

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



Virulence monosporických izolátů *Phytophthora infestans* ke genům introdukovaných ze *Solanum demissum* a *S. bulbocastanum*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karolína Pumprová

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Virulence monosporických izolátů *Phytophthora infestans* ke genům introdukovaných ze *Solanum demissum* a *S. bulbocastanum*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Petru Sedlákoví, Ph.D. za jeho čas a cenné rady v rámci řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala Katedře genetiky a šlechtění za umožnění provedení praktické části diplomové práce v prostorách Laboratoře genetických analýz.

Virulence monosporických izolátů *Phytophthora infestans* ke genům introdukovaných ze *Solanum demissum* a *S. bulbocastanum*

Souhrn

Plíseň bramborová je způsobena oomycetním organismem *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, a je považována celosvětově za jednu z nejvíce ekonomicky významných chorob bramboru. Znalost vývoje populace *P. infestans* na určitém území hraje klíčovou roli při regulaci této choroby. Šlechtění bramboru na rezistenci se opírá o řazení R genů do šlechtitelských programů, kdy je cílem posílit vertikální rezistenci současných odrůd.

V rámci diplomové práce bylo hodnoceno 142 izolátů *P. infestans* z bramborářských lokalit České republiky. Tyto izoláty byly sesbírány mezi lety 2012–2016. Při hodnocení celkové virulence současné populace *P. infestans* byla pro listové testy virulence použita Blackova diferenciační sada klonů, klon kultivaru Sárpo Mira a somatický hybrid REG46F nesoucí gen *Rpi-blb1*. Byla zaznamenána virulence na všech klonech diferenciační sady kromě R9 a Sblb. V nejvyšší míře se virulence projevila na genech R1, R3, R7, R10 a R11. Průměrná meziroční hodnota komplexity virulence byla 7,15 a 86 % izolátů vykazovalo virulenci ve více než 6 genech. Bylo detekováno 41 rozdílných ras. Jako nejběžnější fenotyp byl rozpoznán 1,2,3,4,6,7,10,11,sm, a to s výskytem 32. Dále bylo selektováno potomstvo ze samoopylení Sárpo Mira na základě testů virulence. Jako selekční kritérium byla stanovena hypersenzitivní reakce v polovině případů inokulace. K účelům novošlechtění bylo vybráno 37 genotypů.

Současná populace *P. infestans* na území České republiky byla vyhodnocena jako virulentní ke genům introdukovaných ze *S. demissum*, nikoli však ke genu *Rpi-blb1*. Rozdíly v zastoupení virulentních faktorů mezi jednotlivými lety byly vyhodnoceny jako neprůkazné. Vzhledem k tomu, že je současná populace *P. infestans* stabilní, je vhodné využít R geny rezistence *S. bulbocastanum* a komplexu genů odrůdy Sárpo Mira při novošlechtění bramboru.

Klíčová slova: Brambor, plíseň bramboru, rezistence k plísní bramboru, testy virulence

Virulence of *Phytophthora infestans* monosporic isolates to genes introgressed from *Solanum demissum* and *S. bulbocastanum*

Summary

Late blight, caused by oomycete *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary is considered as one of the most economically important potato diseases. Knowledge of the development of *P. infestans* in particular areas plays a key role in regulating this disease. Breeding for resistance is based on R genes introgressed from wild species, which strengthens the vertical resistance of current potato varieties.

142 isolates collected within years in potato growing regions in Czech republic, were analysed. These isolates were collected between years 2012 and 2016. To evaluate frequency and stability of *P. infestans* population detached leaflet assays were used on Black's differential set, supplemented with Sárpo Mira clone and REG46F hybrid containing *Rpi-blb1* gene. It was evaluated virulence to all genes from differentials except R9 and Sblb. Predominant virulence was detected on R1, R3, R7, R10 a R11. Mean virulent complexity was evaluated on 7.15 and 86 % isolates were virulent to more than 6 genes. 41 different races were detected and the most common phenotype was 1.2.3.4.6.7.10.11.sm. Offspring from self-pollination of Sárpo Mira cultivar were tested by laboratory leaflet assay and selected. As selection criteria was set hypersensitive reaction in more than 50% inoculations. There were selected 37 genotypes for future breeding on late blight resistance.

Current population of *P. infestans* in the Czech Republic was evaluated as virulent to genes introgressed from *S. demissum*, but not to the *Rpi-blb1* gene. No statistically significant effect was detected for frequencies of races between the years. Given that the population is relatively stable, it is advisable to use the R genes of *S. bulbocastanum* and the Sárpo Mira genus complex in future potato breeding.

Keywords: Potato, late blight, late blight resistance, detached leaflet assay

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Vědecké hypotézy | 2 |
| 3 | Cíle práce | 3 |
| 4 | Literární rešerše | 4 |
| | 4.1. Phytophthora infestans (Mont.) De Bary | 4 |
| | 4.1.1. Taxonomie | 5 |
| | 4.1.2. Biologie | 6 |
| | 4.1.3. Historie | 7 |
| | 4.1.4. Původ | 8 |
| | 4.1.5. Životní cyklus | 8 |
| | Nepohlavní rozmnožování | 8 |
| | Pohlavní rozmnožování | 9 |
| | 4.1.6. Migrace | 10 |
| | 4.1.7. Příznaky | 10 |
| | 4.1.8. Ochrana | 10 |
| | 4.1.9. Rezistence <i>P. infestans</i> | 11 |
| | 4.1.10. Virulence <i>P. infestans</i> | 12 |
| | 4.2. Solanum tuberosum L..... | 13 |
| | 4.2.1. Taxonomie | 13 |
| | 4.2.2. Původ | 14 |
| | 4.2.3. Genetická variabilita | 15 |
| | 4.2.4. Šlechtění na rezistenci k <i>P. infestans</i> | 16 |
| | Historie šlechtění | 16 |
| | 4.2.5. Monogenní rezistence | 17 |
| | 4.2.6. Polygenní rezistence | 17 |
| | Solanum demissum | 18 |
| | Solanum bulbocastanum | 20 |
| | Sárpo Mira | 21 |
| 5 | Materiál a metody | 23 |
| | 5.1. Odvození monosporických izolátů <i>P. infestans</i> | 23 |
| | 5.2. Rostlinný materiál | 23 |
| | 5.2.1. Potomstvo Sárpo Mira | 23 |
| | 5.2.2. Diferenciační sada klonů | 24 |
| | Udržování diferenciační sady klonů <i>in vitro</i> | 24 |
| | Převod <i>ex vitro</i> | 25 |

| | |
|---|-----------|
| Výběr a příprava listů..... | 26 |
| 5.3. Inokulace..... | 26 |
| 5.3.1. Příprava inokulační suspenze..... | 26 |
| 5.3.2. Ředění inokulační suspenze..... | 26 |
| 5.3.3. Inokulace a inkubace..... | 27 |
| 5.4. Postup při hodnocení..... | 27 |
| 5.4.1. Postup infekce..... | 27 |
| 5.4.2. Hodnocení..... | 28 |
| 5.4.3. Analýza dat..... | 29 |
| 6 Výsledky..... | 30 |
| 6.1. Testy virulence..... | 30 |
| 6.1.1. Celková virulence..... | 30 |
| 6.1.2. Virulence v rámci lokalit..... | 31 |
| 6.1.3. Fenotypizace ras..... | 34 |
| 6.2. Rezistence potomstva ze samoopylení Sárpo Mira..... | 35 |
| 6.2.1. Virulence použitých izolátů..... | 36 |
| 6.2.2. Odpověď rostlin na inokulaci a selekce..... | 36 |
| 7 Diskuze..... | 38 |
| 8 Závěr..... | 41 |
| 9 Reference..... | 42 |
| 10 Seznam použitých zkratk..... | 58 |

Přehled obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1: Zjednodušený fylogenetický strom Eukaryot (Razan et Mattoo, 2005)..... | 6 |
| Obrázek 2: Sporangiofory (A), Sporangia (B), (Watt, 2013). | 7 |
| Obrázek 3: Odezva izolátů <i>P. infestans</i> na metalaxyl mezi lety 2003-2008 (Mazáková et al., 2011) | 12 |
| Obr 4. Geografické rozšíření původu skupiny genů rezistence <i>S. bulbocastanum</i> (Vleeshouwers et al., 2011) | 21 |
| Obrázek 5: Inokulační mapa listu pro Sárpo Mira *Lu6/Lu3/L2/L4/D4 | 27 |
| Obrázek 6: Součet překonaných genů rezistence R..... | 30 |
| Obrázek 7: Procentuální vyjádření virulence izolátů na jednotlivých genech R | 31 |
| Obrázek 8: Znázorněná lokalit dle virulence | 33 |
| Obrázek 9: Poměry v odezvě izolátů na různých lokalitách v rámci R genů | 33 |
| Obrázek 10: Projev sporulace (A), hypersenzitivní reakce (B), nulová odezva (C)..... | 37 |

Přehled tabulek

| | |
|--|-----------|
| Tab. 1: Přehled zmapovaných genů kvantitativní rezistence k <i>P. infestans</i> (Sedlák et al., 2016) | 22 |
| Tabulka 2: Vzor formuláře s ukázkou záznamu možného vývoje experimentu (Sedlák et al., 2016) | 28 |
| Tabulka 4: Počet izolátů <i>P. infestans</i> s určitým fenotypem virulentním ke genům R | 35 |
| Tabulka 3: Frekvence virulence jednotlivých genů v lokalitě..... | 36 |

1 Úvod

Phytophthora infestans (Mont) De Bary představuje jednu z největších hrozeb při pěstování bramboru (Agrios, 2005). Tento oomycetní patogen napadá zástupce rodu *Solanum* L., zejména *Solanum tuberosum* L. a *Solanum lycopersicum* L. V polních podmínkách způsobuje vysoké ztráty, které se v Evropské unii odhadují ročně na 1 bilion euro (Havekort et al., 2008). Historické zdroje označují plíseň bramborovou jako důvod vzniku Irského hladomoru a diaspory v letech 1845-1847 (Widmark, 2010). Původ světové populace *P. infestans* je předmětem diskuze. Dle Niederhauser (1991) je situován do oblasti Mexické vrchoviny, kde se také nachází jedno z genetických center rodu *Solanum*. Gómez-Alpizar et al. (2007) naopak uvádějí jako zdroj inokula jihoamerické Andy. *P. infestans* se po rozšíření do oblastí pěstování bramboru rozmnožovala primárně nepohlavně. Příčinou byl výskyt pouze jednoho pohlavního typu. Na základě migrace došlo v 80 letech k zavlečení A2 typu do Evropy. Tento fakt umožňuje pohlavní rozmnožování *P. infestans* a také rychlou genetickou adaptaci k rezistentním odrůdám (Hohl et Iselin, 1984).

Rezistence kulturních odrůd *Solanum tuberosum* je podmíněna rasově specificky a nespecificky. Rasově specifické jsou geny rezistence (*R*). S těmito geny korespondují geny avirulence patogenu (*Avr*) (Fry, 2008). Rezistence běžných odrůd bramboru pochází zejména ze *Solanum demissum* a *S. stoloniferum*. Zpětná křížení byla realizována s druhy *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. verrucosum* a *S. bulbocastanum* (Zimnoch-Guzowska, 2003). Začátkem 20. století byly mexické druhy *S. demissum* a *S. stoloniferum* zařazeny do šlechtitelských programů proti plísni bramboru (Salaman, 1937). Kolem roku 1920 byla objevena hypersenzitivní reakce u *S. demissum*, následně byl proveden transfer *R* genů zpětným křížením s kultivary se *S. tuberosum* (Toxopeus, 1956). Black (1952, 1954) rozpoznal čtyři kompletně dominantní *R* geny pocházející ze *S. demissum* (*R1*, *R2*, *R3*, *R4*). Celkově bylo doposud identifikováno 11 *R* genů v liniích křížených se *S. demissum* (Malcolmson et Black, 1966). Odrůda Sárpo Mira byla navržena jako potenciální genetický zdroj dlouhodobé rezistence k *P. infestans* (Kim et al., 2011; White et Shawn, 2010). Nabízí kvantitativní i kvalitativní rezistenci nejméně v 5 genech. Čtyři z pěti genů (*R3a*, *R3b*, *R4* a *Rpi-Smira1*) byly determinovány listovými testy virulence, pátý gen, *Rpi-Smira2* byl rozpoznán jen v polních podmínkách (Rietman et al., 2012).

Tato diplomová práce se odkazuje na výsledky Sedlák et al. (2017), rozšiřuje analýzu sesbíraných dat a představuje komplexní řešení při novošlechtění bramboru proti plísni bramborové.

2 Vědecké hypotézy

Pro tuto práci byly formulovány následující hypotézy:

- Současná populace *Phytophthora infestans* v České republice vykazuje virulenci k vybraným genům rezistence získaných křížením bramboru s druhy *Solanum demissum* a *S. bulbocastanum*.
- Laboratorními testy čistých kultur *P. infestans* na diferenciační sadě klonů, obsahujících geny rezistence, lze detekovat virulenci k těmto genům.
- Potomky ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira lze využít při šlechtění bramboru na rezistenci k *P. infestans*.

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo laboratorně otestovat čisté kultury *P. infestans* odebrané v různých lokalitách významných pěstebních oblastí bramboru na diferenciační sadě klonů obsahující jednotlivé geny rezistence a ověřit tak virulenci kmenů *P. infestans* v České republice k těmto genům.

Dalším cílem bylo testovat část potomstva ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira, která je nositelem major genů rezistence, komplexně virulentními izoláty *P. infestans* a ověřit míru fenotypové segregace rezistence.

Dílní cíle této práce jsou:

- Realizace testů virulence spočívající v inokulaci listů sady diferenciačních klonů nesoucích jednotlivé geny odvozené ze *S. demissum* a *S. bulbocastanum* inokulační suspenzí *P. infestans*.
- Interpretace výsledků interakce patogenu s hostitelem v místní populaci alespoň dva roky po sobě.
- Optimalizace metodiky k preselektivnímu hodnocení rezistence potomků ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira a posouzení jejího šlechtitelského potenciálu pro praktické využití.

4 Literární rešerše

4.1. *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary

Plíseň bramborová patří k nejvíce rozšířeným a nejvýznamnějším rostlinným chorobám na světě. Je zapříčiněna rostlinným patogenem *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, který je zároveň modelovým organismem oomycet. Název *Phytophthora*, který je odvozen od řeckého phytó „rostlina“ a phthóra, „destrukce“, napovídá, jaké jsou její účinky. Vyskytuje se v oblastech s nižšími teplotami a vyšší vlhkostí. Zóny s významným výskytem plísně bramboru jsou severní část USA, východní pobřeží Kanady, západní Evropa, centrální a jižní Čína, jihovýchodní Brazílie a tropické vysočiny (Agrios, 2005).

Phytophthora infestans byla pojmenována po Antonu de Barym, který také objasnil životní cyklus tohoto patogenu v roce 1876. Nejprve byla plíseň pojmenována *Botrytis infestans* v polovině 19. století Jeanem Montagnem, Anton de Bary ale zjistil, že plíseň bramborová nesdílí stejné charakteristiky jako druhy rodu *Botrytis*. Proto vytvořil rod *Phytophthora* (Schumann et D'Arcy, 2000).

Tento hemibiotrofní patogen napadá malé množství hostitelů, zejména z čeledi *Solanaceae*. Při pěstování ekonomicky významných polních plodin jako je brambor (*Solanum tuberosum* L.) nebo rajče (*Solanum lycopersicum* L.) způsobuje vysoké ztráty. V Evropské Unii je brambor pěstován na ploše přes 6 Mha, s hodnotou přes 6 bilionu euro. Ztráty zapříčiněné *Phytophthorou infestans* se odhadují na 1 bilion euro ročně. Celosvětově potom na 12 bilionů euro. Pokud jsou podmínky příhodné, je schopna zničit většinu úrody během týdne. V klasické ochraně proti této chorobě se využívají fungicidy ve velmi vysokých dávkách, což se projevuje na vysokých vstupech při pěstování brambor (Haverkort et al., 2008) Odhady ukazují, že náklady spojené s ochranou činí celosvětově ročně až 2,8 miliard euro (Wang et al., 2008).

Patogen napadá jak listy, tak hlízy a rychle se šíří hostitelskou rostlinou za vzniku nekrot. *P. infestans* měla obrovské dopady na lidskou historii a je stále závažným ohrožením potravinové bezpečnosti (Brasier, 2008).

4.1.1. Taxonomie

Většina oomycet (Řasovky) obecně připomíná houbové organismy, proto byly v minulosti řazeny k askomycetum a basidiomycetum. Oomycety, stejně jako Fungi, disponují filamentózním růstem, heterotrofním způsobem výživy a zauímají podobné ekologické niky. Přesto se vyskytují určité znaky, které vyvracejí tvrzení o blízké příbuznosti. Oomycety jsou diploidní téměř po celý životní cyklus, na rozdíl od hub, které jsou typicky haploidní (Shawn et Khaki, 1971). Buňky houbových organismů tvoří přehrádkované, septoidní hyfy, které jsou bohaté na chitin, na rozdíl od buněčných stěn coenocytických hyf oomycet, jejichž hlavní složkou je β -1,4 glukán celulóza, β -1,3 a β -1,6 glukany (Bartnick-Garcia et Wang, 1983). Oomycety také produkují jednu jednostěnnou sférickou sexuální spóru (oosporu), která není schopná přežít v nepříznivých podmínkách (Judelson et Blanco, 2005).

Fylogenetické studie založené na molekulárních markerech tak řadí oomycety ke kmenu Stramenofila (Obr. 1), eukaryotické skupiny SAR (Beakes et al., 2012). Přestože většina *Phytophthora* spp. napadá terestrické hostitele, bazální skupina oomycet primárně obsazuje vodní prostředí stejně jako ostatní větve Stramenopiles, jako jsou hnědé řasy, zlativky a rozsivky (Andersson, 2007; Shawn et Khaki, 1971). Fylogenetická analýza moderních taxonů odhalila, že rostlinný parazitismus se vyvinul nezávisle ve třech liniích oomycet. Rostlinné patogeny jako je *Peronospora*, *Pythium* a *Phytophthora* vznikly ze společného parazitického předka (Thines et Kamoun, 2010).

Phytophthora je rozsáhlý rod čítající kolem 100 druhů způsobujících řadu ekonomicky významných celosvětově rozšířených chorob (Wheller et al., 1998). Na základě sekvencí ribosomálních genů a asociovaných intronů (ITS oblasti), bylo definováno 10 vývojově příbuzných větví v rodu *Phytophthora*. *P. infestans* je stejně jako *P. phaseoli*, *P. mirabilis*, *P. ipomoeae* a *P. andina* zařazena do Ic vývojové větve (Cooke et al., 2000).

Taxonomické řazení dle Adl et al. (2015):

Doména – Eukaryota

Oddělení – Oomycota

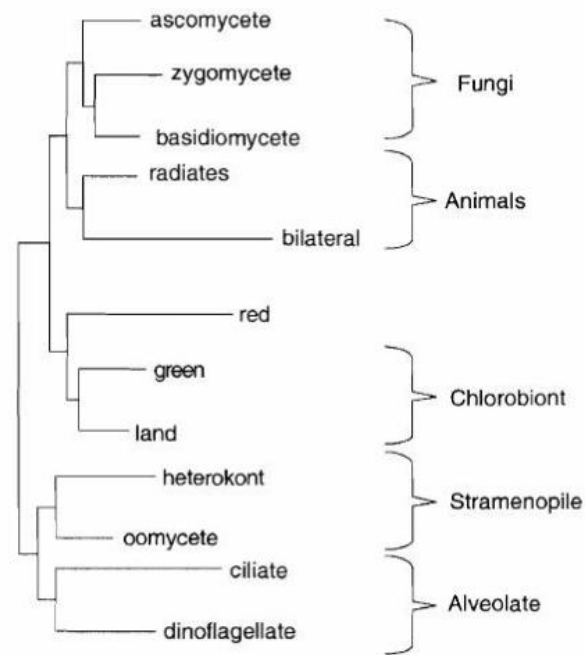
Třída – Oomycetes

Řád – Peronosporales

Čeleď – Pythiaceae

Rod – *Phytophthora*

Druh – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary



Obrázek 1: Zjednodušený fylogenetický strom Eukaryot (Razan et Mattoo, 2005)

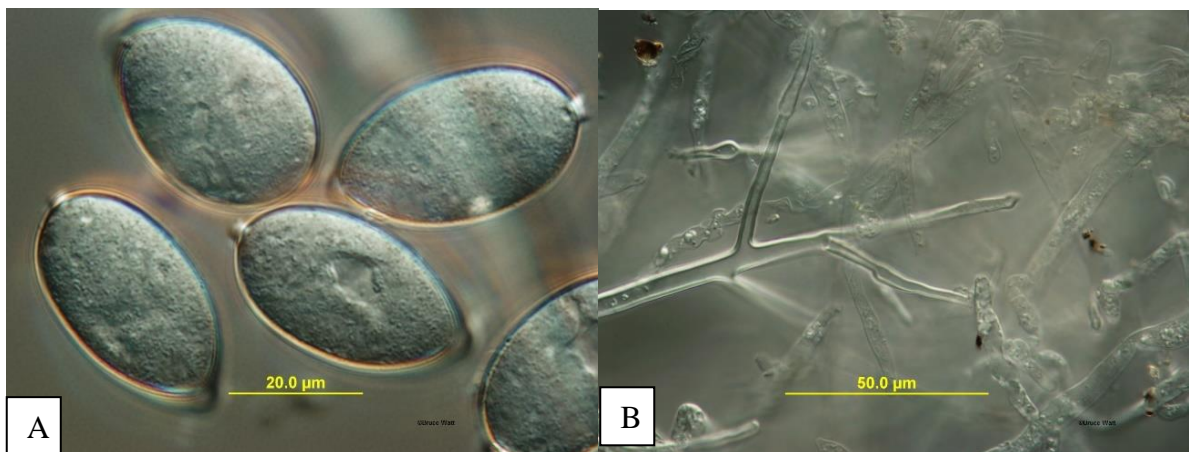
4.1.2. Biologie

Zástupci Oomycet, mikroskopický houbových organismů, jsou většinou saprofité nebo fakultativní či obligátní parazité. Stélka většiny druhů je charakteristická vláknitým, trubicovitým tvarem. Tvoří nepřehrádkované větvené mycelium. Parazitické druhy vytvářejí haustoria a pronikají do buněčných stěn hostitele, vnitrobuněční parazité mají amorfní stélku bez buněčné stěny. Protoplast *P. infestans* je cenocytický, mnohoaderný. Zásobní látkou je mykolaminaran (Kalina et Váňa, 2005).

Asexuálně se *P. infestans* rozmnožuje přes sporangia. Sporangiofory (Obr. 2, A) vyrůstají z mycelia průduchy nebo poraněnou pokožkou. Jednotlivě nebo po 2-5 svazcích. Sporangia jsou oválného nebo citrónového tvaru, bezbarvá, hladká a tenkostěnná, jsou opatřena krátkou stopečkou na bázi a apikálním pórem. Po dozrání jsou uvolňována a přenášena větrem na velké vzdálenosti nebo vodními kapkami z horních listů na dolní a na půdu. Sporangia (Obr. 2, B) jsou zdrojem sekundárních infekcí. Sporangia jsou velká 29-36 x 19-22 μm a klíčí buď přímo (při teplotách 15-24 $^{\circ}\text{C}$), nebo nepřímo přes zoospory (při teplotách pod 18 $^{\circ}\text{C}$). Zoospory (cca 7-12 na sporangium), které jsou ledvinovitého, mírně zploštělého tvaru a opatřené dvěma bičíky různé délky, jeden orientovaný dopředu a jeden dozadu. Zoospory jsou obvykle bez jader, ale byly detekovány i dvoujaderné zoospory. Po kontaktu s hostitelskou rostlinou se zoospory přestávají pohybovat, ztrácí bičíky, vytváří klíčící vlákno zakončené apresoriem, které prorůstá do hostitelské rostliny průduchy, nebo pomocí penetračního hrotu

pronikají pokožkou do vnitřních parenchymatických pletiv a vyvíjí se v mycelium. V mezibuněčných prostorech napadených pletiv se postupně rozrůstají jednotlivé hyfy, větví se a tvoří haustoria, kterými pronikají do buněk, z nichž získávají živiny. V kultuře je mycelium bílé a načechrané; kolonie je pomalu rostoucí. Růstové rychlosti se mezi izoláty mohou dramaticky lišit, rychle rostoucí izoláty mohou pokrýt desku o rozměrech 9 cm v průběhu 7 až 10 dnů. Některé izoláty vytvářejí hrudkovitý vzhled: toto bylo spojeno s pohlavním typem A2. Při pohlavním rozmnožování dochází ke splynutí antheridií a oogonií za vzniku oospory.

Antheridia jsou haploidní, amphigynní a cylindrické samčí pohlavní buňky s rozměry 17 (max.22) x 16 μm . Oogonie se vyskytují jen vzácně v jednopohlavné kultuře, vyvíjejí se ovšem okamžitě na spárovaných izolátech obou pohlavních typů, jejich průměr je 38-50 μm , Oospory jsou kulovitěho tvaru o velikosti 24–46 μm , silnostěnné a klíčí pomocí klíčného vlákna, které zakončené terminálním sporangie. Jsou velmi odolné vůči nízkým teplotám a suchu, proto mohou mít životnost až několik let (Stamps, 1985; Termorshuizen, 2007).



Obrázek 2: Sporangiofory (A), Sporangia (B), (Watt, 2013).

4.1.3. Historie

Nová choroba brambor se v Severní Americe objevuje roku 1843. Epidemie začala rozšířením do pěti států, od New Yorku po Philadelphii. Historické zdroje uvádějí, že roce 1843 byla pole s bramborami napadena hnilobou a zničila 50 % úrody, a to ještě předtím, než rostliny začaly vytvářet biomasu (Ellsworth, 1843). Důvodem zavlečení choroby byl pravděpodobně import hlíz a guana z Peru a jižní Ameriky, které se v polovině 19 století masově dovážely jako hnojivo a genetický zdroj pro nové odrůdy brambor.

V Evropě byla plíseň bramborová poprvé pozorována v Belgii v červnu roku 1845. Odtud se rozšířila do Flander, Nizozemí a Francie. V příštím roce se dostává do celé Evropy,

hlavně na území Anglie a Irska (Bourke, 1964). Vznikla epidemie, která mezi lety 1845-1847 zapříčinila Irský hladomor a diasporu (Widmark, 2010).

4.1.4. Původ

Původ světové populace *P. infestans* je dodnes předmětem diskuze. Existují dvě konkurenční teorie, které podporují buď původ v jižní Americe, nebo v oblasti vrchoviny centrálního Mexika, jež jsou genetickými centry hostitelského rodu *Solanum*.

Dle Andské teorie, poprvé předložené Berkeleym (1846) a následně potvrzené Barym (1861), pochází *P. infestans* ze stejné oblasti jako její hostitel, tedy z jihoamerických And (momentálně oblasti Peru a Bolívie) (Andrison, 1996). Gómez-Alpizar et al. (2007) uvádějí, že Andský zdroj inokula inicioval epidemie nejprve v USA a potom v Irsku, které vedly k hladomoru. Analýza mitochondriálních a jaderných lokusů *P. infestans* silně podporuje jihoamerické centrum původu tohoto patogenu. Vývojové dějiny *P. infestans* byly navrženy tak, že rodová populace *Phytophthora* se rozcházela na různé linie v jihoamerických Andách v souvislosti s divokými druhy *Solanum*. Dvě odlišné linie vedly ke vzniku stávajících haplotypů *P. infestans* schopných infikovat brambory, rajčata a některé divoké druhy *Solanum*. Hostitelská specifická se stala hnací silou pro zachování odlišných linií v Ekvádoru a Peru.

Na druhé straně se předpokládá, že je *P. infestans* původem z centrální části Mexika. Jen zde byl potvrzen výskyt pohlavních typů v poměru 1:1. Populace je v této oblasti velice různorodá fenotypově i genotypově (Goodwin et Dreth, 1997; Grünwald et Flier, 2005). Dalším vodítkem je velké množství druhů z čeledi *Solanaceae* rezistentních vůči *P. infestans* pocházejících z oblasti centrálního Mexika (Niederhauser, 1991).

4.1.5. Životní cyklus

Vzhledem k tomu, že je *P. infestans* hostitelsky specifický parazit, potřebuje rostlinné pletivo k tomu, aby mohla existovat. Ve většině případů se *P. infestans* rozmnožuje nepohlavně.

Nepohlavní rozmnožování

Životní cyklus tak začíná v podobě sporangií, (Obr. 3) které se uvolňují ze sporangioforů a jsou unášeny větrem. Pokud je porost založen z hlíz infikovaných *P. infestans*, projevy choroby se mohou objevit již na jaře. Při vhodných podmínkách sporangiofory vyrůstají ze stomat a uvolňují sporangia, díky nimž se patogen rozšiřuje velice rychle.

Ideální teplotní podmínky jsou kolem 20 °C se vzdušnou vlhkostí nad 91 %-100%. Sporangia se uvolňují v ranních hodinách, kdy rychle vzrůstající teplota vytváří vysokou vzdušnou vlhkost. Při teplotách nad 12-15 °C mohou sporangia na hostiteli klíčit přímo pomocí klíčícího vlákna. Pokud se teplota dostane pod 12 °C, sporangiofory uvolňují pohyblivé zoospory a klíčí nepřímo, teprve po kontaktu s hostitelem. Volné zoospory mají na rozdíl od sporangií a zejména oospor omezenou životnost, a to především v nepřítomnosti vody nebo při vystavení slunečnímu záření po delší dobu. Zoospor se uvolňuje zpravidla 5 až 10 na sporangium. Zoospory se brzy přestávají pohybovat, ztrácí bičíky, vytváří klíčící vlákno zakončené apresoriem, které prorůstá do hostitelské rostliny průduchy, nebo pomocí penetračního hrotu pronikají pokožkou do vnitřních parenchymatických pletiv a vyvíjí se v mycelium. (Carroll et Tudzynski, 1997; Judelson 1997; Andersson, 2007).

Po penetraci hostitele se v mezibuněčných prostorech napadených pletiv postupně rozrůstají hyfy a tvoří haustoria, kterými patogen získává živiny z těla hostitele (Grenville-Brings et van West, 2005). Po skončení inkubační doby, jejíž délka bývá kolem 3 dnů, dochází k opětovné sporulaci patogenu. Tento rychlý proces dává patogenu potenciál se šířit závratnou rychlostí a zapříčinit tak nevratné škody na úrodě i během pouhého týdne.

Hlízy brambor mohou být infikovány, pokud dojde k přenosu sporangií do půdy, například smytím z listů. Sporangia proklíčují do hlíz v místě lenticel nebo oček. Napadené hlízy uhnívají již v zemi nebo během skladování. Tato infekce může zapříčinit totální ztrátovost sklizně a zároveň jako zdroj nákazy pro další léta (Andrivon, 1995; Carroll et Tudzynski, 1997).

Pohlavní rozmnožování

Jsou známy dva pohlavní typy *P. infestans* typy, A1 a A2. Studie prokázaly, že typ A1 má heterozygotní genotyp (Aa), zatímco A2 je recesivní homozygot (Judelson et al., 1995). Pro sexuální rozmnožování je nutná přítomnost obou pohlavních typů. K produkci oospor tedy dochází jen tehdy, pokud se v pletivu setkají dvě fyziologicky odlišné stélky, které v myceliu obsahují jen buď samičí, nebo samčí jádra. Dochází ke spojení antheridií a oogonií a z oplozené oosféry vzniká oospora. Oospory jsou silnostěnné spory a přežívají i velmi nepříznivé podmínky jako jsou nízké teploty nebo sucho. Přetrvávají v rostlinných zbytcích a půdě i několik let.

4.1.6. Migrace

Do 80 let byl v místech rozšíření přítomen pouze pohlavní typ A1 a sexuální cyklus rozmnožování nebyl při analyzování choroby znám. Oba pohlavní typy byly nalezeny jen v Mexiku. Mimo Mexiko dominovala přítomnost klonální linie US-1. Tato situace se nicméně radikálně změnila během 80 a 90 let. Na základě migrace došlo k zavlečení A2 typu do Evropy. Poprvé se A2 pohlavní typ objevil ve Švýcarsku (Hohl et Iselin, 1984), dále v Anglii (Gunn, 1990), následně v řadě evropských zemích, a také v Koreji nebo Japonsku. Na začátku 90 let byl A2 pohlavní typ nalezen taktéž v USA a Kanadě (Fry et al., 1993). Přítomností exotických linií *P. infestans* došlo k pohlavnímu rozmnožování patogenu. Tímto způsobem je zabezpečena genetická variabilita a také vyšší odolnost k fenylamidovým fungicidům (Goodwin et al., 1995; Andersson et al., 2009; Sibley et al., 2012). V USA není sexuální rozmnožování běžné, objevuje se jen zřídka (Lamour, 2013).

4.1.7. Příznaky

Obecně lze tvrdit, že výskyt plísně bramboru lze očekávat v období, kdy se porost začíná zapojovat a rostliny se vzájemně dotýkají. Záleží na mnoha faktorech, především však průběhu počasí, lokalitě, mikroklimatických podmínkách a náchylnosti pěstované odrůdy (Hausvater, 2011). První příznaky se objevují na listech ve spodní části rostliny. Vytváří se malé bledé až tmavě zelené skvrny, které se mění ve hnědé nebo černé léze. Vývoj záleží na vlhkosti vzduchu, skvrny se objevují nejprve na okrajích listů. Světle zelené až žluté skvrny rozdělují živé a mrtvé pletivo. Sporulace se objevuje na spodní straně listu, jako bílá plíseň ohraničující léze. Listy mohou opadávat. Plíseň bramborová se může rozšiřovat také na stonky, které jsou v místě napadení oslabeny a mohou se bortit pod náporu váhy rostliny. Na napadených hlízách pozorujeme nepravidelné zbarvení, suché, hnědé nekrotické skvrny penetrují z povrchu dovnitř pletiva. Sekundární patogeny (především bakterie) pak napadají hlízy a působí hnilobně. Plíseň bramboru se standardně nerozšiřuje během skladování, nicméně sekundární patogeny mohou tomuto jevu napomoci. Patogen se jeví zprvu nenápadně, může se ovšem během týdne rozšířit z několika napadených rostlin na celé pole (Henfling, 1987).

4.1.8. Ochrana

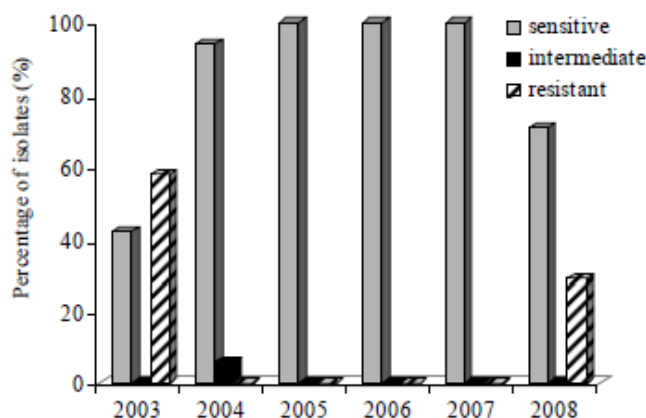
Základním pěstitelským opatřením v boji proti *P. infestans* se uvádí volba vhodné odrůdy pro dané podmínky. Dle odrůdy by se měla odvíjet další pěstitelská opatření, jako je

fungicidní ochrana nebo termín ukončení vegetace. Náchylné odrůdy nelze bez rizika pěstovat na těžké půdě nebo vlhkých lokalitách. Zásadním je pak výběr odrůdy pro ekologické zemědělství. Důležitým krokem při přípravě sadby je narašení a naklíčení, aby byl porost v době nástupu infekce v pokročilém stavu. Dalším významným faktem je dostatečně vyrovnaná výživa v porostu, zejména pak zásoba hořčíku a ostatních mikroprvků. Přehnojení dusíkem naopak vede k rychlejšímu šíření choroby. Napadení hlíz je možné redukovat vyšší vrstvou půdy nad hlízami a nahrnutím hrůbku. Půda tak působí jako mechanická a biologická izolace. Rozhodujícím článkem ochrany je použití fungicidů. Preventivní postřiky proti plísni se aplikují v období suchého počasí a slabého infekčního tlaku. Používají se fungicidy na bázi imancozebu a metiramu. V období před epidemií, epidemie a silného infekčního tlaku, za nepřízně počasí, se využívají přípravky systémové a kontaktní. V případě použití fenylamidů je nebezpečí rezistence, proto je nutná střídavá aplikace. V závěru vegetace se aplikují přípravky k ochraně hlíz. Účinnými látkami jsou například fluazinam, dimethomorph a další. Ukončení vegetace ve formě likvidace natě, je základním předpokladem pro úspěšné omezení výskytu choroby v následujících letech. Mechanické či chemické odstranění zamezuje tvorbě sporangií a jejich smyvu do půdy (Hausvater et al., 2011).

4.1.9. **Rezistence *P. infestans***

V závislosti na migraci A2 pohlavního typu *P. infestans*, došlo k posílení fitness populace patogenu a zvýšila se frekvence virulentních genů. Dramaticky se tak zvýšila i rezistence k fungicidům, konkrétně metalaxyl byl úspěšně využíván od roku 1977, jako systémový fungicid. Situace se výrazně změnila s novou sexuálně reprodukovanou populací *P. infestans*. V Evropě se rezistence objevila poprvé v Irsku a Holandsku kolem roku 1980 (Davidse et al., 1981), následně byla sledována v mnoha zemích Evropy (Gisi et Cohen, 1996). V roce 1992 bylo 45 % izolátů v USA a Kanadě rezistentních k metalaxylu. O dva roky později to bylo 87 % (Deahl et Jones, 1999). V České republice se problém objevuje roku 1989, nicméně pozdější výsledky ukazují na snížení rezistence (Hausvater et Rasocha, 2000). V závislosti na křížení ras dochází k proměnlivým stavům rezistence v populaci *P. infestans* v geografickém měřítku. Ve studii Mazáková et al., (2011) uvádějí výrazné snížení rezistence a zvýšení sensitivity k metalaxylu (Obr. 3). Fenomén je vysvětlován nespécifickým průběhem léta, tudíž velkého tlaku na populaci patogenu. Rezistence na metalaxylu je složitá a může zahrnovat několik genů. U některých izolátů uděluje rezistenci jednonukleotidový polymorfismus (SNP) genu kódující RPA190. Matson et al. (2015) ve své studii uvádějí, že

SNP chybí u mnoha rezistentních ras Severní Ameriky, Evropy a Mexika, proto může být metalaxyl opět použit při kontrole velkého množství kmenů *P. infestans*.



Obrázek 3: Odezva izolátů *P. infestans* na metalaxyl mezi lety 2003-2008 (Mazáková et al., 2011)

4.1.10. Virulence *P. infestans*

Elicitory, ve vztahu rostlina-patogen jsou látky syntetizované patogenem, jsou to látky různé chemické povahy, stimulující rostlinnou obranou reakci (Mikeš et al., 2001). Za exogenní elicitory byly dříve označovány látky patogenního původu a za endogenní elicitory látky rostlinného původu. Elicitory byly považovány za spouštěče syntézy fytoalexinů (Ebel et al., 1994). Dnes se ovšem tvrdí, že jsou to prekurzory jakékoli obranné rostlinné reakce (Nurtenberg, 1999). Elicitorů může být celá řada, můžeme je rozdělit na nespecifické a specifické. Nespecifické mají souvislost s primární imunitou, kam spadají vlivy chemických látek, MAMP's (microbe-associated molecular pattern), PAMP's (pathogen-associated molecular pattern) (Henry et al., 2011). Jako PAMP's jsou označovány malé molekuly typické pro povrchy patogenních organismů. Tyto molekuly jsou často nezbytnou součástí těl patogenů, proto je patogen nemůže eliminovat (Šašek, 2011). PAMP's triggered immunity byla v rámci evoluce vyvinuta jako odezva na specifické molekuly patogenních organismů jako je flagellin, lipopolysacharidy, peptidoglykan, chitin atd. Všechny tyto látky jsou rozeznávány rostlinnými receptory PRRs (pattern recognising receptors) (Newman, 2013). Efektory jsou rozpoznávány tzv. plant disease resistance, tedy R proteiny, zapříčiňující efektorově založenou imunitu rostliny (ETI). Tato imunita se často podílí na hypersenzitivní reakci (HR), tedy programové buněčné smrti, kdy dochází k odstřižení patogenu od zdroje výživy. Oomycety sekterují RXLR efektory (kde R je arginin, X jakákoli aminokyselina a L leucin). Tyto efektory jsou

translokovány dovnitř hostitelské buňky (Whisson et al., 2007). Rasově specifická rezistence je charakterizována vztahem dominantní alely genu rezistence (R) a korespondující patogenní alely genu avirulence (*Avr*). Na základě teorie gen proti genu, patogen přizpůsobuje svojí genetickou informaci tak, aby zabránil rozpoznání sekretovaných molekul hostitelskou rostlinou. Phytophthorové *Avr* proteiny jsou sjednoceny pod RXLR motiv a patří do velmi dynamické superodiny čítající více než 500 genů. Pro lepší sledování vývoje virulence populace *P. infestans* byl vyvinut molekulární marker založený na jednonukleotidovém polymorfismu (SNP) detekovaném na RXLP efektorových genech (Armstrong et al., 2005; Fry, 2008; Guo et al., 2009).

4.2. *Solanum tuberosum* L.

4.2.1. Taxonomie

Dle nejnovějších fylogenetických poznatků, zahrnuje řád *Solanales*, patřící mezi vyšší dvouděložné rostliny, 5 čeledí, 165 rodů a 4 125 druhů (APG, 2016). Dle Stevense (2017) náleží čeledi *Hydroleaceae* (lepicovité) jen jeden rod a 12 druhů, *Montiniaceae* (prudilovitě) 3 rody a 5 druhů, *Sphenocleaceae* 1 rod a 2 druhy. Bylo zjištěno, na základě studií 18 S ribosomální DNA, že v rámci řádu, jsou *Solanaceae* a *Convolvulaceae* sesterskými větvemi (Soltis et al., 2000). Zatímco jsou tyto 2 rozsáhlé čeledi rozšířeny téměř po celém světě, kromě arktických oblastí, *Hydroleaceae*, *Montiniaceae* a *Sphenocleaceae* jsou omezeny oblastmi tropickými a nemají žádný ekonomický význam (Eich, 2008 c). Do *Convolvulaceae* (svlačcovité) patří 59 rodů a přibližně 1880 druhů (Stevens, 2017), mezi nimiž jsou významné plodiny. Například *Ipomoea batatas* L. tzv. batáty, jejichž hlízy jsou jedlé, a mají až o 50 % vyšší nutriční hodnotu než brambory. Zaslouhou Kryštofa Kolumba byly dovezeny téměř o století dříve než brambory (Valíček, 2002).

Čeď lilkovité (*Solanaceae* Juss., 1789), v anglické literatuře uváděny jako "nightshades", čítá 102 rodů a 2460 druhů. Počet druhů a taxonomické uspořádání čeledi se neustále přetváří (Simpson, 2006).

Kromě druhů rodu *Solanum* L. jsou součástí *Solanaceae* další významné rody. Rod *Capsicum* L. (paprika) původem z Jižní Ameriky představuje dva kulturní druhy a to *C. annum* a *C. frutescens*. Jedná se o hospodářsky významnou komoditu s rozmanitým využitím od zeleniny po koření. Existuje mnoho kultivarů a pěstuje se po celém světě. *Physalis* L. (mochyně) má jedlé oranžové bobule. K těmto účelům je využíván americký druh *P. peruviana*

(Novák et Skalický, 2012). *Nicotiana tabacum* L. a *N. rustica* jsou výrazné druhy pro výrobu tabákových výrobků. Původ mají stejný jako *Caspicum*, pěstují se na všech světadílech od rovníku po teplejší oblasti mírného pásu. Sušené listy byly původně užívány americkými indiány jako vykuřovadlo. Obsahují pyrimidinové alkaloidy, nikotin je vysoce toxický (Vaníček, 2002). První divoké druhy petúnií (*Petunia*) odvozené ze semen pocházejících z jižní Ameriky, byly pěstovány v botanické zahradě v Berlíně (1823) a Glasgow (1831). Po 170 let byla prováděna selekce a výsledkem je nespočet variant této květem okrasné rostliny (Gebhardt, 2016).

Rod *Solanum* je s přibližně 1500 druhy, jedním z největších a nejrozšířenějších v rámci krytosemenných rostlin. Zároveň je jedním z deseti nejrozmanitějších rodů kvetoucích rostlin. (Frodin, 2004). Řada druhů se řadí ke kulturním plodinám. Výraznou ekonomickou důležitost mají rajčata (*S. lycopersicum* L.), brambor (*S. tuberosum* L.) a lilek (*S. melongena* L.) (D'Arcy, 1986). Rajče (*Solanum lycopersicum*, dříve *Lycopersicon esculentum*), je rostlina, která byla domestikována v pre-kolumbijských dobách v Mexiku nebo Peru. V Evropě se pak objevuje v polovině 16 století (Daunay et al., 2007). Odtud se rajčata rozšířila na všechny ostatní kontinenty a dnes je po bramboru druhou nejdůležitější rostlinou z čeledi. Pěstovaná rajčata byla vedle kukuřice hlavním rostlinným modelem klasické genetiky ve dvacátém století, díky své self-inkompatibilitě, snadné kultivaci a velké morfologické rozmanitosti (Gebhardt, 2016). K domestikaci lilku vejcoplodého (*Solanum melongena*) došlo v oblasti dnešní Indie, Myanmaru a Číny, kde se stále objevují nekulturní typy.

Obecně jsou hlíznaté druhy *Solanum* rozřazeny do dvou sekcí: *Petota* (také známa jako *Tuberarium*) a *Etuberosum*. Významnější a rozsáhlejší sekce *Petota* je rozdělena do dvou subsekcí, *Potatoe* a *Estolonifera*. Všechny hlíznaté druhy včetně kulturního bramboru (*Solanum tuberosum* L.) náleží subsekcí *Potatoe*, série *Tuberosa*. *Potatoe* čítá 224 hlíznatých druhů v 19 sériích (Spooner, 1990). Ze všech hlíznatých druhů rodu *Solanum* je kultivováno, kromě *Solanum tuberosum*, dalších šest druhů rodu *Solanum* a to lokálně v Andách (Hijmans et Spooner, 2001). Brambor má obrovský genofond čítající mnoho nekulturních druhů. Bylo publikováno mnoho prací na téma taxonomie bramboru, nicméně se autoři ve svých závěrech mnohdy rozcházejí a klasifikace je dodnes nejasná (Machida-Hirano, 2015).

4.2.2. Původ

Nejvyšší druhová rozmanitost v rodu *Solanum* se vyskytuje v Jižní Americe a je soustředěna v Andách (Knapp, 2002). Hawkes (1994) zmiňuje tři genetická centra diverzity:

rovníková oblast s krátkodenními druhy, nížinná oblast Chile a ostrovy s dlouhodobými druhy, a nížinné oblasti Uruguaye. Dle geografických studií Hijmanse et Spoonera (2001), jsou divoké druhy brambor přítomny v 16 zemích Jižní Ameriky, 88 % druhů bylo nalezeno v Argentině, Bolívii, Mexiku a Peru. Většina (77) druhů byla endemických. Největší zastoupení druhů bylo v Peru (93).

Spooner et al. (2005) předpokládá jediný původ kulturního bramboru z nekulturního prapředka přítomného v *S. brevicaulis* komplexu v jižní části And. Původ evropských brambor je diskutabilní. Huamán et Spooner (2002) uvádějí, že brambory byly původně dovezeny z oblasti Chiloé v Chile. Nicméně Hawkes (1994) uvádí, že běžné brambory pocházejí z brambor pěstovaných v Andách, bolívijských vysočinách, Peru a severní Argentině. Molekulární analýza ukázala na andský původ evropských brambor před rokem 1700, později byly introdukovány brambory z Chile a staly se častějšími ještě před vypuknutím Phytophthorové epidemie (Ames et Spooner, 2008; Ríos et al., 2007). Mexické a Středoamerické odrůdy a variety jsou považovány za výsledek migrace sadby v post Kolumbijských dobách (Spooner et al., 2007).

4.2.3. Genetická variabilita

Pěstované brambory lze klasifikovat na krajové odrůdy původních variet, které se v jižní Americe stále udržují, nebo vylepšené odrůdy pěstované po celém světě. Krajové odrůdy jsou velice variabilní ve tvarech, barvě dužniny a slupky. Jsou pěstovány v horských oblastech And od západní Venezuely po jižní a severní Argentinu a v nížinách jižního a středního Chile a jsou přizpůsobeny střední až vysoké nadmořské výšce (3000-4000 m). Druhy *Solanum* mají jedinečné reprodukční charakteristiky. Mohou se rozmnožovat vegetativně i generativně; gametami s neredukovaným počtem chromosomů, existencí odlišné ploidity, a přítomností endospermové bariéry, které regulují interploidní a mezidruhové křížení. Kulturní druhy brambor mají základní chromozómové číslo $n = 12$ a mohou být diploidní ($2n = 2x = 24$) až hexaploidní ($6n = 6x = 72$) a také triploidní ($2n = 3x = 36$), tetraploidní ($2n = 4x = 48$) nebo pentaploidní ($2n = 5x = 60$) (Machida-Hirano, 2015; Carputo et Barone, 2005). Kulturní odrůdy jsou tetrasomické tetraploidy, bez diploidizace. Převážná většina (80%) nekulturních druhů je diploidních. Ploidita se váže ke k fenoménu neredukovaných gamet. Vedle běžných haploidních gamet (n), některé genotypy mohou produkovat neredukované gamety ($2n$) jako produkt meiotických anomálií. Frekvence těchto gamet se pohybuje mezi 2-10 % (Watanabe, 2002). Diploidní druhy ze sekce *Petota* stejně jako tetraploidní *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*,

jsou self-inkompatibilní. Inkompatibilita je gametofytická, determinovaná multialelickým lokusem *S*. Druhy *Solanum* jsou druhy opylované hmyzem a potomstvo vzniká křížením. Dalším fenoménem při křížení ovlivňující křížitelnost bramboru je tzv. endosperm balance number (EBN). EBN je izolační mechanismus, který omezuje nadměrné křížení v populacích *Solanum*. Pokud dojde ke křížení druhů s nekompatibilním EBN, výsledkem je snížení vitality embryí. Diploidní ($2n = 2x = 24$) plané druhy *Solanum* s $EBN = 1$ jsou sexuálně izolované od diploidních 2EBN druhů, tetraploidů ($2n = 4x = 48$, 4EBN) a dihaploidů ($2n=2x=24$, 2EBN). *S. tuberosum* je 4EBN, kdežto většina nekulturních druhů je 2EBN. Tyto bariéry křížitelnosti mohou být překlenuty zvýšením nebo snížením úrovně ploidie (Carputo et al., 1997). Aby bylo docíleno normálního vývoje endospermu, musí být mateřské EBN dvakrát vyšší než otcovské, tzn. v poměru 2:1 (Carputo et Barone, 2005).

4.2.4. Šlechtění na rezistenci k *P. infestans*

Při šlechtění na rezistenci se využívá možnosti více zdrojů rezistence. Rezistence běžných odrůd brambor pochází zejména ze *Solanum demissum* a *S. stoloniferum*. Zpětná křížení byla realizována s druhy *S. papita*, *S. polytrichon*, *S. verrucosum* a *S. bulbocastanum*. Rezistence kulturních brambor je v čase velmi nestabilní, proto je nutno vyhledávat nové genetické zdroje s vyšší pravděpodobností životaschopnosti (Zimnoch-Guzowska, 2003).

Historie šlechtění

Kolem roku 1840, když vypukla epidemie plísňe bramborové, byla u některých kultivarů rostoucích v Evropě pozorována určitá tolerance k chorobě (Glendinning, 1983). *S. tuberosum* nicméně nebyl dostatečným zdrojem rezistence pro získání vysoce rezistentních kultivarů. Začátkem 20. století byly rezistentní mexické druhy *S. demissum* a *S. stoloniferum* zařazeny do šlechtitelských programů proti plísni bramboru (Salaman, 1937). Kolem roku 1920 byla objevena hypersenzitivní reakce u *S. demissum*. Následně byl proveden transfer R genů zpětným křížením *S. tuberosum* kultivarů se nekulturním *S. demissum* (Toxopeus, 1956). Black (1952, 1954) rozpoznal čtyři kompletně dominantní R geny pocházející ze *S. demissum* (R1, R2, R3, R4).

4.2.5. Monogenní rezistence

Monogenní (vertikální, rasově specifická) rezistence k plísní bramboru je přisuzována dominantním R genům a spojována s hypersenzitivní reakcí, vedoucí k buněčné smrti, při které dochází k rychlé lokalizaci patogenu a zamezení kolonizace okolního pletiva. Je to výsledek interakce mezi rostlinnými receptory kódovanými R-geny, kteří přímo či nepřímo, rozpoznávají patogenní elicitory kódované geny avirulence *Avr* (Flor, 1971). Rychlou mutací *Avr* genů dochází ke ztrátě rozpoznávací schopnosti receptorů, tím pádem i rezistence hostitele. Bylo rozpoznáno 11 R genů v liniích křížených se *S. demissum*, R1-R9 (Malcolmson et Black, 1966), R10 a R11 (Skidmore et Shattock, 1985). Další dva geny pocházejí ze *S. stoloniferum* (Schick et al., 1958; Schick et Schick, 1961). Některé R geny byly poměrně snadno introdukovány do genomu mnoha kultivarů bramboru, díky své dominantní a monogenní povaze. Pět z jedenácti R-genů kóduje foliální rezistenci k *P. infestans*. Gen R1 je lokalizován na krátkém rameni V chromozomu (Leonards-Schippers et al., 1992). Tato oblast obsahuje velké množství lokusů kvantitativních znaků (QTL) rezistence k plísní bramboru, které byly lokalizovány a mapovány. R2 gen je lokalizován na IV chromozomu (Li et al., 1998) a R3, R6, R7 umístěny na chromozomu XI (El-Kharbotly et al. 1994, 1996). Byly zmapovány další R-geny, kterým je přisuzována komplexní rezistence. *Rpi1* na VII chromozomu (Kuhl et al., 2001), *Rbl* na VIII (Naess et al., 2000) a *Rber* na IX chromozomu (Ewing et al., 2000).

Rezistence založená na jednom R genu nebo jejich kombinaci se potvrdila jako snadno překonatelná. Nové patotypy *P. infestans* ji překonávají, proto se mnoho šlechtitelů přiklání k odstranění R-genů ze šlechtitelského programu (Wastie, 1991). Na druhou stranu se dlouhodobě objevují názory, kdy se v rámci strategie genové pyramidy, snaží šlechtitelé zařadit co nejvíce rozličných R genů do genotypu (Mohan et al., 1997).

4.2.6. Polygenní rezistence

Horizontální rezistence je kontrolována minor geny a je považována za rasově nespecifickou (Simmonds et Westie, 1987). Horizontální rezistence kvantitativních znaků je účinná proti širokému spektru ras *P. infestans*. Když byly překonány R-geny, šlechtitelé se začali zaměřovat na tzv. polní rezistenci, kterou lze chápat jako kombinaci obou druhů rezistencí, kdy je daný genotyp schopen odolávat vnějším vlivům prostředí (Thurston, 1971). Zdroje horizontální rezistence byly nalezeny v mnoha nekulturních druzích jako je *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. verrucosum*, *S. phureja* a dalších (Ross, 1986). Šlechtění na polní rezistenci je spojeno s pozdností (Swiezynski et al., 1991). Na základě mapování genových

vazeb byla určena lokace kvalitativních a kvantitativních rezistentních genů v genomu bramboru. Faktory výrazně ovlivňující kvalitativní rezistenci byly detekovány na všech z 12 chromozomů. Dvě třetiny detekovaných QTL vykazují relativně nízký efekt na rezistenci (10-20%). Vysoký efekt (35-40 %) vykazuje zhruba 1/10 mapovaných QTL. Srovnávací analýza odlišných populací ukázala na 3 vysoce aktivní místa v genomu, a to v distálních částech chromosomu III, IV a V. Oblast vykazující nejvyšší rezistenci v nati je umístěna na chromosomu V, blízko markeru lokusu GP21 (Simko, 2002). Polygenní rezistence v tomto lokusu byla detekována u populací pocházejících z mnoha druhů *Solanum* (Leonards-Schippers et al., 1994). Polygenní rezistence se obecně považuje za účinnou a stabilní v čase, genotypy reagují podobně na různé izoláty *P. infestans* a rezistence má dobrou fenotypovou stabilitu v různých prostředích (Simko, 2002).

Solanum demissum

Solanum demissum je hexaploidní ($2n=72$) mexický divoký druh *Solanum*. Je důležitým zdrojem rezistence k plísni bramboru. Majorgeny rezistence R, ukázaly rasově specifickou rezistenci k plísni bramboru a jsou spojovány s hypersenzitivní odezvou (Valeeshouwers et al., 2011). Byla vytvořena diferenční sada klonů obsahující jednotlivé geny rezistence introdukované ze *S. demissum* (MaR1 – MaR1) (Mastenbroek, 1952). Původně byla sada vytvořena, aby každý z klonů reprezentoval jeden gen rezistence, nicméně bylo zjištěno, že R1 se nachází také v MaR5, MaR6 a MaR9 (Trognitz et Trognitz, 2007). MaR3 také obsahuje dva geny, a to R3a a R3b (Huang, 2005).

4.2.6.1.1. R1

Technikou RFLP byla konstruována první genetická mapa bramboru. R1 gen rezistence byl umístěn mezi GP21 a GP179 markery na krátkém rameni V chromosomu. Kromě aplikace molekulárních markerů, bylo využito dihaploidů zlomovým okamžikem při analýze a mapování genomu a výzkumu *Rpi* genů. Později bylo zjištěno, že se pozice R1 genu překrývá s oblastí lokusů kvantitativních znaků (QLT) pro rezistenci k plísni bramboru (Leonards-Schippers et al. 1992; Sandbrink et al. 2000). Oblast QTL je spojována s rezistencí v hlízách a listech k *P. infestans* (Śliwka et al., 2007). Meta – QTL pro oba znaky byly také lokalizovány v této oblasti (Danan et al., 2011). Ballvora et al. (2002) poprvé klonovali R1 gen, jako první ze skupiny *Rpi* genů. Tento gen obsahuje tři introny a kóduje CC-NB-LRR protein s 1293 aminokyselinami

(aa). Oblast bohatá na C-terminální leucin je neobvykle krátká a čítá pouze 400 aa. Funkční R1 gen byl přítomen pouze u rezistentní alely. Komplexní povaha R1 genu byla popsána u tří genomů allohexaploidu *S. demissum*. Tři skupiny nezávisle se vyvíjejících R geny jsou reprezentovány a charakterizovány chimérickými strukturami, které jsou výsledkem časté výměny sekvence mezi paralogy (Ballvora et al., 2002; Kuang et al., 2005). Většina současných izolátů *P. infestans* je virulentní k R1 rostlinám, zemědělská hodnota odrůd s R1 rezistencí je klasifikována jako nízká. R1 může být nicméně použit jako marker při stanovení QTL rezistence k plísni bramboru na chromosomu V (Mori et al., 2011).

4.2.6.1.2. R2

R2 je označení velmi rozsáhlé a různorodé genové rodiny mapované na chromosomu IV. R2 gen byl prvním *Rpi* genem mapovaným v tetraploidní populaci bramboru použitím AFLP markerů. Jedná se o jeden z genů odvozených ze *S. demissum* (Li et al., 1998). Bylo identifikováno 11 orthologů vykazující rezistenci k *P. infestans*: R2, R2-like, *Rpi-blb3*, *Rpi-abpt*, *Rpi-mcd1.1*, *Rpisnk1.1*, *Rpi-snk1.2*, *Rpi-edn1.1*, *Rpi-hjt1.1*, *Rpihjt1.2* a *Rpi-hjt1.3*. Geny R2 skupiny vykazující rezistenci k *P. infestans* pocházejí z různých genetických zdrojů (Tab. 1). R2 je celosvětově méně zastoupen než R1, nicméně se objevuje u mnoha evropských kultivarů jako je Eden, Fresco, Naturella, Pentland Dell a Rector. R2 gen způsobuje prodlevu při propuknutí choroby, i když se setká s virulentními izoláty (Pilet et al., 2005). R2 je v mnoha případech překonán novými rasami *P. infestans*, existují ovšem regiony v Číně, Rusku nebo Holandsku, kde rezistence překonána nebyla (Vleeshouwers et al., 2011).

4.2.6.1.3. R3

R3 je dobře prozkoumaný gen původem z Mexika introdukovaný ze *S. demissum*, mapován na krátkém rameni chromosomu XI (El-Kharbotly et al., 1994). Huang et al. (2004) popsali, že ve skutečnosti fenotyp odkazuje na dva těsně spojené geny R3a a R3b. Tyto dva geny se později ukázali jako CC-NBS-LLR s 82 % shodnými nukleotidy (Huang et al., 2005; Li et al., 2011). Geny R5, R6, R7, R8, R9, R10 a R11 byly považovány za alely stejného lokusu na chromosomu XI (Huang, 2005). R8 byl později mapován na chromosomu IX (Jo et al., 2011). S popsanými *Rpi* geny souvisí také oblast QTL na XI chromosomu, jako pozůstatek nekulturních předků bramboru (Leonards-Schippers et al., 1994). R3a je poměrně široce rozšířen mezi odrůdami kulturního bramboru stejně jako R3b. Bylo zjištěno, že Avr3a má velice malou alelickou diversitu, a to dva haplotypy. Produkty obou alel jsou schopny potlačit hypersenzitivní odezvu bramboru (Vleeshouwers et al., 2011).

4.2.6.1.4. R4

Čtvrtý z genů rezistence odvozených od *S. demissum* nebyl zatím klonován. Byl ovšem umístěn do genetické mapy. R4 je spojován s molekulárními genetickými markery sekvencí homologních Rx genů, vykazujících rezistenci k PVX. Stejně jako R1, R2 a R3 je R4 zařazován ke skupině R genů, která byla v polovině 50 let introdukována do genetické informace různých kultivarů brambor. Jejich účinnost zůstala nízká, na základě vysoké frekvence virulentních ras patogenu (Vleeshouwers et al., 2011).

Huang (2005) použil Masterbroekovu holandskou diferenciační sadu klonů v rámci své studie, kde uvádí, že geny R5, R8, R9, R10 a R11 jsou ve skutečnosti součástí R3 komplexu, tedy jeho alelické verze, umístěné na XI chromozomu. Pro geny R10 a R11 toto tvrzení později potvrdil Bradshaw et al. (2006) s použitím Blackovy sady, která je identická od R5 do R11.

Solanum bulbocastanum

Solanum bulbocastanum je diploidní, selfincompatibilní druh pocházející ze Střední Ameriky (Obr.). Vyskytuje se v horských oblastech mezi 1200-2300 m.n.m (Spooner et al., 2004). *S. bulbocastanum* nelze přímo křížit s kultivary *S. tuberosum*. Jako překlenovací druh byl použit *S. acaule* ($2n=4x$) a *S. phureja* ($2n=2x$). Triploidní *S. acaule* x *S. bulbocastanum* byl kolchicinován a výsledný fertillní hexaploid F1 byl křížen se *S. phureja* (Hermsen et Ramanna, 1973). Doposud byly identifikovány a klonovány čtyři rezistentní geny: *Rpi-blb1* (Vossen et al., 2003), také znám jako RB (Song et al., 2003); *Rpi-blb2* (Vossen et al., 2005); *Rpi-blb3* (Lokossou et al., 2010) a *Rpi-bt1* (Oosumi et al., 2009).

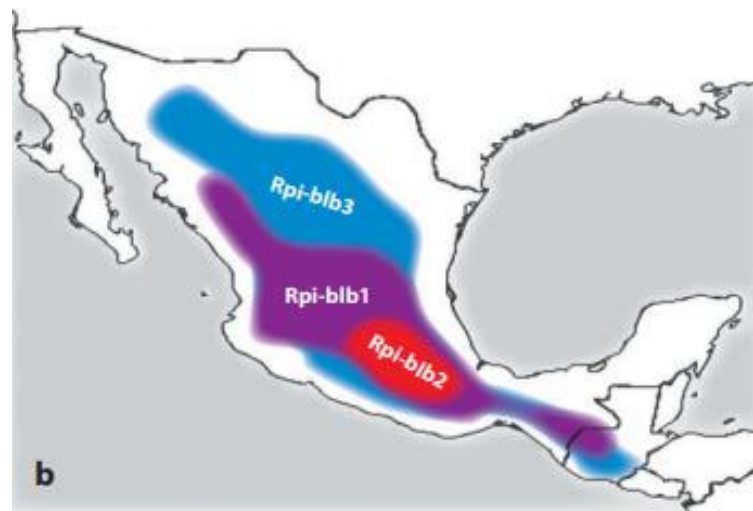
4.2.6.1.5. *Rpi-blb1*

Rpi-blb1 je také znám jako RB, izolován ze *S. bulbocastanum*, klonován s využitím genetické mapy a long-range PCR. *Rpi-blb1* kóduje CC-NB-LRR proteiny o 970 aa. Funkční homolog byl detekován u *S. stoloniferum*. *Rpi-blb1* se nachází na skupině CC-NB-LRR paralogů VIII chromosomu. Tento gen byl definován jako rasově nespecifický ke všem testovaným izolátům *P. infestans*, byly ovšem nedávno objeveny virulentní izoláty v Mexiku. Virulentních ras je obecně málo, hlavně v Evropě a Severní Americe, tím pádem se *Rpi-blb1*

bere jako rezistentní k širokému spektru *P. infestans* izolátů, na rozdíl od ostatních R genů (Vleeshouwers et al., 2011).

4.2.6.1.6. *Rpi-blb2*

Rpi-blb2 byl izolován pozičním klonováním. Odvozený čtecí rámeček kóduje polypeptid 1267 aa, a patří do skupiny CC-NB-LRR proteinů. *Rpi-blb2* je umístěn na krátkém rameni VI chromosomu. U rajčete je tento region pojmenován Mi-1 a je z 82 % identický s *Rpi-blb2*. Tento gen je původem ze středního Mexika (Obr. 4). Podobné sekvence *Rpi-blb2* se vyskytují u *Solanum* jen velmi zřídka, tento fakt nízké alelické diversity naznačuje, že se tento gen vyvinul nedávno (Lokoosou et al., 2010). *Rpi-blb2* vykazuje vysokou rezistenci k testovaným izolátům, tím pádem se považuje za slibný šlechtitelský materiál. Výsledkem introdukce byly rezistentní odrůdy brambor Bionica a Toluca (Vleeshouwers et al., 2011).



Obrázek 4. Geografické rozšíření původu skupiny genů rezistence *S. bulbocastanum* (Vleeshouwers et al., 2011)

4.2.6.1.7. *Rpi-blb3* a *Rpi-bt1*

Rpi-blb3 je umístěn na vazebné skupině IV v blízkosti markeru TG339 v hlavní skupině genů rezistenci k plísni bramboru jako také R2, *Rpi-abpt* a R2-like (Park et al., 2005). *Rpi-bt1* je další z genů *S. bulbocastanum*, který nese rezistenci k plísni bramboru, je lokalizován na chromosomu VII a ze 78 % shodný s *Rpi-blb1* (Oosumi et al., 2009).

Sárpo Mira

Sárpo Mira je jedena z nejvíce rezistentních odrůd konzumních brambor, vyskytující se momentálně na trhu (Kim et al., 2011). Byla vyšlechtěna v Maďarsku rodinou Sárvari.

Laboratorní a polní testy ukazují rezistenci i při velkém infekčním tlaku *P. infestans*. Díky morfologickým vlastnostem jako je velmi zdravá nať, potlačené olistění a dlouhé období dormance se Sárpo Mira osvědčila v oblasti ekologického zemědělství. I po mnoha letech od registrace na rezistenci v nati je Sárpo Mira stále rezistentní i k velice agresivní rase *P. infestans* 13_A2 (White et Shaw, 2010).

Rietman et al. (2012) popsali komplex pěti genů v tomto kultivaru. R3a, R3b, R4 a *Rpi-Smira1* vykazují kvantitativní rezistenci. Tomczyńska et al. (2014) lokalizovali tyto geny na chromozóm XI k lokusu R3. *Rpi-Smira2* byl nejprve detekován jen v polních podmínkách. *Rpi-Smira2* byl později lokalizován do R8 lokusu, Chromosomu IX a při polních pokusech vykazoval s R8 kvantitativní rezistenci se stejnou úrovní prodlevy v odpovědi k *P. infestans* (Jo, 2013).

Tab. 1: Přehled zmapovaných genů kvantitativní rezistence k *P. infestans* (Sedlák et al., 2016)

| Lokus | Donor | Lokalizace | Autor |
|-------------------|-------------------------|----------------|---|
| R1 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm V | Leonard-Schippers et al. (1992) |
| R2 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm IV | Li et al. (1998) |
| R3a | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | El-Kharbotly et al. (1994), Huang et al. (2005) |
| R3b | | | |
| R4 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | Verzaux (2010) |
| R5 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm VIII | Huang et al. (2005) |
| R6 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | El-Kharbotly et al. (1996) |
| R7 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | El-Kharbotly et al. (1996) |
| R8 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm IX | Jo et al. (2011) |
| R9a | <i>S. demissum</i> | Chromozóm IX | Jo et al. (2015) |
| R10 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | Bradshaw et al. (2006) |
| R11 | <i>S. demissum</i> | Chromozóm XI | Bradshaw et al. (2006) |
| <i>Rpi-blb 1</i> | <i>S. bulbocastanum</i> | Chromozóm VIII | Song et al. (2003) |
| <i>Rpi-Smira1</i> | Sárpo Mira | Chromozóm XI | Tomczyńska et al. (2014) |
| <i>Rpi-Smira2</i> | Sárpo Mira | Chromozóm IX | Jo (2013) |

5 Materiál a metody

5.1. Odvození monosporických izolátů *P. infestans*

Mezi lety 2012 a 2016 bylo odebráno celkem 142 vzorků patogenu z 22 lokalit: Valečov, Olešnice, Lučice, Malčín, Frýdnava, Veselý Žďár, Jedouchov, Kamenice u Humpolce, Velhartice, Domanínek, Želiv, Lípa, Malý Bor, Lukavec, Lučice, Malčín, Modlíkov, Nové Dvory, Praha 6 Suchdol, Rozsochatec, Semice a Veselý Žďár.

Při odebírání je nutný optimální stav napadení. Choroba se dostatečně rozvíjí ve vlhkých a nepřilíš teplých podmínkách. Pokud je vlhkost nízká a teplota vysoká, dochází k zasychání mycelia a snížení jeho vitality. Vzorky lze odebírat, pokud na krajích lézí prorůstají sporangiofory. Listy byly odebrány přímo z pole a vloženy do polyethylenového sáčku. Následně byly označeny: Ve11, Ve15, D4, D12, Ž4, Ž6, L2, L4, MB4, MB6, Lu3, Lu6 atd. a umístěny do chladicího boxu, který zabraňuje rozkladným procesům. Teplota v chladicím boxu se pohybovala okolo 10°C. Následovala manipulace v laboratoři.

Pro podpoření sporulace patogenu byly listy rubovou stranou navrch umístěny v laboratoři do vlhké komůrky (skleněná Petriho miska 100 mm s navlhčením filtračním papírem). Následovala 24 hodinová inkubace při teplotě 16-18 °C. Pro izolaci a kultivaci byly použity jednorázové polyethylenové Petriho misky o průměru 90 mm. Zoosporangia byla odebrána injekční jehlou ze sporulujícího mycelia. Tento úkon byl vykonán za pomoci binolupy při zvětšení 30x. Zoosporangia byla následně přenesena na žitný agar (Caten et Jinks, 1968) Petriho misek, které byly přikryty víčkem a uzavřeny parafilmovou fólií (Parafil M). Inkubace probíhala v termostatu, ve tmě a při teplotě 16-18 °C. Přeočkování probíhalo dle stavu kolonie obvykle 1x měsíčně.

5.2. Rostlinný materiál

5.2.1. Potomstvo Sárpo Mira

V polních podmínkách byly odebrány tři bobule ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira. Označeny SM1, SM2 a SM3. Před převodem *in vitro* byla semena sterilována 2 % roztokem NaClO po dobu 10 minut na laboratorní třepačce. Následoval oplach destilovanou vodou. Výsev byl proveden ve sterilních podmínkách flowboxu (Gelaire) na polyethylenové Petriho

misky o průměru 60 mm, obsahující MS (Murashige et Skoog, 1962) médium (Duchefa) s přídavkem sacharózy 3 % a agaru 0,7 %. Na každou Petriho misku bylo umístěno přibližně 5-8 semen. Kultivace probíhala za podmínek popsanych v kapitole 5.2.3.1. Z bobule SM1 se podařilo odvodit 31 genotypů (semenáčků), SM2-56 a SM3-50. Tyto genotypy byly po 3-4 týdnech převedeny do 250 ml kultivačních nádob. Následná kultivace a převod *ex vitro* jsou popsány v kapitolách: 5.2.3.1/2.

5.2.2. Diferenciační sada klonů

Identifikace přítomnosti všech virulentních faktorů je podmíněna prací s diferenciační sadou klonů, tedy sadou genů rezistence. Pro dlouhodobé pozorování virulence v podmínkách ČR se využívá Skotská kolekce diferenciačních klonů dle Blacka (1951). Tato sada obsahuje 11 klonů, z nichž každý nese jeden gen rezistence R1-R11 odvozené ze *S. demissum*, navíc obsahuje kontrolní typ R0, který je homozygotní a nevykazuje žádné projevy rezistence. Genotypy byly získány skrze spolupráci s Výzkumným ústavem bramborářským v Havlíčkově Brodě, kde je tato sada uložena v genové bance pod označením BDRrr (R0) - BDR11. SASA (Science and Advice for Scottish Agriculture) v Edinburgu taktéž nabízí přístup k diferenciační sadě klonů. R5 je k dispozici v databázi GRIN-Global při spolupráci s USDA (United States Department of Agriculture) ve Wisconsinu. Do diferenciační sady byl zařazen nositel genu *Rpi-blb1*, pocházejícího ze *S. bulbocastanum*. Hybrid REG46E vznikl elektrofúzí protoplastů diploidního klonu bramboru DH165 a rezistentního klonu PIS 60 S na Katedře genetiky a šlechtění (Sedláková, 2010). Dalším zařazeným klonem je odrůda Sárpo Mira, která nese R3a, R3b, R4, *Rpi-Smira1* a *Rpi-Smira2* geny rezistence.

Udržování diferenciační sady klonů *in vitro*

Kultivace *in vitro* je efektivním způsobem udržování rostlinného materiálu. V rámci aseptického prostředí je udržována čistota izolátů. Limitace může nastat v případě kontaminace plísněmi nebo bakteriózami. Proto je nutno dodržovat striktní zásady při manipulaci ve sterilním prostředí. Každá kultura diferenciační sady klonů byla vedena minimálně ve dvou opakováních pro zamezení ztráty genotypu v rámci kontaminace. Převed rostlinného materiálu byl prováděn ve flowboxu (Gelaire) v rámci Laboratoře genetických analýz, Katedry genetiky a šlechtění. Pro zamezení možných kontaminací byl flowbox před manipulací s rostlinným materiálem vysterilizován UV zářením po dobu 20 minut a následnou aplikací EtOH na pracovní plochu. Jako živné prostředí bylo použito plné MS (Murashige et Skoog, 1962)

médium (Duchefa) s přidavkem sacharózy 3 % a agaru 0,7 %. PH bylo optimalizováno KOH na 5,7. Médium bylo rozděleno v objemu 30 ml/ 1 sklenici, což odpovídá 1 cm kultivační vrstvy. Sklenice byla následně uzavřena PE víčkem B-Cap, které je uprostřed penetrované a opatřené kouskem molitanu pro lepší výměnu plynů vně a uvnitř nádoby. Nádoby byly tepelně ošetřeny v autoklávu po dobu 20 min a teplotě 121 °C. Po zchlazení na pokojovou teplotu byly sklenice vně ošetřeny EtOH a přemístěny do sterilního prostředí flowboxu. Zde byl převáděn převod rostlinného materiálu. Do jedné nádoby byly umístěny 4 pupeny daného klonu. Při manipulaci bylo použito tepelně ošetřené laboratorní nádobí a kahan pro sterilaci nástrojů. Kultury byly následně označeny a přetaženy parafilmem pro zamezení kontaminace. Kultivovány byly ve vlhčené kultivační skříni MLR-351 H (Sanyo) při fotoperiodě 16 hod den a 8 hodin noc. Teplota v režimu den byla 23 °C a v režimu noc 18 °C. Relativní vlhkost skříně byla nastavena na 50 % pro zamezení odparu vlhkosti z média. Hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů (PPF) byla nastavena na 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a intenzita osvětlení byla 14500 lx. Rostliny byly stejným způsobem pasážovány každé 4-6 týdny.

Převod *ex vitro*

Převod *ex vitro* byl realizován přibližně po 14–20 dnech, kdy rostliny vykazovaly ideální výšku a založení kořenového systému. Nodální řízky tvořili cca 2-3 pravé listy a 2-3 kořeny o délce 3 cm. Nežádoucí pro převod je nadměrná délka řízku, kdy dochází ke zkrhnutí pletiva a větší pravděpodobnost jeho poranění při manipulaci. Řízky byly umístěny do 250 ml PE kontejnerů s perlitem ve vrstvě 2-3 cm. Perlit byl navlhčen pitnou vodou z řádu. Při ideální vlhkosti by neměla zůstat voda na dně nádoby. Rostliny byly nesterilně vyjmuty z kultivačních nádob a očištěny od přebytečného agarového substrátu. Následně byly po 4 kusech vloženy do perlitového substrátu a kontejner byl ponechán napůl otevřen pro přívod vzduchu. Rostliny byly ponechány při běžné laboratorní teplotě a světle. Kultivace probíhala přibližně 5 dnů. Bylo nutno zajistit dostatečnou zálivku, aby perlit nezůstal zcela suchý.

Ve skleníku byly rostliny ponechány další 4 dny v perlitu, aby se aklimatizovaly. Následně došlo k jejich převodu do označeného sadbovače s výsevním substrátem. Po dalších 10 dnech byly rostliny převedeny do 1L kontejnerů s běžným zahradnickým substrátem. Kontejnery byly taktéž označeny. Přihnojování probíhalo po dobu 4-6 týdnů. Zálivka byla uzpůsobena ročnímu období, nicméně ideální podmínky pro pěstování byly v období března až srpna. V ostatních obdobích trpěly rostliny nedostatkem světla nebo nízkou teplotou a nebylo možné je zařadit při testování.

Výběr a příprava listů

V prostředí Laboratoře gentických analýz, Katedry genetiky a šlechtění byly připraveny 60 mm PE Petriho misky. Do nich byl vložen filtrační papír o stejném poloměru. Papír byl navlhčen pitnou vodou. Bylo testováno 13 genů rezistence, a to na klonech: R1-R11, REG46E a SM. Pro testování jednoho izolátu *P. infestans* ve dvou opakováních bylo tedy potřeba připravit 26 Petriho misek. Misky byly označeny jménem klonu. Listy byly odebírány v ranních hodinách, kolem 10 hodiny, v pondělí nebo ve čtvrtek. Odebereme požadovaný počet listů, na jeden list je možno použít až 4 izoláty. Listy vybíráme tak, aby si byly morfologicky co nejpodobnější. Nejsou ideální listy koncové, obvykle jsou příliš velké a listy nesmějí přesahovat přes Petriho misku. Listy do Petriho misky umístíme rubovou stranou navrch, následně misku uzavřeme. Inokuluje v den odběru, v co nejmenším časovém rozptylu.

5.3. Inokulace

5.3.1. Příprava inokulační suspenze

Příprava inokulační suspenze probíhala vždy těsně před samotnou inokulací listů. Kultura *P. infestans* je vhodná k inokulaci tehdy, pokud je agar rovnoměrně porostlý myceliem, které produkuje zoosporangia. Množství sporangií závisí na kondici a stáří kultury. Suspenze byly připravovány z kultur starých 4 týdny. Mycelium bylo seškrábnuto z kultury skalpelem a vloženo do 0,7 ml sterilní vody v 2ml PP zkumavce. Sporangia je nutno vytřepat z mycelia, opakovanou rotací tyčinky ve zkumavce. Mycelium pojme mnoho vody, proto je třeba ho před vyjmutím stlačit a přebytečnou vodu vymačkat. Následně byla provedena kontrola přítomnosti zoosporangií pod mikroskopem.

5.3.2. Ředění inokulační suspenze

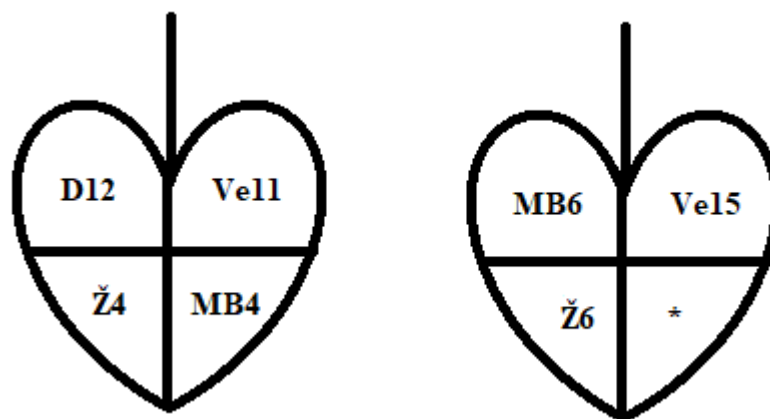
Z inokula byly odebrány 3 kapky o objemu 2 μ l a umístěny na podložní sklíčko. Následně byly spočítány zoosporangia v každé z kapek při zvětšení (100x). Dále byl početně vyjádřen průměrný počet zoosporangií v 1 ml. Byly použity suspenze s počty 10-12 tis. sporangií/ml.

5.3.3. Inokulace a inkubace

Bylo testováno 142 inokulačních suspenzí na diferenční sadě klonů. Každý z izolátů byl testován ve dvou opakováních. Testování bylo časově náročné z důvodu velkého množství rostlinného materiálu. Pro získání celého objemu dat bylo zapotřebí: 284 listů z každé rostliny diferenční sady.

Při testování 205 genotypů ze samooplylení Sárpo Mira, byla pro zjednodušení použita listová mapa (Obr. 5), kdy byly listy inokulovány čtyřmi izoláty.

Inokulace probíhala v podmínkách laboratoře. Inokulační směs byla nanášena mechanickou pipetou na rubovou stranu listu v objemu 20 µl dle listové mapy (Obr. 5). Kapky byly nanášeny podél hlavní žilky. Po označení a uzavření, byly Petriho misky umístěny na ták a přeneseny do inkubátoru. Zde byly inkubovány 24 h při běžné fotoperiodě a teplotě 18 °C při vysoké vzdušné vlhkosti (75%). Pro inkubaci byl použit vlhčící kultivační box MLR-351 H (Sanyo). Po 24 hodinách byly listy obráceny rubovou stranou dolu. Hodnocení probíhalo 3 dny po založení pokusu.



Obrázek 5: Inokulační mapa listu pro Sárpo Mira *Lu6/Lu3/L2/L4/D4

5.4. Postup při hodnocení

5.4.1. Postup infekce

Od třetího do pátého dne inkubace se projeví příznaky infekce na listech bramboru. Přibližně po 48 hodinách lze pozorovat příznaky, které signalizují přítomnost infekce, nicméně tento údaj je variabilní. Pokud se infekce rozšiřuje normálním způsobem, jsou v místě aplikace inokulační suspenze vidět vodnaté až černohnědé tečky (mikronekrózy) o velikosti do 5,0 mm. Dle intenzity infekce se tyto nekrózy během třetího dne buď slévají do lokálních suchých či

vodnatých nektróz, nebo přetrvávají ve stejném stavu. Klony R9 obvykle reaguje vodnatými nektrózami. Avirulentní interakcí odpovídají geny R6 a R8. Spouští se hypersenzitivní reakce a vznikají tečkové nebo pavučinové nektrózy, kterými se zastavuje další postup infekce. Po třetím dnu infekce odpovídá velikost nektróz maximálně 5 % celkové listové plochy. Velikost nektróz mezi klony se liší. Klony REG46E a R9 obvykle mívají obvykle znatelně větší podíl nekrotizované plochy listu, a to až 50 %. Přesto bývají hodnoceny jako avirulentní. Při interakcích s virulentními izoláty nejsou tmavé nektrózy zpočátku patrné, pouze se objevují vodnaté mikronektrózy, které se s postupem infekce šíří na větší plochu listu a podle stáří mohou postupně plošně nebo nitkovitě nekrotizovat.

Momentem, který rozhoduje o virulenci či avirulenci izolátů, je schopnost patogenu vytvářet zoosporangiofory v místě inokulace. Tyto spóry se mohou objevovat na vnitřní i vnější straně listu. V případě nektróz je interakce izolátu považována za negativní.

5.4.2. Hodnocení

Při hodnocení interakce izolátu s genem rezistence byl použit stereoskopický mikroskop, s velkým zorným polem a jemným zaostřováním. Bylo použito zvětšení 20x. Jako vzor pro hodnocení byl využit vzor formuláře (Tab. 2).

Tabulka 2: Vzor formuláře s ukázkou záznamu možného vývoje experimentu (Sedlák et al., 2016)

| Č. j. | Izolát | R0 | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 | R10 | R11 | SM | REG |
|----------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 ^a | xxx | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/0 | +/+ | +/0 | +/0 | +/0 | +/+ | +/0 | +/0 |
| 2 ^b | yyy | +/+ | -/- | +/- | +/+ | -/- | +/+ | +/0 | +/+ | +/0 | +/0 | +/+ | +/+ | +/0 | +/0 |
| 3 ^c | zzz | -/- | -/- | -/- | -/- | +/0 | -/- | +/0 | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/- | -/- | -/- |

Pozn. a) očekávaný, úplný a konečný záznam nevyžadující revizi, b) očekávaný avšak neúplný záznam, který vyžaduje revizi interakce izolátu se dvěma klony (R1 a R4), c) neočekávaný výsledek, který naznačuje chybu v průběhu experimentu, kdy je třeba revidovat celou variantu.

Znaménko +/+ představuje pozitivní průběh interakce, tedy sporulaci v obou opakováních. Avirulenci izolátu představuje záznam +/0, kdy proběhla u rostlinného materiálu hypersenzitivní reakce, a vznikaly nektrózy. Záznam -/- označuje nejasný průběh reakce. V těchto případech buď nedošlo k interakci vůbec, nebo je výsledek zkreslený degradací rostlinného pletiva. Červené znaménko představuje hodnocení v průběhu třetího dne inkubace a projev sporulace je označen černým znaménkem.

5.4.3. **Analýza dat**

Pro porovnání dat v rámci celkové virulence a vlivu roku na virulenci byl použit chí kvadrát test. Veškeré výsledky byly zpracovány v programu MS Excel 2016.

6 Výsledky

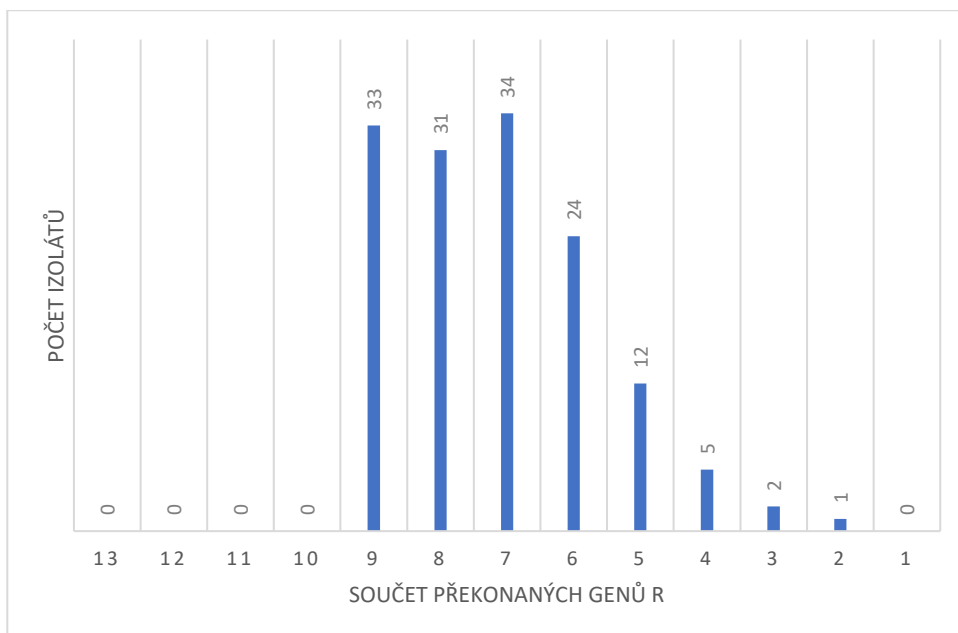
6.1. Testy virulence

Byly úspěšně provedeny testy virulence u všech 142 izolátů *P. infestans* z různých lokalit České republiky. Těmito lokalitami jsou Valečov, Olešnice, Lučice, Malčín, Frýdnava, Veselý Žďár, Jedouchov, Kamenice u Humpolce, Velhartice, Domanínek, Želiv, Lípa, Malý Bor, Lukavec, Lučice, Malčín, Modlíkov, Nové Dvory, Praha 6 Suchdol, Rozsochatec, Semice a Veselý Žďár. Testy virulence byly prováděny na Blackově diferenciační sadě klonů spolu s genotypem SM (Sárpo Mira) a Sblb (hybrid REG46E). Jako kontrolní byl použit genotyp recesivní, rr. Gen R5 nebyl zařazen do testování.

6.1.1. Celková virulence

Většina z izolátů překonala rezistenci ve více než pěti genech (Obr. 6). 23,2 % izolátů překonalo rezistenci v 9 genech, 21,8 % v 8 genech, 23,9 % v 7 genech, 16,9 % v 6 genech, 8,5 % v 5 genech, 3,5 % ve 4 genech, 1,4 % ve 2 genech a 0,7 % v 1 genu. Téměř 86 % izolátů vykazovalo virulenci v 6-9 genech, což odpovídá 46-69 % z komplexu všech R genů.

Obrázek 6: Součet překonaných genů rezistence R



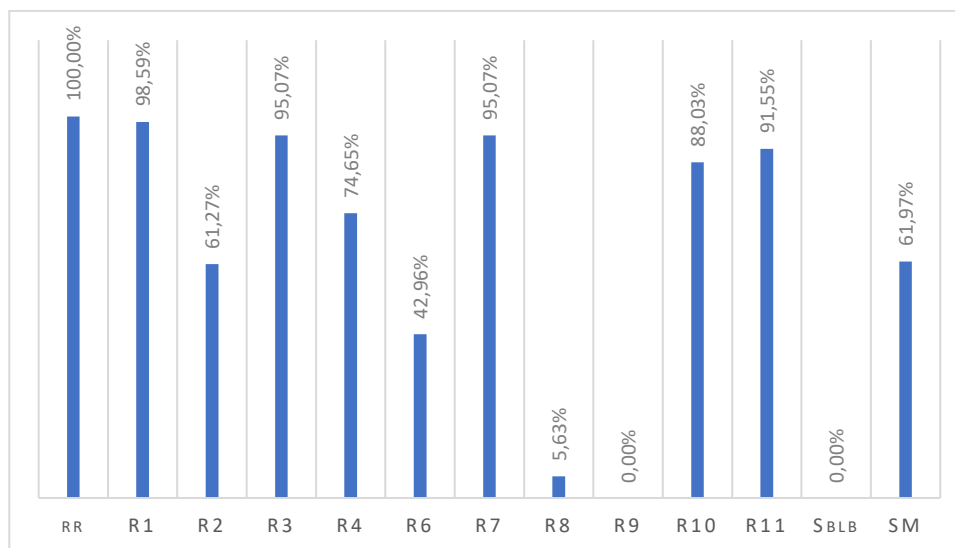
Nejčastěji překonaným R genem je R1, kdy došlo v 98,6 % případů k projevu virulence na klonech. V 91,5 % byl překonán gen R11. Shodně, v 95,1 % byly překonány geny R3 a R7.

Gen R10 byl překonán v 88 % případů, R4 v 74,6 %, R2 v 61,3%. Komplex genů Sárpo Mira byl překonán v 62 %. Rezistenci nad 50 % vykazovaly klony R6 a R8. Pro gen R6 platí celková hodnota 43 % a pro gen R8 pouze 5,6 %. Rezistenci ke 100 % aplikovaných izolátů vykazovaly klony R9 a somatický hybrid REG46E a gen *Rpi-blb1*. Všechny izoláty byly virulentní na recesivním klonu rr (Obr. 7).

Jako nulová hypotéza bylo stanoveno tvrzení, že současná populace patogenu *Phytophthora infestans* v České republice vykazuje virulenci ke genům rezistence získaných křížením bramboru s druhy *Solanum demissum* a *S. bulbocastanum*. Použitím chí kvadrát testu, bylo zjištěno, že je hypotéza z 95 % pravdivá, tedy, že současná populace vykazuje virulenci k daným genům. Chí kvadrát hodnota byla stanovena na 91,625. V případě genu *Rpi-blb1* odvozeného ze *S. bulbocastanum*, nebyl ovšem zaznamenán projev virulence ani v jednom ze sledovaných let. Proto lze tvrdit, že se jedná o virulenci pouze ke genům odvozeným ze *S. demissum*.

Rozdíly v zastoupení virulentních faktorů v jednotlivých letech se ukázaly jako neprůkazné pro 2013 ($P= 0,749$), 2014 ($P=0,501$) a 2016 ($P= 0,18$). Lze tedy tvrdit, že je současná populace *P. infestans* stabilní.

Obrázek 7: Procentuální vyjádření virulence izolátů na jednotlivých genech R



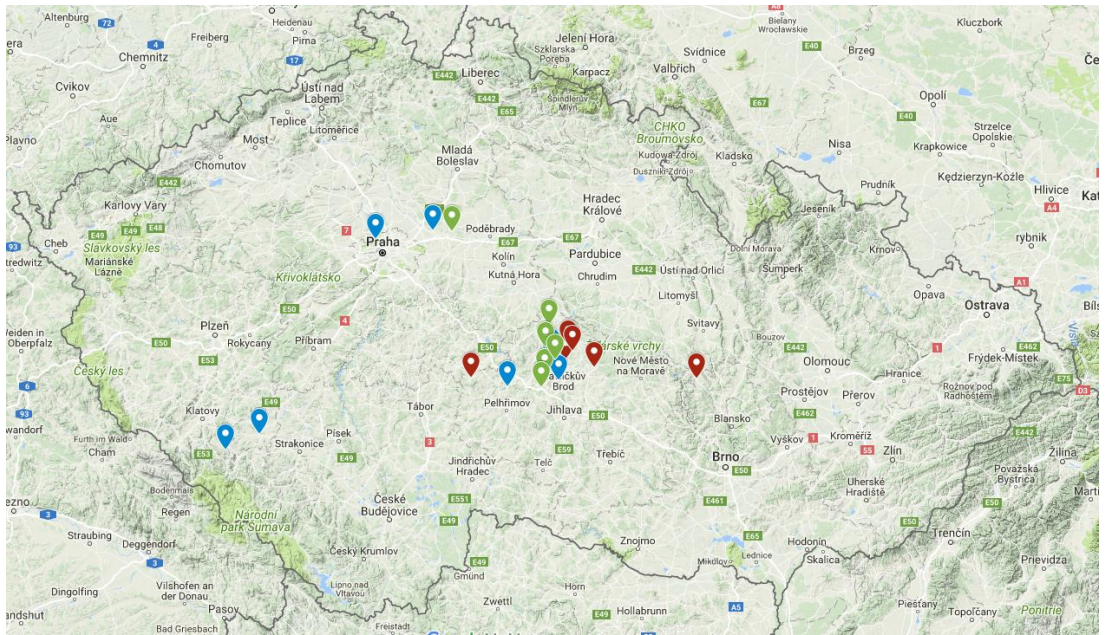
6.1.2. Virulence v rámci lokalit

Byly testovány odezvy izolátů dle jednotlivých lokalit (Obr. 8). Obecně lze konstatovat, že nebyly ani v jednom případě překonány geny R9 a Sblb. Největší virulenci (69%) vykazovaly izoláty z Českého Dvora, kdy došlo k překonání deseti R genů, kromě R8, R9 a

Sblb. Naopak nejnižší virulenci (5 genů/ 27%) vykazovaly izoláty z Malčína, které byly 100 % virulentní na klonu R1 a R7. Na R10, R11 a SM pouze s frekvencí 50 %. Virulence nad 60 % se objevila na lokalitách Čachotín, Český Dvůr, Lukavec, Modlíkov, Olešnice a Rozsochatec. V těchto lokalitách došlo k překonání R1, R3 a R7 ve 100 % případů. R2 byl překonán z 93 %, R4 (90%), R6 (94%), R10 (93%), R11 (97%), SM (71%). Velice odolný se zná být gen R8, pouze v lokalitě Olešnice se vyskytla virulence u třetiny izolátů, celkově virulentních z 5 %. Jako nejběžnější virulentní fenotypový komplex se v těchto lokalitách objevuje R1,2,3,4,6,7,10,11, SM. Virulenci mezi 50-60 % vykazovaly izoláty z následujících lokalit: Čelákovice, Lípa, Lučice, Malý Bor, Praha 6 Suchdol, Valečov, Velhartice a Želiv. V těchto lokalitách je výrazně nižší virulence ke genu R6 (34%) v porovnání s první skupinou lokalit R6 (94%). Virulence k jednotlivým genům R1 (99%), R2 (73%), R3 (93%), R4 (94%), R6 (34%), R7 (95%), R8 (5%), R10 (81%), R11 (91%), SM (49%). Nejběžnějším virulentním komplexem těchto lokalit je R1,2,3,4,7,10,11. Virulence pod 50 % byla pozorována na lokalitách: Frýdnava, Jedouchov, Kamenice u Humpolce, Malčín, Semice, Veselý Žďár. Izoláty byly virulentní R1(100%), R2 (25%), R3 (77%), R4 (32%), R6 (14%), R7 (94%), R8 (8%), R10 (67%), R11 (81%), SM (60%). Nejběžnějším fenotypem virulentním na těchto lokalitách byl R1,3,7,10,11, SM. (Obr 9.)

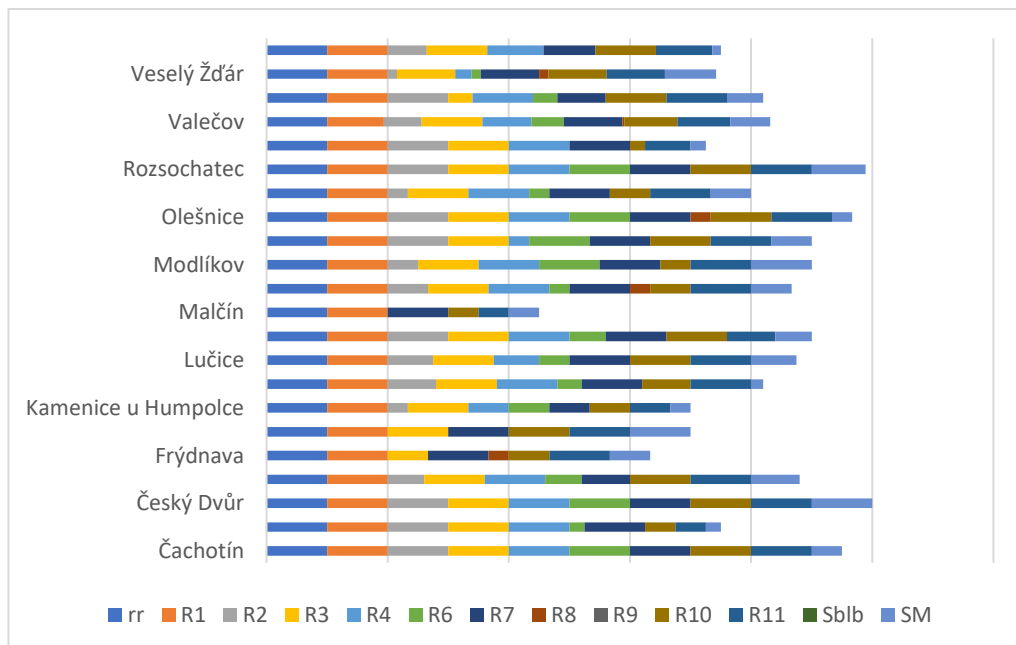
Obecně lze usuzovat, že síla izolátu se projevuje zejména na interakci s geny R2, R4 a R6, kdy dochází k výraznému snížení odezvy se snížením agresivity izolátu. Neměnný stav zůstává u genu R1, který je překonán téměř ze 100 %, při jakémkoli infekčním tlaku. Téměř neměnný stav se projevil v genu R11. Co se týče komplexu SM, složeného z genů R3a, R3b a R4, je vidět výrazně proměnný stav, kolísavý v rámci skupin lokalit.

Obrázek 8: Znázorněná lokalit dle virulence



*virulence nad 60%, virulence mezi 50-60%, virulence pod 50%.

Obrázek 9: Poměry v odezvě izolátů na různých lokalitách v rámci R genu



6.1.3. Fenotypizace ras

Celkově bylo rozpoznáno 41 odlišných ras *P. infestans* napříč lokalitami. Jako nejběžnější rasa v rámci České republiky byl vyhodnocen fenotypový komplex virulentní ke genům R1,2,3,4,6,7,10,11, sm. Tento fenotyp představuje 23 % z celkového souboru ras. Převažuje v lokalitách Český Dvůr, Valečov a Rozsochatec. S frekvencí 10 % se vyskytuje rasa komplexně virulentní ke genům R 1,3,7,10,11, sm. Tento fenotyp lze identifikovat především na lokalitě Veselý Žďár. V 9 % případů se vyskytuje rasa virulentní k R 1,2,3,4,7,10,11. Byla identifikována napříč lokalitami, především pak v lokalitě Želiv. Další identifikované fenotypy jsou uvedeny v Tab. 4.

Tabulka 4: Počet izolátů *P. infestans* s určitým fenotypem virulentním ke genům R

| Frekvence | R | Frekvence | R |
|-----------|----------------------|-----------|--------------------|
| 32 | 1,2,3,4,6,7,10,11,sm | 1 | 1,7,10,11,sm |
| 14 | 1,3,7,10,11,sm | | 1,3,6,7,11 |
| 13 | 1,2,3,4,7,10,11 | | 1,3,4,10 |
| 11 | 1,2,3,4,7,10,11,sm | | 1,3,7 |
| | 1,2,3,4,6,7,10,9 | | 1,2,3,6,7,10,11,sm |
| 6 | 1,3,4,7,10,11 | | 1,2,3,6,7,10,11 |
| | 1,3,4,7,10,11sm | | 3,4 |
| 5 | 1,3,7,8,10,11,sm | | 2,3,4,6,7,10,11,sm |
| | 1,3,7,10,11 | | 1,2,3,4,7,sm |
| 3 | 1,2,3,4,6,7,10,sm | | 1,2,3,4,7,11 |
| | 1,3,7,11 | | 1,3,4,10,11 |
| 2 | 1,3,4,6,7,11,sm | | 1,2,4,6,10,11 |
| | 1,3,4,6,7,10,11,sm | | 1,2,4,6,7,10,11 |
| | 1,3,6,7,10,11,sm | | 1,2,4,7,10,11,sm |
| | 1,2,3,4,7 | | 1,2,4,6 |
| | 1,2,3,4,7,11,sm | | 1,3,4,7,8,10,11,sm |
| | 1,3,4,6,7,11,sm | | 1,3,4,7,11 |
| 1 | 1,3,4,6,7,8,11,sm | | 1,2,3,4,10,11,sm |
| | 1,2,3,4,6,7,8,10,11 | | 1,2,3,4,10,11 |
| | 1,7,10,11 | | 1,2,3,7,10 |
| | 1,7,sm | | |

6.2. Rezistence potomstva ze samoopylení Sárpo Mira

Bylo testováno 204 genotypů ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira. Z bobule číslo 1 bylo testováno 58 rostlin, z bobule číslo 2 bylo testováno 72 rostlin a z bobule číslo 3 jsme testovali 74 rostlin. Rostlinný materiál byl úspěšně optimalizován. K úhynu rostlin ve stádiu semenáčku došlo pouze ve 3 % případů.

Pro inokulaci byly použity 4 sety inokulačních suspenzí složené z izolátů z lokalit Únětice (U), Lukavec (LU), Praha Suchdol (S), Lípa (L), Malý Bor (MB), Želiv (Ž), Velhartice (Ve) a Domanínec (D). Set 1 obsahoval izoláty (U3, U6, S2, L12), set 2 (U2,U4,S1,L2), set 3 (MB4, Ž4, Ve11, D12), set 4 (L4*Lu6,Lu3,D4,L2, Ž6, Ve15, MB6). Set 4 měl v pozici 1 tzv. klouzavý izolát, kdy docházelo k častějším výměnám v rámci testování.

6.2.1. Virulence použitých izolátů

Virulence použitých izolátů byla testována na diferenční sadě klonů. Stejně jako v případě celkové virulence, nedošlo k projevu virulence na diferenčních klonech R9 a Sblb. Velhartické izoláty vykazovaly celkovou virulenci 55 %, Domanínek (60 %), Lukavec (62 %), Malý Bor (59 %), Lípa (55 %), Želiv (50 %), Praha 6 Suchdol (54 %). Celková virulence izolátů byla mezi 50-62 %, což naznačuje vyrovnanost izolátů. Virulence jednotlivých genů v lokalitě je uvedena v tabulce (Tab. 3)

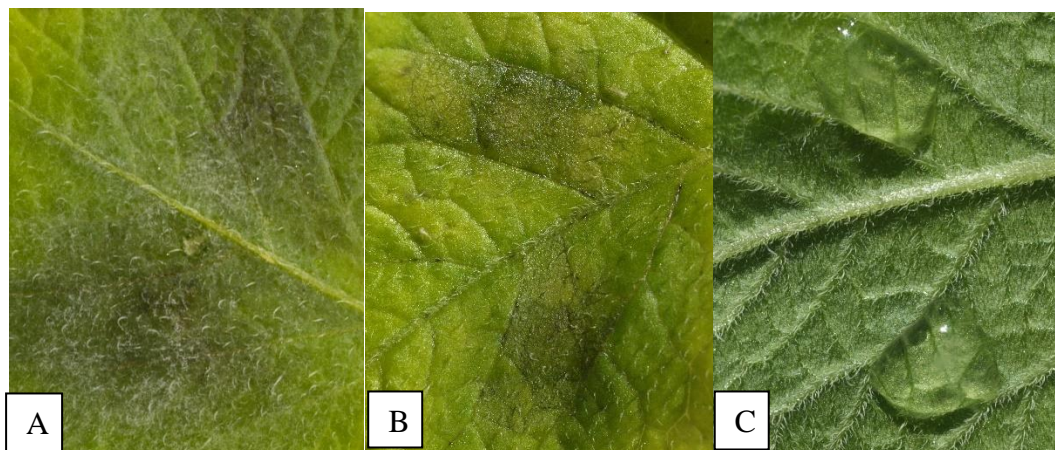
Tabulka 3: Frekvence virulentních faktorů v lokalitě

| Lokalita | rr | R1 | R2 | R3 | R4 | R6 | R7 | R8 | R9 | R10 | R11 | Sblb | SM |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| Velhartice | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,6 |
| Domanínek | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,8 |
| Lukavec | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,8 | 0,0 | 0,6 |
| Malý Bor | 1,0 | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 1,0 | 0,3 | 0,0 | 0,7 | 1,0 | 0,0 | 0,7 |
| Lípa | 1,0 | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,0 | 0,4 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,8 | 1,0 | 0,0 | 0,2 |
| Želiv | 1,0 | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,9 | 0,0 | 0,9 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,9 | 0,0 | 0,1 |
| Únětice | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| Praha 6 | | | | | | | | | | | | | |
| Suchdol | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 1,0 | 1,0 | 0,3 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,7 | 1,0 | 0,0 | 0,7 |

6.2.2. Odpověď rostlin na inokulaci a selekce

Byly pozorovány tři typy interakce mezi patogenem a rostlinou. Geny rezistence rostliny byly buď překonány a docházelo ke sporulaci patogenu (+/+) (Obr. 10 A). Ve druhé interakci rostlina odpovídala hypersenzitivní reakcí a patogen zůstal avirulentní vůči danému rostlinnému genotypu (+/0) (Obr. 10 B). Nebyla pozorována žádná reakce mezi hostitelem a patogenem v místě inokulace (-/-) (Obr. 10 C).

Obrázek 10: Projev sporulace (A), hypersenzitivní reakce (B), nulová odezva (C)



V letech 2016 a 2017 byl každý genotyp testován ve dvou opakováních celkově osmi izoláty z různých lokalit. Jako selekční kritérium pozitivní selekce bylo stanoveno, že musí rostlina vykazovat hypersenzitivní reakci na 4 a více izolátů.

V rámci testování potomstva z bobule číslo 1 byly vybrány sety 3 a 4. Celkově došlo v rámci testovaných genotypů ke sporulaci v 66 % případů, rezistence nastala v 22 % a nulová interakce se objevuje v 11 % testování. Z 58 genotypů bylo vybráno 12 rostlin určených k dalšímu šlechtění, což odpovídá 20,7 % z celkového počtu testovaných genotypů bobule 1.

Pro testování potomstva bobule č. 2 byly použity sety 1,2,3 a 4, každý genotyp byl testován pouze dvěma vybranými sety. Celková sporulace patogenu nastala v 52 % testování, rezistenci vykazovalo 40 % interakcí a v 9 % nedošlo k žádné reakci. Bylo vybráno 16 genotypů z celkových 72 rostlin, což odpovídá 21,9 % z celkového počtu.

Genotypy třetí bobule byly testovány střídavě všemi inokulačními sety. Celkově se sporulace objevila v 62 % testování, rezistentních bylo 33 % testování a bez odezvy 5 %. V rámci selekce bylo vybráno 9 genotypů (12,2 %). Nejúspěšnější odezvu měly genotypy bobule č. 2, naopak nejslaběji reagoval rostlinný materiál z bobule č. 3.

7 Diskuze

Virulence současné populace *P. infestans* je celosvětově řešená problematika. Napříč Evropou vniklo mnoho publikací věnujících se tomuto tématu (Andrison et al., 2011; Aav et al., 2015; Runno-Paurson et al., 2011; Michalska et al., 2016; Elansky et al., 2001; Savazzini et Galletti, 2015; Lehtinen et al., 2008). V České republice (Sedlák et al., 2017; Mazáková et al., 2006, 2010) vypracovali první studie mapující virulenci a výskyt pohlavních typů *P. infestans*. Co se týče celkové struktury populace *P. infestans* v České republice, nejsou známa žádná data před rokem 2012. Tato diplomová práce se odkazuje na výsledky Sedlák et al. (2017), rozšiřuje analýzu sesbíraných dat a představuje komplexní řešení při novošlechtění bramboru proti plísni bramborové.

Výsledky ukazují, že téměř 86 % izolátů vykazovalo virulenci v 6-9 genech (7,15), R1, R3, R7, R10, R11, kdy došlo k překonání rezistence z více než 88 %. Aav et al. (2015) předložili výsledky testování z 13 lokalit v Litvě. Bylo testováno 181 izolátů *P. infestans* mezi lety 2010 a 2012. Více než 80 % izolátů bylo virulentních ke genům R1, R3, R4, R7, R10 a R11, kdežto méně než 33 % bylo virulentních k R5, R8 a R9. R9 pouze ve 24 %. Virulentní faktor byl vysoký (7,2). Virulence k R9 se v českých podmínkách nevyskytuje, k významnému rozdílu dochází i v případě R8 (5,6 %), pro české podmínky. R5 nebyl testován. Vyšší virulence ke genu R2 není běžná v evropských zemích jako je Polsko, Dánsko, Finsko, Norsko nebo Švédsko (Lehtinen et al., 2008; Chmielarz et al., 2014), nicméně byla zaznamenána v Litvě (76%), stejně tak jako v České republice (61%), v poměrně vysoké míře. Runno-Paurson et al. (2011) uvádí virulentní faktor 6,7 izolátů, analyzovaných mezi lety 2001 a 2008 v Estonsku. Virulence se v tomto případě objevuje s největší frekvencí u R1, R3, R4, R7, R10 a R11. Tyto výsledky se shodují s výsledky publikovanými dříve v Estonsku (Runno-Paurson et al., 2009; Runno-Paurson et al., 2010 a; Runno-Paurson et al., 2010 b), ale také v Dánsku a Švédsku (Lehtinen et al., 2008). 743 izolátů nordické populace *P. infestans* bylo testováno v roce 2003. Byla zaznamenána virulence k průměrně 6 genům ve všech 4 hodnocených zemích (Švédsko, Dánsko, Norsko, Finsko), na rozdíl od české populace, kdy je virulence vyšší (7,15). Nordická populace *P. infestans* byla vyhodnocena jako virulentní ve více než 90 % ke genům R1, R3, R4, R7, R10 a R11. Chmielarz et al. (2014) analyzovali mezi lety 2006 a 2009, 96 polských izolátů. Většina izolátů překonala rezistenci v genech R1, R3, R4, R7, R10 a R11, výsledky se shodují s Michalska et al. (2016), kdy bylo testováno 76 izolátů na Blackově diferenciacní sadě klonů. V případě genů R1, R3, R4, R7, R10 a R11 byla virulence pozorována u 100 % případů,

pro R2, R5, R6, R8, platila virulence celkově vyšší než 58 %, pouze při reakci s R9 byla pozorována velice nízká virulence a to 17 %, na rozdíl od české populace, kdy se virulence na klonu R9 neprojevuje. Významný rozdíl byl zaznamenán v rámci klonu R8, kdy polské izoláty byly virulentní z 68 %, kdežto české pouze z 5,6 %. Elansky et al. (2001) vyhodnocovali virulenci 485 izolátů *P. infestans* nasbíraných po celém Rusku. Virulence se pohybovala od 5,5 do 10. Z 94 % byla zaznamenána frekvence překonání genů R1, R2, R3 a R4, na rozdíl od R5, R6, R7, R8, R9 a R11, kdy byla frekvence 69 %.

Při rozpoznávání fenotypů *P. infestans* byl zařazen do testování klon SM (Sárpo Mira) nesoucí komplex genů. Celkový počet rozpoznávaných ras v souboru 142 izolátů byl 41. Nejfrekventovanějším virulentním fenotypem (32 izolátů - 23%) je pro Českou republiku 1,2,3,4,6,7,10,11, sm. Následuje fenotyp 1,3,7,10,11, sm (14 izolátů) a 1,2,3,4,7,10,11 (13 izolátů). V Estonsku se objevují jako dva nejfrekventovanější fenotypy 1,3,4,7,10,11 a 1,2,3,4,6,7,10, 11 (Runno-Paurson, 2011), kdežto v Litvě je to 1,2,3,4,7,10,11 a 1,2,3,4,6,7,10,11 (Aav et al., 2015). Dominujícím fenotypem v severní Evropě je 1,3,4,7,10,11 (Lehtinen et al., 2008). V Polsku byly zaznamenány jako dva nejfrekventovanější patotypy 1,2,3,4,5,6,7,8,10,11 (16 izolátů) a 1,2,3,4,5,6,7,10,11 (16 izolátů) (Michalska et al., 2016).

Dle intenzity virulence, byly rasy *P. infestans* sesbírané na území ČR rozděleny do tří skupin: virulence nad 60 %, virulence mezi 50 a 60 % a virulence pod 50 %. Největší virulenci (69%) vykazovaly izoláty z Českého Dvora. Naopak nejnižší virulenci (27%) vykazovaly izoláty z Malčína. Nebyla zjištěna geografická závislost na síle virulence izolátu, naopak byl zjištěn vliv roku na celkové virulenci *P. infestans* na území České republiky. Stejně tak byla stanovena celková virulence současné populace *P. infestans* ke genům rezistence.

P. infestans je velmi rychle adaptovatelná podmínkám. Zejména po zavlečení A2 pohlavního typu do Evropy, je zde potenciál ke zvýšení genetické variability patogenu. R geny introdukované ze *S. demissum* se zdají býti překonaným faktorem rezistence kulturních brambor. Testy virulence po celé Evropě ukazují, že jediným nepřekonaným genem je R9. Pro Českou republiku je nadějným zdrojem rezistence také gen R8, který byl překonán jen v 5,6 %. Genetická stabilita v populaci *P. infestans* je klíčovým faktorem při křížení bramboru na rezistenci. Jedná se o vhodnou volbu genetických zdrojů rezistence. Vzhledem k tomu, že je současná populace *P. infestans* považována za stabilní, lze tyto zdroje využít ke šlechtitelským účelům (Sedlák et al., 2017). Dalším geneticky zajímavým zdrojem při šlechtění na rezistenci jsou například odrůdy Bionica a Toluca, které mají ve své genetické informaci gen *Rpi-blb1*, odvozen ze *S. bulbocastanum*. Tento gen vykazuje 100 % rezistenci ke všem rasám *P. infestans*.

Somatický hybrid REG46E použitý při testování bohužel vykazuje dlouhodobě nízkou reprodukční vitalitu, tím pádem se stává nevhodným pro další šlechtitelské účely.

Odrůda Sárpo Mira byla navržena jako potenciální genetický zdroj dlouhodobé rezistence k *P. infestans* (Kim et al., 2011; White et Shawn, 2010). Nabízí kvantitativní i kvalitativní rezistenci nejméně v 5 genech. Čtyři z pěti genů (R3a, R3b, R4 a *Rpi-Smira1*) byly determinovány listovými testy virulence, pátý gen, *Rpi-Smira2* byl rozpoznán jen v polních podmínkách (Rietman et al., 2012). Orłowska et al. (2012) uvádějí ve své studii, že odrůda Sárpo Mira byla vyhodnocena jako polně rezistentní k *P. infestans*. Rezistence nebyla překonána v žádném případě mezi lety 2004–2011. Tato studie proběhla v Dánsku a byly použity místní izoláty. Výsledky ukazují na silnou hypersenzitivní reakci a podporují zařazení Sárpo Mira do šlechtitelských programů. Potomstvo Sárpo Mira bylo testováno izoláty z rozdílných geografických lokalit (Maxiko, Ekvádor, Belgie, Holandsko). Výsledky laboratorních testů ukazují, že projev virulence na listech nově vzniklých genotypů je velmi variabilní. Některé rasy byly schopny překonat komplex R genů ve 100 % případů, nicméně polní testy ukázaly, že pouze 4 % rostlin Sárpo Mira bylo napadeno *P. infestans* (Rietman et al., 2012). Dle Gebhard et Valkonen (2001) je polní rezistence kontrolována minor geny, kteří udělují kvantitativní fenotyp.

Celková virulence současné populace *P. infestans* k odrůdě Sárpo Mira je 62 %. Byly zaznamenány rozdíly v meziroční virulenci ke genům SM, kdy v roce 2012 byla virulence ras na území ČR 54 %, 2013 (76%), 2014 (77%) a 2016 (42%). Výsledky ukazují nestálost v interakci mezi patogenem a odrůdou a neukazují na souvislost s virulencí ke genům R3 a R4. Při novošlechtění Sárpo Mira a testování potomstva ze samoopylení byla zaznamenána podobně silná virulence izolátů jako na klonu SM. Pro další šlechtění byly vybrány genotypy s projevem hypersenzitivní reakce ve více než 50% testování. Vybráno bylo 37 genotypů. Projev v laboratorním testu však musí být ověřen v podmínkách polního pokusu a výkonné a polně odolné klony pak mohou být základem dalšího šlechtění odrůd bramboru s vyšší odolností k *P. infestans*.

8 Závěr

- Byly realizovány testy virulence současné populace *P. infestans* na diferenciační sadě klonů s geny introdukovanými ze *S. demissum* a *S. bulbocastanum*, (*Rpi-blb*) a se zařazením komplexu R genů odrůdy Sárpo Mira. Na základě výsledků testů rezistence byla vyhodnocena současné populace *P. infestans* na území České republiky, jako virulentní. Dále nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi projevy virulence v rámci let, proto lze tvrdit, že je současná populace *P. infestans* relativně stabilní.
- Předložená metodika může být použita k monitorování vývoje patogenu, postupy lze uplatnit při charakterizaci izolátů. Dále lze metodiku použít k přípravě izolátů na laboratorní provokační testy. Metody popisují postupy při hodnocení laboratorních testů rezistence genotypů v novošlechtění.
- Byly realizovány laboratorní testy rezistence genotypů ze samoopylení odrůdy Sárpo Mira. Vybrané genotypy budou následně použity při další práci v novošlechtění bramboru. Stejným způsobem lze využít genetické zdroje s geny introdukovanými ze *S. demissum* (R8, R9) a *S. bulbocastanum* (*Rpi-blb1*), vůči nimž je virulence patogenu v ČR dlouhodobě nízká.

9 Reference

- Aav, A., Skrabule, I., Bimšteine, G., Kaart, T., Williams, I. H., Runno-Paurson, E. 2015. The structure of mating type, metalaxyl resistance and virulence of *Phytophthora infestans* isolates collected from Latvia. *Zemdirbyste-Agriculture*. 102 (3). 335-342.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. Burlington, MA. ISBN: 0080473784.
- Ames, M., Spooner, D. M. 2008. DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *American Journal of Botany*. 95 (2). 252-257.
- Andersson, B. 2007. Sexual reproduction in *Phytophthora infestans*: epidemiological consequences. Dept. of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. ISBN: 9789157673763.
- Andrison, D., Avendaño-Córcoles, J., Cameron, A. M., Carnegie, S. F., Cooke, L. R., Corbière, R., Detourné, D., Dowley, L. J., Evans, D., Forisekova, K., Griffin, D. G., Hannukkala, A., Lees, A. K., Lebecka, R., Niepold, F., Polgar, Z., Shaw, D. S., Thompson, J., Trognitz, B., van Raaij, H. M. G., Zimnoch-Guzowska, E. 2011. Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories. *Plant Pathology*. 60 (3). 556-565.
- Andrison, D. 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840 s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*. 45 (6). 1027-1035.
- APG IV. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants *Botanical Journal of the Linnean Society*. 181 (1). 1-20.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S. 2015. "The revised classification of eukaryotes". *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59 (5). 429–493.

- Armstrong, M. R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I.B., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Bohme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M.A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J.L., and Birch, P.R.J. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102 (2). 7766-7771.
- Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C. A., Oberhagemann, P., Salamini, F., Gebhardt, C. 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *The Plant Journal*. 30 (3). 361-371
- Bartnicki-Garcia S., Wang, M. C. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (eds) *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology, and pathology. APS Press, St. Paul. 111 (3). 121–137.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., Sekimoto, S. 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma*. 249 (1). 3-19.
- Berkeley, M. J. 1846. Observations, botanical and physiological on the potato murain. *Journal Horticultural Society London* 1. 9-34.
- Black, W. 1952. Inheritance of resistance to blight (*Phytophthora infestans*) in potatoes. Interrelationships of genes and strains. [Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Botany](#). 44 (2). 312–352.
- Black, W. 1954. Late blight resistance work in Scotland. *American Potato Journal*. 34(4). 93-100.
- Bourke, P. M. 1964. Emergence of potato blight. *Nature*. 203 (8). 805-808.
- Bradshaw, J. E., Bryan, G. J., Lees, A. K., McLean, K., Solomon-Blackburn, R. M. 2006. Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present

in the potato (*Solanum tuberosum*) R-gene differentials of Black. Theoretical and Applied Genetics. 112 (4).

Brasier, C. M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. Plant Pathology. 57 (5). 792-808.

Carputo, D., Barone, A., Cardi, T., Sebastiano, A., Frusciante, L., Peloquin, S. J. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). Proceedings of the National Academy of Sciences. 94 (22). 12013-12017.

Carroll, G. C., Tudzynski, P. 1997. Plant Relationships Part B Part B. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. ISBN: 3642606474.

Carputo, D., Barone, A., 2005. Ploidy level manipulations in potato through sexual hybridisation. Annals of Applied Biology. 146 (1). 71-79.

Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. & Brasier, C. M..2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30 (3). 17–32.

Danan, S., Veyrieras, J. -B., Lefebvre, V. 2011. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. BMC Plant Biology. 11 (1).

D'Arcy, W. G. 1986. *Solanaceae*, biology and systematics. Columbia University Press. New York. ISBN: 9780231057806.

Daunay, M. -C., Laterrot, H., Janick, J. 2007. Iconography of the solanaceae from antiquity to the xviiith century: a rich source of information on genetic diversity and uses. Acta Horticulturae. 74 (5). 59-88.

Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J., Wal, D. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Netherlands Journal of Plant Pathology. 87 (2). 65-68.

Deahl, K. L., Jones, R. 1999. The occurrence of late blight in North America. In: Late Blight: A threat to global food security, Vol. 1 International Potato Center, Lima, Peru. 15-18.

Ebel, J., Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. International Review of Cytology. 148 (1). 1-36.

Eich, E. 2008. *Solanaceae* and *convolvulaceae* – secondary metabolites: biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance: a handbook. Springer. London. ISBN: 978-3-540-74541-9.

Elansky, S., Smirnov, A., Dyakov, Y., Dolgova, A., Filippov, A., Kozlovsky, B., Kozlovskaya, I., Russo, P., Smart, C., Fry, W. 2001. Genotypic Analysis of Russian Isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow Region, Siberia and Far East. Journal of Phytopathology. 149 (10). 605-611.

Ellsworth, H. 1843. Annual Report of Commissioner of Patents, 28th Congress, No. 150.

El-Kharbotly, A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D. J., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W. J., Salamini, F., Gebhardt, C. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. MGG Molecular & General Genetics. 242 (6). 749-754.

El-Kharbotly, A., Palomino-Sánchez, C., Salamini, F., Jacobsen, E., Gebhardt, C. 1996. R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI. Theoretical and Applied Genetics. 92 (7). 880-884.

- Ewing, E. E, Simko, I, Smart, C. D, Bonierbale, M. W, Izubuti, E. S. G, May. G. D, Fry, W. E. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Molecular Breeding* 6 (1). 25–36.
- Flor, H. H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9 (1). 275-296.
- Frodin, D. G. 2004. History and Concepts of Big Plant Genera. *Taxon*. 53 (3). 753-65.
- Fry, W. E. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. *Plant Disease*. 77 (7). 653.
- Fry, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*. 9 (3). 385-402.
- Gebhardt, C. 2016. The historical role of species from the *Solanaceae* plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*. 129 (12). 2281-2294.
- Gisi, U., Cohen, Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A Case Study with *Phytophthora infestans* Involving Mating Type and Race Structure. *Annual Review of Phytopathology*. 43 (1). 549–572.
- Glendinning, D. R. 1983. Potato introductions and breeding up to the early 20th century. *New Phytologist*. 94 (3). 479-505.
- Gómez-Alpizar, L., Carbone, I., Ristaino, J. B. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (9). 3306-3311
- Goodwin, S. B, Sujkowskij, L. S, Fry, W. E. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight fungus. *Phytopathology*. 85 (1). 669-676.

- Goodwin, S. B., Drenth, A. 1997. Origin of the A2 Mating Type of *Phytophthora infestans* Outside Mexico. *Phytopathology*. 87 (10). 992-999.
- Grenville-Briggs, L. J, van West, P. 2005. The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. *Advances in Plant Microbiology*. 57 (1). 217-242.
- Grünwald, N. J., Flier, W. G. 2005. The Biology of *Phytophthora infestans* at Its Center of Origin. *Annual Review of Phytopathology*. 43 (1). 171-190.
- Gunn, J. S. 1990. *Crop Protection Handbook – Potatoes*. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, GU 97 PH, UK.
- Hausvater, E., Doležal, P., Dejmalová, J. 2011. Plíseň bramboru. Vyd. 4., aktualiz. Výzkumný ústav bramborařský. Havlíčkův Brod. Praktické informace. ISBN: 978-80-86940-34-2.
- Hausvater, E., Rasocha, V. 2000. *Nové aspekty plísně bramborové a aktualizace integrované ochrany. [Závěrečná zpráva.] Výzkumný ústav bramborařský Havlíčkův Brod, s.r.o., Havlíčkův Brod.*
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F., van der Vossen, E. A. G. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Research*. 51 (1). 47-57.
- Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. *In: Bradshaw, J.E., Mackay, G. R. (eds.) Potato genetics*, CAB International, Wallingford. 3–42.
- Henfling, J.W. 1987. Late blight of potato: *Phytophthora infestans*. Technical Information BL Iletin 4. International Potato Center, Lima, Peru. 25. (Second edition, revised).
- Henry, G., Tonart, P., Ongena M. 2011. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16.

- Hermesen, J. G. T. H., Ramanna, M. S. 1973. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*. 22 (3). 457-466.
- Hijmans, R. J., Spooner, D. M. 2001. Geographic Distribution of Wild Potato Species. *American Journal of Botany*. 88 (11). 2101-2112.
- Hohl, H. R., Iselin, K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of the British Mycological Society*. 83 (3). 529-530
- Huamán, Z. Spooner, D. M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*), *American Journal of Botany* 89 (6). 947–965.
- Huang, S. 2005. Discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato: genomic structure functional diversity and implications. s.n. Wageningen. ISBN: 9085041805.
- Chmielarz, M., Sobkowiak, S., Dębski, K., Cooke, D. E. L., Brurberg, M. B., Śliwka, J. 2014. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. *Plant Pathology*. 63 (1). 203-211.
- Jo, K. R. 2013. Unveiling and deploying durability of late blight resistance in potato from natural stacking to cisgenic stacking. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Jones, J. D, Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444 (1). 323–329.
- Judelson H. S. 1997. Expression and inheritance of sexual preference and selfing propensity in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics Biology* 21: 188-197.
- Judelson, H. S., Blanco, F. A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*. 3 (1). 47-58.
- Judelson HS, Spielman LJ, Shattock RC. 1995. Genetic mapping and non-mendelian segregation of mating type loci in the oomycete. *Genetics* 141 (2). 503-512.

- Kalina, T., Váňa, J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 606 s. ISBN 80-246-1036-1.
- Khan, M. S., Yu, X., Kikuchi, A., Asahina, M., Watanabe, K. N. 2009. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*. 26 (1). 125-134.
- Kim, H.-J., Lee, H.-R., Kwang-Ryong, J., Mortazavian, S. M. M., Huigen, D. J., Evenhuis, B., Kessel, G., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., and Vossen, J. H. 2011. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theoretical and Applied Genetics*. 124 (1). 923-935.
- Knapp, S. 2002. Assessing Patterns of Plant Endemism in Neotropical Uplands. *The Botanical Review*. 68 (1). 22-37.
- Kuang, H., Wei, F., Marano, M. R., Wirtz, U., Wang, X., Liu, J., Shum, W. P., Zaborsky, J., Tallon, L. J., Rensink, W., Lobst, S., Zhang, P., Tornqvist, C. E., Tek, A., Bamberg, J., Helgeson, J., Fry, W., You, F., Luo, M. C., Jiang, J., Robin Buell, C., Baker, B. 2005. The R1 resistance gene cluster contains three groups of independently evolving, type I R1 homologues and shows substantial structural variation among haplotypes of *Solanum demissum*. *The Plant Journal*. 44 (1). 37-51.
- Kuhl, J. C., Hanneman, R. E, Havey M. J. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet Genomics*; 265 (1). 977-985.
- Lamour, K. 2013. *Phytophthora: a global perspective*. CABI. Cambridge, MA. ISBN: 1780640935.
- Li, X., Van Eck, H. J., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Huigen, D. J., Stam, P., Jacobsen, E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele

conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. Theoretical and Applied Genetics. 96 (1). 1121-1128.

Lehtinen, A., Hannukkala, A., Andersson, B., Hermansen, A., Le, V. H., Nærstad, R., Brurberg, M. B., Nielsen, B. J., Hansen, J. G., Yuen, J. 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of *Phytophthora infestans* in 2003. Plant Pathology. 57 (2). 227-234.

Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F., Gebhardt, C. 1992. The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. MGG Molecular & General Genetics. 233 (1-2). 278-283.

Lokossou, A. A., Rietman, H., Wang, M., Krenek, P., van der Schoot, H., Henken, B., Hoekstra, R., Vleeshouwers, V. G. A. A., van der Vossen, E. A. G., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Vosman, B. 2010. Diversity, Distribution, and Evolution of *Solanum bulbocastanum* Late Blight Resistance Genes. Molecular Plant-Microbe Interactions. 23 (9). 1206-1216.

Machida-Hirano, R. 2015. Diversity of potato genetic resources. Breeding Science. 65 (1). 26-40.

Malcolmson, J. F., Black, W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. And their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de bary. Euphytica. 15 (2). 199-203.

Matson, M. E. H., Small, I. M., Fry, W. E., Judelson, H. S. 2015. Metalaxyl Resistance in *Phytophthora infestans*: Assessing Role of RPA190 Gene and Diversity Within Clonal Lineages. Phytopathology. 105 (12). 1594-1600

Mastenbroek, C. 1952. Investigations into the inheritance of the immunity from *Phytophthora infestans* de B. of *Solanum demissum* Lindl. Euphytica. 1952 (1). 187-198.

Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Táborský, V., Hausvater, E., Doležal, P. 2011. Sensitivity to fungicides in the isolates of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic from 2003 to 2008. Plant Protection Science. 47 (1). 5-12.

- Mikeš, V., Kašparovský, T., Milat, M. L., Blein, J. P. 2001. Elicitory obranných reakcí rostlin. In Sborník abstrakt 5. Setkání biochemiků a mol. biologů. Brno: Přírodovědecká fakulta MU.
- Michalska, A. M., Sobkowiak, S., Flis, B., Zimnoch-Guzowska, E. 2016. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. European Journal of Plant Pathology. 144 (2). 325-336.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R., Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3(1). 87-103.
- Mori, K., Sakamoto, Y., Mukojima, N., Tamiya, S., Nakao, T., Ishii, T., Hosaka, K. 2011. Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. Euphytica. 180 (3). 347-355.
- Naess, S. K., Bradeen, J. M., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., McGrath, J. M., Helgeson, J. P. 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. Theoretical and Applied Genetics. 101 (5-6). 697–704.
- Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In: Lucas, J. A., Shattock, R. C., Shaw, D. S., Cooke, L. R. 1991. *Phytophthora*. Cambridge University press, Cambridge. 25–45.
- Newman, M., Sundelin T., Nielsen J., Erbs G. 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. Frontiers in Plant Science 4.
- Novák, J., Skalický, M. 2012. Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika. 3. vyd. Powerprint. Praha. ISBN: 978-80-87415-53-5.
- Nürnbergger T. 1999. Signal perception in plant pathogen defense. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 55 (6). 167-182.

- Oosumi, T., Rockhold, D. R., Maccree, M. M., Deahl, K. L., McCue, K. F., Belknap, W. R. 2009. Gene *Rpi-bt1* from *Solanum bulbocastanum* Confers Resistance to Late Blight in Transgenic Potatoes. *American Journal of Potato Research*. 86 (6). 456-465.
- Orlowska, E., Basile, A., Kandzia, I., Llorente, B., Kirk, H. G., Cvitanich, C. 2012. Revealing the importance of meristems and roots for the development of hypersensitive responses and full foliar resistance to *Phytophthora infestans* in the resistant potato cultivar Sarpo Mira. *Journal of Experimental Botany*. 63 (13). 4765-4779.
- Park, T. -H., Gros, J., Sikkema, A., Vleeshouwers, V. G. A. A., Muskens, M., Allefs, S., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., van der Vossen, E. A. G. 2005. The Late Blight Resistance Locus *Rpi-blb3* from *Solanum bulbocastanum* Belongs to a Major Late Blight R Gene Cluster on Chromosome 4 of Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18 (7). 722-729.
- Pilet, F., Pelle, R., Ellisseche, D., Andrivon, D. 2005. Efficacy of the R2 resistance gene as a component for the durable management of potato late blight in France. *Plant Pathology*. 54 (6). 723-732.
- Rietman, H., Bijsterbosch, G., Cano, L. M., Lee, H. R., Vossen J. H., Jacobsen, E., Visser, R. G., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. 2012. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Molecular Plant and Microbe Interaction*. 25 (7). 910-919.
- Ríos, D., Ghislain, M., Rodríguez, F., Spooner, D. M. 2007. What Is the Origin of the European Potato? Evidence from Canary Island Landraces. *Crop Science*. 47 (3). 1271-80.
- Ross, H. 1986. Potato Breeding – problems and perspectives, *Journal of Plant Breeding*, 13 (1). 132.
- Runno-Paurson, E., Kotkas, K., Tähtjärv, T., Williams, I., Mänd, M. 2011. Temporal changes in phenotypic diversity of *Phytophthora infestans* in northern Estonia. 96 (1). 212.-205.

Salaman. R. N. 1937. The potato in its early home and its introduction into Europe. Journal of the Royal Horticultural Society 62 (6). 61-77.

Sandbrink, J. M., Colon, L. T., Wolters, P. J. C. C., Stiekema, W. J. 2000. Two related genotypes of *Solanum microdontum* carry different segregating alleles for field resistance to *Phytophthora infestans*. Molecular Breeding. 6 (2). 215–225.

Sedlák, P., Mazáková, J., Sedláková, V., Ryšánek, P., Vejl, P., Doležal, P. 2017. Virulence and Mating Type of *Phytophthora infestans* Isolates in the Czech Republic. Scientia Agriculturae Bohemica. 48 (4). 185-192.

Sedláková, V. 2010. Tvorba a molekulární detekce somatických hybridů bramboru s vyšší odolností k plísni bramboru. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Česká republika.

Shaw, D. S., Khaki, I. A. 1971. Genetical evidence for diploidy in *Phytophthora*. Genetical Research. 17 (2). 165-76.

Schumann, G. L., D'Arcy, C. J. Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor [online].[cit. 2018-04-07]. Dostupné z:

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/LateBlight.aspx>

Schick R., Schick E. 1961. Einige Besonderheiten bei der Vererbung der *Phytophthora-Resistenz* von *Solanum stoloniferum* und die sich daraus ergebende Möglichkeit zur Züchtung Phytophthraresistenter Kartoffelsorten. *Zücher*: 31 (1). 180-183.

Schick R., Schick E., Hausdoerfer, M. 1958. Ein Beitrag zur physiologischen Spezialisierung vor *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische Zeitschrift* 31 (5). 225-236.

Sibley, L. D., Howlett, B. J., Heitman, J., Sibley, L. D. D., Howlett, B. J. J. 2012. Evolution of Virulence in Eukaryotic Microbes. Wiley. Hoboken, United States. ISBN: 9781118308141.

- Simko, I. 2002. Comparative analysis of quantitative trait loci for foliage resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing *Solanum* species. *American Journal of Potato Research*. 79 (2). 125-132.
- Simmonds, N. W., Wastie, R. L. 1987. Assessment of horizontal resistance to late blight of potatoes. *Annual Applied Biology* 111 (1). 213-221.
- Simpson, M. G. 2006. *Plant systematics*. Elsevier/Academic Press. Amsterdam. ISBN: 9780080514048.
- Skidmore, D. I., Shattock, R. C. 1985. Monitoring of Virulence in Populations of *Phytophthora infestans* Using a Schwarzbach Spore Trap. *Journal of Phytopathology*. 113 (2). 141-149.
- Śliwka, J., Jakuczun, H., Lebecka, R., Marczewski, W., Gebhardt, C., Zimnoch-Guzowska, E. 2007. Tagging QTLs for late blight resistance and plant maturity from diploid wild relatives in a cultivated potato (*Solanum tuberosum*) background. *Theoretical and Applied Genetics*. 115 (1). 101-112.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Nickrent, D. L., Johnson, L. A., Hahn, W. J., Hoot, S. B., Sweere, J. A., Kuzoff, R. K., Kron, K. A., Chase, M. W., Swensen, S. M., Zimmer, E. A., Chaw, S. -M., Gillespie, L. J., Kress, W. J., Sytsma, K. J. 1997. Angiosperm Phylogeny Inferred from 18S Ribosomal DNA Sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 84 (1). 1-17.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M. W., Mort, M. E., Albach, D. C., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W., Hoot, S., Fay, M., Axtell, M., Swensen, S., Prince, L., Kress, W., Nixon, K. C., Farris, J. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133 (4). 381-461.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naes, K. S., Raascg, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin – Phillips, S., Buell, C. R., Helgesson, J. P., Jiang, J. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 100 (16). 9128-9133.

- Spooner, D. M. 1990. The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources. J. G. Hawkes. American Potato Journal. 67 (10). 733-735.
- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., Bryan, G. J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102 (41). 14694-14699.
- Spooner, D. M., Nunez, J., Trujillo, G., del Rosario Herrera, M., Guzman, F., Ghislain, M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104 (49). 19398-19403
- Stamps, D. J. 1985. *Phytophthora infestans*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 838. Wallingford, UK: CAB International.
- Stevens, P. F. 2017. Angiosperm Phylogeny Website. Mobot.org [online]. Missouri Botanical Garden.
- Swiezynski, K. M., Sieczka, M. T., Sujkowski, L. S., Zarzycka, H., Zimnoch-Guzowska, E. 1991. Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato Genotypes Originating from Wild Species. Plant Breeding [online]. 107 (1). 28-38.
- Šašek V., Prokinová E., Burketová L. 2011. Kvantitativní a indukovaná rezistence řepky ozimé k *Leptosphaeria maculans*. Disertační práce ČZU.
- Termorshuizen, A. J. 2007. Fungal and Fungus-Like Pathogens of Potato. Potato Biology and Biotechnology. Elsevier. s. 643-665. ISBN: 978-0-444-51018-1.
- Thines, M., Kamoun, S. 2010. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. Current Opinion in Plant Biology. 13 (4). 427-433
- Thurston, H. D. 1971. Relationship of general resistance: late blight potato. Phytopathology 61(6) .620-6.

Tomczyńska, I., Stefańczyk, E., Chmielarz, M., Karasiewicz, B., Kamiński, P., Jones, J. D., Lees A. K., Sliwka, J. 2014. A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*. 127 (3). 647-657.

Toxopeus, H. J. 1956. Reflection on the origin of new physiologic races in *Phytophthora infestans* and the breeding resistance in potatoes. *Euphytica*. 5 (1). 221-237.

Trognitz, B. R., Trognitz, F. C. 2007. Occurrence of the R1 allele conferring resistance to late blight in potato R-gene differentials and commercial cultivars. *Plant Pathology*. 56 (1). 150-155.

Valíček, P. 2002. Užitkové rostliny tropů a subtropů. Vyd. 2., upr. a dopl. Academia. Praha. ISBN: 80-200-0939-6.

Varshney, R. K., Tuberosa, R. 2013. Translational genomics for crop breeding. John Wiley. Hoboken, N.J. ISBN: 9780470962909.

Vining, L. 1990. Functions Of Secondary Metabolites. *Annual Review of Microbiology*. 1990. 44 (1). 395-427.

Vleeshouwers, V. G. A. A., Raffaele, S., Vossen, J. H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M. E., Rietman, H., Cano, L. M., Lokossou, A., Kessel, G., Pel, M. A., Kamoun, S. 2011. Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors. *Annual Review of Phytopathology*. 49 (1). 507-531.

Vossen, E. A. G., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., Pereira, A., Allefs, S. 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *The Plant Journal*. 44 (2). 208-222.

Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B. te L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W., Allefs, S. 2003. An ancient R gene from the wild potato species

Solanum bulbocastanum confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *The Plant Journal*. 36 (6). 867-882.

Wang, X., Zhang, M., Zhu, J., Geng, S. 2008. Spectral prediction of *Phytophthora infestans* infection on tomatoes using artificial neural network (ANN). *International Journal of Remote Sensing*. 29 (6). 1693-1706.

Wastie, R. L. Breeding for resistance. 1991. *Advances Plant Pathology*. 3 (3). 7193–224.

Watanabe, K. N. 2002. Challenges in biotechnology for abiotic stress tolerance on roots and tubers. *JIRCAS Working Report*. 75–83.

Wheller, T., Erwin, D. C., Ribeiro, O. K. 1998. *Phytophthora* Diseases Worldwide. *Mycologia*. 90 (6). 1092-1102.

White, S., and Shaw, D. 2010. Breeding for host resistance: The key to sustainable potato production. In: *Twelfth EuroBlight Workshop*. A. Lees, J. G. Hansen, and H. Schepers, eds. PPO, Arras, France.

Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L., Birch, P. R. J. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*. 450 (7166). 115-118.

Widmark, A. K. 2010. The late blight pathogen, *Phytophthora infestans*: interaction with the potato plant and inoculum sources. Department of Forest Mycology and Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. ISBN: 9789157674791.

Zimnoch-Guzowska, E., Lebecka, R., Kryszczuk, A., Maciejewska, U., Szczerbakowa, A., Wielgat, B. 2003. Resistance to *Phytophthora infestans* in somatic hybrids of *Solanum nigrum* L. and diploid potato. *Theoretical and Applied Genetics*. 107 (1). 43-48.

10 Seznam použitých zkratek

EBN = Endosperm Balance Number

ETI = Effector Triggered Immunity

HR = Hypersensitive Reaction

ITS = Internal transcribed spacer

LRR = Leucine-Rich Repeat sequence

MAMP's = Microbe- Associated Molecular Pattern

PAMP's = Pathogen-Associated Molecular Pattern

PCR = Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

PRRs = Pattern Recognising Receptors

PVX = Potato Virus X

QTL = Quantitative Trait Loci

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů)

RPA190 = RNA Polymerase A (largest subunit)

RXLR = Arg-Xaa-Leu-Arg

SNP = Single nucleotid