

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra ekologie a životního prostředí



**Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii*  
a rezistence vůči metalaxylu v České republice**

**Tomáš Bartůšek**

Bakalářská práce  
předložená  
na Katedře ekologie a životního prostředí  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

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

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

Olomouc 2013



Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod odborným vedením pracovníků KB PřF UP. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, v práci řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci, květen 2013

.....

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

**Jméno a příjmení autora:** Tomáš Bartůšek

**Název práce:** Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii* a rezistence vůči metalaxylu v České republice

**Typ práce:** Bakalářská práce

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

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

**Rok obhajoby práce:** 2013

### **Abstrakt:**

Tato bakalářská práce se zabývá studiem ras *Plasmopara halstedii* u izolátů pocházejících z území České republiky, především z roku 2012, a stanovením citlivosti těchto izolátů k fungicidu metalaxylu. Z výsledků práce vyplývá, že v roce 2012 se v populaci *P. halstedii* na našem území vyskytovaly rasy 700, 710 a 714, přičemž rasa 710 byla v České republice detekována vůbec poprvé a byla určena u většiny testovaných izolátů, které pocházely z lokality Olomouc–Holice. Zároveň bylo zjištěno, že žádný z testovaných izolátů nevykazoval rezistenci vůči metalaxylu. Při srovnání citlivosti a spolehlivosti různých metod pro stanovení rasy *P. halstedii* jsme zaznamenali rozdíly ve výsledcích získaných metodou inokulace listových disků (LDI) a metodou inokulace semenáčků (WSI). Dospěli jsme proto k závěru, že námi používaná metoda inokulace semenáčků je přesnější a lépe odráží skutečnou reakci rostliny na napadení patogenem v přírodních podmínkách. Z toho důvodu by měla být použita pro revizi výsledků získaných u českých izolátů *P. halstedii* v minulosti metodou inokulace listových disků a měla by být užívána pro stanovení rasy izolátů *P. halstedii* i v budoucnu.

**Klíčová slova:** plíseň slunečnicová, slunečnice, *Helianthus annuus*, rasa, fungicid, rezistence, diferenční soubor

**Počet stran:** 44

**Počet příloh:** 0

**Jazyk:** český

## **BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION**

**Autor's first name and surname:** Tomáš Bartůšek

**Title:** Pathogenic variability and metalaxyl resistance of *Plasmopara halstedii* in the Czech Republic

**Type of thesis:** Bachelor work

**Workplace:** Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice, Czech Republic

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

**The year of presentation:** 2013

### **Abstract:**

Race and metalaxyl resistance of *Plasmopara halstedii* isolates originating from the Czech Republic collected in 2012 was determined in presented work. During 2012 races 700, 710 and 704 were present in sunflower downy mildew populations on localities within the Czech Republic. Race 710 has been detected for the first time in our country with the highest frequency among studied isolates Olomouc–Holic. Any isolate resistant to metalaxyl was not detected during the study. Moreover, two approaches of race determination were compared. Whole seedling inoculation (WSI) method provided reliable results but different from those obtained previously by leaf disc inoculation (LDI) method. It is assumed, that the whole seedling inoculation simulates a plant's reaction to pathogen attack in the field more authentically. Therefore, the whole seedling inoculation method should be used for revision of the results obtained previously by leaf disc inoculation and it is recommended to be used for race determination of *P. halstedii* isolates in future.

**Keywords:** sunflower downy mildew, sunflower, *Helianthus annuus*, race, fungicide, resistance, differential set

**Number of pages:** 44

**Number of appendices:** 0

**Language:** Czech

## Obsah

Seznam tabulek .....	vii
Seznam obrázků .....	viii
Poděkování .....	ix
1. Úvod .....	1
2. Cíle práce .....	2
3. <i>Plasmopara halstedii</i> .....	3
3.1. Nomenklatura a taxonomie .....	3
3.2. Morfologie a biologie .....	4
3.3. Životní cyklus .....	5
3.4. Hostitelský okruh .....	6
3.5. Rozšíření <i>P. halstedii</i> .....	7
3.5.1. Šíření plísně slunečnicové ve světě .....	7
3.5.2. Rozšíření v České republice .....	9
3.6. Vnitrodruhová variabilita .....	10
4. Plíseň slunečnice .....	14
4.1. Symptomy .....	14
4.2. Přenos choroby a ochrana proti <i>P. halstedii</i> .....	16
4.3. Rezistence <i>P. halstedii</i> proti fungicidům .....	17
5. Materiál a metody .....	18
5.1. Rostlinný materiál .....	18
5.2. Izoláty <i>P. halstedii</i> .....	19
5.3. Udržování a množení izolátů <i>P. halstedii</i> .....	19
5.4. Určení ras izolátů metodou inokulace semenáčků (WSI) .....	22
5.5. Test rezistence izolátů vůči metalaxylu .....	25
6. Výsledky .....	28
6.1. Rasy <i>P. halstedii</i> v České republice .....	28
6.2. Srovnání metod inokulace semenáčků (WSI) a inokulace listových disků (LDI) .....	32
6.3. Rezistence <i>P. halstedii</i> vůči metalaxylu .....	33
7. Diskuse .....	34
8. Souhrn .....	37
9. Seznam použité literatury .....	38

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b>	Diferenciační soubor a jeho reakce na nejběžnější rasy <i>P. halstedii</i> .....	11
<b>Tabulka 2</b>	Příklad vytvoření tripletového kódu .....	12
<b>Tabulka 3</b>	Seznam testovaných izolátů <i>P. halstedii</i> .....	19
<b>Tabulka 4</b>	Semikvantitativní stupnice napadení rostlin <i>P. halstedii</i> .....	25
<b>Tabulka 5</b>	Výsledky dvojic testů určení rasy izolátů z roku 2012 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné .....	29
<b>Tabulka 6</b>	Výsledky dvojic testů určení rasy izolátů z roku 2012 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné .....	30
<b>Tabulka 7</b>	Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2010 a 2011 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné .....	31
<b>Tabulka 8</b>	Srovnání výsledků metody inokulace semenáčků (WSI) a metody inokulace listových disků (LDI) při určování rasy izolátů <i>P. halstedii</i> .....	32
<b>Tabulka 9</b>	Výsledky testování <i>P. halstedii</i> na rezistenci vůči metalaxylu.....	33

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1</b>	Nepohlavní rozmnožování <i>P. halstedii</i> . A – sporangiofor, B – zoosporangia, C – zoospory.....	4
<b>Obrázek 2</b>	Orientační mapa rozšíření <i>P. halstedii</i> ve světě (EPPO, 2013) .....	8
<b>Obrázek 3</b>	Orientační mapa výskytu <i>P. halstedii</i> na území České republiky .....	9
<b>Obrázek 4</b>	Symptomy vyvolané <i>P. halstedii</i> . A – zakrslost, B – chlorotická léze na listu, C – sporulace na spodní straně listu, D – sporulace v místě ohraničené léze vyvolané sekundární infekcí .....	15
<b>Obrázek 5</b>	Přesev linií diferenciacního souboru a produkce osiva v létě 2012.....	18
<b>Obrázek 6</b>	A – materiál a pomůcky nutné k přípravě inokula, B – semenáčky slunečnic vhodné k inokulaci.....	20
<b>Obrázek 7</b>	A – kultivace infikovaných semenáčků v kultivační skříni, B – indukce sporulace <i>P. halstedii</i> v uzavřených krabičkách se 100% vlhkostí .....	21
<b>Obrázek 8</b>	Výsadba semenáčků jednotlivých diferenciacních linií do perlitu .....	22
<b>Obrázek 9</b>	Tác s diferenciacními liniemi slunečnice po čtrnáctidenní kultivaci a 12 hodinách zatmění při 100% vlhkosti .....	24
<b>Obrázek 10</b>	Semikvantitativní stupnice napadení rostlin <i>P. halstedii</i> . A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).....	24



## **Poděkování**

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literatury a užitečné rady; Mgr. Zuzaně Trojanové za předání praktických zkušeností při práci v laboratoři a laskavou pomoc se psaním odborného textu; pracovníkům fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci paní Drahomíře Vondrákové a Věře Zoubkové za pomoc při pěstování rostlin. Děkuji také rodičům a kamarádům za podporu, kterou mi poskytovali po dobu studia.

## 1. Úvod

Vřetenatka slunečnicová, odborně *Plasmopara halstedii*, je původcem tzv. plísně slunečnice (Kůdela et al., 2012). Tento patogen se v současnosti vyskytuje ve všech oblastech, kde je slunečnice pěstována, včetně České republiky, a pokud se vymkne kontrole, působí značné ekonomické ztráty. Ochrana pěstovaných slunečnic byla a je založena především na pěstování rezistentních kultivarů slunečnic v kombinaci s používáním fungicidů k moření osiva. Tato opatření vytvářejí na populaci *P. halstedii* značný selekční tlak, což vede k neustálé selekci nových izolátů, které překonávají geny rezistence u vyšlechtěných odolných kultivarů a jsou schopné tolerovat běžně používané koncentrace fungicidů. V současnosti proto neexistuje stoprocentně spolehlivá chemická ochrana a spoléhá se především na šlechtění kultivarů slunečnice s novými geny rezistence, které *P. halstedii* není schopna překonat. Ale ani to však není konečné řešení. Patogenní variabilita *P. halstedii* je poměrně rozsáhlá. Dosud bylo v rámci celého světa popsáno množství ras a nové budou s největší pravděpodobností stále popisovány. Pro udržení kontroly nad tímto patogenem je proto nutné monitorovat vývoj nových ras a spektrum jejich virulence, aby bylo možné na případné změny včas zareagovat.

## 2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo 1/ zpracování literární rešerše týkající se vnitrodruhové variability *Plasmopara halstedii* významné pro management ochrany pěstovaných slunečnic a 2/ praktické studium patogenní variability izolátů *P. halstedii* pocházejících z České republiky. V literárním přehledu je zvláštní pozornost věnována způsobům determinace, výskytu a rozšíření patogenních ras *P. halstedii*, stejně tak jako problematice rezistence *P. halstedii* vůči používaným fungicidům.

Praktickými cíli práce bylo:

- naučit se a uvést do praxe metodu determinace ras *P. halstedii* založenou na inokulaci semenáčků („whole seedling inoculation“) diferenciačního souboru slunečnic a pomocí této metody určit patogenní rasy jednotlivých izolátů *P. halstedii* pocházejících z České republiky z roku 2012;
- revidovat starší izoláty *P. halstedii*, u nichž byla rasa určena pomocí metody inokulace listových disků („leaf disc inoculation“) a porovnat výsledky;
- otestovat vybrané izoláty na rezistenci vůči fungicidu metalaxylu.

### 3. *Plasmopara halstedii*

Vřetenatka slunečnicová, odborně *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni (1988), je biotrofní parazit cca 100 druhů rostlin čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité). Studium této peronospory se tradičně zabývá mykologie, přestože je tento patogen v současnosti řazen do říše Straminipila. *P. halstedii* je původcem ekonomicky významné, u nás karanténní choroby tzv. plísně slunečnice (Sedlářová et al., 2010). Z vlastního názvu organismu je patrné, že nejvýznamnějším a nejohroženějším hostitelem je zemědělská plodina *Helianthus annuus* L. (slunečnice roční). Rozšíření, variabilita, biologie, taxonomické zařazení stejně jako interakce *P. halstedii* s hostitelem *Helianthus annuus* je studována již desítky let. V následujícím textu se budu věnovat vybraným oblastem studia týkajících se *P. halstedii*.

#### 3.1. Nomenklatura a taxonomie

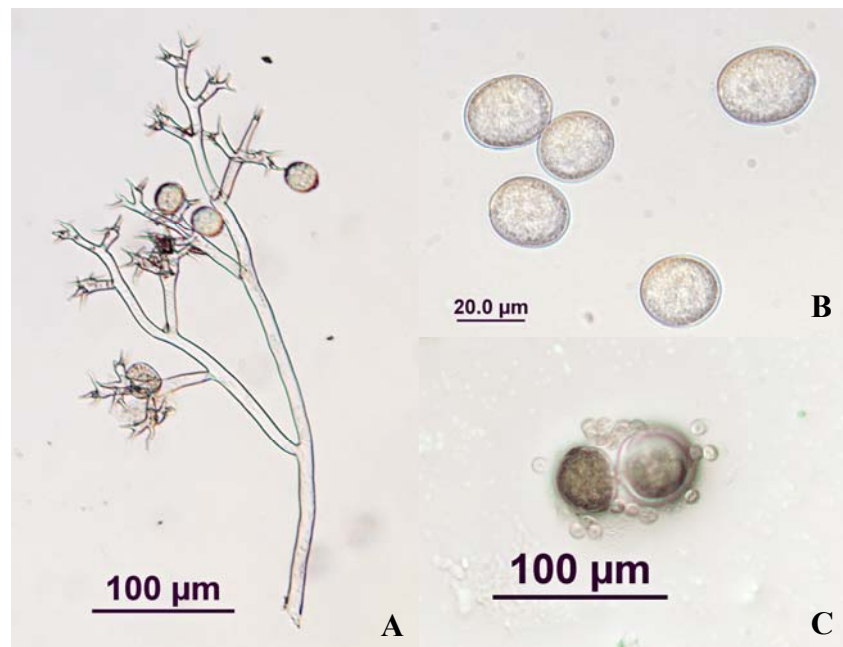
*P. halstedii* byla v minulosti známa pod několika jmény. Popsána byla v roce 1876 v Severní Americe W. S. Halstedem (EPPO, 2012) a roku 1882 byla pojmenována W. G. Farlowem jako *Peronospora halstedii* Farl. V roce 1888 byl organismus P. A. Saccardem přeřazen do rodu *Plasmopara* a současný jeho platný vědecký název zní *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni (Lebeda et al., 2006). V Evropě byly některé rasy tohoto druhu znovu nezávisle pojmenovány roku 1962 Novotelnovou jako *Plasmopara helianthi* Novot., ale název nebyl odbornou veřejností akceptován. Česky je tento patogen známý pod názvem vřetenatka slunečnicová.

Taxonomické zařazení *P. halstedii* bylo v minulosti nestálé a i v současné době jsou postavení tohoto organismu v systému a evoluční vztahy s příbuznými druhy značně problematické (Hudspeth et al., 2003). Zástupci řádu Peronosporales, do kterého *P. halstedii* patří, byli Carlem Linném v polovině 18. století řazeni do říše Plantae (Lebeda et al., 2006). Zhruba o sto let později byla tato skupina biotrofních parazitů přeřazena do říše Protista, která zahrnovala prakticky všechny jednobuněčné organismy jako např. Amoebozoa (měňavky) nebo Euglenozoa (krásnoočka) (Lebeda et al., 2006). Zařazení peronospor do říše Fungi, ke kterému došlo v roce 1969 (Lebeda et al., 2006), se silně vžilo, a proto se i dnes můžeme v literatuře často setkat s označením peronospor jako „pravé plísně“ a původci mykóz, třebaže s houbami sensu stricto z říše Fungi nejsou příbuzné. Peronospory se od „pravých hub“ liší v několika podstatných znacích,

jako je např. přítomnost celulózy v buněčné stěně, bičíkatá stádia nebo tripartitní mastigonemata na jednom z bičíků (Dick, 2001). Kompromisem bylo zavedení termínu „houbám podobné organismy“ nebo „fungus like organism“, který v sobě zahrnuje fakt, že peronospory jsou významem, symptomy i způsobem života podobné houbovým patogenům v užším slova smyslu a zároveň naznačuje, že jsou taxonomicky odlišné. V současnosti spadá *P. halstedii* do řádu Peronosporales (tzv. downy mildews) a říše Straminipila, kam je řazena např. spolu s nálevníky (Ciliophora), obrněnkami (Dinoflagellata) a rozsivkami (Bacillariophyceae) (Dick, 2001).

### 3.2. Morfologie a biologie

*P. halstedii* má stélku v podobě nepřehrádkovaného mycelia, které intercelulárně prorůstá pletiva infikované hostitelské rostliny. Z bezbarvých hyf o průměru 6–20  $\mu\text{m}$  (Šedivý et al., 1977) vrůstají do buněk hostitele haustoria, které slouží k čerpání živin (Bouterige et al., 2003). Za příhodných podmínek vyrůstají z mycelia sporangiofory stromečkovitého charakteru, které často tvoří bílé povlaky na povrchu napadených hostitelských orgánů, zejména listů (EPPO, 2013).



**Obrázek 1** Nepohlavní rozmnožování *P. halstedii* A – sporangiofor, B – zoosporangia, C – zoospory.

Sporangiofory mohou vyrůstat buď po 5–6 z průduchů (Šedivý et al., 1977) nebo při silné infekci proráží epidermis, a tak se dostávají na povrch těla hostitele. Sporulaci často pozorujeme jako bílý prášivý povlak zejména na spodní straně čepele napadených listů, při silné infekci se mohou vyskytovat i na svrchní straně nebo na řapících listů a na stoncích. Plíseň sporuluje zejména ráno, při vysoké vzdušné vlhkosti blížící se 100 % (Tosi a Zizzerini, 2004) a za příznivé teploty 16–17°C (Anonym, 2008). Bezbarvá, průhledná zoosporangia eliptického tvaru s délkou 18–30  $\mu\text{m}$  a šířkou 14–20  $\mu\text{m}$ , která vyrůstají na koncích sporangioforů, produkují až 20 oválných dvoubičíkatých zoospor s průměrem 14–30  $\mu\text{m}$  (Hall, 1989), které slouží k vlastní infekci hostitele.

*Plasmopara halstedii* je obligátní biotrofní parazit a není tedy schopný dlouhodobě přežít bez hostitele. Ke svému životu a rozmnožování nutně potřebuje živé pletivo, které je pro *P. halstedii* jediným zdrojem živin. Výjimku do jisté míry tvoří oospory, které patogenu slouží k přečkání nepříznivých podmínek mimo vegetační sezónu a jsou schopny samostatně přežít v rostlinných zbytcích nebo v půdě až deset let (Sackston, 1981). Vytrvalé tlustostěnné oospory se vytváří ze zygot vzniklých pohlavním procesem po splynutí samčího antheridia a samičího oogonia. Vzhledem k tomu že je *P. halstedii* homothalická, může k pohlavnímu procesu docházet mezi pohlavními orgány vyrůstajícími na jednom myceliu. Oospory vznikající zejména v závěru vegetační sezóny hostitele se po odumření rostliny dostávají spolu s rozkládajícím se pletivem do půdy, ve které přežívají (Anonym, 2008).

### 3.3. Životní cyklus

Z pohlavně vzniklé oospory vyrůstá za vhodné teploty a vlhkosti hyfa, která na svém konci nese jedno zoosporangium (Delanoë, 1972). Ze zoosporangia jsou uvolněny dvoubičíkaté zoospory (Anonym, 2008), které se pomocí bičíků pohybují v půdní vodě nebo vodním filmu (Virányi, 1988) a chemotakticky vyhledají kořenový systém mladých hostitelských rostlin. Při nalezení kořenového vlášení encystují a vyklíčí hyfou, kterou penetrují do rostlinek přes rhizodermis (Virányi, 1988). Při kompatibilní interakci pak ve většině případů dochází k systémové (primární) infekci. Intercelulární mycelium parazita prorůstá celou rostlinu směrem k vrcholu s výjimkou meristémů a vysílá haustoria do okolních buněk. Po kolonizaci rostliny z mycelia vyrůstají sporangiofory, které pronikají skrz průduchy nebo epidermis ven z hostitele a na koncích jejich větvíček dochází k tvorbě zoosporangií. Zoosporangia se po dozrání

odlamují a jsou roznášena větrem do okolí, kde mohou sekundárně infikovat další hostitelské rostliny a tím se podílí na šíření patogenu (Spring, 2001).

Ze zoosporangia, které dopadne na hostitelskou rostlinu, se za příznivých podmínek uvolní zoospory, které encystují a penetrují skrz epidermis do buněk hostitele. Při kompatibilní interakci dochází k sekundární infekci, která má na rozdíl od primární infekce často jen lokální charakter. Z místa, kde zoospory pronikly do pletiva, se mycelium zpravidla rozrůstá pouze do mezofylu mezi žilkami, a tak tvoří lokální ohraničenou lézi (Anonym, 2008). V některých případech může mycelium prorůst dál tělem rostliny, která v tomto případě není napadena systémově, ale patogen prorůstá pletivem pouze směrem k vegetačnímu vrcholu, nikoli směrem k zemi (Mouzeyar et al., 1994). V době, kdy je mycelium dostatečně rozrostlé v hostitelském pletivu, opět dochází k tvorbě sporangioforů, zoosporangií a šíření v porostu hostitele. Popsaný nepohlavní cyklus trvá za optimálních podmínek jeden až dva týdny a v příznivých podmínkách může proběhnout i několikrát za sezónu (Bouterige et al., 2003). Na konci vegetačního období hostitele nastává útlum produkce nepohlavních zoosporangií a během 5–6 týdnů dochází k pohlavnímu rozmnožování a vzniku oospor, které zabezpečí přežití patogenu do příští sezóny (EPPO, 2013). Dalším způsobem přežívání a šíření je v podobě mycelia v semenech slunečnice (Virányi a Spring, 2011).

### 3.4. Hostitelský okruh

*Plasmopara halstedii* byla poprvé popsána na *Eupatorium purpureum* (sadeč červený). Hostitelský okruh tohoto patogenu celosvětově zahrnuje přes 100 druhů rostlin z čeledi Asteraceae (hvězdicovité) např. rody *Ambrosia* (ambrozie), *Artemisia* (pelyněk), *Bidens* (dvouzubec), *Centaurea* (chrpa), *Cineraria* (cinerarie), *Coreopsis* (krásnoočko), *Dimorphotheca* (dimorphotecie), *Erigeron* (turan), *Eupatorium* (sadeč), *Rudbeckia* (třapatka), *Solidago* (zlatobýl), *Verbena* (sporýš) a *Xanthium* (řepeň) (Virányi, 2002). Podrobnější studie *P. halstedii* jako parazita byly prováděny např. na rodu *Ambrosia* (Walcz et al., 2000), nebo *Helianthus* včetně jeho planě rostoucích zástupců (Spring et al., 2003). Ekonomicky nejvýznamnějším hostitelem je však slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Přenos inokula mezi planě rostoucími rostlinami (včetně planých slunečnic) a pěstovanou slunečnicí a naopak zatím nebyl potvrzen ani vyvrácen. Podle některých autorů však hraje důležitou roli v šíření a přežívání tohoto patogenu v přírodě (Agrios, 2005).

### 3.5. Rozšíření *P. halstedii*

*Plasmopara halstedii* stejně jako její hlavní hostitelská rostlina slunečnice roční, pochází ze Severní Ameriky, kde byla také *P. halstedii* v roce 1888 poprvé popsána (Šindelková et al., 2008). Primární centrum rozšíření se nachází v oblasti jižní části USA a severního Mexika (Sackston, 1981). Odtud se patogen rozšířil do Jižní Ameriky a Evropy, kde na území dnešní jižní Ukrajiny leží jeho sekundární centrum rozšíření (Virányi, 2002). V dalším šíření *P. halstedii* sehrálo důležitou roli pěstování slunečnice jako zemědělské plodiny (Virányi, 2002), díky kterému se tento patogen rozšířil prakticky do celého světa.

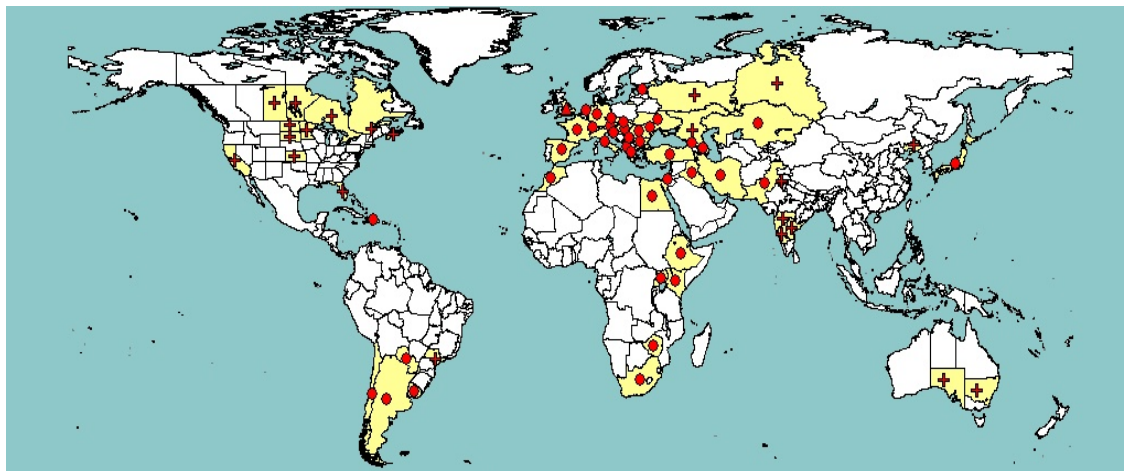
#### 3.5.1. Šíření plísně slunečnicové ve světě

Z místa svého původu, tj. ze Severní Ameriky, byla plíseň slunečnicová zavlečena do Evropy a do Jižní Ameriky (Virányi, 2002). Zpočátku se jednalo o patogen bez známé vnitrodruhové variability, ale v 70. letech 20. stol. byly poprvé oficiálně popsány a začaly být odlišovány dvě fyziologické rasy *P. halstedii*. Jednalo se o tzv. Evropskou rasu (podle současné nomenklatury rasa 100) a americkou Red River Valley rasu (podle současné nomenklatury rasa 300). Trvalo pouhých deset let, než byly z míst primárního (Severní Amerika) a sekundárního rozšíření (Evropa) popisovány další rasy s odlišnou patogenitou. Patogen se šířil i do dalších částí světa, roku 1993 byl výskyt *P. halstedii* popsán také v Jižní Africe (Viljoen et al., 1997) a zaznamenány jsou i výskyty v Asii (Virányi, 2002). Předpokládá se, že k šíření tohoto patogenu mezi kontinenty docházelo a dochází zejména při přepravě rostlinného materiálu, především osiva (Gulya, 2007; Virányi, 2002; Virányi a Spring, 2011). Tento předpoklad potvrzuje i skutečnost, že *P. halstedii* se vyskytuje prakticky ve všech oblastech, kde je slunečnice pěstována jako zemědělská plodina. Jediným kontinentem, kde nebyl výskyt doposud potvrzen, zůstává Austrálie. Nálezy peronospory na rostlinách r. *Arctotis* a *Arctotheca* byly revidovány a popsány jako *Plasmopara majewskii* sp. nov. (Constantinescu a Thines, 2010). Současný výskyt *P. halstedii* ve světě ilustruje Obrázek 2 převzatý z EPPO (2013).

První známý výskyt plísně slunečnice v Evropě byl zaznamenán v roce 1960 v tehdejší SSSR, v oblasti dnešní Ukrajiny (Delmotte et al., 2008), kde se zároveň nachází sekundární centrum rozšíření tohoto patogenu. Odtud se *P. halstedii* rozšířila na



Balkánský poloostrov a následně postupovala do států střední, jižní i západní Evropy (Virányi, 2002). Vzhledem k tomu, že se choroba nekontrolovatelně



**Obrázek 2** Orientační mapa rozšíření *P. halstedii* ve světě (EPPO, 2013).

- Výskyt *P. halstedii* s národním významem;
- + Výskyt *P. halstedii* jen v některých oblastech země s národním významem.

šířila a hrozilo riziko ohrožení evropských pěstitelů slunečnic, byla v roce 1977 *P. halstedii* zařazena mezi karanténní onemocnění ve všech zemích Evropy, kde je slunečnice pěstována (Delmotte et al., 2008). Epidemie hrozí zvláště v oblastech, kde je slunečnice pěstována na velkých plochách v optimálních klimatických podmínkách, např. v zemích jako Francie, Maďarsko, Španělsko nebo USA. V těchto zemích je také popisováno nejvíce ras *P. halstedii*, což je do jisté míry ale ovlivněno i skutečností, že v ohrožených oblastech probíhá nejintenzivnější výzkum tohoto patogenu. Tam, kde je slunečnice pěstována mimo své optimální podmínky, převažují obvykle jiné choroby (Kudlíková a Veverka, 1999) např. stříbřitost stonku (původce *Macrophomina phaseolina*), rzivost (původce *Puccinia helianthi*) nebo sklerotiniová hniloba (původce *Sclerotinia sclerotiorum*).

### 3.5.2. Rozšíření v České Republice

V někdejším Československu byla *P. halstedii* poprvé hlášena v roce 1950 V. Bojňanským a to z jižní Moravy a jižního Slovenska. Plíseň slunečnice byla později zaznamenána v roce 1999 na experimentálním pozemku Mendelovy univerzity v Brně (Veverka a Křížková–Kudlíková, 2006) a od té doby je tato choroba prakticky každoročně prokazována Státní rostlinolékařskou správou na pěstebních plochách na Jižní Moravě a ve Východních Čechách. Přesto je výskyt *P. halstedii* na našem území považován spíše za vzácný.

První podrobná studie o rozšíření *P. halstedii* na území České republiky proběhla až v letech 2007–2012 a byla realizována pracovníky Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (Sedlářová et al., 2010). Sledováno bylo 128 lokalit, přičemž výskyt patogenu byl potvrzen pouze na 7 z nich a z toho na 4 lokalitách byl patogen nalezen opakovaně (Sedlářová et al., 2013). *Plasmopara halstedii* byla zaznamenána především na provokačních pozemcích a experimentálních poličcích výzkumných ústavů, pouze v 1 případě se jednalo o poličko malopěstitele a v 1 případě o pozemek využívaný komerčně. Konkrétní lokality výskytu *P. halstedii* na území České republiky v Leducích, Čáslavi, Olomouci–Holici, Kroměříži, Brně–Chrlicích, Lednici a Podivíně jsou zobrazeny na Obrázku 3, upraveném podle podkladů (Sedlářová et al., 2013).



**Obrázek 3** Orientační mapa výskytu *Plasmopara halstedii* na území České republiky.

\* místo výskytu *P. halstedii*

### 3.6. Vnitrodruhová variabilita

Studium vnitrodruhové variability *P. halstedii* začalo ve 40. letech 20. stol., kdy byly na území dnešního Rumunska popsány dva mikrodrohy *P. halstedii* napadající slunečnice. Ze stejné doby existuje záznam o nové „rase“ *P. halstedii*, která se neobvykle rychle šířila v Jižním Rusku v oblasti Krasnodaru (Orellana, 1970). Teprve od 70. let 20. století byly odbornou veřejností rozlišovány dvě rasy. Jednalo se o tzv. Evropskou rasu (podle současné nomenklatury rasa 100) a americkou Red River Valley rasu (podle současné nomenklatury rasa 300) (Zimmer, 1974). Díky zintenzivnění studia patogenní variability *P. halstedii* a díky selekčnímu tlaku vytvořeným používáním fungicidů a prvních rezistentních odrůd slunečnice, byly v 80. a především 90. letech 20. stol. popsány další nové rasy v Evropě i v Americe (Rashid, 1993).

Systém určování ras *P. halstedii* byl zpočátku velmi nejednotný. První rasy byly pojmenovávány pořadovými čísly, což vedlo ke zmatku. Začalo se proto pracovat na široce uznávaném systému určení ras a na jednotné formě diferenciacního souboru.

Ke sjednocení došlo v roce 1991, kdy T. Gulya představil návrh jednotného diferenciacního souboru slunečnic a metody testování (Gulya et al., 1991). Navržený systém však nefungoval ideálně a bylo nutné učinit dílčí změny (Limpert a Muller, 1994). Navržené změny byly přijaty v roce 2000 (Tourvieille de Labrouhe et al., 2012) a diferenciacní soubor je v této podobě používán dodnes. Současný diferenciacní soubor je složen ze tří tripletů, přičemž každý triplet obsahuje tři diferenciacní linie slunečnice (Tabulka 1). Někteří autoři pro zjednodušení označují těchto devět diferenciacních linií jako D–1 až D–9. Jak již bylo řečeno, *P. halstedii* má schopnost v poměrně krátké době překonávat geny rezistence a v současnosti používaný diferenciacní soubor není schopen rozlišit nové, virulentnější rasy. Z toho důvodu byl přednesen návrh na rozšíření diferenciacního souboru o další 2 triplety (Tourvieille de Labrouhe, 2012).

**Tabulka 1** Diferenciační soubor a jeho reakce na nejběžnější rasy *P. halstedii*.

Název rasy	Linie diferenciačního souboru								
	První triplet			Druhý triplet			Třetí triplet		
	HA-304	RHA-265	RHA-274	PMI-3	PM-17	803-1	HAR-4	QHP1	HA335
100	s	R	R	R	R	R	R	R	R
300	s	s	R	R	R	R	R	R	R
700	s	s	s	R	R	R	R	R	R
704	s	s	s	R	R	R	R	R	s
710	s	s	s	s	R	R	R	R	R
730	s	s	s	s	s	R	R	R	R
770	s	s	s	s	s	s	R	R	R

s = náchylná fenotypová reakce

R = rezistentní fenotypová reakce

V současnosti je určení rasy izolátu založeno na principu interakce gen proti genu (Agrios, 2005). Spočívá v tom, že každá rasa *P. halstedii* nesoucí určitou kombinaci genů virulence je schopna napadat jen určité kultivary slunečnice, které nenesou odpovídající geny rezistence. Na základě toho byl sestaven mezinárodně standardizovaný diferenciační soubor kultivarů slunečnic, kde každý kultivar odpovídá jedné diferenciační linii a nese specifický gen nebo kombinaci genů rezistence, která ji odlišuje od ostatních (Gulya et al., 1991). Pokud inokulujeme všechny linie diferenciačního souboru jedním izolátem, můžeme zaznamenat, že některé linie jsou patogenem napadány (označujeme je jako náchylné) a některé jsou i přes inokulaci a kultivaci rostlin v podmínkách vyhovujících patogenu zdravé (označujeme je jako rezistentní). Specifická kombinace reakcí linií diferenciačního souboru potom určuje rasu testovaného izolátu. Podle toho, které diferenciační linie jsou vůči testovanému izolátu *P. halstedii* rezistentní a které náchylné, přidělujeme danému izolátu třímístný kód označující rasu podle tripletového kódovacího systému (Tabulka 2).

Třímístný kód, který představuje jméno rasy, zároveň nese informaci o její virulenci, a proto se tvoří podle následujících pravidel. Pokud byla po vyhodnocení testu první diferenciační linie z tripletu (HA-304, PMI-3 nebo HAR-4) označena jako náchylná, získala hodnotu 1. Pokud se jako náchylná jevila druhá diferenciační linie z tripletu (RHA-265, PM-17 nebo QHP-1), získala hodnotu 2. V případě, že se třetí diferenciační linie z tripletu (RHA-274, 803-1 nebo HA-335) v průběhu testu projevila jako náchylná, získala hodnotu 4. Pokud byla jakákoli diferenciační linie v průběhu

testu vyhodnocena jako rezistentní, získala vždy hodnotu 0. V závěru hodnocení tedy dostaneme 9 přidělených hodnot (1,2,4 nebo 0) seřazených do 3 skupin, které vyjadřují reakce jednotlivých diferenačních linií na testovaný izolát *P. halstedii*. Jak již bylo řečeno, tripletový kód je třímístný a diferenační soubor je tvořen třemi triplety. Každá číslice tohoto unikátního kódu je tedy získána jako součet hodnot přiřazených liniím daného tripletu a díky tomu je v kódu obsažena úplná informace o virulenci izolátu.

**Tabulka 2** Příklad vytvoření tripletového kódu.

Název diferenační linie	První triplet			Druhý triplet			Třetí triplet		
	HA-304	RHA-265	RHA-274	PMI-3	PM-17	803-1	HAR-4	QHP1	HA335
reakce diferenační linie	s	s	s	R	R	R	R	s	R
Přidělená hodnota	1	2	4	0	0	0	0	2	0
součet přidělených hodnot	1 + 2 + 4 = 7			0 + 0 + 0 = 0			0 + 2 + 0 = 2		
Název rasy = třímístný kód	7			0			2		

s = náchylná fenotypová reakce

R = rezistentní fenotypová reakce

V roce 2006 byl sestaven seznam všech známých ras z nejvýznamnějších zemí pěstujících slunečnici. Doposud bylo popsáno 36 ras *P. halstedii* (Gulya, 2007) z celého světa. V Evropě je v současné době známo 22 různých ras *P. halstedii*. Z dostupných zdrojů vyplývá, že existují velké rozdíly ve virulenci a rozšíření ras mezi jednotlivými zeměmi i kontinenty. Některé rasy se vyskytují pouze v určitých oblastech, jiné, jako např. rasy 700, 710, 730 a 770, jsou popisovány z celého světa (Gulya, 2007). Vzhledem k prohlubující se globalizaci se však tato situace může do budoucna podstatně měnit. Například ve Francii bylo do roku 2008 popsáno 14 ras *P. halstedii*. Tamní výzkumy naznačují, že současná rozmanitost ras byla nejspíše způsobena opakovaným zavlečením tohoto patogenu do Francie (Delmotte et al., 2012). Největší patogenní variabilita *P. halstedii* je v Severní Americe, kde bylo prozatím identifikováno 24 ras, následuje Evropa s 21 rasami, Afrika s 10 rasami a v Jižní Americe a Asii je popsáno 5 ras (Gulya, 2007). Vysoká patogenní variabilita v Evropě a v Severní Americe může být do jisté míry zkreslující a to z důvodu poměrně intenzivního studia *P. halstedii* v těchto oblastech ve srovnání s jinými částmi světa.

V České republice byla patogenní variabilita *P. halstedii* podrobněji zkoumána v letech 2007–2011 fytopatologickou laboratoří Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Celkem bylo na území České republiky metodou inokulace diskových listů detekováno 6 ras. Drtivá většina z 54 testovaných izolátů byla identifikována jako rasa 700, virulentnější rasa 770 byla zaznamenána ve čtyřech, a rasa 730 ve třech případech. Ostatní rasy (704, 714 a 774) byly zaznamenány u maximálně 2 testovaných izolátů (Stojaspal, 2009; Trojanová, dosud nepublikováno).

## 4. Plíseň slunečnice

*Plasmopara halstedii* je patogen způsobující významnou karanténní chorobu plíseň slunečnice (dříve uváděnou jako plíseň slunečnicovou). Oospory původce choroby přežívají v půdě až 10 let, díky čemuž hrozí kontaminace pozemku a další šíření této choroby. *P. halstedii* působí ekonomické ztráty ve všech oblastech pěstování slunečnice, zejména snižuje výnosy semen (Čača et al., 1981), protože systémově napadené rostliny zpravidla neprodukuje žádná nebo dostatečně olejnatá semena (Baiswar et al., 2009) a navíc zakrslé systémově infikované rostliny nelze sklízet standardními postupy. Proto byla roku 1977 plíseň slunečnice prohlášena za hlavní chorobu slunečnic ve všech evropských zemích, kde se tato plodina pěstuje (Sackston, 1981).

### 4.1. Symptomy

*Plasmopara halstedii* může vyvolat různé symptomy v závislosti na věku hostitele, podmínkách prostředí a způsobu infekce (EPPO, 2013). Při primární infekci semenáčků zoosporami z půdy zpravidla dochází k systémové infekci. U mladých rostlin tato infekce vrcholí buď padáním klíčnic rostlin nebo produkcí zoosporangií, které vyrůstají na sporangioforech tvořících bílý povlak na děložních lístcích hostitele (Spring et al., 1991). Pokud rostlinky přežijí, dochází k rozvoji systémové infekce a rostliny začínají vykazovat typické symptomy. Zkrácení internodií vede k zakrslému růstu a na listech se objevují charakteristické chlorotické léze, které jsou nejzřetelnější podél listové žilnatiny (Sackston, 1981). Za příznivých klimatických podmínek vyrůstají na spodní straně listů sporangiofory, které často tvoří souvislý bílý povlak odpovídající chlorotické části listu (Čača et al., 1981; EPPO, 2013). Plíseň slunečnicová také ovlivňuje kvetení a tvorbu semen. Pouze cca 30% napadených rostlin tvoří květenství, které však bývá deformované a výnos semen klesá až cca o 75% (Čača et al., 1981).

Vedle systémové infekce může dojít k infekci latentní. Při latentní infekci jsou napadeny buď děložní lístky, nebo podzemní orgány rostlin. K nárůstu zoosporangií potom dochází pouze na napadených částech těla hostitele, tj. na kořenovém systému a případně na spodní části hypokotylu.

Při sekundární infekci vyvolané zoosporami, které jsou produkovány v nepohlavní části životního cyklu, se na listech vzrostlých rostlin tvoří ohraničené chlorotické léze, z nichž mohou na spodní straně listu znovu vyrůst zoosporangia (Sackston, 1981).



**Obrázek 4** Symptomy vyvolané *P. halstedii* A – zakrslost, B – chlorotická léze na listu, C – sporulace na spodní straně listu, D – sporulace v místě ohraničené léze vyvolané sekundární infekcí.

Hlavní obrannou reakcí proti primární infekci v průběhu inkompatibilní interakce je hypersenzitivní reakce v hypokotylu napadané rostliny (Mouzeyar et al., 1993). Obranná reakce probíhá cca po 5 dnech od infekce kořenů rostliny řízenou smrtí buněk v oblasti hypokotylu, kterým prorůstá mycelium *P. halstedii* dál do nadzemních orgánů napadené rostliny (Radwan et al., 2005). Tím, že cíleně odumřelé buňky neposkytují patogenu zdroj výživy, kterou vyžaduje pro růst mycelia, rostlina zamezuje patogenu, aby se šířil dál jejím tělem. Tímto způsobem se brání všechny kultivary slunečnice, ale jen u rezistentních kultivarů je obranná reakce natolik úspěšná, že je růst parazita zastaven už v hypokotylu a nedosáhne listů hostitele (Mouzeyar et al., 1994).



U náchylných kultivarů slunečnic dochází k hypersenzitivní reakci pouze v omezené míře, která není dostačující pro zastavení růstu patogenu.

#### 4.2. Přenos choroby a ochrana proti *P. halstedii*

Přenos patogenu a šíření choroby probíhá třemi způsoby: kontaminovanou půdou (oospory), větrem (zoosporangia) nebo osivem (mycelium). Oospory se v půdním prostředí šíří za pomoci tekoucí vody, nebo jsou rozšiřovány při obdělávání pozemku (orba, vláčení) a způsobují primární infekci rostlin (EPPO, 2013), ke které jsou slunečnice nejnáchylnější do stáří dvou až tři týdnů. Jako ochrana proti tomuto typu přenosu se využívá pěstování rezistentních odrůd slunečnice v kombinaci s mořením osiva fungicidy na bázi metalaxylu (Spurný, 2005). Zoosporangia, která produkuje patogen na infikovaných rostlinách, se rozšiřují větrem a způsobují sekundární infekce. V porostu náchylné plodiny může šíření zoospor vést k epidemii (Sedlářová et al., 2010) a může se vysokou měrou podílet na produkci kontaminovaného osiva (Spring, 2001). Ochranu proti tomuto typu infekce představují rezistentní odrůdy slunečnice. Na malých pěstebních plochách je možné zabránit šíření zoosporangií včasným odhalením a likvidací infikovaných rostlin, které jsou zdroji inokula.

*Plasmopara halstedii* se může do jisté míry rozšiřovat kontaminovaným osivem. Semena vzniklá v květenství zpravidla sekundárně napadených rostlin mohou pod osemením nést mycelium patogenu, které přežívá a může v další sezóně způsobit infekci klíčící rostliny. Tomuto typu šíření lze zabránit používáním pouze certifikovaného osiva, u kterého je vyloučena přítomnost patogenu. *Plasmopara halstedii* se nejúčinněji šíří oosporami v půdě. Z hlediska rozšiřování choroby nepovažujeme vítr za důležitý faktor. Nicméně v oblastech s příznivými klimatickými podmínkami můžeme sekundární infekci rostlin způsobenou větrem přenášenými zoosporangii považovat za významnou.

Nejefektivnější ochranou proti infekci slunečnic *P. halstedii* je zabránění vzniku primární infekce rostlin. Toho lze dosáhnout pěstováním certifikovaného rezistentního mořeného osiva v nekontaminované půdě. V případě, že se choroba vyskytne, je nutné zamezit jejímu šíření a zabránit kontaminaci půdy. Na pozemcích zamořených oosporami je třeba dodržet karanténní opatření a nepěstovat na nich slunečnici min. 10 let.

#### **4.3. Rezistence *P. halstedii* vůči fungicidům.**

Ochrana slunečnic proti *P. halstedii* byla v minulosti založena především na používání fungicidů. Avšak dlouhodobé používání těchto látek vedlo k selekci rezistentních izolátů (Molinero–Ruiz et al., 2003) a v současnosti není dostupný žádný přípravek, který by rostliny stoprocentně ochránil. Již v 90. letech 20. stol. byly u izolátů *P. halstedii* získaných z Evropy pozorovány rozdíly v toleranci vůči metalaxylu (Virányi et al., 1992). První zprávy o rezistenci tohoto patogenu vůči metalaxylu jsou hlášeny z Francie z let 1995 a 1996, pouze 6 let od začátku používání metalaxylu v zemědělství (Albourie et al., 1998). Rezistentní izoláty byly hlášeny i ze Španělska (Moliero–Ruiz et al., 2003) nebo Německa (Spring et al., 2006). V České republice zatím nebyla *P. halstedii* na odolnost vůči metalaxylu testována.

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Rostlinný materiál

Udržování a množení izolátů *P. halstedii* bylo prováděno na náchylném kultivaru slunečnice roční *Helianthus annuus* cv. Giganteus (Benary, Han.–Münden, Německo), který postrádá geny rezistence vůči *P. halstedii*. Osivo linií diferenciačního souboru používané při testování bylo získáno vlastním přesevem originálního osiva v létě 2012 (Obrázek 5). Originální osivo diferenciačních linií laskavě poskytli Reinhard Zipper z Univerzity Hohenheim, Německo (HA-304, PMI-3 a QHP-1), Dr. Thomas Gulya z ARS USDA ve Fargu, Severní Dakota, USA (RHA-265, RHA-274, DM-2, PM-17, 803-1, HAR-4, HAR-5) a Prof. Karel Veverka z VÚRV Praha-Ruzyně (HA-335). Vyprodukované osivo bylo vyčištěno a po 2 měsíce skladováno v -20 °C. Semena byla poté uchovávána v semenářských sáčcích v lednici se stálou teplotou 4 °C bez přístupu světla.



**Obrázek 5** Přesev linií diferenciačního souboru a produkce osiva v létě 2012.

## 5.2. Izoláty *P. halstedii*

Testované izoláty *P. halstedii* pochází ze sběrů na území České Republiky provedené pracovníky Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením prof. Ing. Aleše Lebedy, DrSc.. Izoláty byly přemnoženy z originálního inokula uskladněného v -80 °C a po dobu experimentu byly podle potřeby přemnožovány a uchovávány v pracovní kolekci při -20 °C.

**Tabulka 3** Seznam testovaných izolátů *P. halstedii*

Označení izolátu	Rok sběru	Název lokality	Rasa <sup>a</sup>
1201	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1201 (K2) <sup>b</sup>	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1202	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1203	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1204	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1205	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1207	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1207 (K1) <sup>b</sup>	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1208	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
1210	2012	Olomouc – Holice	neurčeno
0001	poskytnuto r. 2007	Maďarsko <sup>c</sup>	730
1009	2010	Podivín	730
1108	2012	Brno – Chrlice	700
1111	2011	Podivín	714
1112	2011	Podivín	704
1115	2011	Podivín	704
1120	2011	Lednice	700
1124	2011	Olomouc – Holice	770
1125	2011	Olomouc – Holice	770

<sup>a</sup> rasa byla určena pomocí metody inokulace listových disků (LDI)

<sup>b</sup> monozygotický izolát

<sup>c</sup> referenční izolát ze sbírky prof. Ference Virányiho ze St. Stefan Univerzity v Gödöllő, Maďarsko

## 5.3. Udržování a množení izolátů *P. halstedii*

Rostliny pro udržování a množení kultury vřetenatky byly pěstovány podle upraveného postupu dr. Gulyi (Gulya, 1991). Semena slunečnice cv. Giganteus byla vložena do kádinky a dezinfikována ponořením do 10 % roztoku Sava (Bochemie a.s., Bohumín, Česká Republika) s několika kapkami detergentu (např. Jar na nádobí) pro podpoření smáčivosti po dobu 15 minut. Poté byla alespoň 1 minutu proplachována proudem čisté vody, dokud se nezbavila stop dezinfekčního roztoku. Dezinfikovaná

semena byla vyseta na dno Petriho misky pokryté filtračním papírem, zalita destilovanou vodou tak, aby byla téměř ponořená a takto byla kultivována 3 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Po třech hodinách byla přebytečná voda odstraněna a semena na misce byla upravena tak, aby se nedotýkala. Klíčení probíhalo na vlhkém filtračním papíru v uzavřené Petriho misce při pokojové teplotě ve tmě a 2–4 dny.

Pro inokulaci byly vybírány semenáčky s cca 1,5 cm dlouhým kořínkem a dobře vyvinutým kořenovým vlášením. Vybrané semenáčky nesměly být napadeny kontaminujícími organismy (bakterie, plísně) a zároveň nesměly vykazovat žádné další anomálie (deformace, barevné změny).

Stejně semenáčky byly používány i pro vypěstování materiálu nutného k testování rezistence *P. halstedii* vůči metalaxylu. Zdravé, nedeformované, 2–4 dny staré semenáčky vyrostlé ze semen povrchově dezinfikovaných roztokem Sava byly vysázeny do plastových květináčů s Perlitem (Agroperlit, Nový Jičín, Česká Republika) a pěstovány ve skleníku po dobu 14 dní. Rostlinky byly během pěstování 1x týdně přihnojeny hnojivem značky Kristalon (Agro CS a. s., Říkov, Česká Republika). K testování rezistence izolátů vůči fungicidu byly používány plně vyvinuté, nepoškozené děložní lístky 14 dní starých rostlin.



**Obrázek 6** A – materiál a pomůcky nutné k přípravě inokula, B – semenáčky slunečnic vhodné k inokulaci.

Inokulum potřebné k inokulaci naklíčených semen bylo připravováno podle postupu, který uvádí Gulya (Gulya, 1996). Pro přípravu inokula byla používána zoosporangia buď čerstvá, právě narostlá na infikovaných semenáčcích slunečnice cv. Giganteus, nebo mražená uchovávaná na děložních lístcích cv. Giganteus v alobalu v mrazničce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Několik děložních lístků se sporangiofory a zoosporangii *P. halstedii* bylo vloženo do plastové zkumavky, zalito 1–5 ml destilované vody (podle množství materiálu a intenzity sporulace) a šetrně protřepáno pomocí třepačky (2–3 krát 3 s, max. 2500 rpm). Zbytky pletiva byly ze suspenze odstraněny sterilní pinzetou. Kvalita inokula byla zkontrolována pod mikroskopem a koncentrace upravena tak, aby odpovídala hodnotě cca 10 000 životaschopných zoosporangií v 1 ml.



**Obrázek 7** A – kultivace infikovaných semenáčků v kultivační skříni, B – indukce sporulace *P. halstedii* v uzavřených krabičkách se 100% vlhkostí.

Ze semenáčků bylo šetrně odstraněno osemení a byly ihned vkládány do inokula tak, aby byly zcela ponořené. Inokulace probíhala ve tmě po dobu 3 h při teplotě  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$  a v průběhu inokulace byla zkontrolována přítomnost živých zoospor pomocí mikroskopu. Inokulované semenáčky byly vysázeny do zvlhčeného Perlitu a pěstovány v kultivační skříni při teplotě  $19/18\text{ }^{\circ}\text{C}$  s fotoperiodou 12/12 hodin (den/noc) po dobu 9–13 dní. Přibližně jedenáctý den po inokulaci (podle velikosti semenáčků a závažnosti symptomů), kdy jsou první pravé lístky cca 0,5 cm dlouhé, byly nadzemní části

semenáčků odstřiženy sterilními nůžkami a uzavřeny do plastové krabičky s navlhčenou buničinou. Tím byla zajištěna 100% vzdušná vlhkost nutná k indukci růstu sporangioforů a zoosporangií. Indukce sporulace probíhala 16–24 hodin ve tmě při teplotě 18–19 °C. Zoosporangia vyrostlá na děložních lístcích byla používána k přípravě inokula pro experimenty nebo mohla být znovu přemnožena či zamražena v -20 °C pro další použití.

#### 5.4. Určení ras izolátů metodou inokulace semenáčků (WSI)

Rasy izolátů byly určovány metodou zvanou inokulace semenáčků – whole seedling inoculation (WSI) (Gulya et al., 1998) a pro tzv. patotesty (patotest = test na určení rasy 1 izolátu) bylo používáno 9 základních genotypů slunečnice (HA–304, RHA–265, RHA–274; PMI–3, PM–17, 803–1; HAR–4, QHP–1 a HA–335), 2 doplňkové (DM–2 – starší diferenciační linie odpovídající PMI–3 a HAR–5 – starší dif. linie odpovídající QHP–1) a 1 kontrolní linie (cv. Giganteus). Semenáčky jednotlivých diferenciačních linií pro patotest byly připravovány podle postupu popsaného v kapitole 5.1.. Vždy 10 semenáčků od každé diferenciační linie bylo vysázeno v řadách do tácu naplněného do 2/3 zvlhčeným perlitem tak, aby kořinky směřovaly ke dnu tácu a rostlinka nebyla zcela ponořená do perlitu.



**Obrázek 8** Vysadba semenáčků jednotlivých diferenciačních linií do perlitu.

Inokulum, tj. suspenze zoosporangií *P. halstedii* v destilované vodě, bylo připravováno vždy z čerstvě narostlých zoosporangií požadovaného izolátu podle postupu popsaného v kapitole 5.3.. Poté byla pomocí Bürkerovy počítací komůrky stanovena koncentrace připraveného inokula podle vzorce:

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

kde X = počet zoosporangií v 1 ml a Y = průměrný počet zoosporangií v 10 počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky. Poté bylo vypočítáno množství tekutiny, které při dané koncentraci obsahuje cca 10 000 životaschopných zoosporangií podle vzorce:

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

kde Z = objem inokula s 10000 zoosporangii a X = počet zoosporangií v 1 ml. Pokud se vypočítaný objem pohyboval mezi 20–40 µl bylo možno ihned přistoupit k inokulaci patotestu. V opačném případě bylo nutné zakoncentrovat inokulum přidáním dalších zoosporangií nebo naředit inokulum destilovanou vodou a znovu stanovit koncentraci.

Vypočteným objemem inokula, který obsahoval cca 10 000 zoosporangií, byl inokulovaný každý semenáček patotestu. Automatickou pipetou byla přímo na každou rostlinku nanесena požadovaná dávka inokula. Pro minimalizaci odchylek v množství zoosporangií pro každou rostlinku bylo nutné dbát na to, aby inokulum bylo po celou dobu inokulace homogenní (protřepávání před odebráním další dávky) a aby každá rostlinka dostala právě jednu dávku inokula.

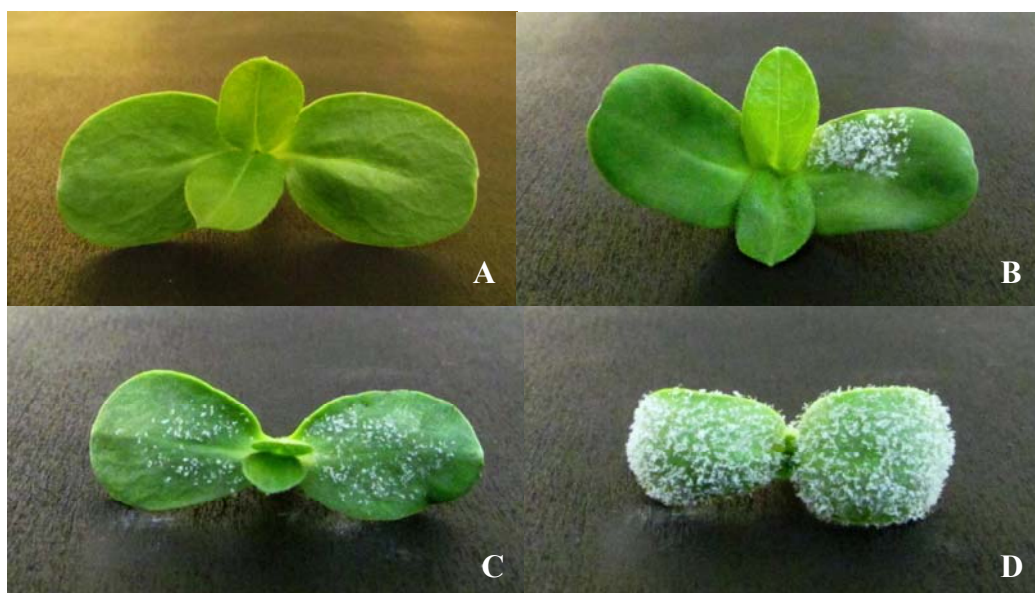
Po dokončení inokulace všech rostlin patotestu byla na semenáčky nanесena cca 1 cm silná vrstva zvlhčeného perlitu. Táč s rostlinami byl poté přenesen do fytotronu a prvních 12–16 hodin (do rána následujícího dne) byl kultivován pod tmavou fólií při 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc. Poté byla fólie odstraněna a rostliny byly ve stejných podmínkách pěstovány a podle potřeby zalévány po 13 dní. Třináctý den byly vytvořeny podmínky vhodné pro sporulaci patogenu (100% vzdušná vlhkost a tma). Rostlinky byly pomocí rozprašovače navlhčeny destilovanou vodou a táč byl vložen do dostatečně velké neprůhledné plastové bedny s víkem tak, aby se rostlinky ničeho nedotýkaly. Bedna se zatemněnými rostlinami patotestu byla ponechána ve fytotronu při 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc a po 16–24 hodinách, tj. 14. den po inokulaci bylo provedeno hodnocení. Hodnocení patotestu a určení rasy izolátu probíhalo ve třech



krocích. Nejprve byla pomocí semikvantitativní stupnice odhadnuta míra napadení každé rostliny v patotestu. Podle toho, na kolika procentech plochy rostlinného těla se vyskytovala sporulace, byl rostlině přidělen jeden ze čtyř stupňů napadení.



**Obrázek 9** Táč s diferenciačními liniemi slunečnice po čtrnáctidenní kultivaci a 12 hodinách zatmění při 100% vlhkosti.



**Obrázek 10** Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *P. halstedii*. A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).

**Tabulka 4** Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *P. halstedii*.

Stupeň napadení	Procento povrchu rostliny pokryté sporangioforami
0	0%
1	do 25%
2	nad 25% a do 50%
3	nad 50 %

Dalším krokem byl výpočet míry napadení pro každou diferenční linii (10 rostlin) podle vzorce:

$$P = \frac{\sum (n \cdot v) \cdot 100}{x \cdot N}$$

kde P = míra napadení diferenční linie, n = počet rostlin s příslušným stupněm napadení, v = příslušný stupeň napadení, x = 3 (rozsah stupnice), N = celkový počet hodnocených rostlin v diferenční linii. Na základě procentuálně vyjádřené míry napadení jednotlivých diferenčních linií bylo možné určit, jsou-li dané diferenční linie k testovanému izolátu *P. halstedii* náchylné nebo rezistentní. Míra napadení kontrolní linie cv. Giganteus musela být min 70%, jinak byl patotest vyhodnocen jako neprůkazný a bylo nutné jej opakovat. Pokud stupeň napadení diferenční linie přesáhl 50 %, byla diferenční linie hodnocena jako náchylná a pokud stupeň napadení diferenční linie nedosáhl 30 %, byla linie hodnocena jako rezistentní. Pokud se stupeň napadení diferenční linie pohyboval v rozmezí 30–50 %, byly napadené rostliny diferenční linie odebrány a použity jako zdroj zoosporangií pro novou inokulaci. Nově vytvořený izolát byl přemnožen a znovu testován. Pokud se procento napadení u diferenční linie, ze které byl izolát přemnožen, zvýšilo, byl původní izolát považován za směs několika ras, ve které se nově přemnožená a testovaná rasa vyskytuje v nižší frekvenci.

Poslední částí experimentu bylo přiřazení třímístného kódu podle pravidel tripletového kódovacího systému, čímž byla určena a pojmenována rasa testovaného izolátu.

### 5.5. Test rezistence izolátů vůči metalaxylu

Odolnost izolátů *P. halstedii* vůči fungicidu metalaxyl byla testována metodou listových disků. Rostliny pro přípravu listových disků byly pěstovány způsobem

popsaným v kapitole 5.1.. Z vypěstovaných rostlin byly sterilní pinzetou a nůžkami ostříhány děložní lístky, které byly na prkénku rozřezány žiletkou na listové disky čtvercového tvaru o délce strany 6 mm, které byly ponořeny do destilované vody, aby v průběhu práce neztrácely turgor a neusychaly.

Samotný test probíhal v plastové kultivační destičce s 24 komůrkami (Nunc 24-well Multidish). Do 12 komůrek v horní polovině kultivační destičky bylo napipetováno 900  $\mu$ l destilované vody, zatímco do 12 komůrek v dolní polovině kultivační destičky bylo napipetováno 900  $\mu$ l roztoku metalaxylu (N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-D-alanine methyl ester, analytical standard, Fluka) o koncentraci 10 mg/l.

Těsně před umístěním do jamek destičky byly disky šetrně osušeny mezi dvěma vrstvami buničiny. Jakýmkoli způsobem poškozené disky nebyly pro testování použity. Do každé komůrky v destičce byl poté šetrně vložen pinzetou jeden listový disk, tak aby plaval na své svrchní straně (tedy byl abaxiální stranou vzhůru).

Každý listový disk byl inokulován kapkou inokula umístěné do středu disku tak, aby nesklouzla do okolní tekutiny. Inokulum bylo připraveno stejným způsobem, jaký byl popsán v kapitole 5.3. Určení ras izolátů metodou WSI s tím rozdílem, že koncentrace inokula byla upravena tak, aby 10 000 zoosporangií bylo obsaženo v 10–15  $\mu$ l tekutiny. Aby bylo možné následující den určit klíčivost zoosporangií, byla jedna dávka inokula napipetována také přímo do destilované vody v levé horní jamce A1 a jedna dávka do metalaxylu v levé spodní jamce D1.

Destička s inokulovanými disky byla inkubována 12–16 hodin (do druhého dne) bez přístupu světla při 18–19°C a po odkrytí byla dále kultivována při 19/18°C, 12/12 hodin, den/noc. Klíčivost zoosporangií byla pozorována pod inverzním mikroskopem v jamkách A1 a D1 24 hodin po inokulaci. V příslušné jamce bylo při 100násobném zvětšení nalezeno místo s homogenně distribuovanými zoosporangii a v zorném poli byla spočítána zvlášť neživotaschopná tmavá zoosporangia s obsahem uvnitř, která neuvolnila žádné zoospory a prázdné schránky životaschopných zoosporangií, které zoospory uvolnily. Klíčivost zoosporangií v destilované vodě a v roztoku metalaxylu byla spočítána podle rovnice:

$$C = \frac{A}{A + B} \times 100$$

kde C = klíčivost zoosporangií, A = počet neživotaschopných zoosporangií, B = počet prázdných schránek.

Test na rezistenci izolátu *P. halstedii* vůči metalaxylu byl považován za průkazný, pokud klíčivost zoosporangií dosáhla v obou případech minimálně 90 %.

Čtrnáctý den po inokulaci bylo provedeno hodnocení testu. Každý listový disk na destičce byl prohlédnut pod binokulární lupou a do protokolu bylo zaznamenáno, zda se na něm po kultivaci objevily sporangiofory *P. halstedii*. Testovaný izolát byl označen jako rezistentní k metalaxylu pokud bylo vřetenatkou napadeno minimálně 75 % listových disků kultivovaných v komůrkách s roztokem metalaxylu. Test byl označen jako průkazný, pokud se sporangiofory *P. halstedii* objevily minimálně na 75 % kontrolních listových disků kultivovaných v destilované vodě.

## 6. Výsledky

### 6.1. Rasy *P. halstedii* v České republice

Metodou inokulace semenáčků bylo testováno celkem 19 izolátů z let 2010 až 2012. Pomocí metody inokulace semenáčků byly u izolátů z roku 2012 zjištěny tři rasy. Rasa 710 byla identifikována u všech izolátů pocházejících z pozemku Katedry botaniky PřF UP z Olomouce–Holic. Rasa 700 byla identifikována v jenom případě u monozoosporického izolátu vytvořeného z mateřského izolátu pocházejícího z experimentálního pole v Olomouci–Holic. Rasa 704 byla identifikována u jediného izolátu pocházejícího z provokačního pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici. Výsledky testování včetně procentuálně vyjádřeného stupně napadení jednotlivých diferenciačních linií jsou uvedeny v Tabulkách 5 a 6.

Rasa 710 byla identifikována v 5 případech a výskyt rasy 710 byl prokázán v Olomouci–Holic, Lednici, Podivíně a na blíže neurčené lokalitě v Maďarsku. Rasy 700 a 704 byly určeny vždy u jednoho z izolátů, v roce 2012 nepotvrzená rasa 714 byla prokázána u 2 izolátů. Přítomnost rasy 700 byla potvrzena na provokačním poli Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně–Chrlicích a rasa 704 a 714 se vyskytují na komerčně využívaném poličku v Podivíně. Výsledky testování včetně procentuálně vyjádřeného stupně napadení jednotlivých diferenciačních linií jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Tabulka 5** Výsledky dvojic testů určení rasy izolátů z roku 2012 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů									
	1201 (K2)	1201 (K2)	1201	1201	1202	1202	1203	1203	1204	1204
HA-304	<b>30,0<sup>a</sup></b>	<b>0,0<sup>a</sup></b>	<b>80,0</b>	<b>50,0</b>	<b>33,3<sup>a</sup></b>	<b>26,6<sup>a</sup></b>	<b>20,0<sup>a</sup></b>	<b>73,3</b>	<b>70,0</b>	<b>73,3</b>
RHA-265	<b>96,6</b>	<b>56,6</b>	<b>96,6</b>	<b>83,3</b>	<b>100,0</b>	<b>96,6</b>	<b>100,0</b>	<b>86,6</b>	<b>96,6</b>	<b>100,0</b>
RHA-274	<b>53,3</b>	<b>60,0</b>	<b>100,0</b>	<b>76,6</b>	<b>95,8</b>	<b>83,3</b>	<b>100,0</b>	<b>90,0</b>	<b>100,0</b>	<b>73,3</b>
PMI-3	0,0	6,6	<b>100,0</b>	<b>56,6</b>	<b>23,3<sup>b</sup></b>	<b>20,0<sup>b</sup></b>	<b>36,6<sup>b</sup></b>	<b>66,6</b>	<b>40,0<sup>b</sup></b>	<b>46,6<sup>b</sup></b>
PM-17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	13,3	0,0	0,0
803-1	30,0 <sup>c</sup>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAR-4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
QHP-1	0,0	20,0	33,3 <sup>d</sup>	3,3	0,0	30,0 <sup>d</sup>	3,3	20,0	6,6	26,6
HA-335	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Giganteus	<b>93,3</b>	<b>90,0</b>	<b>100,0</b>	<b>63,3</b>	<b>93,3</b>	<b>83,3</b>	<b>96,6</b>	<b>86,6</b>	<b>86,6</b>	<b>93,3</b>
Rasa	700	700	710	710	710	710	710	710	710	710

<sup>a</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (Giganteus) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>b</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>c</sup> chyba při výsadbě semenáčků, opakování testu nepotvrdilo výsledek (data nejsou uvedena), diferenciační linie je vyhodnocena jako rezistentní

<sup>d</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (HAR-5, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní

**Tabulka 6** Výsledky dvojic testů určení rasy izolátů z roku 2012 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů									
	1205	1205	1207 (K1)	1207 (K1)	1207	1207	1208	1208	1210	1210
HA-304	<b>23,3<sup>a</sup></b>	<b>56,6</b>	<b>63,3</b>	<b>10,0<sup>a</sup></b>	<b>43,3<sup>a</sup></b>	<b>93,3</b>	<b>53,3</b>	<b>50,0</b>	<b>76,6</b>	<b>60,0</b>
RHA-265	<b>96,6</b>	<b>100,0</b>	<b>96,6</b>	<b>86,6</b>	<b>90,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>83,3</b>	<b>96,6</b>	<b>83,3</b>
RHA-274	<b>96,6</b>	<b>96,6</b>	<b>90,0</b>	<b>60,0</b>	<b>93,3</b>	<b>96,6</b>	<b>100,0</b>	<b>76,6</b>	<b>85,7</b>	<b>96,6</b>
PMI-3	<b>76,6</b>	<b>73,3</b>	<b>76,6</b>	<b>30,0<sup>b</sup></b>	<b>80,0</b>	<b>50,0<sup>b</sup></b>	<b>70,0</b>	<b>43,3<sup>b</sup></b>	0,0	0,0
PM-17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	13,3	0,0	6,0	0,0	0,0
803-1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAR-4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
QHP-1	46,6 <sup>d</sup>	10,0	13,3	0,0	0,0	0,0	6,6	13,3	12,5	16,6
HA-335	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	<b>100,0</b>	<b>93,3</b>
Giganteus	<b>100,0</b>	<b>86,6</b>	<b>76,6</b>	<b>93,3</b>	<b>96,6</b>	<b>85,1</b>	<b>73,3</b>	<b>93,3</b>	<b>100,0</b>	<b>96,2</b>
Rasa	710	710	710	710	710	710	710	710	704	704

<sup>a</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (Giganteus) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>b</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>d</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (HAR-5, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní

**Tabulka 7** Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2010 a 2011 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů								
	0001	1009	1108	1111	1112	1115	1120	1124	1125
HA-304	<b>56,6</b>	<b>23,3<sup>a</sup></b>	<b>66,6</b>	<b>33,3<sup>a</sup></b>	<b>40,0<sup>a</sup></b>	<b>23,3<sup>a</sup></b>	<b>96,6</b>	<b>40,7<sup>a</sup></b>	<b>33,3<sup>a</sup></b>
RHA-265	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>76,6</b>	<b>96,6</b>	<b>93,3</b>	<b>90,0</b>	<b>96,6</b>	<b>95,8</b>	<b>60,0</b>
RHA-274	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>60,0</b>	<b>93,3</b>	<b>100,0</b>	<b>96,6</b>	<b>88,8</b>	83,3	<b>73,3</b>
PMI-3	<b>70,0</b>	<b>83,3</b>	0,0	<b>76,6</b>	<b>80,0</b>	0,0	<b>56,6</b>	<b>96,6</b>	<b>50,0<sup>b</sup></b>
PM-17	0,0	0,0	0,0	26,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
803-1	3,3	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
HAR-4	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
QHP-1	10,0	30,0 <sup>d</sup>	0,0	40,0 <sup>d</sup>	0,0	20,0	3,3	56,6	10,0
HA-335	0,0	0,0	0,0	<b>86,6</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	0,0	0,0	<b>0,0</b>
Giganteus	<b>93,3</b>	<b>96,6</b>	<b>80,0</b>	<b>93,3</b>	<b>100</b>	<b>93,3</b>	<b>100,0</b>	<b>83,3</b>	<b>86,6</b>
Rasa	710	710	700	714	714	704	710	710	710

<sup>a</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (Giganteus) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>b</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

<sup>d</sup> osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (HAR-5, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní



## 6.2. Srovnání metod inokulace semenáčků (WSI) a inokulace listových disků (LDI)

Rasy determinované pomocí metody inokulace semenáčků se u některých izolátů neshodovaly s předchozím určením pomocí metody inokulace listových disků. Ze získaných dat je patrné, že metoda inokulace semenáčků přinesla jednoznačnější fenotypovou reakci diferenciačního souboru. Porovnání ras testovaných izolátů určených oběma metodami je uvedeno v Tabulce 8.

**Tabulka 8** Srovnání výsledků metody inokulace semenáčků (WSI) a metody inokulace listových disků (LDI) při určování rasy izolátů *P. halstedii*.

Označení izolátu	Rasa izolátu určená metodou	
	Inokulace semenáčků (WSI)	Inokulace listových disků (LDI)
0001	710	730
1009	710	730
1108	700	700
1111	714	714
1112	714	704
1115	704	704
1120	710	700
1124	710	770
1125	710	770

### 6.3. Rezistence *P. halstedii* vůči metalaxylu

Testováním izolátů na odolnost vůči metalaxylu metodou listových disků bylo zjištěno, že žádný z testovaných izolátů nevykazoval odolnost vůči této látce. Vysokou účinnost fungicidu na *P. halstedii* u testovaných izolátů potvrzuje i skutečnost, že u všech testů bylo procento napadení disků ošetřených metalaxylem rovno nule. Výsledky jsou v Tabulce 9.

**Tabulka 9** Výsledky testování *P. halstedii* na rezistenci vůči metalaxylu.

Označení izolátu	Reakce na metalaxyl	Procento listových disků napadených <i>P. halstedii</i>		Procento klíčících zoosporangií <i>P. halstedii</i>	
		Kontrola	Metalaxyl	Kontrola	Metalaxyl
1201	Náchylný	75	0	100	90
1202	Náchylný	100	0	69	92
1203	Náchylný	92	0	94	100
1204	Náchylný	83	0	93	97
1205	Náchylný	83	0	96	100
1206	Náchylný	75	0	69	95
1207	Náchylný	100	0	93	100
1210	Náchylný	75	0	93	79
1115	Náchylný	75	0	99	97

## 7. Diskuse

Stanovení rasy nebo patotypu biotrofního patogenu pomocí souboru diferenciacních linií hostitelských rostlin je ve fytopatologii náročný úkol vyžadující jistou zkušenost a nese s sebou řadu úskalí a problémů, které doposud nebyly zcela vyřešeny.

Jak již bylo řečeno, diferenciacní soubor slunečnic pro určování rasy *P. halstedii* se vyvíjí zhruba 20 let a přestože byly učiněny kroky pro unifikaci metod testování a hodnocení, zůstává určování ras značně subjektivní disciplínou. Třebaže existuje několik velmi srozumitelně napsaných metodik testování, které popisují jakým způsobem přemnožovat a subkultivovat izoláty (Gulya, 1996), jaké linie diferenciacního souboru použít (Gulya et al., 1991), prakticky v žádném návodu se čtenář nedozví, kde leží hranice mezi náchylnou a rezistentní reakcí rostlin. Zatímco Gulya et al. (1991) považuje za kritérium náchylnosti sporulaci na děložních lístcích a nižší vzrůst rostliny, Tourvieille et al. (2000) dokonce navrhuje, že rostliny, u kterých se sporulace vyskytuje pouze na děložních a nikoli na pravých lístcích, by měly být označeny jako rezistentní. Vzhledem k tomu, že testování rasy *P. halstedii* jsme prováděli na semenáčcích, zvolili jsme proto pro účely stanovení intenzity napadení jednotlivých rostlin systém, který se používá při stanovení patotypů u *Bremia lactucae* (plíseň salátová). Stupnice napadení a výpočet intenzity napadení vychází z metodiky, kterou popsal Lebeda a Petrželová (2010) (Lebeda a Petrželová, 2010). Přesto ale během testování některé diferenciacní linie nereagovaly jednoznačně a byli jsme nuceni potýkat se s více či méně výraznými přechody od slabě náchylných po slabě rezistentní reakce.

V průběhu testování byly reakce linií HA–304, PMI–3 a QHP–1 nejednoznačné. Linie HA–304 postrádá geny rezistence vůči *P. halstedii* a jako alternativní kontrola byl použit kultivar Giganteus. Do doplňkového testování zařazeny linie DM–2, která nese stejné geny rezistence jako linie PMI–3, a linie HAR–5, odpovídající linii QHP–1. Zajímavé je, že PMI–3 a QHP–1 jsou linie, které nahradily ve starších verzích diferenciacního souboru používané linie DM–2 a HAR–5 právě z důvodu problematických a nejednoznačných reakcí na izoláty *P. halstedii*. Podle návrhu inovace a rozšíření diferenciacního souboru z roku 2012 mají být linie HA–304 a QHP–1 opět nahrazeny jinými, které poskytují jednoznačnější reakci (Tourvieille et al., 2012). To může poukazovat na skutečnost, že problém nejednoznačných reakcí těchto linií nebyl prostou výměnou vyřešen a naše zkušenost může být impulzem pro další zdokonalování

použité metodiky. Faktem ale je, že osivo linií PMI-3 a QHP-1 nepocházelo z originálních kolekcí profesionálních pěstitelů, ale bylo přepěstováno svépomocí pracovníky Katedry botaniky PřF UP na pozemku v Olomouci–Holici. Ke změnám vlastností osiva, které se projevily při testování, tak mohlo dojít chybou při opylování nebo nedostatečnou izolací jednotlivých květenství před pylem jiných slunečnic. Diferenciační soubor rozšířený o dvě linie potom fungoval následujícím způsobem. Diferenciační linie PMI-3 byla považována za náchylnou, pokud procento napadení linie DM-2 bylo minimálně 50%. Stejně tak diferenciační linie QHP-1 byla považována za náchylnou, pokud procento napadení linie HAR-5 bylo minimálně 50% a diferenciační linie HA-304 byla považována za náchylnou, pokud procento napadení linie Giganteus bylo minimálně 50%. Izoláty, jejichž výsledky byly při testování původním diferenciačním souborem nejasné, byly přetestovány za použití nově zařazených linií. Přestože ani osivo DM-2 a HAR-5 nepocházelo z originálních přesevů, napomohly nově zařazené linie objasnit sporné výsledky. Zároveň patotesty provedené s inokulem přemnoženým z podezřele reagujících linií jasně potvrdily, že se jedná o nejednoznačnou reakci rostlin a nikoli o směsné izoláty *P. halstedii*.

Na území České republiky byly v průběhu našeho testování izolátů z roku 2012 detekovány rasy 700, 710 a 704, přičemž rasa 710 byla prokázána u většiny testovaných izolátů. Vzhledem k tomu, že 7 z 8 izolátů pocházelo ze stejné lokality (Olomouc–Holice), může být tento údaj poněkud zkreslující. Zajímavým faktem je, že rasa 700 monozygotického izolátu 1201(K2) se lišila od rasy 710 mateřského izolátu 1201, ze kterého byl monozygotický izolát vytvořen. Z toho může vyplývat, že na lokalitě Olomouc–Holice se vyskytuje směsná populace *P. halstedii* s rasami 700 a 710 a rasa 700, která zde byla pravidelně zaznamenávána v minulých letech (Stojaspal, 2009; Trojanová, dosud nepublikováno), je vytlačována virulentnější rasou 710. To potvrzuje fenomén, že výsledná rasa směsného izolátu může být de facto součtem několika rozdílných ras s různou virulencí a při testování směsného izolátu na diferenciačním souboru se výsledná rasa může jevit virulentnější, než ve skutečnosti je (Virányi a Gulya, 1995). Např. ve směsném izolátu s rasou určenou jako 714 se mohou teoreticky ukrývat izoláty patřící k rasám 100, 104, 110, 114, 300, 304, 310, 314, 700, 704, 710 a 714, které je možné se štěstím odhalit pouze při testování monozygotických izolátů vytvořených z mateřského směsného izolátu. Vzhledem k tomu, že z lokality Lednice byl testován pouze jediný izolát, nemůžeme o rase 704 říci

nic bližšího, než že je na lokalitě v Lednici přítomna. Zároveň to naznačuje, že může existovat patogenní variabilita *P. halstedii*, která souvisí s geografickým rozšířením.

Ve srovnání s výzkumem, který probíhal v letech 2007–2011 (Stojaspal, 2009; Trojanová, dosud nepublikováno) byla pro Českou republiku poprvé zaznamenána rasa 710. V roce 2012 naopak nebyly zaznamenány rasy 730 a 770, které byly zjištěny v minulých letech. Vzhledem k tomu, že *P. halstedii* dokáže v půdě v podobě oospor přežívat až 10 let, mohou se nezjištěné rasy objevit v příštích letech. Je ale třeba přihlídnout k tomu, že výsledky z minulých let, byly získány odlišnou metodikou, která je podle některých autorů náchylná k falešně pozitivním fenotypovým projevům diferenciací linie. Tato linie se potom jeví jako náchylná, ale ve skutečnosti je rezistentní (Spring et al., 1997). Srovnání metody inokulace semenáčků s metodou inokulace listových disků poukázalo na výhody prvně jmenované metody. Předností metody inokulace semenáčků je používání celých rostlin a zapojení hlavní obranné reakce slunečnice, která probíhá v hypokotylu (Mouzeyar et al., 1993), což u metody listových disků může výsledky zkreslit.

V porovnání s ostatními státy Evropy, např. Francií, kde byly doposud detekovány rasy 100, 300, 304, 307 314, 334, 700, 703, 704, 707, 710, 714, 717 a 730 (Delmotte et al., 2012) nebo Španělskem s rasami 100, 130, 310, 330, 700, 703, 710, 730, 731 a 753 (Molinero–Ruiz et al., 2002) je patogenní variabilita *P. halstedii* v České republice spíše nižší a rozšíření lokální. Vzhledem k poloze našeho státu ve středu Evropy, životnímu cyklu vřetenatky a skutečnosti, že je u nás *P. halstedii* intenzivně studována až v posledních několika letech, vyžaduje tento patogen na našem území další studium.

Výsledky testování odolnosti *P. halstedii* vůči metalaxylu naznačily, že se v České republice doposud nenachází izolát *P. halstedii* odolný vůči této látce. Varující však může být situace v ostatních státech Evropy. Například Španělsko (Molinero–Ruiz et al, 2003) nebo Německo (Spring et al., 2006) se s rezistencí tohoto patogenu vůči metalaxylu potýkají již řadu let. S vysokou pravděpodobností lze tedy očekávat, že v budoucnu potká podobná situace i Českou republiku. Prozatím je však možné konstatovat, že *P. halstedii* je na našem území pod kontrolou a při dodržování všech karanténních a fyto-sanitárních opatření, včetně dalšího studia a monitoringu populace *P. halstedii*, vážnější ohrožení ze strany tohoto patogenu nehrozí.

## 8. Souhrn

V mé bakalářské práci jsem se zabýval studiem patogenní variability *Plasmopara halstedii* a rezistencí tohoto patogenu vůči fungicidu metalaxylu v České republice. Pomocí metody inokulace semenáčků byly u 8 izolátů z roku 2012 zjištěny rasy 700, 704, 710. Dále jsem srovnal dvě různé metody determinace ras tohoto patogenu a zjistil jsem, že metoda inokulace semenáčků (WSI) vykazovala v některých případech odlišné výsledky než metoda inokulace listových disků (LDI). Metoda inokulace semenáčků (WSI) zároveň byla průkaznější než metoda inokulace listových disků (LDI) a z toho důvodu by měla být používána pro testování i v budoucnu. Při testování izolátů na odolnost vůči metalaxylu jsem dospěl k závěru, že žádný z testovaných izolátů *P. halstedii* z ČR není odolný vůči této látce.

## 9. Seznam použité literatury

- Agrios, G.N. (2005): Plant Pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press, Burlington, 922 p.
- Albourie, J.M., Tourvieille, J., Tourvieille de Labrouhe, D. (1998): Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. European Journal of Plant Pathology, 104: 235–242.
- Anonym (2008): Diagnostics *Plasmopara halstedii*. Bulletin OEPP/EPPO 38, 343–348.
- Baiswar, P., Kumar, S., Chandra, S., Ngachan, S.V. (2009): First report of powdery mildew on Mexican sunflower in India. Plant Pathology, 58: 396.
- Bouterige, S., Tronchin, G., Lesourd, M., Marot–Leblond, A., Molinéro, V., Bouchra, J.P., Robert, R. (2003): Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. Phytopathology, 93(8): 1023–1030.
- Constantinescu, O., Thines, M. (2010): *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. Polish Botanical Journal, 55: 293–298.
- Čača, Z., Kolár, V., Novák, J.B., Závra, J. (1981): Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 344 p.
- Delanoë, D. (1972): Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). CETIOM Informations Techniques, 29: 1–49.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard–Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. Infection, Genetics and Evolution, 8: 534–540.
- Delmotte, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Ahmed, S. (2012): Emerging races arising from recombination facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew *Plasmopara halstedii* in France. Proceedings of 18th International Sunflower Conference, Mar Del Plata & Balcarce, Argentina 27.2. – 1.3. 2012, 4p.
- Dick, M.W. (2001): Straminipilous fungi. Kluwer Academic, Dordrecht Publisher, 670 p.
- EPPO (2013) PQR – EPPO database on quarantine pests (available online). <http://www.eppo.int>. (přístup 2.5.2013).

- Gulya, T.J. (1996): Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. In: Proc. 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, U.S.A., 11.–12. 1. 1996, pp. 39–48.
- Gulya, T.J., Miller, J.F., Virányi, F., Sackston, W.S. (1991): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11–20.
- Gulya, T., Tourvieille, D., Masirevic, S., Pennaud, A., Rashid, K., Virányi, F. (1998): Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: Symposium III: Sunflower Downy Mildew, Fargo, ND, U.S.A., 13.–14. 1. 1998, pp. 130–136.
- Gulya, T.J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda A., Spencer–Phillips P.T.N. (eds.): Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings 2nd International Downy Mildews Symposium. Palacký University in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hané, pp. 121–134.
- Hall, G. (1989): Unusual or interesting records of plant pathogenic Oomycetes. *Plant Pathology*, 38: 604–611.
- Hudspeth, D.S.S., Stenger, D., Hudspeth, M.E.S. (2003): A *cox2* phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. *Fungal Diversity*, 13: 47–57.
- Kůdela, V., Kocourek, F., Bárnet, M. (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. Česká akademie zemědělských věd, Praha 272 p.
- Kudlíková, I., Veverka, K. (1999): Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: Nové poznatky o vztahu hostitel – patogen, 4.11.1999, Česká fytopatologická společnost, Praha, (Sborník referátů), 37–41.
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006): Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92 p.
- Lebeda, A., Petrželová, I. (2010): Screening for resistance to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 245–252.
- Limpert, E., and Muller, K. (1994): Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology*, 140: 346–358.



- Molinero–Ruiz, M.L., Domínguez, J., Melero–Vara, J.M. (2002): Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Disease*, 86: 736–740.
- Molinero–Ruiz, M.L., Melero–Vara, J.M., Gulya, T.J., Dominguez, J. (2003): First report to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. *Plant Disease*, 87(6): 749–749.
- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (1993): Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal Phytopathology*, 139: 289–297.
- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (1994): Effect of host–race combination on resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal of Phytopathology*, 141: 249–258.
- Orellana, R.G. (1970): Resistance and susceptibility to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 97: 91–97.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J.S., Nicolas, P., Bouzidi, M.F. (2005): Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2683–2693.
- Rashid, K.Y. (1993): Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988–1991. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15(3): 206–210.
- Sackston, W.E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: *The downy mildews* (Ed. by Spencer, D.M.), pp. 545–575. Academic Press, London, UK.
- Sedlářová, M., Stojaspal, K., Lebeda, A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České Republice. *Rostlinolékař*, 1: 17–20.
- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 49: 1–10.

- Spring, O. (2001): Nonsystemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108: 329–336.
- Spring, O., Benz, A., Causy, V. (1991): Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on development and metabolism of sunflower. *Journal of Plant Disease and Protection*, 98: 597–604.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1997): Leaf disc inoculation – a useful tool for selecting infections on sunflower downy mildew at low inoculum concentration, but inappropriate to pathotype characterization. *Journal of Phytopathology*, 145: 189–191.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethuller, A., Oberwinkler, F. (2003): Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus × laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress*, 2(3): 163–170.
- Spring, O., Zipper, R., Heller–Dohmen, M. (2006): First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 224.
- Spurný, M. (2005): Hybridy slunečnice *Rustica* úspěšné v boji proti plazmopaře. In: Řepka, mák, slunečnice a hořčice. 22.–23.2. 2005, Česká společnost na ČZU v Praze a katedra rostlinné výroby, Praha, (Sborník referátů) 146–166.
- Stojaspal, K. (2009): Studium interakcí slunečnice–*Plasmopara halstedii*. Diplomová práce, 58 p. Depon. In: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.
- Šedivý, J., Chod, J., Kodys, F., Kůdela, V., Sychrová, E., Šebesta, J. (1977): Klíč k určování chorob a škůdců polních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 485 p.
- Šindelková M., Brnický P., Svobodová I., Šamánek J. (2008): Plíseň slunečnice *Plasmopara halstedii*. Ministry of Agriculture of the Czech Publisher, London, UK, 167–172p.

- Tourvieille, D., Gulya, T., Maširevic, S., Penaud, A., Rashid, K., Virányi, F. (2000) New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: 15<sup>th</sup> International Sunflower Conference, Toulouse, France, 12.-15. 6., pp. 61- 66.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P., Vear, F. (2012): Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proceedings of 18th International Sunflower Conference, Mar Del Plata & Balcarce, Argentina. 27.2. – 1.3. 2012. 6p.
- Tosi, L., Zizzerini, A. (2004): First Report of Downy Mildew Caused by *Plasmopara helianthi* Races 700 and 703 of Sunflowers (*Helianthus annuus*) in Italy. Disease Notes, 88: 1284.
- Veverka, K., Křížková–Kudlíková, I. (2006): Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin, 12. 9. – 16.9. 2006, ČZU Praha, (Sborník abstraktů), pp. 287-288.
- Viljoen, A., Wyk van P.S., Nowell, D.C., Gulya, T.J. (1997): Occurrence of Downy Mildew on Sunflower in South Africa. Disease Notes, 81: 111.
- Virányi, F. (1988a): *Plasmopara halstedii*. In: European handbook of plant diseases (Ed. by Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A.).
- Virányi, F. (1988b): Factors affecting oospore formation in *Plasmopara halstedii*. Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Novi Sad 2, 32–37.
- Virányi, F. (2002): The sunflower – *Plasmopara halstedii* pathosystem: Natural and artificially induced coevolution. In: Spencer – Philips, P.T.N, Gisi, U., Lebeda, A., (eds.): Advances in Downy Mildew Research. Volume 1. Kluwer Academic Publisher, London, UK, p. 167–172.
- Virányi, F., Gulya, T.J. (1995): Inter–isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* from Hungary. Plant Pathology, 44: 619–624.
- Virányi, F., Gulya, T.J., Masirevic, S. (1992): Races of *Plasmopara halstedii* in Central Europe and their metalaxyl sensitivity. Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pisa, Italy 1: 865–868.

- Virányi F., Spring O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 207–220.
- Walcz, I., Bogár, K., Virányi, F. (2000): Study on an *Ambrosia* isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 23: 19–24.
- Zimmer, D.E. 1974: Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology*, 64: 1465—1467.

**Zdroje obrázků:**

Obrázek 1 – Tomáš Bartůšek

Obrázek 2 – EPPO (2013) PQR – EPPO database on quarantine pests  
(available online). <http://www.eppo.int>. (přístup 2.5.2013)

Obrázek 3 – Mgr. Zuzana Trojanová

Obrázek 4 – Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Obrázek 5 – Mgr. Zuzana Trojanová

Obrázek 6 – Mgr. Zuzana Trojanová

Obrázek7 – Mgr. Zuzana Trojanová

Obrázek 8 – Tomáš Bartůšek

Obrázek 9 – Tomáš Bartůšek

Obrázek 10 – Tomáš Bartůšek