

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Determinace variability virulence v populaci plísně okurkové
(*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Nikola Vyslyšelová

Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Botanika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Rok obhajoby:	2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia podle pokynů vedoucího diplomové práce s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 8. 8. 2014

vlastnoruční podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc., za odborné vedení mé diplomové práce, poskytnutí odborné literatury, pomoc a ochotu.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Boženě Sedlákové, Ph.D. za pečlivé pročtení celé práce a poskytnutí cenných rad a připomínek v průběhu psaní, čas a ochotu vždy pomoc při vypracování této práce.

Poděkování patří také paní Drahomíře Vondrákové a paní Věře Zoubkové za ochotu a pomoc, kterou mi poskytly v rámci experimentální části mé diplomové práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Nikola Vyslyšelová
Název práce: Determinace variability virulence v populaci plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice
Typ práce: Diplomová práce
Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice
Vedoucí práce: Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Rok obhajoby práce: 2014

Abstrakt:

Pseudoperonospora cubensis je jedním z nejzávažnějších původců chorob rostlin čeledi Cucurbitaceae na světě. Výskyt tohoto patogenu z třídy Oomycetes je každoročně zaznamenán na území České republiky. Přirozená infekce je pozorována převážně na porostech *Cucumis sativus* a jen výjimečně na ostatních tykvovitých plodinách.

Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na determinaci variability virulence v populaci *P. cubensis* v České republice. Pro testování bylo použito celkem 118 izolátů pocházejících z různých krajů České republiky z let 2010-2012, převážně z porostů *C. sativus*, ale i z nových hostitelských druhů. Patogenní variabilita izolátů *P. cubensis* byla testována terčíkovou metodou v prostředí umělé inokulace s využitím diferenciačního souboru 12 genotypů z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003). Na testovaném souboru izolátů *P. cubensis* bylo determinováno 56 různých patotypů. Většina izolátů *P. cubensis* (75%) byla vysoce patogenní. Střední úroveň patogenity byla zaznamenána u 18% izolátů a nízká úroveň u 7% izolátů. Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru vůči *P. cubensis* se ve sledovaném období lišila, a to především v roce 2011 v porovnání s ostatními roky. Detekce vysokého počtu patotypů *P. cubensis* zaznamenaná v letech 2010-2012 potvrdila dlouhodobý trend českých populací *P. cubensis*, a to jejich značnou proměnlivost v prostoru a čase.

Klíčová slova: Cucurbitaceae, *Pseudoperonospora cubensis*, patogenní variabilita, patotyp, virulence
Počet stran: 84
Počet příloh: 1
Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Bc. Nikola Vyslyšelová
Title: Determination of virulence variability in populations of *Pseudoperonospora cubensis* in Czech Republic
Type of thesis: Master thesis
Department: Department of Botany, Faculty of Science
Palacky University in Olomouc
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holic
Supervisor: Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
The year of presentation: 2014

Abstract:

Pseudoperonospora cubensis is one of the most serious agents of disease for family Cucurbitaceae in a world. The presence of this pathogen in the Czech Republic observed every year. Natural infection is usually observed on *Cucumis sativus* and exceptionally on others cucurbit crops.

Experimental part of this master thesis is focused on determination of virulence variation in population of *P. cubensis* in Czech Republic. Set of 118 samples originated in different regions of Czech Republic from years 2010-2012 were used for testing, mostly samples of *Cucumis sativus*, but also from new host species. Pathogenic variability of isolates of *P. cubensis* was tested by leaf-disc method in an artificial inoculation using differential set of 12 genotypes of the family Cucurbitaceae (Lebeda and Widrlechner, 2003). Fifty-six different pathotypes of *P. cubensis* were determined on tested set of isolates. Most isolates of *P. cubensis* (75%) was highly pathogenic. Medium level of pathogenicity was observed in 18% of the isolates and the low level of 7% of the isolates. Resistance and susceptibility of differential genotypes set against *P. cubensis* in the period of observation differed mainly in 2011 compared with other years. High number of pathotypes of *P. cubensis* detected in 2010-2012 confirmed the long-term trend of Czech's *P. cubensis* populations and their considerable variability in space and time.

Key words: Cucurbitaceae, *Pseudoperonospora cubensis*, pathogenic variation, patotype, virulence
Number of pages: 84
Number of appendices: 1
Language: Czech

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
3.1	Taxonomie <i>P. cubensis</i>	10
3.2	Nomenklatura <i>P. cubensis</i>	10
3.3	Biologie a ekologie <i>P. cubensis</i>	11
3.3.1	Parazitismus <i>P. cubensis</i>	11
3.3.2	Životní a infekční cyklus <i>P. cubensis</i>	11
3.3.3	Šíření <i>P. cubensis</i>	15
3.3.4	Symptomatologie <i>P. cubensis</i>	15
3.3.5	Ekologické nároky <i>P. cubensis</i>	16
3.4	Hostitelský okruh	18
3.5	Geografické rozšíření <i>P. cubensis</i>	20
3.6	Hostitel	22
3.6.1	Taxonomie a význam čeledi Cucurbitaceae	22
3.6.2	Původ a charakteristika zástupců čeledi Cucurbitaceae	23
3.7	Interakce Cucurbitaceae – <i>P. cubensis</i>	26
3.7.1	Patogenismus	27
3.7.2	Patogenní variabilita <i>P. cubensis</i>	28
3.7.3	Variabilita hostitelů diferenciačního souboru v interakcích s <i>P. cubensis</i>	32
3.8	Genetické aspekty interakcí Cucurbitaceae – <i>P. cubensis</i>	35
3.9	Interakce na buněčné a molekulární úrovni	36
3.10	Genetická struktura populací <i>P. cubensis</i>	36
4	MATERIÁL A METODIKA	39
4.1	Izolace patogenů, kultivace a uchovávání	39
4.2	Rostlinný materiál	43
4.3	Determinace variability virulence	44
4.3.1	Metoda listových disků	44
4.3.2	Metody hodnocení	44
4.3.3	Stanovení úrovně patogenity	45
4.3.4	Tetrádový kód	46
5	VÝSLEDKY	47
5.1	Variabilita virulence izolátů <i>P. cubensis</i> v roce 2010	47
5.2	Variabilita virulence izolátů <i>P. cubensis</i> v roce 2011	51

5.3	Variabilita virulence izolátů <i>P. cubensis</i> v roce 2012	55
5.4	Srovnání variability virulence u izolátů <i>P. cubensis</i> v letech 2010-2012	59
6	DISKUZE.....	65
7	ZÁVĚR.....	75
8	LITERATURA	76
9	PŘÍLOHY	83

1 ÚVOD

Plíseň okurková způsobená patogenem *Pseudoperonospora cubensis* je nejvýznamnější listovou chorobou tykvovitých plodin na celém světě. Choroba se nejčastěji vyskytuje v tropických, subtropických a teplých oblastech mírného pásma. V současnosti působí tento patogen velmi destruktivně ve všech humidních oblastech světa, stejně jako v některých temperátních oblastech. *Pseudoperonospora cubensis* může přezimovat v oblastech s mírnými zimami (ve formě oospor) nebo může přežívat ve formě aktivního mycelia na pěstovaných nebo planých druzích z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Cohen, 2011). V USA přišli s myšlenkou, že do oblastí s chladnou zimou jsou oospory každoročně přenášeny větry z teplejších oblastí (Ojiambo a Holmes, 2011). Tato domněnka se nejspíše týká i České republiky, kde oospory dosud nebyly nalezeny. Existují zprávy o přežívajících oosporách z Ruska, Číny, Japonska, Indie a Itálie (Lebeda a Cohen, 2011).

Vzhledem k povaze životního cyklu (polycyklický) se *P. cubensis* rychle šíří, a to jak na polích, tak v chráněných prostředích. Infekce je způsobena zoosporami, kdy ke sporulaci dochází při relativní vlhkosti vyšší než 90%. Onemocnění tímto patogenem často devastuje porosty tykvovitých rostlin a je tedy vyžadována pravidelná fungicidní ochrana. *P. cubensis* je považována za rizikového patogena s vysokým evolučním potenciálem a velkou mírou přizpůsobivosti (McDonald a Linde, 2002).

Spektrum známých hostitelských rostlin *P. cubensis* je v současnosti rozšířeno o nové hostitele (Cohen a kol., 2003; Choi a Shin, 2008; Pavelková a kol., 2011). Rozdílné reakce hostitelských druhů na patogena *P. cubensis* jsou pravděpodobně důsledkem existence různých fyziologických ras anebo patotypů v různých zemích. Detailní studium virulence *P. cubensis* prokázalo existenci velkého počtu patotypů a potenciálních ras po celém světě (Lebeda a kol., 2006b).

Výsledky předložené diplomové práce jsou pouze dílčím příspěvkem ke studiu patogenní variability v populaci *P. cubensis* na území České republiky, kterým se dlouhodobě zabývá Fytopatologická laboratoř Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Tento výzkum je rovněž podporován i následujícími projekty: QH71229, MSM6198959215, PrF_2010_001, PrF_2011_003, PrF_2012_001, IGA_PrF_2014001.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo zpracovat dostupné informace o patogenu *P. cubensis* se zaměřením na variabilitu virulence, včetně nejnovějších poznatků z České republiky a ze Světa v návaznosti na předchozí bakalářskou práci.

Experimentální část zahrnovala determinaci variability virulence populace *P. cubensis* na území České republiky. Izoláty *P. cubensis* získané na území České republiky v letech 2010-2012 byly v prostředí umělé inokulace s využitím diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae využity k determinaci patotypů. Patotypy byly denominovány s použitím tetrádového kódu. Analýza patogenní variability *P. cubensis* společně s detailním vyhodnocením získaných výsledků bude sloužit k interpretaci změn patogenní variability populace *P. cubensis* v průběhu sledovaného období.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Taxonomie *P. cubensis*

Pseudoperonospora cubensis (Berk. a Curt.) Rostov. řadíme do říše Chromista, pododdělení Peronosporomycotina, třídy Peronosporomycetes, řádu Peronosporales (nepravá padlí = downy mildew), čeledi Peronosporaceae, rodu *Pseudoperonospora* (Dick, 2001). Rod *Pseudoperonospora* zahrnuje kromě druhu *P. cubensis*, dalších druhy: *P. humuli*, *P. cannabina*, *P. celtidis*, *P. urticae* (Savory a kol., 2011).

3.2 Nomenklatura *P. cubensis*

Druh *P. cubensis* byl poprvé popsán v roce 1868 Berkelym na rostlinném materiálu, který pocházel z Kuby. Odtud tedy pochází její druhové jméno *cubensis* (Skalický, 1961). V roce 1903 byl původní název *Peronospora cubensis* překlasifikován podle znaků zjištěných při pozorování klíčení sporangií. Jednalo se o první pozorování *P. cubensis* na živém materiálu v botanické zahradě v Moskvě (Skalický, 1961). Z hlediska diference větvení sporangioforů představuje rod *Pseudoperonospora* spp. přechodný typ mezi *Plasmopara* spp. (laterálně větvené sporangiofory s tupě zakončenými větévkami) a *Peronospora* spp. (větévky zašpičatělé) (Dick, 2001). Avšak tyto morfologické znaky nemohou poskytovat dostatečné informace. Sporangiofory se mohou měnit s teplotou a rozměry sporangií jsou dány hostitelskou rostlinou (Runge a Thines, 2012). Molekulárně fylogenetické studie řádu Peronosporales a čeledi Peronosporaceae demonstrují, že rod *Pseudoperonospora* je unikátní monofyletickou skupinou (Volgmayr, 2008). Tyto studie jsou potvrzeny dalšími morfologickými a molekulárními studiemi druhů tohoto rodu, které ukazují, že rod *Pseudoperonospora* je samostatnou taxonomickou jednotkou (Riethmüller a kol., 2002).

Vývoj českého názvu patogena *P. cubensis* zaznamenal několik změn. Lebeda v roce 1990 uvádí název plíseň okurková, zřejmě podle nejčastějšího hostitele okurky seté (*Cucumis sativus*) (Lebeda, 1990). Kúdela a kol. (2012) uvádějí nový český název, plíseň dýňovitých, zřejmě podle českého názvosloví hostitelských rostlin čeledi Cucurbitaceae – dýňovité podle paní Chrtkové (Chrtková, 1990).

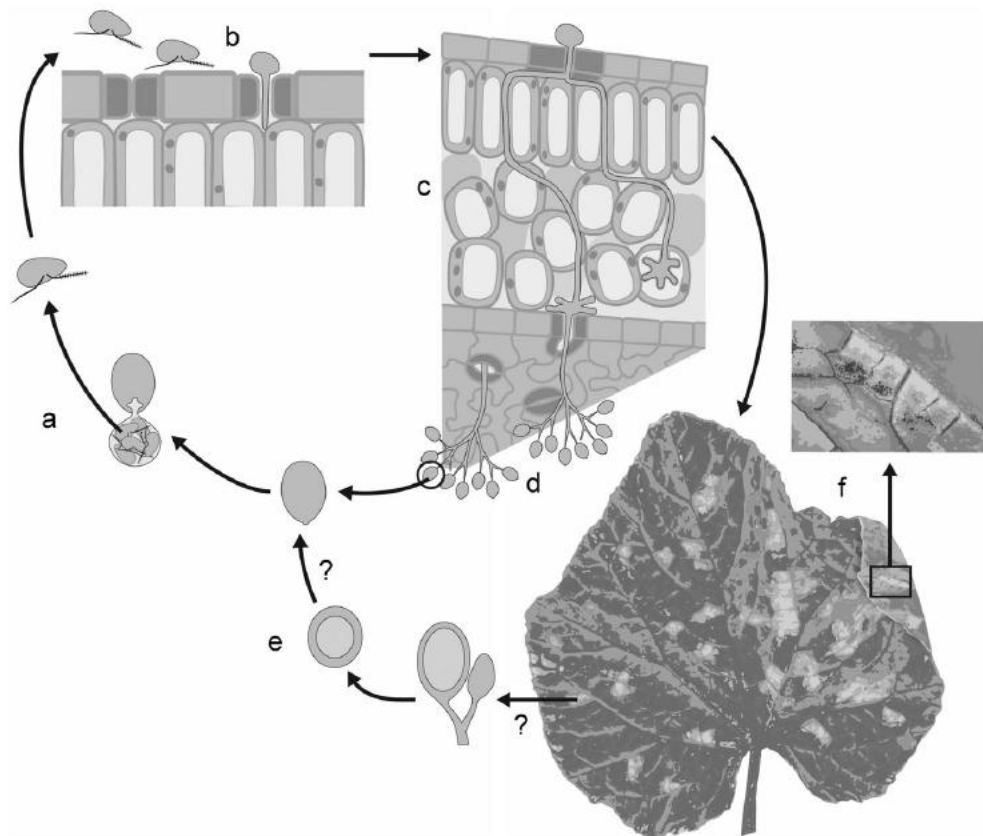
3.3 Biologie a ekologie *P. cubensis*

3.3.1 Parazitismus *P. cubensis*

P. cubensis je obligátní biotrofní parazit nadzemních částí rostlin čeledi Cucurbitaceae. Podléhá úplné nutriční závislosti patogena na hostitelské rostlině, kdy bez hostitelské rostliny není možná existence patogena (pouze ve formě oospor). Napadána jsou pouze živá pletiva rostlin, na nichž je schopen se rozmnožovat, pokud hostitelské pletivo odumírá, tak nepřežívá ani patogen. Jelikož *P. cubensis* patří mezi Oomycota neprodukující toxiny, nedochází tedy k usmrcování napadeného pletiva. U tohoto patogenu dochází pouze k uvolňování enzymu, u kterého byla zjištěna funkce degradace buněčné stěny (Lebeda a kol., 2006b). Na začátku napadení hostitele tímto patogenem dochází spíše k podpoře růstu a zvyšování počtu organel v buňkách (Lebeda a Schwinn, 1994). Na listech náchylných hostitelů se vytváří světle zelené až žlutozelené žilnatinou ohraničené skvrny. Skvrny postupně nekrotizují, zasychají, dochází k rozpadu pletiv mezi hlavními nervy (Rod a Ackermann, 1990). Nekrotizace začíná v centru léze, kdy na okraji této léze se nachází přechodová zóna typická pro sporulaci, kdy dochází k proniknutí patogena do hostitele pomocí haustorií, které čerpají živiny přímo z živých pletiv hostitele. Pomocí těchto haustorií jsou vysílány do hostitelského pletiva hyalinní coenocytická mycelia, která se rychle rozšiřují uvnitř buněk. V tomto složitém procesu nedochází ani k porušení buněčné stěny, ani plazmatické membrány a tak vzniká mezi buněčnou stěnou haustoria a cytoplazmatickou membránou napadené buňky štěrbina, v níž se hromadí živiny vstřebávané parazitem (Lebeda a Schwinn, 1994). U rezistentních hostitelů se objevuje primární nekrotická reakce, která má hypersenzitivní charakter (Lebeda a kol., 2006b).

3.3.2 Životní a infekční cyklus *P. cubensis*

Životní cyklus *P. cubensis* se vyznačuje dvěma odlišnými fázemi: pohlavní a nepohlavní (obr. 1). U *P. cubensis* je známa tzv. polycyklická infekce (tvorba několika nepohlavních generací v průběhu vegetační sezóny). Přezimování probíhá pomocí oospor (pohlavních spor) nebo jsou populace bez tvorby oospor každoročně obnovovány příchodem inokula z oblastí, kde se patogen vyskytuje každoročně (Lebeda a kol., 2006b).



Obrázek 1. Životní cyklus *P. cubensis* (Savory a kol., 2011)

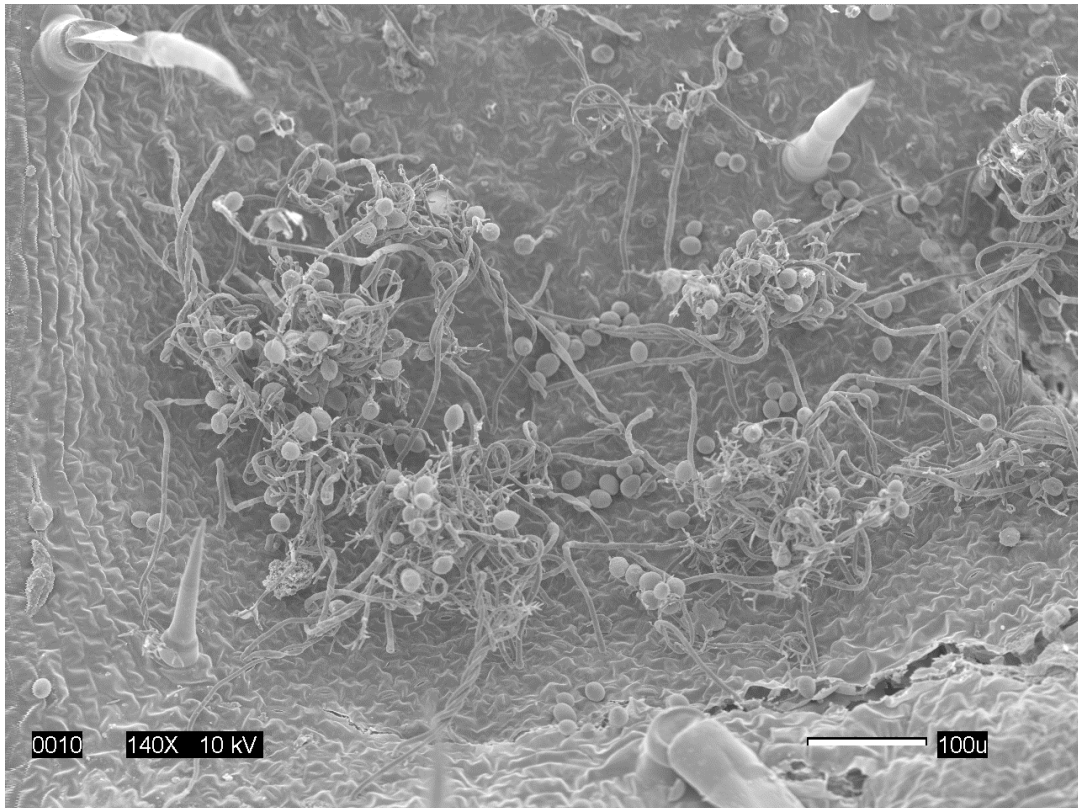
(a) vzduchem rozptýlená sporangia přistanou na povrchu listu a klíčí ve vlhkém prostředí za vzniku dvoubičíkatých zoospor, (b) zoospory se dostanou k průduchu a penetrují na povrchu listu, (c) hyfy kolonizující mezofyl a zakládají haustoria, která se vchlipují do membrán hostitelských buněk, (d) ke sporulaci dochází přes den, kdy z každého průduchu vyroste až 6 sporangioforů nesoucích na koncích sporangia. Sporangia se uvolňují ze sporangioforů změnami hydrostatického tlaku a jsou nesena proudem větru, který je zaneše k dalšímu hostiteli, (e) chlorotická, angulární skvrnitost je ohraničena listovou žilnatinou a jsou typickým symptomem infekce *P. cubensis* na svrchní straně listů *Cucumis sativus*, (f) role pohlavní fáze *P. cubensis* je zatím neznámá.

Nepohlavní fáze životního cyklu *P. cubensis* je zároveň také infekčním cyklem. Na začátku se na myceliu (průměr hyf 5,4 – 7,2 μm) vytvoří sporangiofory, které na koncích nesou nepohlavní spory (konidiosporangia, zoosporangia) tzv. zárodky primární infekce (obr. 2 a 3). Spory o velikosti 15-25 x 20-35 μm jsou zbarveny šedavě až černo-fialově a mají vejčitý až elipsoidní tvar. Většinou se na jednom sporangioforu vyvine kolem 20 spor, které se velmi snadno odlamují od rodičovských sporangioforů a jsou dále rozšiřovány větrem na velmi dlouhé vzdálenosti (anemochorie). Po styku spory s hostitelskou rostlinou dochází za vhodných podmínek (styk s vodou, příznivá teplota a vlhkost) ke klíčení. Klíčení má několik fází, nejprve po kontaktu spory s vodou se začnou uvolňovat dvoubičíkaté zoospory o velikosti 8-12 μm (v jednom zoosporangiu se jich vytvoří 5-15, jeden bičík mají hladký a druhý péřitý). Poté se zoospory pohybují pomocí bičíků směrem ke stomatům, kde ztrácejí bičíky a encystují

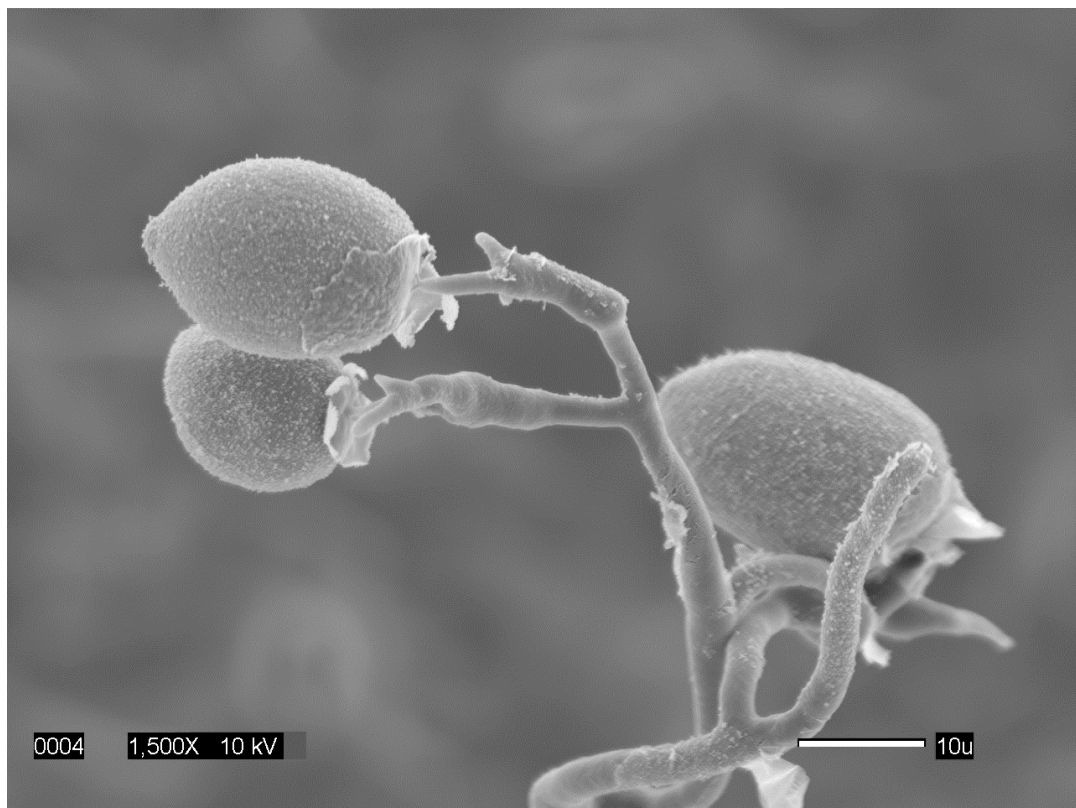
v průduchových štěrbinách (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a kol., 2006b). Ze vzniklé cysty následně vyrůstá klíčící vlákno, které vytváří apresorium z něhož vyrostou penetrační hyfy se schopností proniknout průduchovou štěrbinou do vnitřního pletiva listu (Sedlářová a Lebeda, 2002). Cenocytické mycelium v mezofylu se postupně rozrůstá a vytváří primární a sekundární vezikuly a následně haustoria. Během 5-7 dnů po napadení patogenem vyrůstají z průduchů na spodní straně listů sporangiofory. Penetrace přes průduchy je nejčastějším způsobem průniku do pletiva u *P. cubensis*, avšak vzácně se může objevit i přímá epidermální penetrace (Lebeda, 1990).

Pohlavní fáze u tohoto druhu fytopatogena probíhá obdobně jako u ostatních druhů Peronosporaceae. Není příliš častá a v mnoha zemích světa nebyla dosud prokázána. Také v České republice zatím nebyla zaznamenána u *P. cubensis* tvorba oospor. Zůstává tedy dosud nezodpovězeno, jak u nás patogen přežívá, jestli ve formě oospor (pohlavních spor) nebo příchodem inokula patogena z celoročně infikovaného území a právě tato druhá zmiňovaná varianta, že zdroj infekce u nás je způsoben vzdušnými proudy z jihovýchodní Evropy, které sebou přinášejí infikované spory, se zdá pravděpodobnější. „Zelený most“ je další možností *P. cubensis* přezimovat, jedná se o přežívání na chráněných kulturách tykvovitých rostlin např. ve sklenících. V oblastech s příznivějším klimatem např. v Indii nebo na jihu USA jsou schopny přezimovat aktivní mycelia *P. cubensis* v některých hostitelích (planých i kulturních) (Lebeda, 1990). V několika zemích světa však byl pohlavní proces zaznamenán a to v Rakousku, Izraeli (Cohen a kol., 2003), Indii, Iránu a v Číně (Lebeda a kol., 2006b). K pohlavnímu procesu dochází většinou koncem vegetační sezóny, kdy už začínají infikovaná pletiva hostitelských rostlin odumírat (Bedlan, 1989; Lebeda, 1990) a vytvářejí se v nich samčí anteridia a samičí oogonia tvořící se na vegetativních hyfách. Oogonium obsahuje oosféru, která posléze splývá se samčím anteridiem procesem zvaným oogametangiogamie (Lebeda a kol., 2006a). Výsledkem je odpočívající oospora, která je tlustostěnná, schopna přezimovat. Po přezimování oospora vyklíčí vláknem, na jehož konci se vytvoří zoosporangium (pouze za příznivých podmínek – teplota, vlhkost) a potom většinou následuje nepohlavní fáze životního cyklu (Kalina a Váňa, 2005).

Infekční cyklus *P. cubensis* odpovídající nepohlavnímu procesu a má několik fází. Cyklus začíná tvorbou sporangioforů a zoosporangií, následnou diseminací (uvolňování, šíření a depozice zoosporangií) a poté přímou infekcí (klíčení, penetrace a kolonizace). *P. cubensis* patří mezi velmi citlivé patogeny reagující na změny prostředí a ty mají později velmi silný vliv na průběh infekčního cyklu, proces patogeneze a exprese symptomů (Lebeda, 1990).



Obrázek 2. Sporangiofory a sporangia *P. cubensis* na listu – SEM (Colucci, 2008).



Obrázek 3. Sporangia *P. cubensis* na dichotomicky větveném sporangioforu – SEM (Colucci, 2008).

3.3.3 Šíření *P. cubensis*

Patogen *P. cubensis* se každoročně dostává do oblastí, kde nepřezimuje, pomocí spor ze vzdálených (teplejších) oblastí. V severních zeměpisných šířkách jsou primární infekce výsledkem každoročního rozšíření spor z jižních a jihovýchodních oblastí Evropy i USA (Holmes a kol., 2004, Ojiambo a kol., 2009). Studie z východu USA naznačuje, že se jedná o velké prostorové měřítko (cca 1000 km) v šíření patogena (Ojiambo a Holmes, 2011). Sporangia jsou na infikovaných listech, kde vznikají na vzduchu po snížení relativní vlhkosti vzduchu a při hygrokopických pohybech jsou uvolňovány do ovzduší (Lange a kol., 1989). Proto je nejvyšší koncentrace sporangií *P. cubensis* v pozdních dopoledních a časných odpoledních hodinách, kdy nastávají změny v relativní vlhkosti vzduchu (Cohen a Rotem, 1971). Hydrochorie (šíření vodou) představuje sekundární mechanismu šíření, kdy jsou spory distribuovány na krátké vzdálenosti (z listu na list a z rostliny na rostlinu), zejména při pěstování tykvovitých plodin na polích (Lebeda, 1999).

3.3.4 Symptomatologie *P. cubensis*

Podle příznaků napadení, které se u *P. cubensis* vyskytují zejména v oblasti listové čepule, se jedná o folikolního patogena. Ostatní části rostliny jsou napadány jen zřídka, např. u druhu *C. melo* bylo pozorováno napadení stonků, řapíků a květních stopek (Lebeda et al., 2006b). Mohou být infikovány jak semenáčky, tak i mladé a dospělé rostliny. Příznaky napadení se objevují zhruba po 4 – 12 dnech od napadení patogenem, inkubační doba je ale závislá na mnoha faktorech, především na podmínkách prostředí a reakci hostitele (Lebeda a Widrechner, 2003). Hlavní symptomem je tzv. angulární skvrnitost, kdy se na svrchní straně listů objeví světle žluté olejovité skvrny, které jsou ohraničeny listovou žilnatinou (obr. 4) (Lebeda a Cohen, 2011). Primární léze dosahují velikost 3 – 10 mm, kdy poté dochází ke spojení do větších skvrn během rozšíření infekce. Později se na spodní straně listů (v místech kde se na svrchní straně vyskytují léze) začíná objevovat šedavý až černofialový „poprašek“ sporangioforů se sporangii. Poté léze začínají nekrotizovat, až uschnou, což vede ke ztrátě listů a tím se zvyšuje procento výskytu dalších chorob na plodech. Pokud dojde k masivnímu napadení *P. cubensis*, tak nekrotizuje celá listová čepel a rostlina postupně odumírá, to se může stát i během 4-10 dnů, opět zaleží na podmínkách prostředí a genotypu hostitele (Lebeda, 1990). Symptomy mohou být značně variabilní v závislosti na genotypu. U druhů *Cucumis sativus* a *Luffa* spp. způsobuje *P. cubensis* nepravidelné, lokalizované léze, které jsou

ohraničeny listovou žilnatinou. Zatímco u druhů *C. melo* subsp. *melo* a *Citrullus lanatus* nejsou léze ohraňeny listovou žilnatinou a jsou kruhové a nepravidelné. Rozdíly se také objevují mezi velikostmi sporulujících tmavých oblastí na spodních stranách listů druhů *Cucumis sativus* a *Cucurbita pepo*. U druhu *C. pepo* je velikost menší (5-8 mm) oproti druhu *Cucumis sativus* (5-20 mm) (Lebeda a Cohen, 2011).



Obrázek 4. Symptomy napadení *P. cubensis* na listech *C. sativus* (E. Křístková).

3.3.5 Ekologické nároky *P. cubensis*

V následující kapitole jsou popsány faktory ovlivňující určité fáze infekčního cyklu *P. cubensis*. Mezi hlavní faktory patří teplota a vlhkost prostředí, světlo, koncentrace inokula a další faktory prostředí.

Počáteční fáze infekčního cyklu jsou ovlivňovány zejména životností sporangií, kdy se po oddělení od mateřského sporangioforu musí rychle dostat do styku s vodou na povrchu listu hostitelské rostliny. Voda je nezbytně nutný element k vyklíčení spor a tvorby primárních infekčních struktur (Lebeda, 1990). Záleží také na časových podmínkách orosení, kdy minimální doba orosení je přibližně 2 hodiny, za optimální dobu je považováno 6 hodin. Ke klíčení může sloužit i gutační kapka. Pokud v průběhu klíčení dojde k vyschnutí listů (cca 10-15 minut), může dojít k ukončení fáze klíčení a následné penetraci. K uvolnění zoospor ze sporangií nemůže dojít v přítomnosti inhibitorů respirace nebo v anaerobních podmínkách. Uvolňování zoospor je závislé na teplotě, za optimum lze považovat teploty mezi 9-30°C. Spory jsou schopné vydržet až 18 hodin ve vodě, ale za vyšších teplot encystují. Neoptimálnější teplota pro klíčení cyst je 25°C (Cohen, 1981). Dalším důležitým faktorem při procesu klíčení je světlo, jelikož intenzivní klíčení probíhá hlavně v noci. Konidiosporangia vyklíčí za optimálních podmínek do

2-3 hodin a první penetrace u nich může nastat už po 5 hodinách po přilnutí spor na povrchu listu (Lebeda, 1990).

Inkubační doba je velmi závislá na klimatických podmínkách, zejména teplotě, kdy je zde významné střídání denní a noční teploty. Dalším důležitým faktorem je intenzita osvětlení, čím větší intenzita osvětlení, tím větší rozvoj hyf a haustorií v pletivu. Optimální inkubační doba je mezi 4 až 12 dny. Příznaky napadení jsou nejvíce ovlivněny koncentrací inokula, při vysoké koncentraci se mohou symptomy projevit už 3-4 dny po inokulaci (cca 1000 sporangii/cm² listu). Další vývoj symptomů a kolonizace pletiva patogenem je významně ovlivněn teplotou. Projevy napadení jsou podporovány vyššími teplotami narozdíl od kolonizace pletiva, kterému vyhovují nižší teploty (Cohen, 1981; Lebeda, 1990).

Sporulace je velmi ovlivnitelná vnějšími podmínkami. Kvalita a intenzita světla patří k hlavním podmínkám optimální sporulace. Produkce spor probíhá zejména za tmy (v noci), naopak na světle dochází k zastavení produkce. Inhibiční působení světla je ovšem závislé i na teplotě, kdy roste se zvyšující se teplotou. Teplota zásadně ovlivňuje časovou náročnost procesu sporulace, při vyšší teplotě začne sice sporulace dříve, ale v důsledku nekrotizace také dříve skončí. Ovšem nižší teploty sice vyvolají sporulaci později, ale trvá delší dobu. Největší inhibiční účinky vykazuje modré světlo (Cohen, 1981). Na intenzitu sporulace má také značný vliv vybraný list hostitelské rostliny, zejména jeho stáří a odrůda. Na mladších listech je sporulace rychlejší a intenzivnější než na fyziologicky starších listech. Druh hostitele hraje významnou roli v počtu sporangií, kde u náchylných odrůd je počet v řádech tisíců např.: *Citrullus lanatus* až 4000/cm², *Cucumis sativus* až 7000/cm² a u *Cucumis melo* až 100 000/cm² listu. Záleží také na velikosti lézí, kde logicky malé léze mají větší hustotu sporangioforů než větší léze, nejspíše se jedná o lepší zásobení živinami z okolního zdravého pletiva. Chlorotické léze bývají více infikované než léze nekrotické (Cohen, 1981).

3.4 Hostitelský okruh

Hostitelský okruh *P. cubensis* je představován pouze čeledí Cucurbitaceae. Tato čeleď je relativně velká a zahrnuje cca 825 druhů v 118 rodech, jejichž původ je ve třech hlavních oblastech: Afrika a Madagaskar, Střední a Jižní Amerika, jihovýchodní Asie a Malajsie (Jeffrey, 1990). Současné taxonomické studie udávají rozličné počty druhů čeledi Cucurbitaceae. Zatímco Renner a kol. (2007) udávají 800 druhů ve 130 rodech (Renner a kol., 2007), v následující studii Schaefera a Rennera (2011) uvádí 950-980 druhů v 95 rodech (Schaefer a Renner, 2011). Na základě experimentálních výsledků z umělých inokulací a sledováním přirozeného výskytu *P. cubensis* patří mezi její hostitele 50 až 60 druhů z 20 rodů čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Cohen, 2011). Podle Cohena (1981) je celosvětově pěstováno asi 12 druhů z čeledi Cucurbitaceae a z nich je 9 napadáno *P. cubensis* v přírodních podmínkách, ale podle novějších informací je napadáno více kulturních hostitelů (Lebeda, 1990). *P. cubensis* napadá kromě kulturních druhů také druhy polokulturní, plevelné a planě rostoucí z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003).

U rodu *Cucumis* je známo nejvíce hostitelských druhů tohoto patogena (více než 30 planě rostoucích druhů). Druh *Cucumis sativus* a *C. melo*, společně s cca osmi planě rostoucími druhy *Cucumis* jsou známy jako přirození hostitelé *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003). Mezi další časté hostitele *P. cubensis* patří rod *Cucurbita* (tykev): *C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata* a *C. pepo*. Umělé inokulace v laboratorních podmínkách prokázaly, že *P. cubensis* může infikovat i mnoho planě rostoucích a plevelných druhů rodu *Cucurbita* (Lebeda a Widrlechner, 2003). Dalšími důležitými hostitelskými rody jsou *Citrullus*, *Lagenaria*, *Benincasa* a *Luffa*. U rodu *Citrullus* jsou dva druhy *C. colocynthis* a *C. lanatus* známy jako přirození hostitelé *P. cubensis*. Rod *Lagenaria* zahrnuje pěstovaný druh *L. siceraria* a společně s druhem *L. sphaerica* patří do hostitelského okruhu *P. cubensis*. *Benincasa* je monotypický rod zahrnující pouze druh *B. hispida*, který je také přirozeným hostitelem *P. cubensis*. Rod *Luffa* je reprezentován sedmi druhy, z nichž dva druhy *L. acutangula* a *L. cylindrica* jsou napadáni *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003; Seshadri a More, 2009). Výskyt *P. cubensis* byl zaznamenán i na planě rostoucím druhu *Bryonia dioica* (Runge a Thines, 2008).

Ve střední Evropě, zejména v České republice je pěstován pouze omezený počet druhů kulturních plodin v čeledi Cucurbitaceae (*Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita maxima*, *C. pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia* a *Citrullus lanatus*). Vzácně jsou pěstovány i druhy *Cucurbita foetidissima* a *Lagenaria siceraria* (Lebeda a Urban, 2004a,b). V České republice je hlavním přirozeným hostitelem *P. cubensis* druh *Cucumis sativus*, na kterém způsobuje patogen značné škody.

V roce 2007 byla zaznamenána infekce *P. cubensis* na druhu *Cucumis melo* v Koreji. Studie byla provedena ve fóliovníku na druhu *Cucumis melo* L. var. *makuwa* Makino roubovaného na Shintoza (*Cucurbita maxima* x *C. moschata*), kde byla zjištěna přirozená infekce. Infekce byla pozorována během dubna až června, zejména na listech (Yeon, 2007).

Další zpráva o napadení patogenem *P. cubensis* v Koreji pochází z roku 2008, kdy se jednalo o napadení druhu *Lagenaria siceraria*. *P. cubensis* byla objevena na porostech *L. siceraria* pěstovaných na polích v oblasti Hoengsong a byla sekvenována ITS rDNA. Porovnání sekvence v databázi GenBank potvrdilo, že testovaná sekvence ITS je identická s *P. cubensis* na hostiteli *Cucurbita moschata* (AY608619). Tímto se potvrdil první záznam o výskytu *P. cubensis* na druhu *Lagenaria siceraria* v Koreji (Choi a Shin, 2008).

Runge a Thines poprvé pozorovali infekci *P. cubensis* na druhu *Bryonia dioica* (posed dvoudomý), víceleté rostlině z čeledi Cucurbitaceae (Runge a Thines, 2008). Druh *B. dioica* je popínává bylina a využívá své úponky k přichycení na plotech a stromech (zejména v lužních lesích), pochází ze střední a jižní Evropy. Z navazující studie provedené na univerzitě v Hohenheimu, ve které byly použity kromě německých izolátů také izoláty *P. cubensis* z České republiky z fytopatologické laboratoře UP v Olomouci (26/01, 39/01 – Olomouc), se ukázalo, že české izoláty *P. cubensis* mnohem častěji infikovaly druh *B. dioica* na rozdíl od izolátů německých. Mikroskopická analýza vzorků infikovaných listů druhu *B. dioica* ukázala, že morfologie sporangioforů *P. cubensis* se nelišila od těch, které byly získány z infikovaných listů *C. sativus*. Symptomy napadení *B. dioica* patogenem *P. cubensis* jsou odlišné od napadení okurek tímto patogenem, kdy u *B. dioica* není sporulace omezena listovou žilnatinou. Tato studie podporuje hypotézu, že *B. dioica* jako víceletá rostlina má potenciál fungovat jako hostitel *P. cubensis* umožňující přezimování v chladnějších oblastech Evropy a to buď prostřednictvím semen nebo stonkových částí pod zemí (Runge and Thines, 2008).

První zprávy o napadení *Cucurbita moschata* (Duchesne) *P. cubensis* v České republice pocházejí ze srpna 2009 a opakovaně ze září 2010 (Pavelková a kol., 2011). Infikované rostliny byly nalezeny na dvou lokalitách, a to na severní Moravě (lokalita Nový Jičín – Kojetín) v roce 2009 i 2010 a druhý na střední Moravě (Olomouc-Holice) v roce 2010. Po napadení se objevily malé hranaté, žluté nebo světle žluté léze na horní straně listů *C. moschata* a na spodní straně listů byly přítomny sporangiofory a sporangia. Léze byly ohraničeny listovou žilnatinou a později se změnilly na nekrotické. Sporangiofory byly hyalinní, rozvětvené a objevovaly se ve skupinkách vycházejících z průduchů. Z přirozeně infikovaných rostlin *C. moschata* byl získán izolát (88/09), u kterého byl detekován patotyp 4.15.0, který dosud v České republice nebyl zjištěn (Pavelková a kol., 2011).

3.5 Geografické rozšíření *P. cubensis*

Nejstarší nálezy o výskytu *P. cubensis* z Evropy byly zaznamenány v Rakousku a Maďarsku a to v roce 1904 (Hecke, 1904; Linhart, 1904). Z Československa jsou první údaje o výskytu *P. cubensis* až z roku 1926 (Smolák, 1926). Další výskyty z Evropy byly publikovány v roce 1973 z Itálie (Damiano, 1973), Řecka (Pantidou, 1973), a o rok později z Německa (Crüger, 1974) a Rumunska (Geaman, 1974). I v zemích severní Evropy (Finsko, Švédsko) zaznamenali nález *P. cubensis*, ale až v roce 1985 a 1986 (Tahvonen, 1985; Forsgerb, 1986).

Druh *P. cubensis* je v současnosti celosvětově rozšířen a její výskyt je zaznamenán prakticky všude, kde jsou pěstovány tykvovitě rostliny a to jak v polních podmínkách, tak také v krytých porostech. Neoptimálnější podmínky pro tohoto patogena jsou uváděny v teplejších oblastech (především v tropech a subtropích), kde roční úhrn srážek překračuje 300-350 mm (Lebeda a kol., 2006b)

I přes kosmopolitní rozšíření *P. cubensis* lze nalézt u tohoto patogenu podstatné rozdíly ve vztahu k jednotlivým hostitelským rodům. Největší frekvence rozšíření *P. cubensis* je na rodu *Cucumis*. Napadení *C. sativus* je zaznamenáno ve více než 80 zemích světa, další významný druh *C. melo* se vyskytuje ve více než 50 zemích. Nálezy *P. cubensis* na rodu *Cucurbita* jsou známy asi ze 40 zemí světa, přičemž hlavní centra jsou ve Střední Americe a karibské oblasti. V Evropě je doložen výskyt pouze z bývalé Jugoslávie a bývalého SSSR. Na rodu *Citrullus* je geografické rozšíření *P. cubensis* ještě mnohem menší než na ostatních rodech. Vyskytuje se přibližně pouze v 25 zemích, přičemž hlavní centrum výskytu leží opět ve Střední Americe. V Evropě nebyl přirozený výskyt *P. cubensis* na rodu *Citrullus* spp. známý (Lebeda, 1990).

V Evropě se *P. cubensis* nacházela především ve Středomoří, až ve 2. polovině 80. let 20. století se rozšířila do střední Evropy, přičemž rok 1985 lze označit za přelomový. Silné epidemie *P. cubensis* se objevily prakticky v celé střední Evropě (Československo, Polsko, Německo, Rakousko, Švýcarsko, Maďarsko), ale i v dalších evropských státech (Bulharsko, Rumunsko, Moldávie, Ukrajina, Bělorusko). Z Polska se ve zmiňovaném roce dostalo inokulum vzdušnými proudy až do Finska a Švédska. Ačkoli se jednalo o první výskyt *P. cubensis* na daném území, způsobila choroba velké škody (Lebeda, 1990). Rychlost šíření a výše škod potvrzuje vysoké schopnosti adaptace tohoto patogena na nové geografické oblasti a ekologické podmínky prostředí (Lebeda a Schwinn, 1994). Opakované výskyty *P. cubensis* ve střední Evropě svědčí o její dlouhodobé epidemiologické nákaze, kterou lze srovnat se situacemi v mnoha dalších oblastech světa (USA, Izrael, Japonsko, Indie).

V bývalém Československu se první epidemie plísně okurkové, opět výhradně na *C. sativus*, objevila až v roce 1984 a to zejména na jižním Slovensku, jižní, střední a severní Moravě a v okolí Prahy. Rozsah škod nebyl příliš velký, protože příchod epidemie byl poměrně pozdní a to až na konci července a v srpnu. Následující rok 1985 zaznamenal 80-90 % ztráty na výnosech okurek. V letech 1986-1988 bylo napadení porostů okurek o něco menší než v roce 1985 z důvodů kvalitnějších ochranných opatření. V roce 1989 opět stouply ztráty na výnosech až na 80 % (Lebeda a kol., 2006b). Ve zmíněných letech epidemického výskytu na našem území došlo poté k přesunu *P. cubensis* z Maďarska přes jižní Slovensko na jižní a střední Moravu a pak dále do východních a středních Čech. Mezi poslední napadené porosty patří jako vždy oblasti v jižních a západních Čechách (Lebeda, 1990). Pozorování provedená autory Lebedou a Urbanem v letech 2001 až 2004 (Lebeda a Urban 2004a,b,c) potvrzují, že se *P. cubensis* vyskytuje každoročně téměř na celém území České republiky. Místa výskytu jsou nejen v hlavních pěstitelských oblastech, ale i v oblastech s méně příznivými podmínkami pro výskyt *P. cubensis*. První projevy choroby se v závislosti na podmínkách prostředí objevují v nížinách koncem června až začátkem července a vlastní epidemie nastupuje koncem července a začátkem srpna (Lebeda a Urban, 2004a,b). V období sklizně bývají porosty *C. sativus* silně až velmi silně napadeny (Lebeda a Urban, 2005, 2007).

3.6 Hostitel

3.6.1 Taxonomie a význam čeledi Cucurbitaceae

Čeď Cucurbitaceae (tykvovité) patří do řádu Cucurbitales a zahrnuje přes 800 druhů ve 130 rodech s rozšířením převážně v tropech a subtropích (Renner a kol., 2007). Jedná se o jednoleté až vytrvalé byliny, jednodomé (běžnější) i dvoudomé, polokeře, několik druhů keřů a vzácných sukulentních stromů (Lebeda a kol., 2007). Hlavní využití čeledi je v zemědělském průmyslu, ale také v lékařství. Semena *Cucurbita pepo* jsou využívány jako urologika a prostatika a hlízy *Trichosanthes kirilowii* jsou použita při výzkumu léčby AIDS (Chrtková, 1990; Jahodář, 2006).

Rostliny čeledi Cucurbitaceae jsou charakteristické popínavými nebo plazivými lodyhami, které jsou měkce až pichlavě chlupaté nebo olysalé. Listy jsou střídavé, řapíkaté (bez palistů), celistvé nebo členěné s žilnatinou dlanitou nebo zpeřenou. Úponky jsou původu lodyžního i listového a vyrůstají po stranách v paždí listů nebo chybějí. Květenství mají vrcholičnaté, hroznovité nebo květy jednotlivé. Květy jsou jednopohlavné a pravidelné. Kalich a koruna jsou na bázi často srostlé v kalíškovitou nebo zvonkovitou češuli. Plod je bobule, dužnatá, masitá, houbovitá nebo vysýchavá s tenkým až silným vnějším oplodím (Chrtková, 1990). Rostliny obsahují látky zvané kukurbitaciny, které způsobují hořkou chuť (Opletal a kol., 2007).

Pěstované druhy rostlin čeledi Cucurbitaceae mají schopnost adaptace na velmi rozdílné pěstelské podmínky prostředí. Globální ekonomický význam mají plodiny z rodu *Cucumis* (okurka setá, meloun cukrový), *Cucurbita* (tykev-dýně) a *Citrullus lanatus* (lubenice obecná tzv. meloun vodní) (Chrtková, 1990; Lebeda a kol., 2007). Počátkem nového tisíciletí výrazně vzrostla produkce těchto kulturních plodin a každým rokem vzrůstá. V současnosti vede v produkci tykvovitých Čína, společně s dalšími asijskými státy jako je Indie, Irán a Turecko. Velkými producenty jsou i USA a Egypt (Lebeda a kol., 2007).

Vývoj českého názvosloví čeledi Cucurbitaceae zaznamenal v průběhu let několik změn. Klíč k úplné květeně ČSR uvádí český název tykvovité, rod *Cucumis* L. jsou dyně (zahrnuje druhy *C. sativus* a *C. melo*) a rod *Cucurbita* L. jsou tykve (Dostál, 1954). Dostál (1989) uvádí v Nové květeně ČSSR (díl 1.) český název tykvovité, ale u rodu *Cucumis* L. uvádí název okurka (pouze druh *C. sativus*) a pro druh *C. melo* vyčlenil nový rod *Melo* Adans. zvaný meloun (*M. sativus*), rod *Cucurbita* L. jsou stále tykve, ale u druhu *C. pepo* L. se objevuje výraz „dýně“. V Květeně České republiky z roku 1990 a 2003 se pro čeď Cucurbitaceae uvádí český název dýňovité. Rod *Cucumis* L. (okurka, meloun) zahrnuje druhy *C. sativus* L. a *C. melo* L. a rod *Cucurbita* L. se

značí jako dýně (Chrtková, 1990; 2003). Klíč ke květeně České republiky uvádí název tykvovitě (Kubát a kol., 2002).

3.6.2 Původ a charakteristika zástupců čeledi Cucurbitaceae

Cucumis spp.

Rod *Cucumis* zahrnuje přes 30 planě rostoucích druhů pocházejících zřejmě z aridních a semiaridních oblastí Afriky a dva druhy hojně pěstované, *C. sativus* L. (okurka setá) a *C. melo* L. (meloun cukrový) (Lebeda a Cohen, 2011). Dvě hlavní skupiny, podrody *Cucumis* a *Melo* se liší geneticky, morfologicky i oblastmi přirozeného výskytu. Podrod *Cucumis* (indočínského původu) tvoří pouze 2 druhy: *C. sativus* a *C. hystrix*, zatímco podrod *Melo* (africký původ) je taxonomicky složitý s velkou druhovou diverzitou (Lebeda a kol., 2007). *C. melo* je řazeno blíže skupině *C. sativus*, *C. hystrix* než většině zástupců podrodu *Melo*, podle sekvenování jaderné a plastidové DNA (Sebastian a kol., 2010). Centrum původu a prvního pěstování okurky seté je potvrzené z podhůří Himalájí v Indii. *C. sativus* je jednoletá, jednodomá bylina s poléhavou nebo popínavou hranatou lodyhou, která je štětinatě chlupatá. Úponky jsou jednoduché. Listy jsou 5-7úhelníkovité až mělce laločnaté se špičatými laloky, na okraji zubaté až celokrajné. Syté žluté květy jsou 5četné se srostlým kalichem a korunou, buď jednotlivé anebo ve svazečcích v úžlabí listů. Plodem je bobule (Chrtková, 1990). Druh *C. melo* je drsně chlupatý. Listy jsou mnohoúhelníkovité s laloky zaokrouhlenými, na okraji zubaté až celokrajné, často zvlněné. Květy jsou sytě žluté a krátce stopkaté. Plod je kulovitěho tvaru, vážíci okolo 1-3 kg (Chrtková, 1990).

Cucurbita spp.

Rod zahrnuje asi 12 až 15 druhů, které původně pocházejí z oblastí Ameriky, od USA až po Argentinu. Pět druhů (*C. argyrosperma* C. Huber, *C. ficifolia* Bouche, *C. maxima* Duchesne, *C. moschata* Duchesne a *C. pepo* L.) domestikovaných z těchto oblastí před příchodem Evropanů je v současné době hojně pěstováno v mnoha částech světa. Tento rod nevykazuje blízkou příbuznost s jinými rody čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a kol., 2007). *C. maxima* pochází pravděpodobně z Peru, kde se pěstovala již kolem roku 1200 př.n.l. Druh *C. ficifolia* má původ podle fosilních záznamů nejspíše ve výše položených oblastech And. Zatímco *C. moschata* ve Střední Americe a severní části Jižní Ameriky (Kolumbie) (Lira-Saade, 1995). *C. moschata* má geneticky nejbližší druhu *C. argyrosperma*, který zdomácněl v jižním Mexiku (Seshadri a More, 2009). *C. pepo* patří mezi nejstarší kulturní plodinu, jejíž semena jsou dochována z období 10 000 př.n.l. (Whitaker a Bemis, 1964). Podle molekulárních studií byla domestikována 2x bez

užší spojitosti. První zdomácnění zaznamenal druh *C. pepo* subsp. *texana* na území severovýchodního Mexika. Druhá linie *C. pepo* subsp. *pepo* je výsledkem postupné domestikace z taxonu rostoucího v dnešním Mexiku a *C. pepo* subsp. *fraterna*. Proces domestikace vedl u druhu *C. pepo* k celkové evoluční diferenciaci fenotypů a vzniku mnoha nových taxonů (Paris a kol., 2012). Rostliny rodu *Cucurbita* vyskytující se v České republice jsou jednoleté, jednodomé byliny s poléhavou nebo popínavou lodyhou. Úponky jsou větvené nebo chybějí. Listy jsou dlouze řapíkaté a dlanitě 5-7úhelníkovité a dlanitolaločnaté. Květy jsou jednotlivé v úžlabí různých listů, 5(-7) čtne se srostlým kalichem a korunou. Plody jsou bobule různých tvar (Chrtková, 1990). Na obrázku 5 jsou znázorněny morfotypy druhu *C. pepo*.



Obrázek 5. Diverzita zralých plodů 32 kultivarů *Cucurbita pepo* (E. Křístková).

Ostatní hostitelské rody

Rod *Citrullus* zahrnuje čtyři druhy, z nichž nejznámější je *C. lanatus* (Thunb.) Matsumura et Nakai. Všechny tyto druhy pochází z tropů a subtropů Starého Světa, primárně z Afriky (Lebeda a kol., 2012). Druh *C. lanatus* je na lodyze krátce hustě chlupatý. Listy jsou široce vejčité až trojúhelníkovité. Květy jsou světle žluté a plody kulovité až elipsoidní s červeným vnitřním oplodím (Chrtková, 1990).

Rod *Benincasa* je reprezentován pouze jediným druhem *Benincasa hispida* (Thunb.) (tykev vosková), pocházejícím z jihovýchodní Asie (Seshadri a More, 2009). Tento druh je jednodomý s hustě chlupatou lodyhou, která voní pižmem. Listy jsou jednoduché, střídavé (bez palistů) s řapíky (5-20 cm). Květy se nachází v úžlabí listů a jsou jednopohlavné, pravidelné. Plod je variabilní ve tvaru a je pokryt modrobílou voskovou vrstvou (Robinson a Decker-Walters, 1997).

Rod *Luffa* zahrnuje sedm druhů. Čtyři z těchto druhů pocházejí ze Starého Světa (Afrika, Indie a Austrálie) a zbývající tři druhy z neotropické květenné oblasti (Bates a kol., 1990). Dva druhy *L. acutangula* (L.) Roxb. a *L. cylindrica* (L.) M. J. Roem. jsou kultivované (Seshadri a More, 2009). *Luffa cylindrica* je jednoletá, jednodomá bylina s popínavou lodyhou, která je jemně chlupatá. Listy jsou jednoduché, střídavé (bez palistů) s dlouhými řapíky (až 15cm). Sytě žluté květy jsou jednopohlavné a pravidelné (Robinson a Decker-Walters, 1997).

Rod *Lagenaria* zahrnuje šest druhů. Pouze druh *L. siceraria* (Mol.) Standl. (tykev láhvovitá) je kulturní plodinou (jednoletá, jednodomá) původem ze západní Afriky. Ostatních pět druhů je planě rostoucích (vytrvalé, dvoudomé), pocházející z Afriky, Madagaskaru a Komorských ostrovů (Bates a kol., 1990; Nayar a More, 1998; Seshadri a More, 2009). *Lagenaria siceraria* je bylina s plazivou lodyhou. Listy jsou jednoduché, střídavé (bez palistů) s délkou řapíků 2-12 cm. Bílé květy jsou jednopohlavné. Plody jsou variabilní ve tvaru a velikosti (Robinson a Decker-Walters, 1997).

3.7 Interakce Cucurbitaceae – *P. cubensis*

Vztah hostitele (rostlina) a patogena může být dočasného nebo trvalého charakteru a vyvolává projevy choroby. V této interakci má patogen schopnost interferovat s jednou nebo více podstatnými funkcemi hostitele a vyvolat u něj patologické procesy. Mezi rostlinou a patogenem tedy dochází k řadě interakcí, které se projevují tzv. specifitostí.

Specifitost je posuzována z taxonomického a genetického hlediska na úrovni druhu nebo nižších taxonomických jednotek a bývá determinována charakterem hostitele nebo patogena, většinou kombinací obou. Hodnocení úrovně specifitosti je založeno na základním rozdělení rostlin na hostitele a nehostitele a mikroorganismů na patogena a nepatogena. Výslednou reakcí hostitele a patogena je kompatibilita (náchyllost), která se projevuje parazitismem, případně patogenismem nebo inkompatibilita (odolnost), kdy se interakce neprojevuje, případně jen minimálně (Lebeda, 1989).

Zástupci čeledi Peronosporaceae jsou typičtí obligátní biotrofní parazité a jejichž jednotlivé druhy se od sebe liší rozdílným stupněm hostitelské specifity. Stupeň hostitelské specifity je dán specializací na jeden druh nebo širší spektrum hostitelských druhů a rodů v rámci určité čeledi rostlin. *P. cubensis* je oligofágní systematický patogen, který napadá pouze omezený počet druhů a rodů čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Schwinn, 1994).

V rámci vnitrodruhové variability jsou rozeznávány xenopatické skupiny, vyjadřující různé hladiny specifitosti interakcí mezi populací určitého fytopatogenního organismu a populací jeho hostitele. Na úrovni druhu jsou popisovány specializované formy (forma specialis). Podrobnější diferenciaci jednoho druhu resp. specializované formy je představovaná interakcí odrůda – fyziologická rasa. Pro determinaci jsou používány jednotlivé odrůdy nebo izogenní linie se známými rasově specifickými faktory rezistence (Lebeda, 1989). Nejpresnějším pojmem při hodnocení interakce hostitele a patogena je biotyp. Jde o výhradně genetický pojem. Biotypem, jsou označováni jedinci se stejnou genetickou konstitucí. U hostitele jde o klony nebo čisté linie vzniklé samoopylením, u patogena jsou to jedinci vzniklí z jedné spory nebo buňky (Lebeda a kol., 2006b).

Je-li rostlina inokulovaná potenciálním infekčním agens, může nebo nemusí dojít k infekci. Rezistence a náchyllost charakterizují schopnost či neschopnost rostlin infektibilního (hostitelského druhu) potlačit vývoj patogena a jeho aktivitu. Hostitel, který je schopen potlačit nebo oddálit aktivitu patogenního agens je rezistentní (odolný). Náchylný je hostitel nezpůsobilý odolat nebo klást odpor škodlivému patogennímu faktoru, případně překonat jeho následky. Pro charakteristiku reakcí hostitele, které rozhodují o tom, zda se přítomnost patogena projevuje silnými nebo slabými příznaky choroby a poškození, jsou používány termíny

tolerance a citlivost (Lebeda, 1989). Tolerance (snášlivost) je schopnost infikovaného hostitele snášet zjevně neomezenou a rozsáhlou invazi patogenním organismem, což se projevuje více nebo méně úplnou absencí příznaků a poškození. Citlivost (senzitivita, zranitelnost) je neschopnost infikovaného hostitele snášet činnost patogenního organismu bez více nebo méně silné reakce, což vyúsťuje ve vznik různě silných symptomů a poškození. Produkce různých iritantů zde má za následek dysfunkci rozhodujících metabolických pochodů a fyziologických funkcí (Lebeda, 1989; Lebeda a kol., 2006b)

3.7.1 Patogenismus

Existence a rozvoj jednotlivých organismů je značně ovlivněn typem jejich soužití. Mezi jednotlivými skupinami organismů existují velmi různorodé vztahy. Z hlediska výhodnosti či nevýhodnosti pro oba partnery lze rozeznávat dva protichůdné typy soužití: mutualismus a parazitismus (Cooke, 1977). Parazitismus lze ve svém nejširším pojetí chápat jako částečnou nebo úplnou nutriční závislost určitého buněčného nebo nebuněčného organismu na jiném živém organismu (FBPP, 1973).

S parazitismem velmi těsně souvisí patogenismus, což je vztah dvou organismů, kdy jeden (patogen) vyvolává chorobu na jiném (hostitel). Ačkoli schopnost parazita proniknout a kolonizovat hostitele má většinou za následek vznik choroby, působení patogenu nemusí být nutně spojeno s parazitismem (Horsfall a Cowling, 1978). Parazit je organismus částečně nebo zcela nutričně závislý na jiném organismu. Patogen je takový buněčný nebo nebuněčný organismus, který je schopen způsobovat chorobu na jednom hostiteli nebo okruhu hostitelů. Přičemž každý rod nebo druh patogena má vymezený okruh hostitelských rostlin, u nichž je schopen v různé míře vyvolávat chorobné procesy a má tedy určitý patogenní potenciál (Lebeda, 1989).

Z nejobecnějšího hlediska je patogenní potenciál vyjádřen patogenitou. Jedná se o schopnost patogena (příp. parazita) interferovat s jednou nebo více podstatnými funkcemi rostliny (Agrios, 1978). Přičemž jde o vlastnost parazitního druhu, rodu aj. obecně uznávané skupiny bez ohledu na to, že některé entity (kmeny, rasy, atd.) nemusí být v rámci celé skupiny (druhu) patogenní (FBPP, 1973). Patogenitu lze rozčleňovat na dvě základní kategorie – virulenci a agresivitu (Lebeda, 1989).

Virulencí jsou označovány kvalitativní rozdíly v patogenitě (Tarr, 1972). V rámci základní kompatibility vyjadřuje schopnost vytvořit specificky diferencovaný kompatibilní resp. inkompatibilní vztah (Lebeda, 1989) mezi izoláty (rasami) patogena a odrůdami (liniemi, kmeny) hostitele. Rozdíly ve virulenci mají poměrně dobře odlišitelný diskontinuální charakter

(Vanderplank, 1975), proto je využívána v systémech specificky diferencované kompatibility-inkompatibility, kde je genetická interakce řízena jedním nebo několika málo geny (mono-, oligogenně) a jde tedy o interakce na bázi gen proti genu (Lebeda, 1989).

Agresivita je naproti tomu vlastnost entit nižších než rod a druh a popisuje kvantitativní nediferencovaný vztah patogena k hostiteli. Mezi hostitelem a patogenem se neobjevuje diferenciační reakce, ale konstantní kvantitativní řazení, tzn. že při srovnávání souboru izolátů určitého patogenního druhu lze kontinuálně seřadit podle stupně jejich agresivity (Vanderplank, 1968, 1975). Pojem agresivita je tedy používán v souvislosti s mechanismy specificky nediferencované kompatibility, se systémy polygenní dědičnosti a odrůdově nespécifickou rezistencí (Lebeda, 1989).

3.7.2 Patogenní variabilita *P. cubensis*

Patogen *P. cubensis* naznačuje rozsáhlou vnitrodruhovou variabilitu v patogenitě jako ostatní fytopatogenní organismy ze skupiny Oomycota, zejména z čeledi Peronosporaceae (Lebeda a Widrechner, 2003). První informace o patogenní variabilitě *P. cubensis* byly získány ve 40. letech 20. století v Japonsku, později byla tato problematika rozpracována v Izraeli, Indii, Japonsku a USA. Patogenní variabilita se projevuje při interakcích s hostitelskými rody, druhy nebo jejich nižšími taxonomickými a genetickými jednotkami. Interakce mezi populacemi fytopatogenního organismu a populacemi jeho hostitele se mohou odehrávat na různých hladinách specifičnosti, které jsou na straně patogenu vyjádřeny v rozlišně odlišných patogenních skupinách. U *P. cubensis* jsou zaznamenány speciální formy, patotypy a fyziologické rasy resp. fenotypy virulence (Lebeda a Cohen, 2011).

3.7.2.1 Speciální formy

Speciální forma (forma specialis) je vnitrodruhová taxonomická jednotka používaná pouze pro fytopatogenní houby. Jsou klasifikovány jako populace (izoláty) bez morfologických rozdílů, které se však od sebe liší fyziologicky, svou parazitní adaptací na různé hostitelské rody a druhy. Hlavním kritériem specializace bývá určitý rod (nebo jiná skupina, např. tribus) v rámci celkového hostitelského okruhu parazita. Speciální formy lze rozlišit podle tzv. křížových inokulací, kdy se izolátem z určitého hostitelského druhu inokuluje co nejširší spektrum hostitelů známých pro daný patogen. Křížové inokulace realizované pro některé zástupce Peronosporaceae ukazují, že jejich izoláty jsou často kompatibilní pouze s tím hostitelským

rodem, z něhož byly odebrány. U *P. cubensis* bylo zjištěno, že izoláty z *Cucumis sativus* jsou kompatibilní dokonce s pěti různými rody Cucurbitaceae a na některých dalších rodech čeledi vyvolávají projevy neúplné rezistence (Lebeda a Cohen, 2011).

V současnosti, se všemi získanými výsledky, nelze existenci speciálních forem *P. cubensis* jednoznačně vyvrátit ani potvrdit. Další výzkumy, založené především na mezinárodní spolupráci, mohou přispět k prohloubení poznatků v této oblasti (Lebeda a kol., 2006b).

3.7.2.2 Patotypy

Patotypy *P. cubensis* jsou fyziologické formy, které se od sebe navzájem liší hostitelskou specifikou na úrovni rodů, druhů, popřípadě poddruhů a variet čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Widrlechner, 2003). Prostřednictvím patotypů lze důkladněji popsat patogenní variabilitu z hlediska hostitelského okruhu, tato vlastnost byla dříve připisována existenci speciálních forem (Lebeda a Cohen, 2011).

Pro popis patogenní variability byly vytvořeny diferenciační soubory čeledi Cucurbitaceae, díky kterým jsou determinovány patotypy *P. cubensis*. První obecně uznávaný diferenciační soubor byl soubor Thomas a kol., který obsahoval 6 diferenciačních genotypů z rodů *Cucumis*, *Cucurbita* a *Citrullus* (Thomas a kol., 1987). Soubor byl výsledkem inokulačních experimentů 26 genotypů ze sedmi rodů Cucurbitaceae, z nichž byly pro diferenciaci patotypů vybrány nejvíce náchylné genotypy umožňující jasné rozlišení kompatibility/inkompatibility (Thomas et al., 1987). Použitím tohoto souboru bylo rozlišeno pět patotypů podle odlišných reakcí s osmi testovanými izoláty *P. cubensis* pocházejících z USA, Izraele a Japonska. Tyto izoláty byly vybrány na základě inokulace na 26 rostlinných genotypech reprezentujících 7 rodů (Lebeda a Cohen, 2011). Autoři je označili jako „patotyp 1-5“ podle vzrůstajícího počtu virulentních (kompatibilních) reakcí. Patotyp 1 byl kompatibilní pouze s jedním diferenciačním genotypem, zatímco patotyp 5 se všemi šesti diferenciačními genotypy. Na základě totožného diferenciačního souboru byl popsán v roce 2003 patotyp 6 z Izraele (Cohen a kol., 2003). Soubor Thomase a kol. (1987) měl i přes to vše několik nevýhod, některé genotypy nebyly přesně definovány na úrovni druhové ani genotypové. V práci Lebedy a Gadasové z roku 2002 bylo k charakterizaci *P. cubensis* použito diferenciačního souboru 12 taxonů z 5 rodů čeledi Cucurbitaceae. *Cucumis sativus* cv. Marketer vykázal velmi citlivé reakce ke všem použitým izolátům. *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *C. maxima* a *Lagenaria siceraria* byly považovány za vnímavé k *P. cubensis*. Všech 12 taxonů vykazovalo rozdílnou reakci se souborem izolátů a bylo rozlišeno 13 patotypů (Lebeda a Gadasová, 2002).

Nový diferenciační soubor byl rozšířen o nové komponenty, které byly specifikovány jak na úrovni druhů, poddruhů i genotypů a popis každého patotypu je založen na numerickém systému (Lebeda a Widrechner, 2003). Soubor je založen na souboru Thomas a kol. (1987) a je rozšířen o další genotypy. Ve výsledku soubor zahrnuje 12 genotypů vybraných ze šesti nejdůležitějších rodů z čeledi Cucurbitaceae: *Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullus*, *Benincasa*, *Luffa* a *Lagenaria*. Na základě dobře specifikovaného diferenciačního souboru by bylo možné u *P. cubensis* dobře diferenciovat nejen patotypy (patogenní variabilitu mezi různými rody čeledi Cucurbitaceae), ale i rasy (patogenní variabilitu uvnitř jednoho druhu). S tímto zdokonaleným diferenciačním souborem byl navržen i nový způsob popisu patotypů pomocí 12 patogenních faktorů a jejich kombinací. Patotyp je popsán pomocí numerického tetradového kódu, který je zpracován na základě binárního hodnocení kompatibility a inkompatibility (+/-) určitého izolátu na genotyp diferenciačního souboru.

Studie o geografické distribuci patotypů *P. cubensis* jsou známy kromě České republiky (Lebeda a kol., 2013), z Izraele (Cohen a kol., 2003), USA (Colucci, 2008) a Malajsie (Salati a kol., 2010). V práci autorů Lebedy a Gadasové (2002) bylo studováno 22 izolátů *P. cubensis* pocházejících ze čtyř evropských zemí (zejména z České republiky) s použitím nového diferenciačního souboru 12 genotypů čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003) a bylo rozlišeno 13 různých patotypů. Tyto determinované patotypy byly odlišné od patotypů 1-5 popsaných Thomas a kol. (1987). Pouze jeden izolát korespondoval s patotypem 1. Od roku 2001 se podrobnějším studiem patogenní variability zabývá tým fytopatologické laboratoře PŘF UP v Olomouci pod vedením prof. Lebedy. Tyto podrobné informace poukazují na to, že populace *P. cubensis* v České republice je extrémně variabilní s určitou meziroční fluktuací. Výskyt vysokého počtu různých patotypů a jejich značná proměnlivost zastoupení v čase a prostoru může souviset s migrací patogena a lokací České republiky v Evropě.

Výsledky studia patogenní variability 32 izolátů *P. cubensis* pocházejících z USA z let 2004-2008 potvrdily vysokou variabilitu v jejich patogenitě (Colucci, 2008), stejně jako je tomu v České republice (Lebeda a Urban, 2004c; Erbesová, 2005; Urban, 2006; Lebeda a kol., 2010; Pavelková, 2012; Lebeda a kol., 2013), že existuje vysoká variabilita v patogenitě izolátů *P. cubensis* pocházejících z USA (Colucci, 2008).

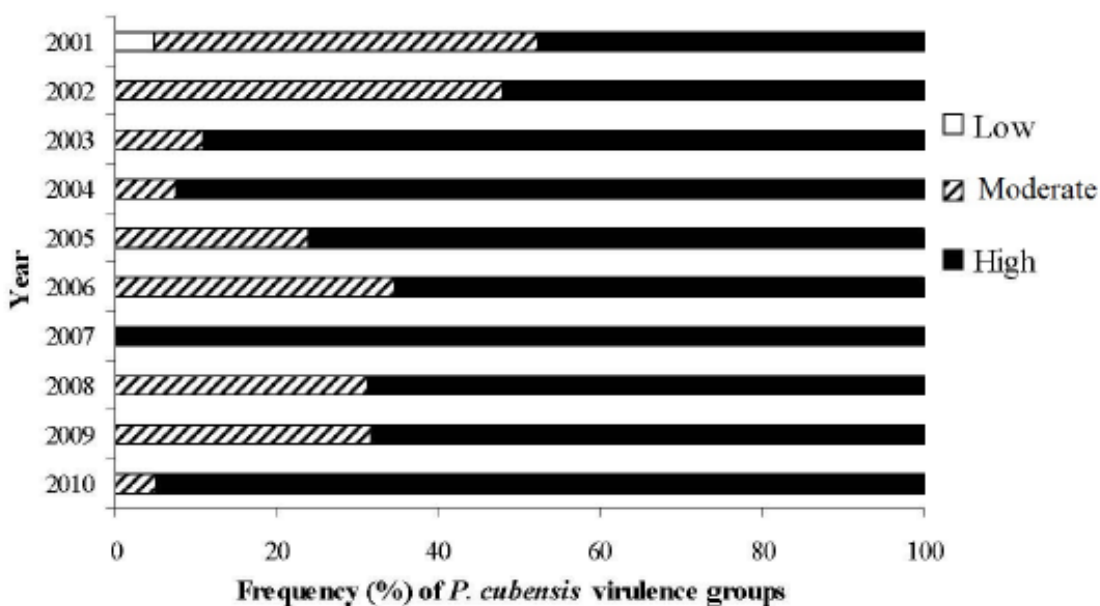
Salati a kol. (2010) se zabývali studiem patogenní variability souboru celkem 29 izolátů *P. cubensis* shromážděných z různých hostitelských druhů (*Cucumis sativus*, *Luffa cylindrica*, *Citrullus lanatus*, *Trichosanthes cucumerina*) západní Malajsie. Na testovaném souboru izolátů bylo determinováno 12 odlišných patotypů a ukázalo se, že izoláty *P. cubensis* pocházející z dýňových farem v západní Malajsi jsou vysoce variabilní (Salati a kol., 2010)

Tabulka 1. Přehled známých dat o determinaci patotypů *P. cubensis* v různých zemích světa (Lebeda a kol., 2006b).

Kategorie patogenity		Patotyp	
Země	Dostupná data	Literatura	
Čína	+	Salati a kol. (2010)	
Česká republika	+	Lebeda (1999); Lebeda a Gadasová (2002); Lebeda a Urban (2004); Lebeda a kol. (2006); Lebeda a Widrlechner (2003); Lebeda a Widrlechner (2004)	
Bulharsko	+?	Angelov a kol. (2000)	
Indie	+	Bains a Sharma (1986)	
Izrael	+	Cohen a kol. (2003); Thomas a kol. (1987)	
Japonsko	+	Thomas a kol. (1987)	
Polsko	?		
USA	+	Shetty a kol. (2002), Colucci (2008)	
Ostatní (FR, NL, SP)*	+	Lebeda a Gadasová (2002)	

+ = patotyp přítomen; ? = data nejsou dostupná nebo experimentálně potvrzena; * = determinován pouze 1 izolát.

U populace *P. cubensis* v České republice byly z hlediska časového i prostorového hlediska zaznamenány značné výkyvy patotypové struktury. V letech 2001-2009 bylo analyzováno 361 izolátů a rozlišeno 67 patotypů. Největší patogenní variabilita byla zaznamenána v roce 2001, kdy bylo objeveno 33 patotypů, v kontrastu s rokem 2007, kdy bylo objeveno pouze 5 patotypů. Větší část testovaných izolátů představovala vysoce patogenní patotypy. Unikátní patotyp 15.15.15. („super patotyp“) byl detekován opakovaně v letech 2001, 2003, 2004 a 2008. Česká populace *P. cubensis* není stabilní a ukazuje časový posun k vyšší patogenní úrovni a ke snížení patogenní variability (obr. 6) (Lebeda a kol., 2010).



Obrázek 6. Struktura populace *P. cubensis* podle jejich úrovně virulence (virulentních faktorů) (Lebeda a kol., 2013).

Celosvětovým problémem patotypů *P. cubensis* je častá záměna názvosloví (patotyp-rasa), kdy místo označení patotyp je použito označení rasa. Zejména se tak stává ve výzkumech ze zahraničí, a poté v publikovaných článcích, viz článek Savory et al. (2010). Jedná se však o chybu zásadní, ke které by nemělo docházet.

3.7.2.3 Fyziologické rasy

Fyziologické rasy, zejména u třídy Oomycetes a hub z říše Fungi, se vyznačují specializací na různé kultivary jednoho hostitelského druhu. Rasa je definována jako biotyp (skupina biotypů) uvnitř druhu, lišící se od jiných biotypů (skupin biotypů) fyziologickými charakteristikami, včetně virulence (Lebeda a Urban, 2010). Rasy byly popsány také u interakcí *P. cubensis* s čeledí Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003; Lebeda a Cohen, 2011).

První záznamy o existenci fyziologických ras *P. cubensis* jsou známy z USA, zejména v roce 1932 v Massachusetts a v roce 1950 v severní Karolíně (Cohen, 1981). Další výzkumy prokazují existenci fyziologických ras na druzích *Cucumis melo* (Thomas a kol., 1987), *Cucurbita pepo* a dalších *Cucurbita* spp. (Lebeda a Widrechner, 2004). Rasově specifické interakce se projevují také na rodu *Citrullus*. Dostupná data o výskytu ras *P. cubensis* jsou potvrzena z České republiky, Izraele a USA. Ze všech získaných výsledků je tedy patrná existence fyziologických ras u tohoto patogenu, ale zatím není dostatečně propracován diferenciační soubor genotypů pro jednotlivé hostitelské druhy, případně rody (Lebeda a kol., 2006b).

Problémem v posledních 30 letech je vývoj nových polních kultur *P. cubensis* odolných proti řadě běžně používaných fungicidů (Lebeda a Cohen, 2011). Pod vlivem jejich opakované aplikace dochází v populacích patogenu k rychlé selekci rezistentních ras resp. kmenů (Lebeda a kol., 2006b).

3.7.3 Variabilita hostitelů diferenciačního souboru v interakcích s *P. cubensis*

P. cubensis vykazuje rozsáhlou vnitrodruhovou variabilitu v patogenitě a hostitelské specifitě je úzce spojena s velkou taxonomickou a genetickou diverzitou různých hostitelských rostlin. V interakcích *P. cubensis* a hostitelských druhů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae (na detekci patotypů) jednoznačně převažuje exprese inkompatibility/kompatibility, ale lze pozorovat i heterogenní reakce a neúplnou rezistenci (Lebeda a Widrechner, 2003; Lebeda a kol., 2006b). Při výzkumu variability *P. cubensis* vůči

hostitelům jsou důležité laboratorní experimenty prováděné za optimálních podmínek, ovšem pro přesnější výsledky je nutné studovat i rozvoj choroby v polních podmínkách, tzv. polní rezistenci.

Cucumis spp.

C. sativus je vysoce náchylný druh a neobsahuje dostačující zdroje rezistence vůči *P. cubensis*. Geneticky je málo variabilní a nevykazuje rasově specifické interakce. V diferenciačním souboru se druh *C. sativus* odrůda Marketer používá jako silně náchylná kontrola (Lebeda a Widrlechner, 2003; Lebeda a Urban, 2004c).

C. melo je geneticky velmi variabilní druh a je u něj velice dobře prozkoumána rasová specifická a efektivní zdroje rezistence (Lebeda a kol., 2007). U druhu *C. melo* je zaznamenána celá škála interakcí v rámci spektra patotypů/ras a je tedy pozorovaná velká diverzita na úrovni morfologické, genetické i molekulární (Stepansky a kol., 1999). V diferenciačním souboru jsou 3 genotypy *C. melo* z taxonů: *C. melo* subsp. *melo*, *C. melo* var. *conomon* a *C. melo* var. *acidulus* (Lebeda a Widrlechner, 2003).

Cucurbita spp.

Rod *Cucurbita* je velmi variabilní a je u něj hojně rozšířena rasově specifická rezistence, což se projevuje rozdílnými reakcemi genotypů na jednotlivé izoláty (Lebeda a kol., 2006b). V diferenciačním souboru je rod zastoupen 4 taxony: *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*, *C. pepo* var. *texana*, *C. pepo* var. *fraterna*, *C. maxima* (Lebeda a Widrlechner, 2003).

Výraznou rasově specifickou rezistenci/náchylnost nacházíme také mezi poddruhy, varetami a kultivary významného druhu *C. pepo* (Lebeda a Cohen, 2011). Z testů prováděných Lebedou a Křístkovou (1993) byla zjištěna neúplná rezistence u mnoha genových zdrojů *C. pepo* subsp. *pepo*, která potvrzuje oddělení tohoto poddruhu od *C. pepo* subsp. *texana*, jehož genotypy byly zcela náchylné k alespoň jednomu ze tří izolátů *P. cubensis*. Možnou příčinou rozdílných reakcí kultivarů *C. pepo* je uváděna vícenásobná domestikace tohoto druhu (Paris a kol., 2012).

Ostatní hostitelské rody

V rodu *Citrullus* existuje výrazná odrůdová variabilita v náchylnosti k izolátům *P. cubensis*. Pro druh *C. lanatus* byla prokázána patotypová a rasová specifická, proto je součástí původního (Thomas a kol., 1987), ale i současného diferenciačního souboru (Lebeda a kol., 2006b; Lebeda a Widrlechner, 2003).

U druhu *Benincasa hispida* byla prokázána patotypově specifická rezistence vůči izolátům *P. cubensis*. Genotyp použitý v předchozím diferenciačním souboru Thomase et al.

(1987) vykazoval rezistenci k izolátům z Japonska, Izraele a USA, oproti genotypu ze současného diferenciačního souboru, který je náchylný k evropským izolátům (Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Widrlechner, 2003; Lebeda a Cohen, 2011).

U druhů *L. acutangula* a *L. cylindrica* je známa patotypová i rasová specificita (Lebeda a Cohen, 2010). Genotyp *L. cylindrica* je v diferenciačním souboru a je velmi odolný k řadě evropských izolátů *P. cubensis* (Lebeda a Gadasová, 2002). V Číně a Indii byly zaznamenány infekce i na polních porostech (Lebeda a Widrlechner, 2003).

Genotyp *L. siceraria* je zahrnut v diferenciačním souboru a vykazuje rasovou specificitu k *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003). Je také vysoce náchylný k evropským izolátům, oproti genotypu ze souboru Thomase a kol. (1987), kde byla zaznamenána rezistence k testovaným izolátům (Lebeda a Gadasová, 2002).

3.8 Genetické aspekty interakcí Cucurbitaceae – *P. cubensis*

Pro poznání vzájemného genetického vztahu hostitele a patogenu jsou nezbytné paralelní studie genetiky rezistence hostitele a genetiky virulence patogenu. Rezistence rostlin vůči patogenům čeledi Peronosporaceae vykazuje mendelistickou dědičnost. Schopnost patogenu napadat určitý druh hostitele podmiňuje základní genetická informace, která odpovídá genetické determinaci základní kompatibility. Základní kompatibility je nadřazen systém „gen proti genu“, který pravděpodobně determinuje rasovou/patotypovou specifitu v interakcích hostitel-*P. cubensis* (Lebeda a Schwin, 1994; Lebeda a kol., 2006b). Teorie „gen proti genu“ funguje na předpokladu, že každý hostitelský genotyp by mohl obsahovat jeden nebo více genů rezistence, který interaguje s odpovídajícím genem avirulence. Podle této teorie, lze tedy konstatovat, že počet genů rezistence daného hostitelského genotypu odpovídá minimálnímu počtu genů virulence patogena, aby mohl hostitele napadnout. Tímto způsobem, lze teoreticky stanovit maximální počet ras *P. cubensis*, které je možno rozlišit. Na zdokonaleném diferenačním souboru genotypů čeledi Cucurbitaceae můžeme tedy rozeznat 2^{12} patotypů (Lebeda a Widrechner, 2003; Lebeda a kol., 2006). Rasově specifická rezistence má monogenní nebo oligogenní charakter (je řízena jedním či několika hlavními geny) (Lebeda a Cohen, 2011).

U druhu *Cucumis sativus* a *C. melo* se předpokládá existence monogenně (oligogenně) i polygenně založené rezistence. Major geny pro specifickou rezistenci *C. sativus* mají zřejmě recesivní účinek, u *C. melo* neúplně dominantní účinek (Lebeda a Widrechner, 2003; Lebeda a kol., 2006b). Zdroje rezistence u *C. melo* mají digenní nebo oligogenní charakter. Nejprozkoumanější je modelový objekt PI 124111, genotyp *C. melo* var. *reticulatus*, kde je rezistence podmíněna dvěma neúplně dominantními geny Pc-1 a Pc-2 (Lebeda, 1990; Lebeda a kol., 2006b).

Genetické studie o patogenní variabilitě *P. cubensis* jsou velmi omezené. Podle Thomase a kol. (1987) je genetická variabilita *P. cubensis* dána vysoce infekčním diploidním vegetativním stádiem, protože dvojitá sada genů umožňuje širší spektrum odpovědí *P. cubensis* na selekční tlaky, a tím zvyšuje schopnost patogenu adaptovat se na hostitele (Lebeda a kol., 2006b). V tomto ohledu je nejvíce prozkoumaným patogenem *Bremia lactucae* jako modelový organismus pro studium genetiky virulence.

3.9 Interakce na buněčné a molekulární úrovni

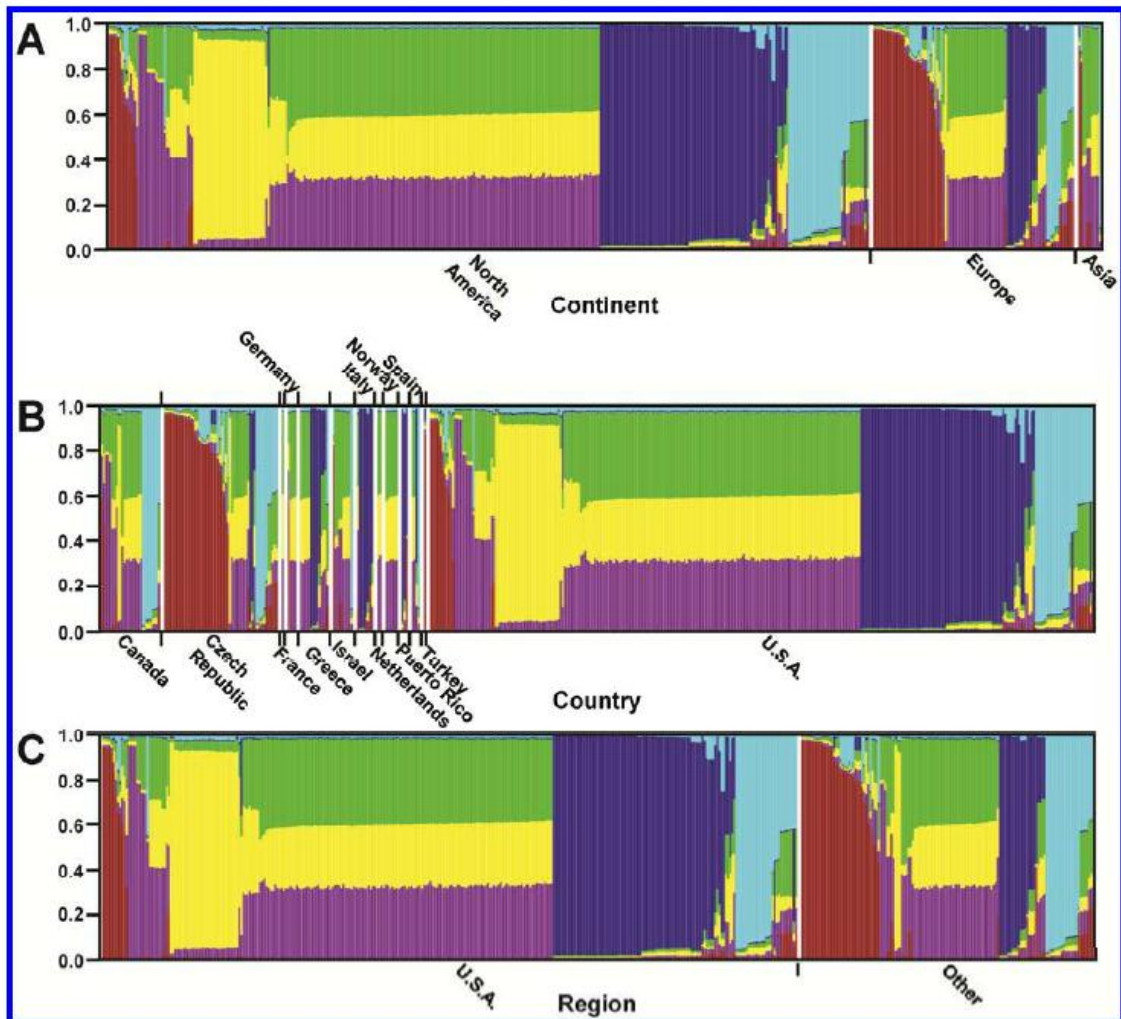
Proces rozpoznání, kdy dochází k penetraci infekčních struktur (hyf) do pletiva hostitele rozhoduje o charakteru interakce (kompatibilita/inkompatibilita) mezi hostitelskou rostlinou a *P. cubensis*. Rozpoznání probíhá na úrovni buněčných stěn a membrán, které detekují jedinečné strukturální znaky patogena pomocí specifických rozpoznávacích molekul rostlin. Pokud jsou detekovány „cizí“ struktury, dojde k zastavení dalšího růstu patogenu. Nejsou-li „cizí“ struktury detekovány, patogen naváže s hostitelskou rostlinou kompatibilní vztah pokračující jeho kolonizací a reprodukcí (Lebeda a kol., 2006b).

Hypersenzitivní reakce se objevuje u genotypů rezistentních vůči napadení krátce po rozpoznání „cizích“ struktur. Výsledkem této reakce je ztráta turgoru buněk, jejich celkový kolaps a nekrotizace (Lebeda a Schwinn, 1994). U druhu *Cucumis melo* je rezistence spojována s akumulací fenolů, kalózy a ligninu v místě infekce. Tyto látky zabraňují dalšímu růstu mycelia patogena. Dalším obranným mechanismem u tohoto druhu je prudké zvýšení aktivity peroxidázy. Byla prokázána i teplotní závislost rezistence, která se plně projevuje při vyšších teplotách (21-25°C). Na procesech rezistence *C. melo* vůči *P. cubensis* se podílejí některé enzymatické systémy (aminotransferázy), jedná se o tzv. „enzymatickou rezistenci“ rostlin (Lebeda a kol., 2006b).

3.10 Genetická struktura populací *P. cubensis*

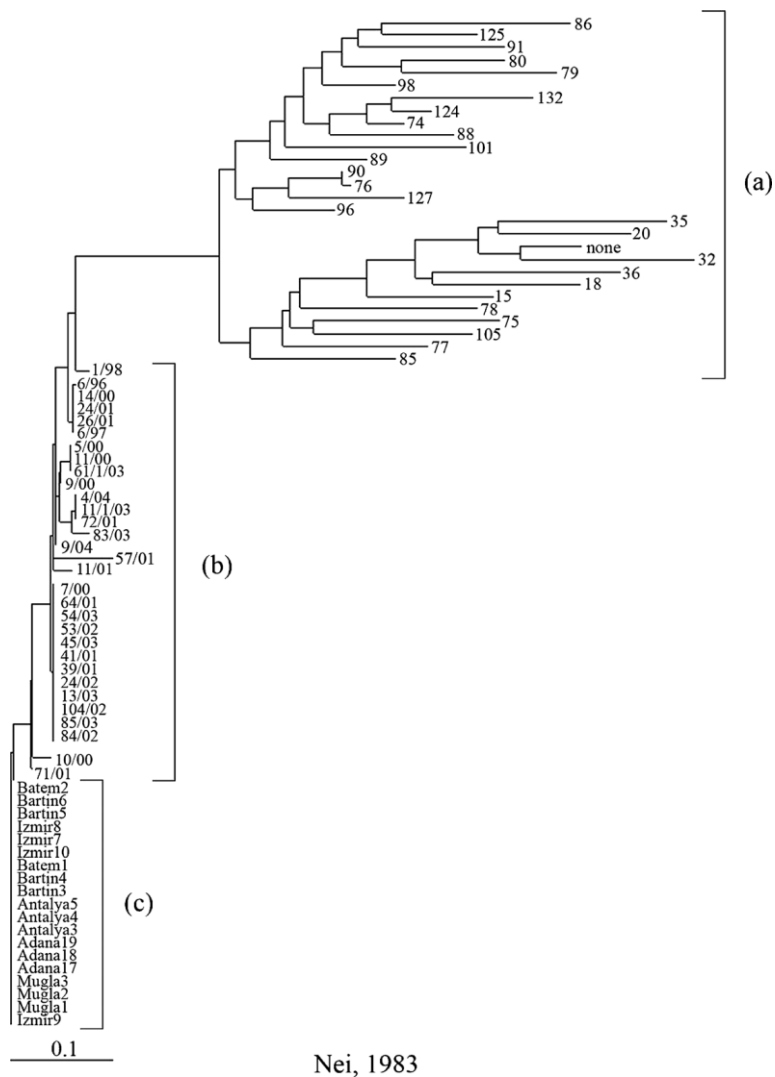
Genetická struktura *P. cubensis* byla zpracována až v posledních letech v několika málo pracích. Quesada-Ocampo a kol. (2012) testovali 465 izolátů *P. cubensis*, pocházejících z různých hostitelů (*Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*), 3 kontinentů, 13 zemí a 19 států USA s využitím molekulárních metod. V této studii byly izoláty zařazeny do předem daných kategorií podle hostitelského druhu, geografie, odběrového roku, a byly genotypovány pomocí dvou mitochondriálních a pěti jaderných lokusů. Bayesiánské klastrování rozdělilo izoláty do šesti genetických klastrů a naznačilo rozdělení populační struktury podle kritéria geografického původu a hostitelského druhu studovaných izolátů, při rozdělení podle dílčích kritérií se některé klastry vyskytovaly více či méně četněji (obr. 7). Ve vzorcích ze severní Ameriky a Evropy byly přítomny všechny genetické klastry. U jednotlivých zemí a států byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých klastrů. Izoláty, které pocházely z okurek, měly odlišné klastrové složení a byla u nich prokázána nižší genetická variabilita ve srovnání s izoláty z jiných tykvovitých zelenin. V této studii se tedy ukázalo, že genetická

struktura české populace *P. cubensis* měla shodné znaky s populacemi z Turecka, Izraele, Kanady a USA (Quesada-Ocampo a kol., 2012).



Obrázek 7. Genetická struktura izolátů *P. cubensis* podle geografického původu (Quesada-Ocampo a kol., 2012).

Další studie o charakterizaci izolátů *P. cubensis* byla s použitím ISSR a SRAP molekulárních markerů. 78 izolátů *P. cubensis* bylo shromážděno v letech 1996-2011 z polí tykvovitých plodin v různých regionech Turecka, Izraele a České republiky a genetická diverzita byla analyzována za použití vysoce polymorfních ISSR a SRAP molekulárních markerů. Získaná data ukázala na pozoruhodnou genetickou diverzitu izolátů *P. cubensis* a mezi nimi. Zatímco izoláty z Turecka a České republiky vykazovaly jednotné genetické pozadí, izoláty z Izraele byly jasně odlišitelné od ostatních a v rámci celé populace *P. cubensis* v Izraeli (obr. 8). Tyto výsledky mohou ukazovat na migraci anebo časté pohlavní rozmnožování patogenu *P. cubensis* v Izraeli (Polat a kol., 2014).



(a) Izrael, (b) Česká republika, (c) Turecko.

Obrázek 8. Dendrogram genetických vztahů mezi 78 izoláty *P. cubensis* na základě kombinovaných souborů dat dvou technik markerů (ISSR a SRAP) (Polat a kol., 2014).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Izolace patogenů, kultivace a uchování

V předložené diplomové práci bylo otestováno na patogenní variabilitu 118 izolátů *Pseudoperonospora cubensis*, které byly získány ze vzorků tykvovitých zelenin, se symptomy infekce pocházejících ze sběrových expedic na území České republiky v letech 2010-2012. Většina izolátů byla sbírána z přirozeně infikovaných porostů *Cucumis sativus*, ale byly zaznamenány i výskyty na jiných hostitelských rostlinách z čeledi Cucurbitaceae (*Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*) (tabulka 2). Přehled všech testovaných izolátů *P. cubensis* za jednotlivé roky se základními informacemi o jejich původu je uveden v tabulkách 3, 4, 5.

Tabulka 2. Počet izolátů *P. cubensis* pocházejících z různých druhů hostitelských rostlin za období 2010-2012.

Hostitelské rostliny Počet testovaných izolátů								
Rok	CS	CM	CP	Cmax	Cmos	CL	LS	Celkový počet izolátů
2010	29	3	4	-	1	1	-	38
2011	25	3	4	1	-	-	-	33
2012	38	-	2	3	2	1	1	47

Hostitelské rostliny: CS – *Cucumis sativus*, CM – *Cucumis melo*, CP – *Cucurbita pepo*, Cmax – *Cucurbita maxima*, Cmos – *Cucurbita moschata*, CL – *Citrullus lanatus*, LS – *Lagenaria siceraria*

Tabulka 3. Seznam izolátů *P. cubensis* za rok 2010.

Číslo izolátu	Kraj	Okres	Lokalita	Stanoviště	H.R.	CH. O. + pozn.	S. N.*	Datum sběru
2/10	OLK	OL	Olomouc-Lutín	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
8/10	JHM	BK	Lipovec	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
11/10	JHM	BO	Silůvky	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
12/10	JHM	BO	Moravské Bránice	pole	CM	nz	1	10.8.2010
13/10	JHM	BO	Moravské Bránice	pole	CS	nz	1	10.8.2010
15/10	JHM	ZN	Moravský Krumlov	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
16/10	JHM	ZN	Rybníky	pole	CS	nz	1	10.8.2010
18/10	JHM	ZN	Hostěřadice-Mišovice	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
21/10	JHM	ZN	Lechovice	pole	CS	nz	4	10.8.2010
23/10	PAK	SY	Bohuňovice	zahrada	CS	nz	1	10.8.2010
24/10	PAK	UO	České Heřmanice	zahrada	CS	nz	2	16.8.2010
30/10	PAK	UO	Choceň	zahrada	CS	nz	1	16.8.2010
31/10	PAK	UO	Choceň	zahrada	CS	nz	3	16.8.2010
34/10/1	HKK	HK	Ledce	zahrada	CS	nz	1	16.8.2010
35/10	HKK	RK	Očelice	zahrada	CS	nz	3	16.8.2010
39/10	HKK	NA	Jaroměř	zahradnictví	CS	nz	3	16.8.2010
40/10	HKK	TU	Vilantice	zahrada	CS	nz	1	16.8.2010
43/10	HKK	JC	Holín	zahrada	CS	nz	3	17.8.2010
45/10	STČ	MB	Dol. Bousov	zahrada	CS	nz	1	18.8.2010
49/10	STČ	NY	Mcely	zahrada	CS	nz	1	17.8.2010
51/10	STČ	NY	Lysá nad Labem	zahradka	CS	nz	3	17.8.2010
52/10/2	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CS	nz	3	19.8.2010
54/10	JHM	BV	Mor. Žižkov	zahrada	CS	nz	3	24.8.2010
56/10	JHM	HO	Čejč	pole	CS	nz	2	24.8.2010
58/10	JHM	HO	Mutěnice	pole	CP ZU	nz	1	24.8.2010

Číslo izolátu	Kraj	Okres	Lokalita	Stanoviště	H.R.	CH. O. + pozn.	S. N.*	Datum sběru
61/10	JHM	HO	Ratiškovice	zahradka	CP	nz	1	24.8.2010
63/10	JHM	HO	Strážnice	pole	CS	nz	1	24.8.2010
66/10	JHM	HO	Veselí nad Moravou	pole	CS	nz	3	24.8.2010
67/10	JHM	HO	Veselí nad Moravou	pole	CM	nz	1	24.8.2010
68/10	ZLK	UH	Ostrožská Nová Ves-Chylice	pole	CS	nz	3	24.8.2010
72/10	ZLK	ZL	Napajedla	zahradka	CP	nz	1	24.8.2010
73/10	ZLK	ZL	Napajedla	zahradka	CP PA	nz	1	24.8.2010
74/10	ZLK	KM	Kvasice	zahradka	CS	nz	2	24.8.2010
79/10	OLK	PR	Tovačov-Annín	zahradky	CS	nz	1	24.8.2010
81/10/1	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CM	nz	1	12.9.2010
83/10/1	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CL	nz	2-3	12.9.2010
86/10/1	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahradka	Cmos	nz	1	19.9.2010

H. R. – hostitelská rostlina, CH.O. – chemická ochrana, S. N.* – stupeň napadení (Lebeda and Urban, 2010), nz – nebylo zjištěno
Druhy hostitelských rostlin: CS – *Cucumis sativus*, CM – *Cucumis melo*, CP – *Cucurbita pepo*, Cmos – *Cucurbita moschata*, CL – *Citrullus lanatus*

Kraj: OLK – Olomoucký, JHM – Jihomoravský, PAK – Pardubický, HKK – Královéhradecký, STČ – Středočeský, ZLK – Zlínský, MSK – Moravskoslezský (http://zkratky.superia.cz/zkratky_kraju_cr/)

Okres: OL – Olomouc, BK – Blansko, BO – Brno-venkov, ZN – Znojmo, SY – Svitavy, UO – Ústí nad Orlicí, HK – Hradec Králové, RK – Rychnov nad Kněžnou, NA – Náchod, TU – Trutnov, JC – Jičín, MB – Mladá Boleslav, NY – Nymburk, BV – Břeclav, HO – Hodonín, UH – Uherské Hradiště, ZL – Zlín, KM – Kroměříž, PR – Přerov, NJ – Nový Jičín (<http://zkratky.superia.cz/okresy/>)

Tabulka 4. Seznam izolátů *P. cubensis* za rok 2011.

Číslo izolátu	Kraj	Okres	Lokalita	Stanoviště	H. R.	CH. O. + pozn.	S. N.	Datum sběru
2/11	JHM	ZN	Lechovice	pole	CS	nz	2	2.8.2011
5/11	JHM	ZN	Hostěřadice-Mišovice	pole	CS	postřik	2	2.8.2011
7/11	JHM	ZN	Rybníky	pole	CS	nz	1	2.8.2011
8/11	JHM	ZN	Moravský Krumlov-Polánka	zahradka	CS	nz	1	2.8.2011
10/11	JHM	BO	Ořechov	pole	CS	nz	1	2.8.2011
17/11	OLK	OL	Olomouc-Lutín	zahradka	CS	ne	1	2.8.2011
18/11	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CS	ne	3	3.8.2011
19/11	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CM	ne	3	3.8.2011
20/11	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CM	ne	2	3.8.2011
22/11	PAK	SY	Horky	zahradka	CS	nz	3	8.8.2011
28/11/1	HKK	RK	Čermná nad Orlicí-Velká Čermná	zahradka	CS	nz	1	8.8.2011
31/11	HKK	HK	Ledce	zahradka	CS	nz	1	8.8.2011
33/11	HKK	RK	Opočno	zahradka	CS	nz	3	8.8.2011
36/11	HKK	JC	Konecchlumí	zahradka	CS	nz	3	9.8.2011
38/11	HKK	JC	Jičín-Robousy	zahradka	CS	nz	2	9.8.2011
40/11	STČ	MB	Dolní Bousov	zahradka	CS	nz	2	9.8.2011
42/11	STČ	NY	Mcery	zahradka	CS	nz	3	9.8.2011
44/11	STČ	NY	Lysá nad Labem	zahradka	CS	nz	3	9.8.2011
45/11/1	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	Cmax	ne	1	12.8.2011
53/11	OLK	PR	Polkovice	zahradka	CS	nz	4	23.8.2011
54/11	OLK	PR	Polkovice	zahradka	CM	nz	1	23.8.2011
55/11	OLK	PR	Kojetín	zahradka	CS	nz	4	23.8.2011
57/11	ZLK	KM	Postoupky	zahradka	CS	nz	4	23.8.2011
59/11	ZLK	KM	Postoupky	zahradka	CP	nz	1	23.8.2011
64/11/1	ZLK	KM	Kvasice	zahradka	CS	nz	3	23.8.2011
65/11	ZLK	ZL	Napajedla	zahradka	CS	nz	3	23.8.2011
66/11	ZLK	ZL	Napajedla	zahradka	CP	nz	1	23.8.2011
70/11	ZLK	UH	Uherská Ostroh	zahradka	CS	nz	4	23.8.2011
72/11	JHM	HO	Veselí nad Moravou	pole	CS	nz	4	23.8.2011
77/11	JHM	HO	Strážnice	pole	CS	nz	4	23.8.2011
85/11	MSK	BR	Dolní Moravice	zahradka	CS	nz	2	24.8.2011
87/11	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahradka	CP	ne	1	12.9.2011
89/11	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahradka	CP	ne	2	13.9.2011

H. R. – hostitelská rostlina, CH. O. – chemická ochrana, S. N.* – stupeň napadení (Lebeda and Urban, 2010), nz – nebylo zjištěno
Druhy hostitelských rostlin: CS – *Cucumis sativus*, CM – *Cucumis melo*, CP – *Cucurbita pepo*, Cmax – *Cucurbita maxima*

Kraj: OLK – Olomoucký, JHM – Jihomoravský, PAK – Pardubický, HKK – Královéhradecký, STČ – Středočeský, ZLK – Zlínský, MSK – Moravskoslezský (http://zkratky.superia.cz/zkratky_kraju_cr/)

Okres: ZN – Znojmo, BO – Brno-venkov, OL – Olomouc, SY – Svitavy, RK – Rychnov nad Kněžnou, HK – Hradec Králové, JC – Jičín, MB – Mladá Boleslav, NY – Nymburk, PR – Přerov, KM – Kroměříž, UH – Uherské Hradiště, HO – Hodonín, BR – Bruntál, NJ – Nový Jičín (<http://zkratky.superia.cz/okresy/>)

Tabulka 5. Seznam izolátů *P. cubensis* za rok 2012.

Číslo izolátu	Kraj	Okres	Lokalita	Stanoviště	H. R.	CH. O. + pozn.	S. N.	Datum sběru
1/12	OLK	OL	Kožušany-Tážaly	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
3/12/1	OLK	PR	Tovačov-Annín	zahrada	CS	nz	2	6.8.2012
3/12/2	OLK	PR	Tovačov-Annín	zahrada	CS	nz	2	6.8.2012
4/12	OLK	PR	Tovačov-Annín	zahrada	CL	nz	1	6.8.2012
5/12	OLK	PR	Polkovice	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
6/12/1	OLK	PR	Kojetín	zahrada	CS	nz	3	6.8.2012
6/12/2	OLK	PR	Kojetín	zahrada	CS	nz	3	6.8.2012
7/12	ZLK	KM	Postoupky	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
8/12	ZLK	KM	Kotojedy	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
9/12	ZLK	KM	Kvasice	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
10/12	ZLK	ZL	Napajedla	zahrada	CS	nz	1	6.8.2012
11/12	ZLK	UH	Ostrožská Nová Ves	pole	CS	nz	1	6.8.2012
13/12	JHM	HO	Veselí nad Moravou	pole	CS	nz	3	6.8.2012
20/12/1	JHM	HO	Strážnice	pole	CS	nz	1	6.8.2012
20/12/2	JHM	HO	Strážnice	pole	CS	nz	1	6.8.2012
25/12	JHM	HO	Čejč	pole	CS	nz	4	6.8.2012
27/12	JHM	HO	Čejč	pole	Cmax	nz	1	6.8.2012
28/12/1	JHM	BV	Velké Bílovice	pole	CS	nz	3	6.8.2012
28/12/2	JHM	BV	Velké Bílovice	pole	CS	nz	3	6.8.2012
29/12	JHM	BV	Velké Bílovice	pole	CP	nz	1	6.8.2012
30/12	PAK	SY	Sedliště	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
31/12/1	PAK	SY	Bohuňovice	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
31/12/2	PAK	SY	Bohuňovice	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
32/12	PAK	SY	Bohuňovice	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
37/12	PAK	UO	Choceň	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
40/12	HKK	RK	Týniště nad Orlicí	zahrada	CS	nz	1	8.8.2012
42/12	HKK	RK	Opočno	zahrada	CS	nz	3	8.8.2012
45/12/1	HKK	JC	Sobotka	zahrada	CS	nz	1	9.8.2012
45/12/2	HKK	JC	Sobotka	Zahrada	CS	nz	1	9.8.2012
47/12	STČ	MB	Řitonic	zahrada	CS	nz	1	9.8.2012
50/12	STČ	NY	Lysá nad Labem	zahrada	CS	nz	3	9.8.2012
51/12	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CS	nz	3	11.8.2012
53/12	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	Cmos	nz	1	11.8.2012
55/12	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	CM	nz	3	16.8.2012
56/12	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	LS	nz	1	16.8.2012
58/12	OLK	OL	Olomouc-Lutín	zahrada	CS	nz	4	22.8.2012
60/12	OLK	PV	Olšany u Prostějova	zahrada	CS	nz	4	22.8.2012
61/12	OLK	PV	Mostkovice	pole	CS	nz	3	22.8.2012
63/12	JHM	BO	Ochoz u Brna	zahrada	CS	nz	4	22.8.2012
65/12	JHM	BO	Moravské Bránice	zahrada	CS	nz	3	22.8.2012
67/12	JHM	ZN	Rybníky	pole	CS	nz	4	22.8.2012
69/12	JHM	ZN	Prosiměřice	zahrada	CS	nz	4	22.8.2012
71/12	OLK	OL	Olomouc-Holice	pole	Cmax	nz	1	22.8.2012
74/12	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahrada	Cmos	nz	1	29.9.2012
75/12	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahrada	CP	nz	2	29.9.2012
77/12	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahrada	Cmax	nz	3	29.9.2012
81/12	MSK	NJ	Nový Jičín-Kojetín	zahrada	CS	nz	3	8.10.2012

H. R. – hostitelská rostlina, CH. O. – chemická ochrana, S. N.* – stupeň napadení (Lebeda and Urban, 2010), nz – nebylo zjištěno
 Druhy hostitelských rostlin: CS – *Cucumis sativus*, CP – *Cucurbita pepo*, Cmax – *Cucurbita maxima*, Cmos – *Cucurbita moschata*, CL – *Citrullus lanatus*, LS – *Lagenaria siceraria*

Kraj: OLK – Olomoucký, JHM – Jihomoravský, PAK – Pardubický, HKK – Královéhradecký, STČ – Středočeský, ZLK – Zlínský, MSK – Moravskoslezský (http://zkratky.superia.cz/zkratky_kraju_cr/)

Okres: OL – Olomouc, PR – Přerov, KM – Kroměříž, UH – Uherské Hradiště, HO – Hodonín, BV – Břeclav, SY – Svitavy, UO – Ústí nad Orlicí, RK – Rychnov nad Kněžnou, JC – Jičín, MB – Mladá Boleslav, NY – Nymburk, PV – Prostějov, BO – Brno-venkov, ZN – Znojmo, NJ – Nový Jičín (<http://zkratky.superia.cz/okresy/>)

Vzorky infikovaných listů hostitelských rostlin získané při sběrových expedicích byly umístěny do umělohmotných misek (110 x 85 x 45 mm) s navlhčenou vrstvou buničité vaty a filtračního papíru. Listy byly pokládány do misek spodní stranou nahoru, aby nedošlo

k poškození sporangioforů, které se objevují na spodní straně listů. Během expedice byly misky se vzorky ukládány do chladicích boxů. Poté byly v laboratoři misky s infikovanými listy *P. cubensis* uloženy do fytotronu po dobu 2-3 dnů. Během této doby došlo k rozvoji infekce. Misky byly kontrolovány, zda jsou dostatečně navlhčeny, abychom zabránili jejich vyschnutí. Poté došlo k inokulaci *P. cubensis* na vysoce náchylnou odrůdu *Cucumis sativus* cv Marketer 430. Listy této odrůdy byly nejprve nachystány do Petriho misek o průměru 10 mm, které byly předem opatřeny navlhčenou vrstvou buničité vaty a filtračního papíru. Inokulum bylo připraveno z infikovaného ložiska na listu, které bylo vystřiženo pomocí sterilních nůžek a přeneseno do zkumavky s destilovanou vodou (cca 5 ml). Ve zkumavce došlo ke smytí spor z listu, pomocí třepačky a zbytek rostlinného materiálu ze zkumavky byl odstraněn pomocí pinzety. Takto vzniklé inokulum bylo pomocí sterilního skleněného rozprašovače rovnoměrně rozprášeno na spodní strany listů, které byly připraveny v Petriho miskách (Lebeda a Urban, 2010). Petriho misky s izoláty *P. cubensis* byly označeny a umístěny do fytotronu, kde byly nejprve 24 hodin uloženy ve tmě (přikryty tmavou fólií) a následně byly kultivovány za těchto podmínek: 12 hodinová fotoperioda s teplotou 18°C ve světelné fázi a 15°C v temnostní fázi. Doba inkubace trvala přibližně 6-8 dnů. Takto připravené izoláty *P. cubensis* mohly být použity přímo k testování variability virulence (Lebeda a Widrechner, 2004).

Čisté kultury *P. cubensis* (izoláty) mohou být uchovány po dobu 6 měsíců při -80°C. Některé izoláty *P. cubensis* použité v této diplomové práci jsou součástí speciální sbírky fytopatogenních mikroorganismů (sinice, řasy, houby, cytoplasmy, viry) Národního programu mikroorganismů, do kterého je zapojena i PŘF UP v Olomouci (Lebeda a kol., 2013).

4.2 Rostlinný materiál

Pro množení izolátů *P. cubensis* byla použita náchylná odrůda *Cucumis sativus* cv. Marketer 430. Virulence izolátů *P. cubensis* byla stanovena na základě jejich reakcí s diferenciacním souborem čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003). Přehled 12 genotypů diferenciacního souboru je uveden v tabulce 6. Osivo genotypů tohoto souboru je uchováváno ve sbírce semen Fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PŘF UP v Olomouci. Podrobný popis jednotlivých druhů diferenciacního souboru čeledi Cucurbitaceae lze nalézt v databázi EVIGEZ (http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm).

Tabulka 6. Přehled diferenciacního souboru čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003).

Číslo	Druh	Číslo genového zdroje	EVIGEZ	Název (odrůda)	Země původu
1	<i>Cucumis sativus</i>		H39-0121	Marketer 430	USA
2	<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i>	PI 292008	H40-1117	Ananas Yokneam	Izrael
3	<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i>	CUM 238/1974	H40-0625	Baj-Gua	Japonsko
4	<i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i>	PI 200819	H40-0611		Myanmar
5	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	PI 171622	H42-0117	Dolmalik	Turecko
6	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>texana</i>	PI 614687	H42-0130		USA
7	<i>Cucurbita fraterna</i>	PI 532355	H42-0136		Mexiko
8	<i>Cucurbita maxima</i>		H42-0137	Goliáš	Československo
9	<i>Citrullus lanatus</i>		H37-0008	Malali	Izrael
10	<i>Benincasa hispida</i>	BEN 485	H15-0001		USA
11	<i>Luffa cylindrica</i>		H63-0010		?
12	<i>Lagenaria siceraria</i>		H59-0009		?

Číslo genového zdroje – původní číslo druhu, pro který je položka evidována v genové bance donora.
EVIGEZ – přidělené číslo druhu v evidenci genetických zdrojů rostlin v České republice.

Předpěstování rostlin diferenciacního souboru čeledi Cucurbitaceae probíhalo ve skleníku za optimálních podmínek. Dostatečný počet semen (cca 10 semen) od každého genotypu bylo vyseto do kelímků s navlhčeným perlitem. Semena v kelímcích s perlitem vyklíčila během několika dní a poté byla přesazena do květináčů se substrátem v poměru 1:1 (zahradní zemina:rašelina) po 3-4 rostlinách v 1 květináči od každého genotypu. Teplota prostředí byla regulována (denní 25°C a noční 15°C), rostliny byly pravidelně zavlažovány a jednou týdně přihnojovány hnojivem Kristalon (Květ a plod, Hydro Agri Rotterdam, Nizozemí). Rostliny nebyly chemicky ošetřeny. Pro testování byly použity rostliny 5-8 týdnů staré ve stádiu 3.-6. pravého listu (Lebeda a kol., 2013).

4.3 Determinace variability virulence

Celkem u 118 izolátů *P. cubensis* z let 2010-2012 z České republiky byla determinována variabilita virulence (detekovány patotypy).

4.3.1 Metoda listových disků

K determinaci patotypů *P. cubensis* byla použita metoda listových disků navržená Lebedou a Widrlechnerem v roce 2003. Každý genotyp diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae byl reprezentován 5 listovými disky (o průměru 15 mm) ve třech opakováních. Listové disky byly připraveny pomocí korkovrtu. Takto připravený testovací materiál byl ukládán spodní stranou nahoru do předem připravených plastových beden s navlhčenou vrstvou buničité vaty a filtračního papíru. Disky musely přilnout k navlhčenému materiálu celou svou plochou, aby nedošlo k omezení infekce z nedostatku vlhkosti. Disky byly následně inokulovány suspenzí spor (cca 10^5 spor/ml) pomocí skleněného rozprašovače. Inokulum bylo získáno z předem přeočkovaných izolátů *P. cubensis* získaných při sběrových expedicích, jež byly uchovány v Petriho miskách. Z infikovaných listů *Cucumis sativus* cv. Marketer 430 byly vystříhány pomocí sterilních nůžek pouze oblasti pokryté sporangiofory se zralými sporangii. Vystřížené oblasti byly vloženy do zkumavky s destilovanou vodou, kde následným použitím třepačky došlo ke smytí spor. Vzniklá suspenze spor byla rozprášena skleněným rozprašovačem rovnoměrně po všech listových discích v plastové bedně. Bedny s disky byly přikryty skleněnými deskami pro udržení optimální vlhkosti. Bedny s disky byly umístěny do fytotronu, kde byly zajištěny optimální podmínky. Prvních 24 hodin byly testované vzorky uchovány ve tmě. V dalším průběhu inkubace byla udržována 12 hodinová fotoperioda s teplotou 18°C ve světelné fázi a 15°C v temnostní fázi. Po celou dobu inkubace byla kontrolována dostatečná vlhkost v bednách s listovými disky (Lebeda a Widrlechner, 2003).

4.3.2 Metody hodnocení

Intenzita sporulace byla hodnocena kvantitativně a kvalitativně. Kvantitativní hodnocení se provádělo ve dvoudenních intervalech 6. až 14. den po inokulaci. Hodnotilo se pomocí pětibodové stupnice (Lebeda a Urban, 2010), kolik % listového disku bylo pokryto myceliem patogena. Tato metoda hodnocení nám ve výsledku poskytla velmi podrobné informace o vztahu hostitele a patogena.

5 bodová stupnice hodnocení napadení (Lebeda a Urban, 2010):

- 0 – bez sporulace
- 1 – < 25% plochy disku pokryto sporangiofory se sporami
- 2 – 25,1-50% plochy disku pokryto sporangiofory se sporami
- 3 – 50,1-75% plochy disku pokryto sporangiofory se sporami
- 4 – > 75,1% plochy disku pokryto sporangiofory se sporami

Souhrnná hodnota intenzity sporulace (celkový stupeň napadení) byla vypočítaná pomocí následujícího vzorce navrženého Towsendem a Heubergerem (1942):

$$P = \sum (n \cdot v) \cdot 100 / (x \cdot N),$$

P ... celkový stupeň napadení

n počet disků v každé kategorii napadení

v stupeň napadení

x maximální stupeň sporulace

N ... celkový počet listových hodnocených disků

Kvalitativní metoda hodnocení byla založena na náchylnosti jednotlivých izolátů *P. cubensis*. Sporulace byla použita jako měřítko virulence. Toto hodnocení bylo prováděno s využitím následující stupnice (Lebeda a Urban, 2010):

- + Kompatibilní/virulentní reakce, > 35% plochy disku pokryto sporangiofory patogena
- Inkompatibilní/avirulentní reakce, < 35% plochy disku pokryto sporangiofory patogena

4.3.3 Stanovení úrovně patogenity

Úroveň patogenity izolátů byla stanovena na základě počtu virulentních faktorů (VF 1-12, číslované podle pořadí genotypu v diferenciacním souboru jednotlivých izolátů *P. cubensis*) (tab. 7). Virulentní faktor izolátu *P. cubensis* byl dán součtem kompatibilních reakcí genotypů diferenciacního souboru čeledi Cucurbitaceae k danému izolátu (Lebeda a kol., 2013). Podle počtu virulentních faktorů lze rozlišit 3 úrovně patogenity: nízkou, střední a vysokou (Lebeda a Urban, 2004b).

Tabulka 7. Úroveň patogenity podle faktorů virulence (Lebeda a Urban, 2004b).

Úroveň patogenity	Stupeň patogenity (počet VF)
Nízká	1 – 4
Střední	5 – 8
Vysoká	9 – 12

4.3.4 Tetrádový kód

Patotypy *P. cubensis* byly popsány pomocí tetrádového kódu, nově navrženého systému pro popis patotypů Lebedou a Widrlechnerem 2003. Binární výsledky (+,-) byly získány pomocí kvalitativní metody hodnocení virulence a na jejich základě byl sestaven tetrádový kód. Tento kód byl složen ze tří částí, z nichž každá odpovídá jedné ze tří skupin po čtyřech diferenciacích. Každému diferenciaci byla přiřazena číselná hodnota podle náchylné (+) nebo rezistentní (-) reakce. Základem je číselná hodnota 1, 2, 4, 8, pokud jsou všechny reakce diferenciaci náchylné. V rámci každé skupiny byly sečteny číselné hodnoty a takto získané součty byly prezentovány jako kód, ve formátu tři čísel oddělených tečkami (součet skupiny 1.součet skupiny 2.součet skupiny 3). Tetrádový kód je specifický pro každý patotyp *P. cubensis* a slouží jako jeho identifikační číslo, které jednoznačně vystihuje jeho patogenitu a rovněž ho numericky popisuje (Lebeda a Widrlechner, 2003; Lebeda a Urban, 2010).

Tabulka 8. Příklad převedení binárních výsledků testovaných izolátů *P. cubensis* dle tetrádového kódu.

Izoláty <i>P. cubensis</i>	Skupiny dif. genotypů	1. <i>Cucumis</i> spp.				2. <i>Cucurbita</i> spp.				3. ostatní <i>Cucurbitaceae</i>				Kód patotypu
	Č. dif. genotypu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Hodnota	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	
	11/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15
	33/11	1	2	0	8	0	2	4	8	0	2	0	0	11.14.2
	58/12	1	2	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	7.2.0

Pozn.: Číslo diferenciacního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenciacním souboru viz. tabulka 6.

5 VÝSLEDKY

5.1 Variabilita virulence izolátů *P. cubensis* v roce 2010

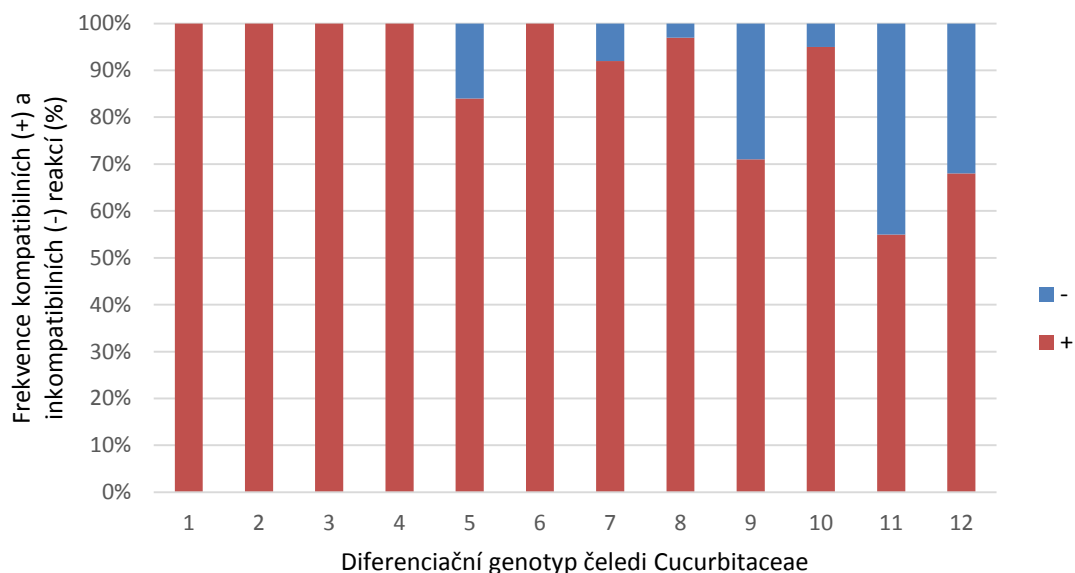
V roce 2010 bylo otestováno 38 izolátů *P. cubensis* pocházejících ze vzorků infikovaných rostlin čeledi Cucurbitaceae (*Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Citrullus lanatus*). Patogenní variabilita izolátů *P. cubensis* byla zjišťována na základě vyhodnocení reakcí testovaných izolátů s genotypy diferenciačního souboru navrženého Lebedou a Widrechnerem v roce 2003. Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru byla vyjádřena pomocí hodnoty intenzity sporulace, která byla vypočítána na základě vzorce (kapitola 4.3.2) s pomocí 5 bodové stupnice (Lebeda a Urban, 2010). Výsledky jsou znázorněny v tabulce 9.

Tabulka 9. Intenzita sporulace (%) izolátů *P. cubensis* získaných v roce 2010 na diferenciačním souboru Cucurbitaceae.

Genotyp*/ Izolát	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2/10	96,7	100,0	100,0	83,3	88,3	75,0	63,3	86,7	85,0	71,7	38,3	40,0
8/10	98,3	100,0	100,0	91,7	100,0	86,7	26,7	85,0	96,7	43,3	78,3	28,3
11/10	100,0	100,0	100,0	95,0	100,0	88,3	38,3	90,0	100,0	68,3	66,7	38,3
12/10	93,3	93,3	100,0	95,0	96,7	93,3	73,3	83,3	71,7	73,3	56,7	28,3
13/10	100,0	100,0	100,0	90,0	45,0	66,7	46,7	75,0	85,0	58,3	41,7	35,0
15/10	88,3	98,3	75,0	78,3	96,7	70,0	20,0	40,0	66,7	46,7	76,7	13,3
16/10	90,0	81,7	95,0	98,3	86,7	95,0	53,3	90,0	75,0	81,7	53,3	66,7
18/10	93,3	100,0	95,0	86,7	91,7	80,0	66,7	80,0	25,0	86,7	56,7	41,7
21/10	63,3	100,0	100,0	95,0	93,3	76,7	80,0	85,0	58,3	43,3	65,0	25,0
23/10	100,0	100,0	100,0	78,3	70,0	95,0	66,7	78,3	100,0	93,3	48,3	35,0
24/10	100,0	86,7	93,3	80,0	83,3	100,0	75,0	100,0	6,7	86,7	60,0	98,3
30/10	100,0	61,7	56,7	73,3	58,3	95,0	88,3	76,7	8,3	61,7	48,3	81,7
31/10	100,0	60,0	61,7	66,7	63,3	95,0	75,0	73,3	36,7	71,7	56,7	93,3
34/10	100,0	100,0	88,3	66,7	66,7	100,0	55,0	81,7	5,0	75,0	63,3	100,0
35/10	100,0	100,0	100,0	88,3	0,0	96,7	88,3	71,7	0,0	33,3	0,0	50,0
39/10	91,7	100,0	100,0	96,7	28,3	86,7	70,0	95,0	28,3	46,7	36,7	50,0
40/10	100,0	100,0	100,0	100,0	1,7	90,0	81,7	81,7	25,0	58,3	0,0	63,3
43/10	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	81,7	100,0	25,0	55,0	15,0	53,3
45/10	90,0	100,0	100,0	100,0	100,0	93,3	65,0	81,7	91,7	70,0	93,3	66,7
49/10	100,0	100,0	96,7	65,0	0,0	100,0	85,0	90,0	0,0	38,3	0,0	36,7
51/10	93,3	100,0	81,7	70,0	98,3	86,7	16,7	70,0	51,7	80,0	30,0	16,7
52/10/2	100,0	100,0	100,0	91,7	58,3	96,7	58,3	100,0	100,0	81,7	53,3	60,0
54/10	98,3	93,3	90,0	61,7	46,7	78,3	66,7	66,7	91,7	35,0	43,3	26,7
56/10	100,0	100,0	100,0	96,7	75,0	96,7	80,0	100,0	95,0	96,7	81,7	71,7
58/10	60,0	95,0	100,0	50,0	35,0	76,7	50,0	60,0	73,3	93,3	30,0	21,7
61/10	93,3	98,3	100,0	75,0	58,3	95,0	96,7	80,0	71,7	90,0	20,0	38,3
63/10	100,0	100,0	100,0	86,7	41,7	96,7	78,3	100,0	100,0	58,3	30,0	35,0
66/10	96,7	100,0	100,0	76,7	48,3	100,0	63,3	80,0	58,3	71,7	28,3	45,0
67/10	100,0	100,0	91,7	93,3	40,0	91,7	76,7	85,0	68,3	86,7	0,0	95,0
68/10	98,3	100,0	100,0	66,7	65,0	81,7	35,0	76,7	95,0	68,3	26,7	28,3
72/10/1	98,3	91,7	95,0	91,7	55,0	91,7	46,7	86,7	43,3	55,0	31,7	26,7
72/10/2	100,0	93,7	98,3	95,1	0,0	100,0	88,3	90,2	64,3	98,3	0,0	0,0
73/10	75,0	93,3	90,0	53,3	83,3	80,0	68,3	50,0	95,0	45,0	15,0	18,3
74/10/1	100,0	100,0	95,0	71,7	48,3	100,0	85,0	98,3	100,0	73,3	30,0	68,3
79/10	100,0	95,0	96,7	66,7	41,7	86,7	53,3	86,7	55,0	98,3	30,0	46,7
81/10/1	96,7	100,0	98,3	81,7	0,0	85,0	80,0	25,0	0,0	28,3	0,0	31,7
83/10/1	100,0	100,0	73,3	96,7	51,7	95,0	83,3	95,0	85,0	100,0	8,3	95,0
86/10/1	95,0	71,7	71,7	48,3	71,7	86,7	96,7	80,0	55,0	68,3	35,0	70,0

*genotypy čeledi Cucurbitaceae diferenciačního souboru navrženého Lebedou a Widrechnerem pro detekci virulence *P. cubensis* (patotypů) (tabulka 6).

Na obrázku 9 je znázorněn graf frekvence výskytu kompatibilních (náchylných) a inkompatibilních (odolných) reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae s izoláty *P. cubensis*. Nejčastěji byla inkompatibilní reakce zaznamenána u těchto genotypů: 9 (*Citrullus lanatus*), 11 (*Luffa cylindrica*) a 12 (*Lagenaria siceraria*) a vykazovaly tedy větší odolnost vůči *P. cubensis* ve srovnání s ostatními genotypy. Nižší procento (do 18%) rezistentních reakcí bylo zaznamenáno také u následujících genotypů: 5 (*Cucurbita pepo* var. *pepo*), 7 (*Cucurbita fraterna*), 8 (*Cucurbita maxima*) a 10 (*Benincasa hispida*). Oproti tomu genotypy z rodu *Cucumis* (1-4) a genotyp 6 (*Cucurbita pepo* var. *texana*) vykazovaly 100% náchylnost k infekci *P. cubensis*. Z celkového hlediska lze tedy říci, že genotypy tohoto diferenciačního souboru se lišily v náchylnosti k izolátům *P. cubensis* z roku 2010.



Obrázek 9. Frekvence kompatibilních a inkompatibilních reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae v reakci na všechny izoláty *P. cubensis* z roku 2010.

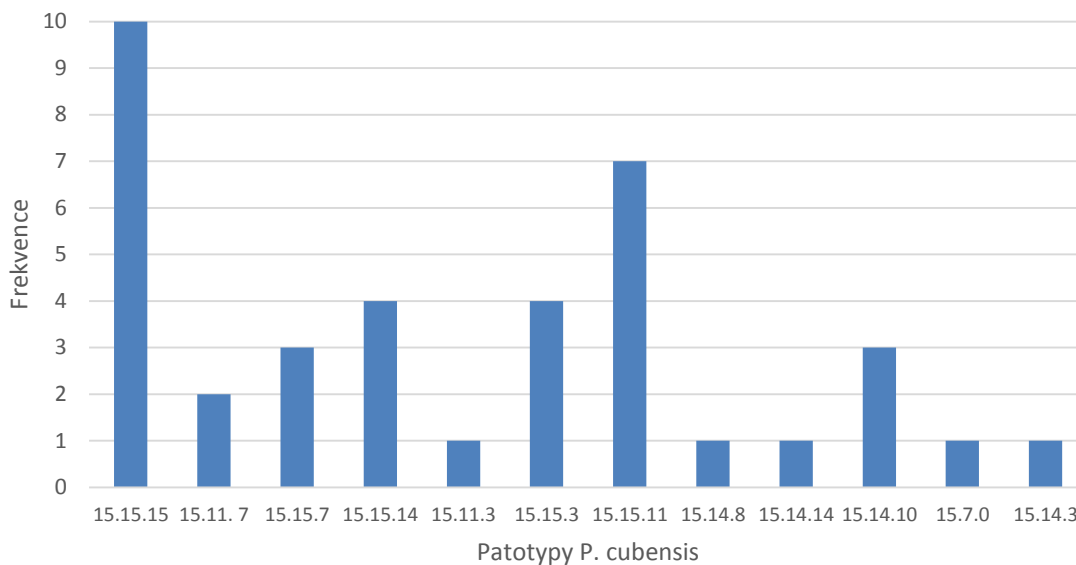
Izolátům *P. cubensis* byly za pomoci tetrádového kódu a počtu kompatibilních reakcí přiřazeny kódy (tabulka 10). Metodika kódování patotypů je uvedena v kapitole 4.3.4. Pomocí kódovacího systému bylo v roce 2010 rozlišeno 12 patotypů.

Tabulka 10. Označení patotypů *P. cubensis* determinovaných v roce 2010 podle tetradového kódu (Lebeda a Widrechner, 2003) na základě jejich reakcí na diferenční soubor.

Izoláty <i>P. cubensis</i>	Skupiny dif. genotypů	1. <i>Cucumis</i> spp.				2. <i>Cucurbita</i> spp.				3. ostatní Cucurbitaceae				Kód patotypu
	Číslo dif. genotypu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Hodnota	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	
2/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
8/10	1	2	4	8	1	2	0	8	1	2	4	0	15.11.7	
11/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
12/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	0	15.15.7	
13/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
15/10	1	2	4	8	1	2	0	8	1	2	4	0	15.11.7	
16/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
18/10	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
21/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	0	15.15.7	
23/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
24/10	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
30/10	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
31/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
34/10	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
35/10	1	2	4	8	0	2	4	8	0	0	0	8	15.14.8	
39/10	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	8	15.14.14	
40/10	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
43/10	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
45/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
49/10	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
51/10	1	2	4	8	1	2	0	8	1	2	0	0	15.11.3	
52/10/2	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
54/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	0	15.15.7	
56/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
58/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
61/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
63/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
66/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
67/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
68/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
72/10/1	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
72/10/2	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	0	15.14.3	
73/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
74/10/1	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
79/10	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
81/10/1	1	2	4	8	1	2	4	0	0	0	0	0	15.7.0	
83/10/1	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.11	
86/10/1	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	

Pozn.: Číslo diferenčního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenčním souboru, viz. tabulka 6.

Na testovaném souboru 38 izolátů *P. cubensis* z roku 2010 bylo rozlišeno 12 různých patotypů, které se v populaci patogenu vyskytovaly s různou četností. Nejpočetnější byl „super“ patotyp 15.15.15, který byl zaznamenán u 10 izolátů *P. cubensis* a byl následován patotypem 15.15.11, který se vyskytoval u 7 izolátů. Patotypy 15.15.14 a 15.15.3 byly zastoupeny se stejnou četností (4x) v populaci *P. cubensis*. Patotyp 15.15.7 byl zastoupen 3x, patotyp 15.11.7 2x. Ostatní patotypy (42%, 5 patotypů: 15.11.3, 15.14.8, 15.14.14, 15.7.0 a 15.14.3) se vyskytly v populaci *P. cubensis* pouze jednou. Frekvence výskytu patotypů *P. cubensis* je znázorněna na obrázku 10.



Obrázek 10. Frekvence výskytu patotypů *P. cubensis* v roce 2010.

V roce 2010 byla většina izolátů (95%) vysoce patogenní, tzn. patřily do skupiny izolátů s počtem virulentních faktorů 9-12, a pouze 2 izoláty (5%) vykazovaly střední hodnotu patogenity (5-8 virulentních faktorů). Žádný z testovaných izolátů nepatřil do kategorie nízké úrovně patogenity (1-4 virulentní faktory). Stanovení úrovně patogenity je znázorněno v tabulce 11. Na základě výsledků z roku 2010 lze tedy říci, že v populaci patogenu převažovaly kmeny vysoce virulentní.

Tabulka 11. Úroveň patogenity izolátů *P. cubensis* za rok 2010.

Úroveň patogenity (počet VF)	Počet izolátů <i>P. cubensis</i> /(%)
Nízká (1 – 4)	0/0.0
Střední (5 – 8)	2/5.0
Vysoká (9 – 12)	36/95.0

Stanovení úrovně patogenity podle Lebeda a Urban, 2004.
VF – virulentní faktor.

5.2 Variabilita virulence izolátů *P. cubensis* v roce 2011

V roce 2011 bylo determinováno na variabilitu virulence celkem 33 izolátů *P. cubensis* získaných při sběrech na území České republiky. Tyto izoláty pocházely ze vzorků se symptomy infekce *P. cubensis* převážně z hostitele *Cucumis sativus*, ale ojediněle i s infekcí na jiných hostitelských rostlinách z čeledi Cucurbitaceae (*Cucumis melo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*).

Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru byla vyjádřena pomocí hodnoty intenzity sporulace, která byla vypočítána na základě vzorce (kapitola 4.3.2) s pomocí 5 bodové stupnice (Lebeda a Urban, 2010). Výsledky jsou znázorněny v tabulce 12.

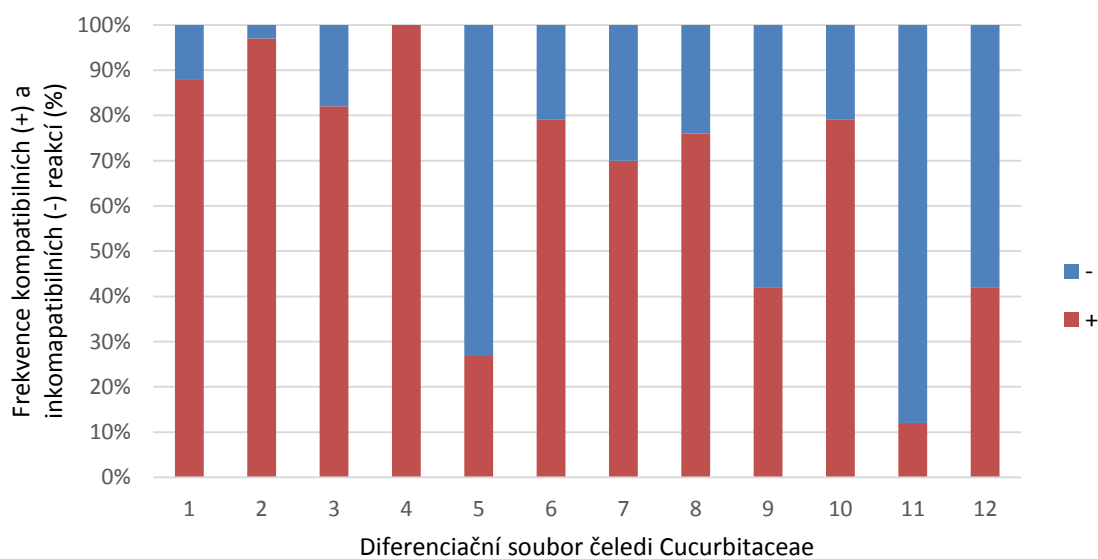
Tabulka 12. Intenzita sporulace (%) izolátů *P. cubensis* získaných v roce 2011 na diferenciačním souboru Cucurbitaceae.

Genotyp/ izolát	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2/11	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	1,6	95,0
5/11	26,6	60,0	38,3	58,3	13,3	30,0	31,6	41,6	25,0	81,6	0,0	0,0
7/11	100,0	100,0	100,0	100,0	53,3	100,0	96,6	100,0	51,6	100,0	50,0	91,6
8/11	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	93,3	95,0	93,3	98,3	100,0	0,0	65,0
10/11	90,0	100,0	96,6	90,0	23,3	83,3	85,0	93,3	0,0	31,6	0,0	11,6
17/11	100,0	100,0	100,0	100,0	3,3	96,6	98,3	100,0	95,0	90,0	13,3	78,3
18/11	100,0	100,0	93,3	96,6	73,3	73,3	88,3	73,3	68,3	68,3	0,0	93,3
19/11	93,3	86,7	100,0	100,0	20,0	68,3	60,0	100,0	86,7	83,3	40,0	60,0
20/11	90,0	96,7	85,0	98,3	81,7	60,0	55,0	26,7	76,7	31,7	20,0	60,0
22/11	53,3	50,0	33,3	66,6	0,0	16,6	5,0	8,3	0,0	40,0	0,0	0,0
28/11/1	100,0	100,0	100,0	93,3	0,0	90,0	39,0	73,3	56,8	100,0	0,0	45,0
31/11	93,3	100,0	26,6	96,6	6,6	75,0	56,6	58,3	0,0	53,3	0,0	26,6
33/11	93,3	66,6	0,0	80,0	6,6	86,6	56,6	60,0	0,0	98,3	0,0	18,3
36/11	100,0	100,0	100,0	100,0	6,6	91,6	95,0	98,3	61,6	100,0	0,0	26,6
38/11	100,0	100,0	0,0	100,0	0,0	60,0	51,6	68,3	0,0	46,6	0,0	28,3
40/11	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	80,0	66,6	75,0	0,0	10,0	25,0	43,3
42/11	86,6	78,3	85,0	68,3	1,6	35,0	21,6	68,3	100,0	0,0	36,6	1,6
44/11	85,0	98,3	98,3	83,3	3,3	68,3	70,0	85,0	0,0	8,3	38,3	16,6
45/11	100,0	93,3	93,3	100,0	63,3	98,3	60,0	93,3	45,0	95,0	0,0	1,7
53/11	35,0	40,0	81,6	70,0	0,0	48,3	1,6	40,0	0,0	93,3	0,0	23,3
54/11	93,3	88,3	95,0	100,0	50,0	100,0	100,0	98,3	0,0	60,0	0,0	36,7
55/11	80,0	76,6	70,0	80,0	0,0	50,0	35,0	76,6	0,0	51,6	0,0	31,6
57/11	23,3	100,0	78,3	53,3	0,0	43,3	13,3	31,6	0,0	58,3	0,0	0,0
59/11	100,0	100,0	100,0	96,7	100,0	96,7	98,3	95,0	20,0	100,0	0,0	36,7
64/11/1	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	93,3	100,0	0,0	98,3	0,0	63,3
65/11/2	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	81,6	93,3	55,0	100,0	0,0	63,3
66/11	96,7	93,3	100,0	96,7	91,7	88,3	100,0	80,0	100,0	96,7	0,0	63,3
70/11	71,6	26,6	20,0	70,0	15,0	66,6	8,3	28,3	0,0	75,0	0,0	0,0
72/11	58,3	60,0	93,3	60,0	0,0	28,3	5,0	21,6	0,0	13,3	30,0	16,6
77/11	93,3	60,0	26,6	91,6	60,0	96,6	68,3	95,0	0,0	80,0	0,0	15,0
85/11	90,0	100,0	100,0	70,0	0,0	73,3	26,6	91,6	100,0	90,0	0,0	0,0
87/11	10,0	36,7	65,0	45,0	16,7	16,7	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
89/11	63,3	100,0	100,0	100,0	95,0	98,3	75,0	98,3	71,7	86,7	0,0	28,3

*genotypy čeledi Cucurbitaceae diferenciačního souboru navrženého Lebedou a Widrechnerem pro detekci virulence *P. cubensis* (patotypů) (tabulka 6).

Kompatibilní a inkompatibilní reakce jsou výsledkem náchylnosti nebo odolnosti různých genotypů čeledi Cucurbitaceae na patogena *P. cubensis*. Výsledky těchto reakcí jsou uvedeny v grafu na obrázku 11. Největšího počtu inkompatibilních reakcí bylo dosaženo u těchto genotypů: 5 (*Cucurbita pepo* var. *pepo*), 9 (*Citrullus lanatus*), 11 (*Luffa cylindrica*) a 12

(*Lagenaria siceraria*). U genotypu 11 byla frekvence výskytu rezistentních reakcí téměř 90%, dá se tedy říci, že genotyp *Luffa cylindrica* byl v roce 2011 velice odolný vůči *P. cubensis*. Další genotypy: 6 (*Cucurbita pepo* var. *texana*), 7 (*Cucurbita fraterna*), 8 (*Cucurbita maxima*) a 10 (*Benincasa hispida*) vykazovaly četnost inkompatibilních reakcí kolem 25%, genotypy: 1 (*Cucumis sativus*), 2 (*Cucumis melo* var. *melo*), 3 (*Cucumis melo* var. *conomon*) měly v populaci patogenu 15% zastoupení. Pouze jediný genotyp 4 (*Cucumis melo* var. *acidulus*) byl 100% náchylný (0% inkompatibilní reakce). Z celkového hlediska lze tedy říci, že genotypy tohoto diferenciačního souboru se lišily v náchylnosti k izolátům *P. cubensis* z roku 2011.



Obrázek 11. Frekvence kompatibilních a inkompatibilních reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae v rámci všech izolátů *P. cubensis* za rok 2011.

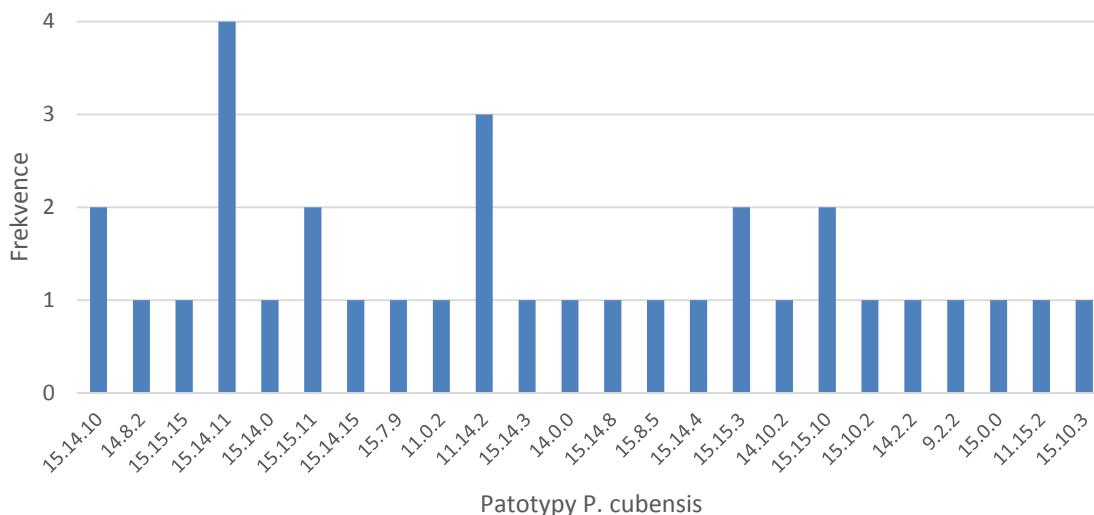
K determinaci patotypů *P. cubensis* byl použit tetradový kód. Kód patotypu byl dán součtem kompatibilních reakcí genotypů v rámci jednotlivých skupin diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae s izoláty *P. cubensis* (tabulka 13).

Tabulka 13. Označení patotypů *P. cubensis* determinovaných v roce 2011 podle tetradového kódu (Lebeda a Widrechner, 2003) na základě jejich reakcí na diferenční soubor.

Izoláty <i>P. cubensis</i>	Skupiny dif. genotypů	1. <i>Cucumis</i> spp.				2. <i>Cucurbita</i> spp.				3. ostatní Cucurbitaceae				Kód patotypu
	Číslo dif. genotypu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	Hodnota	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	
2/11	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
5/11	0	2	4	8	0	0	0	8	0	2	0	0	14.8.2	
7/11	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4	8	15.15.15	
8/11	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
10/11	1	2	4	8	0	2	4	8	0	0	0	0	15.14.0	
17/11	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
18/11	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
19/11	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	4	8	15.14.15	
20/11	1	2	4	8	1	2	4	0	1	0	0	8	15.7.9	
22/11	1	2	0	8	0	0	0	0	0	2	0	0	11.0.2	
28/11/1	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
31/11	1	2	0	8	0	0	4	0	0	2	0	0	11.4.2	
33/11	1	2	0	8	0	0	4	0	0	2	0	0	11.4.2	
36/11	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	0	15.14.3	
38/11	1	2	0	8	0	2	4	8	0	2	0	0	11.14.2	
40/11	1	2	4	8	0	2	4	8	0	0	0	8	15.14.8	
42/11	1	2	4	8	0	0	0	8	1	0	4	0	15.8.5	
44/11	1	2	4	8	0	2	4	8	0	0	4	0	15.14.4	
45/11	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
53/11	0	2	4	8	0	2	0	8	0	2	0	0	14.10.2	
54/11	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
55/11	1	2	4	8	0	2	0	8	0	2	0	0	15.10.2	
57/11	0	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	0	14.2.2	
59/11	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
64/11/1	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
65/11/2	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
66/11	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
70/11	1	0	0	8	0	2	0	0	0	2	0	0	9.2.2	
72/11	1	2	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	15.0.0	
77/11	1	2	0	8	1	2	4	8	0	2	0	0	11.15.2	
85/11	1	2	4	8	0	2	0	8	1	2	0	0	15.10.3	
87/11	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	14.0.0	
89/11	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	

Pozn.: Číslo diferenčního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenčním souboru, viz. tabulka 6.

V roce 2011 byla u 33 izolátů *P. cubensis* testována patogenní variabilita a celkem bylo zjištěno 24 různých patotypů. Četnosti výskytu jednotlivých patotypů jsou uvedeny v grafu na obrázku 12. Nejčastěji byl zaznamenán patotyp 15.14.11, který se vyskytl 4x, byl následován patotypem 11.4.2 (3x). Následující patotypy 15.14.10, 15.15.3, 15.15.10 a 15.15.11 se vyskytly v populaci patogena *P. cubensis* 2x. Ostatní patotypy byly detekovány v roce 2011 pouze jednou.



Obrázek 12. Frekvence výskytu patotypů *P. cubensis* v roce 2011.

V roce 2011 byly u testovaného souboru izolátů *P. cubensis* zaznamenány všechny úrovně patogenity. Téměř polovina testovaných izolátů *P. cubensis* měla vysokou úroveň patogenity (počet virulentních faktorů 9-12). Střední úroveň patogenity (5-8 virulentních faktorů) byla zjištěna u 39% izolátů. 12% izolátů *P. cubensis* patřilo do kategorie nízké úrovně patogenity (1-4 virulentní faktory). Rok 2011 byl tedy z hlediska patogenity velmi variabilní. Výsledky patogenity izolátů *P. cubensis* za rok 2011 jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14. Úroveň patogenity izolátů *P. cubensis* za rok 2011.

Úroveň patogenity (počet VF)	Počet izolátů <i>P. cubensis</i> /(%)
Nízká (1 – 4)	4/12.0
Střední (5 – 8)	13/39.0
Vysoká (9 – 12)	16/49.0

Stanovení úrovně patogenity podle Lebeda a Urban, 2004.
VF – virulentní faktor.

5.3 Variabilita virulence izolátů *P. cubensis* v roce 2012

Celkem byla u 47 izolátů *P. cubensis*, z hostitelských rostlin z čeledi Cucurbitaceae z roku 2012, determinována variabilita virulence. Nejčastěji se jednalo o hostitelský druh *Cucumis sativus*, v menší míře byly zastoupeny i ostatní druhy tykvovitě zeleniny (*Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*).

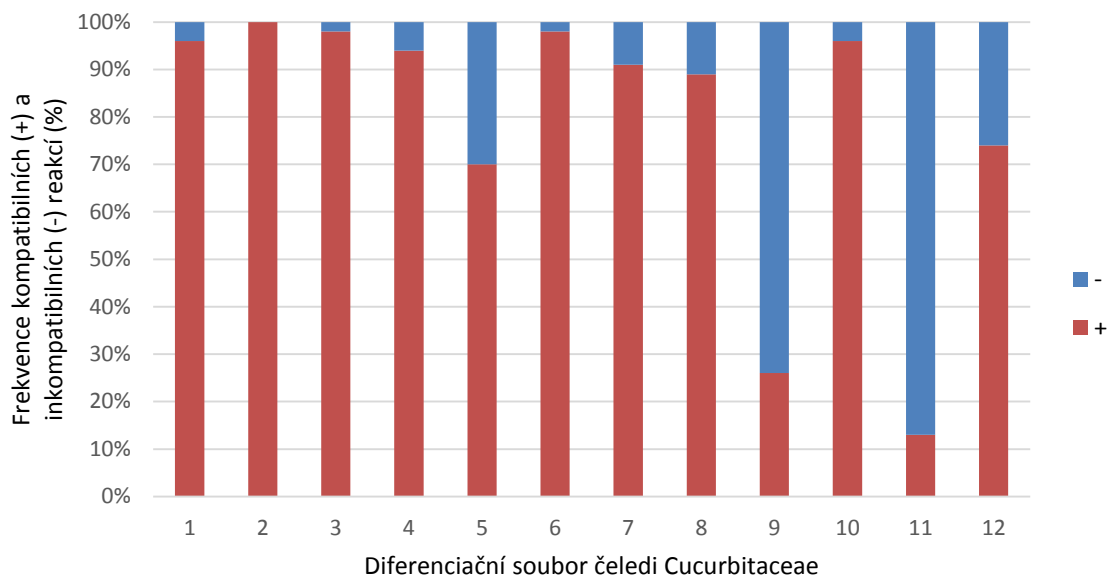
Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru byla vyjádřena pomocí hodnoty intenzity sporulace, která byla vypočítána na základě vzorce (kapitola 4.3.2) s pomocí 5 bodové stupnice (Lebeda a Urban, 2010). Výsledky jsou znázorněny v tabulce 15.

Tabulka 15. Intenzita sporulace (%) izolátů *P. cubensis* získaných v roce 2012 na diferenciačním souboru Cucurbitaceae.

Genotyp/ Izolát	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/12	100,0	100,0	93,3	98,3	46,7	75,0	76,7	95,0	40,0	93,3	15,0	31,7
3/12/1	100,0	100,0	100,0	100,0	80,0	100,0	76,7	95,0	25,0	86,7	0,0	58,3
3/12/2	100,0	100,0	100,0	100,0	51,7	96,7	33,3	61,7	86,7	70,0	13,3	66,7
4/12	95,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	98,3	81,7	100,0	90,0	0,0	100,0
5/12	100,0	100,0	98,3	95,0	55,0	91,7	46,7	76,7	25,0	60,0	0,0	26,7
6/12/1	100,0	100,0	100,0	100,0	85,0	100,0	55,0	100,0	30,0	88,3	0,0	46,7
6/12/2	100,0	100,0	100,0	85,0	63,3	100,0	36,7	68,3	30,0	70,0	5,0	30,0
7/12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	90,0	78,3	8,3	23,3	0,0	48,3
8/12	100,0	100,0	100,0	100,0	96,7	100,0	66,7	65,0	0,0	100,0	0,0	100,0
9/12	100,0	100,0	100,0	93,3	78,3	86,7	95,0	81,7	16,7	93,3	31,7	33,3
10/12	100,0	100,0	100,0	100,0	86,7	100,0	85,0	91,7	25,0	80,0	0,0	88,3
11/12	100,0	100,0	100,0	100,0	93,3	100,0	98,3	100,0	31,7	70,0	26,7	76,7
13/12	90,0	55,0	8,3	53,3	66,7	73,3	51,7	1,7	16,7	100,0	6,7	100,0
20/12/1	100,0	100,0	100,0	88,3	53,3	96,7	98,3	81,7	0,0	86,7	81,7	88,3
20/12/2	85,0	93,3	100,0	88,3	36,7	35,0	91,7	95,0	0,0	65,0	0,0	88,3
25/12	91,7	100,0	95,0	31,7	25,0	76,7	78,3	76,7	0,0	100,0	11,7	61,7
27/12	100,0	100,0	100,0	93,3	0,0	96,7	98,3	56,7	93,3	100,0	0,0	45,0
28/12/1	100,0	100,0	100,0	100,0	33,3	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	26,7	100,0
28/12/2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	30,0	93,3	30,0	85,0
29/12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	95,0	100,0	100,0	3,3	50,0
30/12	100,0	100,0	95,0	100,0	100,0	100,0	71,7	15,0	25,0	100,0	0,0	100,0
31/12/1	100,0	83,3	100,0	93,3	51,7	100,0	96,7	83,3	0,0	93,3	58,3	70,0
31/12/2	73,3	100,0	93,3	86,7	81,7	90,0	98,3	100,0	0,0	76,7	0,0	93,3
32/12	100,0	100,0	76,7	68,3	75,0	95,0	61,7	100,0	0,0	93,3	30,0	18,3
37/12	100,0	100,0	100,0	100,0	56,7	100,0	98,3	76,7	100,0	98,3	0,0	100,0
40/12	23,3	81,7	41,7	36,7	30,0	30,0	15,0	33,3	0,0	36,7	15,0	11,7
42/12	88,3	80,0	43,3	70,0	75,0	98,3	21,7	3,3	3,3	100,0	25,0	93,3
45/12/1	100,0	100,0	100,0	48,3	28,3	90,0	76,7	81,7	0,0	100,0	6,7	73,3
45/12/2	93,3	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	93,3	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
47/12	33,3	88,3	90,0	73,3	13,3	78,3	61,7	51,7	0,0	100,0	10,0	18,3
50/12	95,0	96,7	36,7	48,3	43,3	98,3	93,3	93,3	25,0	63,3	66,7	38,3
51/12	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,3	25,0	91,7	16,7	73,3
53/12	100,0	96,6	100,0	0,0	2,6	96,8	99,1	75,0	0,0	68,9	1,7	0,0
55/12	100,0	100,0	100,0	100,0	46,7	100,0	100,0	75,0	0,0	100,0	1,7	100,0
56/12	100,0	100,0	100,0	96,7	3,3	95,0	100,0	93,3	0,0	100,0	6,7	63,3
58/12	65,0	71,7	68,3	23,3	0,0	70,0	8,3	21,7	0,0	10,0	1,7	1,7
60/12	100,0	95,0	98,3	88,3	78,3	98,3	100,0	81,7	100,0	100,0	0,0	70,0
61/12	100,0	100,0	90,0	100,0	93,3	100,0	100,0	96,7	100,0	100,0	1,7	100,0
63/12	95,0	100,0	100,0	100,0	58,3	95,0	96,7	78,3	96,7	100,0	0,0	73,3
65/12	100,0	100,0	96,7	86,7	13,3	100,0	90,0	90,0	0,0	100,0	40,0	45,0
67/12	66,7	100,0	81,7	88,3	20,0	88,3	50,0	38,3	0,0	73,3	36,7	3,3
69/12	100,0	100,0	100,0	100,0	10,0	100,0	95,0	95,0	0,0	95,0	26,7	58,3
71/12	100,0	100,0	96,67	90,0	81,67	98,33	65,0	95,0	18,33	96,67	58,33	95,0
74/12	100,0	100,0	100,0	100,0	25,0	100,0	95,0	100,0	0,0	98,33	3,33	0,0
75/12	38,33	96,67	100,0	91,67	81,67	65,0	96,67	73,33	51,67	68,33	18,33	23,3
77/12	98,33	100,0	100,0	95,0	100,0	100,0	100,0	100,0	73,33	88,33	0,0	45,0
81/12	100,0	100,0	93,33	60,0	73,33	98,33	61,67	98,33	0,0	66,67	11,67	70,0

*genotypy čeledi Cucurbitaceae diferenciačního souboru navrženého Lebedou a Widrechnerem pro detekci virulence *P. cubensis* (patotypů) (tabulka 6).

Na obrázku 13 je znázorněn graf frekvence výskytu kompatibilních (náchylných) a inkompatibilních (odolných) reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae s izoláty *P. cubensis*. Nejvíce inkompatibilních reakcí bylo zaznamenáno těchto dvou genotypů: 9 (*Citrullus lanatus*) a 11 (*Luffa cylindrica*), kde frekvence těchto reakcí byla kolem 85%. Další genotypy: 5 (*Cucurbita pepo* var. *pepo*) a 12 (*Lagenaria siceraria*) měly četnost výskytu rezistentních reakcí kolem 25% a genotypy 7 (*Cucurbita fraterna*) a 8 (*Cucurbita maxima*) 10%. Zbývající genotypy: 1 (*Cucumis sativus*), 3 (*Cucumis melo* var. *conomon*), 4 (*Cucumis melo* var. *acidulus*), 6 (*Cucurbita pepo* var. *texana*) a 10 (*Benincasa hispida*) patřily mezi genotypy s nízkou frekvencí výskytu inkompatibilních reakcí (pod 10%). Pouze jediný genotyp 2 (*Cucumis melo* var. *melo*) vykazoval 100% náchylných reakcí (0% inkompatibilních reakcí). Z celkového hlediska lze tedy říci, že genotypy tohoto diferenciačního souboru se výrazně lišily v náchylnosti k izolátům *P. cubensis* z roku 2012.



Obrázek 13. Frekvence kompatibilních a inkompatibilních reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae v rámci všech izolátů *P. cubensis* za rok 2012.

K determinaci patotypů *P. cubensis* byl použit tetradový kód. Kód patotypu byl dán součtem kompatibilních reakcí genotypů v rámci jednotlivých skupin diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae s izoláty *P. cubensis*. V tabulce 16 jsou uvedeny výsledky determinace patotypů u izolátů *P. cubensis* z roku 2012.

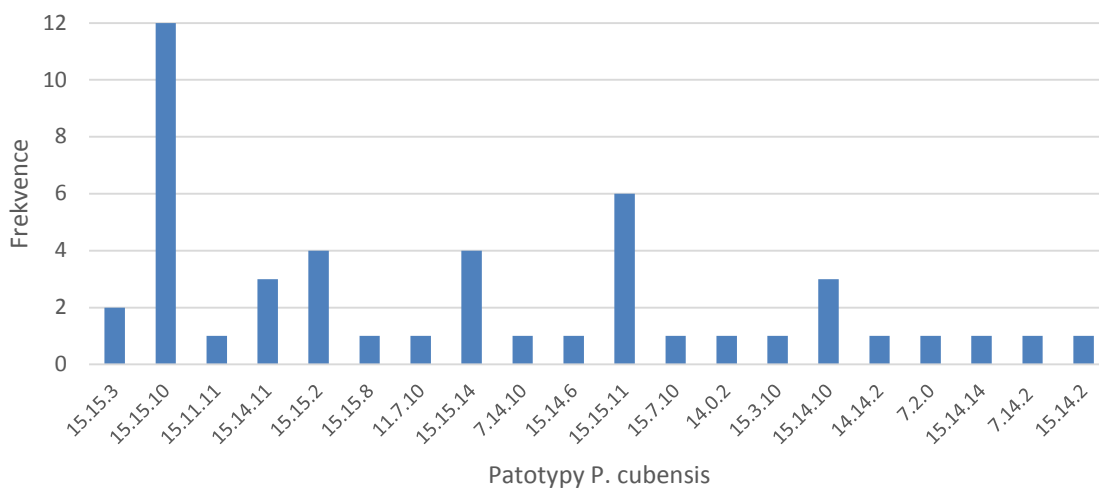
Tabulka 16. Označení patotypů *P. cubensis* determinovaných v roce 2012 podle tetradového kódu (Lebeda a Widrechner, 2003) na základě jejich reakcí na diferenční soubor.

Skupiny dif. genotypů	1. Cucumispp.				2. Cucurbitaspp.				3. ostatní Cucurbitaceae				Kód patotypu	
	Číslo dif. genotypu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
	Hodnota	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	4		8
1/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
3/12/1	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
3/12/2	1	2	4	8	1	2	0	8	1	2	0	8	15.11.11	
4/12	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
5/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	0	15.15.2	
6/12/1	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
6/12/2	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	0	15.15.2	
7/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	0	0	8	15.15.8	
8/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
9/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	0	15.15.2	
10/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
11/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
13/12	1	2	0	8	1	2	4	0	0	2	0	8	11.7.10	
20/12/1	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
20/12/2	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
25/12	1	2	4	0	0	2	4	8	0	2	0	8	7.14.10	
27/12	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
28/12/1	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
28/12/2	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
29/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
30/12	1	2	4	8	1	2	4	0	0	2	0	8	15.7.10	
31/12/1	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
31/12/2	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
32/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	0	15.15.2	
37/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
40/12	0	2	4	8	0	0	0	0	0	2	0	0	14.0.2	
42/12	1	2	4	8	1	2	0	0	0	2	0	8	15.3.10	
45/12/1	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
45/12/2	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
47/12	0	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	0	14.14.2	
50/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
51/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
53/12	1	2	4	0	0	2	4	8	0	2	0	0	7.14.2	
55/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	
56/12	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
58/12	1	2	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0	7.2.0	
60/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
61/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
63/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
65/12	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	8	15.14.14	
67/12	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	0	15.14.6	
69/12	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
71/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	4	8	15.15.14	
74/12	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	0	15.14.2	
75/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	0	15.15.3	
77/12	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
81/12	1	2	4	8	1	2	4	8	0	2	0	8	15.15.10	

Pozn.: Číslo diferenčního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenčním souboru, viz. tabulka 6.

V roce 2012 bylo na souboru 47 izolátů *P. cubensis* detekováno 20 různých patotypů. Celková četnost determinovaných patotypů *P. cubensis* za rok 2012 je uvedena v grafu na obrázku 14. Patotyp 15.15.10 patřil mezi nejčastěji se vyskytující patotypy v roce 2012 a byl zastoupen u 12 izolátů *P. cubensis*. Patotyp 15.15.11 byl druhým nejčastěji se vyskytujícím

patotypem a byl determinován u 6 izolátů. Patotypy 15.15.2 a 15.15.14 se vyskytly v populaci patogena 4x, patotypy 15.14.11 a 15.14.10 3x a patotyp 15.15.3 2x. Ostatní determinované patotypy byly v populaci *P. cubensis* v roce 2012 zaznamenány pouze jednou.



Obrázek 14. Frekvence patotypů *P. cubensis* v roce 2012.

V roce 2012 většina izolátů *P. cubensis* (83%) patřila mezi vysoce patogenní s počtem virulentních faktorů 9-12. Pouze 13% izolátů *P. cubensis* mělo střední úroveň patogenity (5-8 virulentních faktorů) a jen 4% izolátů bylo v kategorii nízké patogenity (1-4 virulentní faktorů). Počty izolátů *P. cubensis* z roku 2012 s danou úrovní patogenity jsou uvedeny v tabulce 17.

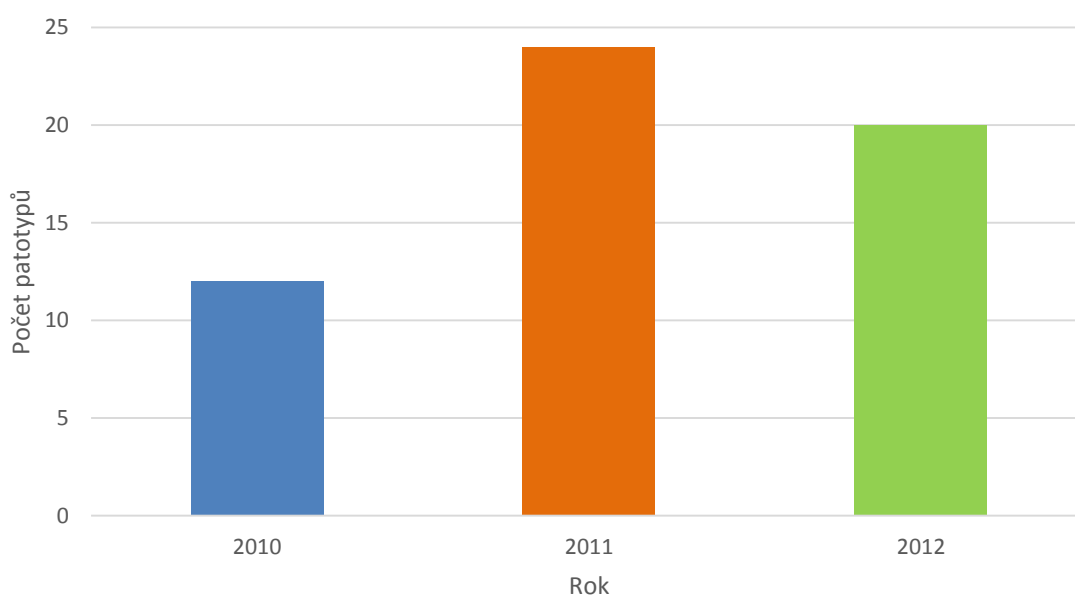
Tabulka 17. Úroveň patogenity za rok 2012.

Úroveň patogenity (počet VF)	Počet izolátů <i>P. cubensis</i> /(%)
Nízká (1 – 4)	2/4.0
Střední (5 – 8)	6/13.0
Vysoká (9 – 12)	39/83.0

Stanovení úrovně patogenity podle Lebeda a Urban, 2004.
VF – virulentní faktor.

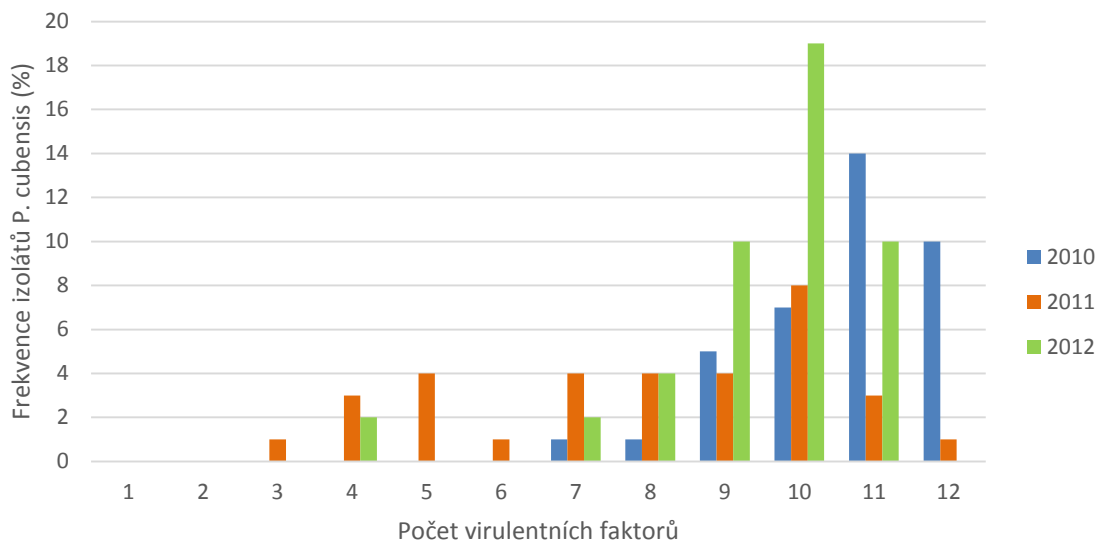
5.4 Srovnání variability virulence u izolátů *P. cubensis* v letech 2010-2012

Za tříleté období (2010-2012) bylo otestováno na patogenní variabilitu celkem 118 izolátů *P. cubensis* s využitím diferenčního souboru navrženého Lebedou a Widrlechnerem (2003) a pomocí tetradového kódu bylo rozlišeno 56 různých patotypů. Počet patotypů determinovaných v jednotlivých letech je uveden v grafu na obrázku 15. Ve sledovaném období byl v jednotlivých letech zaznamenán různý počet patotypů. Nejvíce patotypů *P. cubensis* bylo zjištěno v roce 2011, kdy bylo determinováno 24 patotypů (33 izolátů *P. cubensis*) a o něco nižší počet (20 patotypů) byl determinován v roce 2012 (47 izolátů *P. cubensis*). Nejméně patotypů (12 patotypů) se vyskytlo v populaci patogenu v roce 2010 (38 izolátů *P. cubensis*).



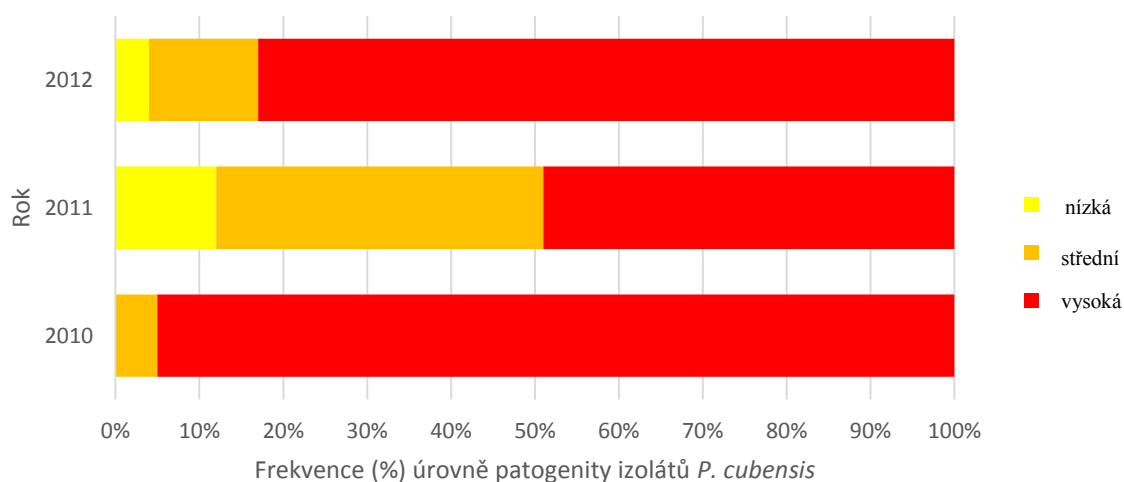
Obrázek 15. Variabilita virulence izolátů *P. cubensis* v České republice v letech 2010-2012.

U každého z testovaných izolátů *P. cubensis* byla stanovena úroveň patogenity na základě počtu virulentních faktorů (VF 1-12) viz kapitola 4.3.3. Frekvence výskytu izolátů *P. cubensis* s daným počtem virulentních faktorů se v jednotlivých letech lišila (obrázek 16). Kmeny s virulentními faktory 1 a 2 nebyly ve sledovaném období zastoupeny vůbec. V roce 2010 a 2012 bylo složení české populace *P. cubensis* z hlediska počtu virulentních faktorů podobné, kdy v roce 2010 převažovaly kmeny s virulentními faktory 10-12 a v roce 2012 VF 9-11. Zatímco v roce 2011 měly výraznou převahu sice kmeny s VF 10, ale častěji se vyskytovaly také kmeny s nižším počtem VF 5, 7-9.



Obrázek 16. Frekvence izolátů *P. cubensis* podle počtu virulentních faktorů za období 2010-2012.

Úroveň patogenity byla stanovena pro každý patotyp podle počtu virulentních faktorů (Lebeda a Urban, 2004b) (obrázek 17). Virulence studované populace *P. cubensis* se ukázala jako vysoce variabilní, kdy se lišila frekvence úrovně patogenity izolátů *P. cubensis* v jednotlivých letech, a byla tedy pozorována určitá meziroční fluktuace ve variabilitě virulence. Zatímco v roce 2010 a 2012 převažovaly v populaci patogenů vysoce virulentní kmeny (VF 9-12, 95%/2010, 83%/2012), tak v roce 2011 bylo jejich zastoupení pouze 49% a naopak v tomto roce byl pozorován nárůst středně virulentních kmenů (VF 5-8, 39%). Kmeny s VF 1-4 (nízká úroveň patogenity) byly zjištěny pouze v letech 2011 (12%) a 2012 (4%).



Obrázek 17. Struktura populace *P. cubensis* podle jejich faktoru virulence (nízká: 1-4 VF, střední: 5-8 VF, vysoká: 9-12).

V tabulce 18 jsou uvedeny frekvence výskytu kompatibilních a inkompatibilních reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae s izoláty *P. cubensis* v letech 2010-2012. Frekvence výskytu těchto reakcí se u některých diferenciačních genotypů byla výrazně odlišná v roce 2011 v porovnání s ostatními studovanými roky. Diferenciační genotypy z rodu *Cucumis* (pořadí 1-4 v diferenciačním souboru) vykazovaly četnost výskytu kompatibilních reakcí v rozmezí 82-100%. U většiny genotypů z rodu *Cucurbita* (pořadí 5-8 v diferenciačním souboru) byla zaznamenána v průběhu sledovaných let obdobná četnost zastoupení těchto reakcí jako genotypy rodu *Cucumis*. Frekvence kompatibilních reakcí dosahovala hodnot 70-100%. Výjimkou však byl genotyp 5, který v roce 2011 měl četnost výskytu těchto reakcí pouze 27% a naopak vzrostl počet inkompatibilních reakcí (73%). U ostatních genotypů z čeledi Cucurbitaceae (pořadí 9-12 v diferenciačním souboru) se frekvence kompatibilních a inkompatibilních reakcí výrazně lišila a to buď v rámci jednotlivých let celého tříletého období (genotypy 9 a 11), nebo mezi rokem 2011 a roky 2010 a 2012 (týká se genotypů 10 a 12). U genotypu 9 (*Citrullus lanatus*) byl pozorován ve sledovaném období pokles četnosti výskytu kompatibilní reakce (2010 – 71%, 2011 – 42%, 2012 – 26%), mohlo by se tedy jednat o vznikající rezistenci vůči *P. cubensis*. Genotyp 10 (*Benincasa hispida*) se jevil v letech 2010-2012 jako vysoce náchylný (90% četnost kompatibilní reakce). U genotypu 11 (*Luffa cylindrica*) byl pozorován výrazný rozdíl mezi rokem 2010 a roky následujícími. Zatímco v roce 2010 byla více než polovina (55%) pozorovaných reakcí kompatibilních, tak v letech 2011 a 2012 došlo k výraznému poklesu těchto reakcí (12-13%). U genotypu 12 (*Lagenaria siceraria*), posledního v diferenciačním souboru, byla četnost kompatibilních reakcí kolem 61% (2010 – 68%, 2011 – 42%, 2012 – 74%).

Tabulka 18. Frekvence výskytu kompatibilních a inkompatibilních reakcí genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003) k izolátům *P. cubensis* za období 2010-2012.

Rok	2010		2011		2012	
	+	-	+	-	+	-
Diferenciační soubor čeledi Cucurbitaceae						
1 (<i>Cucumis sativus</i>)	100%	0%	88%	12%	96%	4%
2 (<i>Cucumis melo</i> var. <i>melo</i>)	100%	0%	97%	3%	100%	0%
3 (<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i>)	100%	0%	82%	18%	98%	2%
4 (<i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i>)	100%	0%	100%	0%	94%	6%
5 (<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>)	84%	16%	27%	73%	70%	30%
6 (<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>texana</i>)	100%	0%	79%	21%	98%	2%
7 (<i>Cucurbita fraterna</i>)	92%	8%	70%	30%	91%	9%
8 (<i>Cucurbita maxima</i>)	97%	3%	76%	24%	89%	11%
9 (<i>Citrullus lanatus</i>)	71%	29%	42%	58%	26%	74%
10 (<i>Benincasa hispida</i>)	95%	5%	79%	21%	96%	4%
11 (<i>Luffa cylindrica</i>)	55%	45%	12%	88%	13%	87%
12 (<i>Lagenaria siceraria</i>)	68%	32%	42%	58%	74%	26%

+, kompatibilní reakce; -, inkompatibilní reakce.

Z celkového počtu 56 různých patotypů *P. cubensis*, které byly determinovány v letech 2010-2012, se v populaci tohoto patogenu pouze 11 patotypů vyskytlo více než jednou (tabulka 19), avšak četnost těchto patotypů se v jednotlivých letech lišila, a to se týkalo rovněž i nejčastěji se vyskytujících patotypů v daném roce. Ve sledovaném tříletém období se ukázalo, že česká populace *P. cubensis* byla velmi variabilní ve své virulenci, kdy bylo determinováno velké množství různých patotypů. 3 patotypy (15.15.11, 15.15.3 a 15.14.10) byly zaznamenány v každém roce v rámci tříletého sledovaného období, ale frekvence výskytu jednoho z nich (15.15.11) se v jednotlivých letech lišila. Patotyp 15.15.15 tzv. „super patotyp“, který se objevil pouze v roce 2010 byl v rámci celého sledovaného období druhým nejpočetnějším patotypem. Patotyp 15.15.10 byl nejčastěji se vyskytujícím patotypem ve sledovaném tříletém období, avšak frekvence jeho výskytu se v jednotlivých letech lišila (2010 – 0%, 2011 – 6,1%, 2012 – 25,5%).

Tabulka 19. Nejčastější patotypy *P. cubensis* za období 2010-2012.

Patotypy	Rok Počet/frekvence izolátů <i>P. cubensis</i> (%*)		
	2010	2011	2012
15.15.15	10/26.3	-	-
15.15.14	4/10.5	-	4/8.5
15.15.11	7/18.4	2/6.1	5/12.8
15.15.10	-	2/6.1	12/25.5
15.15.7	3/7.9	-	-
15.15.3	4/10.5	2/6.1	2/4.3
15.15.2	-	-	4/8.5
15.14.11	-	4/12.1	3/6.4
15.14.10	3/7.9	2/6.1	3/6.4
15.11.7	2/5.3	-	-
11.14.2	-	3/9.1	-
	Celkem: 38 izolátů	Celkem: 33 izolátů	Celkem: 47 izolátů

*, frekvence je počítána z celkového počtu izolátů *P. cubensis* za jednotlivé roky (obr. 14).

Červená barva označuje patotypy, které se vyskytly v celém sledovaném období.

V letech 2010-2012 bylo 27 izolátů *P. cubensis* získáno ze vzorků nových hostitelských druhů tohoto patogenu (*Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*), bylo u nich rozlišeno 14 různých patotypů. Patotypy z jiných hostitelských rostlin než *Cucumis sativus* jsou uvedeny v tabulce 20. Patotypy získané z nových hostitelských druhů byly hodnoceny podle následujících kritérií: výskyt u tradiční hostitelské rostliny *Cucumis sativus*, virulence, unikátnosti a opakování těchto patotypů na stejných lokalitách. Z celkového počtu 14 získaných patotypů bylo 6 patotypů (15.7.0, 15.14.15, 15.7.9, 7.14.2, 15.14.2, 14.0.0) zaznamenáno pouze na těchto nových hostitelích. Zbýlých 8 patotypů bylo determinováno i na hostitelském druhu *Cucumis sativus*.

Mezi zajímavý patotyp, který se vyskytoval na nových hostitelích, a současně také i na *C. sativus*, patřil patotyp 15.15.3, který se vyskytl ve všech třech letech výzkumu u 8 izolátů *P.*

cubensis, z nichž právě 6 pocházelo z nových hostitelských druhů rodu *Cucurbita*. Obdobně tomu bylo u patotypu 15.15.11, který se vyskytl u 13 izolátů *P. cubensis* v letech 2010 a 2012 a z toho méně než polovina izolátů (7 izolátů) byla zaznamenána také na nových hostitelských družích (2x CL, 1x Cmax, 1x CM, 3x CP).

Většina determinovaných patotypů (71%) u izolátů z jiných hostitelských rostlin byla vysoce virulentní (9-12 virulentních faktorů), okolo 21% patotypů bylo středně virulentních (5-8 virulentních faktorů) a pouze jediný patotyp patřil do kategorie nízké virulence (1-4 virulentních faktorů). 4 patotypy, patřící do střední úrovně patogenity (3 patotypy – 15.7.0, 7.14.2, 15.14.2) a nízké (14.0.0) byly zjištěny pouze u těchto nových hostitelských druhů. Patotypy 15.15.15 a 14.0.0 můžeme z hlediska jejich reakce na diferenční soubor považovat za unikátní. „Super patotyp“ 15.15.15 (virulentní ke všem 12 genotypům diferenčního souboru) byl detekován u izolátu 86/10/1, který pocházel z druhu *Cucurbita moschata*. Patotyp 14.0.0 (pouze 3 kompatibilní reakce s genotypy 2-4 diferenčního souboru) byl determinován u izolátů 87/11, získaném z druhu *Cucurbita pepo*. Oba tyto izoláty s unikátními patotypy pocházely ze stejné lokality sběru (MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín).

V rámci opakovaného výskytu patotypů na stejných lokalitách byl jedinečný pouze patotyp 15.15.3, který byl v roce 2010 zaznamenán ve dvou populacích pocházejících ze stejného hostitele (*Cucurbita pepo*) na lokalitě Napajedla (ZLK/ZL). Jedinečnost tohoto patotypu (15.15.3) spočívala také v tom, že z celkového počtu 8 výskytů za celé 3 roky výzkumu, byl 6x pozorován na nových hostitelích, a z toho 5 výskytů bylo zaznamenáno na druhu *Cucurbita pepo*, mohlo by se zřejmě jednat o případ rasové specifity. Patotyp 15.15.11 byl v jihomoravském kraji zjištěn u 50% izolátů *P. cubensis*. Pouze na jediné lokalitě (Nový Jičín-Kojetín) v Moravskoslezském kraji byl zaznamenán opakovaný výskyt jednoho patotypu (15.15.3) na stejném hostiteli (*Cucurbita pepo*) v letech 2011 a 2012. Tato lokalita byla jedinečná i v rámci unikátních patotypů 15.15.15 a 14.0.0. V Olomouckém kraji bylo v letech 2010-2012 získáno 11 izolátů *P. cubensis*, z nichž 9 pocházelo z lokality Olomouc-Holice (výzkumné pole Katedry botaniky PŘF UP). U těchto 9 izolátů bylo detekováno 9 různých patotypů.

Proměnlivá struktura populace *P. cubensis* pocházejících z jiných hostitelů by mohla naznačovat, podobně jako je tomu u izolátů pocházejících z druhu *Cucumis sativus*, na značnou proměnlivost studovaných populací *P. cubensis* z hlediska patogenní variability na území České republiky v letech 2010-2012.

Tabulka 20. Izoláty *P. cubensis* pocházející z nových hostitelských druhů čeledi Cucurbitaceae (2010-2012)

Diferenční genotyp čeledi Cucurbitaceae																
Hostitelská rostlina	Izolát	Původ	Patotyp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	VF
CM	81/10/1	OLK/OL Olomouc-Holice	15.7.0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	7
CM	19/11	OLK/OL Olomouc-Holice	15.14.15	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	11
CM	20/11	OLK/OL Olomouc-Holice	15.7.9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	9
CM	55/12	OLK/OL Olomouc-Holice	15.15.10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	10
Cmax	45/11/1	OLK/OL Olomouc-Holice	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
Cmax	71/12	OLK/OL Olomouc-Holice	15.15.14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	11
Cmos	53/12	OLK/OL Olomouc-Holice	7.14.2	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	7
CL	83/10/1	OLK/OL Olomouc-Holice	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11
LS	56/12	OLK/OL Olomouc-Holice	15.14.10	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	9
CM	54/11	OLK/PR Polkovice	15.15.10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	10
CL	4/12	OLK/PR Tovačov-Annín	15.14.11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	10
Cmos	86/10/1	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	15.15.15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
Cmos	74/12	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	15.14.2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	8
CP	87/11	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	14.0.0	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3
CP	89/11	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
CP	75/12	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
Cmax	77/12	MSK/NJ Nový Jičín-Kojetín	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11
CM	12/10	JHM/BO Moravské Bránice	15.15.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	11
CM	67/10	JHM/HO Veselí nad Moravou	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11
CP	58/10	JHM/HO Mutěnice	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
CP	61/10	JHM/HO Ratiškovice	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11
CP	29/12	JHM/BV Velké Bílovice	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11
Cmax	27/12	JHM/HO Čejč	15.14.11	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	10
CP	72/10/1	ZLK/ZL Napajedla	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
CP	73/10	ZLK/ZL Napajedla	15.15.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	10
CP	59/11	ZLK/KM Postoupky	15.15.10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	10
CP	66/11	ZLK/ZL Napajedla	15.15.11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	11

CM – *Cucumis melo*; CP – *Cucurbita pepo*; Cmax – *Cucurbita maxima*; Cmos – *Cucurbita moschata*; CL – *Citrullus lanatus*; LS – *Lagenaria siceraria*.

+, kompatibilní/virulentní reakce izolátů *P. cubensis* k diferenčnímu souboru čeledi Cucurbitaceae.

-, inkompatibilní/avirulentní reakce izolátů *P. cubensis* k diferenčnímu souboru čeledi Cucurbitaceae.

VF, počet virulentních faktorů (určující úroveň patogenity daného izolátu/patotypu *P. cubensis*).

6 DISKUZE

Pseudoperonospora cubensis patří mezi nejzávažnější choroby rostlin čeledi Cucurbitaceae, a to hlavně díky snižujícímu se výnosu okurek v zemědělských oblastech, proto se už řadu let studiu variability virulence *P. cubensis* věnuje velká pozornost (Lebeda a Cohen, 2011). Tato diplomová práce tématicky navazuje na dlouhodobý výzkum realizovaný v minulých letech (Lebeda a Urban, 2004b; Erbesová, 2005; Urban, 2006; Lebeda a kol., 2010; Pavelková, 2012; Lebeda a kol., 2013), který byl součástí několika projektů realizovaných fytopatologickou laboratoří PŘF UP v Olomouci pod vedením prof. Lebedy.

Na tomto pracovišti se problematice variability *P. cubensis* věnovala celá řada bakalářských, diplomových a disertačních prací. V posledních 5 letech to byly např. bakalářské a diplomové práce zaměřené na studium variability účinnosti fungicidů vůči populaci *P. cubensis* (Kadlecová, 2010, 2012; Němcová, 2008, 2012), rezistence genových zdrojů *Cucumis* spp. a *Cucurbita* spp. vůči patotypům *P. cubensis* (Roháčková, 2012, 2014) nebo na studium populační dynamiky tohoto patogena (Pavelková, 2012). Na katedře buněčné biologie a genetiky byla *P. cubensis* využita při studiu genetické variability sbírky izolátů *P. cubensis* s využitím metody AFLP (Procházková, 2011).

V předložené diplomové práci jsem se zabývala variabilitou virulence izolátů *P. cubensis* získaných z infikovaných porostů tykvovitých zelenin při sběrových expedicích na území České republiky v letech 2010-2012. U testovaných izolátů *P. cubensis* byly klasifikovány patotypy za pomoci tetradového kódu s použitím diferenčního souboru čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003). Dále byla zkoumána odolnost a náchylnost genotypů diferenčního souboru pro detekci patotypů *P. cubensis* za použití studovaného souboru izolátů.

Zatímco v roce 2010 a 2012 převažovaly v populaci patogenu vysoce virulentní kmeny (VF 9-12, 95%/2010, 83%/2012), tak v roce 2011 bylo jejich zastoupení pouze 49% a naopak v tomto roce byl pozorován nárůst středně virulentních kmenů (VF 5-8, 39%). Kmeny s VF 1-4 (nízká úroveň patogenity) byly zjištěny pouze v letech 2011 (12%) a 2012 (4%). Porovnáním dat o patogenní struktuře české populace *P. cubensis* v letech 2010-2012 a dřívějších let se ukázalo, že v letech 2001-2009 bylo v české populaci tohoto patogenu zastoupení vysoce patogenních kmenů *P. cubensis* na našem území velmi podobné jako se ukázalo v letech 2010-2012. Zajímavé je také srovnání četnosti výskytu kmenů *P. cubensis* s nízkou úrovní patogenity (VF 1-4) v českých populacích tohoto patogenu v letech 2001-2011, kdy výskyt těchto kmenů byl pozorován poprvé v roce 2001, a to zhruba u 5% izolátů *P. cubensis* a poté se opákoval až

v letech 2011 a 2012. Pokud se podíváme podrobněji na patogenní strukturu českých populací *P. cubensis*, tak v období 2001-2002 se na území České republiky vyskytovaly patotypy, s vysokou hladinou patogenity ve frekvenci 52%, se střední hladinou patogenity v 43% a s nízkou hladinou patogenity v 5% (Lebeda and Urban, 2004b). V následujících letech 2003-2004 měly výraznou převahu kmeny s vysokou patogenní reakcí (72% izolátů *P. cubensis*), a pouze 28% izolátů bylo se střední patogenní reakcí a kmeny s nízkou patogenitou nebyly v tomto dvouletém období zastoupeny vůbec. V roce 2005 byla situace velmi podobná jako v letech 2003-2004, kdy byl zjištěn vysoký stupeň patogenity u 76% izolátů *P. cubensis* a střední stupeň patogenity u zbývajících 24% izolátů. K nárůstu kmenů *P. cubensis* středně virulentních došlo v následujícím roku, kdy 34% testovaných izolátů tohoto patogenu patřilo do této skupiny a ostatní izoláty z tohoto roku (66%) byly naopak vysocevirulentní. A v dalších dvou letech (2008 – 2009) byly výsledky studia patogenity izolátů *P. cubensis* velmi podobné, kdy vysoký stupeň patogenity byl detegován u 68% izolátů a střední stupeň patogenity u 32% izolátů (Lebeda a kol., 2013).

V letech 2010-2012 bylo otestováno na patogenní variabilitu celkem 118 izolátů *P. cubensis* s využitím diferenční souboru navrženého Lebedou a Widrechnerem (2003) a s pomocí tetrádového kódu bylo rozlišeno 56 různých patotypů. Nejvíce patotypů *P. cubensis* bylo zjištěno v roce 2011, kdy bylo determinováno 24 patotypů a o něco nižší počet patotypů (20) pak v roce následujícím (2012). Nejméně patotypů (12 patotypů) se vyskytlo v populaci patogenu v roce 2010. Tyto tři patotypy (15.15.11, 15.15.3 a 15.14.10) byly detegovány ve všech třech letech výzkumu, zatímco zastoupení ostatních patotypů v české populaci *P. cubensis* se během studovaného tříletého období (2010-2012) lišilo. Na základě získaných výsledků prezentovaných v této diplomové práci a podle údajů získaných při studiu této problematiky v předchozích letech (2001-2009) lze usuzovat, že populace *P. cubensis* je na našem území z hlediska patogenní variability velmi proměnlivá (Erbesová, 2005; Lebeda a Urban, 2004b; Lebeda a kol., 2013; Pavelková, nepublikované; Vyslyšelová, 2012). Pokusím se tuto skutečnost podrobněji vysvětlit v následujícím textu. V letech 2001-2002 bylo celkem u 96 izolátů *P. cubensis* detekováno 43 odlišných patotypů (33 /2001/ a 16 /2002/. V těchto dvou letech byl poprvé determinován tzv. „super patotyp“ 15.15.15. V roce 2001 byl nejfrekventovanějším patotypem 15.14.14 (9,5%) a v roce 2002 patotyp 15.10.10 (19%) (Lebeda a Urban, 2004). V následujícím dvouletém období (2003-2004) bylo na souboru 25 izolátů *P. cubensis* klasifikováno 11 patotypů (2003: 15 izolátů otestováno a rozlišeno 7 patotypů; 2004: 10 izolátů a 4 patotypy). V obou studovaných letech se rovněž vyskytovaly patotypy 15.14.11, 15.14.15 a 15.15.15. A dokonce patotyp 15.14.15 byl v roce 2004, determinován u většiny izolátů pocházejících z Jihomoravského kraje (Erbesová, 2005). V roce

2005 bylo determinováno 11 patotypů z celkového počtu 25 izolátů *P. cubensis* a v tomto roce patřil mezi nejfrekventovanější patotyp 15.14.10 (36%). V roce 2006 bylo rozlišeno 10 patotypů na souboru 29 izolátů *P. cubensis* a patotypem nejčastěji zastoupeným v tomto roce byl opět patotyp 15.14.10 (35%). Zajímavým z hlediska srovnání patogenní struktury českých populací tohoto patogenu v celém devítiletém období (2001-2009) se ukázal rok 2007, kdy na souboru 39 izolátů *P. cubensis* bylo detekováno pouze 5 patotypů a mezi těmito patotypy měly největší zastoupení tyto dva: 15.14.11 (51%) a 15.14.10 (33%). V roce 2008 bylo na souboru 32 izolátů *P. cubensis* detekováno 10 patotypů. V tomto roce byl znovu zjištěn „super patotyp“ 15.15.15 u 23% izolátů *P. cubensis*. Následují ho patotypy 15.14.10 (22%) a 7.14.10 (19%) (Lebeda a kol., 2013; Pavelková, nepublikované). V roce 2009 bylo u 44 testovaných izolátů *P. cubensis* rozlišeno 14 patotypů, z nichž nejčastěji byl zastoupen patotyp 15.14.10 (45,5%). Z ostatních 13 determinovaných patotypů se pouze tři z nich (15.2.10, 15.14.11 a 15.10.10) vyskytly v populaci *P. cubensis* více než jednou (Vyslyšelová, 2012).

Ve studovaném období 2010-2012 bylo zjištěno 27 nových patotypů (z celkového počtu 56 různých patotypů), které se v předchozích letech (2001-2009) na našem území neobjevily. Patotypy *P. cubensis* detekované v letech 2001-2012 jsou uvedeny v tabulce 21. V roce 2010 bylo rozlišeno celkem 12 patotypů a z toho 5 patotypů bylo nových, dosud v české populaci tohoto patogenu v letech 2001-2009 nezaznamenaných. Jednalo se o následující patotypy: 15.7.0 (izolát 81/10/1, OLK/OL, hostitelská rostlina: *Cucumis melo*), 15.11.3 (51/10, STČ/NY, *Cucumis sativus*), 15.11.7 (8/10 a 15/10, oba izoláty pocházely z Jihomoravského kraje a hostitele *Cucumis sativus*), 15.14.8 (35/10, HKK/RK, *Cucumis sativus*) a 15.15.7 (12/10-*Cucumis melo*, 21/10-*Cucumis sativus*, 54/10-*Cucumis sativus*, všechny izoláty byly z Jihomoravského kraje). Patotyp 15.14.10 byl v roce 2010 v české populaci *P. cubensis* detekován u tří izolátů a všechny pocházely z hostitelské rostliny *Cucumis sativus*. Patotyp 15.15.3 byl v roce 2010 zjištěn 4x a z toho byl 3x zaznamenán na novém hostitelském druhu *Cucurbita pepo* (58/10, JHM/HO; 72/10, ZLK/ZL a 73/10, ZLK/ZL). Na rozdíl od patotypu 15.15.11, který byl získán ze vzorků z různých hostitelů čeledi Cucurbitaceae: *Cucumis sativus* (5 izolátů), *Cucumis melo* (67/10, JHM/HO), *Cucurbita pepo* (61/10, JHM/HO). „Super patotyp“ 15.15.15, který patřil mezi nejfrekventovanější patotypy v roce 2010, byl zjištěn u 9 izolátů *P. cubensis* pocházejících z *Cucumis sativus* a 1 izolátu z druhu *Cucurbita moschata* (86/10, MSK/NJ). V roce 2011 bylo rozlišeno nejvíce patotypů v rámci celého sledovaného tříletého období.

Z celkového počtu 24 různých patotypů bylo 13 patotypů nových, do roku 2010 nedetekovaných. A z těchto 13 nových patotypů pouze dva z nich pocházely z nových hostitelských rostlin a jednalo se o tyto patotypy: 14.0.0 (87/11, MSK/NJ, *Cucurbita pepo*) a

15.7.9 (20/11, OLK/OL, *Cucumis melo*). Z těchto nově determinovaných patotypů v roce 2011 stojí za zmínku patotyp 11.4.2, který byl detekován u tří izolátů *P. cubensis*, pocházející z hostitele *Cucumis sativus* pouze z lokalit Královéhradeckého kraje. Jeden z nejčastěji se vyskytujících patotypů zaznamenaných v letech 2001-2012, patotyp 15.14.11, se v roce 2011 vyskytoval u čtyř izolátů *P. cubensis*, které pocházely z odlišných krajů České republiky (8/11 – JHM, 17/11 – OLK, 28/11 – HKK, 65/11 – ZLK), ale ze stejného hostitele *Cucumis sativus*. Patotypy 15.15.3 a 15.15.10 byly detekovány v roce 2011 u izolátů pocházejících z nových hostitelských rostlin. Patotyp 15.15.3, zaznamenaný ve všech třech letech výzkumu, byl zjištěn u dvou izolátů *P. cubensis* z roku 2011 (45/11, OLK/OL, *Cucurbita maxima* a 89/11, MSK/NJ, *Cucurbita pepo*). Druhý zmiňovaný patotyp 15.15.10 byl rovněž zjištěn u dvou izolátů *P. cubensis* pocházejících z jiných hostitelských rostlin čeledi Cucurbitaceae (54/11, OLK/PR, *Cucumis melo* a 59/11, ZLK/KM, *Cucurbita pepo*). U izolátů *P. cubensis* z roku 2012 bylo rozlišeno 20 různých patotypů a devět z nich bylo nových, do roku 2011 v české populaci *P. cubensis* nezjištěných. A z těchto devíti patotypů byl pouze jeden detekován u izolátu pocházejícího z jiné hostitelské rostliny než okurky seté v rámci tykvovitých zelenin (53/12, OLK/OL, *Cucurbita moschata*). Patotyp 15.14.10, který se vyskytoval každoročně během celého 12-ti letého období (2001-2012), byl detekován u tří izolátů *P. cubensis*, pocházejících z odlišných krajů (45/12/1, HKK/JC, *Cucumis sativus*; 56/12, OLK/OL, *Lagenaria siceraria* a 69/12, JHM/ZN, *Cucumis sativus*). Druhý nejfrekventovanější patotyp v období let 2001-2012 15.14.11 byl detekován u tří izolátů pocházejících z různých hostitelů (4/12, OLK/PR, *Citrullus lanatus*; 27/12, JHM/HO, *Cucurbita maxima* a 28/12/1, JHM/BV, *Cucumis sativus*). Patotyp 15.15.3 byl opakovaně detekován u izolátů z *Cucurbita pepo* (75/12, MSK/NJ). Další patotyp 15.15.11 rovněž velmi frekventovaný v celém sledovaném období, který nebyl zjištěn pouze v roce 2001, 2002 a 2005, byl zaznamenan v roce 2012 na hostitelských rostlinách rodu *Cucurbita*: *Cucurbita pepo* (29/12, JHM/BV), *Cucurbita maxima* (77/12, MSK/NJ) a také na okurce seté (*Cucumis sativus*). Za zajímavé lze v roce 2012 považovat tyto dva patotypy 15.7.0 a 15.7.9, které byly rozlišeny v české populaci *P. cubensis* poprvé až v roce 2012 a které pocházely ze stejné lokality (OLK/OL – Olomouc-Holice) a téhož hostitele (*Cucumis melo*) a byly u nich pozorovány rovněž i stejné reakce vůči osmi diferenciačním genotypům (resp. genotypům 1. /1-4/ a 2. skupiny /5-8/).

Srovnáním detekovaných patotypů u izolátů *P. cubensis* pocházejících z různých hostitelských rostlin v rámci celého 12-ti letého období se ukázalo, že neexistovala jednoznačná souvislost mezi druhem hostitelské rostliny a patotypem. Tuto skutečnost lze demonstrovat následujícími příklady: Patotyp 15.14.10, který byl každoročně detekován u izolátů *P. cubensis* v rámci celého 12-ti letého studia, byl s výjimkou jednoho izolátu z roku

2012 (69/12 hostitel: *Lagenaria siceraria*) detekován u izolátů pocházejících výhradně z okurky seté. Velmi úzká interakce patogen-hostitel u druhu *Cucurbita pepo* byla zaznamenána u dvou ze tří opakovaně se vyskytujících patotypů v letech 2010-2012 a jednalo se o tyto patotypy: 15.15.3 a 15.15.11. I když se lišila u těchto dvou patotypů frekvence jejich výskytu v jednotlivých letech v rámci tříletého období (2010-2012), tak vždycky aspoň jeden z izolátů s detekovaným patotypem (15.15.3 nebo 15.15.11.) pocházel z hostitele *Cucurbita pepo*. Z dosud publikované odborné literatury je známo, že rod *Cucurbita* je neobyčejně variabilní a u jeho zástupců je hojně rozšířená rasově specifická rezistence (Lebeda a kol., 2006). Od roku 2009 byla v České republice každoročně pozorována infekce *P.cubensis* i na nových hostitelských druzích z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a kol., 2012, 2013; Pavelková a kol., 2011) a tento trend byl potvrzen i v letech 2010-2012, tedy v období, kdy byly sbírány vzorky a z nich pak následně získány izoláty použité při experimentech v této diplomové práci. V posledních letech (2009-2012) bylo zaznamenáno hodně nových hostitelů *P. cubensis* na území České republiky. V roce 2009 se *P. cubensis* objevila na druhu *Cucurbita moschata* (Pavelková et al., 2011) a v následujících letech také na druzích *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita ficifolia*, *Citrullus lanatus* a *Lagenaria siceraria* (Lebeda a kol., 2012, 2013). Z dlouhodobého hlediska, lze tedy konstatovat, že se hostitelský okruh *P. cubensis* v České republice mění, což by mohlo souviset s velkou variabilitou českých populací tohoto patogenu na našem území, a rovněž i výsledky prezentované v této diplomové práci tuto skutečnost potvrdily.

Tabulka 21. Přehled patotypů *P. cubensis* determinovaných v České republice v letech 2001-2012 (upraveno podle Lebeda a kol., 2013; Pavelková, osobní sdělení – výsledky z let 2001-2008, Vyslyšelová, 2012)

Patotypy	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
3.0.12	+											
3.2.14	+											
3.14.10								+				
3.14.14	+											
4.15.0									+			
7.2.0												+
7.2.4	+											
7.6.10						+		+	+			
7.7.10	+				+							
7.10.2						+						
7.10.10						+		+	+			
7.10.14	+											
7.14.2												+
7.14.10					+	+		+				+
7.14.14	+					+						
7.15.10					+	+						
9.2.2												+

Patotypy	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
11.0.2											+	
11.0.8	+											
11.3.11	+											
11.6.2	+											
11.6.8	+											
11.7.10												+
11.7.14	+											
11.10.10	+											
11.10.14	+											
11.11.10	+											
11.14.2											+	
11.14.12	+											
11.14.14	+											
11.15.2											+	
14.0.0											+	
14.0.2											+	+
14.2.2											+	
14.8.2											+	
14.10.2											+	
14.14.2												+
15.0.0											+	
15.0.10		+										
15.0.14		+										
15.2.0	+											
15.2.2		+							+			
15.2.8						+						
15.2.10	+	+							+			
15.2.11				+								
15.3.10												+
15.3.12	+											
15.3.14	+											
15.6.10									+			
15.6.14	+											
15.6.15				+								
15.7.0										+		
15.7.9											+	
15.7.10												+
15.7.13	+											
15.7.14	+											
15.8.5											+	
15.10.0	+											
15.10.2		+	+								+	
15.10.3		+									+	
15.10.6		+										
15.10.10	+	+	+			+			+			
15.10.11				+					+			
15.10.12	+											
15.10.14	+	+	+						+			
15.11.3										+		
15.11.7										+		
15.11.10		+			+							
15.11.11												+
15.11.14		+										
15.12.2					+							
15.14.0											+	
15.14.2		+	+		+							+
15.14.3			+		+					+	+	
15.14.4											+	
15.14.6			+									+

Patotypy	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
15.14.8										+	+	
15.14.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.14.11	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
15.14.14	+	+	+	+					+	+		+
15.14.15			+	+			+		+		+	
15.15.2					+							+
15.15.3				+						+	+	+
15.15.7										+		
15.15.8												+
15.15.10		+	+	+	+	+	+	+			+	+
15.15.11			+	+		+	+	+	+	+	+	+
15.15.14	+	+	+	+	+					+		+
15.15.15	+		+	+				+		+	+	

+, patotyp přítomen

Žlutě zvýrazněné jsou nové patotypy zaznamenané v letech 2010-2012.

Fialově zvýrazněný je patotyp 15.14.10, který se vyskytl v letech 2001-2012.

Odolnost a náchylnost některých genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae vůči testovanému souboru izolátů *P. cubensis* se ve sledovaném období lišila, a to především v roce 2011 ve srovnání s ostatními studovanými roky. Genotyp *Luffa cylindrica* se ukázal jako vysoce rezistentní (27% frekvence kompatibilních reakcí), a také u genotypu *Citrullus lanatus* byla četnost výskytu kompatibilních reakcí téměř 50%. Naopak jako vysoce náchylné se jevily genotypy rodu *Cucumis* spolu s dalšími genotypy *Cucurbita pepo* var. *texana* a *Benincasa hispida*. V porovnání s předchozím obdobím (2001-2009) byla zaznamenána největší změna u těchto genotypů: 5 (*Cucurbita pepo* var. *pepo*) a 12 (*Lagenaria siceraria*). Zatímco genotyp 5 vykazoval v letech 2010-2012 frekvenci virulentních reakcí kolem 60%, do roku 2009 to bylo pouze cca 30%. Vysvětlením pro tyto rozdíly ve virulenci by mohla být existence rasově specifické interakce mezi rodem *Cucurbita* a *P. cubensis*. U genotypu 12 byla rovněž frekvence kompatibilních reakcí cca 60% (2010-2012), zatímco v letech 2001-2009 byla vyšší cca 90%. Ostatní genotypy z diferenciačního souboru vykazovaly podobné hodnoty virulence jako v období do roku 2009. Mezi vysoce rezistentní genotypy patřily následující tři genotypy: *Cucurbita pepo* var. *pepo*, *Citrullus lanatus* a *Luffa cylindrica*. Mezi vysoce náchylné genotypy se řadily diferenciační genotypy rodu *Cucumis*, z nichž genotyp *Cucumis sativus* cv Marketer 430, patřil mezi nejnáchylnější genotypy, kdy téměř u všech testovaných izolátů *P. cubensis* byla na tomto genotypu zaznamenána výrazná sporulace. Naopak odolnost či náchylnost ostatních genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae vůči izolátům *P. cubensis* se v letech 2010-2012 příliš výrazně nelišila v porovnání s dřívějšími roky.

Všechny uvedené skutečnosti tedy poukazují na to, že populace *P. cubensis* v České republice je extrémně variabilní s určitou meziroční fluktuací (Pavelková, 2012). Výskyt vysokého počtu různých patotypů a jejich značná proměnlivost zastoupení v čase a prostoru může souviset s migrací patogena a lokací České republiky v Evropě. Na základě vysokého

evolučního potenciálu *P. cubensis* (McDonald a Linde, 2002) a její adaptability na nové klimatické podmínky nelze předvídat její vývoj v dalších letech a je potřeba ji nadále sledovat i v budoucnu.

Ve světě se problematice patogenity *P. cubensis* věnovalo několik autorů. Podrobnější studie o patogenitě *P. cubensis* pocházejí např. z těchto zemí: z USA (Colucci, 2008) a Malajsie (Salati et al., 2010), kde pro testování variability virulence tohoto patogenu bylo použito zdokonaleného diferenciačního souboru navrženého Lebedou a Widrlechnerem v roce 2003, tedy stejného souboru jako byl použit při testování variability virulence českých izolátů zpracovaných v této diplomové práci. Zajímavý výzkum této problematiky byl realizován také v Izraeli, v rámci něhož byl popsán nový patotyp (Cohen, 2003), avšak detekce tohoto patotypu byla realizována s využitím starého diferenciačního souboru navrženého Thomasem et al. (1987). Nové hostitelské druhy *P. cubensis* uvádí také ve svých pracích řada zahraničních autorů, např. jsou známy z Německa (Runge a Thines, 2008) a Koreje (Choi a Shin, 2008).

S. J. Colucci se ve své disertační práci zabývá kromě jiných aspektů studia interakce *P. cubensis*-Cucurbitaceae rovněž i patogenní variabilitou souboru 32 izolátů *P. cubensis* pocházejících z USA z let 2004-2008. Celkem bylo na studovaném souboru 32 izolátů klasifikováno 32 odlišných patotypů. Testování bylo prováděno umělou inokulací *P. cubensis* na listové disky diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae vytvořeného Lebedou a Widrlechnerem (2003). Ukázalo se, že všechny izoláty *P. cubensis* byly vysoce kompatibilní s genotypy *Cucumis sativus* a *Cucumis melo* subsp. *melo*. Většina izolátů získaných z druhu *Cucumis sativus* vykazovala jen nepatrné rozdíly v pokrytí listových disků sporangii patogena (v %). Dalšími náchylnými hostiteli byly *Cucumis melo* var. *conomon*, *C. melo* var. *acidulus*, *Cucurbita pepo* var. *pepo*, *C. pepo* subsp. *fraterna* a *C. maxima*. Pouze 4 izoláty *P. cubensis* z celého testovaného souboru byly vysoce kompatibilní s genotypem *Citrullus lanatus* a 5 izolátů bylo kompatibilních s *Luffa cylindrica*. 7 izolátů bylo vysoce kompatibilních s genotypy *Benincasa hispida* a *Lagenaria siceraria*. Za obzvlášť pozoruhodné v této studii lze považovat výsledky testů izolátů získaných z tykví (*Cucurbita* sp.) v roce 2007 z lokality Johnston County, u nichž byl nalezen patotyp virulentní ke všem 12 genotypům diferenciačního souboru. Autorka ve své dizertaci přichází s myšlenkou, že by mohlo existovat tolik patotypů, kolik je izolátů *P. cubensis* nebo jejich hostitelů (Colucci, 2008). Výsledky zpracované v dizertaci této autory ukazují na skutečnost, která se potvrdila také při dlouhodobém studiu této problematiky v České republice (Lebeda a Urban, 2004b; Erbesová, 2005; Urban, 2006; Lebeda a kol., 2010; Pavelková, 2012; Lebeda a kol., 2013), že existuje vysoká variabilita v patogenitě izolátů *P. cubensis* pocházejících z USA.

Studie autorského kolektivu Salati a kol. (2010) se zabývala studiem patogenní variability souboru celkem 29 izolátů *P. cubensis* shromážděných z různých hostitelských druhů (*Cucumis sativus*, *Luffa cylindrica*, *Citrullus lanatus*, *Trichosanthes cucumerina*) západní Malajsie. Sporangia 13 izolátů *P. cubensis* měla schopnost klíčit při 14°C a byla tedy použita pro studium patogenní variability za použití testu listových disků s využitím diferenciačního souboru 12 genotypů čeledi Cucurbitaceae navržených Lebedou a Widrlechnerem v roce 2003. Na testovaném souboru izolátů bylo determinováno 12 odlišných patotypů a ukázalo se, že izoláty *P. cubensis* pocházející z dýňových farem v západní Malajsii jsou vysoce variabilní. Většina izolátů patřila do kategorie střední a vysoké patogenity a tato skutečnost ukazuje potenciál tohoto patogenu napadat tykvovitě plodiny v tropických oblastech. Nicméně, v této studii nemohly být patotypy rozlišeny na základě morfologické charakterizace sporangií a sporangioforů a bude tak v budoucnu potřeba provést molekulární analýzu tohoto souboru 13 izolátů *P. cubensis* (Salati a kol., 2010).

Další zajímavá studie pochází z Izraele a pojednává o determinaci nového patotypu 6 v izraelské populaci tohoto patogenu a tento patotyp byl popsán na základě diferenciačního souboru Thomase a kol. (1987) v roce 2003. V Izraeli byla *P. cubensis* zaznamenána na hostitelských rostlinách *Cucumis sativus* a *Cucumis melo* v letech 1979-2001 a byla klasifikována jako patotyp 3. V roce 2002 byl objeven výskyt tohoto patogenu také na druzích *Cucurbita moschata* a *Cucurbita pepo* var. *pepo*. Studium patogenity hostitelského okruhu prokázalo vysokou kompatibilitu nové populace s genotypy těchto druhů: *Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Cucurbita moschata* a *Cucurbita pepo* var. *pepo*, ale nízkou kompatibilitu s *Citrullus lanatus*. Tato nová populace byla označena jako patotyp 6. Celkem bylo tedy ve světě popsáno podle starého diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae navrženého Thomasem a kol. (1987) šest patotypů. Patotypy 1 a 2 pocházely z Japonska, patotyp 3 z Izraele, patotypy 4 a 5 z USA a poslední patotyp 6 tedy z Izraele (Cohen a kol., 2003).

V Německu byl výzkum zaměřen na druh *Bryonia dioica*, nový hostitelský druh patogenu *P. cubensis*. *Bryonia dioica* je jediná vytrvalá rostlina z čeledi Cucurbitaceae, která se přirozeně vyskytuje ve střední a severní Evropě a u které nebylo dosud zaznamenáno napadení patogenem. Infekční studie německých vědců, ale ukazují, že *P. cubensis* je schopna napadnout tuto rostlinu v laboratorních podmínkách za použití metody umělé inokulace. Inokulum bylo připraveno z izolátů *P. cubensis* pocházejících z České republiky (26/01 a 39/01) a Německa. Zjištění, že *B. dioica* může být hostitelem *P. cubensis* podporuje hypotézu, že *B. dioica* jako vytrvalá rostlina může potencionálně fungovat jako hostitel umožňující přezimování *P. cubensis* v chladnějších oblastech Evropy, a to v semenech nebo půdě (Runge a Thines, 2008).

V Koreji byla poprvé zaznamenána infekce *P. cubensis* na hostitelské rostlině *Lagenaria siceraria* teprve až v roce 2005. *Lagenaria siceraria* patří v Koreji mezi hojně pěstovanou plodinu (zelenina, léčitelství). *P. cubensis* byla objevena na porostech *L. siceraria* pěstovaných na polích v oblasti Hoengsong a byla sekvenována ITS rDNA. Porovnání sekvence v databázi GenBank potvrdilo, že testovaná sekvence ITS je identická s *P. cubensis* na hostiteli *Cucurbita moschata* (AY608619). Tímto se potvrdil první záznam o výskytu *P. cubensis* na druhu *Lagenaria siceraria* v Koreji (Choi a Shin, 2008).

Jako poslední zajímavou studii bych uvedla práci Quesada-Ocampo a kol. (2012) pojednávající o genetické struktuře populace *P. cubensis*. V této práci bylo celkem otestováno 465 izolátů *P. cubensis*, pocházejících z různých hostitelů (*Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moschata*), 3 kontinentů, 13 zemí a 19 států USA s využitím molekulárních metod. V této studii byly izoláty zařazeny do předem daných kategorií podle hostitelského druhu, geografie, odběrového roku, a byly genotypovány pomocí dvou mitochondriálních a pěti jaderných lokusů. Bayesiánské klastrování rozdělilo izoláty do šesti genetických klastrů a naznačilo rozdělení populační struktury podle kritéria geografického původu a hostitelského druhu studovaných izolátů, při rozdělení podle dílčích kritérií se některé klastry vyskytovaly více či méně častěji. Ve vzorcích ze severní Ameriky a Evropy byly přítomny všechny genetické klastry. U jednotlivých zemí a států byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých klastrů. Izoláty, které pocházely z okurek, měly odlišné klastrové složení a byla u nich prokázána nižší genetická variabilita ve srovnání s izoláty z jiných tykvovitých zelenin. V této studii se tedy ukázalo, že genetická struktura české populace *P. cubensis* měla shodné znaky s populacemi z Turecka, Izraele, Kanady a USA (Quesada-Ocampo a kol., 2012).

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly vyhodnoceny informace pojednávající o variabilitě virulence vybraného souboru izolátů *P. cubensis*, u nichž byla detekována úroveň patogenity a byly rozlišeny na jednotlivé patotypy podle specifického tetradového kódu. Pro účely této diplomové práce bylo získáno 118 izolátů *P. cubensis* z let 2010-2012, pocházejících ze sběrových expedic z různých lokalit České republiky a z různých hostitelských rostlin čeledi Cucurbitaceae. Patogenní variabilita izolátů *P. cubensis* byla testována terčíkovou metodou v prostředí umělé inokulace s využitím diferenciačního souboru 12 genotypů z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003).

V předložené diplomové práci jsem dospěla k následujícím závěrům:

- Na testovaném souboru izolátů *P. cubensis* bylo determinováno 56 různých patotypů, z nichž bylo 27 nových, v České republice dosud nepopsaných, což naznačuje vysokou variabilitu virulence českých populací *P. cubensis* a byla také pozorována určitá meziroční fluktuace ve variabilitě virulence;
- Celkem 27 izolátů *P. cubensis* bylo získáno ze vzorků nových hostitelských druhů tohoto patogenu (*Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*) a bylo u nich rozlišeno 14 různých patotypů. Proměnlivá struktura populace *P. cubensis* pocházejících z jiných hostitelů by mohla naznačovat, podobně jako je tomu u izolátů pocházejících z druhu *Cucumis sativus*, na značnou proměnlivost studovaných populací *P. cubensis* z hlediska patogenní variability na území České republiky v letech 2010-2012;
- Struktura populace *P. cubensis* z hlediska úrovně její patogenity (resp. počtu virulentních faktorů VF 1-12) byla následující: u 75% izolátů *P. cubensis* byla zjištěna vysoká patogenita (VF 9-12), u 18% izolátů střední (VF 5-8) a u 7% izolátů nízká (VF 1-4) patogenita. V České republice tedy převažovaly vysoce virulentní kmeny *P. cubensis*;
- Odolnost a náchylnost některých genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae vůči izolátům *P. cubensis* se ve sledovaném období lišila, především v roce 2011 ve srovnání s ostatními studovanými roky. Genotyp *Luffa cylindrica* se ukázal jako vysoce rezistentní (27% frekvence kompatibilních reakcí) a také u genotypu *Citrullus lanatus* byla četnost výskytu kompatibilních reakcí téměř 50%. Naopak jako vysoce náchylné se jevíly genotypy rodu *Cucumis* spolu s dalšími genotypy *Cucurbita pepo* var. *texana* a *Benincasa hispida*.

8 LITERATURA

- Agrios, G. N. (1978): Plant pathology. Second Edition. Academic Press. New York. pp. 466-470.
- Bates, D. M., Robinson, R. W., Jeffrey, C. (1990): Biology and utilization of the Cucurbitaceae. Cornell University Press.
- Bedlan, G. (1989): Erstmaliger nachweis von oosporen von *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rost. an Gewächshausgurken in Österreich. Pflanzenschutzberichte 3: 119-120.
- Cohen, Y. (1981): Downy mildew of cucurbits. In: Spencer, D. M. ed.: The Downy Mildews. Academic Press, London, pp. 341-354.
- Cohen, Y., Meron, I., Mor, N., Zuriel, S. (2003): A new pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew in cucurbits in Israel. Phytoparasitica 31: 458-466.
- Cohen, Y., Rotem, J. (1971): Dispersal and viability of sporangia of *Pseudoperonospora cubensis*. Trans. of the British Mycolog. Soci. 57: 67-74.
- Colucci, S. J. (2008): Host range, fungicide resistance and management of *Pseudoperonospora cubensis*, causal agent of cucurbit downy mildew. MS Thesis, North Carolina State University, Raleigh, USA.
- Cooke, R. (1977): The biology of symbiotic fungi. John Wiley et Sons, London, New York.
- Crüger, G. (1974): Starkes auftreten des falschen mehltaus an Hausgurkenkulturen in Rheinland. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutz 26: 145-148.
- Damiano, A. (1973): Una nuova peronospora delle cucurbitaceae. Lotta Antiparas 5: 12-13.
- Dick, M. W. (2001): The Peronosporomycetes. In: McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., Lemke, P. A. eds.: The Mycota VII Part A: Systematics and Evolution. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, pp. 39-72.
- Dostál, J. (1954): Klíč k úplné květeně ČSR. Československá akademie věd.
- Dostál, J. (1989): Nová květena ČSSR, díl 1. Academia, Praha.
- Erbesová, M. (2005): Determinace patotypů plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Diplomová práce, Olomouc, Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Federation of British Plant Pathologists (FBPP) (1973): A guide to use of terms in plant pathology. Phytopathological Paper 17, Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, reprinted 1986, CAB International.
- Forsberg, A. S. (1986): Downy mildew – *Pseudoperonospora cubensis* in Swedish cucumber fields 1985. Växtskyddsnotiser 50: 17-19.
- Geaman, I. (1974): Morphology and biology of *Peronoplasmopara cubensis* (B. and C.) Clinton causing downy mildew of cucurbits An. Inst. Cerc. pentru Prot. Pl. 10: 151-159.

- Hecke, L. (1904): Über das auftreten von *Plasmopara cubensis* in Österreich. Ann. Mycol. 2: 356-358.
- Holmes, G. J., Main, C. E., Keever, Z. T., III. (2004): Cucurbit downy mildew: a unique pathosystem for disease forecasting. In: Spencer-Phillips, P. T. N., Jeger, M. eds.: Advances in downy mildew research, Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 69–80.
- Horsfall, J. G., Cowling, E. B. eds. (1978): Plant disease: an advanced treatise. How disease is managed. How disease develops in populations. Academic Press, New York.
- Choi, Y. J., Shin, H. D. (2008): First record of downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* on bottle gourd in Korea. Plant Pathol. 57: 371.
- Chrtková, A. (1990): 62. Cucurbitaceae Juss. – dýňovitě. In: Hejný, S., Slavík, B. eds.: Květena České republiky, díl 2. (první vydání). Academia, Praha, pp. 439-452.
- Chrtková, A. (2003): 62. Cucurbitaceae Juss. – dýňovitě. In: Hejný, S., Slavík, B. eds.: Květena České republiky, díl 2. (druhé vydání). Academia, Praha, pp. 439-452.
- Jahodář, L. (2006): Farmakobotanika. Karolinum, Praha.
- Jeffrey, C. (1990): Systematics of the Cucurbitaceae: an overview. In: Bates, D. M., Robinson, R. W., Jeffrey, C. eds.: Biology and Utilization of the Cucurbitaceae. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, pp. 3-7.
- Kadlecová, M. (2010): Testování účinnosti vybraných fungicidů vůči plísni okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice. Bakalářská práce. Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Kadlecová, M. (2012): Variabilita účinnosti fungicidů vůči populacím *Pseudoperonospora cubensis*. Diplomová práce. Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, p. 606.
- Kubát, K., Hrouda, L., Chrtek, J. jun., Kaplan, Z., Kirschner, J., Štěpánek, J. eds. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.
- Lange, L., Eden, U., Olson, L.W. (1989): Zoosporogenesis in *Pseudoperonospora cubensis*. The causal agent of cucurbit downy mildew. Nordic J. Bot. 8: 497–504.
- Lebeda, A. (1989): Evoluce parazitismu a patogenismu. In: Kúdela, V., Bartoš, P., Čača, Z., Dirlbek, J., Frič, F., Lebeda, A., Šebesta, J., Ulrychová, M., Valášková, E., Veselý, D. ed.: Obecná fytopatologie. Academia, Praha, pp. 107-113.
- Lebeda, A. (1990): Biologie a ekologie plísně okurkové. In: Lebeda, A. ed.: Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew). Československá vědecká společnost pro mykologii při ČSAV, Praha, pp. 13-45.

- Lebeda, A. (1999): *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucumis* spp. and *Cucurbita* spp. – resistance breeding aspects. *Acta Hort.* 492: 363-370.
- Lebeda, A., Cohen, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) – biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *Eur. J. Plant Pathol.* 129: 157-192.
- Lebeda, A., Gadasová, V. (2002): Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech republic and some other european countries. *Acta Hort.* 588: 137-141.
- Lebeda, A., Hübschová, J., Urban, J. (2010): Temporal population dynamics of *Pseudoperonospora cubensis*. In: Thies, J. A., Kousik, S., Levi, A. eds.: *Cucurbitaceae 2010 Proceedings*. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, USA, pp. 240-243.
- Lebeda, A., Mieslerová B. (2006a): Charakteristika a význam říše Chromista se zaměřením na třídu Peronosporomycetes. In: Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. eds.: *Protozoa a Chromista – Taxonomie, biologie a hospodářský význam*. ČFS, Praha, pp. 25-26.
- Lebeda A., Pavelková J., Sedláková B., Urban J. (2013): Structure and temporal shifts in virulence of *Pseudoperonospora cubensis* populations in the Czech republic. *Plant Pathol.* 62: 336-345.
- Lebeda, A., Pavelková, J., Urban, J., Sedláková, B. (2011): Distribution, host range and disease severity of *Pseudoperonospora cubensis* on cucurbits in the Czech Republic. *J. Phytopathol.* 159: 589-596.
- Lebeda, A., Sedláková, B., Pavelková, J. (2012): New hosts of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and pathogen virulence variation. *Eucarpia Cucurbitaceae 2012*, Antalya, Turkey, pp. 768-776.
- Lebeda, A., Schwinn, F. J. (1994): The downy mildews – an overview of recent research progress. *J. Plant Dis. Protect.* 101: 225-254.
- Lebeda, A., Štěpánková, J., Urban, J. (2006b): Plíseň okurky (*Pseudoperonospora cubensis*) – taxonomie, biologie, ekologie interakce hostitel-patogen a možnosti ochrany. In: Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. eds.: *Protozoa a Chromista – Taxonomie, biologie a hospodářský význam*. ČFS, Praha, pp. 47-78.
- Lebeda, A., Urban, J. (2004a): Nové poznatky o plísní okurkové. *Rostlinolékař* 15: 20-23.
- Lebeda, A., Urban, J. (2004b): Disease impact and pathogenicity variation in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. In: Lebeda, A., Paris, H. S. eds.: *Progress in Cucurbit Genetics and Breeding Research. Proceedings of Cucurbitaceae 2004, the 8th EUCARPIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding*. Palacký University in Olomouc, Olomouc (Czech Republic), pp. 267-273.

- Lebeda, A., Urban, J. (2004c): Distribution, harmfulness and pathogenic variability of cucurbit downy mildew in the Czech Republic. *Acta fyt. et zoo.*, 7: 170-173.
- Lebeda, A., Urban, J. (2005): Ochrana okurek a dalších tykvovitých zelenin vůči plísni okurkové /Sborník přednášek/ (Protection of cucumbers and other cucurbitaceous vegetables to cucurbit downy mildew /Proceedings/). In: Kocourek, F. et al. eds.: Metodika pro integrovaný systém ochrany polní zeleniny vůči škodlivým organismům (Methods for integrated system of field vegetables protection to dangerous organisms). Zelinářská unie Čech a Moravy, Olomouc (Vegetables Grower Union of Bohemia and Moravia, Olomouc, Czech Republic), pp. 24-38.
- Lebeda, A., Urban, J. (2007): Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. *Acta Hort.*, 731: 327-336.
- Lebeda, A., Urban, J. (2010): Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). In: Spencer, M. M., Lebeda, A. eds.: Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease. International Atomic Energy Agency, pp. 285-294.
- Lebeda, A., Widrlechner, M. P. (2003): A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *J. Plant. Dis. Protect.* 110: 337-349.
- Lebeda A., Widrlechner M. P. (2004): Response of wild and weedy *Cucurbita* L. to pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostov. (cucurbit downy mildew). In: Spencer-Phillips P. T. N., Jeger M. eds.: Advances in Downy Mildew Research, Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 203-210.
- Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J., Křístková, E. (2007: *Cucurbita* (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.), Chapter 8. In R. Singh Ed., Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement series, volume 3—vegetable crops. Boca Raton (CRC): pp. 273-377.
- Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Urban, J. (2006c): Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. In: Holmes, G. J. ed.: Proceeding of Cucurbitaceae 2006, Universal Press, Raleigh, North Carolina, USA, pp. 453-467.
- Linhart, M. (1904): Die *Peronospora* rente *Pseudoperonospora*, krankheit der melonen und gurken in Ungarn. *Z. PflKrankh.* 14: 143.
- Lira-Saade, R. (1995): Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las Cucurbitaceae latinoamericanas de importancia económica. Instituto de Biología, UNAM, México.
- McDonald, B. A., Linde, C. (2002): Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.

- Nayar, N. M., More, T. A. (1998): Cucurbits. Enfield. NH: Science Publishers.
- Němcová, M. (2008): Výskyt kmenů s rezistencí vůči fungicidům v populacích plísně tykvovitých v České republice. Bakalářská práce. Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Němcová, M. (2012): Porovnání účinnosti vybraných fungicidů vůči plísni okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice. Diplomová práce. Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Ojiambo, P. S., Holmes, G. J. (2011): Spatiotemporal spread of cucurbit downy mildew in the eastern United States. *Phytopathology* 101: 451-461.
- Ojiambo, P., Kanetis, L., & Holmes, G. (2009). Forecasting long distance movement of *Pseudoperonospora cubensis* and the Cucurbit ipmPIPE. *Phytopathology* 99: 171.
- Opletal, L., Čopíková, J., Uher, M., Lapčík, O., Moravcová, J., Drašar, P. (2007): Přírodní látky hořké chuti. *Chem. Listy* 101: 895-906.
- Pantidou, M. E. (1973): Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathology Inst., Kiphissia, Athens.
- Paris, H. S., Lebeda, A., Křistkova, E., Andres, T. C., Nee, M. H. (2012): Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Econ. Bot.* 20: 1-20.
- Pavelková, J. (2012): Temporal population dynamics of *Pseudoperonospora cubensis*. Disertační práce, Olomouc, Katedra botaniky PŘF UP v Olomouci.
- Pavelková, J., Lebeda, A., Sedláková, B. (2011): First report of *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucurbita moschata* in the Czech Republic. *Plant Dis.* 95: 878-879.
- Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Kitner, M., Cohen, Y., Lebeda, A., Carimi, F. (2014): Characterization of *Pseudoperonospora cubensis* isolates from Europe and Asia using ISSR and SRAP molecular markers. *Eur. J. Plant Pathol.* 139: 641-653.
- Procházková, L. (2011): Využití metody AFLP při studiu genetické variability sbírky izolátů *Pseudoperonospora cubensis*. Bakalářská práce. Katedra buněčné biologie a genetiky PŘF UP v Olomouci.
- Quesada-Ocampo, L. M., Granke, L. L., Olsen, J., Gutting, H. C., Runge, F., Thines, M., Lebeda, A., and Hausbeck, M. K. (2012): The genetic structure of *Pseudoperonospora cubensis* populations. *Plant Dis.* 96: 1459-1470.
- Renner, S. S., Schaefer, H., Kocyan, A. (2007): Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology* 58.

- Riethmüller, A., Voglmayr, A., Göker, M., Weiß, M., Oberwinkler, F. (2002): Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94: 834–849.
- Robinson, R. W., Decker-Walters, D. S. (1997): Cucurbits. CAB International, Wallingford, New York.
- Rod, J., Ackermann, P. (1990): Plíseň okurková. Sempra, s.p. Praha, Český zahrádkářský svaz, ÚKZÚZ – SOR Brno.
- Roháčková, J. (2012): Rezistence genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči plísni okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Bakalářská práce. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci.
- Roháčková, J. (2014): Rezistence genových zdrojů *Cucumis* spp. a *Cucurbita* spp. vůči patotypům *Pseudoperonospora cubensis*. Diplomová práce. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci.
- Runge, F., Thines, M. (2008): A potential perennial host for *Pseudoperonospora cubensis* in temperate regions. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 483-486.
- Runge, F., Thines, M. (2012): Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis*. *Plant Dis.* 96: 55-61.
- Salati, M., Yun, W. M., Meon, S., Masdek, H. N. (2010): Host range evaluation and morphological characterization of *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew in Malaysia. *African J. Biotech.* 9: 4897-4903.
- Savory, E. A., Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Varbanova, M., Hausbeck, M. K., Day, B. (2011): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Mol. Plant Pathol.* 12: 217-226.
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H., Renner, S. S. (2010): Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *PNAS USA*, 107: 14269–14273.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. (2002): Cytologické aspekty interakce rostlin a patogenů (Cytological aspects of host-pathogen interactions). *Biologické listy* 67: 59-73.
- Seshadri, V. S., More, T. A. (2009): Cucurbit vegetables: biology, production and utilization. Studium Press LLC.
- Schaefer, H., Renner, S. S. (2011): Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon* 60: 122-138.
- Skalický, V. (1961): Plíseň okurková – *Peronoplasmodium cubensis*. In: Benada, J., Špaček, J. eds.: Zemědělská fytopatologie. Díl III. Choroby zeleniny. SZN, Praha, pp. 390-393.
- Smolák, J. (1926): Information service. Second Annual Rep. Phytopath. St., Mělník, for the year 1925-1926, pp. 90-95.

- Stepansky, A., Kovalski, I., Perl-Treves, R. (1999): Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Syst. and Evol.* 217: 313-332.
- Tahvonen, R. (1985): Downy mildew of cucurbits found for the first time in Finland. *Växtskyddsnotiser* 49: 42-44.
- Tarr, S. A. J. (1972): *The principles of plant pathology*. MacMillan Press, London.
- Thomas, C. E., Inaba, T., Cohen, Y. (1987): Physiological specialization in *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology*. 77: 1621-1624.
- Urban, J. (2006): Biology and variability of interactions between cucurbitaceous plants and *Pseudoperonospora cubensis*. Autoreferát disertace k získání vědecké hodnosti doktor, Olomouc.
- Vanderplank, J. E. (1968): *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York-London.
- Vanderplank, J. E. (1975): *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York.
- Voglmayr, H. (2008): Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122: 3–18.
- Vyslyšelová, N. (2012): Determinace patogenní variability v populaci plísňě okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice. Bakalářská práce, Olomouc, Katedra zoologie a ornitologická laboratoř PŘF UP v Olomouci.
- Whitaker, T. W., Bemis, W. P. (1964): Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution* 18: 553-559.
- Yeon, I. K. (2007): Incidence of *Pseudoperonospora cubensis* on winter grown oriental melon (*Cucumis melo*) in vinyl houses in Korea. In: A. Lebeda and P.T.N. Spencer-Phillips Eds., *Advances in downy mildew research*, Vol. 3. Palacký University in Olomouc and JOLA, v.o.s., Kostelec na Hané (Czech Republic), pp. 217-222.

INTERNETOVÉ ZDROJE: (aktuální k datu 8.8.2014)

- Tým Superia.cz (2012): Zkratky, co znamená, zkratková slova, akronymy. http://zkratky.superia.cz/zkratky_kraju_cr/ (staženo 22. 7. 2014).
- Tým Superia.cz (2012): Zkratky, co znamená, zkratková slova, akronymy. <http://zkratky.superia.cz/okresy/> (staženo 22. 7. 2014).

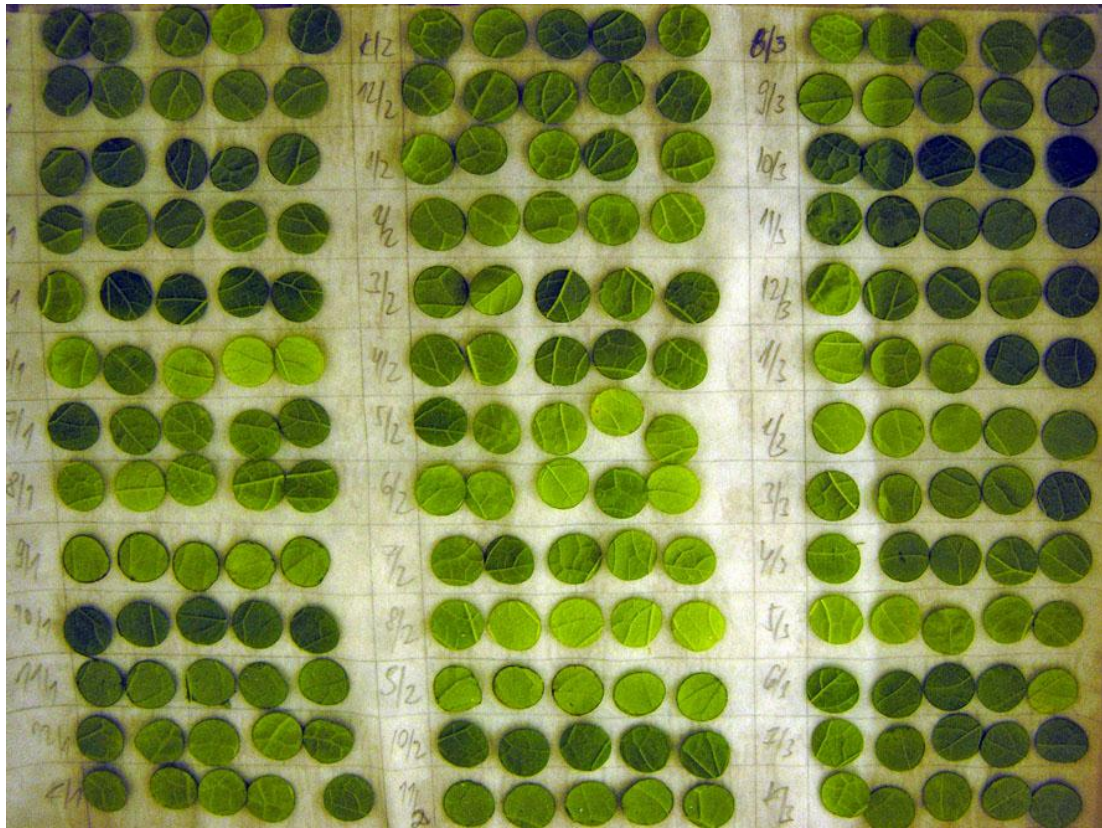
9 PŘÍLOHY



Obr. P1. Pěstování diferenciačního souboru genotypů čeledi Cucurbitaceae pro determinaci patotypů *P. cubensis* ve skleníku (zobrazena pouze část souboru) (N. Vyslyšelová).



Obr. P2. Plastové tácy s listovými disky uložené ve fytostronu a připravené na inokulaci izoláty *P. cubensis* (N. Vyslyšelová).



Obr. P3. Detail plastového tácu s listovými disky (N. Vyslyšelová).

DI 0



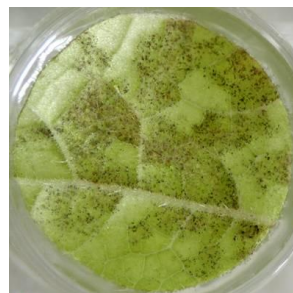
DI 1



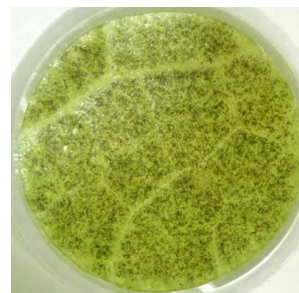
DI 2



DI 3



DI 4



Obr. P4. Detail listových disků s odlišnými stupni infekce (DI 0-4) 9 dní po inokulaci *P. cubensis* (J. Urban).