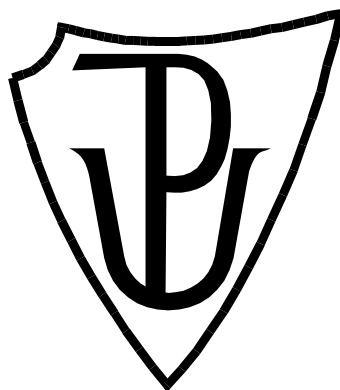


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Plíseň slunečnicová: problematika monosporických
izolátů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Nikol Krčová
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Chemie pro víceoborové studium, Biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Michaela Sedlářové, Ph.D. za použití literatury a zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

.....

Bc. Nikol Krčová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své vedoucí doc. RNDr. Michaele Sedlářové Ph.D. za odborné vedení, vstřícný a osobitý přístup, množství cenných rad, ochotu, trpělivost a věnovaný čas, bez kterého by se vypracování této diplomové práce neobešlo.

Velký dík patří Mgr. Zuzaně Drábkové Trojanové PhD. za předání praktických zkušeností. Děkuji Mgr. Romaně Pospíchalové za předání praktických zkušeností a pomoc při práci v laboratoři. Vřelé „díky“ patří Mgr. Pavle Šikové a paní Věře Zoubkové za pomoc při pěstování rostlin a práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat celému oddělení fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci za pomoc při provádění experimentální práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Nikol Krčová
Název práce	Plíseň slunečnicová: problematika monosporických izolátů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice, Česká republika
Vedoucí práce	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá problematikou monosporických izolátů, se zaměřením na izolaci monozoosporických klonů *Plasmopara halstedii* původem z *Helianthus annuus*.

Součástí teoretické části je charakteristika biotrofní parazitické řasovky *P. halstedii*, která je původcem plísně slunečnicové, včetně biologie, kultivace a izolace tohoto patogenu. Shrnutí jsou metody používané při monosporické a monosporangiální izolaci různých druhů mikroorganismů.

Cílem experimentální části bylo připravit vlastní monozoosporické izoláty ze tří vybraných pravděpodobně směsných vzorků *P. halstedii*. K odchytu životaschopných zoospor uvolněných z čerstvých zoosporangií kultivovaných na 1 % agaru ve tmě při teplotě 19 °C byla použita kapilární technika. Jednotlivé zoospory byly odchytávány již po 45 min kultivace pomocí skleněné kapiláry připojené k mikromanipulátoru. Kultivace probíhala na listových discích pocházejících z děložních listů náchylného genotypu slunečnice *Helianthus annuus* cv. Peredovik a cv. Giganteus v jamkách kultivačních destiček s 1 ml destilované vody při fotoperiodě 12/12 h a teplotě 19 °C. Touto metodou bylo vytvořeno celkem 5 monosporických izolátů. Pro další studium toho patogena je důležité pracovat s geneticky homogenním materiálem, proto je vhodné použít právě monosporické izoláty. Bohužel úspěšnost metody je velmi malá, pouze 1-2 %.

Klíčová slova	<i>Plasmopara halstedii</i> , <i>Helianthus annuus</i> , inolulace, kapilární technika, zoospora, listový disk, izolát
Počet stran	96
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and Surname	Nikol Krčová
Title	Sunflower downy mildew: issue of monosporic isolated
Type of thesis	master
Department	Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holic, Czech Republic
Supervisor	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

Master thesis deals with the issue of monosporic isolates, in details with the isolation of monozoosporic clones of *Plasmopara halstedii* originating from *Helianthus annuus*.

The theoretical part embodies characteristics of biotrophic parasitic oomycete *P. halstedii*, the causative agent of sunflower downy mildew, including biology, cultivation and isolation of this pathogen. There is a summary of the methods used in the monosporic and monosporangial isolation of the different types of microorganisms.

The aim of the experimental part was to prepare monozoosporic isolates from three likely mixed samples of *P. halstedii*. To obtain monozoosporic isolates, fresh zoosporangia were cultivated on 1% agar in darkness, at 19 °C and the capillary technique used to isolate released viable zoospores. Individual zoospores were captured after 45 minutes of cultivation by a glass capillary connected to a micromanipulator under light microscope. The cultivation of individual isolates took place on cotyledon discs of susceptible sunflower *Helianthus annuus* cv. Peredovik and cv. Giganteus. This took place in microplates with 1 ml of distilled water and a photo-period of 12/12 hours at a temperature of 19° C. Using this method, five monosporic isolates in total were created. For further study of this pathogen, it is important to work with genetically homogeneous material and therefore it is appropriate to use monozoosporic isolates. Unfortunately, the yield of this method is only 1-2%.

Keywords	<i>Plasmopara halstedii</i> , <i>Helianthus annuus</i> , inoculation, capillary technique, leaf disc, zoospore
Number of pages	96
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Patosystém <i>Plasmopara halstedii</i> – <i>Helianthus annuus</i>	10
3.1.1	<i>Helianthus annuus</i>	12
3.1.1.1	Biologie a ekologie	12
3.1.1.2	Taxonomie.....	13
3.1.1.3	Historie.....	13
3.1.1.4	Pěstované formy slunečnice a použití	14
3.1.2	Rezistence <i>Helianthus annuus</i>	16
3.1.2.1	Efektory <i>P. halstedii</i>	17
3.1.3	Ochrana slunečnice	18
3.1.4	<i>Plasmopara halstedii</i>	19
3.1.4.1	Taxonomické zařazení a fylogeneze <i>Plasmopara halstedii</i>	19
3.1.4.2	Koncepce druhů a hostitelský okruh <i>P. halstedii</i>	21
3.1.4.3	Biologie <i>P. halstedii</i>	24
3.1.4.3.1	Životní cyklus <i>P. halstedii</i>	26
3.1.4.3.2	Morfologie <i>P. halstedii</i>	27
3.1.4.4	Symptomy, šíření a epidemiologie <i>P. halstedii</i>	29
3.1.4.5	Vývoj nomenklatury a klasifikace ras.....	33
3.1.5	Globální distribuce a patogenní variabilita <i>P. halstedii</i>	34
3.1.5.1	Původ šíření a globální distribuce	36
3.1.5.2	Distribuce <i>P. halstedii</i> v České republice	37
3.2	Metody tvorby monosporických izolátů	40
3.2.1	Příprava MZSI.....	40
3.2.1.1	Zředňovací metody	42
3.2.1.2	Částečně mechanické metody	43
3.2.1.2.1	Cylinder loop – needle metoda	43
3.2.1.2.2	Technika suchou jehlou	44
3.2.1.2.3	Kapičková metoda.....	44
3.2.1.2.4	Mikrokolonie.....	45
3.2.1.2.5	Kapilární metoda	45
3.2.1.2.6	Mercury-shield (rtuťový štít)	46
3.2.1.3	Mechanická izolace.....	46
3.2.1.3.1	Barberova metoda	46
3.2.1.3.2	Izolátory	47
3.2.1.3.3	Automatické mikromanipulátory	48
3.2.1.3.4	Zvlhčovací komory	49
3.2.1.3.5	Světelný zdroj	50
3.2.1.4	Izolace MZSI <i>P. halstedii</i>	50
3.3	Studium <i>P. halstedii</i> – metodika	51
3.3.1	Sběr a izolace pagenu.....	51
3.3.2	Příprava rostlinného materiálu	53

3.3.2.1	Desinfekce a klíčení osiva.....	54
3.3.3	Příprava inokula a inokulace.....	55
3.3.4	Metody inokulace.....	56
3.3.4.1	Inokulace semenáčků ponořením do inokula (WSI – whole seedling inoculation) 56	
3.3.4.2	Inokulace semenáčku SDI.....	57
3.3.4.3	Inokulace listových disků LDI.....	57
3.3.5	Kultivace inokulovaných rostlin	58
3.3.5.1	Hodnocení patotestů.....	59
4	Materiál a metody	61
4.1	Příprava rostlinného materiálu <i>Helianthus annuus</i>	61
4.2	Izoláty <i>Plasmopara halstedii</i>	62
4.3	Inokulace, udržení a množení izolátů <i>P. halstedii</i>	62
4.4	Identifikace ras <i>P. halstedii</i> metodou inokulace semenáčku (SDI)	63
4.5	Kapilární metoda izolace zoospor.....	66
4.6	Kultivace monozoosporických izolátů.....	69
5	Výsledky	71
5.1	Vytvořené monozoosporické izoláty.....	71
6	Diskuse.....	72
7	Závěr	76
8	Didaktická část – využití tématu „ ve výuce na SŠ“	77
8.1	Praktické cvičení z biologie	79
8.2	Projekt	83
9	Literatura.....	84
10	Seznam obrázků	95
11	Seznam tabulek	96

1 Úvod

Biotrofický parazit *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni (1888) známý také jako vřetenatka slunečnicová (Chromista, Oomycetes, Peronosporaceae) způsobuje ekonomicky významnou nemoc plíseň slunečnice a dalších zástupců čeledi Asteraceae (Sedlářová *et al.*, 2016). Plíseň slunečnicová je v současnosti zařazena jako regulovaný nekaranténní škodlivý organismus (viz. Sdělení č. 16/2019 Sb. Ministerstva zahraničních věcí o přijetí Mezinárodní úmluvy o ochraně rostlin (<https://www.zakonyprolidi.cz/ms/2019-16>). Regulován je především dovoz osiva, protože latentní infekce (přítomnost mycelia pod osemením nažek) způsobuje systémovou infekci vzcházejících rostlin a je zodpovědná za významnou ztrátu výnosu slunečnice roční (Gascuel *et al.*, 2015).

Ochrana slunečnic proti *P. halstedii* spočívá v pěstování odolných hybridů, fungicidním ošetření semen a agrotechnických opatřeních. V současné době je známo více než 22 genů rezistence vůči *P. halstedii* (Pl_1 – Pl_{22} , Pl_{Arg}) (Spring *et al.*, 2019; Trojanová *et al.*, 2017), které byly charakterizovány z kulturních i planých druhů slunečnic (Sedlářová *et al.*, 2016; Gascuel *et al.*, 2015). Pěstování rezistentních slunečnic urychluje mikroevoluci zástupců třídy Oomycetes, ty reagují zvýšením vnitrodruhové variability na úrovni fyziologických ras a selektují se ty, které jsou schopny překonat geny rezistence (Sedlářová *et al.*, 2016).

Kromě klasických šlechtitelských metod jsou v posledních letech běžně používány nové molekulární techniky, jako je genotypizace, sekvenování a editace genomu (Kaya, 2016). Šlechtění slunečnice na rezistenci k *P. halstedii* je založeno na využití *Pl* genů v nových hybridech, využití kvantitativní rezistence kódované QTLs zatím není běžné. Strategií šlechtitelů je i navýšení diverzity genů u sortimentu pěstovaných variet tak, aby se snížil selekční tlak na populaci *P. halstedii* (Vear, 2016).

2 Cíle práce

Cíle této diplomové práce byly následující.

1/ Vytvořit literární rešerši

- charakterizovat biologii, výskyt a variabilitu *Plasmopara halstedii* v ČR
- popsat techniky inokulace a kultivace patogena se zaměřením na monosporické izolace
- ozřejmit význam monosporangiálních a monosporických izolátů při studiu interakce *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*.

2/ Experimentální část

- připravit vlastní monozoosporické izoláty z vybraných (dle dosavadních výsledků pravděpodobně směsných) vzorků *P. halstedii* z ČR (sbíraných v letech 2014-16)
- namnožit inokulum a stanovit rasu na základě fenotypu reakce diferenciačního souboru slunečnice.

3/ V diskusi bylo cílem shrnout vlastní výsledky, srovnat je s literaturou a vyvodit závěry pro další práci s *P. halstedii*,

4/ Součástí DP je zpracovat didaktickou část na téma původci chorob rostlin

- navrhnou a zařadit témata do výuky
- rozbor učiva a pracovní list pro SŠ.

3 Teoretická část

3.1 Patosystém *Plasmopara halstedii* – *Helianthus annuus*

Slunečnice (*Helianthus annuus* L.) je důležitým zdrojem rostlinných olejů a díky vysokému zastoupení kyseliny olejové a linoleové (cca 90%) tato olejnina získává stále větší popularitu. Slunečnici postihuje více než 30 nemocí, které v kombinaci s abiotickými faktory mají různý dopad na výnos v jednotlivých zemích produkce (Kazda *et al.*, 2018). Plíseň slunečnicová je jedna z nejméně destruktivních chorob napadající *Helianthus annuus* L. (slunečnici roční), jednu z nejnámennějších pěstovaných olejnin na světě (Virányi *et Spring*, 2011). Choroba způsobuje téměř století rozsáhlé ekonomické ztráty ve výnosech slunečnice (Virányi *et Spring*, 2011). Kromě Austrálie, Nového Zélandu a Antarktidy je distribuce patogenu globální (Virányi *et al.*, 2015). Díky vysoké genetické plasticitě je schopný opakovaně překonávat rezistenci u vyšlechtěných kultivarů slunečnice (Spring, 2019).

Nemoc primárně napadá klíčící rostliny. Silná nákaza se projevuje silnou sporulací a padáním mladých rostlin, čímž dochází ke snížení populace. Slabší infekce vyvolávají řadu příznaků v závislosti na stáří rostliny. Mezi charakteristické příznaky patří růstové deformace, chlorózy nebo bílé povlaky sporangií (Sedlářová *et al.*, 2020).

K šíření infekce v porostu nejnámenně dochází půdou prostřednictvím nově vytvořených sporangií. Odolné hybridy slunečnice mohou začínající infekci zastavit, i když se u nich ve fázi dvou děložních listů objeví sporulace. Růst mycelia je zastaven v hypokotylu, kde se nachází hlavní obranný mechanismus slunečnice. U náchylných genotypů slunečnice se projeví známky systémové infekce (nejčastěji ve fázi 3-6 pravých listů). Napadené rostliny vykazují známky hypoplazie (zakrnělý vzrůst) s různými deformacemi listů a často nedotvořenými a sterilními úbory (Sedlářová *et al.*, 2020). Za vhodných podmínek se na listech se objevují a bílé vrstvy sporangioforů se sporangiemi vyčnívajícími ze stromat na rubu listu (Sedlářová *et al.*, 2020; Spring, 2019), které způsobují sekundární infekce. Ty se projevují světle zelenými až chlorotickými ohraničenými skvrnami listech (Sedlářová *et al.*, 2020).

Latentní infekci způsobují klíčivé nažky (nesou mycelium *P. halstedii*), které vznikly u rostlin vykazující slabou systémovou nebo sekundární infekci. Na konci vegetační

sezóny se v pletivech napadených rostlin vytváří tlustostěnné oospory, které mohou zamočit půdu až na 10 let (Sedlářová *et al.*, 2020; EPPO, 2014).

Původce *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. *et de Toni* (1888) byl poprvé Farlowem (1883) nalezen na *Eupatorium purpureum* L. (Spring, 2019; Virányi *et Spring*, 2011), následně se názvosloví a pojetí druhu několikrát měnily, zvláště když ve 20. století se významně choroba rozšířila v USA i Evropě (Spring, 2019). Od roku 1992 byla *P. halstedii* zařazena v karanténní regulaci EU (Gascuel *et al.*, 2016), od roku 2002 v ČR (Sedlářová *et al.*, 2016) a v současnosti je vedena jako regulovaný nekaranténní škodlivý organismus, tj. kontrole podléhá dovoz osiva. Koncepce taxonu s ohledem na hostitelský okruh je vědci dále diskutována, zejména s rozvojem molekulárních technik (Spring, 2019), v běžné praxi se používá široké pojetí taxonu (Trojanová *et al.*, 2017).

Interakce mezi hostitelem *Helianthus annuus* a patogenem *Plasmopara halstedii* můžeme popsat podle koncepce „**gen – proti – genu**“ (Flor, 1946), kde interagují produkty genů rezistence slunečnice (označovány jako *Pl*) a produkty genů avirulence *P. halstedii*, zatím známé jako RXLR a CRN efekторы (Gascuel *et al.*, 2016; Pecrix *et al.*, 2019).

Genotypy patogena se projevují jako tzv. fyziologické rasy (někteří autoři používají označení patotypy), které jsou schopny infikovat variabilní škálu genotypů slunečnice a projev jejich fenotypu se využívá v praktickém hodnocení (Trojanová *et al.*, 2017). Nomenklatura těchto ras je založena na fenotypové reakci řady diferenciačních linií (Tourvieille de Labrouche *et al.*, 2000). Přes intenzivní výzkum metod ochrany pěstovaných slunečnic, šlechtění rezistence pěstovaných hybridů i aplikací fungicidů, se za více než 50 let nepodařilo tento patogen dostat pod kontrolu. Selekcční tlak, který je na patogen neustále vytvářen, vede ke vzniku nových rezistentních ras *P. halstedii* (Spring, 2019).

3.1.1 *Helianthus annuus*

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) je jednoletá rostlina s velkým žlutým úborem, který obsahuje nažky s vysokým obsahem oleje (Sakr, 2013).

Slunečnice je jednou z hlavních olejnatých plodin pěstovaných po celém světě. Pěstuje se na všech kontinentech kromě Antarktidy (Seiler *et* Gulya, 2016).

Slunečnicový olej má vyšší nutriční hodnoty než ostatní rostlinné oleje. Má více procent nenasycených mastných kyselin (olejová, linolová a linolenová) a nižší hodnoty nasycených mastných kyselin (palmitová a stearová) (Seiler *et* Gulya, 2016).

Slunečnice je hlavním zdrojem rostlinného oleje v Evropě. Používá se k vaření, také jako průmyslová surovina (olej, celulóza), krmivo pro drůbež a zvířata (semena, lisované zbytky). Semena obsahují 20–40 % bílkovin, 30–65 % oleje, který obsahuje až 80 % kyseliny linolové. Je také zdrojem nektarů pro včely (Gulya, 2004).

3.1.1.1 Biologie a ekologie

Pěstovaná slunečnice, *H. annuus*, je jednoletá diploidní rostlina, se základním haploidním počtem chromozómů $n = 17$ (Trojanová *et al.*, 2017; Heiser *et al.*, 1969). Rod *Helianthus* zahrnuje 49 druhů, z nich 12 druhů jsou diploidní jednoletky (např. *H. annuus*, *H. agrophyllus*, *H. petiolaris*, *H. praecox* atd.) a 37 druhů jsou diploidní ($2n = 2x = 34$), terraploidní ($2n = 4x = 68$) nebo hexaploidní ($2n = 6x = 102$) trvalky (např. *H. giganteus*, *H. tuberosus*, *H. occidentalis*, a *H. angustifolius*) (Trojanová *et al.* 2017; Humann, 2016).

Slunečnice patří k teplomilným a suchovzdorným plodinám (Tichá *et* Vyzínová, 2006). Pěstují se v mírném podnebí (teplotní rozmezí mezi 20-25 °C). Tato rostlina roste lépe v suchém podnebí s vysokým slunečním zářením a hlubokými půdami, ve kterých je schopna rozvíjet svůj dlouhý pedikulární systém (Kaya, 2016; Seiler *et* Gulya, 2016; Bockisch, 1998). Půdy vyžaduje humózní, strukturní, hlinitopísčité a písčitohlinité, nejlépe černozemního typu (Tichá *et* Vyzínová, 2006). Oproti ostatním olejnatým plodinám má menší nároky na kvalitu životního prostředí. Je schopná růstu v půdě s nízkým vodním režimem a s omezeným používáním půdních hnojiv a fungicidů, na rozdíl od jiných olejin (Kaya, 2016; Seiler *et* Gulya, 2016; Bockisch, 1998).

3.1.1.2 Taxonomie

Pěstovaná slunečnice, *H. annuus*, patří do řádu Asterales (hvězdnicotvaré), čeledi Asteraceae (hvězdnicovité), což je největší čeleď, do které patří přibližně 10 % všech kvetoucích rostlin vůbec. Slunečnice je dále v čeledi Asteraceae zařazena do podčeledi Asteroideae, tribusu Heliantheae a podtribusu Helianthinae a rodu *Helianthus* (Humann, 2016).

Název rodu *Helianthus* odvodil C. Linné z dvou řeckých slov, a to „hélios“ (slunce) a „ánthos“ (květ). U slunečnice je znám jev heliotropismus (otáčení se za sluncem) (Humann, 2016).

Tabulka 1: Taxonomický strom slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*)

Taxonomický strom	
doména	Eukaryota
nadříše	Bioconta
říše	Plantae
oddělení	Magnoliophyta
třída	Rosopsida
řád	Asterales
čeleď	Asteraceae
rod	<i>Helianthus L.</i>
druh	<i>Helianthus annuus L.</i>

3.1.1.3 Historie

Slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*) pravděpodobně pochází ze Severní Ameriky, v USA byla domestikována (Heiser, 2008). Přesto první rozsáhlý rozvoj plodiny byl v Rusku v letech v 1900–1950 (Pecrix *et al.*, 2018).

Archeologické nálezy ukázaly, že tuto olejninu jako první pěstovali američtí indiáni 4625 let před naším letopočtem (Jocić *et al.*, 2015). Domorodí indiáni používali slunečnici pro léčbu různých onemocnění. S její pomocí léčili bolesti hlavy, záněty, kašel, rány po uštknutí chřestýšem a kousnutí pavoukem. Indiáni Hopi v USA stále pěstují zvláštní odrůdu slunečnice, která je vysoká, štíhlá s tmavými listy a má tenké, tmavě

fialové nažky, které zrají delší vegetačního období než jiné místní odrůdy. Tato slunečnice je cenná pro brilantní modré, fialové, černé nebo červené barvivo, které se vyrábí z těl rostlin a používá se k barvení vlny, bavlny, košů i ke slavnostnímu malování na tělo (EPPO, 2019).

V Evropě představili slunečnici španělští průzkumníci v 16. století. Následující dvě století byla pěstovaná jako okrasná rostlina, teprve později se začala používat pro potravinářské a lékařské účely. (Kaya, 2016, Seiler *et* Gulya, 2016).

Ruští pěstitelé byli mezi prvními, kteří ze slunečnice vyráběli olej. V polovině 19. století přivezli ruští přistěhovalci slunečnicová semena do Argentiny a začali ji pěstovat po celé zemi. Pěstování slunečnice bylo v průběhu 19. a začátku 20. století rozšířeno do celého světa a dnes je to čtvrtá nejvíce pěstovaná olejovina společně se sójou, palmami a řepkou (Gulya, 2004).

3.1.1.4 Pěstované formy slunečnice a použití

Slunečnice se používá především v potravinářském průmyslu na výrobu dieteticky hodnotného, vysoce kvalitního oleje. Pěstuje se také jako krmná plodina a okrasná rostlina. Dalším využitím je výroba barviv a také pro léčebné účely (Gulya, 2004).

Slunečnice se většinou pěstuje kvůli produkci semen na výrobu oleje, ale je také důležitým zdrojem bílkovin (Jocić *et al.*, 2015; Gulya, 2004). V závislosti na způsobu použití konečného produktu byla slunečnice vyšlechtěna do několika forem. Semenné formy, které se dále dělí na olejný a cukrářský typ, dále silážní a okrasné formy (Tichá *et* Vyzínová, 2006).

Semenné formy: olejný typ – nažky jsou středně velké s tenkou slupkou. Semenné formy se dále dělí na tradiční typ, který má vysokým obsah (75–80 %) kyseliny linolové a olejový typ s vysokým obsahem kyseliny olejové, který tvoří až 80 % oleje (Tichá *et* Vyzínová, 2006).

Další semennou formou je **cukrářský typ** – nažky jsou velké se silnou slupkou, semena tohoto typu mají na rozdíl od olejného typu nižší množství oleje, ale obsahují mnohem více sacharidů a bílkovin (Tichá *et* Vyzínová, 2006). Semena se praží se skořápkou nebo bez skořáčky jako potrava pro člověka či krmivo pro ptáky.

Silážní formy slunečnice (pícniny) u nás nemají velký význam, jelikož mají nízkou stravitelnost pro skot, který ji přijímá velice nerad. Proto ji zařazují do směsí s jinými luskovinami a kukuřicí (Tichá *et* Vyzínová, 2006)

Okrasné formy slunečnic jsou pěstované druhy pro ozdobné účely (Jocić *et al.*, 2015; Gulya, 2004). Ty se dělí na typy ornamentální a plnokvěté (Tichá *et* Vyzínová, 2006).

V České republice se nejčastěji pěstují semena olejného typu, které obsahují 30-45 % tuku s poměrně vysokým obsahem dusíkatých látek. Slupka semen je dřevnatá, obsahuje vysoký podíl hrubé vlákniny. Semena obsahují cca 2-3 % minerálních látek, z nich jsou nejvíce zastoupeny P, K, Mg a Ca (Tichá *et* Vyzínová, 2006).

V kontextu udržitelného zemědělství jsou klíčové cíle: řízení trvalé genetické rezistence a minimalizace selektivního tlaku na patogeny.

3.1.2 Rezistence *Helianthus annuus*

Rod *Helianthus* patří do jedné z největších čeledí rostlin a je také jedním z největších rostlinných rodů na Zemi. Genom slunečnice je dlouhý 3,5 miliardy nukleotidů, je o něco delší než lidský genom (Kaya *et al.*, 2012). Rod *Helianthus* zahrnuje asi 49 druhů a nabízí skvělé příležitosti k přenosu cenných genů z planých typů s nejžádanějšími vlastnostmi, jako je odolnost proti chorobám, více semen a snadná sklizeň (Kaya, 2016). Aby bylo možné sekvenovat, sestavit a anotovat slunečnicový genom a lokalizovat geny, které jsou zodpovědné za zemědělsky důležité vlastnosti, se kromě klasických šlechtitelských metod v posledních letech běžně používají nové molekulární techniky, jako je genotypizace a sekvenování (Spring *et al.*, 2019; Kaya, *et al.*, 2012).

V současné době je známo aspoň 22 genů rezistence vůči *P. halstedii* (Pl_1 – Pl_{22} , Pl_{Arg}), které byly charakterizovány z kulturních i planých druhů slunečnic (Trojanová *et al.*, 2017; Gascuel *et al.*, 2015, Spring *et al.*, 2019).

Plasmopara halstedii sensu lato může infikovat všechny druhy *Helianthus*. Rezistentní vůči *P. halstedii* jsou mnohem častěji vytrvalé druhy. První gen rezistence k plísni slunečnicové (Pl_1) byl identifikován v 70. letech 20. století v hybridní slunečnici v Rumunsku. Geny rezistence jsou mnohem snadněji přenášeny z diploidních jednoletých druhů na kulturní slunečnici, ale už se podařilo do genomu slunečnice vložit i geny rezistence z polyploidních trvalých druhů *Helianthus* (Trojanová *et al.*, 2017; Vear, 2016).

Rezistence k *P. halstedii* z planých *Helianthus* je přenášena na populaci jednoletých *H. annuus*, *H. agrophyllus* a *H. praecox* subsp. *hirtus* a trvalých druhů *H. grosseserratus*, *H. maximiliani*, *H. nuttallii*, *H. pauciflorus* Nutt., *H. tuberosus* (Trojanová *et al.* 2017; Seiler, 1992). Jeden z prvních hybridů slunečnice rezistentní k *P. halstedii* byl produktem křížení kulturní slunečnice *H. tuberosus*, což vedlo k objevení Pl_2 (Trojanová *et al.* 2017; Sackston, 1992).

Pl geny zajišťují kvalitativní rezistenci a jsou řízeny geny velkého účinku. Postupně byly detekovány další geny rezistence tzv. *QTL* geny, které zajišťují kvantitativní rezistenci a jsou řízeny polygeny (geny malého účinku). Doposud byly tyto geny získány z planě rostoucích *H. annuus*, *H. praecox*, *H. tuberosus* a *H. agrophyllus* (Qi *et al.*, 2016). Rezistence řízená geny velkého účinku i kvantitativní rezistence jsou hlavní mechanismy rozpoznávané ve slunečnici (Trojanová *et al.*, 2017).

3.1.2.1 Efektory *P. halstedii*

Genom *Plasmopara halstedii* sekvenovali Sharma *et al.* (2015). Bylo odhaleno více než 600 genů kódujících předpokládané efektorové proteiny, které jsou rozhodující pro kompatibilitu nebo inkompatibilitu interakce, tj. patogen investuje asi 4 % do peptidů souvisejících s patogenitou (Cohen *et al.*, 2019). Většina efektorů *P. halstedii* patří mezi RxLR a CRN, u nichž se předpokládá, že působí v hostitelské buňce, ale ještě nejsou funkčně charakterizovány (Cohen *et al.*, 2019). Mezi další faktory patogenity patří kutinázy, pektinázy, a fosfolipázy, které patogenu umožní proniknout do hostitelských pletiv a vytvořit v buňkách parenchymu haustoria (Cohen *et al.*, 2019; Spring *et al.*, 2019).

Další produkty *P. halstedii* narušují metabolismus hostitele (lipázy, proteázy), fyziologické aktivity (cytochrom P450, ABC transportéry) nebo mechanismy rezistence (proteiny indukující elicitin a nekrózy). Je tedy třeba odhalit skutečnou funkci těchto genů v různých fázích interakce hostitele s patogenem a hledat vztah mezi efekty a virulencí (Sharma *et al.*, 2015).

Ještě méně informací je k dispozici o elicitech, což jsou signální molekuly, které spouštějí reakci rezistence hostitele. Elicitory mohou být molekuly s nízkou molekulovou hmotností (např. mastné kyseliny, glukany) nebo molekuly s vysokou molekulovou hmotností (např. proteiny), které pocházejí buď z patogenu nebo ze samotného hostitele (např. buněčné stěny nebo fragmenty membrány po enzymatické penetraci). O elicitoru *P. halstedii* byla publikována jediná studie od Jung *et al.* (2010), charakterizující polypeptid 57 kDa, který indukuje produkci ethylenu ve slunečnici, čímž se iniciuje jeden z nejrychlejších a nejranějších kroků rezistence rostlin. Aby se více osvětlila potenciální role elicitorů ke klasifikaci patogenních ras plísňe slunečnicové jsou zapotřebí další srovnávací studie s definovanými fenotypy virulence (Spring *et al.*, 2019).

3.1.3 Ochrana slunečnice

Ochrana slunečnice proti *P. halstedii* spočívá v pěstování certifikovaného osiva rezistentních hybridů v kombinaci s mořením osiva fungicidy (Trojanová *et al.*, 2017; Kazda *et al.*, 2018; Sedlářová *et al.*, 2020).

První chemická kontrola jak v EU, tak v USA byla založena na systémovém ošetření semen fenylamidem, jako je metalaxyl, používaný od roku 1980 nebo mefenoxam (jeho optický izomer) zavedený o 10 let později. Ovšem už v roce 1995 byly objeveny tolerantní izoláty *P. halstedii*, a to jak v EU, tak v USA (Trojanová *et al.*, 2017). Následně byly testovány různé chemické sloučeniny např. strobilurinový derivát azoxystrobin (FRAC 11), širokospektrální fungicid ze skupiny β – methoxyakrylátů (Askon | Syngenta, 2020)

Nedávný výzkum uvedl novou sloučeninu oxathiapiprolin (Spring *et* Gómez-Zeledón, 2020; Cohen *et al.*, 2019) vysoce účinný proti hemibiotrofním a biotrofním oomycetám, méně proti nekrotrofním oomycetám, jako je *Pythium*. Jeho biologická aktivita byla testována na *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Pseudoperonospora cubensis* (Spring *et* Gómez-Zeledón, 2020; Cohen *et al.*, 2019).

Pro *P. halstedii* jde o první sloučeninu, která účinně zastavuje infekci v časném stádiu, počínaje uvolněním zoospor až po vývoj mycelia a vznik sporangíí. Mechanismus fungicidní aktivity spočívá ve vazbě na protein vázající sterol. Preventivní ošetření v raných stádiích vývoje patogenu (klíčení spor) je účinné v koncentraci ≥ 1 ng/ml, tj. látka je vhodná pro moření semen k ochraně vůči půdním infekcím, synergicky působí v kombinaci s dalšími fungicidy. Účinky byly prokázány na listových discích i na infikovaných mladých rostlinách (Spring *et* Gómez-Zeledón, 2020; Cohen *et al.*, 2019).

3.1.4 *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farlow) Berlese & de Toni (1888), česky vřetenatka slunečnicová, je původce karanténní choroby plísně slunečnicové. Je to obligátní biotrofní parazit (Nishimura, 1922), tj. potřebuje živého hostitele k dokončení svého životního cyklu, patří do třídy Oomycetes, řádu Peronosporales, který napadá jednoleté druhy *Helianthus* a kulturní slunečnici *Helianthus annuus* (Slunečnice roční) (Gascuel *et al.*, 2015). Biologie patogena a mechanismy infekce byly prostudovány již před více než sto lety (Nishimura, 1922; Young *et Morris*, 1927).

Systémově infikované slunečnice nevytváří použitelné nažky, což zemědělcům způsobuje značné ekonomické ztráty. Patogen je přenášen půdou, semeny, větrem, vodou. Kromě toho oospory, vzniklé na konci vegetační sezóny, mohou až na deset let kontaminovat půdu (Sedlářová *et al.*, 2016; Gulya, 2007).

3.1.4.1 Taxonomické zařazení a fylogeneze *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farlow) Berlese *et de Toni* (1888) je obligátní biotrofní parazit, patřící do infraříše Stramenopila, která je součástí eukaryotické superskupiny SAR, oddělení Oomycota, třídy Oomycetes, podtřídy Peronosporomycetidae, řádu Peronosporales, čeledi Peronosporaceae, rodu *Plasmopara*.

Patogen patrně pochází ze Severní Ameriky, kde byl poprvé identifikován v roce 1876 W. S. Halstedem na *Eupatorium purpureum* L. (sadci červeném) (Trojanová *et al.*, 2017; Nimsura, 1922) a pojmenován v roce 1883 W. G. Farlowem jako *Peronospora halstedii* Farl. (Trojanová *et al.*, 2017, Sedlářová *et al.*, 2016, Farlow, 1883). Schröter v roce 1886 oddělil rod *Plasmopara* od *Peronospora* kvůli rozdílům v klíčení, tj. tvorbou zoospor místo apresorií. Následně P. A. Saccard v roce 1888 přenesl taxon do nového rodu *Plasmopara* pod názvem *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese *et de Toni* (Virányi *et Spring*, 2011); který napadá kulturní slunečnici roční (*Helianthus annuus*), jednoleté a trvalé druhy *Helianthus* a řadu dalších zástupců z čeledi Asteraceae (Gascuel *et al.*, 2015; EPPO, 2014).

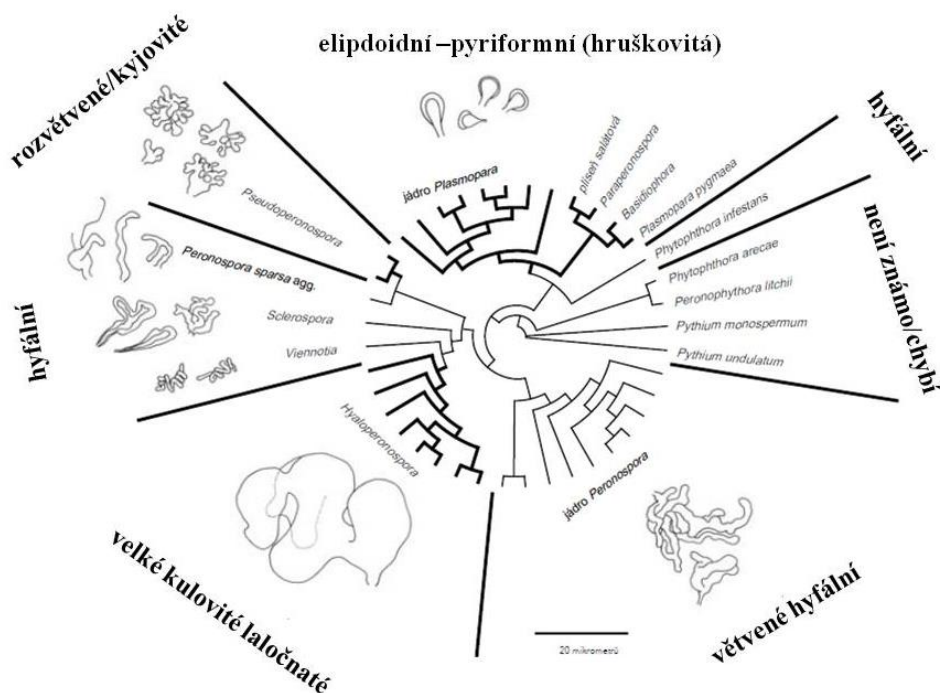
V polovině 20. století se Novotělnova (1966) pokusila o reklasifikaci druhového komplexu a na základě fyziologických a morfologických odlišností *Plasmopary* ze Severní Ameriky a Evropy (Novotělnova, 1962, 1964, 1966). Zavedla nový název *Plasmopara helianthi* Novot. pro izoláty infikující pouze slunečnici, dokonce rozlišovala

tři intragenetické taxony jako „formae speciales:“ *f. helianthi* (napadající pouze *Helianthus annuus*), *f. perennis*, *f. patens* (infikující trvalé druhy), na základě drobných rozdílných morfologických znaků na sporangiích a sporangioforech mezi jednotlivými izoláty. Tento koncept však nebyl odbornou veřejností všeobecně přijat (nebyla dodržena pravidla mezinárodního kodexu botanické nomenklatury (Gulya *et al.*, 1997), tudíž název *Plasmopara helianthi* Novotel'nova zůstal platný pouze pro region Krasnodar v Rusku (EPPO, 2014; Virányi *et Spring*, 2011; Sackston, 1981).

O padesát let později při studiu *P. halstedii* a *P. helianthi* Novotel'novy, molekulární a genetické studie zásadně ovlivnily chápání fylogeneze Oomycetes a změnily klasifikaci na všech taxonomických úrovních (Virányi *et Spring*, 2011). Na základě fylogenetických studií byly vyhledány a vyhodnoceny nové fenotypové znaky (Spring *et Thines*, 2004), další studie vedly k revizi a reklasifikaci druhů *Plasmopara*, což vedlo k oddělení nově zavedených rodů, jako jsou *Novotel'nova*, *Protobremia* nebo *Plasmoverna* (Virányi *et Spring*, 2011). Klasifikace založená na pozorování morfologických znaků (sporangia, sporangiofory, haustoria, ...) s použitím světelné mikroskopie obvykle spolehlivě rozlišuje organismy na úrovni rodu, avšak není vhodná k popisu nových druhů (Thines, 2007).

Současná data naznačují, že *P. halstedii* patří do skupiny výlučně biotrofních fytopatogenních plísní s hruškovitými (pyriformními) haustorii (Obrázek 1) parazitujících na *Angiospermae* (Drábková Trojanová, 2017). Biotrofické patogeny můžeme rozdělit alespoň do čtyř morfologických a ekologických podskupin na základě sekvencí LSU, COX 2, β – tubulinu a NADH 1 (Gascuel *et al.*, 2015). Pravděpodobně tři skupiny jsou monofyletické: plísně s barevnými sporangii (rod *Peronospora* a *Pseudoperonospora*), plísně s vezikulárními až hruškovitými haustorii – rod *Plasmopara* (a také *Basidiophora*, *Bremia*, *Benua*, *Paraperonospora*, *Plasmoverna* a *Protobremia*) a *Brassicaceae* (*Hyaloperonospora* a *Perofascia*). Monofyletické vztahy ve čtvrté skupině, včetně parazitů trav *Viennotia oplismeni*, *Graminivora graminicola* a *Sclerospora graminicola*, nebyly jasně prokázány (Drábková Trojanová, 2017)

V poslední době, byl rod *Plasmopara* označen jako polyphyletický a rozdělen do šesti skupin: *Plasmopara*, *Novotel'nova* (*Pl. savulescui*), *Plasmoverna* (*Pl. pygmaea* s.l.), *Poakatesthia* (*Pl. penniseti*), *Protobremia* (*Pl. sphaerosperma*), and *Viennotia* (*Pl. oplismeni*) (Voglmayr *et Constantinescu*, 2008). V současné době zahrnuje rod *Plasmopara* alespoň 109 druhů a spolu s rodem *Peronospora* představuje globálně nejhojnější Oomycetes (Drábková Trojanová, 2017; Lebeda *et al.*, 2006).



Obrázek 1: Zjednodušený fylogenetický strom podle Goker *et al.* (2003) ve kterém jsou u jednotlivých rodů peronospor uvedeny různé typy haustorií. Pro přehlednost bylo z původního schématu několik taxonů rodu *Peronospora*. Na obrázku tučně vyznačeny větve, u kterých se předpokládá amfoterní typ haustorií. Za pleimorfnní znak (protože jsou přítomny u některých druhů rodu *Phytophthora*) jsou interpretovány hyfální haustoria. Přestože u rodu *Pseudoperonospora* jsou haustoria v podstatě hyfální (Fraymouth 1956), jsou diferencována díky charakteristicky kyjovitému rozvětvenému tvaru. Kromě rodu z Pl. umbelliferarum) mají všechny kresby haustorií stejné měřítko. Všechny kresby jsou originální, jen haustoria rodu *Viennotia* jsou překreslena z Göker *et al.* (2003) (převzato z Voglmayer *et al.*, 2004).

3.1.4.2 Koncepce druhů a hostitelský okruh *P. halstedii*

Druhá koncepce *P. halstedii* se od prvního popisu výrazně vyvíjela (Trojanová *et al.* 2017; Farlow, 1883), ale stále neexistuje zcela jasný a obecně uznávaný koncept (Trojanová *et al.*, 2017; Virányi *et Spring*, 2011). Pro vědecké účely byly zavedeny zjednodušené koncepty *P. halstedii* - *sensu lato* a *sensu stricto* (Trojanová *et al.*, 2017; Voglmayer, 2008).

P. halstedii Sensu lato (Tabulka 2) (Choi *et al.*, 2009) představuje dobře morfologicky charakterizovaný organismus schopný infikovat více než 80 druhů z čeledi Asteraceae (Trojanová *et al.*, 2017; Gulya *et al.*, 1997).

Jelikož byl patogen určen na základě morfologických znaků, není vždy v souladu s Kochovými postuláty. Není tedy jisté, že tyto infekce způsobuje právě *P. halstedii* (Trojanová *et al.*, 2017). To je možné doložit názorným příkladem. *Xanthium strumarium* byl nejprve považován za hostitele *P. halstedii* (Novotelova, 1962), ale patogen byl později popsán jako *Plasmopara angustiterminalis* (Novotelova, 1962 ; Komjáti *et al.*, 2007). Podobná situace nastala u *Arctotis hybrida* × *Arctotheca calendula*. Ukázalo se, že jsou hostitelem nového druhu *Plasmopara majewski* (Constantinescu *et Thines*, 2010), nikoliv *Plasmopara halstedii* (Trojanová *et al.*, 2017).

Tabulka 2: Jeden z prvních seznamů *P. halstedii* hostitelské koncepce **sensu lato** v Severní Americe (převzato z Drábková Trojanová, 2017 původně publikoval Wilson, 1908)

Rod	Druh	Rod	Druh
<i>Ageratina</i>	<i>altissima</i>	<i>Helianthus</i>	<i>maximiliani</i>
<i>Ambrosia</i>	<i>artemisiifolia</i>		<i>occidentalis</i>
<i>Artemisia</i>	<i>ludoviciana</i>		<i>strumosus</i>
<i>Bidens</i>	<i>cernua</i>		<i>tuberosus</i>
	<i>comosa</i>	<i>Iva</i>	<i>xanthiifolia</i>
	<i>connata</i>	<i>Madia</i>	<i>sativa</i>
	<i>frondosa</i>	<i>Rudbeckia</i>	<i>fulgida</i>
	<i>laevis</i>		<i>laciniata</i>
<i>Centaurea</i>	<i>sp.</i>		<i>triloba</i>
<i>Erechtites</i>	<i>hieraciifolia</i>	<i>Silphium</i>	<i>Laciniatum</i>
<i>Erigeron</i>	<i>annuus</i>		<i>perfoliatum</i>
<i>Eupatorium</i>	<i>purpureum</i>		<i>terebinthaceum</i>
<i>Gnaphalium</i>	<i>purpureum</i>		<i>trifoliatum</i>
	<i>spathulatum</i>	<i>Solidago</i>	<i>canadensis</i>
<i>Helianthus</i>	<i>annuus</i>		<i>riddellii</i>
	<i>divaricatus</i>	<i>Vernonia</i>	<i>baldwinii</i>
	× <i>doronicoides</i>		<i>noveboracensis</i>
	<i>grosseserratus</i>	<i>Verbesina</i>	<i>encelioides</i>
	<i>hirsutus</i>	<i>Xanthium</i>	<i>strumarium</i>
	× <i>laetiflorus</i>		

Koncepce *P. halstedii* **Sensu stricto** (Tabulka 3) je založena na molekulárních studiích, které odhalily, že izoláty *Plasmopara* z *Ambrosia artemisiifolia* jsou zcela odlišné od izolátů pocházejících z *H. annuus* nebo *X. strumarium* (Choi *et al.*, 2009a; Trojanová *et al.*, 2017).

Tabulka 3: Navrhovaný koncept **sensu stricto** a jeho spektrum hostitelů *P. halstedii* (převzato z Drábková Trojanová 2017, původně publikoval Wilson, 1908)

hostitel prokázán inokulací	planě rostoucí hostitel potvrzen křížovou inokulací	hostitel nepotvrzen
<i>H. agrophyllus</i>	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (Walcz <i>et al.</i> , 2000)	<i>Ageratum houstonianum</i> (Mattos <i>et al.</i> , 2006)
<i>H. annuus</i>	<i>Artemisia vulgaris</i> (Walcz <i>et al.</i> , 2000)	<i>Ceratopsis lanceolata</i> (Choi <i>et al.</i> , 2009)
<i>H. debilis</i>	<i>H. × laetiflorus</i> (Spring <i>et al.</i> , 2003)	
<i>H. divaricatus</i>	<i>Iva xanthiifolia</i> (Gulya, 2002)	
<i>H. grosserratus</i>	<i>Rudbeckia fulgida</i> (Rivera <i>et al.</i> , 2016)	
<i>H. lenticularis</i>	<i>Xanthium strumarium</i> * (Komjáti <i>et al.</i> , 2007)	
<i>H. petiolaris</i> **		
<i>H. × multiflorus</i>		
<i>H. tuberosus</i>		

* Plíseň reklasifikována podle molekulárně genetické analýzy jako *P. angustiterminalis* Novot.

** Walcz *et al.*, 2000

Je tedy zřejmé, že hostitelský okruh *P. halstedii* může být chápán různými způsoby podle koncepce *P. halstedii sensu lato* nebo **sensu stricto** (např. *Pseudoperonospora cubensis* / *Pseudoperonospora humuli*), což může významně zkomplikovat výskyt křížových infekcí, hostitelských skoků a případné hybridizace kryptických druhů. (Drábková Trojanová, 2017).

Spring *et al.* (2019) nedávno uvedli, že *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese *et de Toni* je vysoce specifickým patogenem *H. annuus*. Na rozdíl od dříve uvedených

informací v literatuře, patogen slunečnice neovlivňuje širokou škálu druhů Asteraceae. Nedávné fylogenetické studie revidovaly koncepci širokého druhu a rozdělily *P. halstedii sensu lato* na několik charakteristických taxonů s úzkým spektrem hostitelů (Spring *et al.*, 2019; Virányi *et Spring*, 2011).

V americké sbírce národních hub (BPI) byly zaznamenány vzorky 11 planých druhů rodu *Helianthus*, které jsou náchylné k plísni, přestože infekce u volně žijících populací byly dokumentovány jen zřídka (Spring *et al.*, 2019; Novotelnova, 1966).

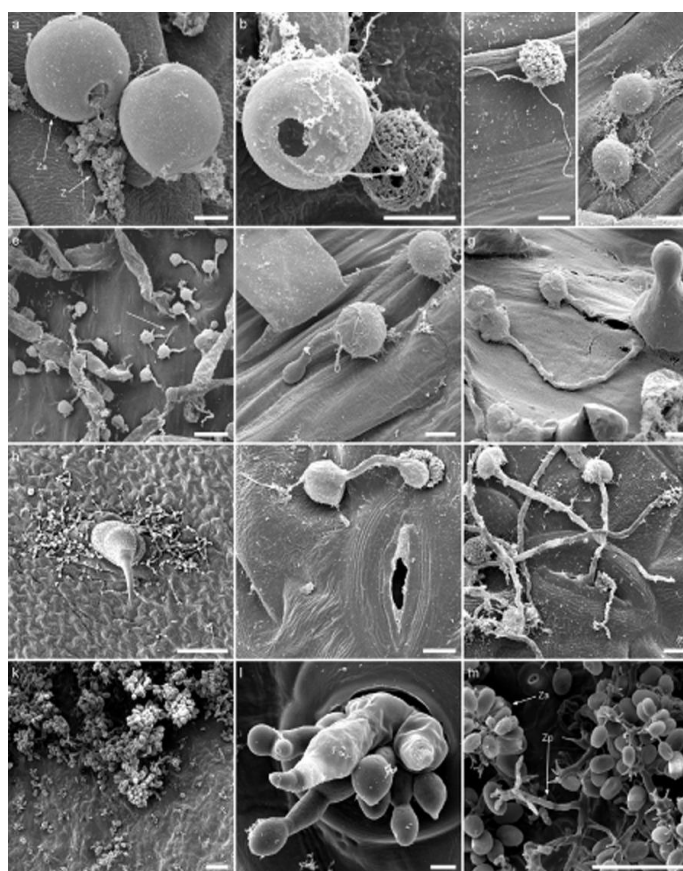
3.1.4.3 Biologie *P. halstedii*

Obligátní biotrofní parazit *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. *et de Toni* (1888) (*Chromista, Oomycetes, Peronosporaceae*) způsobuje závažnou nemoc plíseň slunečnice (Sedlářová *et al.*, 2016). Patogen není možné kultivovat nezávisle na jeho hostiteli, k dokončení svého životního cyklu vyžaduje živé pletiva hostitele.

U třídy Oomycetes byly popsány dva typy pohlavní reprodukce, homothalický a heterothalický. **Homothalický organismus** je schopný sexuální reprodukce v rámci stejného mycelia, ze kterého vyrůstají samčí (antheridia) i samičí (oogonia) pohlavní buňky, splynutím obou jader vznikne oospora. **Heterothalický organismus** je sexuálního rozmnožování schopný pouze při styku pohlavních buněk z fyziologicky odlišných mycelií (Gascuel *et al.*, 2015).

Plasmopara halstedii je diploidní, homothalický parazit, patřící do skupiny vláknitých organismů fylogeneticky příbuzných s heterokontními řasami (na základě ultrastruktury bičíků), jehož životní cyklus (Obrázek) se skládá z jediné sexuální generace na konci vegetačního období a jedné nebo dvou nepohlavních generací v průběhu vegetačního období (Sakr, 2012; Spring *et Zipper*, 2006). Pravděpodobně vytváří nové rekombinanty. Křížové infekce *P. halstedii* mezi různými hostiteli mohou poskytnout další zdroje inokula nebo působit jako genofond pro nové patogenní rasy. (Komjáti *et al.*, 2007). Genetická variabilita *P. halstedii* tedy může být zvýšena křížením nebo parasexuální rekombinací (Drábková Trojanová; 2017). Bylo prokázáno, že homothalická sexuální reprodukce nastává po inokulaci semenáčku slunečnice jedinou zoosporou (Gascuel *et al.*, 2015). *P. halstedii* byl popsán jako vysoce soběstačný druh a v přirozených populacích byla pozorována vysoká míra homozygotnosti (Gascuel *et al.*, 2016).

Průnik infekce do hostitelské rostliny je zprostředkován pohyblivými dvoubičíkatými zoosporami, které klíčí ze zoosporangií (ve vlhkých a chladných podmínkách cca 10-15 ° C) (Drábková Trojanová, 2017; Virányi *et Spring*, 2011). Disperze patogenu v populaci hostitelů je zprostředkována asexuálně vytvořenými zoosporangii (Drábková Trojanová, 2017). Nepříznivé období přečkává ve formě tlustostěnných oospor, které vznikly sexuální reprodukcí, které jsou v půdě schopny přežít 8-10 let, tím je tedy zajištěno přežití patogenu do dalšího vegetačního období (Drábková Trojanová, 2017; Gascuel *et al.*, 2015).



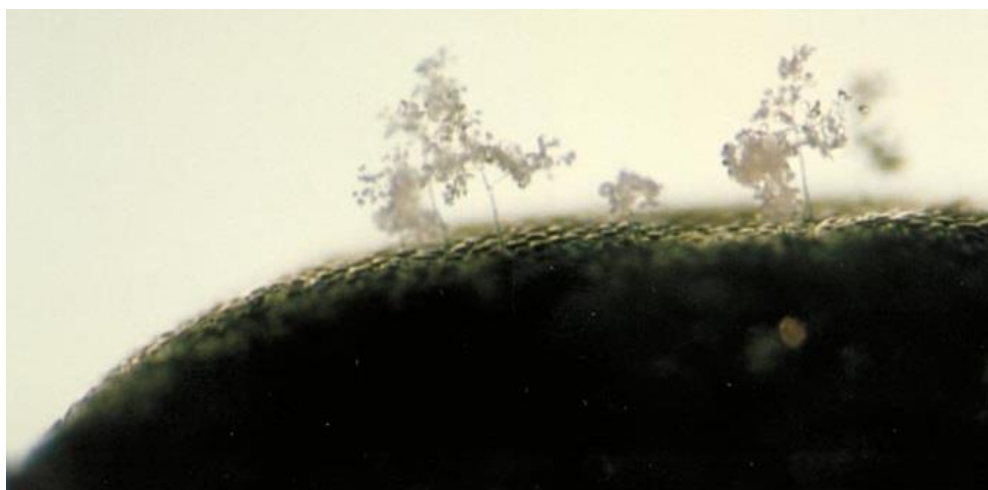
Obrázek 2: elektronová mikroskopie (SEM) Plasmody. Obrázky znázorňují klíčové kroky životního cyklu Plasmody halstedii. (A – D) Uvolnění a encystmentace zoospor ze zoosporangie (A) Zoospory (Z) uvolněné ze zoosporangia. (B) zoospora na pravé straně zoosporangia ukazuje hrudkovitý povrch, používá dva bičíky k pohybu k rostlinným tkáním (C). (D) Encystmentace spory, ztratí svůj bičík a má hladký povrch. Měřítko: (A – D) 5 µm. Klíčivost spory do kořenů (E – G) a listů (H – J) (E) Klíčení spor v kořenovém vlášení. Bílá šipka označuje průnik zárodečné trubice přímo přes epidermis bez tvorby appressoria. (F) Spora se zárodečnou trubicí tvořící appressorium. (G) Spora pronikající do kořenového vlášení bez appressoria. H) Spory klíčící na listech, seskupené kolem trichomů. (I) klíčení spor a tvorba appressoria v blízkosti stomat. (J) Vstup P. halstedii do listů stomatem. Měřítko: 20 µm (E); 5 µm (F, G, I, J), 100 µm (H). (K–M) Struktury šíření P. halstedii. (K) Sporulace na spodní straně deložních lístků. (L) Rozšíření zóny od (K) ukazující zoosporangia opouštějící rostlinu přes průduch (M) (Převzato z Gascuel *et al.*, 2015)

3.1.4.3.1 Životní cyklus *P. halstedii*

Životní cyklus plísně slunečnicové (Obrázek 4) začíná na jaře v půdě primární infekcí semenáčku. Zralá oospora klíčí v jediné primární zoosporangium, ze kterého se uvolňuje variabilní počet dvoubičíkatých haploidních zoospor, které v přítomnosti volné vody cestují půdním prostředím do míst infekce (kořen, hypokotyl). Zoospory pronikají do hostitele přes rhizodermis (v zóně kořenového vlášení) nebo epidermis hypokotylu, zřídka listu (CABI, 2019; Drábková Trojanová, 2017; Virányi, 1988).

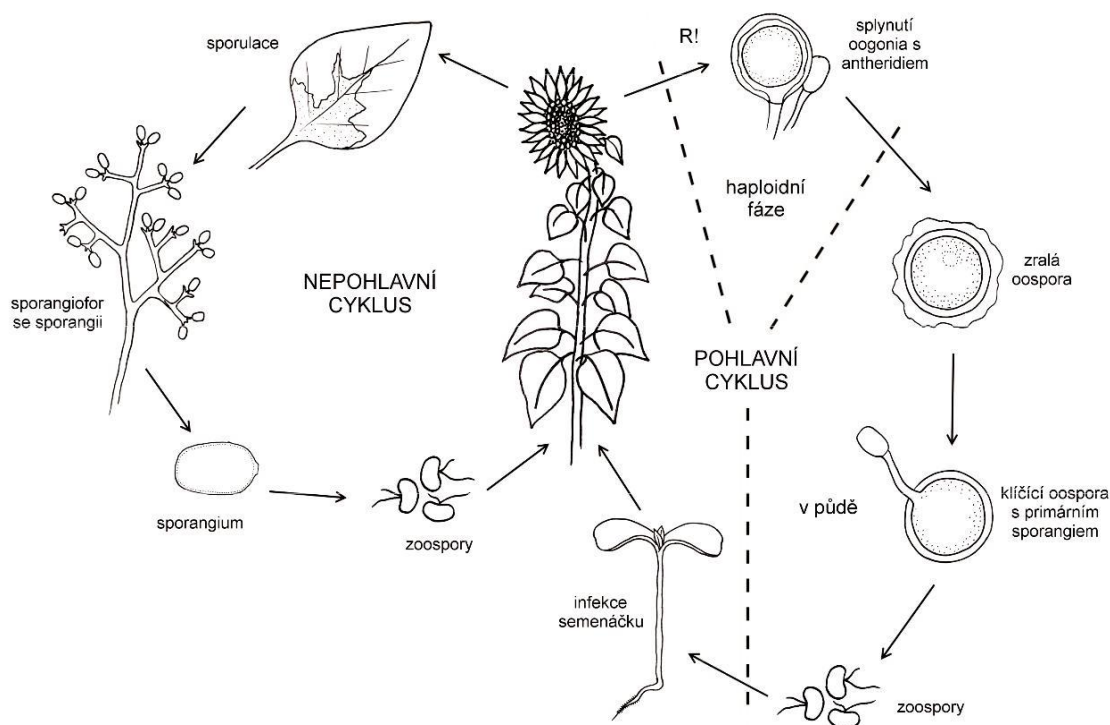
Zoospory v místě infekce encystují a následně klíčí. Po proniknutí patogenu, v případě kompatibilní interakce, roste coenocytické hyalinní mycelium, prorůstá mezibuněčnými prostory a vysílá haustoria (ty zajišťují výživu) do buněk hypokotylu, později epikotylu ve stonku. Postupně kolonizuje celou rostlinu, u které způsobuje příznaky systémové infekce (Drábková Trojanová, 2017; Sedlářová *et al.*, 2010; EPPO, 2008).

Po úspěšné kolonizaci za příznivých podmínek prostředí (teplota 10-25 °C + dostatečná vlhkost) dochází k nepohlavní sporulaci (CABI, 2019; Humann, 2016). Hyalinní bočně rozvětvené sporangiofory (Obrázek 3) vyrůstají z průduchů listů hostitele nebo prorůstají epidermis a produkují několik generací sekundárních zoospor, které se šíří větrem, což může vést k epidemii nemoci (CABI, 2019; Drábková Trojanová, 2017).



Obrázek 3: Sporulující list mladé rostliny – sporangiofory se sporangii (převzato z <https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos>)

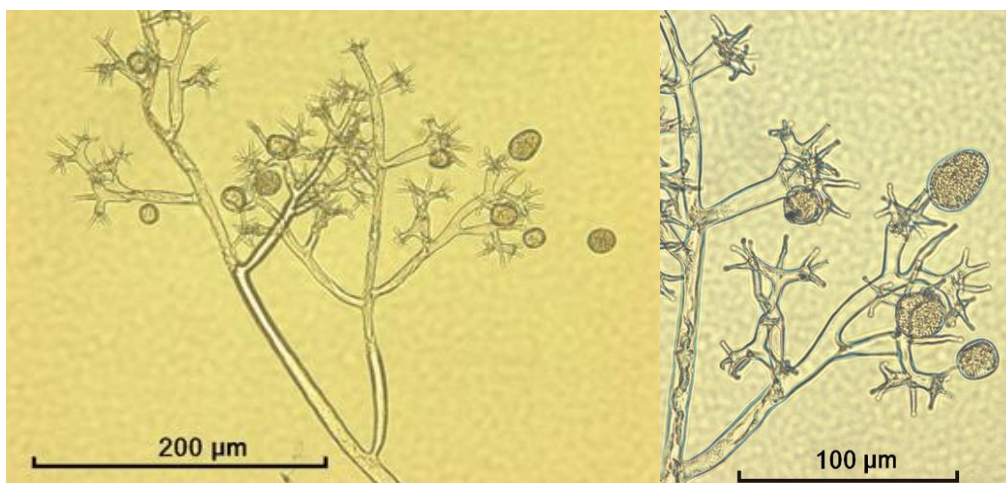
Mitoticky vytvořené zoospory za vlhka vyklíčí ze zoosporangií, penetrují do pletiv hostitele a na povrchu rostlin způsobují sekundární infekce. Na konci vegetačního období probíhá pohlavní rozmnožování – oogametangiogamie, dojde ke splynutí antheridia a oogonia za vzniku diploidní a odolné oospory (Drábková Trojanová, 2017; Gascuel *et al.*, 2015).



Obrázek 4: Životní cyklus *P. halstedii* (převzato z Trojanová 2010, původně překresleno ze Spring, 2001)

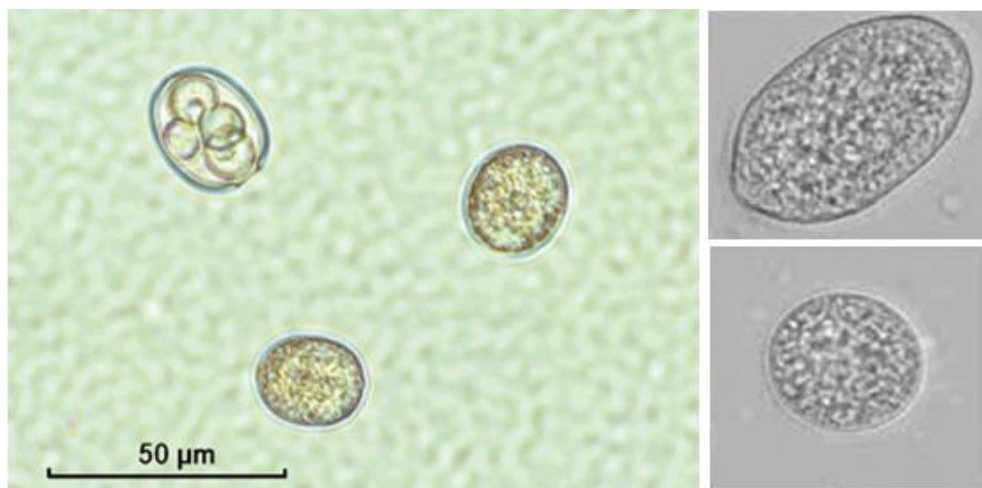
3.1.4.3.2 Morfologie *P. halstedii*

P. halstedii má hyalinní coenocytické (nepřehrádkované) mycelium, které je složeno z intercelulárních aseptátových hyf o průměru 6–20 μm , které prorůstají mezibuněčnými prostory. Do buněk hostitele vysílá malá vezikulární haustoria o průměru 5–10 μm (EPPO, 2008). Za příznivých podmínek z mycelia vyrůstají stromečkovité sporangiofory (Obrázek 5), které jsou štíhlé, monopodiálně větvené, obvykle zakončené třemi sterigmaty (CABI, 2019).



Obrázek 5: Sporangiofory se zoosporangii (převzato z EPPO, 2014)

Nepohlavní zoosporangia (Obrázek 6) vznikají na sporangioforech (Obrázek 5), jsou vejčitá až elipsoidní ($11\text{--}20\ \mu\text{m} \times 8\text{--}30\ \mu\text{m}$) (EPPO, 2014), nasedají na sporangiofory stigmaty, jsou zakončeny apikální papilou. Prorůstají průduchy a tvoří diploidní pohyblivé zoospory, které se šíří větrem. Velikost sporangií i počet dvoubičíkatých zoospor uvolňovaných z právě jednoho sporangia, je variabilní (EPPO, 2014).



Obrázek 6: Sporangium *P. halstedii* a tvorba zoospor (EPPO, 2014, 2008).

V rostlině vznikají pohlavní orgány. Antheridia, tedy samčí pohlavní orgány, mají kyjovitý tvar ($12\text{--}30\ \mu\text{m}$) (EPPO, 2014) a tvoří se na vzdálenějších větvích hyf. Samičí pohlavní orgány jsou kulovitá bezbarvá oogonia ($30\text{--}40\ \mu\text{m}$) (EPPO, 2014), ke kterým jsou hormonálně přitahována antheridia, osahují po jedné oosféře (CABI, 2019).

Splynutím antheridia a oogonia vzniká diploidní zygota – oospora. Tento proces se nazývá oogametangiogamie. Oospory se tvoří ve všech vegetativních orgánech hostitele,

zejména v kořenech a listech, těsně pod epidermis. Mají kulovitý tvar (23-30 μm , tloušťka 3 μm) (EPPO, 2014) a jsou žlutohnědé se zvrásněnou strukturou. Jsou tlustostěnné a odolné, na začátku vegetačního období vyklíčí v zoosporangium (CABI, 2019).

3.1.4.4 Symptomy, šíření a epidemiologie *P. halstedii*

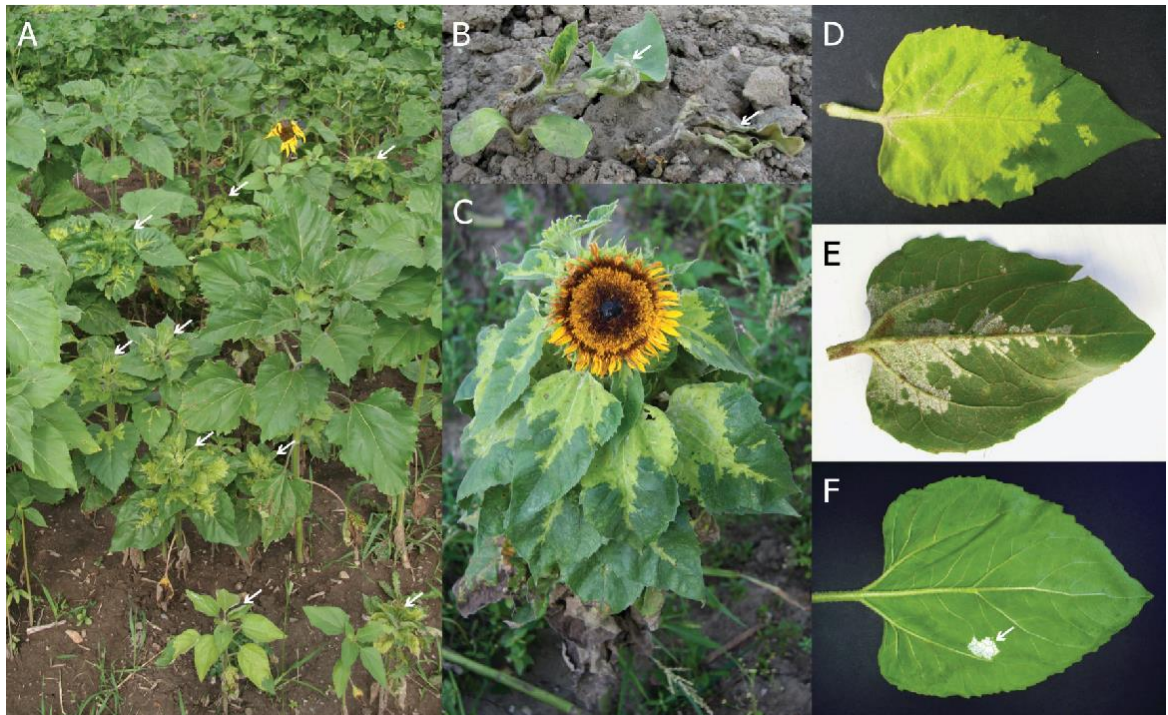
V závislosti na typu infekce, vývojovém stádiu rostliny, koncentraci inokula a na podmínkách prostředí vyvolává *P. halstedii* infikované slunečnice řadu symptomů (Drábková Trojanová, 2017; Sedlářová *et al.*, 2020). Primární infekce způsobná oosporami v půdě vede nejčastěji k systémové infekci. Primární infekce semenáčků mladých rostlin způsobuje padání klíčících rostlin nebo může vyvolat produkci bílých povlaků sporangioforů se zoosporami na děložních lístcích (Obrázek 7).



Obrázek 7: Sporulace *P. halstedii* na povrchu uměle naočkovaných děložních lístů (převzato z <https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos>)

Pokud mladé rostlinky přežijí, rozvíjí se u nich systémová infekce, která postihuje celou hostitelskou rostlinu (Obrázek 8). Napadené rostliny bývají zakrslé v důsledku zkrácených internodií. Listy bývají různě zdeformované. Mladé listy silně postižených rostlin vykazují světle zelené až chlorotické skvrny na svrchní straně listů, které se šíří podél hlavní žilnatiny. Za příznivých klimatických podmínek se na spodní straně listů vytváří bílé povlaky sporangioforů se zoosporami. Pokud systémově infikované slunečnice dosáhnou zralosti, tvoří deformované květy směřující vzhůru s malým počtem semen, ale většinou nekvetou. Nažky jsou ve většině případů sterilní a obsahují mycelium, které je zdrojem další případné infekce. Kořenový systém nemocných

slunečnic je nerozvinutý s výrazně redukovanou tvorbou sekundárních kořenů a tmavě hnědým vzhledem na jejich povrchu. Tvorba vegetativních a generativních orgánů rostlin je drasticky snížena (EPPO, 2014; Spring *et al.*, 1991).



Obrázek 8: Příznaky systémová infekce *H. annuus*.

A - zakrslost, nejvýznamnější příznak systémové infekce plísní, je patrný na rostlinách již v raném stádiu silná , B - silná primární infekce mladé rostliny – vede ke smrti rostliny, C – květní úbor, ve kterém se vyvíjí prázdné nebo plísní infikované nažkyd (způsobují latentní infekci), deformace a chlorotizace listů, zkrácená internodia, D – chloróza na adaxiální straně listu, E – sporulace na abaxiální straně listu, F – sekundární infekce – žilnatinou ohraničené lokální léze (převzato z Sedlářová *et al.*, 2013).

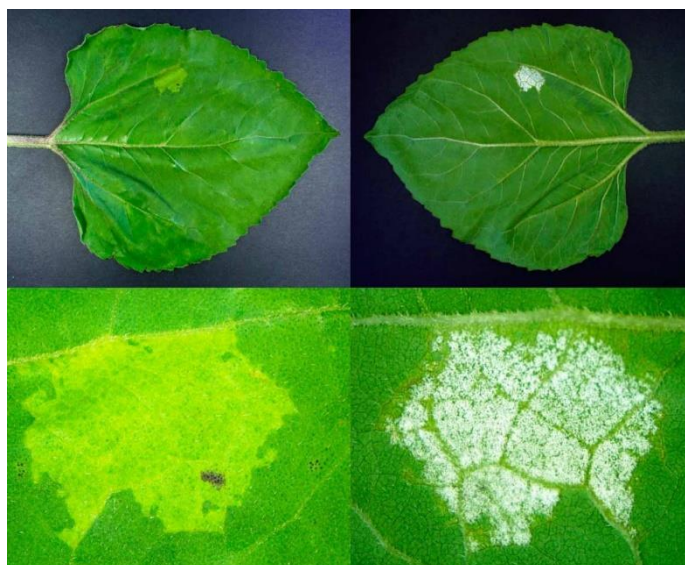
Průběh slabé primární infekce může být někdy omezen pouze na děložní lístky nebo je situován na podzemní orgány. Latentní infekce jsou bez jasných symptomů, pouze se objevuje sporulace na hypokotylu (Obrázek 9) a děložních listech (Drábková Trojanová, 2017; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). I tak je patogen způsobilý dokončit životní cyklus. (EPPO,2014)

Větrou rozšířená zoosporangia vzniklá nepohlavní reprodukcí v průběhu vegetační sezóny způsobují sekundární infekce, které jsou obvykle lokalizované v nadzemních částech rostlin. Tyto lokální infekce tvoří uzavřené chlorotické léze na listech (Obrázek 10).

Za podmínek vysoké relativní vlhkosti dochází na spodním povrchu listů ke sporulaci, která může zůstat lokální (Drábková Trojanová, 2017; Heller *et al.*, 1997) nebo se vyvíjí do systémové infekce na květenství (Drábková Trojanová, 2017; Spring, 2009). Po dlouhou dobu bylo ignorováno, že tyto lokální infekce mohou vést k systémové infekci. V minulých letech se v některých slunečnicových polích hojně vyskytovala lokální až systémová infekce kvůli příznivým povětrnostním podmínkám, což způsobilo neobvykle vysoký tlak infekce (CABI, 2019).



Obrázek 9: Projev latentní infekce - sporulace na hypocotylu (převzato z www.eppo.int/taxon/PLASHA/photos)



Obrázek 10: Lokální léze na listech *H. annuus* (převzato z Sedlářová *et al.*, 2020)

K přenosu vřetenatky slunečnicové dochází větrem nebo vodou (v obou případech zoosporangia působí jako sekundární inokulum). Větre přenášené infekce jsou významné pro epidemiologii. Šíření prostřednictvím kontaminovaného osiva (mycelium patogenu přežívá pod osemením, semena vytvořená u slabě napadených rostlin) je spíše vzácné a má za následek velmi nízké procento systémově infikovaných rostlin. Většinou dochází k infekci prostřednictvím oospor, které v půdě mohou přežít až 10 let (Drábková Trojanová, 2017).

Kořenové infekce mladých slunečnic jsou zodpovědné za většinu závažných projevů, a proto silně ovlivňují výnos semen. Teplota vzduchu má zřetelný vliv na výskyt onemocnění, nejvýhodnější jsou průměrné teploty vzduchu mezi 10 a 15 °C během prvních 5 dnů po vysetí (Virányi *et* Spring, 2011), ale patogen může napadnout rostliny až do stádia čtyř listů (2-3 týdny po vysetí) (Zimmer, 1971, 1975). *Plasmopara halstedii* produkuje pohyblivé zoospory, které uvolňuje buď z oosféry sporangií (na jaře), nebo z asexuálních sporangií (od jara do léta), může infikovat i mladé slunečnice (Cohen *et* Sackston, 1973; Nishimura, 1922) Vzhledem k tomu, že zoospory vyžadují přítomnost volné vody k dosažení kořenů hostitele, riziko onemocnění stoupá s výskytem srážek krátce po vysetí (Drábková Trojanová, 2017; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008). Nejvíce náchylné stádium vývoje hostitele je mezi klíčením a vzejitím sazenice (Drábková Trojanová, 2017; Meliala *et al.*, 2000), kdy je celý povrch kořenů v kontaktu s půdním inokulem v podobě zoospor.

Každá systémová infekce (primární, se vyvinula z lokální infekce nebo latentní infekce), při které rostlina dosáhne květenství, může produkovat semena obsahující mycelium nebo oospory *P. halstedii*. (Drábková Trojanová, 2017; Spring, 2001). Osivo systémově infikovaných slunečnic jen velice zřídka (2 %) produkuje systémově infikované potomstvo, nicméně způsobují latentní infekci. Kontaminované nažky, které obsahují mycelium patogenu, mohou přepravit patogen na dlouhé vzdálenosti. S největší pravděpodobností jsou zodpovědné za šíření infekce z jednoho kontinentu na druhý (Drábková Trojanová, 2017; Virányi, 2002).

Každý typ kompatibilní interakce teoreticky umožňuje patogenu dokončit svůj životní cyklus sexuální reprodukci. Proto i jediná infikovaná rostlina, která přežije až do konce vegetačního období, představuje potenciální zdroj vysoce odolného inokula, které by mohlo způsobit kolonizaci patogenu na novém místě. Oospory jsou schopny přežít v půdě velice dlouho, cca 8-10 let (CABI, 2019; Drábková Trojanová, 2017).

K lokálnímu přenosu choroby dochází hlavně oosporami v půdě, například při zpracování půdy, nebo větrem šířenými sporangii (Drábková Trojanová, 2017; Virányi *et Spring*, 2011). Avšak rozsah sekundárních infekcí je velice závislý na příznivých (vlhko a chladno) povětrnostních podmínkách (Virányi *et Spring*, 2011). Kromě toho, vzdušné inokulum umožňuje hybridizaci různých ras *P. halstedii*, které koexistují v jedné oblasti (různé patotypy a inokula) Proto je plíseň slunečnice velmi obtížné vymýtit, jakmile se objeví v dané lokalitě (Drábková Trojanová, 2017; CABI, 2019).

3.1.4.5 Vývoj nomenklatury a klasifikace ras

První diferenciací populací plísně slunečnicové začala v 70. letech 20. století, kdy byla izoláty *P. halstedii*. překonána rezistence (Pl_1) v rumunské hybridní linii RHA-266 (gen rezistence z planě rostoucí *H. annuus*) V té době byly známy pouze dvě patogenní rasy *P. halstedii* (Drábková Trojanová *et al.*, 2018; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000), jejichž klasifikace spočívala ve schopnosti infikovat linii slunečnice s genem rezistence Pl_1 (Spring, 2019). Rasa 1 (100) nazývaná jako „Evropská rasa“ a rasa 2 (300) nazývaná „Red River Valley rasa,“ která byla přítomna v severo-centrální části USA a v Kanadě (Trojanová *et al.*, 2017, Sackston *et al.*, 1990, Gulya, 2007; Gulya *et al.*, 1991). Od té doby byly postupně identifikovány další geny rezistence, což umožnilo další diferenciaci v patogenní populaci *P. halstedii* (Spring, 2019). Tento systém, definující patogeny podle jejich kompatibility s různě rezistentními slunečnicovými liniemi, byl v USA rozšířen na 11 ras, ale bohužel paralelně ve Francii pomocí různých hostitelských linií byl zaveden další anotační systém (francouzské rasy A-D) (Spring *et al.*, 2019; Trojanová *et al.*, 2017).

Nastal problém s klasifikací, až do 90. let nebyla k dispozici jednotná rasová nomenklatura ani standardizovaná sada diferenciacních linií (Gulya, 2007), proto bylo problematické porovnat výsledky (Spring, 2019; Trojanová *et al.*, 2017).

Teprve Gulya (1995) navrhl jednotný klasifikační systém infekce na definovaném souboru hostitelských genotypů (Spring, 2019; Trojanová *et al.*, 2017).

V roce 1988 byl navržen a schválen fytopatologů na mezinárodní úrovni první oficiální diferenciacní soubor devíti genotypů slunečnice (D1-D9), včetně hodnocení jejich reakce po inokulaci patogenu a tripletového kódovacího systému (pro fenotyp virulence *P. halstedii*) (Trojanová *et al.*, 2017).

Diferenciační linie byly vytvořeny USDA (United States Department of Agriculture, USA) INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) a IFVC (Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, Serbia) (Sedlářová *et al.*, 2016).

Jednotlivé rasy (patotypy) byly určeny na základě fenotypové odezvy diferenciačních linií (DLS) s přesně definovanými *Pl* geny, které byly upořádány do tripletů (testovací sada I-III) po třech genotypech. Výsledkem byl tříciferný kód (Spring, 2019; Trojanová *et al.*, 2017). Hodnocení patotestu probíhá ve dvou fázích vývoje rostliny – sporulace na děložních listech a pravých listech (kombinované hodnocení) (Trojanová *et al.*, 2017). Pokud je DL rezistentní, uvádí se hodnota 0, v opačném případě je hodnota dána polohou v tripletu (Trojanová *et al.*, 2017). Výsledný trojciferný kód pro tzv. patotyp (fenotyp virulence *P. halstedii*) je v rozsahu hodnoty virulence 100 (infekce v první diferenciační linii v prvním tripletu) až po hodnotu 777 (infekce na všech třech diferenciačních liniích ve třetí sadě) (Spring, 2019).

V době, kdy byl tento systém zaveden, bylo klasifikováno přibližně 10 až 15 patotypů, ale jejich počet se rychle zvyšoval a systém dosáhl svých limitů. Doposud bylo na celém světě zaznamenáno celkem více než 46 ras *P. halstedii* (Sedlářová *et al.*, 2020; Spring, 2019; Drábková Trojanová, 2017). Odrazem trvalých změn ve virulenci patogenu byly změny v diferenciační sadě slunečnice (Sedlářová *et al.*, 2016).

Trojciferný kód představuje kódovaný virulenční vzorec (CVS), který poskytuje informaci o virulenci dané rasy, navíc jej lze rozšířit přidáním dalších linií, a to bez ztráty informací v původním CVS (Trojanová *et al.*, 2017). S rostoucí variabilitou ras, které překonaly všechny geny rezistence, musela být tato metoda opět upravena a rozšířena. V roce 2012 byla pokusně přijatá sada složená z patnácti diferenciačních linií slunečnice seskupených do pěti tripletů. Rasy *P. halstedii* jsou označeny pětímístným číselným kódem (Drábková Trojanová *et al.*, 2018; Sedlářová *et al.*, 2016; Gascuel *et al.*, 2015). Od roku 2014 probíhá fenotypové hodnocení na 15 DSL i v ČR (Sedlářová *et al.*, 2020).

3.1.5 Globální distribuce a patogenní variabilita *P. halstedii*

První výskyt *P. halstedii* na pěstované slunečnici byl hlášen ve 20. letech 20. století v USA. Patogenní variabilita byla poprvé navržena ve 40. letech 20. století, ale až v 60. letech byla pozorována v terénu (Spring *et al.*, 2019, Drábková Trojanová, 2017).

První záznam v Evropě pochází z 60. let 20. století z Ruska, kam byl pravděpodobně zaveden prostřednictvím infikovaných slunečnicových semen. (Drábková Trojanová, 2017) Odtud se infekce rozšířila na Balkánský poloostrov (Bulharsko, Řecko, Turecko), následně do mnoha dalších zemí (Maďarsko, Itálie, Francie, Španělsko, Německo, Československo) (Sedlářová *et al.*, 2013; Virányi, 2002). Dnes je rozšířená v 52 zemích po celém světě. *P. halstedii* byla v roce 1992 podle nařízení Evropské unie zařazena do seznamu karanténních chorob (Gascuel *et al.*, 2015)

Intraspecifická patogenní variabilita *P. halstedii* je známá od 70. let 20. století., kdy Zimmer (1974) popsal slunečnicové linie odolné vůči izolátům pocházejících z Evropy, ale náchylné k izolátům pocházejících ze Severní Ameriky (Drábková Trojanová, 2017). Do roku 1980 byly znány pouze dvě patogenní rasy, tj. Evropská rasa (1, 100) a Red River Valley (rasa 2, 300) (Spring, 2019; Drábková Trojanová *et al.*, 2018; Drábková Trojanová, 2017; Trojanová *et al.*, 2017; Gulya *et al.*, 1991). V roce 1980 byla z Brant v Severní Dakotě hlášena nová rasa schopná infikovat slunečnicovou linii s genem rezistence PI2, do té doby rezistentní k rase Red River Valley (Carson, 1981), která byla později popsána jako rasa 3 (700) Drábková Trojanová, 2017). Později Gulya *et al.* (1985) detekovali rasu 4 (730) v Minnesotě a Ljubich *et al.* (1988) popsali rasu 5 (770) ze skleníkových experimentů ve Fargo v Severní Dakotě. Následně byly v Severní Americe, Argentíně, Bulharsku, Maďarsku a Francii nalezeny nové rasy se složitější virulencí (6 a 7, odpovídajících 310 a 330) (Trojanová *et al.*, 2017; Gulya *et al.*, 1991). Distribuce a patogenní variabilita *P. halstedii* byla průběžně sledována a intenzivně studována zejména v Severní Americe a Evropě, v hlavních oblastech produkujících slunečnice

Pěstování samosprašných odrůd slunečnice náchylných na *P. halstedii*, intenzivní zemědělství v kombinaci s vhodným počasím přispělo k rychlému šíření infekce, jak v Americe, tak v Evropě, zejména ve Francii, Španělsku, Německu, na Ukrajině a v Rusku (Trojanová *et al.*, 2017). Od roku 1977 šíření této choroby představovalo obrovskou hrozbu pro producenty slunečnice v celé Evropě (Gascuel *et al.*, 2015).

Celosvětově nejběžnější rasy *P. halstedii* byly 100 a 300 (Gulya, 2007). Přestože jsou tyto dvě rasy dominantní v celosvětovém měřítku, v České republice nebyly zjištěny. To je možné vysvětlit tak, že rasy 100 a 300 jsou méně virulentní a mohly být vytlačeny virulentnější rasou 7xx přítomnou na území České republiky. Nicméně, rasa 100 byla detekována v populacích *P. halstedii* v Severní Americe po roce 2007, i když více byly

ve stejné oblasti přítomny virulentnější rasy (Virányi *et al.*, 2015). Tudiž rasy 100 a 300 mohou společně v populaci koexistovat. Jejich absence v české populaci je možná z důvodu omezeného počtu vzorků ve výzkumu nebo byl jejich fenotyp překrytý během testování.

Pro zpřesňování by byly za potřebí monosporické nebo alespoň monosporangianí izoláty připravené z hromadných izolátů k opakovanému testování, což by bylo velmi časově i materiálově náročné. Navíc úspěšnost monosporické izolace je cca 1-2%. (Doudová, 2013) V Evropě jsou nejhojnější rasy 100, 300, 330, 700, 710 a 730. (Virányi *et al.*, 2015) V České republice převažovala v populacích *P. halstedii* rasa 700 a později 710 (Sedlářová *et al.*, 2016).

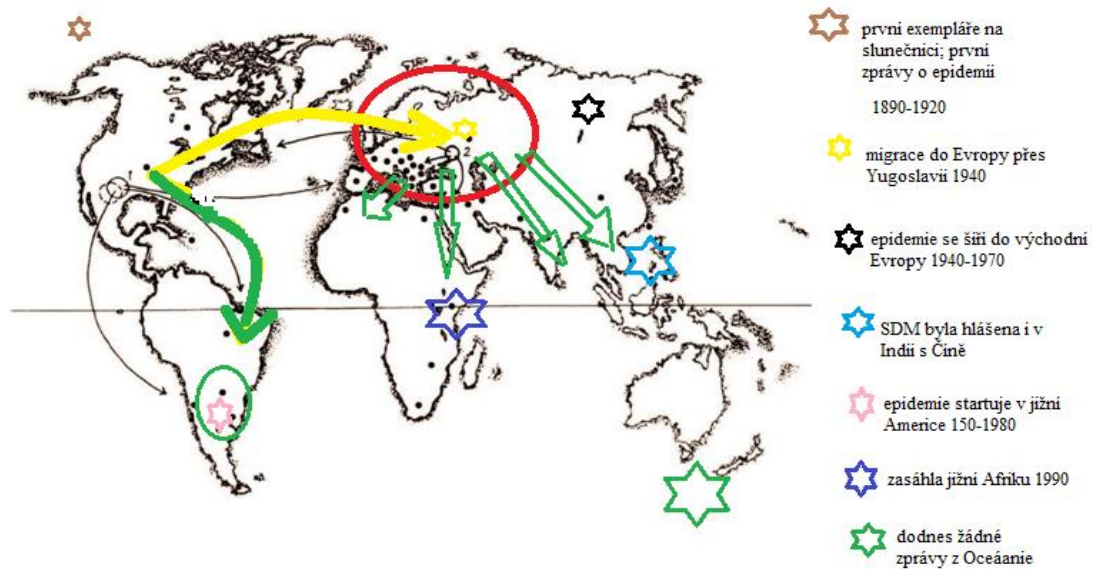
3.1.5.1 Původ šíření a globální distribuce

Patogen pochází ze Severní Ameriky, kde má původ i jeho hostitel – slunečnice roční, *Helianthus annuus* (Spring, 2019, Sackston, 1992). Informace o šíření patogenního původce jsou nejisté. Příčinou je nejspíš rozdílné pojetí druhové koncepce *P. halstedii* publikované v té době (Spring, 2019; Leppik, 1962, 1966; Novotelnova, 1966).

Dalším problémem je, že sice existuje mnoho záznamů o počátečních výskytech infekce, ale jsou vědecky nepřesné (lokalita, datum sběru a identifikace patogenu). Proto jsou tato „pozorování“ v literatuře velice obtížně publikovatelná (Spring, 2019).

V případě distribuce *P. halstedii* na pěstované slunečnici je evidentní první vlna migrace ve 40. letech (Novotelnova 1966), kdy byl patogen objeven na slunečnicových polích v bývalé Jugoslávii (1946 v Chorvatsku, 1946 v Srbsku). Poté se choroba rychle rozšířila do dalších zemí východní Evropy, jako například do Rumunska (1946), Bulharska (1947), Maďarska (1949), Ruska (1951) a dalších (Spring, 2019). V 70. - 90. letech 20. století zasáhla infekce oblasti severní a jižní Evropy, Asie a severní Afriky, přičemž slunečnice byla v těchto oblastech hlavní olejnatou plodinou. (Spring, 2019).

Druhá cesta rozptylu infekce nastala v 50. letech 20. století v Jižní Americe (Obráze), kdy choroba začala nebezpečně ovlivňovat výnosy slunečnice v Chile (Sackston, 1956) a Argentině. (Spring 2019). Následně se objevila ohniska plísně v sousedních zemích jako je Uruguay, Brazílie a Paraguay. Výskyt patogenu potvrzuje 52 zemí (Virányi, 2018). Nejvíce ohnisek infekce je v Evropě (26 zemí), následuje Asie (13), Afrika (8), Jižní Amerika (5) Střední (1) a Severní Amerika (3) (Spring 2019).



Obrázek 11: Mapa distribuce *P. halstedii* (překleseno podle Spring, 2019)

K distribuci patogenu na velké vzdálenosti dochází prostřednictvím infikovaných semen (Spring, 2019, 2001). Šíření *P. halstedii* není ojedinělou událostí, ale běžnou záležitostí v globálním kontextu pěstování slunečnice (Spring, 2019). Delmotte *et al.*, (2008) ukázal molekulárními metodami, že větvenka slunečnicová pochází nejméně ze tří genetických zdrojů. Možnosti, jak zabránit zavedení *P. halstedii* nebo fenotypů s novou virulencí přenosem semen, jsou omezené (Virányi *et Spring*, 2011). Testy jsou příliš náročné časově, provedením nebo jsou málo citlivé. Pouze Austrálie a Nový Zéland udrželi svou produkci slunečnice bez kontaminace *P. halstedii* díky přísným omezením (Spring, 2019).

3.1.5.2 Distribuce *P. halstedii* v České republice

Plíseň slunečnicová (*P. halstedii*) byla na území bývalého Československa poprvé zaznamenána v 50. letech 20. století na jižní Moravě a na Slovensku (Bojňanský, 1956, 1957). Výskyt v ČSR patří mezi první záznamy mimo Severní Ameriku. Až do roku 1989 byla naše země součástí Československa. Od té doby však o výskytu *P. halstedii* v naší zemi nejsou k dispozici téměř žádné informace (Drábková Trojanová *et al.*, 2018; Drábková Trojanová, 2017; Sedlářová *et al.*, 2016). Od roku 2002 je plíseň slunečnice registrována jako karanténní choroba a její výskyt je každoročně monitorován Státní rostlinolékařskou správou (Sedlářová *et al.*, 2013).

P. halstedii se v České republice vyskytuje od roku 2000. Od té doby s výjimkou roku 2004 byl patogen zaznamenán na jižní Moravě a ve východních Čechách (Sedlářová *et al.*, 2013). V letech 2007–2012 bylo v ČR sledováno 128 lokalit, kde se pěstují kultivary slunečnice na různých stanovištích – pole, zahrady, pole okolo silnic atd. (Sedlářová *et al.*, 2016).

V České republice nejsou k dispozici údaje o infekci *P. halstedii* na některé ze šesti planých alternativních hostitelů z rodu *Helianthus* (*Xanthium strumarium*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Artemisia vulgaris*, *Iva xanthiifolia*, *Abutilon theophrasti* or *Rudbeckia fulgida*). Monitorování invazivních Asteraceae by proto mělo být doplněno screeningem *P. halstedii*. Nejbližší populace *P. halstedii* na alternativním hostiteli se nachází na *H. tuberosus* (Hohenheim University) v Německu (Drábková Trojanová, 2017) a *A. artemisiifolia* v jižním Maďarsku (Drábková Trojanová, 2017; Walcz *et al.*, 2000). Vzhledem k zeměpisné izolaci nepředstavují velkou hrozbu pro české pěstitele slunečnice ani přírodní zdroj možné rekombinace s *P. halstedii* v našem státě (Drábková Trojanová, 2017).

Distribuce *P. halstedii* v České republice zahrnuje pouze několik lokalit a to, Olomouc-Holice, Brno-Chrlice, Lednice, Podivín, Kroměříž, Čáslav a Ledce, kde hostitelské rostliny (*H. annuus*), vykazovaly systémovou infekci. Rostliny se sekundárními projevy infekce byly hlášeny z lokalit: Olomouc (každoročně), z Brna – Chrlice a z Lednice až v roce 2010. Opakovaný výskyt s příznaky systémové infekce a reprodukce patogenu byl potvrzen na čtyřech lokalitách: Olomouc-Holice, Brno-Chrlice, Lednice a Podivín. Infekce nebyla zaznamenána na experimentálním poli Ústředního ústavu kontroly a testování v zemědělství v Brně-Chrlicích v letech 2009 a 2012 pravděpodobně v důsledku posunu experimentálních polí používaných pro testování slunečnice a tím pádem opuštění zdroje inokula patogenu v půdě (Sedlářová *et al.*, 2016).

Většina populací pochází především z pokusných polí výzkumných institucí a několik infekcí bylo hlášeno ze soukromých zahrad. Naopak v Německu je situace zcela jiná, populace *P. halstedii* je hlášena především z komerčních polí (Spring. *et al.*, 1994). *P. halstedii* je na provokačních polích v České republice udržována v kontrolovaných podmínkách a je testována. Nicméně, tato místa mohou představovat zdroj inokula schopného omezeného šíření patogenu. To pravděpodobně dokazuje objev nakažené rostliny v zahradě Mendelovy Univerzity v Lednici vzdálené cca 2,5 km od experimentálního pole se zavedenou populací *P. halstedii*. Původ infekce zůstává

neznámý, ale není vyloučen ani přenos člověkem nebo větrem. (Drábková Trojanová, 2017)

Jedno z „přírodních“ ohnisek s dobře zavedenou populací se až do nedávné doby nacházelo v Podivíně. S největší pravděpodobností jde o lokalitu, která je podpořena faktory životního prostředí (vodou nasáklá půda), bez agronomické praxe a fytosanitárních opatření. Nicméně, pole byla v roce 2016 přeměněna na stavební pozemky (Drábková Trojanová, 2017)

Podobné „přirozené“ populace jsou v naší zemi občasné a rozptýlené. Podle CABI údajů (2019), je *P. halstedii* přítomna ve všech zemích obklopujících Českou republiku, s výjimkou Polska. Omezené populace *P. halstedii* v České republice představují nejsevernější hranice areálu patogenu ve střední Evropě, což ale neznamená, že nemůže docházet k dalšímu šíření tohoto patogenu do západní, jižní, střední a východní Evropy. Z tohoto důvodu je doporučeno další sledování, aby se zabránilo šíření patogenu (Drábková Trojanová, 2017).

3.2 Metody tvorby monosporických izolátů

Techniky izolace jednotlivých mikroorganismů jsou metody, které oddělují jednotlivé buňky od sebe navzájem nebo z matečného materiálu. Každá technika má své výhody i nevýhody, proto volba metody závisí na účelu studie (Ischii *et al.*, 2010). Většina těchto metod se dá spolehlivě použít pro výzkum bakterií, hub i oomycet, avšak většinou je nelze použít pro práce s biotrofními parazity, neboť nemohou být kultivovány na umělých médiích, proto práce s nimi je časově i materiálově náročná (Choi *et al.*, 1999).

Mono(zoo)sporické izoláty (MSI/MZSI) jsou obecně klony mikroorganismů vyrostlých z jedné rozmnožovací struktury, tj. spory (pohyblivé jsou označovány jako zoospory). Naproti tomu monosporangiální izoláty (MSGI) vznikají z jednoho sporangia, tj. útvaru, ve kterém se tvoří rozmnožovací propagule endogenně. MSI/MZSI jsou téměř totožné s MSGI, ovšem s tím rozdílem, že mají menší jednotku izolace. MSGI nemusí být geneticky stejnorodé; pokud sporangium obsahuje odlišné (zoo)spory, jako je tomu například u *P. halstedii*, je nutné pracovat u daného druhu s MSI/MZSI (Doudová, 2013; Dick, 2001). U *P. halstedii* se odchytávají životaschopné zoospory, které vznikly ze zoosporangií. Tyto pohyblivé bičíkaté buňky vznikají nepohlavně a pomáhají šíření patogenu v porostu (Doudová, 2013; Dick, 2001; Spring *et al.*, 1998). Zoospory je možné oddělit pomocí různých metod (Hildebrand, 1938).

Způsob, jak co nejspolehlivěji získat geneticky stejnorodý materiál u *P. halstedii* je využít MZSI, neboť zoospory tvořené ve sporangiích se mohou lišit v patogenní variabilitě (Doudová, 2013; Spring *et al.*, 2006; Spring *et al.*, 1998).

3.2.1 Příprava MZSI

Izolát je samotná kultura mikroorganismů, zejména první monosporická nebo čistá izolace mikroorganismu z nějakého místa (Kirk *et al.* 2001). U organismů, u nichž se při určování druhů nelze spoléhat jen na anatomické, či morfologické znaky, jsou pro identifikaci potřebné MZSI/MSI (Choi *et al.*, 1999). Tvorba těchto izolátů je často spojená se získáním geneticky homogenního materiálu pro genetické rozborů (Doudová, 2013).

V případě klasického pojetí druhů založeného na morfologii tyto izoláty poskytovaly informace pro identifikaci anamorfního či teleomorfního stádia (používány např. u rodů

Fusarium a *Collectorichum*). Koncepce druhů založené na polyfázickém přístupu shrnují jak morfologické, fyziologické, ekologické, fytopatologické, tak i molekulární znaky a jsou ve většině případů založeny na jednobuněčné / monosporangiální / monosporické izolaci (Choi *et al.*, 1999).

U rodu *Plasmopara* tvorba monosporických/monosporangiálních izolátů umožňuje studium patogenní variability, umožňuje identifikovat patotypy / fyziologické rasy (Doudová, 2013; Spring *et al.*, 1998).

Pro tvorbu MZSI/MSI se používají kultury jak čisté, tak smíšené. **Čistá kultura** je souborem organismů pocházejících z jediné buňky (stejného původu), podle staršího konceptu obecně rozšířenějšího mezi biology jde o kulturu tvořenou jedinci pouze jednoho druhu. Ale taková kultura nemusí být vždy geneticky stejnorodá. Čisté kultury se tvoří z důvodu zabránění kontaminace a kvůli izolaci organismu, s nímž chceme dále pracovat (Hildebrand, 1938). Čistou kulturu získáme přenesením organismu na vhodné kultivační médium a můžeme ji získat např. vytvořením MZSI/MSI (Goh, 1999). Takto vytvořená čistá kultura už může ale nemusí být geneticky homogenní (Hildebrand, 1938).

Oproti čistým patří smíšené kultury vždy k heterogenním materiálům, které jsou v přírodě přirozeně přítomné (Doudová, 2013; Xue *et al.*, 2008). Ze smíšených kultur oddělujeme čistou formu v podobě MZSI/MSI.

Při neodborném zacházení může při izolaci dojít ke kontaminaci vzorků, proto je při tvorbě MSI důležité oddělování nečistot (Choi *et al.*, 1999; Goh, 1999; Hildebrand, 1938;). Zhang *et al.* (2013), Choi *et al.* (1999) a Goh (1999) uvádějí, že míra kontaminace značně závisí na dovednostech pracovníka a sterilitě prováděných kultivací. Také uvádějí, že izoláty nejčastěji podléhají kontaminaci, kterou způsobují bakterie, kvasinky a vláknité houby (mikromycety). Bakteriální kontaminaci lze zabránit přidáním antibiotik do média. Kvasinkovou kontaminaci lze minimalizovat zředěním suspenze spor (Zhang *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 1999; Goh, 1999). Zabránit kontaminaci vláknitými houbami zejména druhy *Aspergillus* nebo *Penicillium* je těžké, jelikož spory se do média obvykle dostanou díky cirkulaci vzduchu nebo znečištěným rostlinným materiálem (Zhang *et al.*, 2013).

Techniky k vytvoření monosporové kultury byly popsány několika autory (Noman *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 1999; Goh, 1999; Ho *et al.*, 1997). Izolace mikroskopických monosporových forem (MSI) bakterií, hub, oomycet je možné tvořit třemi různými metodami, a to **zřed'ovací, mechanickou izolací a částečně mechanickou izolací** (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938). Davis (1930) tvrdí, že často

jsou použité techniky kombinací těchto metod. Goh (1999) uvádí, že většina těchto metod jsou v podstatě různé modifikace metody ředění.

3.2.1.1 Zřed'ovací metody

Zřed'ování patří mezi nejjednodušší metody jak co do pracovního postupu, tak i z hlediska nároků na přístrojové vybavení. Zřed'ovací technika vychází z hypotézy, že na sklíčko, či agar umístěná kapka ze separovaných propagulí dostatečně rozředěných v unášecí kapalině, bude obsahovat jednu propaguli. Jako unášecí kapalinu volíme destilovanou vodu nebo teplý agar, se kterým se po vychladnutí lépe manipuluje (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938; Goh, 1999). Kapky obsahující jednu propaguli umístíme na čisté médium. Tuto techniku uplatňujeme u nekrotrofních nebo hemibiotrofních druhů, které mohou dále růst na umělém médiu (*Alternaria*, *Corynespora*, *Helminthosporium*), jsou díky velkým a jednodušeji zjiřitelným konidiím vhodnější pro použití této metody. Naopak nedoporučuje se k tomuto typu izolace použít druhy jako *Aspergillus* a *Penicillium*, a to zejména protože produkují enormní množství malých spor (Doudová, 2013; Goh, 1999).

Metody zředění pro izolaci spor byly převzaty od bakteriologů. Lister (1878) byl první, kdo popsal metodu zředění pro izolaci jednotlivých spor (Davis, 1930). A. De Bary (1872) sledoval vývoj jediné spory od klíčení až po vytvoření hyf a konidií (Davis, 1930; Van Tiegham, 1873). Byl první, kdo prezentoval potřebu monosporické izolace při pozorování hub (Davis, 1930). V roce 1873 Van Tiegham publikoval práci s *Mucor* spp. Ve svých výzkumech kultivoval *Penicillium*, *Mucor*, *Achlya*, *Thamnidium*, *Circinella*, *Chaetocladium* a *Syncephalis*. Díky tomu byly pojmenovány nové rody hub. *Circinella*, *Chaetocladium* a *Syncephalis* byly přerazeny z říše Plantae do říše Fungi (Davis, 1930). 1881 Brefeld zavedl pěstování hub v čistých kulturách. Použil modifiovanou metodu zředění od Listera, suspenzi spor zředil v destilované vodě tak, že jedna kapka nabraná špičkou jehly obsahovala právě jednu sporu. Brefeldovy izolace a kultivace byly ještě dalších 50 let vzorem pro odborníky v oblasti biologie (Davis, 1930).

Autoři Vávra *et al.* (2015) použili tuto metodu při práci s patogenem *Venturia inaequalis* (strupatka jabloňová). K vytvoření MSI nejdříve preparační jehlou preparovali pseudopetrithecia, které roztlačili v kapce sterilní vody a zralé askospory odsály mikropipetou. Suspenzi spor naředili v desetinásobku objemu sterilní vody a následně askospory přenesli na povrch vhodného kutivačního media (PDA nebo ALA „Aple Leaf

Agar“). Po první fázi kultivace media obohatili antibiotiky, následně probíhala kultivace. Po týdnu mycelia použili techniku přenosu vyříznutých bločků z plotny s myceliem. Autoři konstatují, že možný se ukázal i přenos nebo přetisk konidií smytím nebo stěrem preparační jehlou (Vávra *et al.*, 2015).

3.2.1.2 Částečně mechanické metody

K semimechanickým izolačním technikám je využíván mikroskop (Hildebrand, 1938). Čistá kultura je tvořena použitím izolačních nástrojů neboli izolátorů (Hildebrand, 1938), které mohou být připevněné k mikroskopu (Hildebrand 1950). Pro tuto metodu se používá nejčastěji sklo, agarová plotna, či želatina, kde se následně daří organismy snadněji izolovat kapkami vody. Hildebrand (1938) doporučuje pro částečně mechanické metody techniku „cylinder loop-needle“, lze použít i techniku suchou jehlou, techniku kapičkovou metodou, kapilární techniku, použití mikro-kolonie a mercury-shield (Hildebrand 1938; Doudová, 2013).

3.2.1.2.1 Cylinder loop – needle metoda

Pro použití této metody je nejlepší, pokud jsou jednotlivé buňky vzdálené od sebe. Malé množství mikroorganismů rozmístíme na agarové plotně. Izolaci organismů provádíme, jak název metody napovídá, ouškem jehly, či drobnou očkovací kličkou. Pro jednodušší a přesnější práci je doporučeno jehlu nebo očkovací kličku zapíchnout do korku a opatřit držadlem nebo násadkou (www.collections.infocollections.org; Doudová, 2013; Hildebrand, 1938)

Podle Hildebranda (1938) můžeme za předchůdce této metody označit autory Heller (1913) a Shear et Wood (1913). Ti nejprve připravili suspenzi spor v tenké agarové vrstvě v Petriho miskách. Po vyklíčení izolovali jednotlivé spory s malým množstvím substrátu pomocí jemné špičaté nebo zploštělé jehly do čistých kultur (Hildebrand, 1938).

Metodu „cylinder loop,“ poprvé popsal Keitt v roce 1915, kdy k přenosu jediné spory použil ouško jehly. Obdobu Keittovy metody použil Langenon (1921). Připravil suspenzi spor metodou ředění a následně ouškem jehly vyjmul kapku, kterou zkoumal pod mikroskopem. Kapky, které vykazovaly pouze jednu přítomnou konidii, byly kapičkovou metodou převedeny do kultur (Davis, 1930)

3.2.1.2.2 Technika suchou jehlou

Jde o obdobu cylinder loop-needle metody. Technika zahrnuje práci s jehlou, mikroskopem nebo binokulární lupou. Při technice suchou jehlou jsou konidie rozvrstveny v dostatečné vzdálenosti na ztuhlém agaru. Právě k jedné konidii je přiblížena špička krejčovské jehly tak, aby k ní přilnula. Následně je konidie přenesena na čisté médium (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938).

Rosenbaum (1912) publikoval svou práci s *Thielavia basicola* a Anderson (1913) publikoval práci s *Endothia parasitica*. Oba na agarovou plotnu přenesli zředěnou suspenzi spor, jednotlivé konidie pak pomocí jehly přenesli na požadované medium (Hildebrand, 1938; Davis, 1930). Hanna (1924) použil také jemnou krejčovskou jehlu pro přenesení spor druhu *Coprinopsis lagopus* z podložního sklíčka na vhodné medium (Hildebrand, 1938; Davis, 1930; Hanna, 1924). Touto metodou bylo vytvořeno mnoho monosporových kultur řady hub, což uvádějí ve své práci Buller (1925) a Togashi (1926). Poté bylo publikováno mnoho modifikací tvorby monosporových kultur pomocí jehly připojené k mikroskopu pomocí mikromanipulátoru (Hildebrand, 1950).

3.2.1.2.3 Kapičková metoda

Metoda spočívá v izolaci čisté kultury ve formě mikrokapičky na krycí sklíčko. Jde o modifikaci Brefedovy „drop-slide“ metody, kterou použil Burri (1907, 1909), následně byly použity další variace metody, a to Lindner (1909) Strasbourg-Koernecke (1913), Mutch (1919), Paine (1927), Paine and Ramchandani (1929) (Hildebrand, 1938).

Lindnerova kapičková metoda: Lindner v roce 1909 použil Brefeldovu metodu, ale místo jehly k přenosu kultury na podložní sklo použil psací pero (Davis, 1930). Tato metoda se používá v kvasném průmyslu pro izolaci kvasinek. Ty jsou zředěny do sladiny a následně přeneseny na krycí sklíčko sterilním perem ve formě kapičky. Následně jsou pomocí mikroskopu vybrány kapičky obsahující pouze jednu konidii (Hildebrand, 1950, 1938).

Kapičková metoda s použitím inkoustu: tato metoda se uplatňuje při práci s bakteriemi. Kapky bakterií jsou umístěny na agaru, na které je nanesen inkoust. Ten se pro tuto práci musí naředit tak, aby sytost barvy byla mezi hnědou a černou (Doudová, 2013; Hildebrand, 1950). Následujícím krokem je izolace bakterie pomocí suché jehly

(Doudová, 2013; Hildebrand, 1950; 1938). Tato metoda byla objevená Ehrenbergem (1838) a byla přezkoumána Niklitschekem (1939) (Hildebrand, 1950).

3.2.1.2.4 Mikrokolonie

Metoda ve své zjednodušené formě byla poprvé použita Hansenem v roce 1888. Hansen na sklíčko rozetřel zředěnou suspenzi kvasinek a sledoval vznik kolonie, následně mikro-kolonii přenesl na vhodné medium. Později v roce 1900 uvedl výsledky podobných studií s kvasinkami i bakteriemi. Avery a Leland (1927) použili modifikaci Hansenovy metody pro izolaci jednotlivých bakteriálních buněk. De Zeeuw (1943) vytvořil pro získání čisté kultury *Agaricus campestris* speciální živné medium (Hildebrand, 1950).

Hildebrand (1950) ve své práci uvádí, že kolonie organismů může vyrůst na speciálním substrátu. Po zhruba 7–14 dnech se agarová plotna zahřeje, rozpustí a odstraní se mrtvé mycelium. Následně se tekuté medium nalije na krycí sklíčko. Po kultivaci se pod mikroskopem izoluje izolát pouze s jednou sporou (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938).

3.2.1.2.5 Kapilární metoda

Tato technika má široké možnosti využití, neboť se používá k izolaci řas, spor hub, oomycet i bakterií. Při této metodě se k izolaci používá unášecí kapalina, kterou je voda, či olej. Ta se pod tlakem vhání do kapiláry, jejíž průměr se upravuje podle velikosti buněk (Fröhlich a König, 1999). Přestože má tato metoda široké pole využití, nepoužívá se k izolaci některých mikroorganismů, které se zachycují na skle. Kapilární technika je často používána v kombinaci s mikromanipulátory, které upevňují kapiláru staticky (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938).

Klebs (1873) používal velmi jemnou kapiláru při práci se zředěnou suspenzí bakterií a spor. Pod mikroskopem sledoval, jak se jednotlivé buňky tvoří kolonie. Hesler (1913) pomocí ručně vedené kapiláry izoloval jednotlivé askospory *Phyalospora cydoniae* (dnešní platné pojmenování *Botryosphaeria obtusa*). Holker (1919) studoval anaerobní organismy. Používal zploštělou kapiláru. Segmenty obsahující jednotlivé buňky asepticky přenesl do růstového média. Hansen (1926) naplnil kapiláry suspenzí spor, jako

unášecí kapalinu použil teplý agar, poté kapiláry zkoumal pod mikroskopem. Části kapilár, které obsahovaly jednu sporu ponořil do alkoholu ke sterilizaci a umístil do vhodného media (Hildebrand, 1938).

3.2.1.2.6 Mercury-shield (rtuťový štít)

Jde o modifikace metody mikrokolonie. Při metodě rtuťového štítu se na izolované organismy používá tuš, která je následně chrání. Další organismy hynou pod UV zářením, kterým se agar osvítí (Doudová, 2013; Hildenbrad, 1938). Zastíněné buňky mohou tvořit kolonie, které se pak přenesou na požadované medium (Hildebrand, 1938)

Tuto unikátní metodu představili Topley, Barnard and Wilson (1921) ve své práci s bakteriálními organismy. Následně roku 1925 Barmaid použil stejnou metodu k získání čisté kultury z jednotlivých buněk (Hildebrand, 1938).

3.2.1.3 Mechanická izolace

Techniky mechanické izolace jsou mnohem složitější a nákladnější než zředovací a polo-mechanické metody. Přesto většinou je základem mnoha metod připravená suspenze propagulí (buněk, spor, konidií) či mikroorganismů metodou zředění. Při mechanické izolaci se pracuje přímo s jednotlivými propagulemi/mikroorganismy. Při mechanické izolaci je zapotřebí více přístrojů, které jsou obtížnější na ovládní. Výhodou těchto technik je kratší doba práce a přímý přenos do kultury, čím se eliminuje míra kontaminace (Hildebrand, 1938).

Při mechanické izolaci používáme Barberovu metodu, mikromanipulátory, izolátory, automatické mikromanipulátory, zvlhčující komoru, světelný zdroj a izolaci na povrchu buněk (Hildebrand, 1938; Doudová, 2013).

3.2.1.3.1 Barberova metoda

Metodu poprvé představil Barber v roce 1904, následně ji modifikoval v roce 1907, 1908, 1911, 1914 a 1920 (Hildebrand, 1938). Poté prošla několika dalšími modifikacemi a to autory: Chambers, (1922), Wright *et* McCoy (1927); Wright *et* Nakojima, 1929, Wright *et al.*, (1930) Lindegren (1933) (Hildebrand, 1938).

Barber vynalezl mikromanipulátor, který byl připojen ke stolku mikroskopu. K izolaci jednotlivých propagulí tato metoda využívá mikropipety nebo malé jehličky. Při správném zředění suspenze obsahovala právě jedna mikro-kapka izolovaná pomocí pipety, či jehličky pouze jednu propaguli (Hildebrand, 1938).

3.2.1.3.2 Izolátory

Jako izolátory rozumíme nástroje (jehly, nůžky, nože, kapiláry, kličky, pipety), s nimiž přímo manipulujeme s objekty při vytváření MZSI/MSI (Hildebrand, 1938). Tyto nástroje se často používají v mikromanipulační technice a mohou být vyráběny ručně nebo mechanicky z různých materiálů a v různých tvarech a velikostech (Hildebrand, 1950).

Při izolaci buněk hub, kvasinek a bakterií se v biologických laboratořích používají mikropipety. Ty jsou vyráběny ručně nebo mechanicky.

Těmto nástrojům jsou podobné kapiláry, ale pro jejich použití je spíše spjato s invertovaným mikroskopem s objektivy umístěnými pod pracovním stolem (Hildebrand, 1938). Spring *et al.* (1998) aplikovali tuto techniku k vytvoření MZSI *P. hastedii*. Použili skleněnou kapiláru připevněnou k mikromanipulátoru pomocí mikrolitrové stříkačky k izolaci jednotlivých zoospor *P. halstedii* a následné inokulaci listových disků (Spring *et al.*, 1998).

K dalším často používaným přístrojům patří jehly vyráběné z kovu, skla, štetin. Brefeld (1881) byl jedním z prvních, kdo použil jehlu k izolaci jednotlivých spor. Goh (1999) popsal a znázornil metody izolace spor pomocí ručně vyrobené skleněné jehly. Doporučuje vyrobit skleněnou jehlu spojením dvou Pasteurových pipet, které v místě spojení roztavil a pohybem od sebe vytvořil potřebný nástroj. Pro snadnější manipulaci by skleněná jehla měla mít pro izolaci úzký hrot cca 2 cm dlouhý a delší rukojeť. Při tomto postupu probíhá izolace přenesením spory, či části mycelia z agarové plotny. Choi *et al.* (1999) navrhuje vyrobit skleněnou jehlu zlomením úzkého hrotu Pasteurovy pipety. Dvnitř rozbité pipety je umístěna kovová jehla (špendlík k upevnění hmyzu). Pomocí plamene se roztaví sklo, tak je jehla upevněna. Tito autoři navrhují i použití jiných druhů jehel. Např. skleněné jehly od Goh (1999), ale upozorňují na to, že sklo je obtížnější sterilizovat, nebo komerční zakoupené jehly, ale ty jsou dosti drahé a křehké, tudíž nevhodné pro nezkušené pracovníky (Choi *et al.*, 1999).

Hanzalová *et* Bartoš (2015) použili jednoduchou metodu k vytvoření MSI rzi plevové. K zachycení jednotlivých spor použili preparační jehlu nebo vlas v násadce. Sporu následně přenesli na listový segment v Petriho misce nebo na izolovanou rostlinu. Místo přenosu následně označili barvou nebo vpichem a rostlinu inkubovali stejně jako při jiných infekčních pokusech. Celou problematiku shrnuli ve své práci (Hanzalová *et* Bartoš, 2015).

Mezi speciální izolátory patří harpuna, kterou používal Hewlett (1918). Jde o speciální jehlu, s níž se pracuje s mikro-koloniemi (Hildebrand, 1938).

K izolaci bakterií, prvoků a spor se používá kličkový izolátor, který je ukončený očkem nebo ouškem, ovšem jeho výroba je poměrně složitá. Pro izolaci kvasinek slouží krycí sklíčko, odkud se kolonie přenáší do nové kultury. Toto je jen krátký výčet izolátorů. V laboratořích se dále používají mikro-nůžky, časté použití najdou i elektrické dráty a další nástroje (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938). Harder (1927) použil jemný platinový drát vyhřívaný slabým elektrickým proudem k izolaci hyf. Barnes (1928) a Dickinson (1933) použili podobnou techniku pro izolaci hyfových buněk. Dickinson (1933) a Hertig (1938) navrhli mikro-nůžky ovládané pomocí mikromanipulátoru k oddělování hyfových vláken. Dickinson (1933) vymyslel mikro-nůž k řezání hyfových vláken, který vyrobil z malého kousku žiletky (Hildebrand, 1938).

3.2.1.3.3 Automatické mikromanipulátory

Mikromanipulátory jsou obecně přístroje pro manipulaci s mikroskopickými objekty. Jedná se o nákladná zařízení, která k bezchybnému fungování potřebují mikroskop, speciální mikromanipulační součástky a pomůcky a další komponenty (Doudová, 2013).

Mikromanipulátory pracují s mikrostrukturami, proto se používají různé mikromanipulační pomůcky (izolátory) a zvlhčovací komůrky. Výběr pomůcek závisí na tom, s jakým materiálem budeme pracovat a jakou činnost chceme provádět. Mikromanipulátory (magnetový nosič, límcový objektiv) se využívají při manipulaci s mikro objekty, u nichž chceme zkoumat mikro-kolonie, genetiku, či rozvoj kolonií (Skerman, 1968).

Pro přenos pohybu ruky na mikromanipulační nástroje se využívají různé mechanismy. Mikromanipulátory s přímým pohybem převádí pohyb pomocí ozubených

kol, nazýváme je mechanické mikromanipulátory. Nevýhodou těchto zařízení je, že mohou při vstupním a výstupním pohybu ruky vznikat vibrace (Organonet.med.muni.cz.)

Vibrace jsou redukovány u mikromanipulátorů, které nereagují přímo na pohyb ruky – hydraulické a elektrické. Pohyb hydraulické kapaliny využívají hydraulické mikromanipulátory, elektrické mikromanipulátory používají přesné motory k otáčení mechanických částí. Speciálním typem jsou piezoelektrické mikromanipulátory, které využívají expanzi piezoelektrického krystalu k provedení mikroskopického pohybu (umožňují velice krátké pohyby v rozsahu 1-10 um). Vstříkovaní aplikované látky kapilárou ovládají miniinjektory, které zároveň po dobu aplikace hlídají tlak v kapiláře. Pokud objekty ovládáme pomocí magnetické, optické nebo elektrické energie, pak mluvíme o laserové (optické) mikromanipulaci. K izolaci buněk, chromozomů, buněčných organel atd. se používá technika laserové mikrodisekce (Organonet.med.muni.cz.)

O přelom v této technice se v roce 1925 postaral Hurst, který přišel s novým druhem mechanického mikromanipulátoru. Jeho jedinečnost spočívala v tom, že měl staticky upevněnou kapiláru a mohl se pohybovat ve třech různých směrech. Toto zařízení se pro izolaci spor ve fytopatologických laboratořích používá spolu s invertovaným mikroskopem dodnes (Doudová, 2013; Hildebrand, 1938). První hydraulický mikromanipulátor vymyslel Dunn (1927). Vymyslel přístroj pracující na principu hydraulického čerpadla pro získání jemně regulovaných pohybů (Hildebrand, 1938). Izolace pomocí mikromanipulátorů jsou užitečné, ale mají svá omezení. Mikromanipulátory jsou drahé a ke zvládnutí techniky je potřeba hodně cviku a trpělivosti (Goh, 1999).

3.2.1.3.4 Zvlhčovací komory

Zvlhčovací komory udržují stabilní vlhkost a chrání vzorky před kontaminací. Používají se v případě izolovaných mikroorganismů, které žijí ve vodě nebo jsou jejich spory a mycelia náchylná k vyschnutí. Jako zvlhčovací komora může sloužit nádobka přikrytá sklíčkem nebo krytem s otvorem pro vkládání izolátů. V zásadě čím menší je otvor v těchto komůrkách, tím lépe se reguluje vlhkost. Základním pravidlem je, aby nádobka byla rovnoměrně zakrytá a dala se zkoumat pod mikroskopem (Hildebrand, 1938). Podle Hildebranda (1938) je tato metoda vhodnou zejména pro práci s kvasinkami.

Pro přenos buněk z Petriho misky se použila technika suché jehly. Dále se kvasinky kultivovaly na agarových plotnách. (www.zor.zut.edu.pl; Doudová, 2013)

Pro určité účely je vyžadována regulace teploty. Hill (1902) navrhl zvlhčovací komoru a vyhřívací zařízení. Reyniers (1933) navrhl zcela uzavřenou komoru. Šlo o speciální typ vlhké komory eliminující kontaminaci, která byla vybavena regulátorem teploty (Hildebrand, 1938).

3.2.1.3.5 Světelný zdroj

Vývoj tohoto výzkumu jde kupředu. Poměrně mladou metodou jsou optické pinzety. Toto zařízení využívající laserové pojitko k přesunu mikro, i nanoobjektů (<http://www.isibrno.cz>; Doudová, 2013) slouží k izolaci buněk z tkání a pletiv, ale i bakterií a virů, a dokonce i kovových částic (<http://www.fbmi.cvut.cz>; Doudová, 2013)

3.2.1.4 Izolace MZSI *P. halstedii*

Spring *et al.* (1998) ve své studii hledal metodu pro odchyt životaschopných pohyblivých zoospor *P. halstedii* po zoosporogenezi (uvolnění ze zoosporangia) k následné infekci slunečnicových listových disků. U vzorků, které obsahovaly několik zoospor pocházejících z jediného sporangia, vzorků obsahujících několik zoospor i u vzorků obsahujících pouze jedinou zoosporu byly infekce úspěšné. Po spontánní sporulaci na povrchu inokulovaných listových disků (z děložních listů slunečnice) vytvořili homogenní inokulum, kterým byly naočkovány semenáčky. Tato metoda umožňovala produkci geneticky homogenních kmenů *Plasmopara halstedii* (Spring *et al.*, 1998)

Pro tvorbu MZSI *P. halstedii* je nejvhodnější izolační technikou mechanická izolace pomocí kapiláry, která je umístěna na rameni mikromanipulátoru tzv. kapilární technika. Zoosporangia se kultivují v Petriho miskách v kapkách destilované vody na agarové plotně. Po vylíhnutí dvoubičíkatých zoospor ze zoosporangií se odchyťávají jednotlivé životaschopné zoospory pomocí kapiláry umístěné v mikromanipulátoru (Doudová, 2013). (viz kap. 4.5) Problémem je, že se nedá nijak ovlivnit doba a množství uvolněných zoospor. Tento problém popsali ve své studii Spring *et al.* (1998).

3.3 Studium *P. halstedii* – metodika

Vzhledem k tomu že, biotrofní patogeny nemohou být pěstovány na (polo) umělých médiích, jejich studium vyžaduje spolehlivé metody izolace, množení, kultivace, a skladování na tkáních jejich náchylného hostitele. Stejně tak pro opakovatelné metody při studium patogenní variability a screeningu rezistence. Práce s biotrofními oomycetami je časově i materiálně náročná (Drábková Trojanová, 2017).

Výzkum výrazně usnadňuje široce přijímaná a spolehlivá technika kultivace patogenu. Znalost metodiky ovlivňuje kvalitu výsledků a také pomáhá při porovnávání výsledků mezi laboratořemi po celém světě. Metody inokulace hostitelské pletiva in vitro (Sackston *et* Vimard, 1988), skladování sporangií (Gulya *et al.*, 1993), množení patogenu (Gulya, 1996), izolace a inokulace jednotlivých spór (Spring *et al.*, 1998), screening fungicidní rezistence (Rozynek *et* Spring, 2001) nebo detekce oospor *P. halstedii* v půdě (Gulya, 2004), jsou techniky, které se jsou známé z dob, kdy patogen způsobil značné ekonomické ztráty ve světové produkci slunečnice (Drábková – Trojanová, 2017).

Autoři Trojanová *et al.* (2017) shrnuli známé a publikované metody se zkušenostmi ze svého výzkumu i spolupracujících laboratoří a vytvořili všeobecně uznávanou metodiku pro práci s *P. halstedii* (Drábková Trojanová, 2017).

Fenotypové metody jsou založeny na reakci diferenciacního souboru slunečnice zahrnujícího 15 kultivarů / linií s různými geny rezistence, a tím rozdílně reagující na infekci *P. halstedii* (Drábková Trojanová, 2017).

3.3.1 Sběr a izolace pagenu

Trojanová *et al.* (2017) uvádí, že pro výzkum *P. halstedii* není třeba sbírat celou infikovanou rostlinu. Pro identifikaci rasy jsou zcela dostačující 1-2 infikované listy s bohatou sporulací. Navíc doporučují shromážděný rostlinný materiál uchovávat v chladu a v označených vodotěsných nádobách či sáčkách a co nejdříve jej transportovat do laboratoře. Pokud jsou listy znečištěné nebo bez viditelné sporulace, je možné je opláchnout pod tekoucí vodou a nechat inkubovat přes noc ve tmě při teplotě 15-18 °C (v nádobách, kde je zajištěna dostatečná vlhkost) k vyvolání sporulace (Trojanová *et al.*, 2017)

Vzhledem k tomu, že u nasbíraných vzorků není známé stáří ani životaschopnost sporangií, doporučuje se nejprve inokulace, tedy přenos patogenu, na kultivar postrádající

geny rezistence, za vzniku čerstvých sporangií s vysokou životaschopností (Trojanová *et al.*, 2017, Gulya *et al.*, 1991).

Jednotlivé izoláty *P. halstedii* mohou být získány z jednotlivých infikovaných listů (smíšené izoláty) nebo z jediného zoosporangia / zoospory. Každý typ izolátu je vhodný pro různé účely. Výhodou smíšených izolátů je jejich poměrně snadná a rychlá příprava, která nevyžaduje speciální vybavení. Smíšené izoláty navíc zachovávají variabilitu původních vzorků, a tak napodobují situaci v přírodních podmínkách (Trojanová *et al.*, 2017, Molinero-Ruiz *et al.*, 2002, 1998), proto jsou tyto izoláty vhodné pro testování rezistence / náchylnosti slunečnic. Na druhou stranu, smíšené izoláty nejsou vhodné pro studium taxonomie či molekulární biologie, jelikož jsou s největší pravděpodobností geneticky heterogenní (Trojanová *et al.*, 2017).

Existuje mnoho technik izolace jednotlivých spor u hub, obecně však nejsou použitelné v případě biotrofních organismů. Metodu izolace jediného zoosporangia nebo zoospory *P. halstedii* poprvé uvedli Sackston *et al.* (1998) a Spring *et al.* (1998) za použití metody inokulace listových disků (LDI) (Spring *et al.*, 1997). Účinnost monozoosporangiální inokulace (inokulace jedním sporangiem/zoosporangiem) je nízká (cca 10–15 %). Navíc izolace jediného zoosporangia nezaručuje genetickou homogenitu, jelikož každé zoosporangium obsahuje několik pohyblivých zoospor. Tudíž izolace jediné zoospory (monosporický izolát) vede k získání geneticky jednotného materiálu (Trojanová *et al.*, 2017).

O. Spring (Hohenheim University, Německo) ve spolupráci Trojanová *et al.* (2017) optimalizovali kapilární techniku izolace jediné zoospory *P. halstedii*. Čerstvá zoosporangia jsou nejdříve inkubována ve tmě při teplotě 19 °C v kapkách vody na 1% agrarové plotně po dobu cca 1 hod. Uvolněné zoospory jsou poté izolovány pod invertovaným mikroskopem pomocí kapiláry připojené k mikromanipulátoru a přeneseny na segmenty děložních listů náchylného genotypu slunečnice. Inokulované děložní listy se inkubují při teplotě 19 °C s fotoperiodou 12/12 hodin (světlo / tma), přičemž se vynechá počáteční fáze 12–16 h tmy. Listové disky se nejlépe kultivují v kultivačních destičkách s destilovanou vodou, která zajišťuje vlhkost pro pozdější sporulaci. Metoda je však velice pracná a časově náročná. Úspěšnost metody je dokonce nižší než pro inokulaci zoosporangií, a to 1-2 %. Metoda je tedy nepraktická pro práci s velkým počtem izolátů (Trojanová *et al.*, 2017).

Doudová (2013) optimalizovala techniku kultivace listových disků. První úspěšná infekce jedinou zoosporou se projevila nejdříve 5. den s tím, že pro kultivaci MZSI se původní LD používají až 12. max. 14. den po inokulaci. Jelikož časový interval je klíčový bod při tvorbě těchto izolátů, Doudová (2013) upozorňuje na zvýšené riziko kontaminace jinými patogeny v při delší kultivaci MZSI, jak 14. dní. Ve své práci zjišťovala nejvhodnější náchylný genotyp *P. halstedii* pro tvorbu MSI. V průběhu optimalizace stanovila jako nejvhodnější náchylný kultivar slunečnice roční cv. Peredovik, jelikož nejlépe odolával otlakům a poraněním na pletivu, a tudíž neprojevoval výrazné patologické změny. To je ovšem v rozporu s výsledky Spring *et al.*, (1997), který používal k tvorbě LD cv. Giganteus. Doudové nejvíce vykazoval patologické změny. Dále pro následnou kultivaci určila objem vody 1 ml v jamce v destičce s 12 jamkami a teplotu pro pěstování v rozmezí 16-20 °C (Doudová, 2013).

3.3.2 Příprava rostlinného materiálu

Pro subkultivaci (k růstu a množení) *P. halstedii* je třeba pracovat s kultivary bez genů rezistence, tedy kultivary s vysokou mírou náchylnosti ke všem známým rasám *P. halstedii*. Autoři Trojanová *et al.* (2017) uvádí celou řadu kultivarů bez genů rezistence vhodných pro kultivaci *P. halstedii*, s to například: HA – 89 (Sackston *et al.*, 1990), HA – 288 (Mathew *et al.*, 2018), HA-300 (Gulya *et al.*, 1991), HA -302 (Gulya, 1996), HA-304 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012), HA-821 (Spring *et al.*, 1997), HA-850 (Gulya, 1996), giganteus (Spring *et al.*, 1997), Peredovik, Krasnodarets (Sackston *et al.*, 1990), inbrední linie INRA FU, BT, GB (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012) a AD-66 (Shindrova, 2005) nebo linie GK-70 (Virányi *et al.*, 1995).

Veřejné diferenciační linie slunečnice jsou nevhodnější díky dostupnosti semen. Oproti tomu kultivary jako např. Krasnodarets a jiné komerční hybridy nejsou pro testování vhodné, jelikož nejsou k dostání celoročně a nejsou distribuovány po celém světě (Trojanová *et al.*, 2017).

Při výběru diferenciační linie je dobré zvážit jaký typ slunečnice zvolit, obecně cukrářský typ slunečnice má větší děložní listy, oproti olejnatým odrůdám slunečnice. *P. halstedii* se udržuje inokulací semenáčku nebo se používají rostlinné části, např. pro metodu inokulace listových disků. Každá metoda má své výhody a je vhodná pro různé účely (Trojanová *et al.*, 2017).

Nejjednodušší způsob získání kultury *P. halstedii* je zasadit náchylný kultivar slunečnice v kontaminované půdě, která již obsahuje oospory *P. halstedii*. Pro kultivaci *P. halstedii* v laboratorních podmínkách je vhodná metoda inokulace semenáčku nebo listového disku (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.2.1 Desinfekce a klíčení osiva

Semenáčky by měli být před inokulací čisté bez známek kontaminace, aby se zabránilo úhynu rostlin během růstu. Toho lze dosáhnout desinfekcí semen zředěným roztokem chlornanu sodného (10% roztok SAVA) s malým množstvím povrchově aktivního mycího prostředku ke zvýšení smáčivosti osiva. Osivo je třeba namočit po dobu 2 až 15 minut, poté musí být opláchnuto pod tekoucí vodu z vodovodu (Trojanová *et al.*, 2017).

Klíčení desinfikovaných nažek může probíhat mnoha způsoby. Osivo se může rozložit v jedné vrstvě na tácku s filtračním papírem nebo vložit do mikroténového sáčku mezi dvě vrstvy („filtrační papír – buničina – filtrační papír“), tak aby se semena nedotýkala (Trojanová, 2014). Dalším způsobem je osivo rovnoměrně rozložit a uzavřít do nadepsané Petriho misky s jednou vrstvou filtračního papíru na dně. Do misky je třeba přidat destilovanou vodu tak, aby semena ve vodě stála, ale neplavala. Klíčení (inkubace) osiva lépe probíhá ve tmě za laboratorní teploty, nebo při pokojové teplotě, alternativně lze semena naklíčovat v kultivační skříni nebo ve fytotronu (Trojanová *et al.*, 2017; Trojanová, 2014).

Doba klíčení semen do optimální délky kořínku pro očkování je obvykle dva až tři dny, v závislosti na odrůdě a teplotě. Různé diferenciační linie vyžadují různý čas pro naklíčení kořínku dostatečné velikosti, proto kultivary s pomalejším tempem růstu lze připravit ke klíčení dříve než rychle rostoucí kultivary. Alternativou je vhodně naklíčené semenáčky uskladnit při teplotě 4 °C, než vyklíčí zbylé osivo (Trojanová *et al.*, 2017; Trojanová, 2014).

Pro inokulaci jsou vhodné zdravé semenáčky bez jakékoliv známky poškození a kontaminace s 1-2 cm dlouhým kořínkem a dobře vyvinutým kořenovým vlášením (Trojanová, 2014).

3.3.3 Příprava inokula a inokulace

Inokulum neboli suspenze zoosporangíí/zoospor v destilované vodě lze připravit buď z čerstvých, nebo zmrazených sporangíí. Gulya (1996) doporučuje použití čerstvých sporangíí z rostlin vypěstovaných ve skleníku (Trojanová *et al.*, 2017). Vhodnou alternativou k čerstvému materiálu, použitelnou pro inokulaci až 7 dní po sporulaci, mohou být nasporulované listy slunečnice uložené ve vlhkém prostředí při 4 °C (Trojanová *et al.*, 2017). Zoosporangia lze uchovat delší dobu pro pozdější testování v mrazáku při teplotě -20 °C, - 80 °C nebo zmrazit v kapalném dusíku. Podle Virányi (1985) a Trojanová *et al.* (2017) je životaschopnost zoosporangíí na děložních listech při -20 °C až 3 měsíce. Dále autoři Trojanová *et al.* (2017) uvádí, že skladováním při -80 °C mohou zoosporangia přežít i několik let, avšak životaschopnost zoospor s časem klesá. Toto tvrzení potvrzuje práce od Virányi (1985), který dokládá životnost zoosporangíí uchovaných na děložních listech až rok při teplotě -60°C. Několik soukromých společností v USA dokonce dokázalo obnovit životaschopnost patogenu po 8-12 měsících skladovaných při -20 °C. Podle Trojanová *et al.*, (2017) skladování zoosporangíí zmrazením v kapalném dusíku může uchovat životaschopné zoospory po dobu až 10 let. Obecně platí, čím nižší obsah vody uložené vzorky obsahují, tím delší je doba uskladnění a následná úspěšnost inokulace. Nutností je pro oživení izolátu patogenu výběr náchylného genotypu slunečnice bez genů rezistence (Trojanová *et al.*, 2017).

Inokulum se tvoří smytím sporulujících listů destilovanou vodou nebo nechlorovanou pramenitou vodou. Podle Gulya (1996) minimální množství Ca ve vodě zvyšuje účinnost infekce při inokulaci málo koncentrovaným inokulem. Trojanová *et al.* (2017) uvádí že minimální množství Ca je nezbytné pro rozvoj patogenních oomycet jako jsou *Pythium* a *Phytophthora* (Trojanová *et al.*, 2017).

Důležitá je koncentrace inokula, ta se stanovuje pod mikroskopem pomocí Burkerovy počítací komůrky. Vědci z různých zemí používají rozdílně koncentrovaná inokula. Vyhovující koncentrace inokula je 10 000 – 50 000 zoosporangíí/ ml, jelikož vyšší koncentrace inokula by mohla vyvolat příliš silnou infekci a tím způsobit předčasné odumření rostliny. Slunečnice jsou pak inokulovány metodami – WSI nebo SDI (viz. kapitola 3.3.4) (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.4 Metody inokulace

Existují tři hlavní metody inokulace, které lze použít k určení rasy (= fenotypu virulence) a to inokulace semenáčku ponořením do inokula WSI (Whole seedling inoculation), inokulace semenáčků dle Springa SDI nebo LDI, což inoulace listových disků / inokulace listových disků ponořením (Leaf disc inoculation, Leaf disc immersion) (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.4.1 Inokulace semenáčků ponořením do inokula (WSI – whole seedling inoculation)

Inokulace semenáčků (popsána Cohen *et Sackston*, 1973) se provádí inokulací klíčících semen diferenční sady slunečnice. Rostliny musí splňovat podmínky popsané pro subkultivaci izolátů *P. halstedii* (viz. kapitola 3.2.2) a musí být i stejným způsobem ošetřovány. WSI je možné provést několika způsoby, ale obecně nejvhodnější je metoda podle Gulya *et al.* (1991).

Inokulum by mělo být připraveno z čerstvých zoosporangií, která byla produkována přes noc. Koncentrace inokula by měla být mezi 20 000 - 50 000 zoosporangií/ml (Trojanová *et al.*, 2017).

Semenáčky každé diferenční linie slunečnice zbavené osemení a ponořené do inokula o vhodné koncentraci se v plastových flakonech (či malých Petriho miskách) inkubují ve tmě při teplotě 16-20 °C. Stejným způsobem se provádí přemnožování izolátu na semenáčky náchylných kultivarů *Helianthus annuus*. Po 3 h inokulaci by se semenáčky měli vysadit v řadách do vhodného substrátu.

Následuje 14-ti denní kultivace (viz. kapitola 3.3.5) za podmínek vhodných pro vývoj *P. halstedii*. Tato metoda inokulace však poskytuje téměř 100% infekčnost semenáčků a vyžaduje velké množství inokula (Trojanová *et al.*, 2017).

Metoda je vhodná k rutinnímu přemnožování patogenu na semenáčky náchylného kultivarů *H. annuus* cv. Peredovik/cv. Giganteus v případech, kdy je potřebné vyprodukovat poměrně velké množství zoosporangií pro další práci, či pro uchování přemožených izolátů (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.4.2 Inokulace semenáčku SDI

K určení rasy metodou inokulace semenáčku SDI (Goossen *et* Sackston, 1968) je nutné mít od každé diferenciacní linie nejméně 10 čerstvě naklíčených slunečnicových semen s dobře vyvinutým kořenovým vlášením. Semenáčky musí být zasazeny v řadách po 10 do substrátu tak, aby byly viditelné pro inokulaci (aby část semenáčku vyčnívala nad povrch). Koncentrace připraveného inokula se stanoví pomocí počítačí Bürkerovy komůrky (viz. kap. 4.4) nebo hemocytometru. Spočítá se objem inokula obsahující přibližně 10 000 zoosporangiií a pomocí automatické pipety se nanese na každý semenáček. Naočkovaný soubor linií zasypeme tenkou vrstvou substrátu. a následně se inkubuje 12 hodin ve tmě (přikryto černou fólií). Poté jsou diferenciacní linie slunečnice udržovány v normálních klimatických podmínkách ve skleníku či fytotronu. Vyhodnocení procesu se provádí po 14 – ti denní kultivaci (Trojanová *et al.*, 2017).

Výhodou této metody je malé množství použitého inokula a spolehlivost výsledků ve srovnání s předchozí metodou. Tento způsob inokulace je vhodný především pro inokulaci diferenciacního souboru při patotestech nebo pokud nemáme dostatek inokula pro metodu WSI (Trojanová, 2014).

3.3.4.3 Inokulace listových disků LDI

V poslední metodě testování virulence, inokulací listových disků LDI (Sackston *et* Vimard, 1988), jsou listové disky o průměru přibližně 12 mm vyříznuty z děložních nebo pravých listů 14 dní starých slunečnic. Tyto disky jsou okamžitě ponořeny do 3 ml čerstvě připraveného inokula s koncentrací v rozmezí od 20 000 do 50 000 zoosporangiií/ml a inokulováno ve tmě při teplotě 16-20 ° C po dobu 3 hodin (Trojanová *et al.*, 2017).

Inokulované listové disky lze kultivovat plovoucí na destilované vodě v příslušných uzavřených sterilních kultivačních destičkách nebo je lze umístit na navlhčenou buničinu umístěnou v podnosu a zakrytou sklem. Nejméně 15 listových kotoučů z každé diferenciacní linie je umístěno do řad abaxiální stranou nahoru, v zásobníku obsahujícím navlhčenou buničinu pokrytou filtračním papírem. Podnosy jsou pak zakryty sklem, aby se udržovala vysoká vlhkost a kultivovaly se v podmínkách vhodných pro *P. halstedii*. Listové disky jsou vyhodnocovány 5., 9., 12. a 15. den po inokulaci (Trojanová *et al.*, 2017).

Metoda LDI se nedoporučuje pro testování ras, neboť vyvolává falešně-pozitivní výsledky (Spring *et al.*, 1997). Odříznutá hrana listového disku by mohla usnadnit vstup do tkáně patogenu, který by byl zastaven rostlinnými bariérami (kutikuly, epidermis atd.). Mechanismy rezistence ve slunečnicích jsou pravděpodobně v kořenech nebo hypokotylech, a tak schopnost izolátu infikující listové disky nemusí být skutečným odrazem rezistence/náchylnosti. Nicméně, LDI je ideální pro fungicidní testy nebo klonální techniky (izolované mnosporangiální/ monosporické izoláty) (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.5 Kultivace inokulovaných rostlin

Inokulované slunečnice musí být pěstovány ve vhodném substrátu a za optimálních podmínek pro vývoj patogenu. Naočkované semenáčky mohou být zasazeny do půdy, písku, perlitu nebo různých směsí těchto substrátů. Růstový substrát by měl být sterilní, dobře odvodněný s nízkým obsahem dusíku. Trojanová *et al.* (2017) doporučují sterilizaci půdy jak v terénu, tak u komerčně dodávaných substrátů, aby se zabránilo kontaminaci jiným půdním patogenem (Trojanová *et al.*, 2017).

Gulya (1966) jako substrát doporučuje směs promytého písku a hrubozrnného perlitu v objemovém poměru 3:2. Výhodou tohoto substrátu je, že je levný, relativně sterilní a zadržuje potřebnou vlhkost. Nicméně neobsahuje dostatek živin a je tedy doporučeno použití ve vodě rozpustných hnojiv (Trojanová *et al.*, 2017).

Autoři Trojanová *et al.* (2017) podle svých zkušeností pro testy doporučují pouze zvlhčený perlit, který je relativně levný, sterilní, je dobře odvodněný ale zadržuje dostatek vlhkosti pro růst rostlin. Aby bylo zabráněno kontaminaci virem *P. halstedii*, který způsobuje hypovirulenci plísňě, je třeba květináče, tácy a další nástroje desinfikovat 1% roztokem KOH (Trojanová *et al.*, 2017).

Pro příznivý vývoj *P. halstedii* je vhodná relativně nízká teplota (16-20 °C) s teplotní optimem 19 °C. Obecně platí, že vyšší teploty (20-24 °C) jsou vhodné pro růst rostlin, zatímco nižší teploty (16-20 °C) jsou příznivé pro vývoj patogenů a sporulace, proto je teplota 19 °C příznivá jak pro růst rostliny, tak pro úspěšnou sporulaci. Při inokulaci metodou LDI by listové disky měli být kultivovány při nižších teplotách, aby se zabránilo hnití a rozkladu rostlinné tkáně před sporulací patogenu. Fotoperioda by se měla pohybovat v rozmezí od 12 do 16 hodin. Inokulované semenáčky by neměli být ani

v suchém ani v podmáčeném prostředí, aby rostlina vytvořila kořenový systém pro systémovou infekci a aby se zabránilo předčasné sporulaci a tím kontaminaci okolních rostlin (Trojanová *et al.*, 2017).

Inokulované rostliny by měly být pěstovány za výše uvedených podmínek 11 až 14 dní nebo dokud se neobjeví první pravé listy (cca 1 cm velké). V této fázi by měla rostlina již vykazovat známky systémové infekce a měla by být dostatečně silná na patogenní sporulaci. K indukci sporulace patogenu je obvykle potřeba 100% vlhkost po dobu min. 8 hodin, čehož se dá dosáhnout vložением květináče do sáčku nebo uzavřením do plastové bedny (předem navlhčené rozprašovačem s vodou pro dosažení 100% relativní vlhkosti). Kultivace semenáčků přesahující 14 dní, může skončit úhynem rostliny v důsledku silné systémové infekce. Na listových discích může dojít ke spontánní sporulaci již po pěti až 10 dnech. Aby se zamezilo křížovým kontaminacím měl by být listové disky v každé kultivační destičce inokulovány pouze jedním izolátem (Trojanová *et al.*, 2017).

3.3.5.1 Hodnocení patotestů

Pro hodnocení patotestů jsou běžně používané metody pro patosystém *Bremia lactucae-Pseudoperonospora cubensis*. Existují dvě základní metody (kvalitativní a kvantitativní) pro stanovení rezistence/náchylnosti slunečnice na patogen *P. halstedii*.

Kvalitativní hodnocení rezistence je vhodné pro screening šlechtěného materiálu, za to kvantitativní metoda je používána pro výzkumné účely v laboratoři (Trojanová *et al.*, 2017).

Interpretace výsledků testů patogenity i hodnocení míry sporulace je ovšem dost subjektivní. Existují ale semikvantitativní vyhodnocovací systémy (Tabulka 4) pro přesnější hodnocení sporulace (Trojanová *et al.*, 2017).

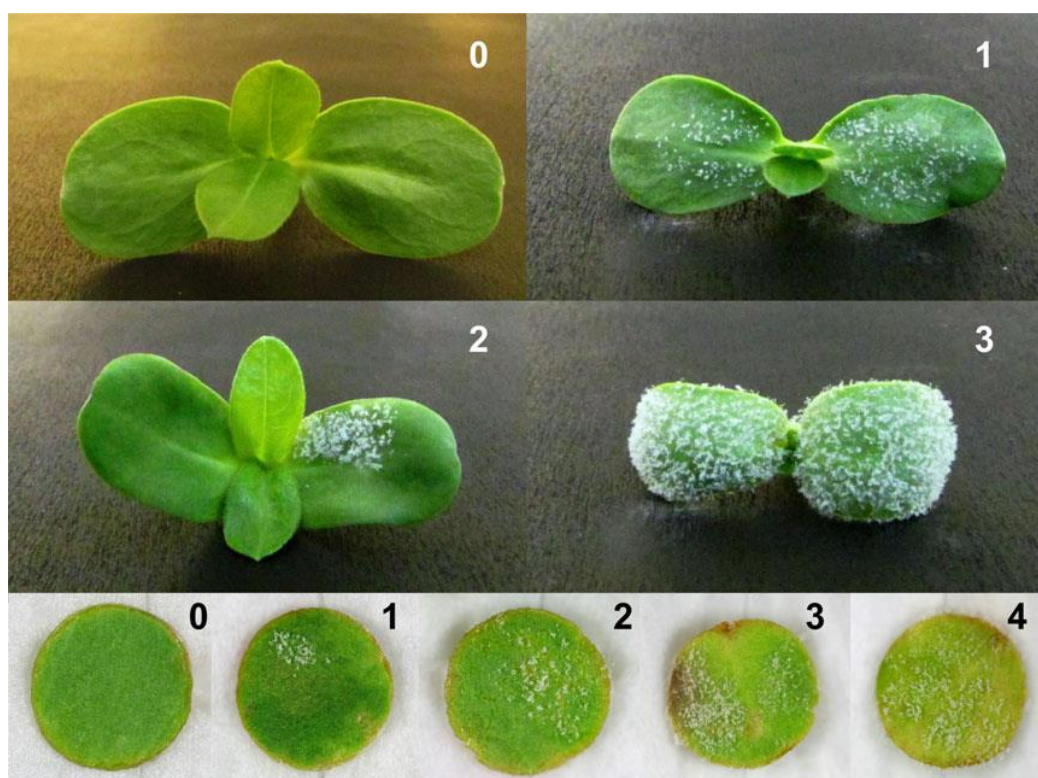
Gulya *et al.* (1991) popisuje pouze rezistentní a náchylné reakce inokulovaných rostlin, hlavním kritériem náchylnosti je pouze hojná sporulace a zakrňlost rostlin. Oproti tomu Tourvieille de Labrouche *et al.* (2000) použili čtyřstupňové hodnocení, RI (bez sporulace), RII (slabá sporulace na děložních listech), SI (sporulace na listech) a SII (silná sporulace na děložních listech), ale i toto hodnocení je dost nejednoznačné.

Trojanová *et al.* (2017) uvádí klasifikaci pomocí semikvantitativní stupnice 0-3 pro celé rostliny (vždy na 10 semenáčcích) nebo 0-4 pro hodnocení listových disků (na 15 listových discích) ve dvou opakujících se testech (Tabulka 4, Obrázek 12). I tak existují

izoláty, které nelze jednoznačně určit. V takových případech by bylo vhodné použít monosporické izolace (Trojanová *et al.*, 2017).

Tabulka 4: Semikvantitativní stupnice používaná pro hodnocení stupně napadení děložních listů *P. halstedii* (přetvořeno dle Trojanová *et al.* 2017).

STUPEŇ NAPADENÍ	MÍRA SPORULACE NA POVRCHU DĚLOŽNÍCH LÍSTKŮ V %	
	INOKULACE SEMENÁČKU	INOKULACE LISTOVÉHO DISKU
0	0 %	0 %
1	do 25	do 25 %
2	25-50 %	25-50 %
3	do 50 %	50-75 %



Obrázek 12: Semikvantitativní stupnice pro hodnocení stupně napadení *Plasmopara halstedii* na diferenciální linii slunečnice. a) pro hodnocení inokulovaných semenáčků (0-3) b) pro hodnocení inokulovaných listových disků (převzato z Trojanová *et al.*, 2017)

4 Materiál a metody

4.1 Příprava rostlinného materiálu *Helianthus annuus*

Pro udržování a množení izolátů *Plasmopara halstedii* metodou „whole seedling inoculation“ (WSI) byly použity náchylné genotypy slunečnice *Helianthus annuus* cv. *Giganteus* a cv. *Peredovik*, které nenesou geny rezistence vůči *P. halstedii*.

Semena náchylných kultivarů slunečnice používaných pro inokulaci semenáčků byla vložena do skleněné kádinky, kde byla povrchově desinfikována roztokem 10-15% Sava Original v destilované vodě. Do roztoku bylo pro zvýšení smáčivosti přidáno několik kapek detergentu (Jar na nádobí). Desinfekce probíhala po dobu 15 minut. Tento krok má zabránit kontaminaci semen s bakteriemi a plísněmi. Následně byla semena důkladně propláchnutá pod proudem čisté vody. Po zbavení zbytků desinfekčního roztoku byla semena přemístěná do Petriho misek, kde byla položena na filtrační papír, a zalita destilovanou vodou tak, aby neplavala a urovnána tak, aby se nedotýkala. Klíčení semen probíhalo po dobu dvou, až čtyř dnů v uzavřených Petriho miskách při pokojové teplotě 20 °C. Každý den byl stav semen kontrolován, v případě kontaminace bakteriemi, či plísní byla napadená semena odstraněná. Stejně bylo naloženo i s vyschlými nebo deformovanými semenáčky. Pro další práci byla vybírána semena s kořínky dlouhými 1 až 2 cm, z nichž bylo šetrně odstraněno osemení. Následně se semena použila pro inokulaci a pro růst nových rostlin. Naklíčené semenáčky byly vysázené do květináčů naplněných do $\frac{3}{4}$ dostatečně mokřím perlitem. Pěstování probíhalo odděleně od inokulovaných rostlin za optimálních podmínek při teplotě 22-25 °C po dobu 12–15 dní ve fytotronu.

4.2 Izoláty *Plasmopara halstedii*

Pro práci byly použity izoláty z vybraných pravděpodobně směsných vzorků *P. halstedii* z infikovaných rostlin slunečnic z ČR sbíraných v letech 2014 a 2016 a to izoláty 1405, ... Sběry vzorků byly provedeny, pod vedením doc. RNDr. Michaely Sedlářové PhD, pracovníky katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Pracovní kolekce, která byla vytvořena z originálních vzorků, dlouhodobě uložených v -80 °C, byla uchovávána při -20 °C.

Tabulka 5: Izoláty *P. halstedii* k vytvoření MSI

OZNAČENÍ IZOLÁTU	LOKALITA	ROK
1403	Podivín	2014
1405	Podivín	2014
1605	ZS ÚKZUZ Lednice	2016

4.3 Inokulace, udržení a množení izolátů *P. halstedii*

Pro udržování a přemnožení patogenu *P. halstedii* byly rostliny kultivovány podle upraveného postupu dr. Gulyi (Gulya, 1991). Semena náchylných genotypů slunečnice byla použita jak pro produkci listových disku, tak pro inokulaci semenáčků.

Inokulum bylo připraveno z čerstvých zoosporangií, které narostly na děložních lístcích infikovaných rostlin nebo ze zamražených zoosporangií, které byly uchovávány na děložních lístcích v alobalových sáčkích při teplotě -20 °C (viz. kap. 3.3.3). Část nasporulovaných děložních lístků bylo vloženo platového flakonu, kam bylo nalito 1-5 ml destilované vody (v závislosti na množství materiálu a intenzitě sporulace byl upraven objem vody). Flakon byl lehce promísen při nízkých otáčkách na třepačce, přičemž došlo k uvolnění zoosporangií do destilované vody. Poté byly ze suspenze sterilní pinzetou vytaženy zbylé děložní listy a pod mikroskopem zkontrolována kvalita inokula. Pro práci byla používána koncentrace 10 000 životaschopných zoosporangií v 1 ml.

Do připraveného inokula byly vloženy předem naklíčené semenáčky zbavené osemení. Samotná inokulace probíhala ve tmě při teplotě 19 °C během tří hodin. Během této doby byla za pomoci mikroskopu kontrolována přítomnost živých zoospor. Následně

byly semenáčky inokulované jednotlivými izoláty vysázeny do označených květináčů naplněných dostatečně zvlhčeným perlitem. Inokulované rostliny byly kultivovány v kultivační skříni nebo fytotronu při teplotě 19 °C s fotoperiodou (den/noc) 12/12 hodin zhruba 9-13 dní do doby, než se objevily první pravé listy. Následně byly rostliny navlhčeny a každý květináč byl zvlášť zabalen do mikrotenového sáčku pro zajištění 100 % vlhkosti k indukci sporulace. Kultivace probíhala dále ve tmě, při teplotě 19 °C po dobu cca 16-24 hodin, než se na povrchu rostlin objevila sporulace *P. halstedii*. Lístky s bílým povlakem sporangioforů byly odštířeny a použity k přípravě MSI, inokula pro patotesty, zmrazeny v -20 °C či opět použity pro přemnožení izolátu.

4.4 Identifikace ras *P. halstedii* metodou inokulace semenáčku (SDI)

Pro rozlišení fyziologických ras získaných monozosporických izolátů patogena byl použit soubor 15 diferenciacních linií slunečnice (osivo bylo získáno přesevem originálního osiva v letech 2015, 2016, 2017): *P. halstedii* *Helianthus annuus* GB, RHA-265, RHA-274; PMI-3, PM-17, 803-1; HAR-4, QHP-2, HA-335; Y7Q, PSC8, XA; PSS2RM, VAQ, RHA-419. Jako kontrolní linie byl použit náchylný kultivar slunečnice *Helianthus annuus* cv. Giganteus nebo Peredovik. Fyziologické rasy *P. halstedii* byly určovány metodou (viz. kap. 3.3.4.2) inokulace semenáčků pipetováním inokula, tzv. „soil drench inoculation“ (SDI) (Gulya 1998).

Jednotlivé diferenciacní linie byly připraveny podle postupu v kap. 4.1. Vždy po 10 semenáčcích z každé linie byly v řadách na táč zaplněný do dvou třetin vlhkým perlitem vysázeny naklíčené nažky. Suspenze zoosporangií *P. halstedii* v destilované vodě byla připravena z čerstvého materiálu konkrétního izolátu podle postupu popsání v kapitole 4.3. Poté pomocí Bürkerovy počítací komůrky za pomoci uvedeného vzorce byla spočítána koncentrace inokula:

$$X = \frac{1000}{0,04} \cdot Y$$

kde X = počet zoosporangií v 1 ml a Y = průměrný počet zoosporangií v 10 počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky. Množství inokula, která obsahuje asi 10 000 životaschopných zoosporangií se následně vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{10000}{X} \cdot 1000$$

kde Z = objem suspenze s 10000 zoosporangií a X = počet zoosporangií v 1 ml. Vhodné množství inokula pro inokulaci jednoho semenáčku je 20-40 µl. Pokud ale spočítaný objem neodpovídal požadovanému číslu, bylo nutné buď při vyšší koncentraci naředit inokulum destilovanou vodou nebo naopak přidat zoosporangia a znovu vypočítat koncentraci. Takto bylo postupně dosaženo správné koncentrace zoosporangií ve vhodném objemu.

Inokulum bylo naneseno na každý semenáček patotestu automatickou pipetou. Bylo přitom nutné dodržovat homogenitu inokula. Po inokulaci byla semena pokryta 0,5-1 cm vrstvou perlitu a táč přenesen do fytotronu, kde byl prvních 12-16 hodin přikryt tmavou fólií při teplotě 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc. Následující den byla fólie odstraněna a rostliny pěstovány za dodržení stejných podmínek třináct dní. Perlit bylo nutné udržovat vlhký. Po vypršení doby byly rostliny navlhčeny destilovanou vodou a přemístěny do neprůhledné bedny ve fytotronu (Obrázek 12), čímž byly vytvořeny ideální podmínky pro sporulaci. Bedna zůstala ve fytotronu při 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc. Po ukončení testu došlo k vyhodnocení patotestu, a to 14. a 21. den po inokulaci.

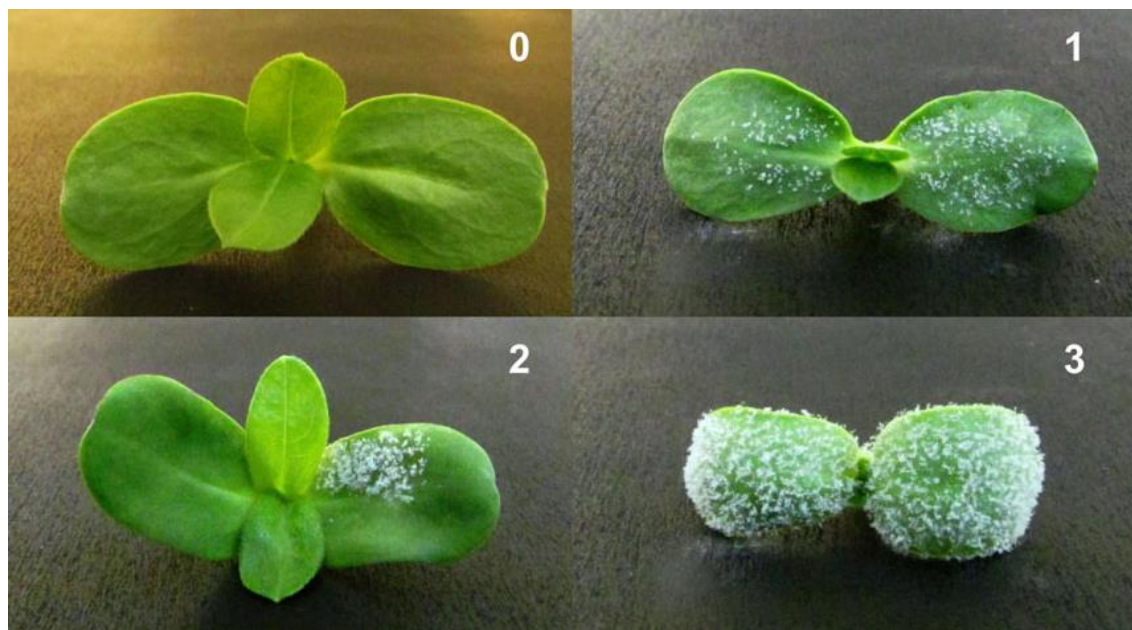


Obrázek 13: Patotest - pro stanovení fyziologické rasy *P. halstedii* před sporulací – vytvoření vhodných podmínek ke sporulaci 13. den po inokulaci semenáčku DSL daným izolátem (Převzato z Sedlářová *et al.*, 2020)

Hodnocení rasy spočívalo ve třech krocích. Jako první byla s pomocí semikvantitativní stupnice vyhodnocena míra napadení každé rostliny. Podle toho, kolik procent plochy listů bylo pokryto sporulací byl rostlině přidělen jeden ze čtyř stupňů napadení (Obrázek 13).

Tabulka 6: Semikvantitativní stupnice pro hodnocení patotestu

STUPEŇ NAPADENÍ	MÍRA SPORULACE NA POVRCHU DĚLOŽNÍCH LÍSTKŮ V %
0	0 %
1	do 25 %
2	nad 25 % a do 50 %
3	nad 50 %



Obrázek 14: Stupnice intenzity napadení slunečnice *P. halstedii*.

A – bez sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).

Následoval krok, kdy se určoval rozsah napadení pro každou diferenciační linii. Pro prokazatelnou náchylnost bylo třeba více než 70% napadení kontrolní linie (cv. Giganteus/Peredovik). V případě nižšího procenta napadení musel být test opakován. U patotestu se hodnotilo, zda je diferenciační linie k testovanému izolátu *P. halstedii*

náchylná nebo rezistentní. Třetím krokem byl stanovení pětimístného kódu podle pravidel tripletového kódovacího systému. Ten specifikoval výslednou rasu šetřeného izolátu.

4.5 Kapilární metoda izolace zoospor

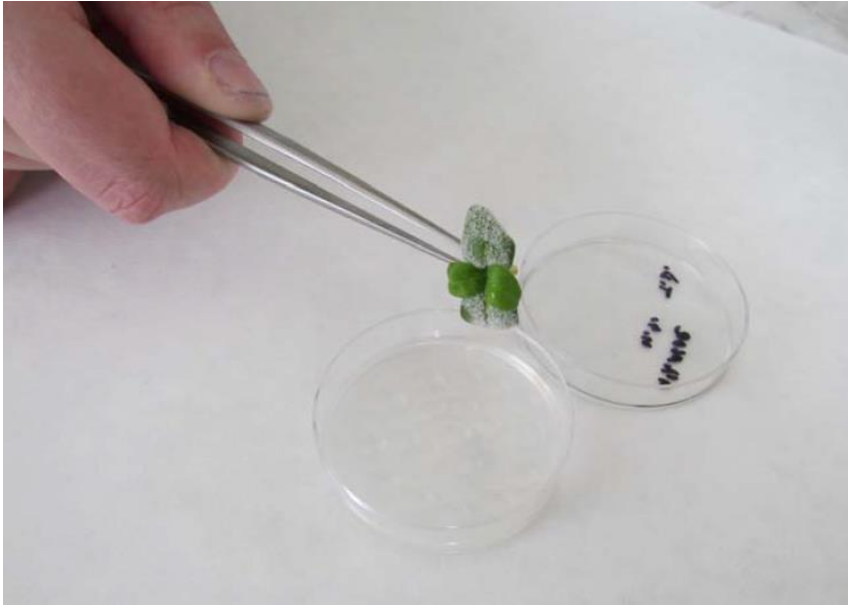
Tvorba monozoosporických izolátů spočívá v kultivaci sporangií, ze kterých se uvolňují dvoubíčíkaté zoospory, v kapkách vody na 1% agaru. Agarová plotna se tvoří rozlitím 3,5 ml 1% agaru na Petriho misku (Ø 6 cm). Následně byly na agar v Petriho miskách nakapány v dostatečné vzdálenosti od sebe kapky destilované vody (Obrázek 15).



Obrázek 15: Příprava agarové plotny pro odlov zoospor - nakapání destilované vody

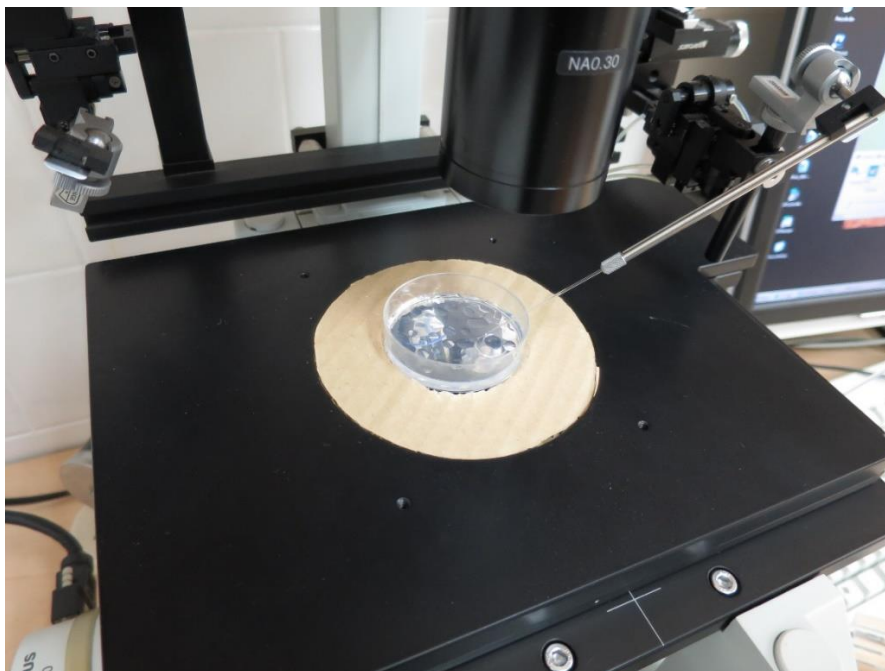
Sterilní pinzetou byly odebrány čerstvě nasporulované děložní lístky. Z výšky asi 5 cm byla na agarovou plotnu naprášena zoosporangia (Obrázek 16). Petriho misky byly následně utěsněny parafilmem, aby agar nebo kapky vody nevysychaly.

Následně byly Petriho misky kultivovány ve tmě při teplotě 19 °C po dobu asi 45 min, což je doba potřebná k uvolnění zoospor. Aby byl zachycen moment, kdy se začnou objevovat zoospory, což je chvíle, kdy začíná vlastní odchyt zoospor, byly misky pravidelně kontrolovány pod mikroskopem.



Obrázek 16: Naprášení zoosporangií na agarovou plotnu (převzato z Doudová, 2013)

Odchyt probíhal kapilární metodou pomocí mikromanipulátoru pod mikroskopem (Olympus) při stonásobném zvětšení. Před vlastním odchytem zoospor bylo nutné si nachystat pracovní místo. Pro usnadnění orientace bylo nutné umístit kapiláru doprostřed zorného pole (Obrázek 17).



Obrázek 17: Příprava před odchytem zoospor – umístění kapiláry naplněné unášející kapalinou doprostřed zorného pole.

Kapilára musela být naplněna destilovanou vodou (unášecí kapalina), kterou bylo nutné mezi jednotlivým odchytem odpouštět například do připravené buničiny, aby se zabránilo případnému zanesení kapiláry nečistotou či zoosporami z předchozí manipulace. Také bylo nutné mít nachystané kultivační destičky s destilovanou vodou (1 ml) a listové disky (žiletkou vyřezané čtverce o délce strany cca 0,5 cm) s narušeným povrchem na abaxiální straně pro snadnější proniknutí infekce

Po prasknutí jednotlivých sporangíí na agarové plotně se uvolňovaly zoospory. Odchyt zoospor probíhal opatrným přiblížením kapiláry ke kapce vody se zoosporami a následným nasátím právě jedné, pohybující se životaschopné zoospory. Ústí kapiláry se nasměrovalo k okraji kapky vody, která obsahovala životaschopné zoospory. V okamžiku spojení kapiláry s kapkou vody začala fungovat kapilarita a zoospory se začali pohybovat směrem ke kapiláře. Při troše zručnosti a hlavně velkému „štěstí“ se podařilo oddělit a následně pomocí mikromanipulátoru nasát právě jednu životaschopnou zoosporu. Je třeba pracovat rychle, jelikož zoospory jsou životaschopné jen po určitou dobu. Navíc kapky vody na povrchu agaru pod mikroskopem celkem rychle vysychají, obecně lze zoospory na agarové plotně odchyťovat přibližně 30 – 45 minut.



Obrázek 18: Sporangia *P. halstedii*, vlevo sporangium krátce před uvolněním 5 spor (převzato z Sedlářová *et al.*, 2020)

Nejlépe šlo odchyťávat zoospory uvězněné v malých kapičkách vody, které vznikly při vysychání větších kapek na povrchu agarové plotny. Takový odchyt zoospor s sebou nese jistá rizika, to že zoospora bude mrtvá nebo nebude schopná infikovat listový disk.

Právě jedna zoospora vtažená do kapiláry byla přenesena v kapce vody na listový disk, ideálně do středu na narušenou epidermis abaxiální strany, který byl opatrně pomocí zahnuté pinzety přenesen do jamky kultivační destičky s 1 ml vody.

4.6 Kultivace monozoosporických izolátů

V jamkách kultivačních destiček s 1 ml vody probíhala kultivace inokulovaných listových disků při teplotě 19 °C a fotoperiodě (noc/den) 12/12 hod. Prvních 12-16 hodin probíhala kultivace za tmy, poté probíhala kultivace při téže teplotě i fotoperiodě cca 6–12 dnů. Úspěšnou infekci naznačoval výskyt bílých povlaků sporangioforů v místě inokulace listového zoosporou (obr. Proto bylo nutností pravidelně disky kontrolovat pod binokulární lupou. Pokud se vyskytly na disku sporangioforu bylo třeba vzniklý MZSI inokulovat na další čisté disky.

Za pomoci binokulární lupy a sterilní jemné pinzety probíhala inokulace nově vzniklého MZSI na čisté listové disky. Přeočkování probíhalo tak, že do jamek kultivační destičky s 1 ml destilované vody byly vloženy listové disky náchylného genotypu slunečnice abaxiální stranou vzhůru. Sporangie se zoosporangii byly odebírány pomocí sterilní pinzety z povrchu disku s viditelnou infekcí patogenu a přeneseny do jamek kultivační destičky s destilovanou vodou a čistými listovými disky. Jedna generace sporangioforů z vytvořeného MZSI vystačí zhruba na inokulaci 3 nových listových disků. Přeočkování ze stejného MZSI, v případě výskytu další generace sporangioforů, lze praktikovat, dokud listový disk nevykazuje známky rozkladu.

Zhruba po 7-10 dnech se po úspěšné inokulaci na okrajích disku objevily sporangiofory, které sloužily jako zdroj inokula pro přeočkování dalších listových disků. Druhé přeočkování bylo provedeno tak, že zatřesením kultivační destičky vzniklo v jamce kultivační destičky u úspěšně inokulovaného disku inokulum, které bylo přepipetováno do jamek nové kultivační destičky a do požadovaného objemu doplněno vodou. Do jamek kultivační destičky se zředěnou suspenzí sporangioforů se sporami byly následně vloženy nové listové disky opět abaxiální stranou vzhůru. Po úspěšné inokulaci, přibližně po 7-10 dnech kultivace se na discích opět objevily sporangiofory. Setřepáním

3-4 silně nasporulovaných listových disků v kultivační destičce do vody vznikla dostatečně koncentrovaná suspenze sporangií pro inokulaci semenáčků. Inokulum bylo z jamek kultivační destičky přepipetováno do flakonu s cca 5-10 semenáčky náchylného genotypu slunečnice bez genů rezistence vůči *P. halstedii*. Dále se postupovalo podle postupu v kapitole 4.3.

Aby nedošlo ke kontaminaci nebo smíchání jednotlivých MZSI, bylo třeba při práci zachovat sterilitu. K desinfekci nástrojů byl použit 95% ethanol. Následně byly nástroje vyžihány v plameni. Kultivační destičky byly umyty jarovou vodou, destilovanou vodou a poté umyty v myčce. Všechny použité pomůcky včetně květinčů byly opláchnuty 1% KOH proti případné kontaminaci *P. halstedii* virem.

5 Výsledky

5.1 Vytvořené monozoosporické izoláty

Pro tvorbu monosporických izolátů (MNZI) byly vybrány směsné vzorky *P. halstedii*, které testování vykazovaly nejasné fenotypové reakce. Vzorky pocházely z infikovaných rostlin slunečnic z Lednice a Podivína.

MZSI se stejnorodou genetickou informací byly tvořeny z izolátů posbíraných v roce 2014 v Podivíně (izolát 1405) a v r. 2016 v Lednici (izolát 1605). Vzorek 1403 pocházející z Podivína se nepodařilo přemnožit.

Během několika měsíců se podařilo vytvořit 4 klony ze dvou mateřských izolátů. V případě vzorku 1405 sbíraného v roce 2014 v lokalitě Podivín se podařily vytvořit jeden klon. Po reakci bylo zjištěno, že jde o rasu 714 71. V případě vzorku 1605 pocházejícího z Lednice se podařilo vytvořit 3 MZSI. Podle výsledků fenotypové reakce tento izolát obsahuje směs ras 704 71 a rasu 714 71. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 7. Určení ras izolátů *P. halstedii* metodou inokulace semenáčků (SDI)

Rasy 5 vytvořených monosporických izolátů *P. halstedii* byly určeny metodou SDI na diferenciačním souboru slunečnice. Každá rasa byla označena vždy označena pětímístným číselným kódem. Číselný kód odpovídá fenotypové reakci pěti tripletů diferenciační sady slunečnice. Výsledky shrnuje tabulka.

Tabulka 7: rasy *P. halstedii* testovaných vytvořených MZSI

ROK	LOKALITA	ČÍSLO IZOLÁTU	MZSI	DATUM	DATUM	VÝSLEDNÁ RASA
				HODNOCENÍ	HODNOCENÍ	
				RASA	RASA	
2014	PODIVÍN	1405	K1	14.10.2017	30.08.2017	714 71
				714 71	714 71	
			K1	30.8.2017		714 71
				714 71		
2016	LEDNICE	1605	K2	3.10.2017	28.11.2017	704 71
				704 71	704 71	
			K3	19.09.2017	28.11.2017	714 71
				714 71	714 71	

6 Diskuse

Práce s biotrofním patogenem *Plasmopara halstedii* je v několika ohledech dosti náročná a vyžaduje praktické zkušenosti a znalosti spolehlivých metod. Nutností je předběžná kultivace hostitelských rostlin, jelikož se nedá pěstovat na (polo)umělých médiích. Kromě toho se u tohoto druhu objevují v rámci jednoho izolátu směsi několika patotypů / fyziologických ras. Ve studiu mechanismů interakce hostitel-patogen (např. studium efektorů patogenu) důležité nové poznatky přinášejí molekulárně-biologické metody, ale je potřeba použít výchozí materiál *P. halstedii*, který je geneticky homogenní, ideálně monozoosporické izoláty. V případě monosporangialního izolátu u *P. halstedii* totiž nemusí jít vždy o geneticky stejnorodý materiál, neboť každé sporangium obsahuje variabilní počet zoospor, které se mohou lišit v patogenní variabilitě. Aby byla zajištěna genetická homogenita, je třeba vytvořit monozoosporický izolát (Doudová, 2013; Spring *et al.* 2006).

Vytvoření monozoosporického izolátu (MZSI) u *P. halstedii* je časově náročný proces, který značně závisí na dovednostech pracovníka. Klíčovým krokem je znalost metody, která spočívá v dodržení správného postupu. Pro tvorbu MZSI *P. halstedii* je nejvhodnější kapilární technika pomocí mikromanipulátoru a izolace pod mikroskopem, ale její zvládnutí si vyžaduje hodně cviku, trpělivosti. Odchyt jednotlivých zoospor pomocí kapiláry musí být prováděn rychle, jelikož je za potřebí chytat pouze životaschopné zoospory a kapky vody se zoosporami rychle pod mikroskopem rychle vysychají. Ale ani přesná práce nám nezaručí jasný výsledek. Účinnost izolace MZSI velice nízká - Trojanová *et al.* (2017) uvádějí 1-2 %, Sakr *et al.* (2007) v závislosti na fyziologické rase úspěšnost 1.4 - 7.4%, Spring *et al.* (1998) cca 5%. Proto se pro studium patogenní variability na úrovni ras běžně používá metoda SDI a teprve v případě nejasných výsledků (směsný izolát) se tvoří MZSI.

V rámci této práce byly vytvořeny 4 MZSI ze 2 mateřských izolátů (1405, 1605, viz, kap. 4.2). Ze zmraženého materiálu byly přemnoženy izoláty pomocí metody WSI (inokulace ponořením do inokula viz. kap.3.3.4.2.) a kultivovány za optimální podmínek, jak je uvedeno v kap. 4.3. Čerstvá sporangia byla použita k tvorbě MZSI. Jednotlivé zoospory byly izolovány pomocí kapiláry připojené a ovládané pomocí mikromanipulátoru (kapilární metoda izolace zoospor, viz kap. 4.5) a následně inokulovány metodou LDI (inokulace listových disků viz. kap. 3.3.3.3) a kultivovány, jak je uvedeno v kapitole 4.6. Rasy byly určeny na základě fenotypové odezvy 15

diferenciálních linií slunečnice a označeny pětičíselným kódem pomocí metody SDI (viz. kap.4.4). Podle výsledků oba izoláty 1405 i 1605 obsahují rasu 714 71. Vzorek 1605 je směsí ras 714 71 a 704 71. Tvorba těchto izolátů je velice pracná, zvládnutí kapilární techniky si žádá hodně cviku a dovedností a úspěšnost izolací je minimální, závisí mimo jiné na životnosti zoospor, fyziologickém stavu pletiva listů, na které se zoospory přenášejí ke kultivaci, a genotypu slunečnice (Sakt *et al.*, 2007).

Jednotlivé pracovní postupy probíhaly dle T. Doudové (2013), která ve své bakalářské práci optimalizovala metody kultivace MZSI u *P. halstedii*. Stanovila dobu potřebnou k uvolnění zoospor, testovala nejvhodnější náchylný genotyp slunečnice pro přípravu LD, optimální množství vody v jamce při kultivaci inokulovaných LD a ideální teplotu pro kultivaci inokulovaných LD a vliv zatemnění na úspěšnost infekce. Doudová (2013) zhotovila 7 MZSI z izolátů posbíraných v roce 2012 v lokalitě Olomouc-Holice. Důvodem bylo, jak je prezentováno v BP T. Bartůška (2013), že řada těchto izolátů při stanovení kódu virulence pomocí souboru devíti diferenciačních linií slunečnice vykazovala smíšený fenotyp. T. Bartůšek (2013) navíc porovnal stanovení fyziologické rasy pomocí metod WSI a LDI, do té doby používané v některých laboratořích. Je nutné podotknout, že tyto metody poskytují falešně pozitivní výsledky a dnes se převážně používají k tvorbě MZSI (LDI) a přemnožování izolátů (WSI) (Trojanová *et al.*, 2017).

Autoři Sakr *et al.* (2007) tvořili monosporangialní izoláty díky kterým popsali 9 patotypů *P. halstedii* ve Francii. Konkrétně šlo rasy 100, 300, 304, 314, 700, 704, 710, 707 a 714. Tato metoda jim umožnila poprvé potvrdit přítomnost rasy 707. Jednotlivá sporangia izolovali na povrchu agarové plotny a inokulovali na LD také umístěné na pevné Knopovo medium. Izolace probíhala pod inverzním mikroskopem pomocí mikropipety. Sakr *et al.* (2007) popsali, že úspěšnost metody se pohybovala v rozmezí 1,4 -7,4 %. Spring *et al.* (1998) měli úspěšnost 5 % při izolaci zoospor a 15% při izolaci zoosporangií. Podle Trojanová *et al.* (2017) se účinnost monosporických izolací pohybuje v rozmezí 1-2%.

Podle vlastní zkušenosti byla průměrná doba kultivace sporangií při teplotě 19 °C, než mohl začít vlastní odchyt zoospor, zhruba 45 minut. Při práci s izoláty nastaly situace, kdy se zoospory uvolňovaly s velkým zpožděním nebo mnohem dříve. Tyto situace nastaly pravděpodobně díky přenášení Petriho misek z kultivační skříně nebo fytotronu pod mikroskop během kontrol. Opačná situace mohla nastat tak, že nasporulovaná rostlina byla skladována ve vlhkém prostředí což způsobilo předčasné uvolnění zoospor.

Doudová (2013) uvedla, že zoospory při teplotě 19 °C se uvolňují po 60 minutách kultivace. Zároveň uvádí, že některé izoláty reagovaly zcela odlišně (Doudová, 2013). V literatuře se objevují rozdílné optimální teploty jak pro inokulaci, tak pro kultivaci rostlin. Cohen *et Sackston* (1973) uvádějí teplotu 15 °C pro inokulaci a 20 °C pro kultivaci rostlin a Spring *et al.* (1997) optimální teplotu 16 °C a 21°C. Proto je výhodné stanovit optimální teplotu kterou Spring *et al.* (1998) stanovili na 19°C.

Doudová (2013) popsala problémy s izolací zoospor pomocí kapiláry z velkých kapek vody. Díky vlastní zkušenosti souhlasím s názorem, že zoospory se lépe izolují z vysychajících kapek. Jednotlivé zoospory byly přeneseny na listové disky náchylného genotypu slunečnice *Helianthus annuus* cv Peredovik/cv Giganteus. Doudová (2013) ze tří testovaných genotypů (*Helianthus annuus* cv Giganteus, Peredovik, HA-304) podle zjištěných výsledků radí pro metodu LDI použít kultivar slunečnice roční Peredovik naopak kultivar Giganteus zcela nedoporučuje. Sakr *et al.* (2007) také preferují kultivar Peredovik, a to jak přípravě listových disků, tak i při přemnožení izolátů. Výsledky Doudové jsou zcela odlišné od autorů Spring *et al.*, (1998), kteří navrhují k přípravě listových disků pro inokulaci zoosporou právě Giganteus. Metodika od Trojanové *et al.* (2017) poskytla celý výčet vhodných náchylných kultivarů a doporučila použití veřejných diferenciálních linií. Z vlastní zkušenosti můžu říci, že jsem používala kultivary slunečnice roční cv. Peredovik a cv Giganteus, častěji však Peredovik a to hlavně z důvodu lepší klíčivosti. Jinak jsem žádné zásadní rozdíly v reakci pletiv nezaznamenala.

Inokulace listových disků probíhala podle Doudové v kultivačních destičkách (12 jamek) s 1 ml destilované vody. Spring *et al.* (1998) LD kultivovali v 25 jamkových kultivačních destičkách se 750 µl destilované vody. Sakr *et al.* (2007) inokulované listové disky inkuboval v Petriho misce v inkubační skříni (18h/6h den/noc a 60 % vlhkosti)

Autoři uvedli, že míra sporulace závisí na životaschopnosti spor, fyziologickém stavu listů a náchylném genotypu slunečnice. To vyvrátilo domněnku Spring *et al.* (1998), že fyziologický stav rostliny není důležitým faktorem při produkci MZSI.

Míra sporulace listových disků nebyla příliš vysoká (od 3,4 – 12,2 %), podobný výsledek uvádí i Spring *et al.* (1998) při práci se stejným patogenem a Maisonneuve s patogenem *Bremia lactucae*. Sakr *et al.* (2007) ve své práci prezentuje výsledky získané osobní komunikací dalšími autory: získal v průměru méně než jeden nasporulovaný LD na 16 – 24 po 10-12 dnech inkubace se 16h/24h (den/noc) a 16°C/12°C. Za to Griefeldova

práce s *Plasmopara viticola* dosáhla skvělých výsledků (30-40%) po 5 dnech inkubace (16h/8h den/noc při teplotě 22 °C a 100 % vlhkosti).

MZSI se kromě molekulárních studií používají ke studiu tvorby oospor. *P. halstedii* je homothalický druh, ale při řešení otázky, zda je *P. viticola* heterothalický organismus, byly použity monosporické izoláty. Wong *et al.* (2001) studovali životní cyklus pomocí izolátů z pěti různých zemí. Výskyt oospor na LD naznačil, že patogen je heterothalický se dvěma skupinami párovacích typů izolátů (P1 a P2). Jednotlivé MZSI v rámci skupiny P1 nebo P2 nevykazovaly kompatibilní reakci. Jakmile byly P1 a P2 spárovány, u těchto MZSI došlo k pohlavnímu rozmnožování za vzniku oospor. Díky MZSI byl prokázán heterothalismus *P. viticola* (Wong *et al.* 2001).

MZSI hrají také důležitou roli ve studiu náchylnosti/rezistence k fungicidům. Genet *et* Jaworska (2013) prokázali, že přítomnost pouze 1% rezistentního izolátu v populaci *P. viticola*, způsobí rezistentní reakci vůči fungicidu. Tvorba MZSI u *P. viticola* může výrazně pomoci při studiu rezistence k fungicidům (Genet *et* Jaworska, 2013). U *P. halstedii* mnozí autoři popisují, že rezistence vůči fungicidům nesouvisí s fenotypem virulence = fyziologickou rasou. MZSI by mohly pomoci v podrobnějším studiu tohoto problému.

V průběhu této práce bylo prokázáno, že přibližně 70 % zoosporangií *P. halstedii* uvolňují zoospory, což je zcela dostačující pro izolaci zoospor i kultivaci MZSI. To bylo potvrzeno i v práci Doudová (2013). Totéž uvádí Spring *et al.* (1998).

7 Závěr

Od roku 2012 probíhá testování ras metodou inokulace semenáčků diferenciačních linií slunečnic, která umožňuje určení stupně náchylnosti či rezistence díky hodnocení fenotypu reakce celé rostliny, a tak lépe odpovídá polním podmínkám. Pomocí této metody jsou postupně testovány všechny dostupné izoláty ve sbírce katedry botaniky, Univerzity Palackého v Olomouci (především z let 2010–2019).

Ve své diplomové práci jsem se zabývala problematikou monozygotických izolátů plísně slunečnicové. Tyto izoláty nám dávají možnost pracovat s geneticky homogenním materiálem, díky tomu můžeme získat spolehlivé informace o rase patogenu. V případě *P. halstedii* je důležité vytvořit opravdu MZSI, abychom měli jistotu, že pracujeme s geneticky stejnorodým materiálem. Genetická homogenita výchozího materiálu je zásadní pro molekulárně – biologické metody, které nám přináší opravdu důležité vědomosti o mechanismech v interakci hostitel – patogen.

Pro získání čisté kultury v případě *P. halstedii*, jejíž hlavní infekční mechanismus spočívá v tvorbě pohyblivých zoospor, které je těžké izolovat, je vhodná kapilární technika. Úspěšnost izolace zoospor pod mikroskopem pomocí kapiláry připojené k mikromanipulátoru dosti závisí na dovednostech a zkušenostech pracovníka. Technika si žádá mnoho času a cviku. I přesto výsledek není vždy zaručen. Úspěšnost tvorby MZSI je velice nízká.

V rámci této práce se mi podařilo vytvořit mono(zoo)zygotické izoláty z mateřských izolátů 1405 a 1605.

8 Didaktická část – využití tématu „ve výuce na SŠ“

Problematika mé diplomové práce je v rámci výuky biologických předmětů na ZŠ a SŠ okrajovým tématem. Paraziti rostlin jsou obecně organismy způsobující infekce s různě závažnými příznaky a ekonomickým dopadem na kulturních plodinách. Původci rostlinných chorob jsou učební látkou, která se v hodinách vyučuje spíše v širších souvislostech a při výuce většinou na tento méně známý a úzce orientovaný okruh parazitických organismů není vyčleněn ani zdaleka takový prostor, jaký by si toto téma zasloužilo. S těmito patogeny se přitom běžně setkáváme v každodenním životě, ale studenti je neumí rozpoznat ani pojmenovat.

Důvodem je zřejmě skutečnost, že každá škola si svůj školní vzdělávací plán (ŠVP) tvoří sama a přizpůsobuje svým potřebám tak, aby splnila povinný rozsah i obsah vzdělávání, který vymezují rámcové vzdělávací programy (RVP) Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT). RVP vymezují tzv. „rámce“ pro jednotlivé etapy vzdělávání (předškolní, základní i střední, základní umělecké) a specifikují úroveň klíčových kompetencí, vzdělávací obsah, výstupy, podmínky vzdělávání, standardy. Rámcové vzdělávací programy vychází z Národního programu rozvoje vzdělávání v ČR (tzv. Bílé knize), který pro každý obor stanovuje Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy podle zákona č. 561/2004 Sb., o předškolním, základním, středním, vyšším odborném a jiném vzdělávání žáků od 6 do 19 let. Národní program pro vzdělávání (NVU) definuje počáteční vzdělávání jako celek. RVP i NVU představují tzv. státní úroveň v systému kurikulárních dokumentů. Vzdělávání na jednotlivých školách se uskutečňuje podle školního vzdělávacího programu (ŠVP), který si každá škola tvoří sama. Tyto ŠVP představují školní úroveň, podle které se vzdělávání a jednotlivých školách uskutečňuje.

V učebnicích je zmíněno jen pár parazitických druhů. Na gymnáziích je často používaná Biologie rostlin od Lubomíra Kincla a kolektivu autorů, kterou vydalo nakladatelství Fortuna (Kincl *et al.*, 2006). Z parazitických druhů se autoři věnují oddělení Plasmodiophoromycota, kde zmiňují nádorovku kapustovou, u odd. Oomycota vřetenatce révové a plísni bramborové, z oddělení Chytridiomycota rakovinovci bramborovému, u Basidiomycota hlívě ústříčné a u Ascomycota hlízence ovocné, paličkovici nachové a plísni šedé. Stručná zmínka je v učebnici věnovaná rzím, snětím a padlím. K reprezentativní řadě učebnic biologie pro studenty středních škol patří Botanika od Karla Kubáta z nakladatelství Scientia (Kubát, 2003), kde jsou parazitické

druhy rozdělené na obligátní a fakultativní. Pro názornost kniha obsahuje perokresby životních cyklů, plodnic a pletiv.

Oproti tomu *Biologie pro gymnázia* od Jana Jelínka a Vladimíra Zicháčka z nakladatelství Olomouc (Jelínek *et* Zicháček, 2006) je, co se týče informací o parazitických druzích, velmi stručná. Za zmínku stojí nákresy a popisy životních cyklů rzi travní a paličkovice nachové.

Jsem přesvědčená, že paraziti rostlin by měli v rámci výuky jak na základních, tak zejména na středních školách, dostat více prostoru. Vzhledem k tomu, že školy jsou dnes vybavené výpočetní technikou, mělo by být snazší předávat studentům potřebné informace záživnou formou. Posun ale není vidět, jak o tom ve své knize *Digitální demence* píše německý neurovědec Manfred Spitzer (Spitzer, 2014).

Jsem toho názoru, že studenty je třeba připravovat do běžného života a umožnit jim získat větší rozhled. Snad každý učitel by chtěl ve svých studentech zažehnout jiskru pro obor, který vyučuje tak, aby se mu věnovali ve svém profesním životě. Právě výzkum parazitů rostlin otevírá široké možnosti studia. Společenský a hospodářský dosah při úspěšném výzkumu by byl obrovský.

Didaktická část mé diplomové práce je zaměřena původce chorob rostlin ze skupiny oomycet. Materiál je možné využít při hodinách přírodopisu a biologie nejen na středních školách. Nejdříve bych studenty uvedla do problematiky, seznámila je s teorií a objasnila, jací parazité poškozují rostliny. V rámci domácí přípravy by žáci vypracovali projekt na jednotlivé parazity rostlin (viz kap. 8.2). Pro názornost bychom se následně vydali na vycházku a za vlhkého počasí sbírali vzorky pro mikroskopování. Poté bychom udělali praktické cvičení z biologie. Navrhla jsem laboratorní cvičení, ve kterém je úkolem žáků vytvořit nativní preparát odebraného mycelia plísně bramborové, který by následně pozorovali pod mikroskopem. Závěrem cvičení by nakreslili do laboratorního protokolu pozorované morfologické struktury a zapsali výsledky pozorování (viz. kap. 8.1.)

8.1 Praktické cvičení z biologie

Tabulka 8: Metodické pokyny pro učitele

Téma	Mikroskopické pozorování plísně bramborové
Začlenění do RVP	Biologie hub
Cílová skupina	SŠ
Výukové cíle	<p>Žák umí pracovat s mikroskopem.</p> <p>Žák dovede vytvořit mikroskopický preparát.</p> <p>Žák pozná jednotlivé pozorované struktury – sporangia, sporangiofory</p> <p>Žák popíše stavbu a funkci pozorovaných struktur</p> <p>Žák vlastními slovy popíše nepohlavní rozmnožování plísně bramborové</p> <p>Žák dovede vysvětlit praktický význam nativních preparátů při určování morfologických znaků plísní</p>
Klíčové kompetence	<p>Kompetence k učení</p> <ul style="list-style-type: none"> - žák si vědomě vytvoří sled kroků, které bude muset realizovat v průběhu laboratorní práce - žák si sám organizuje práci a po ukončení pozorování zhodnotí výsledek. - žák získává informace v rámci laboratorního cvičení z mikrobiologie na základě praktické činnosti a z výsledků čerpá ponaučení pro další práci <p>Kompetence k řešení problémů</p> <ul style="list-style-type: none"> - žák se během laboratorního cvičení z mikrobiologie učí rozpoznat a pojmenovat pozorované struktury - žák využívá dříve získané postupy při mikroskopování, které aplikuje při postupu řešení problémů - žák kriticky interpretuje získané poznatky, formuluje položené závěry - žák rozpozná, které informace k vymezení problémů či jeho řešení chybějí a doplní nebo uvede, jak by se daly získat <p>Kompetence komunikativní</p> <ul style="list-style-type: none"> - žák dokáže interpretovat dosažené výsledky laboratorního cvičení, případné nejasnosti řeší formou otázek k učiteli - žák je schopen porozumět odborným a abstraktním termínům, je schopen se sám vyjádřit vlastními slovy a formulovat výsledky pozorování a napsat odpověď laboratorního úkolu

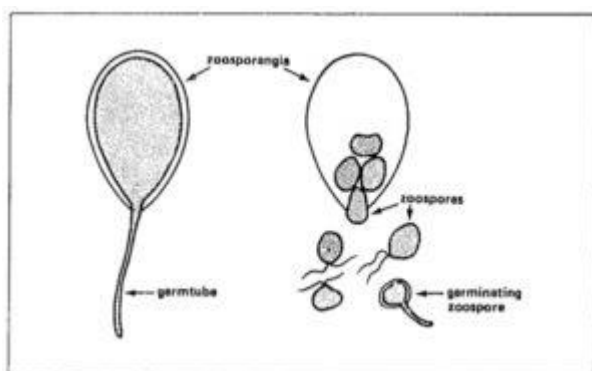
	<p>Kompetence sociální a personální</p> <ul style="list-style-type: none"> - žák se učí vytvářet sebehodnocení a zdokonalovat svou práci individuální i skupinovou. - žák projevuje zodpovědný vztah k vlastnímu zdraví a k zdraví druhých
Analýza prekonceptů	Žák umí zařadit oomycety do systému hub. Dokáže popsat základní charakteristiku oomycet, umí popsat životní strategie a rozmnožování řasovek. Vyjmenuje jednotlivé původce infekčních chorob rostlin.
Časová náročnost	1 vyučovací hodina
Mezipředmětové vztahy	Dějepis – choroby rostlin významné pro historii lidstva Zeměpis – zemědělství, regiony světa – lokalizace výskytu patogenů
Průřezová témata	Enviromentální výchova – lidské aktivity, problémy životního prostředí
Metoda výuky	Instruktaž, samostatná práce, žákovský experiment
Forma výuky	Frontální, skupinová, individuální
Pomůcky	Pracovní list, laboratorní protokol listy brambor nebo rajčat s projevy napadení plísní bramborovou mikroskop, podložní sklíčko, krycí sklíčko, preparační jehla, skalpel, pinzeta, kapátko, voda, bavlníková modř / Lugolův roztok / Melzerovo činidlo
Závěr	Laboratorní cvičení je vhodným doplněním probírané látky a mělo by být naplánováno, tak aby žáci měli učivo aspoň z části probrané, aby pro ně nebylo téma cizí. Laboratorní práce poskytují žákům možnost prakticky osvojit, upevnit a prohloubit získané vědomosti. Žáci se učí samostatně pracovat a lépe si zapamatují činnost, kterou sami dělali.

Teoretický úvod:

Na vegetativních i generativních orgánech řady rostlin se průběhu vegetační sezony objevují známky činnosti fytoparazitů. Tito paraziti rostlin způsobují typické změny na rostlinných orgánech – mohou se projevit tvarové či barevné změny a makroskopicky patrné struktury patogena, vyrůstající z rostlinných pletiv. Za vlhkého počasí (jako v r. 2020) je na bramboru a rajčatech vysoký výskyt plísně bramborové (*Phytophthora infestans*).

Plíseň bramborová je zástupce z oddělení OOMYCOTA – „houby vaječné“ nověji označované jako „řasovky“. Oomycety jsou organismy s celulózni buněčnou stěnou, ještě nedávno patřili do říše Chromista, ale byly přesunuty do fylogenetické větve SAR (Miesleová *et al.*, 2015). Plíseň bramborová napadá lilkovité rostliny (rajčata, brambory a další), na kterých způsobuje velké hospodářské ztráty, čímž se řadí mezi nejvýznamnější rostlinné patogeny. Prvním projevem infekce je vznik žlutých, později hnědých skvrn na listech, které postupně odumírají. Při vlhkém počasí se na spodní straně listu mohou objevit bílé povlaky sporangioforů. Patogen postupně napadá celou rostlinu, způsobuje hnilobu hlíz a smrt rostliny.

Sporangiofory s jednotlivými sporangii jsou struktury, které jsou dobře pozorovatelné na mikroskopickém preparátu. Sporangia spolehlivě poznáme – tvar citronu, sledujeme tzv. papilu, odkud sporangium klíčí. Za dostatečné vlhkosti prostředí sporangium klíčí zoosporami, nebo ze sporangia vyrůstá hyfa (houbové vlákno). Hyfa se po infekce v pletivu dále větví a nese další sporangiofory, nebo sporangium, ze kterého se za vhodných podmínek uvolňují dvoubičíkaté zoospory.



Laboratorní protokol	
Téma: Mikroskopické pozorování plísně bramborové	
Jméno a příjmení:	
Třída:	Datum:

Úkol: Vytvořte nativní a barvený preparát plísně bramborové.

Rostlinný materiál: listy brambor nebo rajčat s projevy napadení plísní bramborovou

Pomůcky: mikroskop, podložní sklíčko, krycí sklíčko, preparační jehla, skalpel, pinzeta, kapátko, voda, bavlníková modř / Lugolův roztok / Melzerovo činidlo

Pracovní postup:

1. Nastav mikroskop na nejmenší zvětšení.
2. Ze spodní strany listu infikovaného plísní bramborovou pomocí žiletky a preparační jehly sejmi kousek mycelia
3. a) Mycelium přenes do kapky vody na podložním skle
b) Mycelium přenes do kapky vody a podložním skle a přikápní kapku bavlníkové modři / Lugolova roztoku / Melzerova činidla
4. Přikryj krycím sklíčkem a pozoruj pod mikroskopem
5. Nejdříve při nejmenším zvětšení vyhledej sporangiofor se sporangiem, které následně prohlédneš při větším zvětšení.
6. Zakresli sporangiofory a sporangia, nezapomeň na uvedení použitého zvětšení.

Nákres:

Zvětšení:

Výsledky pozorování: / *popiš, co jsi viděl* /

8.2 Projekt

- Vyber si jednoho rostlinného parazita z třídy Oomycetes a vypracuj referát, prezentaci nebo „poster,“ který následně předneseš spolužákům.
- Vyhledej si základní informace a zajímavosti o tomto parazitu.
- Pro práci využij výpočetní techniku, naučnou literaturu.
- Ve své práci zařaď patogen do systému, shrň hostitelský okruh rostlin, na kterých parazituje.
- Popiš projevy choroby, infekční cyklus, případnou ochranu a léčbu před tímto parazitem. Pokus se vyhledat, zda zvolený patogen napáchal významné škody, ať v národním, či celosvětovém měřítku.

9 Literatura

- Bartůšek, T. (2013): *Patogenní variabilita Plasmopara halstedii a rezistence vůči metalaxylu v České republice*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- Berlese, A. N; De-Toni, J.B, 1888. Phycomyctetiae. In: Sylloge fungorum, VII:242.
- Bockisch, M. (1998) Fats and Oils Handbook. American Oil Chemists Society, Champaign, 175-344
- Bojňanský, V. (1956): Peronospora slnečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. & de Toni) v ČSR. Poľnohospodárstvo 3(3), 397-401.
- Bojňanský, V. (1957): Bude peronospora slnečnicová i u nás vážnou chorobou? Za vysokou úrodu 6, 19.
- CABI (2019): Datasheet: *Plasmopara halstedii* (downy mildew of sunflower). [<http://www.cabi.org/isc/datasheet/41911>]. Accessed 12 December 2019
- Carson, M.L. (1981): New race of *Plasmopara halstedii* virulent on resistant sunflowers in South Dakota [USA]. Plant Diseases 65(10), 842-843.
- Cohen Y., Rubin A.E., Galperin M. (2019): Novel synergistic fungicidal mixtures of oxathiapiprolin protect sunflower seeds from downy mildew caused by *Plasmopara halstedii*. PLoS ONE 14(9): e0222827. doi: 10.1371/journal.pone.0222827 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222827>
- Cohen Y., Rubin A.E., Galperin M. (2019): Novel synergistic fungicidal mixtures of oxathiapiprolin protect sunflower seeds from downy mildew caused by *Plasmopara halstedii*. PLoS ONE 14(9): e0222827. doi: 10.1371/journal.pone.0222827 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222827>
- Cohen, Y., Sackston, W. E. (1973): Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Botany 51(1): 15-22.
- Constantinescu, O., Thines, M. (2010): *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. Polish Botanical Journal 55(2), 293-298.
- Davis, W. H. (1930): "Single Spore Isolation," *Proceedings of the Iowa Academy of Science*, 37(1), 151-159. Available at: <https://scholarworks.uni.edu/pias/vol37/iss1/29>
- De Bary, A. (1876): Researches into the nature of the potato fungus, *Phytophthora infestans*. J. R. Agric. Soc. 12, 239–269.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard–Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. Infection, Genetics and Evolution 8(5), 534-540.
- 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.

- Doudová, T. (2013): *Techniky kultivace a izolace plísně slunečnicové*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- Drábková Trojanová, Z. Patogenní variabilita a studium interakcí v patosystému *Helianthus* spp. - *Plasmopara halstedii*. Olomouc, (2017): disertační práce (Ph.D.). Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika
- Drábková Trojanová, Z., Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Lebeda, A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflowers in the Czech Republic. *Plant Pathology* 67(1), 136-144. DOI: 10.1111/ppa.12722
- EPP0 (2014) PM 7/85 (2) *Plasmopara halstedii*. *Bull. OEPP/EPP0 Bull.* 44, 350-359. Wiley Online Library: <https://doi.org/10.1111/epp.12160> (24. 4. 2018) Forestry images: <https://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=11133> (4. 3. 2018)
- EPP0 (2019): Data sheets of quarantine pests: *Plasmopara halstedii*. [https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/fungi/PLASHA_ds.pdf]. Accessed 12 March 2019
- EPP0 (2008): PM 7/85 (1) *Plasmopara halstedii*. *Bulletin OEPP / EPP0 Bulletin* 38 , 343 - 348 . doi: 10,1111 / j.1365-2338.2008.01245.x2008.
- Farlow, W.G. (1883): Note on some species in the third and eleventh centuries of Ellis's North American Fungi. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 18, 65-85.
- Flor, H.H. (1955): Host–parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology* 45(12), 680–685. 84
- Gascuel, Q., Bordat, A., Sallet, E., Pouilly, N., Carrere, S., Roux, F., Vincourt, P., Godiard, L. (2016): Effector polymorphisms of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* and their use to identify pathotypes from field isolates. *PLoS One* 11(2), e0148513.
- Gascuel, Q., Buendía, L., Pecrix, Y., Blanchet, N., Muños, S., Vear, F., Godiard, L. (2017). RXLR and CRN Effectors from the Sunflower Downy Mildew Pathogen *Plasmopara halstedii* Induce Hypersensitive-Like Responses in Resistant Sunflower Lines. *Front Plant Sci.*7:1887. Published 2016 Dec 19. doi:10.3389/fpls.2016.01887
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M.C., Vear, F., Pichon, M., Godiard, L. (2015): The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology* 16(2), 109-122.
- Genet, J., Jaworska, G., 2012. Characterization of European *Plasmopara viticola* isolates with reduced sensitivity to cymoxanil. *European Journal of Plant Pathology*, 135(2), 383-393.
- Goh, T. K. (1999): Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Fungal Diversity* 2: 47-63.
- Göker, M., Voglmayr, A., Riethmüller, M., Weiss, M., Oberwinkler, F. (2003): Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. *Canadian Journal of Botany*, 81(7): 672-683, <https://doi.org/10.1139/b03-066>

- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2003): Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. *Can. J. Bot.* 81, 672–683.
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2003): Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. *Can. J. Bot.* 81, 672–683.
- Gulya, T.J. (1995): Proposal of a revised system of classifying races of sunflower downy mildew. In: Proceedings of 17th Sunflower Research Workshop. Fargo, ND, USA: National Sunflower Association, pp. 76-78. [http://www.sunflowernsa.com/uploads/research/686/1995_gulya_proposalrevisedssystem.pdf]. Accessed 12 March 2017.
- Gulya, T.J. (1996): Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. In: Proceedings of the 18th sunflower research workshop. Fargo, ND, USA: National Sunflower Association, pp. 39-48. [http://www.sunflowernsa.com/uploads/research/639/1996_gulya_everythingdowny.pdf]. Accessed 12 March 2017.
- Gulya, T.J. (2002): First report of cross-infectivity of *Plasmopara halstedii* from Marshelder to Sunflower. *Plant Disease* 86(8), 919.
- Gulya, T.J. (2004): A seedling bioassay to detect the presence of *Plasmopara halstedii* in soil. In: Spencer-Phillips, P., Jeger, M. (Eds.): *Advances in Downy Mildew Research, Volume 2*. Springer Netherlands, pp. 233-240.
- Gulya, T.J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N. (Eds.): *Advances in Downy Mildew Research*. Kostelec na Hané: JOLA and Palacký University in Olomouc, Czech Republic, pp. 121-134.
- Gulya, T.J., Masirevic, S., Thomas, C. (1993): Preservation of air-dried downy mildew sporangia in liquid nitrogen without cryoprotectants or controlled freezing. *Mycological Research* 97(2), 240-244.
- Gulya, T.J., Miler, J.F., Virányi, F., Sackston, W.E. (1991): Proposed internationally standardized method for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia* 14, 11-20.
- Gulya, T.J., Sackston, W.E., Virányi, F., Masirevic, S., Rashid, K.Y. (1991): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Journal of Phytopathology* 132, 303-311.
- Gulya, T.J., Urs, R. (1985): A new race of sunflower downy mildew (Abstr.). *Phytopathology* 75(11), 1339.
- Gulya, T., Rashid, K.Y., Masirevic, S.M. (1997): Sunflower diseases. In: Schneider, A.A. (Ed.): *Sunflower Technology and Production*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 263-380.
- Hanna, W. (1924): The dry-needle method of making monospore cultures of hymenomycetes and other fungi. *Annals of Botany*, 38(152), 791-795. Retrieved August 1, 2020, dostupné z www.jstor.org/stable/43237261

- Hansen, H. A (1926): simple method of obtaining single spore cultures. *Science* 64: 384. [Also *Phytopath.* 16: 763. 1926.]
- Hanzalová, A., Bartoš, P. (2015): *Rez plevová na pšenici a ochrana proti ní*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN isbn:978-80-7427-184-7.
- Heiser, C. B., Smith, D. M., Clevenger, S. B., & Martin, W. C. (1969). The north american sunflowers (*Helianthus*). *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 22(3), 1-218.
- Heller, A., Rozynek, B., Spring, O. (1997): Cytological and physiological reasons for the latent type of infection in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Journal of Phytopathology* 145(10), 441-445.
- Heller, H. H. (1921): Principles concerning the isolation of anaerobes. *Studies in pathogenic anaerobes. II. Jour. Bact.* 6: 445-470.
- 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.
- Ho, W. C., Ko, W. H. (1997): A simple method for obtaining single-spore isolation of fungi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38.
- Ho, W. C., Ko, W. H. (1997): A simple method for obtaining single-spore isolation of fungi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38. <https://www.zakonyprolidi.cz/ms/2019-16>
- Humann, R., (2016): *Development Of Management Tools For Sunflower Downy Mildew (Plasmopara Halstedii) And Rust (Puccinia Helianthi)*. PhD. North Dakota State University of Agriculture and Applied Science.
- Hurts, C. T. (1925): A simple micromanipulation and microinjection apparatus for low power work. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 44: 224-228.
- Chambers, R. (1935): Exploring living cells with microneedles. *Lit. Dig.* p. 17. Feb. 2,
- Choi, Y.J., Kiss, L., Vajna, L., Shin, H.D., (2009): Characterization of *Plasmopara* species *Ambrosia artemisiifolia*, and notes on *Plasmopara halstedii*, based on morphology and multiple gene phylogenesis. *Mycological Research* 113(10), 1127–36.
- Choi, Y.J., Park, M.J., Shin, H.D. (2009): First Korean report of downy mildew on *Coreopsis lanceolata* caused by *Plasmopara halstedii*. *Plant Pathology* 58(6), 1171
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3,29-38.
- Ishii, S., Tago, K., & Senoo, K. (2010): Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1281-1292.
- Ishii, S., Tago, K., & Senoo, K. (2010): Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(5), 1281-1292.

- Jocić, S., Miladinović, D., Kaya, Y. (2015): Breeding and Genetics of Sunflower. In: Martínez-Force, E., Dunford, N. T., Salas, J. J. (Eds.). Sunflower: chemistry, production, processing, and utilization. Elsevier, Urbana, IL, AOCS Press (1),1-25.
- Jung, S., Fladerer, C., Braendle, F., Madlung, J., Spring, O., Nordheim, A. (2010): Identification of a novel *Plasmopara halstedii* elicitor protein combining *de novo* peptide sequencing algorithms and RACE-PCR. *Proteome Sci* 8, 24 <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-24>
- Kaya, Y. (2016) Sunflower. In: Gupta, S. K. (ed.). *Breeding oilseed crops for sustainable production Opportunities and Constraints*. USA: Academia Press an Imperator of Elsevier, p. 55–88.
- Kaya, Y. (2016): Sunflower. *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 55-88 [cit. 2020-08-03]. DOI: 10.1016/B978-0-12-801309-0.00004-5. ISBN 9780128013090. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128013090000045>
- Kaya, Y., Josic, S., Miladinovic, D. (2012): Sunflower. In: Gupta, S. K. (Ed.), *Technological Innovation in Major World Oil Crops*, 1, Springer Press, New York, 85-129.
- Kazda, J., Říha, J., Stejskalová, M., Spitzer, T. (2018): Ochrana slunečnice roční (*Helianthus annuus*) proti chorobám a živočišným škůdcům podle zásad IOR. Uplatněná certifikovaná metodika pro praxi, ČZU FAPPZ, Praha, 2018, 57 s. ISBN 978-80-213-2818-1
- Keitt, G. W.(1915): Technique for isolating fungi. *Phytopath.* 5: 266-269.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. et Stalpers J. A. (2001): *Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Wallingford, CAB International.
- Komjáti, H., Walcz, I., Virányi, F., Zipper, R., Thines, M., Spring, O. (2007): Characteristics of a *Plasmopara angustiterminalis* isolate from *Xanthium strumarium*. *European Journal of Plant Pathology* 119(4), 421-428.
- Kormsny, A. *EPPO Global Database* [online]. [cit. 10.8.2020]. Dostupný na [www: https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos](https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos)
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006): Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92 p.
- Leppik, E.E. (1966): Origin and specialization of *Plasmopara halstedii* complex in the Compositae. *FAO Plant Protection Bulletin* 14, 72-76.
- Lister, J. (1878): On the lactic fermentation and its bearings on pathology. *Trans. Pathol. Soc. London.* (29)425-467. 1878.
- Ljubich, A., Gulya, T.J., Miller, J.F. (1988): A new race of sunflower downy mildew in North America (Abstr.). *Phytopathology* 78(12), 1580. 87
- Ljubich, A.; Gulya, T. J. (1988): Cotyledon-limited systemic downy mildew infection. *Proceedings of 1988 Sunflower Research Workshop, Bismarck, USA, National Sunflower Association*, 9.

- Mathew, F., Olson, T., Marek, L., Gulya, T., and Markell, S. (2018): Identification of sunflower (*Helianthus annuus*) accessions resistant to *Diaporthe helianthi* and *Diaporthe gulyae*. *Plant Health Prog.* 19: 97–102.
- Mattos, J.K.A., Pio, B.L.A., Gouveia, J., Inacio, C., Dianese, J.C. (2006): Primeiro relato de *Plasmopara halstedii* em *Ageratum houstonianum* (Asteraceae) no distrito federal, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 31(4), 413.
- Molinero-Ruiz, M.L., Domínguez, J., Melero-Vara, J.M. (2002): Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Disease* 86(7), 736-740.
- Nishimura, M. (1922): Studies in *Plasmopara halstedii*. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan* 11(3), 185–210.
- Noman, E., Al-Gheethi, A., Rahman, N., Talip, B., Mohamed, R. and Kadir, O., (2018): Single Spore Isolation as a Simple and Efficient Technique to obtain fungal pure culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 140, p.012055.
- Novotel'nova, N.S. (1962): *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et De Toni kak sbornyj vid (Obosnovanie k taksonomicheskomu podrazdeleniyu roda *Plasmopara* na slozhnotsvetnykh) / *Plasmopara halstedii* as a composite species (the basis for the taxonomic division of the genus *Plasmopara* on Compositae). *Botanicheskij Zhurnal (Moscow and Leningrad)* 47, 970-981.
- Novotel'nova, N.S. (1966): Downy mildew on sunflower. *Izdatelstvo „Nauka“, Moskva-Leningrad*. Translated from Russian, *Indian National Scientific Documentation, Hillside Road New Delhi*.
- Organonet.med.muni.cz. 2014. *Mikromanipulace S Buňkami - Principy, Možnosti A Technické Vybavení*. [online] K dispozici na: <http://organonet.med.muni.cz/media/62511/vy_05.pdf> [Přístup 25. července 2020].
- Pecrix, Y., Buendia, L., Penouilh-Suzette, C., Maréchaux, M., Legrand, L., Bouchez, O., Rengel, D., Gouzy, J., Cottret, L., Vear, F. and Godiard, L. (2019): Sunflower resistance to multiple downy mildew pathotypes revealed by recognition of conserved effectors of the oomycete *Plasmopara halstedii*. *The Plant Journal*, 97(4), 730-748. doi:10.1111/tpj.14157
- Qu T., Shao Y., Csinos A.S., Ji P. (2016): Sensitivity of *Phytophthora nicotianae* from tobacco to fluopicolide, mandipropamid, and oxathiapiprolin. *Plant Disease*, 100: 2119–2125. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0429-RE>
- Qu, T., Shao, Y., Csinos, A. S., Ji P. (2016): Sensitivity of *Phytophthora nicotianae* from tobacco to fluopicolide, mandipropamid, and oxathiapiprolin. *Plant Disease*, 100: 2119–2125. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0429-RE>
- Rivera, Y., Salgado-Salazar, C., Gulya, T.J., Crouch, J.A. (2016): Newly emerged populations of *Plasmopara halstedii* infecting *rudbeckia* exhibit unique genotypic profiles and are distinct from sunflower infecting strains. *Phytopathology* 106(7), 752-761.

- Roberts, J. W. (1923) A method of isolating single spores. *Phytopath.* 13: 12: 558. 1923.
- Rozynek, B., Spring, O. (2001): Leaf disc inoculation, a fast and precise test for the screening of metalaxyl tolerance in sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology* 149(6), 309-312.
- Sackston WE; Anas O; Paulitz T, (1992):. Biological control of downy mildew of sunflower. In: Abstracts of the American Phytopathological Society North-East Division Meeting, Portland, USA: 33.
- Sackston WE; Anas O; Paulitz T, 1992. Biological control of downy mildew of sunflower. In: Abstracts of the American Phytopathological Society North-East Division Meeting, Portland, USA: 33.
- Sackston, W. E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: Spencer, D. M. (ed.), *The Downy Mildews*, Academic Press, New York, 545–575.
- Sackston, W.E. (1981): The sunflower crop and disease: progress, problems, and prospects. *Plant Disease* 65(8), 643-648.
- Sackston, W.E. (1992): On a treadmill: Breeding sunflowers for resistance to diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 529–551.
- Sackston, W.E., Gulya, T.J., Miller, J.F. (1990): A proposed international system of designating races of *Plasmopara halstedii*. *Plant Disease* 74(9), 721-723.
- Sackston, W.E., Vimard, B. (1988): Leaf disc immersion (LDI) inoculation of sunflower with *Plasmopara halstedii* for in vitro determination of host-pathogen relationships. *Plant Disease* 72, 227-229.
- 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.
- Sakr, N., Ducher, M., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouche, D. (2007): A new method to obtain monozygospore isolates of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Cryptogamie, Mycologie* 28 (2): 123-131.
- Sedlářová, M., Dobešová, K., Lebeda, A. (2020): Plíseň slunečnice v České republice. *Agromanuál* 15 (5): 32-34. [https://www.agromanual.cz/cz/casopis-agromanual/agromanual-2020-5\(published\)](https://www.agromanual.cz/cz/casopis-agromanual/agromanual-2020-5(published))
- Sedlářová, M., Dobešová, K., Lebeda, A. (2020): Plíseň slunečnice v České republice. *Agromanuál* 15 (5): 32-34. [https://www.agromanual.cz/cz/casopis-agromanual/agromanual-2020-5\(published\)](https://www.agromanual.cz/cz/casopis-agromanual/agromanual-2020-5(published))
- Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic – short communication. *Plant Protection Science* 52(3), 182-187.
- Sedlářová, M., Stojaspal K., Lebeda A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České republice. *Rostlinolékař* 1: 17-20.
- 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.
- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 49(1), 1-10.
- Seiler, G. (1992): Wild sunflower as a potential source of resistance to downy mildew. In: Gulya T.J.,
- Seiler, G.J., Gulya, T. (2016). Sunflower: Overview. 10.1016/B978-0-08-100596-5.00027-5.
- Sharma, R., Xia, X., Cano, L. M., Evangelisti, E., Kemen, E., Judelson, H., Oome, S., Sambles, C., van der Hoogen, D.J., Kitner, M., Klein, J., Meijer, H.J.G., Spring, O., Win., J., Zipper, R., Bode, H.B., Govers., F., Kamoun. S., Schornack, S., Studholme, D.J., van der Ackerveken, G., Thines, M. (2015): Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. *BMC Genomics* 16(1), 741.
- Singh, K. P, Kumar, D., Bandyoadhyay, P. (2004): A new technique for single spore isolation of two preedacious fungi forming constricting ring. *Mycobiology*, 32 (4), 197-198
- Singh, K. P, Kumar, D., Bandyoadhyay, P. (2004): A new technique for single spore isolation of two preedacious fungi forming constricting ring. *Mycobiology*, 32 (4), 197-198
- Spring O. (2019): Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew – Review. *Plant Protection Science*, (55) 149–158.
- Spring O., Zipper R. (2018): New highly aggressive pathotype 354 of *Plasmopara halstedii* in German sunflower fields. *Plant Protect. Sci.* 54, 83–86.
- Spring, O. (2001): Nonsystemic infection 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. 90
- 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(2), 75-80.
- Spring, O., Benz, A., Faust, V. (1991): Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on the development and metabolism of sunflower/Auswirkungen der Infektion mit Falschem Mehltau (*Plasmopara halstedii*) auf die Entwicklung und den Stoffwechsel von Sonnenblumen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection* 98(6), 597-604.
- Spring, O., Gomez-Zeledon, J., Hadziabdic, D., Trigiano, N. R., Thines, M., Lebeda, A. (2019): Biological Characteristics and Assessment of Virulence Diversity in Pathosystems of Economically Important Biotrophic Oomycetes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 37(6), 439-495. DOI: 10,1080 / 07352689.2018,1530848

- Spring, O., Miltner, F., Gulya, T.J. (1994): New races of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in Germany. *Journal of Phytopathology* 142(3), 241-244.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1997): Leaf disc inoculation – a useful tool for selecting infections of sunflower downy mildew at low inoculum concentration, but inappropriate to pathotype characterization. *Journal of Phytopathology* 145(4), 189-191.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1998): Single spore infections with sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology* 146(11-12), 577-579.
- Spring, O., Thines, T. (2004): On the necessity of new characters for classification and systematics of biotrophic Peronosporomycetes. *Planta* 219, 910–914.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Oberwinkler, F. (2003): Characterization of *Plasmopara* isolate from *Helianthus x laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress* 2(3), 163-170.
- Spring, O., Zipper, R. (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research*, 110(6), 657-663.
- Spring, O., Zipper, R., Heller–Dohmen, M. (2006): First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113, 224.
- Syngenta. (2020) *Askon* | *Syngenta*. [online] Available at: <<https://www.syngenta.cz/produkt/ochrana-rostlin/fungicidy/askon>> [Accessed 5 August 2020].
- Thines, M., Göker, M., Oberwinkler, F., Spring, O. (2007): A revision of *Plasmopara penniseti*, with implications for the host range of the downy mildews with pyriform haustoria (DMPH). *Mycological Research* 111(12), 1377-1385.
- Tichá, M., Vyzínová, P., (2006): *Polní plodiny*. Brno: VFU, 2006. 44 s., dostupné na: <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/psenice.htm>
- Tichá, M., Vyzínová, P., (2006): *Polní plodiny*. Brno: VFU, 2006. 44 s., dostupné na: <http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/psenice.htm>
- Tourvieille de Labrouhe, D., Lafon, S., Walser, P., Raulic, I. (2000): A new strain of *Plasmopara halstedii*, a form of mildew that attacks sunflowers. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 7(5), 404-405.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Gulya, T.J., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K., Virányi, F. (2000): New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference*. Toulouse, France: International Sunflower Association, 61-66.
- Tourvieille De Labrouhe, D., Serre, F., Walser, P., Roche, S., Vear, F. (2008): Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* 164(2), 433-444.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P., Vear, F. (2012): Proposal for

- improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proceedings of the 18th International Sunflower Conference, Feb 27–March 1, 2012, Mar del Plata, Argentina: 322–327
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Serre, F., Roche, S., Vear, F. (2008): Relations between spring rainfall and infection on sunflower by *Plasmopara halstedii* (downy mildew). In: Velasco, L. (ed.) Proceedings of the 17th International Sunflower Conference Vol. 1. Cordoba, Spain, pp. 97-102.
- Trojanová, Z. (2010): Patofyziologie slunečnice: interakce s *Plasmopara halstedii*. Diploma thesis, Deposited at Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic.
- Trojanová, Z., Sedlářová, M., Gulya, T.J., Lebeda, A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower – a review. *Plant Pathology* 66, 171-185. 91
- Vear, F. (2016): Changes in sunflower breeding over the last fifty years. *OCL*, 23(2), D202. [http://www.ocl-journal.org/articles/occl/full_html/2016/02/occl160006-s/occl160006-s.html]. Accessed 5 August 2020.
- Vear, F. (Eds.): ISA Symposium III sunflower downy mildew. Fargo, ND, USA: International sunflower association, 113-121. [http://isasunflower.org/fileadmin/documents/Symposia/3rd_Symposium_on_Sunflower_Mildew__USA__1998/T03-113_-_Wild_Sunflower_as_a_Potential_Source_of_resistance_to_Downy_Mildew.pdf]. Accessed 20 March 2017.
- Virányi, F. (1988) *Plasmopara halstedii*. In: European handbook of plant diseases (Ed. By Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 228-230.
- 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 1. Kluwer Academic Publisher, London, UK, pp. 167-172.
- Virányi, F. (2018): CABI invasive species compendium. Datasheet *Plasmopara halstedii* (downy mildew of sunflower). Available at <https://www.cabi.org/isc/datasheet/41911> (accessed Jan 20, 2019).
- Virányi, F. <https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos> [online]. [cit. 11.8.2020]. Dostupný na WWW: <https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos>
- Virányi, F., Gulya, T.J. (1995): Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) from Hungary. *Plant Pathology* 44(4), 619-624.
- Virányi, F., Gulya, T.J., Tourvieille de Labrouhe, D. (2015): Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different continents. *Helia* 38(63), 149-162.
- Virányi, F., Spring, O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology* 129: 19-24.

- Voglmayr, H. (2008): Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1): 3–18.
- Voglmayr, H., Constantinescu, O. (2008): Revision and reclassification of three *Plasmopara* species based on morphological and molecular phylogenetic data. *Mycological Research* 112(5), 487-501.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildews with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial *LSU rDNA* sequence data. *Mycol. Res.* 108, 1011–1024.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiss, M., Oberwinkler, F. (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial *LSU rDNA* sequence data. *Mycological Research*, 108(9), 1011-1024.
- Walcz, I., Bogár, K., Virányi, F. (2000): Study on *Ambrosia* isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia* 23(33), 19-24.
- Wilson, G.W. (1908): Studies in North American Peronosporales – IV. Host Index. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 35(11), 543-554.
- Wong, F., Burr, H., Wilcox, W. (2001): Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 50(4), pp.427-432. 10.1046/j.1365-3059.2001.00573.x.
- Xue S., 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., 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(11), 1465-1467.

10 Seznam obrázků

- Obrázek 1 Zjednodušený fylogenetický strom podle Goker *et al.* (2003)
(Voglmayer *et al.*, 2004)
- Obrázek 2 Elektronová mikroskopie (SEM) Plasmopary (Gascuel *et al.*, 2015)
- Obrázek 3 Sporulující list mladé rostliny – sporangiofory se sporangii. Foto: F Virányi
- Obrázek 4 Životní cyklus *P. halstedii* (Trojanová 2010, původně Spring, 200)
- Obrázek 5 Obrázek 5: Sporangiofory se zoosporangii (převzato z EPPO, 2014)
- Obrázek 6 Obrázek 6: Sporangium *P. halstedii* a tvorba zoospor (EPPO, 2014, 2008).
- Obrázek 7 Sporulace *P. halstedii* na povrchu uměle naočkovaných děložních listů
(<https://gd.eppo.int/taxon/PLASHA/photos>)
- Obrázek 8 Obrázek 8: Příznaky systémová infekce *H. annuus*. (Sedlářová *et al.*, 2013).
- Obrázek 9 Projev latentní infekce - sporulace na hypokotylu
(www.eppo.int/taxon/PLASHA/photos) Foto: A. Kormany
- Obrázek 10 Obrázek 10: Lokální léze na listech *H. annuus* (Sedlářová *et al.*, 2020)
- Obrázek 11 Obrázek 11: Mapa distribuce *P. halstedii* (Spring, 2019)
- Obrázek 12 Semikvantitativní stupnice pro hodnocení stupně napadení *Plasmopara halstedii*
(Trojanová *et al.*, 2017)
- Obrázek 13 Patotest - pro stanovení fyziologické rasy *P. halstedii* před sporulací (Sedlářová
et al., 2020)
- Obrázek 14 Stupnice intenzity napadení slunečnice *P. halstedii*. (Trojanové *et al.*, 2017)
- Obrázek 15 Příprava agarové plotny pro odlov zoospor - nakapání destilované vody,
Foto: Nikol Krčová
- Obrázek 16 Naprášení zoosporangii na agarovou plotnu (Doudová, 2013)
- Obrázek 17 Příprava před odchytém zoospor – umístění kapiláry naplněné unášející
kapalinou doprostřed zorného pole. Foto: Nikol Krčová
- Obrázek 18 Sporangia *P. halstedii*, vlevo sporangium krátce před uvolněním 5 spor
(Sedlářová *et al.*, 2020)

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomický strom slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.)

Tabulka 2: Jeden z prvních seznamů *P. halstedii* hostitelské koncepce **sensu lato** v Severní Americe (Wilson, 1908)

Tabulka 3: Navrhovaný koncept **sensu stricto** a jeho spektrum hostitelů *P. halstedii* (Wilson, 1908)

Tabulka 4: Semikvantitativní stupnice používaná pro hodnocení stupně napadení děložních listů *P. halstedii* (Trojanová *et al.* 2017).

Tabulka 5: Izoláty *P. halstedii* k vytvoření MSI

Tabulka 6: Semikvantitativní stupnice pro hodnocení patotestu

Tabulka 7: rasy *P. halstedii* testovaných vytvořených MZSI

Tabulka 8: Metodické pokyny pro učitele