including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids, and similar organisms. Nizozemí: Kluwer Academic, Dordrecht Publishers, s. 670.
- Döken M. (1989): *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni in Sunflower Seeds and the Role of Infected Seeds in Producing Plants with Systemic Symptoms. *Phytopathology* 124: 23-26.
- Fröhlich J. a König H. (1999): Rapid Isolation of Single Microbial Cells from Mixed Natural and Laboratory Populations with the Aid of a Micromanipulator. *Systematic and applied microbiology* 22: 249-157.

- Fröhlich J. a König H. (2000): New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 567-572.
- Goh T.-K. (1999): Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* 2: 47-63.
- Gulya T. J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower arend the Word. In: Lebeda A., Spencer-Phillips P.T.N. (Eds.) *Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings of The 2nd International Downy Mildews Symposium*. UP in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hane, Czech Republic, s. 121-134.
- Hall G. (1989): Unusual or interesting records of plant pathogenic Oomycetes. *Plant Pathology*: 38: 604-611.
- Heller A., Rozynek B., a Spring O. (1997): Cytological and Physiological Reasons for the Latent Type of Infection in Sunflower Caused by *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology* 145: 441-445.
- Hildenbrand E. M. (1938): Techniques for the Isolation of Single Microorganisms. *Botanical Review* 4(12): 627-664.
- Hildenbrand E. M. (1950): Techniques for the Isolation of Single Microorganisms. II. *Botanical Review* 16(4): 181-207.
- Choi Y.-A., Hyde K. D. a Ho W. H. (1999): Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38.
- Kůdela V., Kocourek F. a Bárnet M. (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. Česká akademie zemědělských věd, Praha, s. 272.
- Mendgen K. a Hahn M. (2002): Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7:352-356.
- Nishimura M. (1922a): *Studies in Plasmopara halstedii*. Sapporo, Japan: College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, s. 33.
- Nishimura M. (1922b): *Studies in Plasmopara halstedii II*. Sapporo, Japan: College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, s. 67.

- Sackston W. E. (1981): The Sunflower crop and disease: progress, problems, and prospects. *Plant Disease* 65 (8): 643-648.
- Sackston W. E. a Anas O. (1991): Problems with the leaf disc immersion (LDI) method of inoculating sunflowers with downy mildew, and solutions to some of them. *Helia* 14: 1-6.
- Sakr N. (2013): Pathogenic, morphological and genetic diversity in *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35(1): 9-19.
- Sedlářová M., Stojaspal K., Lebeda A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České republice. *Rostlinolékař* 1: 17-20.
- Sedlářová M., Trojanová Z., Lebeda A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 49: 1-10.
- Skerman V. B. D. (1968): A New Type of Micromanipulator and Microforge. *Journal of General Microbiology* 54: 287-297.
- Some A., Manzanares M. J., Laurens F., Baron F., Thomas G. a Rouxwel F. (1996): Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45: 432-439.
- Spring O. (2000): Homothalic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the Downy Mildew Sunflower . *Helia* 23(32): 19-26.
- Spring O. (2001): Nonsystematic infections of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108(4): 329-336.
- Spring O. (2009): Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* – An underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecology* 2: 75-80.
- Spring O., Rozynek B., Zipper, R. (1998): Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology* 146: 577-579.

- Spring O. a Zipper R. (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* 110: 657-663.
- Trojanová Z. (2010): Patofyziologie slunečnice: interakce s *Plasmopara halstedii*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, s. 66.
- Trojanová Z., Sedlářová M. a Lebeda A. (nepublikováno): Pathogenic variability of sunflower downy mildew in the Czech Republic. Připraveno do tisku.
- Virányi F. (2002): The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Philips, P.T.N, Gisi, U., Lebeda, A., (Eds.) *Advances in Downy Mildew Research. Volume I*. London, UK: Kluwer Academic Publishers, s. 167-172.
- Virányi F. a Spring O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology* 129: 19-24.
- Wehtje G. a Zimmer D. E. (1978): Downy mildew of sunflower: biology of systematic infection and the nature of resistance. *Phytopathology* 68: 1568-1571.
- Xue S. a Cao T. (2008): Isolation and Variation in Virulence of Single-Spore Isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Canada. *Plant Disease* 92: 456-462.
- Young P. A. a Morris H. E. (1927): *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflowers. *American Journal of Botany* 14(9): 551-552.
- Zimmer D. E. (1974): Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology* 64: 1465- 1467.

Internetové zdroje

- Anonym (2008): Diagnostics *Plasmopara halstedii*. OEPP/EPPO Bulletin 38: 343-348. [<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2008.01245.x/pdf>, přístup: 29. 7. 2013].

CABI and EPPO. *Plasmopara halstedii*. Data Sheets on Quarantine Pests, 5 s.

[http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Plasmopara_halstedii/PLASHA_ds.pdf, přístup 1. 5. 2013].

Corps P. (1980): Preserving Food by Drying: a Math-Science Teaching Manual.

[<http://collections.infocollections.org/ukedu/en/d/Jm0010e/5.1.html>, přístup 27. 7. 2013].

FNCA Forum for nuclear cooperation in Asia. [www.fnca.mext.go.jp, přístup: 30. 7. 2013]

Isolation of saprotrophic and pathogenic fungi from plant organs and cultivation of the fungi in agar cultures.

[<http://www.zor.zut.edu.pl/Mycota/Isolation%20of%20saprobes%20and%20pathogens.htm>, přístup 27. 7. 2013].

Mycorrhiza.

[http://www.fnca.mext.go.jp/english/bf/bfm/pdf/4_3_Mycorrhiza0403.pdf, přístup 27. 7. 2013].

Optické mikromanipulační techniky

[http://www.isibrno.cz/index.php?co=/team/teamhome.php&id_celek=87&lang=_cz&id_druh_menu=2&url=http://www.isibrno.cz/litec, přístup 28. 7. 2013]

Prnka T. a Šperling K. (2006): Optické pinzety (optical tweezers).

[<http://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/2405/public/Optick%C3%A1%20manipulace.pdf>, přístup 28. 7. 2013].