

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



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

Bakalářská práce

Nikola Vyslyšelová

Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.**
Rok obhajoby: 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia podle pokynů vedoucího bakalářské práce s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 11. května 2012

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc., za odborné vedení bakalářské práce, za čas a trpělivost věnovanou vedením mé bakalářské 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 poskytli při zpracování této práce.

Vyslyšelová, N. (2012): Determinace patogenní variability v populaci plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*) v České republice [bakalářská práce]. Olomouc: Katedra zoologie a ornitologická laboratoř PřF UP v Olomouci. 59 s. 3 přílohy, česky.

Abstrakt

V předložené bakalářské práci jsem se zabývala patogenní variabilitou izolátů *P. cubensis*, získaných z infikovaných porostů tykvovitých zelenin při sběrových expedicích na území České republiky v roce 2009. U těchto izolátů byly determinovány patotypy, které byly dále zkoumány ve vztahu k jejich geografickému původu. Rovněž byla hodnocena odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru Cucurbitaceae pro detekci patotypů *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003) vůči studovanému souboru izolátů patogena.

V literárním přehledu jsou zpracovány informace o biologii a ekologii *P. cubensis*, hostitelském okruhu tohoto patogenu, rozšíření *P. cubensis* a interakcích hostitel-patogen zahrnující patogenismus a zkoumanou patogenní variabilitu a patotypy.

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na determinaci patogenní variability v populaci *P. cubensis* v České republice. Pro testování byly použity izoláty *P. cubensis* pocházející z různých lokalit České republiky získané v roce 2009. K determinaci patogenní variability byla použita metoda listových terčů (Lebeda, 1990). Celkem bylo získáno 44 izolátů z různých krajů, převážně z *Cucumis sativus*, pouze dva izoláty byly z druhů *Cucumis melo* a *Cucurbita moschata*. V roce 2009 byl vysoký stupeň patogenity zaznamenán u 68% izolátů a střední stupeň patogenity u 32% izolátů *P. cubensis*. Nízký stupeň patogenity nebyl v roce 2009 u testovaných izolátů *P. cubensis* determinován. Ve sledovaném roce bylo u 44 testovaných izolátů rozlišeno celkem 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) se vyskytly v populaci tohoto patogenu více než jednou.

..

Klíčová slova: tykvovité, interakce hostitel-patogen, náchylnost, odolnost, patogenní variabilita, patotypy, plíseň okurková, plíseň tykvovitých

Vyslyšelová, N. (2012): Determination of pathogenic variation in populations of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech republic. Olomouc: Department of Zoology and Laboratory of Ornithology Science, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc. 59 pp. 3 Appendices, in Czech.

Abstract

In this bachelor thesis, I investigated the pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* isolates originated from infected cucurbit plants during the sampling expeditions at the areal of the Czech Republic in the 2009. Pathotypes were determined at these isolates that were also screened in relation to their geographic origin. Resistance and susceptibility of genotypes of differential set of Cucurbitaceae for detection of *P. cubensis* pathotypes (Lebeda a Widrlechner, 2003) were also assigned against the studied set of pathogen isolates.

Information about biology and ecology of *P. cubensis*, host range, distribution of *P. cubensis* and host-pathogen interactions including pathogenism and the screened pathogenic variation and pathotypes are described in the theoretical part of this bachelor thesis.

Experimental part of this bachelor thesis was focused on the determination of pathogenic variation in *P. cubensis* population in the Czech Republic. The *P. cubensis* isolates originated from different locations in the Czech Republic and obtained in the year 2009 were used for screening. A modified-leaf disk method (Lebeda, 1990) was used for determination of pathogenic variation. A total of 44 isolates from different regions, mainly from *Cucumis sativus*, only two isolates originating from *Cucumis melo* and *Cucurbita moschata* was obtained. In the year 2009, the high pathogenicity factor was noted at 68% *P. cubensis* isolates and medium pathogenicity factor at 32% isolates. No screened *P. cubensis* isolates belonged to low pathogenicity factor group. 14 pathotypes were detected at 44 screened isolates in the studied year. Pathotype 15.14.10 was the most frequent (45,5%). Other 13 determined pathotypes were less often found, only three of them (15.2.10, 15.14.11 a 15.10.10) occurred more than one in population in this pathogen.

Key words: Cucurbitaceae, host-pathogen interactions, resistance, susceptibility, pathogenic variation, pathotypes, *Pseudoperonospora cubensis*, cucurbit downy mildew

OBSAH

OBSAH.....	6
1 ÚVOD.....	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE	10
3.1 Taxonomie <i>P. cubensis</i>	10
3.2 Biologie a ekologie <i>P. cubensis</i>	10
3.2.1 Parazitismus <i>P. cubensis</i>	10
3.2.2 Životní a infekční cyklus <i>P. cubensis</i>	11
3.2.3 Symptomatologie <i>P. cubensis</i>	12
3.2.4 Ekologické nároky <i>P. cubensis</i>	13
3.3 Hostitelský okruh.....	14
3.4 Geografické rozšíření <i>P. cubensis</i>	16
3.5 Hostitel	18
3.5.1 Taxonomie a význam čeledi Cucurbitaceae	18
3.5.2 Původ a charakteristika zástupců čeledi Cucurbitaceae	18
3.6 Interakce hostitel-patogen.....	19
3.6.1 Patogenismus	20
3.6.2 Patogenní variabilita <i>P. cubensis</i>	21
3.6.2.1 Speciální formy	22
3.6.2.2 Patotypy.....	22
3.6.2.3 Fyziologické rasy.....	24
3.6.2.4 Variabilita hostitele v interakcích s <i>P. cubensis</i>	25
4 MATERIÁL A METODIKA	27
4.1 Rostlinný materiál	27
4.1.1 Předpěstování rostlin	27
4.2 Izoláty <i>P. cubensis</i>	28
4.2.1 Izolace a uchovávání <i>P. cubensis</i>	29

4.3	Determinace patogenní variability.....	30
4.3.1.	Metoda listových disků.....	30
4.3.2	Metody hodnocení	30
4.4	Tetrádový kód pro popis patotypů <i>P. cubensis</i>	31
4.5	Stanovení úrovně patogenity	32
5	VÝSLEDKY.....	33
5.1	Patogenní variabilita izolátů <i>P. cubensis</i>	33
5.2	Patotypy <i>P. cubensis</i> z hlediska jejich geografického původu	37
5.3	Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru.....	40
6	DISKUZE.....	43
7	ZÁVĚR.....	48
8	LITERATURA	49
9	PŘÍLOHY	57

1 ÚVOD

Pseudoperonospora cubensis (Berk. a Curt.) Rostov., původce plísně tykvovitých, je považována za nejzávažnější chorobu postihující tykvovité rostliny. Významné hospodářské ztráty způsobuje nejen v Evropě (Lebeda et al., 2012), ale rovněž i ve světě a to především v USA (Colucci, 2008), Číně a Izraeli (Cohen, 2003). Poprvé byla *P. cubensis* objevena na Kubě v roce 1868, odtud pochází její druhové jméno *cubensis* (Skalický, 1961). Jedná se o obligátního houbového parazita, který napadá nadzemní části rostlin z čeledi Cucurbitaceae, zejména listovou čepel (Lebeda et al., 2006b). Vyskytuje se v semi-aridních až tropických oblastech, všude kde se pěstují plodiny z čeledi Cucurbitaceae, napadány jsou polní i kryté porosty. Rozšíření tohoto patogena je celosvětové, vyskytuje se na všech kontinentech severní a jižní polokoule (Lebeda and Cohen, 2011). Mezi nejčastěji pěstovaný druh tykvovitých plodin patří *Cucumis sativus*, který je zároveň i nejčastější hostitel *P. cubensis*. Tento patogen je znám i svým širokým hostitelským okruhem, napadá jak polokulturní plodiny, tak i plevelné a planě rostoucí druhy (Lebeda, 1990; Lebeda et al., 2006b; Lebeda a Urban, 2007).

Patogenní variabilita *P. cubensis* se projevuje při interakcích s hostitelskými rostlinami, je studována na souboru diferenciačních genotypů čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003). Cílem je detailně poznat patogenní variabilitu populací *P. cubensis* na úrovni patotypů a ras. Výsledné informace jsou velmi důležité pro šlechtění rostlin na rezistenci a v ochraně rostlin proti *P. cubensis*. V posledních letech byla v české populaci *P. cubensis* zaznamenána velká variabilita virulence a zvyšující se patogenita (Lebeda et al., 2012).

Výsledky předložené bakalářské práce jsou dílčím příspěvkem k poznání patogenní variability populace *P. cubensis* na území České republiky, kterým se dlouhodobě zabývá Fytopatologická laboratoř katedry botaniky PřF v Olomouci. Tento výzkum byl podporován následujícími projekty: Variability složek a interakcí v rostlinném patosystému a vliv faktorů prostředí na jejich projev (MŠMT ČR, MSM 6998959215), Diagnostika a metody integrované ochrany proti karanténním a dalším ekonomicky vybraným patogenům plodové a listové zeleniny (Mze ČR (NAZV) QH 71229), Biodiverzita rostlin a jejich interakce s prostředím (PřF 2010-001, PřF 2011-001, PřF 2012-001).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce bylo rozšířit poznatky o patogenní variabilitě populace *P. cubensis* na území České republiky v roce 2009. V literárním přehledu zpracovat dostupné informace k této problematice včetně nejnovějších poznatků a to nejen z území České republiky, ale rovněž i ze světa. V experimentální části této bakalářské práce pak prostudovat patogenní variability izolátů *P. cubensis* a odolnost/náchylnost genotypů diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae. Získané výsledky adekvátně zpracovat a interpretovat.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Taxonomie *P. cubensis*

P. cubensis byla poprvé popsána Berkelym v roce 1868 na rostlinném materiálu, který pocházel z Kuby. Odtud tedy pochází její druhové jméno *cubensis* (Skalický, 1961). Zároveň s popisem druhu *Pseudoperonospora cubensis*, byl identifikován i rod *Pseudoperonospora* Berkeley (Dick, 2001). Na živých rostlinách byl patogen pozorován a popsán až v roce 1903 Rostovzevem v botanické zahradě v Moskvě (Skalický, 1961). 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 a to z Itálie (Damiano, 1973) a Řecka (Pantidou, 1973) a o rok později v Německu (Crüger, 1974) a Rumunsku (Geaman, 1974). I v zemích severní Evropy (Finsko, Švédsko) zaznamenali nález *P. cubensis*, ale až v roce 1985 a 1986 (Tahvonen, 1985; Forsberg, 1986).

P. cubensis patří do říše Chromista, podříše Chromobiota a kmenu Heterokonta, který zahrnuje oddělení Bigyra (= Pseudofungi), dále pak do pododdělení Peronosporomycotina, třídy Peronosporomycetes, řádu Peronosporales a čeledi Peronosporaceae (Lebeda et al., 2006a).

Rod *Pseudoperonospora* podle Rostovzeva (1903) zahrnoval pravděpodobně sedm druhů (Dick, 2001), ale nověji je udáváno druhů šest (Savory et al., 2010).

3.2 Biologie a ekologie *P. cubensis*

3.2.1 Parazitismus *P. cubensis*

P. cubensis podléhá úplné nutriční závislosti patogena na hostitelské rostlině, kdy bez hostitelské rostliny není možná existence patogena (pouze ve formě oospor). Napadány 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 et al., 2006b). Na začátku napadení hostitele tímto patogenem dochází spíše k podpoře růstu a zvyšování počtu organel v buňkách (Lebeda a Schwinn, 1994). Poté nastává primární nekrotická reakce, která má hypersenzitivní charakter a objevuje se u rezistentních hostitelů nebo u dlouhodobě infikovaných rostlin jako sekundární reakce

pletiva (Lebeda et al., 2006b). 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 štěrbinu, v níž se hromadí živiny vstřebávané parazitem. (Lebeda a Schwinn, 1994).

3.2.2 Životní a infekční cyklus *P. cubensis*

Životní cyklus *P. cubensis* se vyznačuje dvěma odlišnými fázemi: pohlavní a nepohlavní (obr. 2). U *P. cubensis* je známa tzv. polycyklická infekce (tvorba několika nepohlavních generací) v průběhu vegetační sezóny (Lebeda, 1990). Přezimování probíhá pomocí oospor (pohlavních spor) nebo jsou populace bez tvorby oospor každoročně obnovovány příchodem inokula z oblastí, kde se patogen vyskytuje každoročně (Lebeda, 1986a, 1990).

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 konidie nebo-li zoosporangia (nepohlavní spory) tzv. zárodky primární infekce (obr. 3). Tyto spory o velikosti 15-25 x 20-35 μm jsou zbarveny šedavě až černo-fialově a mají vejčitý až eliptický tvar (Skalický, 1961). Většinou se na jednom sporangioforu vyvine kolem 20 spor, které se velmi snadno odlamují od rodičovských sporangioforů a jsou dále rozšiřovány větrem (anemochorie). Po styku spory s hostitelskou rostlinou dochází za vhodných podmínek (voda – rosa, dešťové kapky) 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 2-15, jeden bičík mají hladký a druhý pětý) (Lebeda, 1990). Poté se zoospory pohybují pomocí bičíků směrem ke stomatům, kde ztrácejí bičíky a encystují v průduchových štěrbinách (Cohen, 1981). Ze vzniklé cysty následně vyrůstá klíční vlákno, které vytváří apresorium z něhož vyroste penetrační hyfa se schopností proniknout průduchovou štěrbinou do vnitřního pletiva listu (Sedlářová a Lebeda, 2002). Intercelulární mycelium v mezofylu se postupně rozrůstá a vytváří primární a sekundární vezikuly a následně haustoria (Lebeda, 1989b). Během 5-7 dnů po napadení patogenem vyrůstají z průduchů na spodní straně listů sporangiofory (Cohen, 1981). 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 sklenicích. 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 (Bedlan, 1989), Izraeli (Cohen et al., 2003), Indii (Mahrisi a Siradhana, 1984; Singh a Sokhi, 1989), Iránu (Zaker a Ommati, 1991) a v Číně (Zhang et al., 2006). 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 et al., 2006a). Výsledkem je odpočívající oospóra, která je tlustostěnná, schopna přezimovat. Po přezimování oospóra 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 má několik fází. Cyklus začíná tvorbou sporangioforů a zoosporangií, následnou diseminací (uvolňování, šíření a depozice zoosporangií) a poté přímou infekcí (klíčení, penetrace a kolonizace) (Lebeda, 1989b). *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 expresi symptomů (Lebeda, 1986c, 1990).

3.2.3 Symptomatologie *P. cubensis*

Podle příznaků napadení, které se u *P. cubensis* vyskytují zejména v oblasti listové čepele, se jedná o typického foliolárního patogena. Ostatní části rostliny jsou napadány jen zřídka, např. u druhu *C. melo* byly sporangiofory napadeny i stonky, řapíky a květní stopky (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 Widrlechner, 2003). Hlavní symptomem je tzv. angulární skvrnitost, kdy se na svrchní straně listů objeví světle žluté olejovité skvrny, které jsou ohraničeny listovou žilnatinou (Lebeda, 1986a). 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 ohraničeny listovou žilnatinou a jsou kruhové a nepravidelné. Rozdíl 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).

3.2.4 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 být použita i gutační kapka. Pokud v průběhu klíčení dojde k osušení listů (cca 10-15 minut), může dojít k ukončení fáze klíčení a následné penetrace (Cohen, 1981; Lebeda, 1990). 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 adhezi 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 sporangií/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 patří k dalším fázím infekčního cyklu, která 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 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 sporangii, 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).

Šíření zoosporangii je nejvíce ovlivňováno vzdušnou vlhkostí a povrchem listů, oproti tomu mají teplota a světlo zanedbatelné vlivy. Optimální je nízká vzdušná vlhkost a suché povrchy listů (Cohen, 1981). Pro šíření je důležitá anemochorie, která je primárním a hlavním zdrojem disperze. Pomocí větru jsou spory roznášeny až na vzdálenosti několika set kilometrů. Dochází tedy k šíření *P. cubensis* i do míst, kde by jinak sama nepřežila nepříznivé období (Lebeda, 1986a, 1990). Díky přenosu větrem byly zaznamenány i velmi silné infekce v jižním Švédsku a Finsku (Forsberg, 1986; Tahvonen, 1985). Druhým způsobem šíření infekce je hydrochorie, jedná se však pouze o přenos na krátkou vzdálenost, většinou jenom mezi porosty tykvovitých (Lebeda, 1990).

3.3 Hostitelský okruh

Hostitelský okruh *P. cubensis* je představován pouze čeledí Cucurbitaceae (Lebeda and Widrechner, 2003). Tato čeleď je relativně velká a mezi hostitele *P. cubensis* patří cca 60 druhů z 20 rodů na základě výsledků z umělých inokulací a sledováním přirozeného výskytu (Lebeda, 1992, 1999). 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 and Widrechner, 2003).

U rodu *Cucumis* je známo nejvíce hostitelských druhů tohoto patogena. Druhy *Cucumis sativus* a *C. melo*, společně s cca osmi planě rostoucími druhy *Cucumis* jsou známy jako přirození hostitelé *P. cubensis* (Lebeda and Widrechner, 2003). Mezi další časté hostitele *P. cubensis* patří rod *Cucurbita* (tykev), a z tohoto rodu jsou tyto: *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 Widrechner, 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 druh *L. siceraria*, která je jedinou pěstovanou kulturní plodinou 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).

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* 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. Avšak v posledních letech byly ojediněle zaznamenány infekce také na *C. melo* a *Cucurbita moschata* (Pavelková et al., 2011).

V roce 2008 byla poprvé pozorována infekce *P. cubensis* na druhu *Bryonia dioica* (posed dvoudomý), víceletá rostlina z čeledi Cucurbitaceae (Runge and Thines, 2008). *B. dioica* využívá své úponky k lezení po plotech a stromech (zejména v lužních lesích), pochází původem z teplejší Evropy. Výsledky této 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 od pana prof. Lebedy (26/01, 39/01 – Olomouc), ukázaly, 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. Na základě výsledků této studie podporuje *B. dioica* hypotézu, že 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 et al., 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 změnily 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 et al., 2011).

Zdá se tedy, že v posledních letech dochází u tohoto patogenu k rozšíření jeho hostitelského okruhu.

Tabulka 1. Hostitelský okruh *P. cubensis* v České republice v letech 2001-2009 (Lebeda et al., 2011).

Host plant	Year no. of monitored locations/locations with infected crops								
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>Cucumis sativus</i>	102/98	91/90	87/87	96/63	83/77	93/65	66/62	65/63	92/91
<i>Cucumis melo</i>	0/0	0/0	7/1	2/1	2/0	1/0	1/0	1/0	2/1
<i>Cucurbita pepo</i>	71/0	91/0	68/0	100/0	60/0	82/0	69/0	49/0	77/0
<i>Cucurbita maxima</i>	27/0	34/0	38/0	36/0	36/0	23/0	38/0	32/0	41/0
<i>Cucurbita moschata</i>	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	2/0	3/1
<i>Citrullus lanatus</i>	0/0	2/0	3/0	7/0	5/0	4/0	12/0	2/0	4/0
<i>Lagenaria siceraria</i>	0/0	0/0	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Total	130/98	105/90	91/87	110/63	96/77	105/65	91/62	76/63	106/91

3.4 Geografické rozšíření *P. cubensis*

P. cubensis je dnes celosvětově rozšířena a její výskyt je zaznamenán prakticky všude, kde jsou pěstovány tykvovitě rostliny a to jak v polních podmínkách, tak také v krytých porostech. Nejoptimálnější podmínky pro tohoto patogena jsou uváděny v teplejších oblastech (především v tropech a subtropích), kde roční úhrn srážek překračuje 300-350 mm (Lebeda, 1986a,c, 1990).

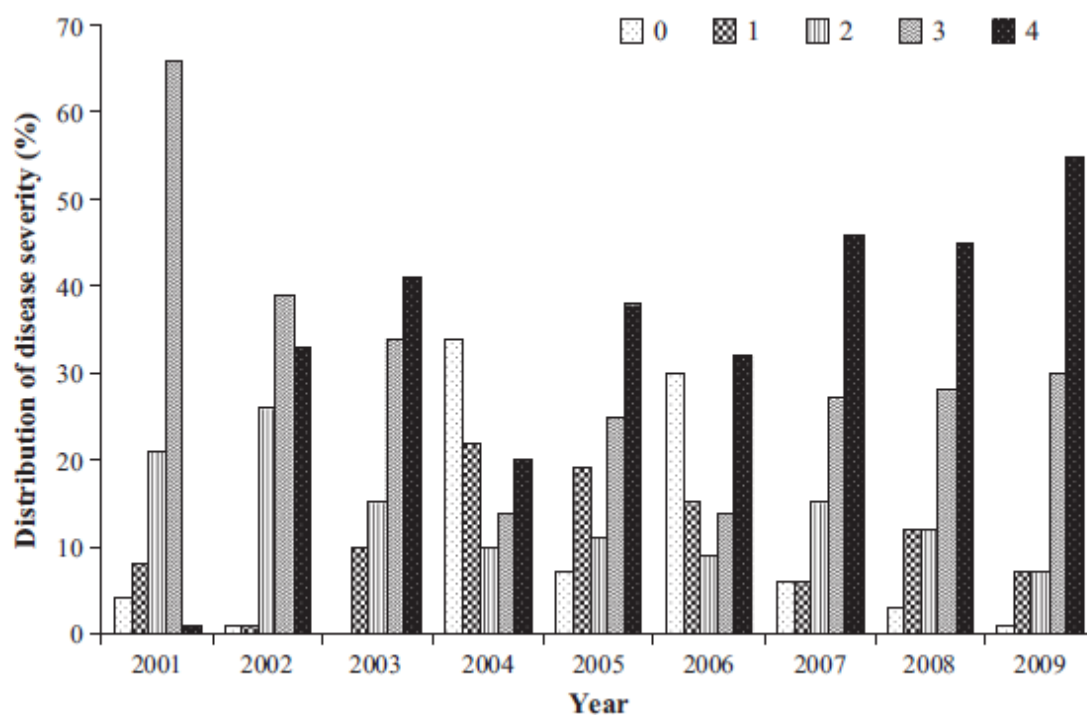
I přes kosmopolitní rozšíření *P. cubensis* lze nalézt u tohoto patogenu podstatné rozdíly ve vztahu k jednotlivým hostitelským rodům. Největší frekvence rozšíření *P. cubensis* je na rodu *Cucumis*. Napadení *C. sativus* je zaznamenáno ve více než 80 zemích světa, další významný druh *C. melo* se vyskytuje ve více než 50 zemích. Rod *Cucurbita* spp. má oproti rodu *Cucumis* relativně malé rozšíření. Zaujímá spíše lokální charakter, nálezy *P. cubensis* 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 objevili 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,

kteřou lze srovnat se situacemi v mnoha dalších oblastech světa (USA, Izrael, Japonsko, Indie) (Lebeda, 1986a; Lebeda a Prášil, 1993). Na rozdíl od těchto oblastí střední Evropy, se neobjevila *P. cubensis* na porostech *C. melo*, *C. lanatus* nebo *Cucurbita* spp. (Lebeda a Gadasová, 2002).

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 (Lebeda, 1986a,b; Zacha et al., 1985). Následující rok 1985 zaznamenal 80-90 % ztráty na výnosech okurek (Lebeda, 1991a). V letech 1986-1988 bylo napadení porostů okurek o něco menší než v roce 1985 z důvodů kvalitnějších ochranných opatření (Rod, 1990). V roce 1989 opět stouply ztráty na výnosech až na 80 % (Lebeda, 1991a). Ve všech 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, 1986a,b). 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, 2005a,b, 2007).

Graf 1. Frekvence intenzity napadení *P. cubensis* v České republice v letech 2001-2009 (Lebeda et al., 2011).



3.5 Hostitel

Hostitel je organismus, který přechovává jiný buněčný nebo nebuněčný organismus (patogen), který je na něm částečně nebo úplně závislý. Pro patogena představuje hostitel stanoviště, zdroj živin i energii potřebnou pro přežití. Ve většině případů je hostitel postižen mnoha změnami, zejména morfologickými, anatomickými i metabolickými (Lebeda, 1989).

3.5.1 Taxonomie a význam čeledi Cucurbitaceae

Čeď Cucurbitaceae patří mezi cévnaté rostliny z oddělení Magnoliophyta, třídy Rosopsida, z řádu Cucurbitales a zahrnuje přes 825 druhů v 118 rodech (Lebeda a Widrlechner, 2003). V přírodních podmínkách bylo prokázáno napadení cca 60 druhů a 20 rodů (Lebeda, 1992b, 1999). Tyto popínavé byliny jsou charakteristické úponky a jednopohlavnými květy v úžlabních květenstvích. Rostliny obsahují látky zvané kukurbitaciny, které způsobují hořkou chuť. V České republice není žádný druh z čeledi Cucurbitaceae původní. 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 (Hejný et al., 1990; Jahodář, 2006).

3.5.2 Původ a charakteristika zástupců čeledi Cucurbitaceae

i) *Cucumis* spp.

Rod zahrnuje přes 30 planě rostoucích druhů pocházejících zřejmě z aridních a semiaridních oblastí Afriky a dva druhy hojně pěstované, *C. sativus* L. (okurka) a *C. melo* L. (cukrový meloun), které pravděpodobně pocházejí z indického genového centra (Lebeda et al., 2007). *C. sativus* je asijského původu. Je to jednoletá bylina s jednopohlavnými žlutými květy, které jsou většinou pětičetné a květní obal je rozlišen na kalich a korunu. Pestík má spodní semeník a tyčinky navzájem srůstají. Listy jsou trojúhelníkovitého tvaru a na řapíku i čepeli se vyskytují chlupy i trichomy. Z lodyhy vyrůstají úponky a ostny. Plodem je bobule (Hejný et al., 1999). *C. melo* je liší zejména plodem, který může vážit okolo 1-3 kg a velikostí a tvarem listů od předešlého druhu.

ii) *Cucurbita* spp.

Rod zahrnuje asi 14 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 (Lebeda et al., 2007). Jedná se o tzv. tykve, které jsou charakteristické svým zbarvením a tvarem plodu, které obsahují až 90% vody (Táborský,

1998). Jedná se o jednoleté popínavé byliny podobné rodu *Cucumis*. Vytváří velkou listovou růžici a z jejího středu narůstají dlouze řapíkaté, dlanitě dělené listy (Hejný et al., 1999). *C. pepo* (tykev obecná) patří mezi nejstarší kulturní plodinu, jejíž semena jsou dochována z období 5000 př.n.l. a pochází ze střední Ameriky (Táborský et al., 1998). *C. fraterna* byla nově objevena na několika místech v severovýchodním Mexiku na začátku roku 1980 (Nee, 1990). *C. maxima* (tykev obrovská) pochází pravděpodobně z Peru, kde se pěstovala již kolem roku 1200 př.n.l. (Táborský et al., 1998).

iii) Ostatní hostitelské rody

Rod *Citrullus* zahrnuje čtyři druhy, z nichž nejznámější je *C. lanatus* (Thunb.) (vodní meloun), který pochází ze savan a pouští tropické a jižní Afriky. První údaje jsou známé z Egypta kolem roku 2000 př.n.l. Stonek je poléhavý, dlouhý až 2m a z něhož vyrůstající listy jsou střídavé, v obryse široko vejcovité až trojúhelníkovité s velmi hlubokými zářezy na čepeli (Hejný et al., 1999). Plod je tvořen uvnitř červenou vodnatou dužninou a zelenou kůrkou na povrchu.

Rod *Benincasa* je reprezentován pouze jediným druhem *Benincasa hispida* (Thunb.) (tykev vosková), pocházejícím z jihovýchodní Asie, zřejmě ze Sundských ostrovů. Lodyha je velice huňatá a voní pižmem. Listy mají dlanitoklanný tvar s pilovitým okrajem. Povrch plodu je pokryt modrobílou voskovou vrstvou (http://www.rostliny.net/rostlina/Benincasa_hispida).

Rod *Luffa* zahrnuje sedm druhů, z nichž dva druhy *L. acutangula* (L.) Roxb. a *L. cylindrica* (L.) M. J. Roem. jsou kultivované. *L. cylindrica* pochází z tropů Starého světa, pravděpodobně z Arábie a Egypta (<http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?373>).

Rod *Lagenaria* pochází z Afriky a je reprezentován šesti druhy, z nichž pouze druh *L. siceraria* (Molina) Standl. (tykev láhvovitá) je kulturní plodinou. Listy jsou nedělené, srdčité a květy s korunami bílými, teprve později žloutnoucími (<http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?60>).

3.6 Interakce hostitel-patogen

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 kvalifikačních 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 (náchylnost), která se projevuje parazitismem, případně patogenismem nebo inkompatibilita (odolnost), kdy se interakce neprojevuje, případně jen minimálně (Lebeda, 1989a).

V rámci vnitrodruhové variability jsou rozeznávány xenopatické skupiny, vyjadřující různé hladiny specifčnosti interakcí mezi populací určitého fytopatogenního organismu a populací jeho hostitele. Na úrovni druhu jsou popisovány specializované formy (forma specialis) (FBPP, 1973). 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). Nejpřesnějším pojmem při hodnocení interakce hostitele a patogena je biotyp. Jde o výhradně genetický pojem. Biotopem, jsou označováni jedinci se stejnou genetickou konstitucí (FBPP, 1973; Rieger et al., 1976). U hostitele jde o klony nebo čisté linie vzniklé samoopylením, u patogena jsou to jedinci vzniklí z jedné spory nebo buňky (Király et al., 1970).

Je-li rostlina inokulovaná potenciálním infekčním agens, může nebo nemusí dojít k infekci. Rezistence a náchylnost 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 nezpůsobitelný odolat nebo klást odpor škodlivému patogennímu faktoru, případně překonat jeho následky (FBPP, 1973). Pro charakteristiku reakcí hostitele, které rozhodují o tom, zda se přítomnost patogena projeví 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 (FBPP, 1973). Citlivost (senzitivita, zranitelnost) je neschopnost infikovaného hostitele snášet činnost patogenního organismu bez více nebo méně silné reakce, což vyústí ve vznik různě silných symptomů a poškození (FBPP, 1973). Produkce různých iritantů zde má za následek dysfunkci rozhodujících metabolických pochodů a fyziologických funkcí (Lebeda, 1989).

3.6.1 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).

Virulenci 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 je 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 nespecifickou rezistencí (Lebeda, 1989).

3.6.2 Patogenní variabilita *P. cubensis*

P. cubensis naznačuje rozsáhlou vnitrodruhovou variabilitu v patogenitě jako ostatní fytopatogenní organismy ze skupiny Oomycota, zejména z čeledi Peronosporaceae (Thomas et al., 1987; Lebeda et al., 2006c; Lebeda and Schwinn, 1994). První informace o patogenní variabilitě *P. cubensis* byly získány ve 40. letech 20. století v Japonsku (Iwata, 1941), později byla tato problematika rozpracována v Izraeli, Indii, Japonsku a USA (Cohen, 1976; Hughes and van Halteren, 1952; Bains and Sharma, 1986; Inaba et al., 1986; Thomas et al., 1987). 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 and Cohen, 2011).

3.6.2.1 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 and 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 et al., 2006b).

3.6.2.2 Patotypy

Patotypy *P. cubensis* jsou fyziologické formy, které se od sebe navzájem liší hostitelskou specifitou 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 and Cohen, 2011).

Pro popis patogenní variability byly vytvořeny diferenční soubory čeledi Cucurbitaceae, díky kterým jsou determinovány patotypy *P. cubensis*. První obecně uznávaný diferenční soubor byl soubor Thomas et al. a obsahoval 6 diferenčních genotypů z rodů *Cucumis*, *Cucurbita* a *Citrullus* (Thomas et al., 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. Autoři je označili jako „patotyp 1-5“ podle vzrůstajícího počtu virulentních (kompatibilních) reakcí. Patotyp 1 byl kompatibilní pouze s jedním diferenčním genotypem, zatímco patotyp 5 se všemi šesti diferenčními genotypy. Na základě totožného diferenčního souboru byl popsán v roce 2003 patotyp 6 z Izraele (Cohen et al., 2003). Soubor

Thomas et al. měl i přes to vše několik nevýhod, některé genotypy nebyly přesně definovány na úrovni druhové ani genotypové.

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 Widrlechner, 2003). Soubor je založen na souboru Thomas et al. 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) (Lebeda a Zinkernagel, 2003).

Studie o geografické distribuci patotypů *P. cubensis* jsou známy kromě České republiky (Lebeda et al, 2011) z Japonska, Izraele (Cohen et al., 2003) a USA (Colucci, 2008). 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 Widrlechner, 2003) a bylo rozlišeno 13 různých patotypů. Tyto determinované patotypy byly odlišné od patotypů 1-5 popsáných Thomas et al. (1987). Pouze jeden izolát korespondoval s patotypem 1. Patotypová struktura populace *P. cubensis* vykazuje celosvětově posun k vyšší patogenitě a vysoké variabilitě v závislosti na dané zemi, kde je patogenní variabilita tohoto patogenu studována (Lebeda and Cohen, 2011).

Tabulka 2. Přehled známých dat o determinaci patotypů *P. cubensis* v různých zemích světa (Lebeda et al., 2006).

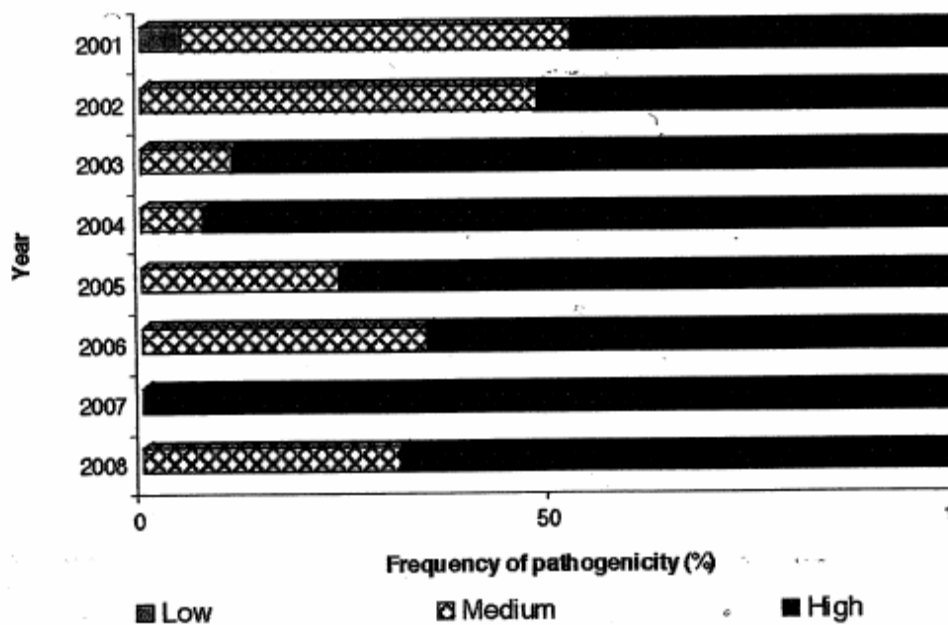
Kategorie patogenity	Patotyp	
Země	Dostupná data	Literatura
Čína	?	
Česká republika	+	Lebeda (1999); Lebeda a Gadasová (2002); Lebeda a Urban (2004); Lebeda et al. (2006); Lebeda a Widrlechner (2003); Lebeda a Widrlechner (2004)
Bulharsko	+?	Angelov et al. (2000)
Indie	+	Bains a Sharma (1986)
Izrael	+	Cohen et al. (2003); Thomas et al. (1987)
Japonsko	+	Thomas et al. (1987)
Polsko	?	
USA	+	Shetty et al. (2002)
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 2001-2008 bylo zanalyzováno 317 izolátů a rozlišeno 65 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 (Lebeda et al., 2010).

Graf 2. Úrovně patogenity u populace *P. cubensis* v České republice v letech 2001-2008 (Lebeda et al., 2010).



Celosvětový problém 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.

3.6.2.3 Fyziologické rasy

Fyziologické rasy, zejména u třídy Oomycetes a hub z říše Fungi, se vyznačují specializací na různé kultivary jednoho druhu hostitele. Rasa je definována jako biotyp (skupina biotypů) uvnitř druhu, lišící se od jiných biotypů (skupin biotypů) fyziologickými charakteristikami, včetně virulence (Lebeda, 1989). Rasy byly popsány také u interakcí *P. cubensis* s čeledí Cucurbitaceae (Lebeda a Widrechner, 2003; Lebeda and 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 existence fyziologických ras na druzích *Cucumis melo* (Thomas et al., 1987; Lebeda, 1991), *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 diferenační soubor genotypů pro jednotlivé hostitelské druhy, případně rody (Lebeda et al., 2006b).

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

Tabulka 3. Přehled známých dat o determinaci ras *P. cubensis* v různých zemích světa (Lebeda et al., 2006).

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

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

3.6.2.4 Variabilita hostitele 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 hostitelského okruhu druhů z čeledi Cucurbitaceae jednoznačně převažuje exprese inkompatibility/kompatibility, ale lze pozorovat i heterogenní reakce a neúplnou rezistenci (Lebeda a Widrlechner, 2003; Lebeda et al., 2006). 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.

i) *Cucumis* spp.

C. sativus je vysoce náchylná odrůda a neobsahuje dostačující zdroje rezistence vůči *P. cubensis*. Geneticky je málo variabilní a nevykazuje rasově specifické interakce. V diferenačním

souboru se druh *C. sativus* odrůda Marketer používá jako silně náchylná kontrola (Lebeda, 1991b, 1999; Lebeda a Widrlechner, 2003; Lebeda a Urban, 2004).

C. melo je geneticky velmi variabilní druh a je u něj velice dobře prozkoumána rasová specifičnost a efektivní zdroje rezistence. U druhu *C. melo* je časté vzájemné křížení a výrazný polymorfismus (Thomas et al., 1987). V diferenciačním souboru je druh zastoupen 3 genotypy ze 3 taxonů, *C. melo* subsp. *melo*, *C. melo* var. *conomon* a *C. melo* var. *acidulus* (Lebeda a Widrlechner, 2003, Lebeda et al., 2006).

ii) *Cucurbita* spp.

Rod *Cucurbita* je velmi variabilní a je u něj hojně rozšířena rasově specifická rezistence (Lebeda et al., 2006). V diferenciačním souboru je rod zastoupen čtyřmi druhy.

C. pepo je známa svou výraznou rasovou specifičností a jejími rozdílnými reakcemi subspecií, botanických variet a kultivarů na izoláty *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003). Rozdíly v rezistenci/náchylnosti k patogenu byly zjištěny mezi jednotlivými morfotypy *C. pepo* (skupiny genotypů s určitým typickým tvarem plodů) (Lebeda a Křístková, 2000). Diferenciační soubor v sobě zahrnuje druh *C. pepo* var. *pepo* a *C. pepo* var. *texana* (Lebeda a Widrlechner, 2003).

C. fraterna a *C. maxima* jsou také součástí diferenciačního souboru.

iii) *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 specifita, proto je součástí původního (Thomas et al., 1987), ale i současného diferenciačního souboru (Lebeda et al., 2006; 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 and Cohen, 2010).

U druhů *L. acutangula* a *L. cylindrica* je známa patotypová i rasová specifita (Lebeda and 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 specifičnost k *P. cubensis* (Lebeda a Widrlechner, 2003). Je také vysoce náchylný k evropským izolátům, oproti genotypu ze souboru Thomase et al. (1987), kde byla zaznamenána rezistence k testovaným izolátům (Lebeda a Gadasová, 2002).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

K determinaci patotypů jednotlivých izolátů *P. cubensis* byl použit diferenční soubor, který zahrnoval 12 genotypů čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003). Tento diferenční soubor se skládá z šesti rodů a devíti druhů této čeledi, jejichž přehled je uveden v tabulce 4. Osivo genotypů tohoto souboru je uchováváno ve sbírce semen Fytopatologické laboratoře katedry botaniky PřF UP v Olomouci (Křístková a Lebeda, 1995). Podrobný popis jednotlivých diferenčních druhů tohoto souboru lze nalézt v databázi EVIGEZ (http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/1_evigez_c.htm).

Tabulka 4. Přehled diferenčního souboru čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003).

Číslo	Druh	Číslo genového zdroje	EVIGEZ	Název (odrůda)	Země původu
1	<i>Cucumis sativus</i>		H39-00121	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		?

4.1.1 Předpěstování rostlin

Výsev rostlin diferenčního souboru probíhal měsíc a půl před samotným testováním (cca 10 semen daného genotypu na 1 kelímek). Semena v umělohmotných kelímcích s perlitem vyrostla v semenáčky během 10 – 14 dnů od výsevu. Semenáčky byly poté přesazeny do květináčů se substrátem (zahradní zemina s rašelinou v poměru 1:1) po 3-4 rostlinách v jednom květináči. Květináče pak byly umístěny do skleníku za standardních podmínek, regulované teploty (denní 25°C, noční 15°C), každodenní zálivce, hnojeny jednou týdně hnojivem Kristalon, chemicky neošetřeny

(obr. 4). Pro testování byly použity rostliny 6-8 týdnů staré ve stádiu 3. pravého listu (Lebeda et al., 2010).

4.2 Izoláty *P. cubensis*

V této bakalářské práci byla otestována patogení variabilita u 44 izolátů *P. cubensis*, sbíraných v roce 2009 na území České republiky. Většina z těchto izolátů (95 %) byla získána z přirozeně infikovaných porostů *Cucumis sativus*. Pouze dva izoláty pocházely z jiných hostitelů, izolát 88/09 z tykve muškátové (*Cucurbita moschata*) a 89/09 z melounu cukrového (*Cucumis melo*). Přehled všech testovaných izolátů se základními informacemi o jejich původu je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Původ izolátů *P. cubensis* použitých pro determinaci patogení variability v roce 2009.

Číslo izolátu	Kraj	Okres	Lokalita	Stanoviště	H.R.	CH.O. +pozn.	Stupeň napadení	Datum sběru
1/2/09	Jihomoravský	BV	Lednice	Pole	CS	postřik	3	15.7.09
4/09	Královéhradecký	RK	Opočno	Zahrada	CS	nz	3	21.7.09
6/09	Olomoucký	OL	Olomouc-Nedvězí	Pole	CS	nz	3	11.8.09
9/09	Olomoucký	PV	Mostkovice	zahrada kolonie -	CS	nz	4	11.8.09
11/09	Olomoucký	PV	Otinoves	zahrada	CS	nz	1	11.8.09
13/09	Jihomoravský	BK	Lipovec	zahrada kolonie -	CS	nz	3	11.8.09
15/09	Jihomoravský	BK	Křtiny	zahrada kolonie -	CS	nz	4	11.8.09
18/09	Jihomoravský	BO	Silůvky	zahrada	CS	nz	2	11.8.09
20/09	Jihomoravský	BO	Ivančice	zahradnictví	CS	nz	4	11.8.09
22/09	Jihomoravský	ZN	Moravský Krumlov	pole	CS	sviluška	3	11.8.09
24/09	Jihomoravský	ZN	Dobelice	pole	CS	postřik	3	11.8.09
27/09	Jihomoravský	ZN	Prosiměřice	zahrada	CS	nz	1	11.8.09
29/09	Jihomoravský	ZN	Lechovice	pole	CS	nz	4	11.8.09
31/09	Jihomoravský	HO	Čejkovice	pole	CS	nz	4	13.8.09
33/09	Jihomoravský	HO	Čejč	pole	CS	nz	4	13.8.09
35/09	Jihomoravský	HO	Ratiškovice	pole	CS	nz	4	13.8.09
36/09	Jihomoravský	HO	Strážnice	zahrada	CS (D)	nz	3	13.8.09
38/09	Jihomoravský	HO	Vnorovy (přejezd)	pole	CS	nz	4	13.8.09
40/09	Zlínský	UH	Uherský Ostroh	zahrada	CS	nz	3	13.8.09
42/09	Zlínský	ZL	Napajedla	zahrada	CS	nz	4	13.8.09
44/09	Zlínský	KM	Trávník	zahrada	CS	nz	4	13.8.09
46/09	Zlínský	KM	Postoupky	pole	CS	nz	4	13.8.09

48/09	Olomoucký	PR	Tovačov-Annín	zahrada	CS (D)	nz	3	13.8.09
50/09	Jihomoravský	HO	Mutěnice	pole	CS (N)	nz	4	13.8.09
51/09	Pardubický	SY	Sedliště	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
52/09	Pardubický	SY	Bohuňovice	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
53/09	Pardubický	UO	České Heřmanice	zahrada	CS	nz	4	20.8.09
55/09	Pardubický	UO	Kosořín	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
58/09	Královehradecký	RK	Černá nad Orlicí - Velká Černá	zahrada	CS	nz	4	20.8.09
60/09	Královehradecký	RK	Albrechtice nad Orlicí	zahrada	CS (D)	nz	4	20.8.09
61/09	Královehradecký	HK	Třebechovice pod Orebem	zahrada	CS	nz	4	20.8.09
62/09	Královehradecký	RK	Ledce	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
66/09	Královehradecký	NA	Bohuslavice	pole	CS	nz	4	20.8.09
69/09	Královehradecký	TU	Vilantice	zahrada	CS	nz	4	20.8.09
71/09	Královehradecký	JC	Konecchlumní	zahrada	CS (D)	nz	3	20.8.09
75/09	Středočeský	MB	Dolní Bousov	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
77/09	Středočeský	MB	Domousice	zahrada	CS	nz	4	20.8.09
81/09	Středočeský	MB	Vlkava	zahrada	CS	nz	3	20.8.09
83/09	Středočeský	NB	Lysá nad Labem	předzahrádka - sídliště	CS	nz	3	20.8.09
85/09	Olomoucký	OL	Olomouc-Holice	pole	CS	ne	4	20.8.09
86/09	Moravskoslezský	BR	Dolní Moravice	zahrada	CS	nz	4	23.8.09
87/09	Moravskoslezský	NJ	NJ-Kojetín	zahrada	CS (N)	ne	3	6.9.09
88/09	Moravskoslezský	NJ	NJ-Kojetín	zahrada	Cmosch	ne	1	18.9.09
89/09	Olomoucký	OL	Olomouc-Holice	pole	Cme	ne	1	21.9.09

H.R. – hostitelská rostlina; CH.O. – chemická ochrana;

CS – *Cucumis sativus*; Cmosch – *Cucurbita moschata*; Cme – *Cucumis melo*;

CH.O. – chemická ochrana (použité fungicidy): N – Novozir; D – Dithane, nz – nebylo zjištěno;

BV – Břeclav, BK – Blansko, BO – Brno-venkov, ZN – Znojmo, HO – Hodonín, OL – Olomouc, PV – Prostějov, PR – Přerov, UH – Uherské Hradiště, Zlín – Zlín, KM – Kroměříž, BR – Bruntál, NJ – Nový Jičín, SY – Svitavy, UO – Ústí nad Orlicí, RK – Rychnov nad Kněžnou, HK – Hradec Králové, NA – Náchod, TU – Trutnov, JC – Jičín, MB – Mladá Boleslav, NB – Nymburk.

4.2.1 Izolace a uchování *P. cubensis*

Při sběrových expedicích byly infikované listy dávány do umělohmotných misek (100 x 85 x 45 mm) (Urban, 2006) s uzavíratelným víčkem, které byly předem opatřeny vlhkou vrstvou buničité vaty a filtračního papíru. Listy se pokládaly spodní stranou nahoru, protože sporangiofory se objevují zejména tam. Takto zpracované vzorky byly po dobu 2 – 3 dnů ponechány ve fytotronu a bylo kontrolováno, zda na nich již došlo ke sporulaci patogenu.

Poté byla část infikovaného listu každého vzorku, kde se vytvořilo ložisko, vystřižena pomocí sterilních nůžek a přenesena do zkumavky s destilovanou vodou. Ve zkumavce s destilovanou vodou

byly spory z listu smyty a pomocí třepačky bylo zajištěno promíchání vzniklého inokula. Použitý list byl pomocí pinzety odstraněn a získané inokulum sloužilo k očkování. Inokulum bylo za pomoci skleněného rozprašovače rozstříkáno na abaxiální stranu listů rostliny *Cucumis sativus* odrůdy Marketer 430.

Petriho misky s izoláty byly poté uloženy do fytotronu, kde byla zajištěna 12 hodinová fotoperioda s teplotou 18 °C ve světelné fázi a 15 °C v temnostní fázi. Prvních 24 hodin byly naočkované listy uchovány ve tmě. Doba kultivace trvá přibližně 6-8 dní. V případě nedostatečného množství sporangioforů se musely izoláty znovu přeočkovat.

Připravené vzorky čisté kultury *P. cubensis* mohou být použity přímo k testování nebo mohou být po dobu půl roku uchovány při -80 °C (Lebeda et al., 2010).

4.3 Determinace patogenní variability

4.3.1. Metoda listových disků

Pro testování patogenní variability (determinaci patotypů) studovaného souboru izolátů *P. cubensis* byla použita terčíková metoda (Lebeda, 1981; Lebeda et al., 2010). Nejprve jsou z listů dospělých rostlin (ve stádiu 3.-4. pravého listu) každého z 12 genotypů z čeledi Cucurbitaceae (Lebeda a Widrlechner, 2003) udělány korkovrtem terčíky, které jsou o průměru 14 mm. Každý genotyp je tedy představován 5 disky ve třech opakováních. Takto připravené terčíky byly ukládány abaxiální (svrchní) stranou nahoru do předem připravených plastových táčů s navlhčeným filtračním papírem a buničinou (Lebeda and Urban, 2010) (obr. 5, 6).

Terčíky byly následně inokulovány inokulem o hustotě cca 10^5 spor/ml pomocí skleněného rozprašovače, kterým bylo zajištěno rovnoměrné rozstříkání spor na listové disky jednotlivých diferenciacních genotypů.

Po inokulaci byly misky s listovými disky překryty skleněným krytem a byly umístěny do fytotronu. Prvních 24 hodin byly misky 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.

4.3.2 Metody hodnocení

Hodnocení sporulace na inokulovaných discích se provádí ve dvoudenních intervalech 6. až 14. den po inokulaci, tzn. celkem 5x během tohoto období (Lebeda, 1982; Lebeda et al., 2010).

Kvantitativní metody hodnocení:

Tento typ metod je vhodný, pro stanovení intenzity napadení a poskytuje přesnější informace o vztahu hostitele a patogenu. Hodnotí se kolik % listu (v našem případě listového disku) je pokryto myceliem patogenu a používá se následující pětibodová stupnice (Lebeda, 1986c; Lebeda et al., 2010) (obr. 7):

- 0 – bez sporulace
- 1 – < 24,9 % plochy disku pokryto sporangiofory
- 2 – > 25 a < 49,9 % plochy disku pokryto sporangiofory
- 3 – > 50 a < 74,9 % plochy disku pokryto sporangiofory
- 4 – > 75 % plochy disku pokryto sporangiofory

Souhrnná hodnota intenzity sporulace se vyjadřuje jako procento maximální možné sporulace a pomocí následujícího vzorce navrženého Townsendem a Heubergerem (1942) se vypočítává celkový stupeň napadení:

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

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 metody hodnocení:

Tyto metody jsou založeny na hodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti choroby (náchylnosti nebo rezistenci hostitelské rostliny) (Lebeda, 1982). Toto hodnocení je prováděno s využitím bodové stupnice (Lebeda, 1986c, 1991),

- + náchylná reakce, více než 35 % povrchu disku pokryto sporangii patogena
- rezistentní reakce, kdy je ≤ 35 % (včetně) plochy disku pokryto sporulujícím myceliem

4.4 Tetrádový kód pro popis patotypů *P. cubensis*

S nově vytvořeným diferenačním souborem 12 genotypů z čeledi Cucurbitaceae byl navržen také nový způsob popisu (značení) patotypů (Lebeda a Widrlechner, 2003), který vychází ze systému navrženého v roce 1994 Limpertem a Müllerem. Binární výsledky (+,-) vyplývající ze screeningu

listových disků infikovaných *P. cubensis* jsou převedeny do tetradového kódu na základě seskupení genotypů celého diferenčního souboru. Tento kód se skládá ze tří částí oddělených tečkou.

Každá část koresponduje s modelem výsledků ze zmíněných tří skupin stanovených na základě rodů v diferenčních souboru a čtyř diferenciálů – samotných druhů (poddruhů a variet). Každému diferenciálu je přiřazena číselná hodnota 1, 2, 4, 8. Výsledné číslo každé skupiny je dáno součtem těch hodnot diferenciálu 1, 2, 4, a 8, u kterých byla zjištěna náchylná reakce. Výsledkem jsou tři součty jako numerický kód v následujícím formátu (součet skupiny 1 – součet skupiny 2 – součet skupiny 3), což je předkládáno jako identifikační číslo každého patotypu (tabulka 6). Toto číselné složení jednoznačně vystihuje jeho patogenitu a rovněž numericky popisuje příslušný patotyp (Lebeda a Widrechner, 2003).

Tabulka 6. Příklad převedení binárních výsledků testovaných izolátů *P. cubensis* dle tetradového kódu (Lebeda a Widrechner, 2003).

	Skupiny dif. genotypů	1. <i>Cucumis</i> spp.				2. <i>Cucurbita</i> spp.				3. ostatní Cucurbitaceae				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	
Izoláty <i>P. cubensis</i>	1/2/09	1	2	4	0	0	2	0	0	0	2	0	8	7.6.10
	4/09	1	2	4	8	0	2	4	0	0	2	0	8	15.2.10
	6/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11

Pozn.: Číslo diferenčního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenčním souboru viz. tabulka 1.

4.5 Stanovení úrovně patogenity

Úroveň patogenity je dána počtem virulentních reakcí, tzv. počtem patogenních faktorů (stupňů). Podle této charakteristiky lze rozlišit hladinu patogenity u zkoumaných patotypů na nízkou, střední a vysokou, viz tabulka 7.

Tabulka 7. Úroveň patogenity podle stupňů patogenity (Lebeda a Urban, 2004b; Lebeda et al., 2010).

Úroveň patogenity	Stupeň patogenity
Nízká	1 – 4
Střední	5 – 8
Vysoká	9 – 12

5 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo determinovat patogenní variabilitu 44 izolátů *P. cubensis* získaných v roce 2009 na území České republiky. Z celkového počtu 44 izolátů *P. cubensis* pocházelo 63,6 % z Moravy, a to z těchto krajů: Jihomoravského (15 izolátů), Olomouckého (6 izolátů), Zlínského (4 izoláty) a Moravskoslezského (3 izoláty). Zbývajících 36,4 % bylo z Čech z kraje Královehradeckého (8 izolátů), Pardubického (4 izoláty) a Středočeského (4 izoláty).

U izolátů *P. cubensis* byly zkoumány tyto hlediska:

1. Patogenní variabilita izolátů *P. cubensis*;
2. Patotypy *P. cubensis* ve vztahu k jejich geografickému původu;
3. Odolnost a náchylnost genotypů diferenciacního souboru.

5.1 Patogenní variabilita izolátů *P. cubensis*

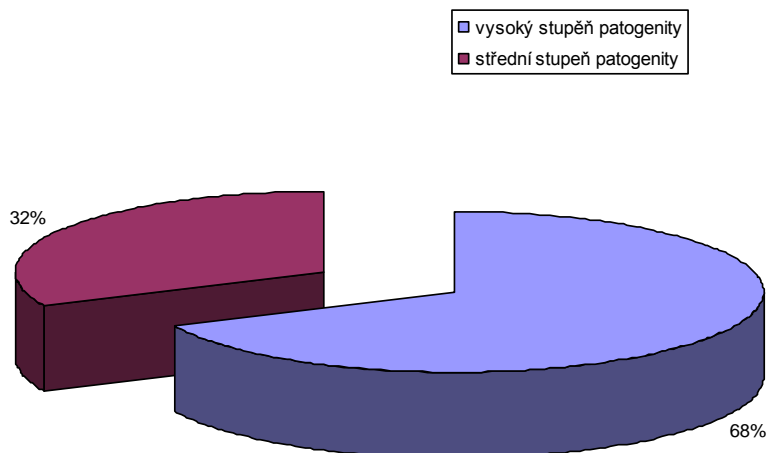
Na základě vyhodnocení reakcí testovaných izolátů *P. cubensis* s genotypy diferenciacního souboru byly pozorovány rozdíly v patogenitě.

Úroveň patogenity resp. virulence je dána počtem kompatibilních reakcí na genotypech diferenciacního souboru a je popsána v kapitole 4.5. Výsledky testování úrovně patogenity izolátů jsou znázorněny v grafu 3 a tabulce 8. V roce 2009 byla většina izolátů (68%) vysoce patogenní tzn. patřily do skupiny izolátů s počtem patogenních faktorů (9 – 12) a 14 izolátů (32%) vykazalo střední patogenitu (5-8 faktorů patogenity). Žádný z testovaných izolátů nepatřil do kategorie nízké patogenity.

Skupinám izolátů *P. cubensis* s odlišnou patogenitou byly za pomoci tetradového kódu a počtu kompatibilních reakcí přiřazeny kódy (tabulky 8 a 9). Metodika kódování patotypů je uvedena v kapitole 4.4.

Determinované patotypy z roku 2009 spolu s inkompatibilními reakcemi k určitým genotypům diferenciacního souboru jsou zobrazeny v tabulce 10. Z celkového počtu 44 studovaných izolátů *P. cubensis* bylo rozlišeno 14 patotypů.

Graf 3. Procentuální vyjádření stupně patogenity sledovaných izolátů *P. cubensis* v roce 2009.



Tabulka 8. Úroveň patogenity izolátů *P. cubensis* v roce 2009.

Patotypy	Počet izolátů	Číslo izolátů
Nízká patogenita (1-4 patogenních faktorů)		
	0	-
Střední patogenita (5-8 patogenních faktorů)		
15.6.10	1	36/09
15.10.10	3	29/09, 53/09, 58/09
15.2.10	6	4/09, 15/09, 18/09, 24/09, 31/09, 38/09
7.6.10	1	01/2/09
7.10.10	1	35/09
15.2.2	1	42/09
4.15.0	1	88/09
Vysoká patogenita (9-12 patogenních faktorů)		
15.10.11	1	83/09
15.10.14	1	40/09
15.14.10	20	9/09, 11/09, 13/09, 20/09, 22/09, 27/09, 33/09, 48/09, 50/09, 51/09, 52/2/09, 55/09, 60/09, 61/09, 62/09, 66/09, 71/09, 75/09, 77/09, 81/09
15.14.14	1	44/09
15.14.11	5	6/09, 89/09, 69/09, 85/09, 86/09
15.14.15	1	46/09
15.15.11	1	87/09

Tabulka 9. Označení patotypů *P. cubensis* determinovaných v roce 2009 podle tetřádového kódu (Lebeda a Widrechner, 2003) na základě jejich reakcí na diferenční soubor.

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
1/2/09	1	2	4	0	0	2	0	0	0	0	2	0	8	7.6.10
4/09	1	2	4	8	0	2	4	0	0	0	2	0	8	15.2.10
6/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
9/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
11/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
13/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
15/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	8	15.2.10	
18/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	8	15.2.10	
20/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
22/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
24/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	8	15.2.10	
27/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.11	
29/09	1	2	4	8	0	2	0	8	0	2	0	8	15.14.11	
31/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	8	15.2.10	
33/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
35/09	1	2	4	0	0	2	0	8	0	2	0	8	7.10.10	
36/09	1	2	4	8	0	2	4	0	0	2	0	8	15.6.10	
38/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	8	15.2.10	
40/09	1	2	4	8	0	2	0	8	0	2	4	8	15.10.14	
42/09	1	2	4	8	0	2	0	0	0	2	0	0	15.2.2	
44/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	8	15.14.14	
46/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	4	8	15.14.15	
48/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
50/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
51/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
52/2/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
53/09	1	2	4	8	0	2	0	8	0	2	0	8	15.10.10	
55/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
58/09	1	2	4	8	0	2	0	8	0	2	0	8	15.10.10	
60/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
61/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
62/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
66/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
69/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
71/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
75/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
77/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
81/09	1	2	4	8	0	2	4	8	0	2	0	8	15.14.10	
83/09	1	2	4	8	0	2	0	8	1	2	0	8	15.10.11	
85/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
86/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	
87/09	1	2	4	8	1	2	4	8	1	2	0	8	15.15.11	
88/09	0	0	4	0	1	2	4	8	0	0	0	0	4.15.0	
89/09	1	2	4	8	0	2	4	8	1	2	0	8	15.14.11	

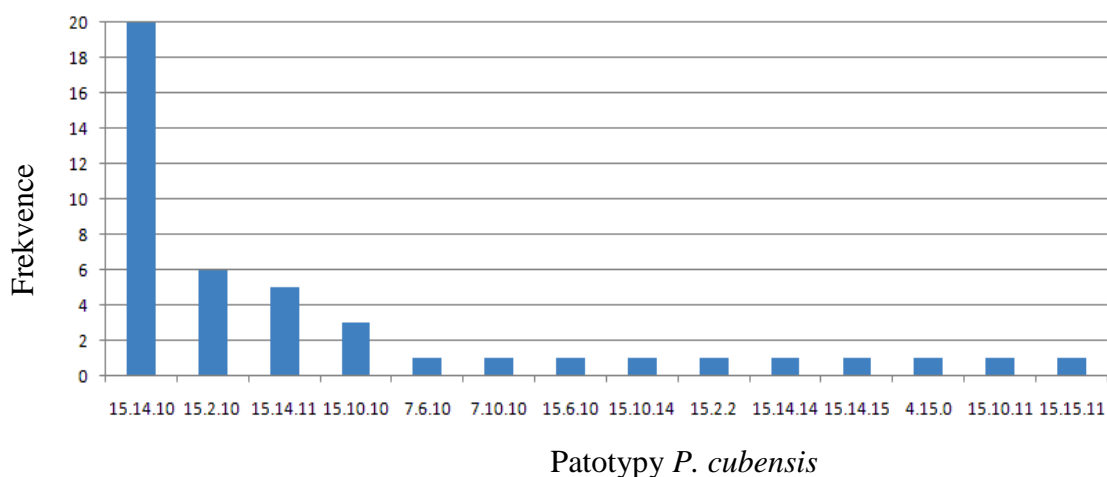
Pozn.: Číslo diferenčního genotypu odpovídá pořadovému číslu genotypu v diferenčním souboru, viz. tabulka 2.

Tabulka 10. Přehled a charakteristika patotypů *P. cubensis* determinovaných v roce 2009.

Patotyp	Inkompatibilní reakce ke genotypům
15.15.11	<i>Luffa cylindrica</i>
15.14.15	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>
15.14.14	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Citrullus lanatus</i>
15.14.11	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.14.10	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.10.14	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Citrullus lanatus</i>
15.10.11	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.10.10	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.6.10	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.2.10	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
15.2.2	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i> , <i>Lagenaria siceraria</i>
7.10.10	<i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i> , <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita fraterna</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
7.6.10	<i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i> , <i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Luffa cylindrica</i>
4.15.0	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i> , <i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i> , <i>Citrullus lanatus</i> , <i>Benincasa hispida</i> , <i>Luffa cylindrica</i> , <i>Lagenaria siceraria</i>

Mezi nejčastěji se vyskytující patřil v roce 2009 patotyp 15.14.10, který se objevil v populaci patogenu 20× (graf 2). Dalšími patotypy s častějším výskytem byly patotypy 15.2.10, 15.14.11 a 15.10.10, které se vyskytly více než 2×. Ostatní patotypy se vyskytly v populaci *P. cubensis* pouze jednou.

Graf 4. Frekvence zjištěných patotypů *P. cubensis* v roce 2009.



5.2 Patotypy *P. cubensis* z hlediska jejich geografického původu

Izoláty *P. cubensis*, které byly testovány v roce 2009, a které byly zpracovány v experimentální části této bakalářské práce, pocházely z různých krajů České republiky. Jejich podrobná charakteristika je uvedena v tabulce 11.

Nejvíce izolátů *P. cubensis* (34 %) pocházelo z Jihomoravského kraje a to z okresů Blansko, Znojmo, Břeclav, Brno-venkov a Hodonín. Další početnou skupinu (18 % izolátů) tvořily izoláty *P. cubensis* z Královhradeckého kraje, z okresů Rychnov nad Kněžnou, Hradec Králové, Náchod, Trutnov a Jičín. Rovněž i z Olomouckého kraje bylo několik izolátů, a to z okresů Olomouc, Přerov a Prostějov. A poslední část testovaných izolátů měla původ v těchto krajích: Zlínském (okresy: Zlín, Kroměříž, Uherské Hradiště), Pardubickém (Ústí nad Orlicí, Svitavy), Středočeském (Mladá Boleslav, Nymburk) a Moravskoslezském (Bruntál, Nový Jičín).

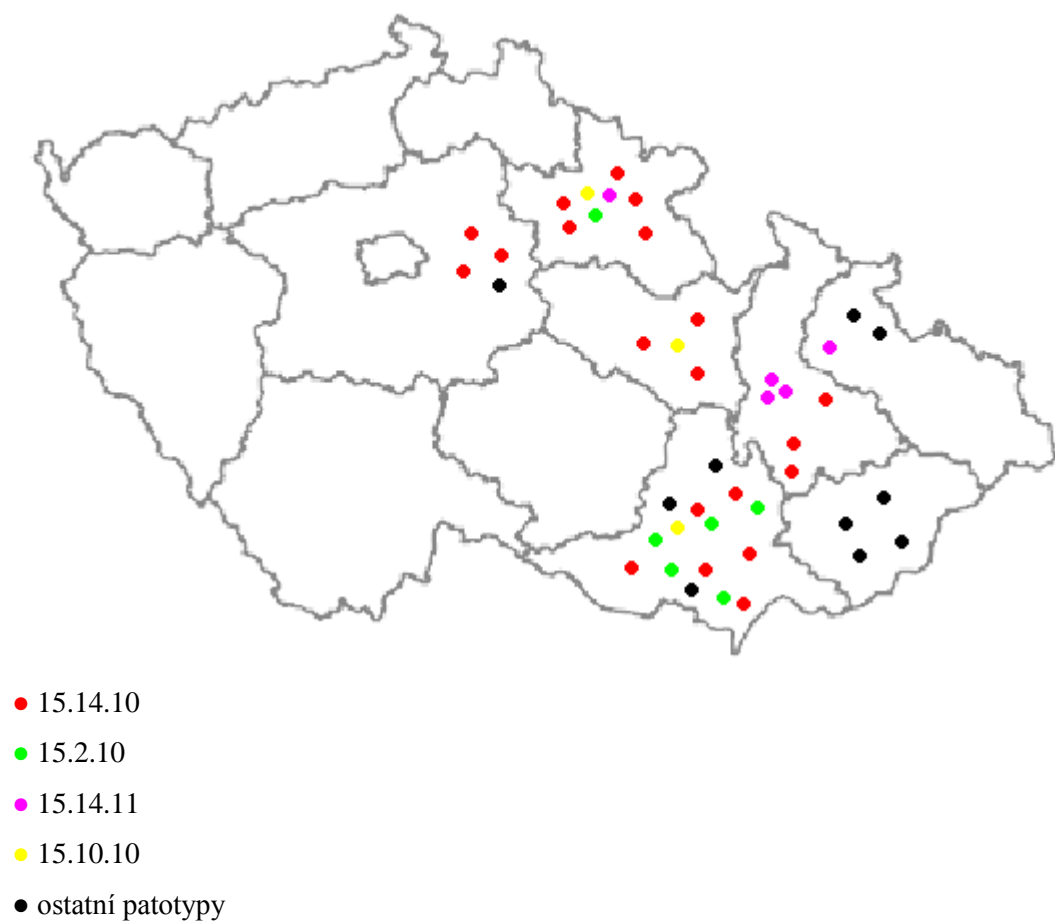
U izolátů pocházejících z Jihomoravského kraje, bylo detekováno celkem šest patotypů. Za zajímavý lze považovat fakt, že téměř všechny izoláty s detekovaným patotypem 15.2.10 pocházely z tohoto kraje s výjimkou jednoho izolátu, který byl z kraje Královhradeckého. Ve Zlínském kraji, odkud byly čtyři izoláty, byly naopak detekovány patotypy zcela odlišné od situace v kraji Jihomoravském. Olomoucký kraj byl reprezentován pouze dvěma patotypy, z nichž patotyp 15.14.10 se vyskytoval nejčastěji, kromě kraje Zlínského a Moravskoslezského, odkud ale bylo nejméně izolátů (každý kraj po 4 izolátech). V pardubickém kraji se vyskytl patotyp 15.10.10, který se dále objevil pouze v kraji Královhradeckém a Jihomoravském. Společně s tímto patotypem se zde nachází také nejčastější patotyp 15.14.10. Zvláštním případem je patotyp 15.14.11 nacházející se s převahou v Moravskoslezském kraji a dále se vyskytuje pouze v kraji Olomouckém a Královhradeckém.

Patotypy zjištěné v roce 2009 a jejich rozmístění podle krajů je znázorněné v obrázku 1.

Tabulka 11. Patotypy *P. cubensis* determinované v roce 2009 a seřazené podle krajů.

Kraj	Okres	Lokalita	Izoláty	Patotypy
Jihomoravský	BV	Lednice	1/2/09	7.6.10
	BK	Lipovec	13/09	15.14.10
	BK	Křtiny	15/09	15.2.10
	BO	Silůvky	18/09	15.2.10
	BO	Ivančice	20/09	15.14.10
	ZN	Moravský Krumlov	22/09	15.14.10
	ZN	Dobelice	24/09	15.2.10
	ZN	Prosiměřice	27/09	15.14.10
	ZN	Lechovice	29/09	15.10.10
	HO	Čejkovice	31/09	15.2.10
	HO	Čejc	33/09	15.14.10
	HO	Ratiškovice	35/09	7.10.10
	HO	Strážnice	36/09	15.6.10
	HO	Vnorovy	38/09	15.2.10
Olomoucký	HO	Mutěnice	50/09	15.14.10
	OL	Olomouc - Nedvězí	6/09	15.14.11
	PV	Mostkovice	9/09	15.14.10
	PV	Otinovec	11/09	15.14.10
	PR	Tovačov - Anín	48/09	15.14.10
	OL	Olomouc - Holice	85/09	15.14.11
Zlínský	OL	Olomouc - Holice	89/09	15.14.11
	UH	Uherský Ostroh	40/09	15.10.14
	ZL	Napajedla	42/09	15.2.2
	KM	Trávník	44/09	15.14.14
Moravskoslezský	KM	Postoupky	46/09	15.14.15
	BR	Dolní Moravice	86/09	15.14.11
	NJ	NJ - Kojetín	87/09	15.15.11
Pardubický	NJ	NJ - Kojetín	88/09	4.15.0
	SY	Sedliště	51/09	15.14.10
	SY	Bohuňovice	52/2/09	15.14.10
	UO	České Heřmanice	53/09	15.10.10
Královehradecký	UO	Kosořín	55/09	15.14.10
	RK	Opočno	4/09	15.2.10
	RK	Čermná nad Orlicí	58/09	15.10.10
	RK	Albrechtice nad Orlicí	60/09	15.14.10
	HK	Třebechovice pod Orebem	61/09	15.14.10
	RK	Ledce	62/09	15.14.10
	NA	Bohuslavice	66/09	15.14.10
	TU	Vilantice	69/09	15.14.11
	JC	Konecchlumí	71/09	15.14.10
	Středočeský	MB	Dolní Bousov	75/09
MB		Domousice	77/09	15.14.10
MB		Vlkava	81/09	15.14.10
NB		Lysá nad Labem	83/09	15.10.11

Obrázek 1. Rozmístění nejčastěji se vyskytujících patotypů *P. cubensis* v České republice.



5.3 Odolnost a náchylnost genotypů diferenciálního souboru

Jednotlivé reakce testovaných izolátů *P. cubensis* z roku 2009, ve vztahu k vybraným genotypům diferenciálního souboru, jsou shrnuty v této kapitole. Výsledky byly získány zpracováním dat z tabulky 12.

Tabulka 12. Intenzita sporulace (%) izolátů *P. cubensis* získaných v roce 2009 na diferenciálním souboru Cucurbitaceae.

Genotyp/ Izolát	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Kód patotypu
1/2/09	100,0	100,0	100,0	30,0	15,0	100,0	35,0	33,3	30,0	90,0	5,0	86,7	7.6.10
4/09	100,0	96,7	95,0	43,3	10,0	98,3	28,3	21,7	1,7	88,3	15,0	55,0	15.2.10
6/09	100,0	100,0	90,0	93,3	18,3	100,0	58,3	71,7	40,0	100,0	26,7	98,3	15.14.11
9/09	100,0	100,0	90,0	100,0	0,0	100,0	51,7	80,0	0,0	100,0	0,0	98,3	15.14.10
11/09	100,0	93,3	75,0	75,0	10,0	96,7	48,3	41,7	18,3	100,0	21,7	88,3	15.14.10
13/09	100,0	98,3	91,7	43,3	0,0	93,3	38,3	55,0	20,0	98,3	10,0	90,0	15.14.10
15/09	95,0	91,7	60,0	96,7	5,0	83,3	26,7	26,7	1,7	80,0	23,3	46,7	15.2.10
18/09	100,0	100,0	98,3	71,7	18,3	100,0	28,3	30,0	11,7	98,3	15,0	96,7	15.2.10
20/09	100,0	96,7	91,7	93,3	6,7	96,7	58,3	76,7	23,3	100,0	30,0	95,0	15.14.10
22/09	100,0	100,0	100,0	76,7	25,0	100,0	38,3	38,3	28,3	100,0	25,0	93,3	15.14.10
24/09	100,0	100,0	100,0	83,3	26,7	100,0	28,3	28,3	21,7	98,3	11,7	95,0	15.2.10
27/09	100,0	100,0	78,3	96,7	11,7	96,7	68,3	50,0	26,7	96,7	30,0	80,0	15.14.11
29/09	100,0	100,0	93,3	96,7	20,0	93,3	31,7	38,3	5,0	98,3	31,7	90,0	15.14.11
31/09	100,0	100,0	91,7	40,0	23,3	96,7	21,7	30,0	0,0	90,0	20,0	78,3	15.2.10
33/09	100,0	100,0	100,0	76,7	1,7	95,0	55,0	76,7	6,7	100,0	25,0	100,0	15.14.10
35/09	95,0	78,3	85,0	31,7	5,0	100,0	20,0	38,3	0,0	90,0	8,3	53,3	7.10.10
36/09	100,0	93,3	98,3	46,7	18,3	95,0	43,3	26,7	18,3	100,0	18,3	55,0	15.6.10
38/09	100,0	100,0	100,0	40,0	11,7	98,3	21,7	20,0	6,7	98,3	15,0	76,7	15.2.10
40/09	100,0	100,0	91,7	90,0	5,0	95,0	33,3	63,3	20,0	98,3	50,0	91,7	15.10.14
42/09	93,3	96,7	78,3	41,7	25,0	95,0	25,0	21,7	1,7	61,7	0,0	33,3	15.2.2
44/09	100,0	96,7	95,0	81,7	13,3	100,0	46,7	58,3	20,0	100,0	60,0	100,0	15.14.14
46/09	100,0	100,0	100,0	40,0	0,0	100,0	63,3	75,0	41,7	100,0	58,3	100,0	15.14.15
48/09	100,0	100,0	96,7	100,0	0,0	95,0	53,3	81,7	0,0	100,0	0,0	100,0	15.14.10
50/09	100,0	100,0	80,0	86,7	3,3	100,0	46,7	85,0	3,3	98,3	0,0	96,7	15.14.10
51/09	100,0	100,0	95,0	96,7	0,0	100,0	61,7	91,7	21,7	100,0	1,7	100,0	15.14.10
52/2/09	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0	60,0	98,3	28,3	100,0	0,0	98,3	15.14.10
53/09	100,0	100,0	71,7	85,0	0,0	100,0	30,0	100,0	0,0	95,0	0,0	96,7	15.10.10
55/09	100,0	100,0	98,3	68,3	0,0	100,0	71,7	90,0	10,0	100,0	0,0	96,7	15.14.10
58/09	100,0	100,0	100,0	86,7	33,3	100,0	31,7	100,0	6,7	93,3	3,3	91,7	15.10.10
60/09	100,0	100,0	100,0	90,0	20,0	100,0	38,3	100,0	33,3	100,0	1,7	96,7	15.14.10
61/09	100,0	100,0	91,7	93,3	0,0	100,0	71,7	100,0	0,0	100,0	0,0	93,3	15.14.10
62/09	100,0	100,0	98,3	91,7	0,0	100,0	88,3	46,7	5,0	98,3	0,0	100,0	15.14.10
66/09	100,0	100,0	68,3	80,0	18,3	100,0	41,7	95,0	3,3	100,0	0,0	98,3	15.14.10
69/09	100,0	100,0	93,3	66,7	0,0	50,0	46,7	66,7	48,3	83,3	0,0	66,7	15.14.11
71/09	100,0	100,0	86,7	93,3	25,0	100,0	48,3	96,7	30,0	93,3	0,0	98,3	15.14.10
75/09	100,0	100,0	91,7	60,0	0,0	100,0	46,7	88,3	8,3	98,3	0,0	93,3	15.14.10
77/09	100,0	100,0	96,7	68,3	6,7	100,0	96,7	100,0	15,0	100,0	0,0	100,0	15.14.10
81/09	100,0	100,0	78,3	90,0	0,0	100,0	68,3	100,0	3,3	86,7	0,0	93,3	15.14.10
83/09	100,0	100,0	80,0	78,3	0,0	93,3	25,0	75,0	56,7	85,0	0,0	90,0	15.10.11
85/09	100,0	100,0	53,3	76,7	0,0	36,7	36,7	66,7	46,7	81,7	0,0	45,0	15.14.11
86/09	100,0	100,0	85,0	88,3	0,0	83,3	45,0	83,3	55,0	91,7	0,0	81,7	15.14.11
87/09	100,0	100,0	100,0	76,7	58,3	100,0	46,7	100,0	40,0	95,0	0,0	95,0	15.15.11
88/09	18,3	6,7	50,0	30,0	63,3	50,0	60,0	43,3	0,0	31,7	0,0	11,7	4.15.0
89/09	88,3	100,0	100,0	85,0	25,0	100,0	86,7	66,7	55,0	100,0	23,3	85,0	15.14.11

Průměrné míry intenzity sporulace *P. cubensis* na genotypech diferenciačního souboru jsou uvedeny v tabulce 13.

a) Rod *Cucumis*

Všechny izoláty *P. cubensis* z roku 2009 vykazovaly vysokou patogenitu k rodu *Cucumis*, který je v diferenciačním souboru zastoupen druhy *Cucumis sativus*, *C. melo* subsp. *melo*, *C. melo* var. *conomon* a *C. melo* var. *acidulus*. Intenzita sporulace izolátů *P. cubensis* u rodu *Cucumis* dosáhla 89,4 %. Na *C. sativus*, náchylné odrůdě Marketer 430, která slouží také jako kontrolní genotyp, byla intenzita sporulace téměř sto procentní (97,5 %), a tedy byla zaručena kontrola správného testování. Inkompatibilní reakce s diferenciačními genotypy r. *Cucumis* se projevila pouze u tří izolátů. U izolátů 1/2/09 a 35/09 byla pozorována intenzita sporulace kolem 30% v interakci s druhem *C. melo* var. *acidulus*. Izolát 88/09 vykazoval inkompatibilní reakci s třemi druhy rodu *Cucumis*, ale pouze u *C. melo* var. *conomon* byla sporulace 50%.

b) Rod *Cucurbita*

V interakcích mezi izoláty *P. cubensis* a druhy rodu *Cucurbita* z diferenciačního souboru, mezi které patří *Cucurbita pepo* var. *pepo*, *C. pepo* var. *texana*, *C. fraterna* a *C. maxima* se ukázala značná variabilita. První zmíněný druh *C. pepo* var. *pepo* byl nejvíce odolným genotypem, vykazujícím až 88% rezistenci vůči testovaným izolátům *P. cubensis*. Kompatibilní reakce byly zaznamenány pouze s izoláty 87/09 a 88/09.

Naopak nejvyšší kompatibilita s izoláty *P. cubensis* byla prokázána u genotypu *C. pepo* var. *texana*, kde hodnota intenzity sporulace dosáhla až 94%. U tohoto druhu se neobjevila žádná inkompatibilní reakce s izoláty *P. cubensis*.

V reakci genotypu *C. fraterna* a izolátů *P. cubensis* se ukázala určitá heterogenita. Z celkového počtu 44 izolátů byla inkompatibilní reakce zaznamenána u 13 izolátů (4/09, 15/09, 18/09, 24/09, 29/09, 31/09, 35/09, 38/09, 40/09, 42/09, 53/09, 58/09 a 83/09).

Výskyt sporulace izolátů *P. cubensis* na genotypech *C. maxima* dosahoval 65%. Rezistentní reakce se objevili pouze u 9 izolátů (1/2/09, 4/09, 15/09, 18/09, 24/09, 31/09, 36/09, 38/09 a 42/09).

c) Ostatní rody Cucurbitaceae

Poslední skupina genotypů zahrnující rody *Citrullus*, *Benincasa*, *Luffa* a *Lagenaria* vykazuje nejvyšší variabilitu v patogenní a hostitelské interakci.

U *Citrullus lanatus* bylo zaznamenáno pouze osm kompatibilních reakcí, a to s těmito izoláty 6/09, 46/09, 69/09, 83/09, 85/09, 86/09, 87/09 a 89/09. U těchto izolátů sporulace nepřesáhla 60%. U většiny ostatních izolátů byla reakce s tímto genotypem inkompatibilní, a dokonce u některých z těchto izolátů nebyla pozorována žádná sporulace.

Naopak u genotypu *Benincasa hispida* byla zaznamenána inkompatibilní reakce pouze s izolátem 88/09. Všechny ostatní reakce s tímto genotypem byly kompatibilní s průměrnou hodnotou sporulace 93,6 %.

U genotypu *Luffa cylindrica* se kompatibilní reakce vyskytly pouze u tří izolátů (40/09, 44/09 a 46/09). Průměrná míra sporulace na tomto genotypu byla 12%.

U genotypu *Lagenaria siceraria*, který je posledním genotypem diferenčního souboru čeledi Cucurbitaceae, byla zjištěna inkompatibilní reakce pouze u dvou izolátů (42/09 a 88/09). Průměrná míra sporulace izolátů na tomto genotypu byla 84,8 %.

Tabulka 13. Přehled průměrné intenzity sporulace celého souboru izolátů *P. cubensis* (n = 44, rok 2009) na genotypech diferenčního souboru Cucurbitaceae.

Pořadové číslo	Genotyp	Průměrná intenzita sporulace [%]
1	<i>Cucumis sativus</i>	97,5
2	<i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i>	96,6
3	<i>Cucumis melo</i> var. <i>conomon</i>	89,1
4	<i>Cucumis melo</i> var. <i>acidulus</i>	74,5
5	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	11,9
6	<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>texana</i>	94,1
7	<i>Cucurbita fraterna</i>	47,1
8	<i>Cucurbita maxima</i>	65,4
9	<i>Citrullus lanatus</i>	18,5
10	<i>Benincasa hispida</i>	93,6
11	<i>Luffa cylindrica</i>	12,0
12	<i>Lagenaria siceraria</i>	84,8

6 DISKUZE

Studiu *P. cubensis* se už řadu let věnuje velká pozornost, a to hlavně díky snižujícímu se výnosu okurek v zemědělských oblastech. Zejména výzkumu patogenní variability je v řadě zemí věnována velká pozornost v rámci studia interakcí Cucurbitaceae-*P. cubensis* vzhledem k tomu, že tento patogen je jedním z hospodářsky nejvýznamnějších (Lebeda a Cohen, 2011; Pavelková et al., 2011). Ve světě bylo studium patogenní variability *P. cubensis* realizováno v Indii (Hughes and van Halteren, 1952), Izraeli (Cohen, 1976), Japonsku (Bains and Sharma, 1986; Inaba et al., 1986) a USA (Thomas et al., 1987). Patogenní variabilita české populace *P. cubensis* je na našem území sledována podrobněji od roku 2001 (Lebeda a Urban, 2004a,b) a z výsledků vyplývá, že populace je silně patogenní a velmi variabilní (Lebeda et al., 2012).

V předložené bakalářské práci jsem se zabývala patogenní variabilitou izolátů *P. cubensis*, získaných z infikovaných porostů tykvovitých zelenin při sběrových expedicích na území České republiky v roce 2009. U těchto izolátů byly determinovány patotypy, které byly dále zkoumány ve vztahu k jejich geografickému původu. Také byla zkoumána odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru pro detekci patotypů *P. cubensis* (podle Lebeda a Widrlechner, 2003), a to za použití studovaného souboru izolátů.

V roce 2009 byl vysoký stupeň patogenity zaznamenán u 68% izolátů a střední stupeň patogenity u 32% izolátů *P. cubensis*. Nízký stupeň patogenity nebyl determinován v roce 2009 u testovaných izolátů *P. cubensis*. Výsledky z roku 2009 zpracované v této bakalářské práci korespondují s výsledky dlouhodobého studia patogenní variability *P. cubensis* v České republice realizované fytopatologickou laboratoří katedry botaniky PřF UP pod vedením prof. Lebedy od roku 2001. Na základě výsledků tohoto výzkumu a rovněž i výsledků prezentovaných v této práci lze říci, že patogenní variabilita populace *P. cubensis* v České republice je rozsáhlá a tuto skutečnost lze doložit tím, že bylo popsáno velké množství patotypů tohoto patogenu v ČR (Lebeda et al., 2006; Lebeda et al., 2012). Ukázalo se však, že během sledovaného období se v české populaci *P. cubensis* měnila frekvence zastoupení kmenů s různým stupněm patogenity. Zatímco v letech 2001-2002 byly v české populaci *P. cubensis* rovnoměrně zastoupeny středně a vysoce patogenní kmeny, tak od roku 2003 naopak výrazně převažovaly kmeny s vysokým stupněm patogenity a zdá se tedy, že probíhá posun k vyšším stupňům patogenity (Lebeda et al., 2006; Lebeda et al., 2006; Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Urban, 2004, 2007). V roce 2009 bylo u 44 testovaných izolátů rozlišeno 14 patotypů, z nichž nejčastěji byl zastoupen patotyp 15.14.10 (45,5 %). Také v předchozím sledovaném období (2001-2008) byl právě patotyp 15.14.10 zastoupen každoročně (Lebeda et al., 2012). Z ostatních 13 determinovaných patotypů se pouze tři z nich (15.2.10, 15.14.11 a 15.10.10) vyskytly v populaci tohoto patogenu v roce 2009 více než jednou. Ve sledovaném roce 2009 byla infekce *P. cubensis* poprvé v České republice pozorována na druhu *C. moschata* (izolát 88/09 pocházející

z Moravskoslezského kraje), u kterého byl detekován nový patotyp 4.15.0, který dosud nebyl zjištěn v české populaci *P. cubensis* (Pavelková et al., 2011). Zároveň byl v tomto roce detekován i další nový patotyp, který od roku 2001 nebyl v České republice objeven, jednalo se o patotyp 15.6.10 determinovaný u izolátu 36/09 z Jihomoravského kraje (Lebeda et al., 2012). Přehled patotypů determinovaných u testovaných izolátů *P. cubensis* v České republice v letech 2001-2009 je uveden v tabulce 14.

Tabulka 14. Přehled patotypů *P. cubensis* determinovaných v České republice v letech 2001-2009 (upraveno podle Lebeda et al., 2012; Pavelková, osobní sdělení – výsledky z let 2001-2008).

Patotypy	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
3.0.12	+								
3.2.14	+								
3.14.10								+	
3.14.14	+								
4.15.0									+
7.2.4	+								
7.6.10						+		+	+
7.7.10	+				+				
7.10.2						+			
7.10.10						+		+	+
7.10.14	+								
7.14.10					+	+		+	
7.14.14	+					+			
7.15.10					+	+			
11.0.8	+								
11.3.11	+								
11.6.2	+								
11.6.8	+								
11.7.14	+								
11.10.10	+								
11.10.14	+								
11.11.10	+								
11.14.12	+								
11.14.14	+								
15.0.10		+							
15.0.14		+							
15.2.0	+								
15.2.2		+							+
15.2.8						+			
15.2.10	+	+							+
15.2.11				+					
15.3.12	+								
15.3.14	+								
15.6.10									+
15.6.14	+								

15.6.15				+					
15.7.13	+								
15.7.14	+								
15.10.0	+								
15.10.2		+	+						
15.10.3		+							
15.10.6		+							
15.10.10	+	+	+			+			+
15.10.11				+					+
15.10.12	+								
15.10.14	+	+	+						+
15.11.10		+			+				
15.11.14		+							
15.12.2					+				
15.14.2		+	+		+				
15.14.3			+		+				
15.14.6			+						
15.14.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15.14.11	+		+	+	+	+	+	+	+
15.14.14	+	+	+	+					+
15.14.15			+	+			+		+
15.15.2					+				
15.15.3				+					
15.15.10		+	+	+	+	+	+	+	
15.15.11			+	+		+	+	+	+
15.15.14	+	+	+	+	+				
15.15.15	+		+	+				+	

+ = patotyp přítomen

V roce 2009 nebyla pozorována souvislost mezi determinovanými patotypy *P. cubensis* a jejich geografickým původem. Jak už bylo zmíněno v kapitole 3.2, tak *P. cubensis* se v České republice patrně nerozmnožuje pohlavně, ale dostávají se k nám spory z teplejších oblastí, šíření spor je zajištěno anemochorií. Anemochorie tedy přímo ovlivňuje patogenní variabilitu populací tohoto patogenu v rámci České republiky. Determinované patotypy *P. cubensis* z roku 2009 se vyskytovaly ve všech krajích Moravy a Slezska, částečně také v Čechách. Největší počet izolátů a tedy i patotypů determinovaných u těchto izolátů byl zjištěn v kraji Jihomoravském a Králověhradeckém, v ostatních krajích byl výskyt méně častý. Nejčastější patotyp 15.14.10 se nevyskytl v kraji Zlínském a Moravskoslezském, v ostatních krajích se vyskytoval často. Většina shodných patotypů se vyskytovala v různých okresech i krajích, pouze ve třech krajích (Olomoucký, Pardubický a Středočeský) byly vždy zastoupeny pouze dva odlišné patotypy. V roce 2009 nebyly u vybraných izolátů *P. cubensis* patrné souvislosti v geografickém rozmístění patotypů. Ani v pracích předchozích autorů (Lebeda a Urban, 2003; Erbesová, 2005) nelze zaznamenat jednoznačnou zákonitost v geografickém rozšíření patotypů na území České republiky.

V roce 2009 nebyla na žádném genotypu z diferenciačního souboru čeledi Cucurbitaceae pozorována 100% sporulace narozdíl od situace v předchozích letech (2001-2008), kdy byla pozorována 100% frekvence kompatibilních reakcí na genotypech *Cucumis sativus* a *Cucumis melo* subsp. *melo* (Lebeda a Urban, 2003; Erbesová, 2005; Pavelková, osobní sdělení; Lebeda et al., 2012). V roce 2009 vykazovaly zmíněné dva genotypy inkompatibilní reakce s izolátem 88/09 (*C. moschata* – patotyp 4.15.0). Naopak byla pozorována 100% sporulace *P. cubensis* na genotypech *Cucumis melo* var. *conomon*. U genotypu *Cucurbita pepo* var. *pepo* byla frekvence kompatibilních reakcí 4,5%, tedy nejnižší od roku 2001 (Pavelková, osobní sdělení). I tento rok potvrdil výsledky z předchozích studií z let 2001-2008 (Lebeda et al., 2012), kdy genotypy *Cucurbita pepo* var. *pepo*, *Citrullus lanatus* a *Luffa cylindrica* vykazovaly nižší frekvence kompatibilních reakcí (20-30%), oproti ostatním genotypům, které mají frekvenci kompatibilních reakcí nad 70% (Pavelková, osobní sdělení). Genotypy *Cucurbita fraterna* a *Cucurbita maxima* vykazovaly nižší procento frekvence kompatibilních reakcí oproti dřívějšímu období (2001-2008), kdy se frekvence pohybovala okolo 90%.

Další podrobnější studie o patosystému *P. cubensis* pocházejí z Malajsie (Salati et al., 2010), Izraele (Cohen et al., 2010), USA (Colucci, 2008) a Německa (Runge and Thines, 2012).

Výzkum z Malajsie (Salati et al., 2010) uvádí střední a vysokou patogenitu a vysoký potenciál *P. cubensis* v invazi na pole tykvovitých v tropických oblastech. V této studii bylo použito 29 izolátů *P. cubensis* z různých farem ze západní Malajsie, z nichž u 13 izolátů byla determinována patogenní variabilita, pomocí metody listových disků a diferenciačního souboru Lebedy a Widrlechnera (2003). Na tomto souboru bylo nalezeno 12 patotypů z pěti států v západní Malajsii (Salati et al., 2010).

V Indii byla nalezena infekce *P. cubensis* na rodu *Luffa* spp. v polních podmínkách a v roce 1999 byla zaznamenána silná infekce druhu *Luffa acutangula* v Číně (Cohen et al., 2003).

V USA bylo identifikováno z 32 izolátů *P. cubensis* 32 různých patotypů a to pomocí umělé inokulace diferenciačního souboru 12 genotypů (Lebeda a Widrlechner, 2003). Rod *Cucumis* spp. byl velmi citlivý, zatímco *Citrullus lanatus*, *Lagenaria siceraria*, *L. cylindrica*, *Benincasa hispida* a *Cucurbita pepo* var. *pepo* patřily mezi méně citlivé genotypy (Colucci, 2008).

V posledních letech byly zaznamenány nové hostitelské druhy *P. cubensis*. V roce 2008 byla v Německu objevena *Bryonia dioica* jako hostitelský druh *P. cubensis* (Runge and Thines, 2008). V následujícím roce 2009 byla poprvé zaznamenána infekce *P. cubensis* na druhu *Cucurbita moschata* v České republice (Pavelková et al., 2011). Nejnovější informace z území České republiky z let 2010-2011 uvádějí výskyt *P. cubensis* poprvé také na druzích *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. ficifolia* a *Lagenaria siceraria* (Lebeda a Sedláková, osobní sdělení). V tomto období byly rovněž zaznamenány infekce *P. cubensis* také na druzích *Citrullus lanatus*, *Cucumis melo* a *Cucurbita moschata*, které byly již v minulosti na těchto hostitelích v České republice uváděny (Lebeda a Sedláková, osobní sdělení).

Runge and Thines (2012) uvádějí informace o fylogenetických vztazích mezi *P. cubensis* a *P. humuli*, které byly rovněž studovány pomocí biologických testů na druzích *Bryonia dioica*, *Sicyos*

angulatus a *Humulus lupulus*. Infekce *P. cubensis* se projevila nejvíce u druhu *B. dioica* (42 infekcí z 50 pokusů) oproti ostatním dvěma druhům. Výzkum potvrdil, že *P. cubensis* a *P. humuli* jsou velmi blízce příbuzné druhy a tato hypotéza byla potvrzena rovněž i posledními fylogenetickými analýzami. Autoři této studie také tvrdí, že *P. cubensis* se liší morfologicky od hostitele k hostiteli a že ve srovnání s *P. humuli* jsou tyto kmeny *P. cubensis* pomocí statistických analýz odlišitelné na svých původních hostitelích. Rozlišení *P. cubensis* a *P. humuli* pocházejících z původních hostitelů je dáno délkou sporangioforů a výškou prvního větvení sporangioforů (Runge and Thines, 2012).

Z vědeckého hlediska patří *P. cubensis* mezi velmi agresivní patogeny tykvovitých porostů. Velmi dobře se přizpůsobuje změnám prostředí a rychle se rozšiřuje. Výsledky této studie navazují na dlouhá léta výzkumů tohoto patogena v České republice (Lebeda, 1990; Lebeda et al., 2006; Lebeda a Cohen, 2011), který se jistě ještě nechýlí ke konci, ale naopak je potřeba řada dalších informací pro pochopení patosystému Cucurbitaceae - *P. cubensis*.

7 ZÁVĚR

Pseudoperonospora cubensis je jedním z celosvětově nejčastěji diskutovaných patogenů napadající tykvovité rostliny. Závažné a pravidelné infekce, vedoucí ke snížení výnosů okurek a dalších tykvovitých rostlin, jsou hlavní důvody pro pokračující snižování (cca 80% od roku 1990 do současnosti) produkce v zemědělských oblastech České republiky (Lebeda et al., 2011). U tohoto patogena se jedná o celosvětový problém, protože rozšíření *P. cubensis* je známo ve více než 70 zemích světa, zejména tam, kde je semi-aridní až tropické klima (Lebeda a Urban, 2007). Dalším důležitým faktorem je široký hostitelský okruh, kdy v současnosti *P. cubensis* napadá více než 60 druhů (Lebeda and Cohen, 2011).

V předložené bakalářské práci jsem se zabývala patogenní variabilitou v populaci *P. cubensis* v České republice v roce 2009. Dospěla jsem k následujícím výsledkům:

1. Patogenní variabilita *P. cubensis* vykazovala střední až vysoký stupeň patogenity a bylo rozlišeno 14 různých patotypů a z nich 2 nové, v České republice dosud nepopsané.
2. Nebyla pozorována souvislost mezi determinovanými patotypy *P. cubensis* a jejich geografickým původem.
3. Odolnost a náchylnost genotypů diferenciačního souboru zaznamenala v roce 2009 několik zásadních změn, nebyla pozorována 100% frekvence infekce na genotypech *Cucumis sativus* a *Cucumis melo* subsp. *melo*, naopak 100% infekce byla pozorována na genotypu *Cucumis melo* var. *conomon* a u genotypu *Cucurbita pepo* var. *pepo* byla zaznamenána nejnižší frekvence kompatibilních reakcí od roku 2001.

8 LITERATURA

- Agrios, G. N. (1978): Plant pathology. Second Edition. Academic Press. New York. pp. 466-470.
- Bains, S. S., Sharma, N. K. (1986): Differential response of certain cucurbits to isolates of *Pseudoperonospora cubensis* and characteristics of identified races. *Phytophylactica* 18: 31-33.
- Bedlan, G. (1989): Erstmaliger nachweis von oosporen von *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rost. an Gewächshausgurken in Österreich. *Pflanzenschutzberichte* 3: 119-120.
- Cohen, Y. (1976): Quantitation of resistance of cucumbers and cantaloups to *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytoparasitica* 4: 25-31.
- 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.
- 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 & 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.
- Erbesová, M. (2005): Determinace patotypů plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Diplomová práce, Olomouc, Katedra botaniky PřF 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.

Hejtný, S. et al. (1990): Květena České republiky 2. Academia, Praha, pp. 439-450.

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.

Hughes, M. B., van Halteren, F. (1952): Two biological forms of *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Dis. Rep. 36: 365-367.

Inaba, T., Morinaka, T., Hamaya, E. (1986): Physiological races of *Pseudoperonospora cubensis* isolates from cucumber and muskmelon in Japan. Bulletin Nat. Inst. of Agro-Environmental Sci. 2: 35-43.

Iwata, Y. (1941): Specialisation in *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. Et Curt.) Rostow. I. Comparative studies on the pathogenicities on the fungi from *Cucumis sativus* L. and *Cucurbita moschata* Duch. Annales of Phyto. Soc. Japan 11: 101-113.

Jahodář, L. (2006): Farmakobotanika. Karolinum, Praha.

Kalina, T., Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, p. 606.

Király, Z., Klement, A., Solimosy, F., Voros, J. (1970): Methods in plant pathology 509, Akademiai Kiadó, Budapest.

Křístková, E., Lebeda, A. (1995): Genetic resources of vegetable crops from the family Cucurbitaceae. Zahradnictví 22 (4): 123-128.

- Lebeda, A. (1981): Population-genetics of lettuce downy mildew (*Bremia-Lactucae*). J. Phytopathol. 101 (3): 228-239.
- Lebeda, A. (1982): Biologie a genetika interakce *Lactuca sativa* – *Bremia lactucae* a její význam ve šlechtění salátu na rezistenci. Kandidátská disertační práce, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, VŠÚZ Olomouc.
- Lebeda, A. (1986a): Plíseň okurková a její epidemický výskyt v roce 1985. Záhradnictvo 11: 21-22.
- Lebeda, A. (1986b): Epidemic occurrence of *Pseudoperonospora cubensis* in Czechoslovakia. Temperate Downy Mildews Newsletter, 4: 15-17.
- Lebeda, A. (1986c): *Pseudoperonospora cubensis*. In: Lebeda, A. (ed.): Metody testování rezistence zelenin vůči rostlinným patogenům. VHJ Sempra, VŠÚZ Olomouc, pp. 81-85.
- Lebeda, A. (1989): Evoluce parazitismu a patogenismu. In: Kúdela, V. (a kol.): 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. (1991a): Resistance in muskmelons to Czechoslovak isolates of *Pseudoperonospora cubensis* from cucumbers. Sci. Hort. 45: 255-260.
- Lebeda, A. (1991b): Máme okurky s polní rezistencí vůči plísni okurkové. Záhradnictvo 3: 72-72.
- Lebeda, A. (1992): Screening of wild *Cucumis* species against downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) isolates from cucumbers. Phytoparasitica 20: 203-210.
- 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., Křístková, E. (2000): Interactions between morphotypes of *Cucurbita pepo* and obligate biotrophs (*Pseudoperonospora cubensis*, *Erysiphe cichoracearum* and *Sphaerotheca fuliginea*). Acta Hort. 510: 219-225.

Lebeda, A., Mieslerová B. (2006a): Charakteristika a význam říše Chromista se zaměřením na třídu Peronosporomycetes. In: Lebeda, A., Mazáková, J., Tábořský, V. (eds.): Protozoa a Chromista – Taxonomie, biologie a hospodářský význam. ČFS, Praha, pp. 25-26.

Lebeda, A., Pavelková, J., Sedláková, B., Urban, J. (2012): Structure and temporal shift in virulence of *Pseudoperonospora cubensis* populations in Czech republic. Plant Pathology, přijato do tisku.

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 (9): 589-596.

Lebeda, A., Prášil, J. (1993): Odolnost světového sortimentu okurek k plísni okurkové. Záhradnictvo 5: 187-188.

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., Tábořský, V. (eds.): Protozoa a Chromista – Taxonomie, biologie a hospodářský význam. ČFS, Praha, pp. 47-78.

Lebeda, A., Urban, J. (2004a): Nové poznatky o plísni okurkové. Rostlinolékař 15/4: 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. et Curt.) Rostov. (Cucurbit downy mildew). In: Spencer-Phillips, P. et Jeger, M. (eds.): Advances in Downy Mildew Research, Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2004, pp. 203-210.

Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Urban, J. (2006c): Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. 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.

- Mahrissi, R. P., Siradhana, B. S. (1984): On the occurrence of oospores of *Pseudoperonospora cubensis* in Rajasthan, India. *Indian Phyto.* 37: 323-325.
- Nee, M. (1990): The domestication of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Economic bot.* 44 (3): 58-59.
- Pantidou, M. E. (1973): Fungus-host index for Greece. Benaki Phytopathology Inst., Kiphissia, Athens.
- Pavelková, J., Lebeda, A., Sedláková, B. (2011): First report of *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucurbita moschata* in the Czech Republic. *Plant Dis.* 95 (7): 878-879.
- Rieger, R., Michaelis, A., Green, M. M. (1976): Glossary of genetics and cytogenetics. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Rod, J. (1990): Principy chemické ochrany. In: Lebeda, A. (ed.): Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew). Československá vědecká společnost pro mykologii při ČSAV, Praha, pp. 46-50.
- Runge, F., Thines, M. (2008): A potential perennial host for *Pseudoperonospora cubensis* in temperate regions. *Eur. J. Plant Path.* 123 (4): 483-486.
- Runge, F., Thines, M. (2012): Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis*. *Plant Disease* 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 (31): 4897-4903.
- Savory, E. A., Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Varbanova, M., Hausbeck, M. K., Day, B. (2010): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Mol. Plant Pathol.* 12 (3): 217-226.
- Sedlářová, M., Lebeda, A. (2002): Cytologické aspekty interakce rostlin a patogenů (Cytological aspects of host-pathogen interactions). *Biologické listy* 67: 59-73.
- Singh, P. P., Sokhi, S. S. (1989): First report of occurrence of oospores of *Pseudoperonospora cubensis* on 2 cucurbitaceous hosts. *Current Sci.* 58: 1330-1331.

Skalický, V. (1961): Plíseň okurková – *Peronoplasmopara cubensis*. In: Benada, J. et 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.

Táborský, V. (1998): Tropické a subtropické zeleniny – pěstování a využití. Nakladatelství Brázda, Praha, s. 89.

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*. Phytopat. 77: 1621-1624.

Urban, J. (2006): Biology and variability of interactions between cucurbitaceous plants and *Pseudoperonospora cubensis*. Autoreferát desirtace 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.

Zacha, V., Janýška, A., Holman, B. (1985): Epifyticia plesne uhorkovej (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rost.) v ČSSR v roku 1984. Sborník ÚVTIZ-Ochrana rostlin 21: 226.

Zaker, M., Ommati, F. (1991): Observation of oospores of *Pseudoperonospora cubensis* on cucumber leaves in Iran. Iran J. Plant. Pathol. 27: 62-63, 1991.

Zhang, Yan-ju, Qin, Zhi-wei, Zhou, Xiu-yan. (2006): Study on the over-wintering of cucumber downy mildew in Heilongjiang province of China. Abstracts, 27th International Horticultural Congress and Exhibition, August 13-19, 2006, COEX (Convention and Exhibition), Seoul, Korea, ISHS and KSHS, S11-P-51, p. 376.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

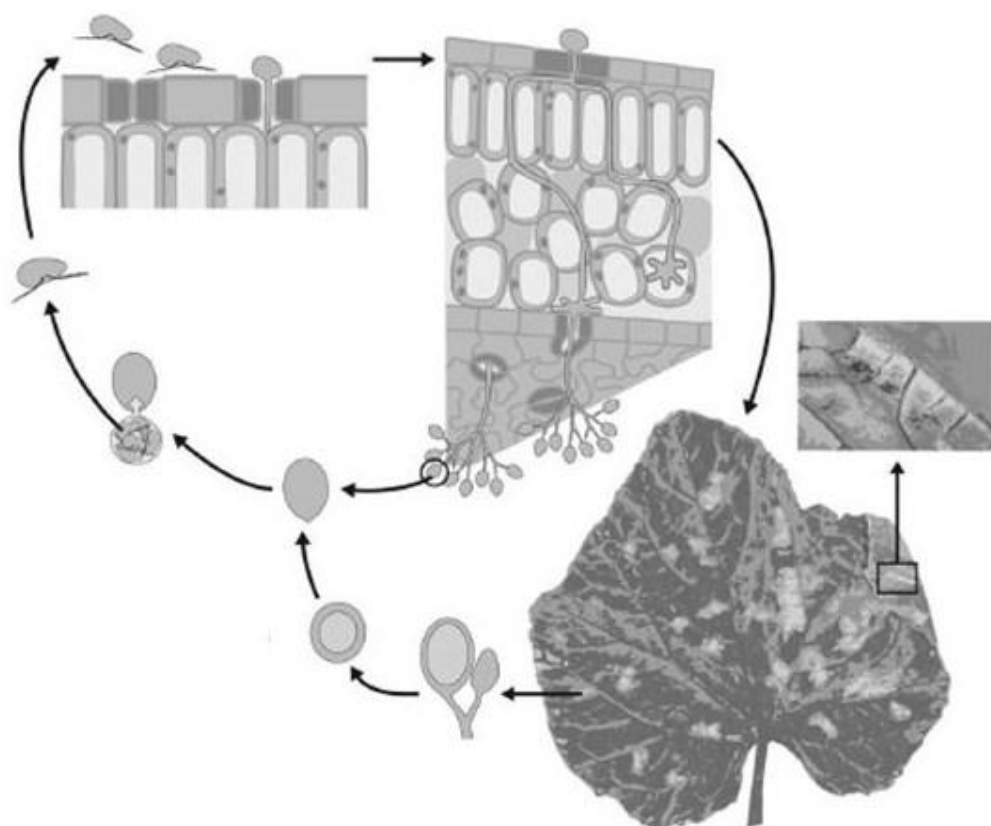
- Aktuální ke dni 11.2.2012

http://www.rostliny.net/rostlina/Benincasa_hispida

<http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?373>

<http://botanika.wendys.cz/cizi/rostlina.php?60>

9 PŘÍLOHY



Obrázek 2. Životní cyklus *P. cubensis* (Savory et al., 2011).



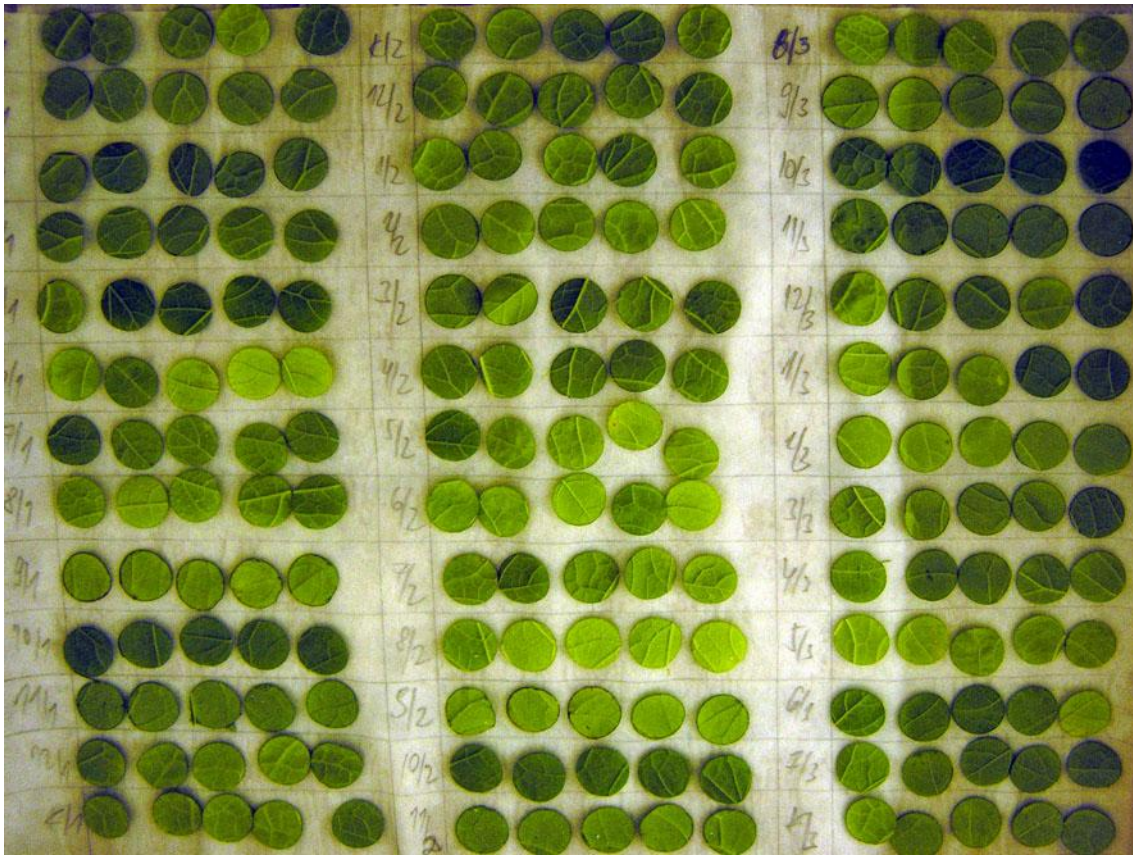
Obrázek 3. Sporangiofor *P. cubensis* (Lebeda and Urban, 2010).



Obrázek 4. Pěstování diferenciačních genotypů čeledi Cucurbitaceae pro determinaci patotypů *P. cubensis* ve skleníku (zobrazena pouze část souboru) (N. Vyslyšelová).



Obrázek 5. Plastové tácy s terčiky uložené ve fytotronu a připravené na inokulaci izoláty *P. cubensis* (N. Vyslyšelová).



Obrázek 6. Detail plastového tácu s terčíky (N. Vyslyšelová).

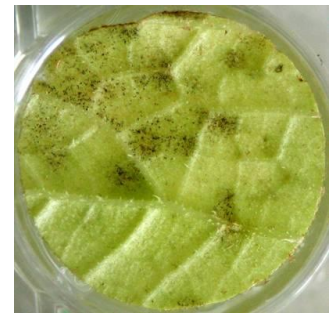
DI 0



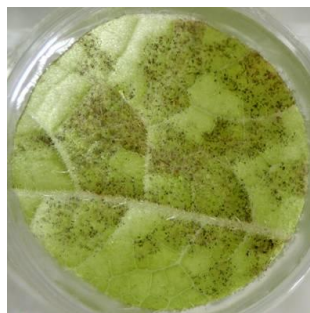
DI 1



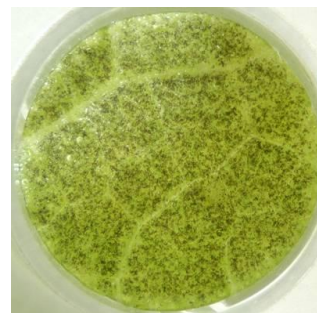
DI 2



DI 3



DI 4



Obrázek 7. Detail listových disků s odlišnými stupni infekce (DI 0-4) 9 dní po inokulaci *P. cubensis*.