

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Rezistence genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči plísni
okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Roháčková
Studijní program:	B1101 Matematika
Studijní obor:	Matematika – Biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Termín odevzdání práce:	11. května 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně dle metodických pokynů vedoucího bakalářské práce a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Jana Roháčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc. za čas věnovaný poradám a kontrole této bakalářské práce, za cenné rady a poskytnutou literaturu.

Dále děkuji paní RNDr. Mileně Krškové za práci se statistickým zpracováním dat, těm, kteří se podíleli na tomto výzkumu jiným způsobem, za jejich úsilí a ostatním členům kolektivu oddělení Fytopatologie Katedry botaniky za vstřícnost a pochopení.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Jana Roháčková
Název práce: Rezistence genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči plísni okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*)
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice
Vedoucí práce: Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Rok obhajoby práce: 2012

ABSTRAKT

Studium interakce rostlin z čeledi Cucurbitaceae (tykvovité) a jejich patogenu, oomycety *Pseudoperonospora cubensis*, způsobující plíseň okurky, je z hlediska velkého ekonomického významu tykvovitých plodin a rozšíření *P. cubensis* dlouhodobě velmi důležité a potřebné. Zaměřuje se mj. na identifikaci nových efektivních zdrojů rezistence (mezi pěstovanými i planými zástupci čeledi Cucurbitaceae), využitelných ve šlechtění tykvovitých na rezistenci vůči *P. cubensis*.

Analýza dat testování rezistence 97 genotypů planých a plevelných taxonů *Cucurbita* spp. vůči 11 izolátům *P. cubensis* (2001) potvrdila možnost existence genů rezistence v rámci rodu *Cucurbita*. Výsledné reakce testovaného souboru mají rasově specifický charakter.

Klíčová slova: *Pseudoperonospora cubensis*, rod *Cucurbita*, interakce hostitele a patogenu, zdroje rezistence, šlechtění na rezistenci
Počet stran: 66
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Jana Roháčková
Title: Resistance of *Cucurbita* spp. germplasm against cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)
Type of thesis: Bachelor
Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holic
Supervisor: Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
The year of presentation: 2012

ABSTRACT

From the viewpoint of great economic significance of cucurbit crops and distribution of their pathogen, oomycete *Pseudoperonospora cubensis*, research of interaction between plants of the Cucurbitaceae and *P. cubensis*, which causes cucurbit downy mildew, has been very important and required for a long time. The research has been also focused on identification of new efficient sources of resistance (among cultivated and wild Cucurbitaceae plants), that could be exploited in breeding of cucurbits for resistance against *P. cubensis*.

Analysis of screening data of 97 genotypes of wild and weedy *Cucurbita* spp. for resistance against 11 isolates of *P. cubensis* (2001) supported the expectation of existence of resistance genes in the genus *Cucurbita*. Final reactions of studied set were considered as race-specific.

Keywords: *Pseudoperonospora cubensis*, genus *Cucurbita*, host-pathogen interaction, sources of resistance, breeding for resistance
Number of pages: 66
Number of appendices: 0
Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍLE PRÁCE	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1 Rod <i>Cucurbita</i>	9
3.1.1 Význam a charakteristika čeledi Cucurbitaceae	9
3.1.2 Taxonomie a biologie Cucurbitaceae	10
3.1.3 Taxonomie a biologie rodu <i>Cucurbita</i>	13
3.1.4 Genofondy a genetická diverzita planých a pěstovaných druhů <i>Cucurbita</i> spp.....	15
3.2 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	18
3.2.1 Systematické zařazení <i>P. cubensis</i>	19
3.2.2 Biologie a ekologie <i>P. cubensis</i>	20
3.2.3 Hostitelský okruh <i>P. cubensis</i>	22
3.2.4 Rozšíření <i>P. cubensis</i> ve světě, v Evropě a na území České republiky	23
3.3 Interakce hostitele (Cucurbitaceae) a patogenu (<i>P. cubensis</i>)	24
3.3.1 Variabilita patogenity <i>P. cubensis</i>	24
3.3.2 Variabilita <i>Cucurbita</i> spp. v interakci s <i>P. cubensis</i>	25
3.3.3 Genetické, buněčné a molekulární aspekty interakce.....	26
3.3.4 Využití genových zdrojů <i>Cucurbita</i> spp. ve šlechtění na rezistenci.....	26
4. MATERIÁL A METODY	27
4.1 Rostlinný materiál (genotypy <i>Cucurbita</i> spp.)	27
4.2 Izoláty <i>P. cubensis</i>	30
4.3 Příprava inokula, inokulace a inkubace	32
4.4 Metody hodnocení rezistence	33
4.5 Metody statistického zpracování dat.....	33
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	35
5.1 Reakce genotypů <i>Cucurbita</i> spp. po inokulaci <i>P. cubensis</i>	35
5.2 Patogenita izolátů <i>P. cubensis</i>	60
6. ZÁVĚR	62
7. LITERATURA	63

1. ÚVOD

Pseudoperonospora cubensis (Berk. et Curt.) Rostov., zástupce řádu Peronosporales, říše Chromista, způsobuje závažnou a mnohdy epidemickou chorobu okurek a jiných pěstovaných zástupců čeledi Cucurbitaceae (tykvovité) (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011), plíseň okurky. Pro své kosmopolitní rozšíření a velkou variabilitu patří mezi nejvýznamnější a v rámci řádu Peronosporales nejvíce studované patogeny rostlin (Lebeda a Cohen, 2011). Každoroční ztráty v produkci okurek, melounů a tykví, napadených *P. cubensis*, v minulých letech byly a jsou i v dnešní době vážným problémem světové ekonomiky pěstování tykvovitých rostlin (Lebeda et al., 2011; Savory et al., 2011), a to i přesto, že výzkum epidemiologie a patogenní variability tohoto organismu zaznamenal v posledních desetiletích výrazný vzestup (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Schwinn, 1994).

Výsledky tohoto výzkumu, ale i dostupná konkrétní ochranná opatření, však dosud stále nestačí ke zcela úspěšnému boji s plísní a jejím šířením. Současné snahy se díky detailnějším a souhrnnějším poznáním vlastností patogenu, hostitele a jejich vzájemné interakce mj. zaměřují na vyšlechtění nových odolných odrůd kulturních plodin (tzv. šlechtění na rezistenci) (Lebeda a Cohen, 2011). Geny rezistence vůči určitým patotypům (případně rasám) *P. cubensis*, využitelné v tomto šlechtění, jsou také známy u některých zástupců rodu *Cucurbita* (Lebeda a Cohen, 2011). Tento ekonomicky významný rod tykvovitých rostlin, pocházející z oblastí amerického kontinentu, vykazuje celkově velkou rozmanitost (Lebeda et al., 2007). Rovněž interakce jednotlivých zástupců s *P. cubensis* je značně variabilní (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2004) a poskytuje předpoklad nalezení nových a zajímavých zdrojů rezistence.

Z důvodu nedostatku dat o zdrojích rezistence v rámci rodu *Cucurbita* (Lebeda a Cohen, 2011) a nutnosti podrobného objasnění vztahů mezi *P. cubensis* a jejím hostitelem byly ve Fytopatologické laboratoři katedry botaniky PřF UP v Olomouci (2001) studovány reakce genových zdrojů planých a plevelných populací *Cucurbita* spp. vůči různým patotypům *P. cubensis*. Dílčí výsledky této studie byly poprvé shrnuty v publikaci Lebedy a Widrlechnera (2004), detailnější zpracování získaných dat je předmětem této práce.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo studium a zpracování odborné literatury se zaměřením na biologii *Pseudoperonospora cubensis*, taxonomii a biologii rodu *Cucurbita* a variabilitu vzájemné interakce *Cucurbita* spp. a *P. cubensis*. Experimentální část byla zaměřena na zpracování výchozích dat testů rezistence *Cucurbita* spp. vůči *P. cubensis* a základní vyhodnocení získaných výsledků.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Cucurbita*

3.1.1 Význam a charakteristika čeledi Cucurbitaceae

Čeď Cucurbitaceae (tykvovité) představuje pro lidstvo velmi významnou skupinu krytosemenných rostlin, a to jak z hlediska botanického, tak také ekonomického, kulturního a lékařského (Lebeda et al., 2007). Tato důležitost je jí přikládána díky dnes téměř celosvětovému rozšíření, široké variabilitě, ale především díky rozsáhlému pěstování a šlechtění mnoha druhů, které se staly jedněmi z nejvýznamnějších plodin vůbec (Esteras et al., 2012b; Lebeda et al., 2011). Jejich charakteristickým znakem a ve většině případů stěžejní příčinou pěstování jsou plody rozmanitých tvarů, velikostí a zbarvení, které lidem slouží k obživě ve zralém, ale mnohdy i nezralém stavu (jedlá dužnina mnoha druhů) a k výrobě různých ozdobných i užitkových nádob, hudebních nástrojů, či dokonce mycích hub (rod *Luffa*) (Lebeda et al., 2007; Paris et al., 2012).

Do této čeledi, s rozšířením převážně v tropech a subtropích, jsou zahrnuty jednoleté i vytrvalé byliny, jednodomé (běžnější) i dvoudomé, polokeře, několik druhů keřů a vzácných sukulentních stromů (Chrtková, 1990; Lebeda et al., 2007). Jedná se často o rostliny s popínavými nebo plazivými lodyhami, jejichž úponky, pokud jsou přítomny, vyrůstají v paždí listů a mohou být i vícenásobně větvené (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Na stonku střídavě postavené řapíkaté listy (bez palistů) mají celistvý tvar nebo jsou členěné v úkrojky (Chrtková, 1990). Velikost úkrojků, celková velikost, textura, tvar a orientace listů představují důležité determinační znaky v rámci jednotlivých rodů tykvovitých (Lebeda et al., 2007). Listy často obsahují extraflorní nektaria a ve struktuře jejich buněk můžeme nalézt fytolity (Lebeda et al., 2007; Watson a Dallwitz, 1992). Jednopohlavné květy zvonkovitého až nálevkovitého tvaru, jenž vzniká srůstem většinou 5-6 kališních a stejného počtu korunních lístků, se na stoncích vytvářejí jednotlivě, případně v květenstvích (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Morfologické charakteristiky květu nepředstavují spolehlivé rozlišovací znaky uvnitř rodu, oproti tomu mezi různými rody jsou rozdíly v morfologii květu nápadné (Lebeda et al., 2007). Plodem tykvovitých je nejčastěji dužnatá, masitá bobule, dorůstající často velkých rozměrů, jak to známe i z našeho domácího pěstování (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Neméně významné jsou však i vysýchavé bobule se silnou kůrou a plody nabývající různých extrémních tvarů,

velikostí a barev. Relativně velká semena všech zástupců neobsahují endosperm, zásobní látky pro vývoj embrya jsou proto obsaženy ve dvou větších dělohách (Lebeda et al., 2007; Watson a Dallwitz, 1992).

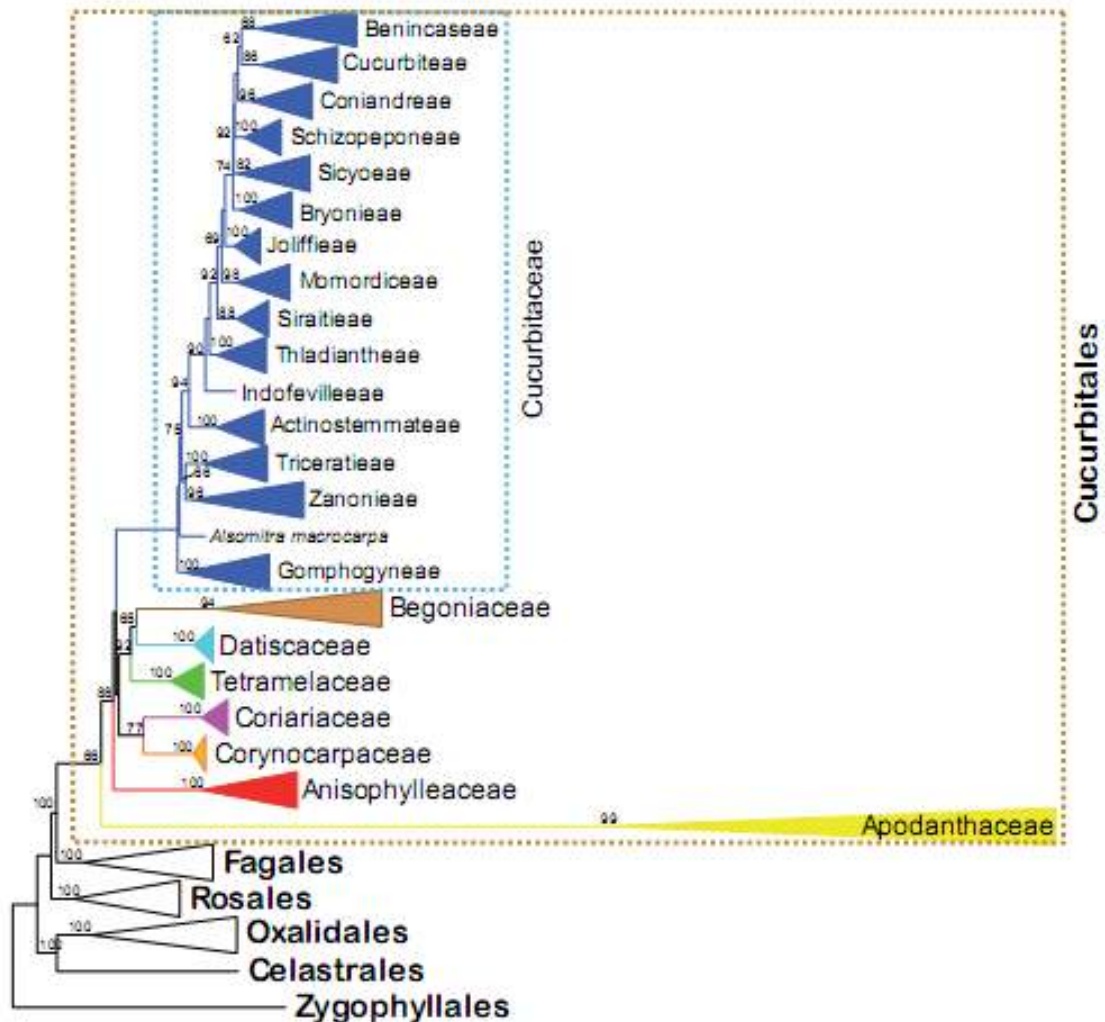
Pěstované druhy čeledi Cucurbitaceae jsou schopny adaptace na velmi rozdílné pěstitelské podmínky prostředí (Lebeda et al., 2007). Mezi plodiny s globálním ekonomickým významem řadíme zástupce rodů *Cucumis* (okurka setá, meloun cukrový), *Cucurbita* (tykve – dýně, cuketa) a *Citrullus* (meloun vodní) (Esteras et al., 2012b; Lebeda et al., 2007). Produkce těchto kulturních rostlin na počátku nového tisíciletí zaznamenala výrazný vzestup. V současné době jí s převahou vévodí Čína, k níž se přidávají další asijské státy jako je Indie, Írán a Turecko. Velkými producenty tykvovitých jsou rovněž Spojené státy americké a Egypt (Lebeda et al., 2007). Tato fakta nasvědčují tomu, že čeleď Cucurbitaceae je právem označována za současně druhou ekonomicky nejvýznamnější rostlinnou čeleď (po čeledi Solanaceae) (Esteras et al., 2012a).

3.1.2 Taxonomie a biologie Cucurbitaceae

Současné výzkumy fylogenetické příbuznosti na molekulární úrovni přinášejí stále nové poznatky a s nimi spojené změny uspořádání jednotlivých taxonomických skupin v systému, což se významně dotýká také zkoumané čeledi Cucurbitaceae. Lebeda et al. (2007) udává, že tykvovité představují, od jiných geneticky příbuzných čeledí, izolovanou čeleď s vlastním monotypním řádem Cucurbitales a za jejich možné příbuzné jsou považováni členové čeledí Begoniaceae a Datisceae z řádu Begoniales. Podle nově získaných výsledků DNA analýz navrhuje Schaefer a Renner (2011) sdružit do řádu Cucurbitales celkem osm čeledí: co do počtu druhů největší Begoniaceae, pak Cucurbitaceae a 6 dalších menších čeledí, které byly dříve řazeny v různých méně příbuzných řádech. Ve fylogenezi řádu (viz Obr. 1) se podle těchto analýz první oddělila čeleď Apodanthaceae, pak postupně Anisophylleaceae a Cucurbitaceae, která představuje sesterskou skupinu k rozvětveným skupinám Coriariaceae a Corynocarpaceae, a Tetramelaceae, (Datisceae, Begoniaceae).

Na základě těchto nově publikovaných molekulárních dat a srovnáním morfologických znaků došlo rovněž k jednomu z možných přeorganizování klasifikace Cucurbitaceae vymezením 95 rodů o 950-980 druzích (Schaefer a Renner, 2011). Přitom ještě v nedávné době se údaje o počtu taxonů pohybovaly okolo 118 rodů s 825 druhy (Lebeda et al., 2007). Takto rozmanitou skupinu rostlin pocházející z Ameriky, Afriky a

především z Asie i dnes tvoří převážně zástupci z tropických a subtropických oblastí těchto kontinentů (Lebeda et al., 2007, 2011; Schaefer a Renner, 2011). Rozšíření planých druhů v temperátní zóně je vzácné, např. v Evropě jsou původní pouze dva rody: *Ecballium* (tykvice) a *Bryonia* (posed) (Chrtková, 1990).



Obr. 1 Zjednodušený kladogram řádu Cucurbitales podle souhrnných výsledků DNA analýz (14 kombinovaných jaderných, plastidových a mitochondriálních markerů, 664 druhů řádu) s naznačením vztahů k příbuzným řádům (Schaefer a Renner, 2011).

Dle členění navrženého C. Jeffreyem (Jeffrey, 1990) existují dvě podčeledi tykvovitých o velmi odlišných parametrech. Zatímco podčeď Zanonioideae, charakteristická malými žlábkovanými pylovými zny, zahrnuje pouze 18 nepřiliš

významných rodů, do druhé podčeledi Cucurbitoideae řadíme okolo 100 rodů, mezi něž patří i ty nejpočetnější a nejvýznamnější. Jejich pylová zrna na povrchu žlábků nemají a čnělky samičích květů srůstají v jeden střední sloupek (Lebeda et al., 2007). Pro taxonomii Cucurbitaceae jsou mimo analýzy morfologických znaků důležité také biochemické charakteristiky – schopnost rostlin produkovat toxické kukurbitaciny, data z výzkumů na cytologické a především molekulární úrovni (analýzy struktury DNA, proteinů), schopnost vzájemného křížení taxonů a jejich koevoluce s opylovači a patogeny (Lebeda et al., 2007). Molekulární studie v této oblasti nejsou záležitostí jen několika posledních let, jak potvrzují například výzkumy velikosti mitochondriálního genomu tykvovitých (Ward et al., 1981) nebo struktury proteinů semen (Pasha a Sen, 1991).

Pozn.: Jako skupina rostlin s širokou diverzitou a dlouhodobým vývojem pěstování v mnoha vzájemně vzdálených oblastech vyžadovala čeleď Cucurbitaceae pro dnešní taxonomické účely přesně definovaná jednoznačná pojmenování jednotlivých taxonů. Nutnou klasifikaci a popis pěstovaných tykvovitých umožnila pravidla určená Mezinárodním kódem pěstovaných rostlin (ICNCP) (Lebeda et al., 2007).

Pokud jde o taxonomické vztahy v rámci ekonomicky nejvýznamnějších rodů, pak pro účely této práce postačí stručná charakteristika rodů *Cucumis* a *Citrullus*; taxonomii rodu *Cucurbita* je věnována další podkapitola. Známý rod *Cucumis* zahrnuje více než 30 planých druhů převážně pouštních a polopouštních oblastí Afriky a dva druhy běžně pěstované v mnoha oblastech světa, *C. sativus* L. (okurka setá) a *C. melo* L. (meloun cukrový), jež mají pravděpodobně indické předky (Lebeda a Cohen, 2011). Kromě těchto dvou pěstovaných druhů jsou další dva plané druhy (*C. anguria* L. a *C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin) využívány k získávání plodů. Vnitřní dělení rodu do dvou hlavních skupin, možných podrodů *Cucumis* a *Melo*, je všeobecně přijímáno (Lebeda et al., 2007). Zvažujeme-li další členění podčeledi Cucurbitoideae, bývá rod *Cucumis* zařazován do kmene *Benincaseae* se známými rody *Benincasa*, *Lagenaria* a *Citrullus* (Esteras et al., 2012b). Všechny druhy starobylého rodu *Citrullus* pocházejí z teplých oblastí Starého světa, hlavně z afrických tropů a pouští. Byly rozlišeny čtyři druhy, z nichž více rozšířené jsou dva: *C. lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai (lubenice obecná) a *C. colocystis* (L.) Schrad. (kolokvinta obecná). *Citrullus lanatus*, známý jako vodní meloun, se hojně pěstuje na jihu Ruska a celého asijského kontinentu. Přestože je dnes pěstován téměř po celém světě, jeho zdomácnění stále zůstává záhadou stejně jako úplná klasifikace jeho forem.

Kromě výše uvedených rodů čeledi Cucurbitaceae, většího hospodářského významu dosahují rody *Luffa*, *Sechium* a *Momordica* (Lebeda et al., 2007).

3.1.3 Taxonomie a biologie rodu *Cucurbita*

Rod *Cucurbita*, řadí se mezi nejvýznačnější rody čeledi tykvovitých, je dnes chápán jako skupina pouze 12 až 15 druhů, Sanjur et al. (2002) uvádí 12-14 druhů, které pocházejí z oblastí Nového světa, širokého pásma od USA po Argentinu (viz Tab. 3.1) (Lebeda et al., 2007). Ačkoliv byly do Evropy některé druhy dovezeny již krátce po prvním osídlení amerického kontinentu, k první domestikaci pěti dnes hojně pěstovaných druhů došlo ještě před příchodem Evropanů tamějšími domorodými obyvateli, pro které byly zdrojem obživy jako jedny z prvních pěstovaných rostlin na tomto území (Lebeda et al., 2007; Sanjur et al., 2002). Tento rod, se základním chromozómovým číslem $2n = 2x = 40$, nevykazuje blízkou příbuznost s jinými rody čeledi Cucurbitaceae (Lebeda et al., 2007).

Podle přizpůsobení se ekologickým podmínkám prostředí lze v rámci rodu rozlišit dvě skupiny rostlin (Lebeda a Widrechner, 2003). První skupinu představují jednoleté či vytrvalé, ale krátce žijící rostliny s vláknitými kořeny, jimž vyhovuje mezofytní prostředí a jejichž areál výskytu je poměrně rozsáhlý, ale nezasahuje do oblastí nad 1300 m n. m. Od těchto druhů bylo také odvozeno všech pět hlavních pěstovaných plodin (*Cucurbita maxima* Duchesne, *C. ficifolia* Bouché, *C. moschata* Duchesne, *C. argyrosperma* C. Huber a *C. pepo* L.), přičemž základním zástupcem celé skupiny byl dle výsledků sekvenční analýzy mitochondriálního genu *nad1* označen druh *C. ficifolia* Bouché (Lebeda et al., 2007; Sanjur et al., 2002). Do druhé skupiny, která je pokládána za původnější, patří vytrvalé dlouho žijící xerofyty, jež dokáží díky svým zásobním kořenům přežít v oblastech s aridním klimatem či ve vysokohorských polohách střední Ameriky. Zajímavým zástupcem této skupiny je druh *C. foetidissima* Kunth, který se stal předmětem pokusů o zdomácnění pro obsah škrobu v jeho zásobních kořenech a možnost získávání jedlého oleje z jeho semen (Lebeda et al., 2007). K určení výchozího druhu rodu *Cucurbita* je nutné důkladné prozkoumání vztahů *C. ficifolia* Bouché k základním xerofytním zástupcům, především k *C. digitata* A. Gray, *C. foetidissima* Kunth a *C. pedatifolia* L.H. Bailey (Sanjur et al., 2002).

Tab. 3.1 Plané a pěstované taxony *Cucurbita* spp. a jejich rozšíření (Lebeda et al., 2007)

Skupina Argyrosperma	
<i>C. argyrosperma</i> C. Huber	Mexiko, střední Amerika, jihozápadní USA
subsp. <i>argyrosperma</i>	
subsp. <i>sororia</i> (L. H. Bailey) L. Merrick & D. M. Bates	Mexiko – Nikaragua, západní pobřeží
Skupina Ficifolia	
<i>C. ficifolia</i> Bouché	Mexiko (vysočiny) – severní Chile, Argentina
Skupina Maxima	
<i>C. maxima</i> Duchesne	Argentina, Bolívie, Chile
subsp. <i>maxima</i>	
subsp. <i>andreaana</i> (Naudin) Filov	Argentina, Bolívie
<i>C. moschata</i> Duchesne	Mexiko (nížiny), střední Amerika
Skupina Pepo	
<i>C. pepo</i> L.	severní Mexiko a jižní USA
subsp. <i>fraterna</i> (L. H. Bailey) Filov	severovýchodní Mexiko
subsp. <i>ovifera</i> (L.) Harz	
subsp. <i>ozarkana</i> D. S. Decker	jižní – střední USA
subsp. <i>pepo</i>	
subsp. <i>texana</i> (Scheele) Filov	Texas a jihovýchodní USA
<i>C. ecuadorensis</i> H. C. Cutler & Whitaker	západní pobřeží Ecuadoru
Skupina Okeechobeensis	
<i>C. okeechobeensis</i> (J. K. Small) L. H. Bailey	
subsp. <i>okeechobeensis</i>	Palm Beach County, Florida, USA
subsp. <i>martinezii</i> (L. H. Bailey) T. W. Walters & D. S. Decker	Veracruz, Mexiko
<i>C. lundelliana</i> L. H. Bailey	Mexiko (nížiny, Yucatán), Guatemala, Belize
Skupina Digitata	
<i>C. digitata</i> A. Gray	Nové Mexiko a Arizona, USA
<i>C. cylindrata</i> L. H. Bailey	Baja California, Mexiko
<i>C. palmata</i> S. Watson	jižní Kalifornie a Arizona, USA
Skupina Foetidissima	
<i>C. foetidissima</i> Kunth	jižní USA a Mexiko
<i>C. pedatifolia</i> L. H. Bailey	střední Mexiko
<i>C. x scabridifolia</i> L. H. Bailey	severovýchodní Mexiko
<i>C. radicans</i> Naudin	Mexiko

Lebeda et al. (2007) dále shrnuje současné poznatky o možném původu a zdomácnění pěti druhů *Cucurbita* spp., které jsou již dnes úspěšně pěstovány v mnoha částech světa (Lebeda a Cohen, 2011). Na základě výzkumů, především pak analýzy mitochondriálního markeru 6 planých a 6 pěstovaných *Cucurbita* spp. (Sanjur et al., 2002), byl každý z těchto druhů domestikován nezávisle na ostatních. U druhu *Cucurbita maxima* Duchesne (tykev obrovská), blízkce příbuzného k divoce rostoucímu *C. maxima* subsp. *andreana* (Naudin) Filov (i přes jejich původ z míst s rozdílným klimatem), k tomu došlo na jihu Jižní Ameriky; u *C. ficifolia* Bouché podle fosilních záznamů nejspíše ve výše položených oblastech severní části Jižní Ameriky, zatímco u *C. moschata* Duchesne v nižších nadmořských výškách tohoto území. Konkrétní předci těchto dvou posledních druhů zůstávají zatím neznámí. Bezesporu zajímavé místo v těchto možných příbuzenských vztazích zaujímá mexický taxon *C. argyrosperma* subsp. *sororia* (L. H. Bailey) L. Merrick & D. M. Bates, který má ze všech známých planých druhů geneticky nejbliže ke *C. moschata* a zároveň je také nejpravděpodobnějším předchůdcem dalšího pěstovaného druhu *C. argyrosperma* C. Huber, zdomácněného v jižním Mexiku. Vůbec nejznámější druh rodu *Cucurbita* existující v mnoha kultivarech a vyšlechtěných formách, *C. pepo* L. (tykev obecná), byl podle různých molekulárních studií domestikován dvakrát bez užší spojitosti těchto dvou událostí, čehož je dokladem existence dvou linií pěstovaných taxonů v rámci druhu (Lebeda et al., 2007, Sanjur et al., 2002). K prvnímu zdomácnění, určující linii *C. pepo* subsp. *ovifera*, přijímanou dnes také jako subsp. *texana* (Gong et al., 2012; Paris et al., 2012), došlo nejspíše na území severovýchodního Mexika (Sanjur et al., 2002). Předchůdci této linie jsou hledáni mezi taxony *C. pepo* subsp. *fraterna*, *C. pepo* subsp. *ozarkana* a *C. pepo* subsp. *texana*. Druhou linii představuje *C. pepo* subsp. *pepo*, jehož zástupci jsou výsledkem postupné domestikace z taxonu rostoucího v dnešním Mexiku a příbuzného planému taxonu *C. pepo* subsp. *fraterna* (Sanjur et al., 2002). Obecně pro druhy rodu *Cucurbita* platí, že proces domestikace vedl k prodlužování plodů a zvětšování velikosti rostlin, k celkové evoluční diferenciaci fenotypů a vzniku mnoha nových taxonů, což je nejvíce patrné právě u druhu *C. pepo* (Paris et al., 2012).

3.1.4 Genofondy a genetická diverzita planých a pěstovaných druhů *Cucurbita* spp.

Jednou z důležitých charakteristik čeledi Cucurbitaceae je její velká genetická diverzita, odlišnost typicky alogamních druhů, které ovšem tolerují určitý stupeň

inbreedingu, důležitého pro selekci genů (forem) odolných k působení abiotických a biotických faktorů prostředí. Tímto směrem se také ubírají snahy o vyšlechtění vysoce odolných plodin se zvýšenou produkcí a kvalitou plodů (Lebeda et al., 2007).

Vysoká genetická diferenciacce se projevuje také uvnitř rodu *Cucurbita*. Obecně však žádný druh nemá takovou bariéru křížení, která by jej naprosto reprodukčně izolovala od ostatních. Mezi oběma výše zmiňovanými skupinami rodu (xerofytními a mezofytními druhy) existuje určitá provázanost vývoje a tedy i částečná genetická příbuznost (Lebeda et al., 2007).

Jak již bylo uvedeno, za potomky linie mezofytních druhů je považováno i pět pěstovaných druhů rodu, které se však obvykle za běžných podmínek vzájemně nekříží. Jejich genofondy jsou charakterizovány genovými pooly. Primární genové pooly těchto druhů jsou tvořeny pouze jejich krajovými odrůdami a kultivary (šlechtěné odrůdy), tzn. že ke zcela úspěšnému křížení dochází jen v rámci druhu. Experimentálně vzniklí kříženci příslušníků rozdílných druhů bývají často neplodní nebo je jejich plodnost omezená (Lebeda et al., 2007). Nejširší kompatibilitu křížení vykazují *C. moschata*, ale také další zdomácnělé druhy *C. argyrosperma*, *C. pepo* a *C. maxima* mohou být kříženy se svými planě rostoucími příbuznými, což představuje významný zdroj variability uvnitř populací, jak uvádí Lebeda et al. (2007). Dále pojednává o sekundárních genových poolch pěstovaných druhů (tj. populace se mohou křížit, často to však bývá spojeno se snížením fertility potomků) na základě výsledků hybridizačních pokusů a polního pozorování. Velmi dobrá slučitelnost byla pozorována mezi populacemi vývojově blízkých druhů *C. moschata* a *C. argyrosperma*. U tykve obrovské (*C. maxima*) sekundární genový pool reprezentuje planý druh *C. ecuadorensis*. Oproti těmto druhům vykazují *C. ficifolia* velmi nízkou schopnost spontánního křížení s jinými druhy, vymezení jeho genových poolů je proto problematické podobně jako u posledního zdomácnělého druhu *C. pepo*. Ačkoliv má tento významný druh, díky své obrovské diverzitě, velmi rozmanitý primární genový pool (patří do něj spousta jeho kultivarů, krajových odrůd, planých taxonů), není jím uchráněn před extrémní náchylností k nejdůležitějším virovým chorobám, které napadají pěstované druhy *Cucurbita* (Lebeda et al., 2007). Terciární genové pooly daných druhů obsahují již mnohem širší škálu planých i pěstovaných druhů v rámci rodu, neboť do nich spadají všechny taxony schopné se s plodinou křížit za uměle navozených podmínek a postupů, většinou však na úkor plodnosti a životaschopnosti potomků (Lebeda et al., 2007). Populace vzniklá mezidruhovým křížením *C. pepo* a *C. moschata* byla příkladně využita při tvorbě genetických map *C. pepo* (Esteras et al., 2012a).

Studiu genetické diverzity a klasifikace jednotlivých pěstovaných druhů v průběhu 70. až 90. let 20. století výrazně napomohly výsledky stále přesnějších izoenzymových analýz, které mj. ukázaly frekvenci genetických diferenciací v rámci druhů (Lebeda et al., 2007). V poslední době se toto studium opírá především o moderní molekulární techniky (markery), např. polymorfismus v SSRs - simple sequence repeats, RAPD – random amplified polymorphic DNA, AFLP – amplified fragment length polymorphism, SBAP - sequence-based amplified polymorphism (Ferriol et al., 2003a,b; Gong et al., 2012).

Nejhojněji pěstované druhy *C. pepo*, *C. moschata* a *C. maxima* mají větší diverzitu na molekulární i morfologické úrovni, tvoří více krajových odrůd a kultivarů než zbývající dva druhy. Vysoký stupeň polymorfismu a genetické rozmanitosti zaznamenáváme především u *C. moschata*, jejíž odrůdy nacházíme na stanovištích s velmi rozdílnými ekologickými podmínkami a mezi některými kultivary existují podstatné rozdíly v náchylnosti nebo rezistenci vůči některým chorobám. Podobné charakteristiky platí také pro druh *C. maxima* (Lebeda et al., 2007). Diverzita tohoto druhu byla dobře popsána morfologicky, méně však pomocí molekulárních markerů. Ve Španělsku byla provedena analýza pomocí RAPD a SBAP markerů, zkoumající míru genetické rozdílnosti 19 genofondových vzorků *C. maxima*, s cílem napomoci lepším pěstitelským výsledkům (Ferriol et al., 2003b). Nejvíce různých pozorování a analýz diverzity bylo a stále je uskutečňováno v rámci druhu *C. pepo* (viz např. Ferriol et al., 2003a; Gong et al., 2012; Paris et al., 2012). Jedná se totiž o nejvýznamnější druh rodu *Cucurbita*, jehož dvě hlavní evoluční linie určil r. 1988 Decker na úrovni poddruhů jako subsp. *pepo* a subsp. *ovifera* (Ferriol et al., 2003a; Lebeda et al., 2007). Dnes se častěji užívá dělení do více poddruhů, přičemž kultivary náleží do subsp. *pepo* a subsp. *texana* (viz Obr. 2) a podle tvaru plodů tvoří 8 morfotypů (Esteras et al., 2012a; Paris et al., 2012). Jak uvádí Paris et al. (2012), hlavním morfologickým znakem odlišujícím tyto dva taxony je povrch plodů; u subsp. *pepo* (s většími plody) se na něm nacházejí výčnělky, u subsp. *texana* naopak prohlubně, kopírující polohu cévních svazků v pletivu. Jen omezená diverzita je popsána u druhu *C. ficifolia*. Vzhledem k tomu, že je však pěstován v širokém rozmezí podmínek prostředí i kompetice, je možná přítomnost skrytých variant izoenzymů jako předchozí adaptace na podmínky prostředí (Lebeda et al., 2007).

Obr. 2 Diverzita zralých plodů 32 kultivarů *Cucurbita pepo*: 21 plodů patří zástupcům subsp. *pepo*, 9 subsp. *texana* a zbylé 2 taxonům ležícím mezi těmito poddruhy (malé pruhované tykve v pravém dolním rohu) (Paris et al., 2012).



3.2 *Pseudoperonospora cubensis*

Pseudoperonospora cubensis (Peronosporales, Chromista), způsobující závažnou plísňovou chorobu tykvovitých rostlin, je dnes jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších rostlinných patogenů (Lebeda a Cohen, 2011). Tento obligátní a vysoce specializovaný biotrofní parazit je příčinou obrovských ztrát ve světové produkci okurek, melounů a tykví (Savory et al., 2011). Přes dlouhodobý a v posledních letech velmi intenzivní výzkum tohoto patogenu stále chybí informace z mnoha oblastí zkoumání, detailní poznatky k efektivnějším opatřením proti šíření choroby (vyvinutí nových rezistentních forem rostlin a účinných fungicidů) (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

3.2.1 Systematické zařazení *P. cubensis*

Druh *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov. poprvé popsal r. 1868 Berkeley na herbářové rostlinné položce pocházející z Kuby (odtud druhové jméno *cubensis*). Byl tak identifikován rovněž nový rod *Pseudoperonospora* Berkeley. K prvnímu určení patogenu na živých rostlinách a k nové klasifikaci (zavedení dnešního označení místo původního *Peronospora cubensis* Berk. et Curt.) došlo až v roce 1903 ruským botanikem Rostovzevem (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

V současné době *P. cubensis* řadíme do poměrně nově vydělené říše Chromista, pododdělení Peronosporomycotina v rámci skupiny Oomycota (houby vaječné), v něm do třídy Peronosporomycetes, čítající asi 900 (možná až 1500) druhů, řádu Peronosporales, čeledi Peronosporaceae a rodu *Pseudoperonospora* (Lebeda a Cohen, 2011).

Do čeledi Peronosporaceae kromě zmiňovaného rodu zahrnujeme nejméně 16 dalších, z nichž jsou ve vyspělých zemích nejrozšířenější rody *Bremia*, *Peronospora*, *Hyaloperonospora* a *Plasmopara*, jejichž zástupci jsou také původci významných chorob kulturních rostlin. Jednotlivé rody uvnitř čeledi charakterizuje mj. tvar a typ větvení sporangioforů a schopnost produkce a rozšiřování zoospor. *Pseudoperonospora*, jež za určitých podmínek tvoří zoospory schopné pohybu, pak pro typ dichotomicky větvených sporangioforů se sporangii podobného stáří na koncích sterigmat, představuje jakýsi přechod mezi rody *Plasmopara* a *Peronospora*, které sice zoospory netvoří, ale sporangiofory a také haustoria se stavbou nejvíce podobají těm, jež pozorujeme u zástupců rodu *Pseudoperonospora* (Lebeda a Cohen, 2011).

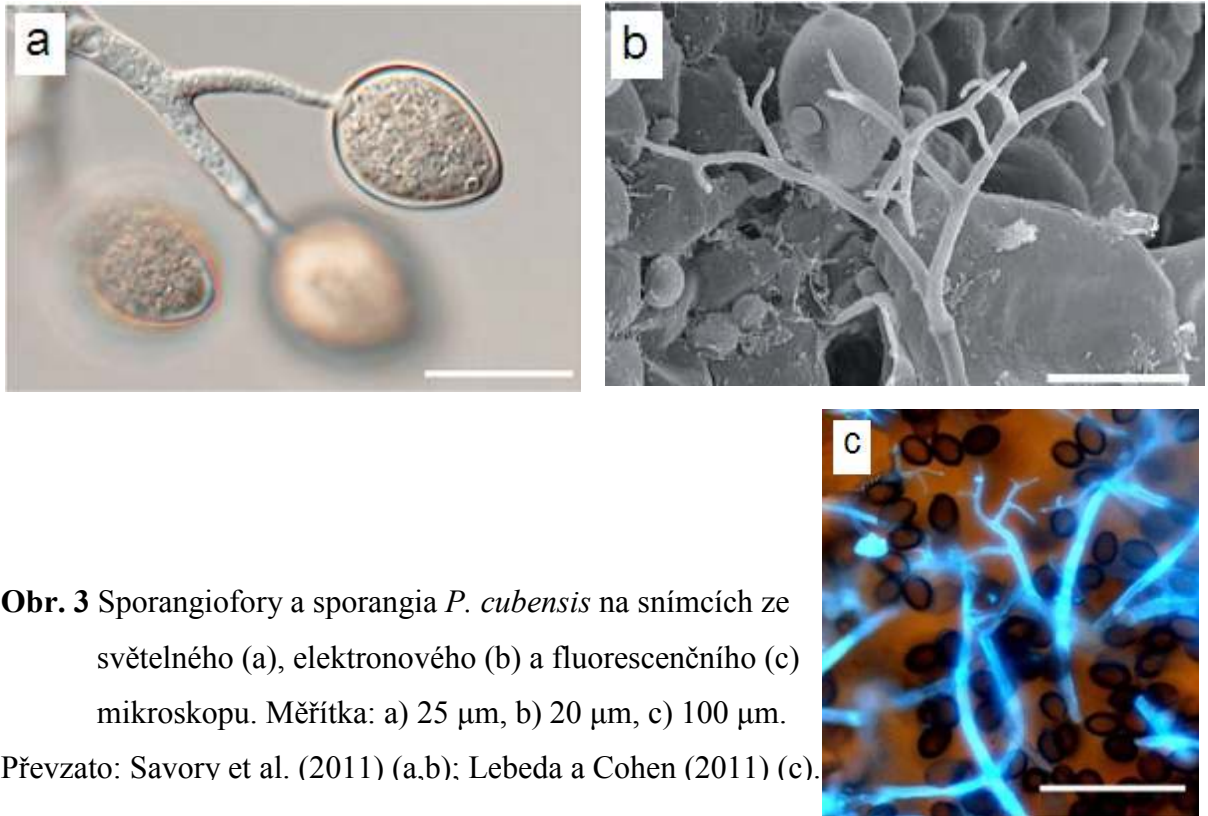
Jak bylo potvrzeno moderními molekulárně fylogenetickými přístupy, rod *Pseudoperonospora* představuje v taxonomii monofyletickou skupinu, blíže příbuznou rodu *Peronospora* (Lebeda a Cohen, 2011). Prozatím obsahuje pět druhů: typový druh *P. cubensis*, dále *P. humuli*, *P. cannabina*, *P. celtidis* a *P. urticae*, uvažuje se však i o možném šestém druhu, zatím jen vzácně se vyskytujícím, s názvem *P. cassiae* (Savory et al., 2011). Nedávné výzkumy příbuznosti uvnitř rodu se soustředily především na složitý vztah *P. cubensis* a *P. humuli*. Jejich velká morfologická i genetická podobnost (v sekvenci ITS rDNA) nasvědčovala, že *P. humuli* by mohla být ekvivalentem *P. cubensis* (Choi et al., 2005). Ovšem, studie M. Mitchella a jeho kolegů z poslední doby, 2009 - 2011 (Mitchell et al., 2011), odhalují podstatné rozdíly v konkrétních jaderných a mitochondriálních genech, jež potvrzují oddělení obou druhů (Savory et al., 2011). Tento názor je navíc podpořen rozdílnými hostitelskými okruhy a patogenní variabilitou obou druhů. *P. humuli* jako patogen chmelu (Cannabaceae) většinou není schopen infikovat

zástupce tykvovitých, výjimkou mohou být některé plané druhy (Runge a Thines, 2012), a *P. cubensis* působí jen mírné projevy choroby na rostlinách chmelu (Lebeda a Cohen, 2011; Mitchell et al., 2011). K hlubšímu náhledu na variabilitu rodu *Pseudoperonospora* je potřeba více komplexního přístupu a experimentálních (především molekulárních) dat (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

3.2.2 Biologie a ekologie *P. cubensis*

Stejně jako u všech ostatních zástupců čeledi Peronosporaceae je životní formou *P. cubensis* obligátní biotrofní parazitismus. Mimo hostitelskou rostlinu může tento druh přežívat jen ve formě odolných pohlavních výtrusů, oospor. Jako biotrofní parazit netvoří toxiny, ale pouze omezené množství enzymů k počátečnímu proniknutí skrz buněčnou stěnu. Při infikování pletiv rezistentní rostliny nastává často rychlá nekróza napadených částí jako přirozená obrana proti šíření patogenu, u náchylných hostitelů se tatáž reakce dostavuje až v pozdějších fázích napadení (Lebeda a Cohen, 2011).

Pro *P. cubensis* je typická vysoká specializace parazitismu, protože napadá výhradně listy tykvovitých (pozorována však také na částech stonkového původu a velmi vzácně na plodech), a to u rostlin všech vývojových stádií (Lebeda a Cohen, 2011). Prvním viditelným příznakem napadení bývá nejčastěji vznik chlorotických oblastí vzhledu světle žlutých olejových skvrn na svrchní straně listu, jež mohou být ohraničeny listovými žilkami (tzv. angulární skvrnitost). Velikost těchto lezí se v průběhu choroby zvětšuje a při silné infekci se převážně v jejich centrech mohou objevovat nekrotická místa (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011). Voglmayr et al. (2008) pozoroval světle červené skvrny s tmavým okrajem způsobené *P. cubensis* na listech nového hostitelského druhu *Impatiens irvingii* (Balsaminaceae). Vždy dochází k rychlému vadnutí, postupnému znetvoření a odumírání napadených listů (Lebeda et al., 2011; Voglmayr et al., 2008). Typickým symptomem pokročilého vývoje onemocnění, podle kterého se řadí mezi tzv. „downy mildews“ („ochmýřené“ plísně), je vytváření oblastí pokrytých vrstvičkou sporangioforů, které nesou sporangia šedé, hnědé či nafialovělé barvy (Obr. 3), na spodní straně listové čepele. Obecně všechny příznaky napadení tímto druhem plísně se mohou lišit v závislosti na hostiteli (jak mezi různými druhy, tak i mezi kultivary či genotypy jednoho druhu) a na podmínkách prostředí, které výrazným způsobem ovlivňují celý infekční a životní cyklus patogenu (Lebeda a Cohen, 2011).



Obr. 3 Sporangiofory a sporangia *P. cubensis* na snímcích ze světelného (a), elektronového (b) a fluorescenčního (c) mikroskopu. Měřítka: a) 25 μm , b) 20 μm , c) 100 μm . Převzato: Savory et al. (2011) (a,b); Lebeda a Cohen (2011) (c).

Hlavním prostředkem rozšiřování a infekce rostlin jsou na sporangioforech nepohlavně vzniklé spory (konidiosporangia, zoosporangia) typického oválného tvaru, které mohou být, přes svou poměrně krátkou životnost (většinou do dvou dní), šířeny větrem na velmi dlouhé vzdálenosti (viz kap. 3.2.4). K úspěšné infekci (inokulaci) cílové rostliny je potřeba zachycení sporangií na svrchní straně listu, jejich bezprostřední styk s vodou a příznivé teplotní a vlhkostní podmínky (Lebeda a Cohen, 2011). Optimální teplota se pohybuje okolo 15°C, při nižší či vyšší teplotě je nutná delší doba saturace listů (Savory et al., 2011), ale spíše nižší relativní vlhkost vzduchu (Lebeda a Cohen, 2011). Formování penetračních hyf ze zoospor uvolněných ze sporangia a jejich pronikání přes epidermis listu je následováno růstem větveného cenocytického mycelia v mezibuněčných prostorech, jehož haustoria se vchlipují do membrán hostitelských buněk. Doba inkubace kolísá v poměrně širokém intervalu mezi 4 a 12 dny v závislosti na vnější teplotě, fotoperiodě, množství inokula a době zavlažení pletiv (Savory et al., 2011). Při vyšší světelné intenzitě je celý proces urychlen až do reprodukční fáze, kdy je tvorba sporangií na sporangioforech, vyrůstajících za vysoké vzdušné vlhkosti průduchovými štěrbinami spodní pokožky, světlem inhibována. Zralá sporangia jsou za sucha pasivně rozšiřována větrem, mezi sousedními rostlinami také srážkovou vodou nebo lidskou činností (Savory et

al., 2011). V současné době je migrace sporangií nejlépe monitorována na území Spojených států amerických pomocí sítě stanic a internetového spojení (Lebeda a Cohen, 2011), program ipmPIPE použili ke své studii Ojiambo a Holmes (2011). Pohyb sporangií *P. cubensis* byl v posledních letech zvláště sledován ve státě Michigan, významném produkci okurek, v důsledku vážného napadení rozsáhlých polí plísni okurkovou r. 2005. Výskyt těchto nepohlavních spor byl zaznamenán v období června až října s nejvyšší koncentrací v dopoledních hodinách (8.00 – 13.00 hod) (Granke a Hausbeck, 2011).

Pohlavní reprodukce je u tohoto houbového organismu vzácná a hůře prokazatelná kvůli velmi ojedinělému výskytu tlustostěnných odpočívajících pohlavních výtrusů (oospor), které by měly být produkovány na konci sezóny při odumírání listů hostitele. V mnoha zemích, včetně ČR, nebyly do této chvíle vůbec pozorovány, ve střední Evropě byl prokázán jejich výskyt pouze v Rakousku r. 1989. Přezimování *P. cubensis* ve formě oospor může být v našich podmínkách částečně nahrazeno přežíváním na skleníkových kulturách tykvovitých rostlin (velký problém rozvoje choroby během zimy), většina inokula je však počátkem léta přinášena vzdušnými proudy z jihovýchodní Evropy (Lebeda a Cohen, 2011).

3.2.3 Hostitelský okruh *P. cubensis*

Ke zcela úspěšnému průběhu infekce a vývoje struktur *P. cubensis* dochází pouze u zástupců čeledi Cucurbitaceae. Do relativně širokého okruhu přirozených hostitelů řadíme 50 až 60 druhů z 20 rodů tykvovitých rostlin, mezi nimi také 9 druhů z 12 běžně pěstovaných. Nejvíce druhů z tohoto souboru zahrnuje rod *Cucumis*, druhově nejpočetnější rod čeledi. Oba pěstované druhy, *C. sativus* a *C. melo*, jsou rovněž vysoce náchylnými hostiteli plísně okurkové, která právě podle výskytu na *C. sativus* získala své české pojmenování (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

Na zástupcích dalšího významného rodu *Cucurbita* je rozšíření choroby více omezeno oproti *Cucumis* spp., jak referuje Lebeda a Křístková (1993). Z celkového počtu 12-15 druhů do hostitelského okruhu *P. cubensis* řadíme dnes všech pět pěstovaných a další planě rostoucí druhy, výzkumy interakce *Cucurbita* spp. a *P. cubensis* byly však dříve opomíjeny a také dnes jsou nedostačující (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Widrlechner, 2004).

Z ostatních ekonomicky důležitých rodů tykvovitých přirozeně podléhají napadení *P. cubensis* rody *Citrullus*, *Lagenaria*, *Benincasa* a *Luffa*. Jediný divoce rostoucí druh čeledi

tykvovitých ve střední Evropě, *Bryonia dioica*, byl shledán náchylným vůči plísni okurkové při umělé inokulaci v laboratoři. Zda na něm plíseň může přezimovat, je předmětem výzkumů (Lebeda a Cohen, 2011; Runge a Thines, 2012).

P. cubensis je schopna v omezené míře infikovat zástupce čeledi Cannabaceae (*Humulus lupulus*) (Mitchell et al., 2011) a Balsaminaceae (*Impatiens irvingii*) (Voglmayr et al., 2008).

3.2.4 Rozšíření *P. cubensis* ve světě, v Evropě a na území České republiky

Vzhledem k takřka celosvětovému rozšíření a hojnému pěstování tykvovitých rostlin můžeme jejich patogen *P. cubensis*, vykazující velkou variabilitu, označit za kosmopolitní druh. Hlavní ohniska výskytu leží v místech teplých klimatických pásů s dostatečnou vlhkostí, kde se tykvovité plodiny pěstují ve větším množství (Lebeda a Cohen, 2011; Ojiambo a Holmes, 2011). Bezkonkurenčně největší rozšíření je každoročně zaznamenáváno na zástupcích rodu *Cucumis*, především na okurkách a cukrových melounech. Vážné problémy s plísnovými epidemiemi okurek jsou řešeny především ve východních státech USA (Granke a Hausbeck, 2011) a v evropských zemích. Střední Amerika a pobřeží Karibského moře se staly centrem výskytu *P. cubensis* na taxonech *Cucurbita* spp., který je ohlášen přibližně ze 40 zemí, přičemž na území Evropy není tak hojný z důvodu nepůvodnosti pěstovaných druhů tohoto rodu. Podobně to platí pro distribuci patogenu na rodu *Citrullus*, jejíž hlavní oblastí jsou opět státy střední Ameriky (Lebeda a Cohen, 2011). Podle popsané situace ve Spojených státech sporangia (zdroj inokula) přezimují v teplých jižních státech (Florida, Texas) a každou sezónu jsou roznášena větrem do severně položených oblastí (Savory et al., 2011). Díky monitoringu výskytu plísně v letech 2008 a 2009 bylo zjištěno, že ačkoliv se choroba v každém z těchto roků objevila v jižní Floridě na přelomu února a března, k počátku jejího šíření do vzdálených oblastí došlo až v polovině června, a průměrná vzdálenost sousedních míst výskytu byla přibližně 110 km v obou letech (Ojiambo a Holmes, 2011).

Evropou se *P. cubensis* začala šířit počátkem 20. století, krátce po jejím prvním popsání na živých rostlinách (v roce 1903) (Lebeda a Cohen, 2011, Lebeda et al., 2011). Klíčovou událost pro zvýšení zájmu Evropanů o studium patogenu a jeho působení znamenala rozsáhlá a velmi ničivá epidemie okurek (*Cucumis sativus*), která zasáhla velkou část kontinentu, především celou oblast střední Evropy, ve 2. polovině 80. let (Lebeda a Schwinn, 1994). Sporangia původem z jihovýchodní části Evropy (Savory et al.,

2011), šířící se vzdušnými proudy na vzdálenosti až několika set kilometrů, byla příčinou propuknutí choroby, která se v dalších letech stěhovala ještě více na sever, do Polska a Skandinávie. Zajímavý je fakt, že během této katastrofální epidemie plíseň na postiženém území vůbec nenapadala zástupce rodu *Cucurbita* a druhu *Cucumis melo* (Lebeda a Gadasová, 2002), jak tomu bývá běžně např. v Izraeli, Japonsku či Indii (Lebeda a Cohen, 2011).

V Československu se v kritickém roce 1985 projevil její silný ekonomický dopad ztrátami okolo 80-90% obvyklé roční produkce okurek. V několika následujících letech nedošlo k výraznému ústupu epidemie, ale ztráty se snižovaly díky účinnější ochraně plodin. Podle hlavních ohnisek výskytu onemocnění docházelo k pravidelné migraci inokula přes oblasti jižního Slovenska, jižní a střední Moravy do východních a středních Čech (Lebeda a Cohen, 2011). V rámci těchto regionů Čech a Moravy byl zaznamenáván hojný výskyt *P. cubensis* na polních okurkách, čítající 80 až 100 lokalit, také v posledních letech (2001-2009) (Lebeda et al., 2011). Rozšíření plísně (převážně v období konce července a srpna) však zasahuje celou oblast České republiky s intenzitou lišící se mezi různými kraji, ale také mezi jednotlivými roky pozorování. Obecně má choroba na našem území velmi závažný charakter, index choroby (disease index, DI) se dle Lebedy a Cohena (2011) pohybuje v rozmezí 3-4 (silný až velmi silný stupeň napadení), nejtěžší stav infekce byl pozorován koncem srpna. Výskyt *P. cubensis* na polích postižených další hojnou chorobou okurek, „powdery mildew“ („práškovou“ plísní), je možný, ale silné projevy obou plísní se spíše vylučují. Napadení jiných druhů tykvovitých, které bylo sledováno u populací *Cucumis melo* a *Cucurbita moschata*, je vzácné (Lebeda et al., 2011).

3.3 Interakce hostitele (Cucurbitaceae) a patogenu (*P. cubensis*)

3.3.1 Variabilita patogenity *P. cubensis*

Díky biotrofně parazitickému způsobu života je pro všechny oomycety typická vysoká specifická hostitelů s vývojem složitých adaptací během koevoluce ze strany obou organismů. *P. cubensis*, vzhledem k svému hostitelskému okruhu (viz kap. 3.2.3), představuje velmi variabilního parazita, u něhož lze rozlišit různé patogenní skupiny. Až dosud se jednalo o patotypy a fyziologické rasy (Lebeda a Cohen, 2011). Také Savory et al. (2011) referuje o odlišné patogenitě a virulenci izolátů plísně okurkové při jejich

inokulaci na různé rody, druhy či odrůdy hostitelských rostlin (tzv. křížové inokulace), jak potvrzují mnohé výzkumy (např. Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Křístková, 1993).

Rozlišování speciálních forem (*formae speciales*) patogenu bylo zavedeno k identifikaci jeho fyziologické specializace na určitý rostlinný rod (Lebeda a Cohen, 2011). Lebeda (1990) zmiňuje možnost určení pěti speciálních forem: f. sp. *cucumae*, f. sp. *cucurbitae*, f. sp. *lagenariae*, f. sp. *benincasae* a f. sp. *luffae*, s nevyřešenou otázkou oddělení speciálních forem zvláště pro izoláty *C. sativus* a *C. melo*. Existence speciálních forem nebyla dosud ani potvrzena, ani vyvrácena (Lebeda a Cohen, 2011).

Patotypy, dále pak zvláště fyziologické rasy, jsou naopak často užívány k odlišení různých fyziologických forem patogenů rostlin v závislosti na jejich hostitelském druhu, případně kultivaru v rámci jednoho druhu (Lebeda a Cohen, 2011). Existence patotypů se studuje pomocí reakce různých izolátů na souboru diferenciačních hostitelů, k jejich určení byl zaveden systém číselných tetradových kódů (Lebeda a Widrlechner, 2003). Používání označení „patotyp“ a „fyziologická rasa“ různými autory není jednotné (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda et al., 2006; Savory et al., 2011). Pravděpodobnost existence fyziologických ras patogenu se zvyšuje s větším polymorfismem hostitelského druhu. Například některé genotypy druhu *C. pepo* mohou sloužit k determinaci rozdílných ras *P. cubensis* (Lebeda a Křístková, 1993).

Rozdíly mezi rasami *P. cubensis* mohou být způsobeny jiným obsahem efektorových proteinů ve strukturách patogenu. Jeho genetická diverzita, která se dnes zjišťuje hlavně prostřednictvím kombinace AFLP a ITS sekvenční analýzy, úzce souvisí s diverzitou patogenní a mění se v čase a v různých geografických podmínkách (Savory et al., 2011).

3.3.2 Variabilita *Cucurbita* spp. v interakci s *P. cubensis*

Hostitelský rod *Cucurbita* zahrnuje široké spektrum geneticky rozdílných druhů, ale také odrůd a kultivarů v rámci jednotlivých druhů (Lebeda et al., 2007). Vnitrodruhová variabilita interakce *Cucurbita* spp. s *P. cubensis* je tedy mnohem větší ve srovnání s tou, kterou vykazuje geneticky téměř homogenní druh *C. sativus* při interakci s tímto patogenem (Lebeda a Cohen, 2011). Přesto byl výzkum rezistence zástupců tohoto rodu vůči plísni okurkové dlouhou dobu opomíjen (Lebeda, 1990).

Interakce hostitele a parazita je v případě rodu *Cucurbita* řízena rasově specifickými faktory, což se projevuje rozdílnými reakcemi genotypů na jednotlivé izoláty (od úplné rezistence až po zcela náchylnou reakci) (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a

Widrlechner, 2004). Výraznou rasově specifickou rezistenci/náchylnost nacházíme také mezi poddruhy, varietami a kultivary významného druhu *C. pepo* (Lebeda a Cohen, 2011), což je zřejmé mj. z výsledků laboratorních testů Lebedy a Křístkové (1993). V rámci nich byla zjištěna neúplná rezistence u mnoha genových zdrojů *C. pepo* subsp. *pepo*, která potvrzuje oddělení tohoto poddruhu od *C. pepo* subsp. *ovifera*, jehož genotypy byly zcela náchylné (kompatibilní) k alespoň jednomu ze tří izolátů *P. cubensis*. Jako jedna z možných příčin rozdílných reakcí kultivarů *C. pepo* je uváděna vícenásobná domestikace tohoto druhu (Lebeda a Křístková, 1993). Reakce planých druhů při umělé inokulaci plísní byla také značně variabilní (Lebeda a Widrlechner, 2004).

3.3.3 Genetické, buněčné a molekulární aspekty interakce

Z hlediska dalšího pokroku poznání se jeví jako nezbytný výzkum interakcí *Cucurbita* spp. (s jeho rezistencí) a *P. cubensis* (s její virulencí) na buněčné a molekulární úrovni. Podle Lebedy a Cohena (2011) má rasově specifická rezistence hostitele z čeledi Cucurbitaceae monogenní nebo oligogenní charakter (je řízena jedním či několika hlavními geny). Povaha dědičnosti této interakce byla blíže studována u druhů *C. sativus* a *C. melo*, u ostatních tykvovitých, včetně *Cucurbita* spp., je zatím blíže neurčena. Rovněž málo informací je známo o genovém řízení virulence *P. cubensis*. Její variabilita a přizpůsobivost má pravděpodobně původ v diploidní sadě chromozómů jaderné DNA (Lebeda a Cohen, 2011).

Při prorůstání houbových hyf do pletiv hostitele (Cucurbitaceae) byla pozorována reakce buněk na přítomnost patogenu. U genotypů odolných vůči napadení se po rozpoznání cizích struktur signálními molekulami objevuje hypersenzitivní reakce, vyjádřená např. hromaděním vrstev kalózy na vnější části stěn hostitelských buněk (někdy také kolem buněk mycelia) spolu s mechanismy spějícími ke smrti buňky. Tyto projevy rezistence byly sledovány při studiu interakce *C. melo* a *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011).

3.3.4 Využití genových zdrojů *Cucurbita* spp. ve šlechtění na rezistenci

Důležitou výzkumnou metodu, využívanou k ochraně pěstovaných tykvovitých rostlin (především okurek) proti infekci *P. cubensis*, představuje šlechtění na rezistenci (vyšlechtění odolných forem kultivarů za použití genů rezistence pocházejících z

příbuzných zástupců). Nedostatek zdrojů rezistence je velkým problémem u druhů s menší genetickou diverzitou, kam patří také *C. sativus* (Savory et al., 2011), naopak dobrá dostupnost zdrojů rezistence, založená na rasové specifičnosti interakce, charakterizuje variabilní druhy *Cucumis melo* a *Cucurbita pepo* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Urban, 2010). Vůbec první polní rezistence *C. pepo* vůči izolátům *P. cubensis* byla doložena na japonském kultivaru Soumen v r. 1986 (Lebeda, 1990). Vysoce rezistentní byly shledány rovněž některé plané taxony *Cucurbita* spp. (Lebeda a Widrlechner, 2004). Obecně však stále postrádáme údaje o zdrojích a charakteristice rezistence v rámci rodu *Cucurbita* (Lebeda, 1990; Lebeda a Cohen, 2011). K hlubšímu prohloubení poznatků o této problematice byla také realizována tato studie, která navazuje na dříve publikovanou práci Lebedy a Widrlechnera (2004).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál (genotypy *Cucurbita* spp.)

Testy rezistence vůči *P. cubensis* byly prováděny na vybraném souboru planých a plevelných taxonů rodu *Cucurbita*, příbuzných všem pěti pěstovaným druhům *Cucurbita* spp., jež reprezentují široké spektrum genetické diverzity tohoto rodu. Semena 97 testovaných genofondových vzorků byla poskytnuta pěti centry národního systému genových zdrojů rostlin USA (The National Plant Germplasm System (NPGS)). Tyto materiály pocházejí především z Ameriky, nejvíce vzorků (63) je z oblasti Mexika; jen malá část zahrnuje evropské a asijské odrůdy. Ve studovaném souboru je zastoupeno 14 taxonů z 10 druhů *Cucurbita* spp. (Lebeda a Widrlechner, 2004). Podrobné informace o jednotlivých položkách jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4.1).

Dostatečný počet semen z každé této položky a z kontrolního vzorku *Cucumis sativus* kultivar Marketer 430 (H39 – 0121, ČR) (Štěpánková, 2006) byl použit k vypěstování pěti pokusných rostlin od každého genotypu. Vývoj rostlin, zasazených v plastových květináčích se zahradní půdou, probíhal v růstové komoře nebo ve skleníku za optimálních podmínek, jak je definují Lebeda a Urban (2010). Teplota prostředí byla ve dne udržována přibližně na 25°C, v noci na 15°C. Rostliny byly pravidelně zavlažovány a jednou týdně přihnojovány hnojivem Kristalon, verze „Květ a plod“ (Hydro Agri Rotterdam, Nizozemí; N 15%, P₂O₅ 5%, K₂O 30%, MgO 3%), přičemž nebyly jinak chemicky ošetřovány. K testování byly určeny vyvinuté listy 6-8 týdenních rostlin s 3-4

pravými listy, z nichž bylo na každou rostlinu odebráno 5 disků (Ø 20 mm, z jednoho listu), a to u tří rostlin z každého genotypu (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2003, 2004). Použití listových disků k testování poskytuje mnohé výhody, zejména prostorovou nenáročnost za možnosti současného testování velkého množství rostlin a možnost přesného definování podmínek v průběhu experimentu (Lebeda a Urban, 2010).

Tab. 4.1 Soubor testovaných vzorků *Cucurbita* spp.

Poř. číslo	Označení vzorku	Taxon <i>Cucurbita</i> spp.	Název odrůdy	Místo původu
1	PI 442192	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-006	Mexiko, Nuevo Leon
2	PI 442193	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-203	Mexiko
3	PI 442194	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-204	Mexiko
4	PI 442200	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-257	Mexiko, Zacatecas
5	PI 512094	<i>Cucurbita foetidissima</i>	LM - 280	Mexiko, Nuevo Leon
6	PI 318832	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Chichicayota	Mexiko, Sonora
7	PI 438832	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2286	Mexiko, Veracruz
8	PI 438833	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2304	Mexiko, Veracruz
9	PI 438834	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2311	Mexiko, Veracruz
10	PI 438835	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2363	Mexiko, Oaxaca
11	PI 438836	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2395	Mexiko, Chiapas
12	PI 442345	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-180	Mexiko, Veracruz
13	PI 442348	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-258	Mexiko, Sinaloa
14	PI 442358	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-290	Mexiko, Chiapas
15	PI 489696	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K801 - 1	Mexiko, Chiapas
16	PI 494128	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	M27	Mexiko, Jalisco
17	PI 512204	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla	Mexiko, Colima
18	PI 512205	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla	Mexiko, Colima
19	PI 512209	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Ahuichichi	Mexiko, Jalisco
20	PI 512212	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Morchete or Morche	Mexiko, Veracruz
21	PI 512213	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla or Chicayote	Mexiko, Guerrero
22	PI 512214	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla or Chicayote	Mexiko, Guerrero
23	PI 512216	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla, Chicayote, or Calabaza de cayote	Mexiko, Guerrero
24	PI 512218	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Cuacualaztle (Zapotec Indian)	Mexiko, Oaxaca
25	PI 512219	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	LM392	Mexiko, Jalisco
26	PI 512220	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN26595	Mexiko, Veracruz
27	PI 512221	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN29350	Mexiko, Veracruz
28	PI 512222	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN29593	Mexiko, Veracruz
29	PI 512223	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Morchete	Mexiko, Veracruz
30	PI 512224	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	GN-MEX-20	Mexiko, Nayarit
31	PI 196309	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Ovifera	Mexiko, Baja

				California
32	PI 318822	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicoyote	Mexiko, Sonora
33	PI 511985	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Sonora
34	PI 512198	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	E02-001	Mexiko, Sonora
35	PI 512199	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Halawe chipu (Warihio Indian)	Mexiko, Sonora
36	PI 512200	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicayote	Mexiko, Sonora
37	PI 512201	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicayote	Mexiko, Sonora
38	PI 512210	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Nayarit
39	PI 512211	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Sinaloa
40	PI 512225	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
41	PI 512226	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
42	PI 512227	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
43	PI 512228	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
44	PI 512229	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
45	PI 512230	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
46	PI 512231	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
47	PI 512232	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
48	PI 512233	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
49	PI 653839	<i>Cucurbita cordata</i>	TWW 30	Mexiko, Baja California Norte
50	PI 240879	<i>Cucurbita digitata</i>	16589	Mexiko, Sonora
51	Grif 9446	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>	TWW 42	Ecuador, Guayaquil
52	PI 432443	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>		Ecuador
53	PI 540895	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>	90	U. S., Kalifornie
54	Grif 9447	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 48	Argentina, Salta
55	Grif 9448	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 55	U. K., Anglie
56	Grif 9450	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 60	Mexiko, Chihuahua
57	PI 512680	<i>Cucurbita ficifolia</i>	V-CU-36	Španělsko, Alicante
58	PI 406683	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>		Mexiko
59	PI 438698	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	W-C 2295	Mexiko, Veracruz
60	PI 512099	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	Ts'oopiluthu (Huasteca)	Mexiko, San Luis Potosi
61	PI 512103	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	LM273	Mexiko, Veracruz
62	PI 512105	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	MN28990	Mexiko, Veracruz
63	PI 512106	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	MN29110	Mexiko, Veracruz
64	PI 540900	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	92	Mexiko, Veracruz

65	PI 442341	<i>Cucurbita pedatifolia</i>	K 792-063	Mexiko, San Luis Potosi
66	PI 173681	<i>Cucurbita pepo</i>	Yumurta	Turecko
67	PI 174178	<i>Cucurbita pepo</i>	Yumurta	Turecko, Kars
68	PI 222247	<i>Cucurbita pepo</i>	1419	Írán, Tehran
69	PI 274787	<i>Cucurbita pepo</i>	Yellow Round	Indie, Delhi
70	PI 357931	<i>Cucurbita pepo</i>	Prilepska	Makedonie
71	PI 512744	<i>Cucurbita pepo</i>	AN-CU-42	Španělsko, Cadiz
72	PI 532354	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	Calabacilla loca	Mexiko, Tamaulipas
73	PI 532355	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	179	Mexiko, Tamaulipas
74	PI 532356	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	180	Mexiko, Tamaulipas
75	PI 614683	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	HDW 5531	Mexiko, Tamaulipas
76	PI 285213	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>		U. S., Texas
77	PI 540907	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	127	U. S., Kalifornie
78	PI 614684	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3163	U. S., Texas
79	PI 614685	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3180	U. S., Texas
80	PI 614686	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3162	U. S., Texas
81	PI 614687	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3173	U. S., Texas
82	PI 614688	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3170	U. S., Texas
83	PI 614689	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 5299	U. S., Texas
84	PI 614690	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 5533	U. S., Texas
85	PI 614692	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 5	U. S., Mississippi
86	PI 614693	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	294	U. S., Mississippi
87	PI 614694	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	293	U. S., Mississippi
88	PI 614696	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	Ames 22733	U. S., Mississippi
89	PI 614697	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	14688	U. S., Mississippi
90	PI 614698	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	14712	U. S., Mississippi
91	PI 614699	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Populations 1 & 2	U. S., Mississippi
92	PI 614700	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 4	U. S., Mississippi
93	PI 614701	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 3	U. S., Mississippi
94	NSL 91999	<i>C. pepo</i> var. <i>ovifera</i>	Bicolor Spoon	U. S., New York
95	G 5285	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		U. S.
96	G 29253	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		Argentina, Entre Rios
97	G 29254	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		Argentina, Toledo

4.2 Izoláty *P. cubensis*

Uvedený soubor genotypů *Cucurbita* spp. byl testován na rezistenci, resp. náchylnost vůči 11 izolátům *P. cubensis* (1/88, 6/96, 1/97, 6/97, 2/95, 1/00, 2/00, 3/00, 11/00, 12/00, 14/00), které byly v průběhu let 1988-2000 získány na území České republiky (8 izolátů) a po jednom izolátu z Francie, Španělska a Nizozemí (Tab. 4.2). Použité izoláty pocházejí většinou z *Cucumis sativus*, jen izolát 2/95 je z *Cucumis melo* (Lebeda a Gadasová, 2002), a na základě reakcí na diferenčním souboru Cucurbitaceae (viz Lebeda a Widrlechner, 2003) reprezentují 9 různých patotypů *P. cubensis*, které se navzájem významně liší ve svých patogenních vlastnostech. Jsou zde reprezentovány jak izoláty s nízkou patogenitou

(nejnižší vykazoval izolát 3/00), tak s vysokým stupněm patogenity (např. izolát 1/97), jak ukazuje tabulka Tab. 4.2 (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Kultivace (uchovávání a množení) izolátů byla prováděna na listových segmentech nebo discích silně náchylného genotypu *C. sativus* cv. Marketer 430, který při testování sloužil také jako náchylná kontrola (Lebeda a Widrlechner, 2004). Vždy po 10-14 dnech kultivace byl příslušný izolát reinokulován na čerstvý rostlinný materiál (Lebeda a Urban, 2010). Dlouhodobé uchovávání kultur (infikovaných listů se sporangiofory) v Petriho miskách (max. 6 měsíců) bylo realizováno za nízkých teplot (-80°C) v mrazicím boxu (Lebeda a Urban, 2010; Lebeda a Widrlechner, 2004).

Tab. 4.2 Izoláty *Pseudoperonospora cubensis*, použité k testování rezistence, a jejich reakce s diferenačním souborem tykvovitých (Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Widrlechner, 2004)

Diferenační genotyp	Izoláty <i>P. cubensis</i> (PC)										
	3/00 ¹	6/97	1/88	11/00	2/95	6/96	1/00 ²	14/00	12/00	2/00 ³	1/97
<i>Cucumis sativus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. melo</i> var. <i>acidulous</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Cucurbita pepo</i> var. <i>pepo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>C. pepo</i> var. <i>fraterna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. maxima</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Citrullus lanatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Benincasa hispida</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Luffa cylindrica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Lagenaria siceraria</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PC – mezinárodní označení izolátů *P. cubensis* (číslo izolátu/rok sběru)
Původ izolátů: ¹ = Francie, ² = Nizozemí, ³ = Španělsko, ostatní = Česká republika
+ náchylná reakce (mírná až hojná sporulace *P. cubensis*)
- rezistentní reakce (žádná nebo značně omezená sporulace)

4.3 Příprava inokula, inokulace a inkubace

Standardizovaná metodika testování rezistence je klíčem k úspěšnému provádění testů a srovnatelnosti získaných výsledků (Lebeda a Widrlechner, 2003). Její jednotlivé kroky, které byly zachovány i při tomto testování, jsou detailně popsány v práci Lebedy a Urbana (2010).

V naší studii bylo k přípravě inokula využíváno listů/listových segmentů *C. sativus* cv. Marketer 430, infikovaných jednotlivými izoláty *P. cubensis*, jež byly umístěny v plastových nádobách (110 × 85 × 45 mm) nebo v Petriho miskách na vlhkém filtračním papíře svrchní stranou dolů, se sporangiofory na spodní straně (nejhojněji se vyskytujícími na čerstvých zelených úsecích listů). Oblasti pokryté sporangiofory se zralými (podle Lebedy a Křístkové (1993) 3-4 denními) sporangii (obvykle 7.-9. den po inokulaci), obklopené zdravým pletivem, byly sterilizovanými nůžkami nastříhány na malé kousky, které byly následně pomocí pinzety propírány v kádince s přibližně 5 ml destilované vody tak, aby došlo k uvolnění sporangii do kapaliny. Koncentrace roztoku byla dále zředěna přidáním destilované vody na optimální hodnotu 10^5 sporangii/ml (Lebeda a Urban, 2010).

Takto připravené inokulum bylo skleněným rozprašovačem rovnoměrně aplikováno na spodní stranu listových disků testovaných rostlin, uložených na vrstvě důkladně navlhčeného filtračního papíru a buničiny v plastových miskách, v průměrném množství 5 ml na jednu misku (Štěpánková, 2006). Před inokulací by měly terčičky v misce přiléhat k navlhčenému materiálu celou svou plochou, v opačném případě totiž může dojít k omezené infekci a tím není zajištěna objektivnost výsledků testování (Lebeda a Urban, 2010). Misky s disky byly přikryty skleněnými víčky pro udržení optimální vlhkosti (Štěpánková, 2006).

Inkubační dobu silně ovlivňují podmínky okolního prostředí, proto bylo nutné v růstové komoře, kde byly napadené listové terčičky inkubovány *in vitro*, udržovat stabilní mikroklima. K němu patří stálá 12h fotoperioda a teplota 18°C za světla a 15°C za tmy, které byly nastaveny v průběhu inkubace po úvodních 24 hodinách uložení čerstvě inokulovaných disků ve tmě (přikrytí misek černou neprůsvitnou fólií). Inkubační doba se v *in vitro* podmínkách obvykle pohybuje v rozmezí 7-9 dnů (viditelná sporulace *P. cubensis*), v polních podmínkách je variabilnější: 4-12 dní (viz kap. 3.2.2) (Lebeda a Urban, 2010).

4.4 Metody hodnocení rezistence

Rezistence/náchylnost listových terčků, reprezentujících jednotlivé genotypy testovaného souboru, vůči izolátům *P. cubensis*, byla posuzována podle intenzity sporulace patogenu semikvantitativně i kvalitativně (viz níže). Hodnocení každého disku proběhlo pětkrát, a to ve dvoudenních intervalech od 6. do 14. dne po inokulaci, 6-14 dpi (Lebeda a Urban, 2010), přičemž hodnoty získané 14. den určují konečný fenotypový projev interakce hostitele (genotypu *Cucurbita* spp.) a parazita (izolátu/patotypu *P. cubensis*) (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Základní semikvantitativní hodnocení reakcí jednotlivých listových terčků využívalo pětibodovou škálu (0-4), vyjadřující poměr plochy pokryté sporangioforami k celkové ploše disku: **0** = 0% (bez viditelné sporulace), **1** = $\leq 25\%$, **2** = $> 25\%$ a $\leq 50\%$, **3** = $> 50\%$ a $\leq 75\%$, **4** = $> 75\%$ plochy disku (Lebeda a Urban, 2010). Pro každý genotyp byla rovněž určena celková intenzita sporulace (stupeň napadení – „degree of infection“, DI) procentuálně z maximální hodnoty (Lebeda a Křístková, 1993), která může teoreticky nastat v případě hodnocení všech listových disků stupněm 4. Výpočet DI se provádí podle matematického vztahu, který uvádějí Lebeda a Urban (2010).

Výsledné reakce zástupců testovaných taxonů a genotypů *Cucurbita* spp. byly na základě stupně napadení (DI) a srovnáním konečného projevu intenzity sporulace na 15 discích (pocházejících ze tří rostlin) daného genotypu zhodnoceny také kvalitativně (Lebeda a Urban, 2010; Lebeda a Widrlechner, 2003), a to jejich zařazením do čtyř skupin podle stupně odolnosti/náchylnosti (Lebeda a Widrlechner, 2003):

- = rezistence (DI = 0%),
- (-) = neúplná rezistence (DI = 0,1-35%),
- (+) = heterogenní reakce mezi rostlinami (terčíky),
- + = náchylná reakce (DI = 35,1-100%).

4.5 Metody statistického zpracování dat

V návaznosti na původně získané údaje o interakcích genových zdrojů *Cucurbita* spp. a izolátů *P. cubensis* (v období testování 22. 1. 2001 - 18. 12. 2001) a jejich následnou prezentaci (Lebeda a Widrlechner, 2004) bylo v rámci této práce přistoupeno k jejich detailnímu statistickému zpracování, které je nezbytné k hlubšímu poznání této interakce a případnému využití ve šlechtění na rezistenci. Pro účely tohoto zpracování byla

v programu MS Office Excel vytvořena výchozí souhrnná tabulka obsahující všechny získané hodnoty škály 0-4 (pro každý disk a izolát, veškerá opakování u všech 97 genotypů *Cucurbita* spp.), přičemž byla použita konečná verze z 27. 10. 2011.

Reakce genotypů vůči konkrétnímu izolátu *P. cubensis* byly nejdříve zhodnoceny podle relativní četnosti disků (n = 15) jednoho genotypu v každém z pěti stupňů intenzity napadení 14. den po inokulaci (14 dpi). Pro snadnější orientaci a také pro porovnání reakcí genotypů vůči jednotlivým izolátům slouží 100% skládané pruhové grafy aplikace MS Office Excel (viz např. Štěpánková, 2006). Grafy stejného typu byly vytvořeny pro výsledné reakce 10 zastoupených druhů rodu *Cucurbita* vůči každému izolátu, které však kvůli výrazně nerovnoměrnému rozložení testovaných taxonů do jednotlivých druhů (viz Tab. 4.1) mají spíše orientační, než směrodatný charakter.

Podobným způsobem došlo k sestavení grafu, který ukazuje rozčlenění všech testovaných terčků (n = 1455, bez kontrolního genotypu) do pětibodové stupnice hodnocení intenzity sporulace (14 dpi), zvláště pro každý z 11 izolátů. Toto grafické vyjádření umožňuje srovnání izolátů z hlediska stupně virulence.

Existuje mnoho dalších metod statistického zpracování dat získaných během testů rezistence, např. dvoufaktorová analýza variance a Tukey HSD test, shluková analýza (metoda single linkage), metoda s využitím aritmetického průměru a směrodatné odchylky, které však nejsou v této práci použity a interpretovány. Takto rozsáhleji zaměřená analýza bude předmětem diplomové práce.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci prováděných testů rezistence 97 genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči 11 izolátům (patotypům) *P. cubensis* bylo získáno velké množství dat, která již byla předběžně analyzována dříve (Lebeda a Widrlechner, 2004). V rámci současné analýzy je detailní pozornost věnována zejména reakci genotypů *Cucurbita* spp., ale i patogenitě izolátů *P. cubensis*. Na závěr je přiložena souhrnná tabulka kvalitativního hodnocení reakcí genotypů *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis* (Tab. 5.1).

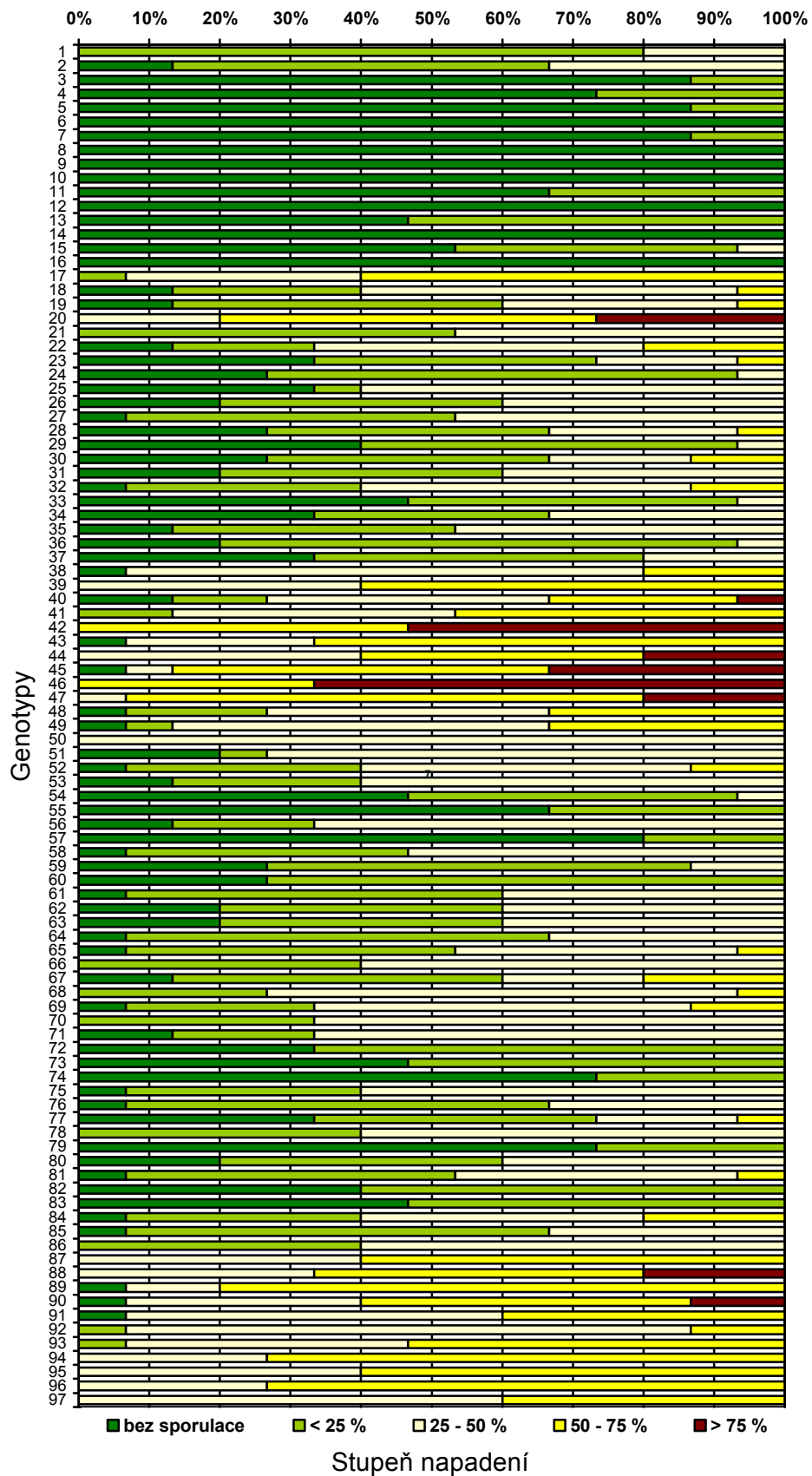
5.1 Reakce genotypů *Cucurbita* spp. po inokulaci *P. cubensis*

Každý ze studovaných 97 genotypů *Cucurbita* spp. byl při testování rezistence vůči danému izolátu *P. cubensis* zastoupen 15 listovými disky ze 3 zdravých rostlin, jejichž intenzita napadení byla v průběhu tohoto experimentu hodnocena pomocí škály 0-4 (blíže viz kap. 4.4). Konečné hodnocení reakcí jednotlivých genotypů (resp. taxonů), prováděné 14. den po inokulaci, je určeno za konečné a je znázorněno vždy pro konkrétní izolát v následujících grafech (Graf 1-11) podle zastoupení jednotlivých stupňů infekce.

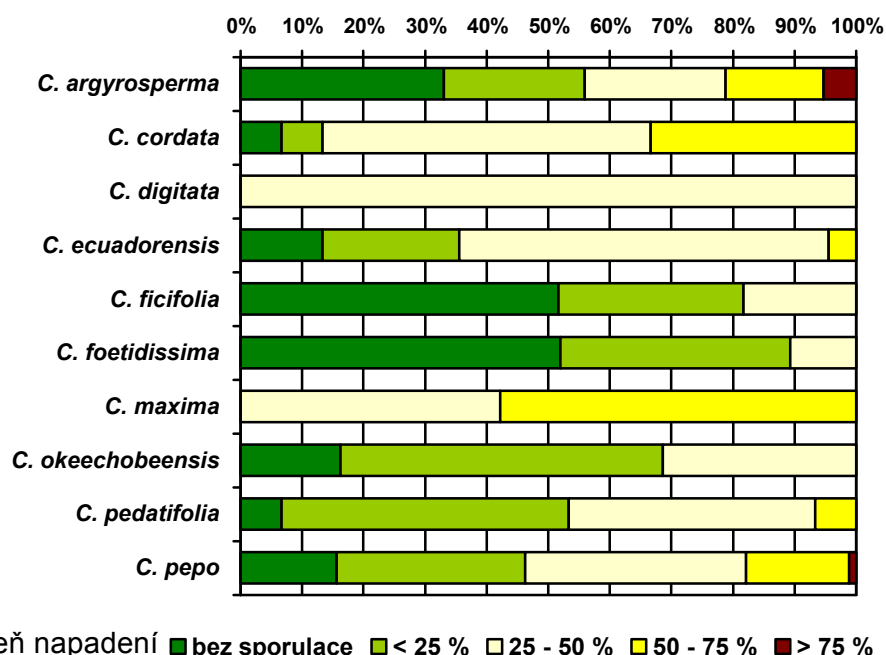
Z grafů 1a-11a je na první pohled patrná velká variabilita ve frekvenci jednotlivých stupňů sporulace, od 0 (úplná rezistence) až po 4 (zcela náchylná reakce), mezi vzorky *Cucurbita* spp. U některých interakcí genotyp hostitele – izolát *P. cubensis* se však projevovala heterogenní reakce, tzn. byl zde zaznamenán projev výrazných rozdílů v intenzitě napadení mezi terčíky z různých rostlin daného genotypu. Některé z těchto výsledných heterogenních reakcí byly potvrzeny až následným opakováním testů pro konkrétní genotyp a izolát. U většiny genotypů se však v konečném hodnocení interakce s konkrétním izolátem vyskytují pouze 2 nebo 3 blízké stupně napadení. Takovou reakci lze označit za homogenní s ohledem na možnou variabilitu kvality rostlinného pletiva či inokula a další faktory ovlivňující průběh a hodnocení testování (Štěpánková, 2006).

Graf 1a-11a: Pořadová čísla 1-97 zastupují jednotlivé genotypy, jež jsou detailně popsány v seznamu položek testovaného souboru (Tab. 4.1). Reakce kontrolního genotypu nejsou v těchto grafech zahrnuty.

Graf 1b-11b: Souhrnné zhodnocení reakcí zastoupených druhů *Cucurbita* spp.



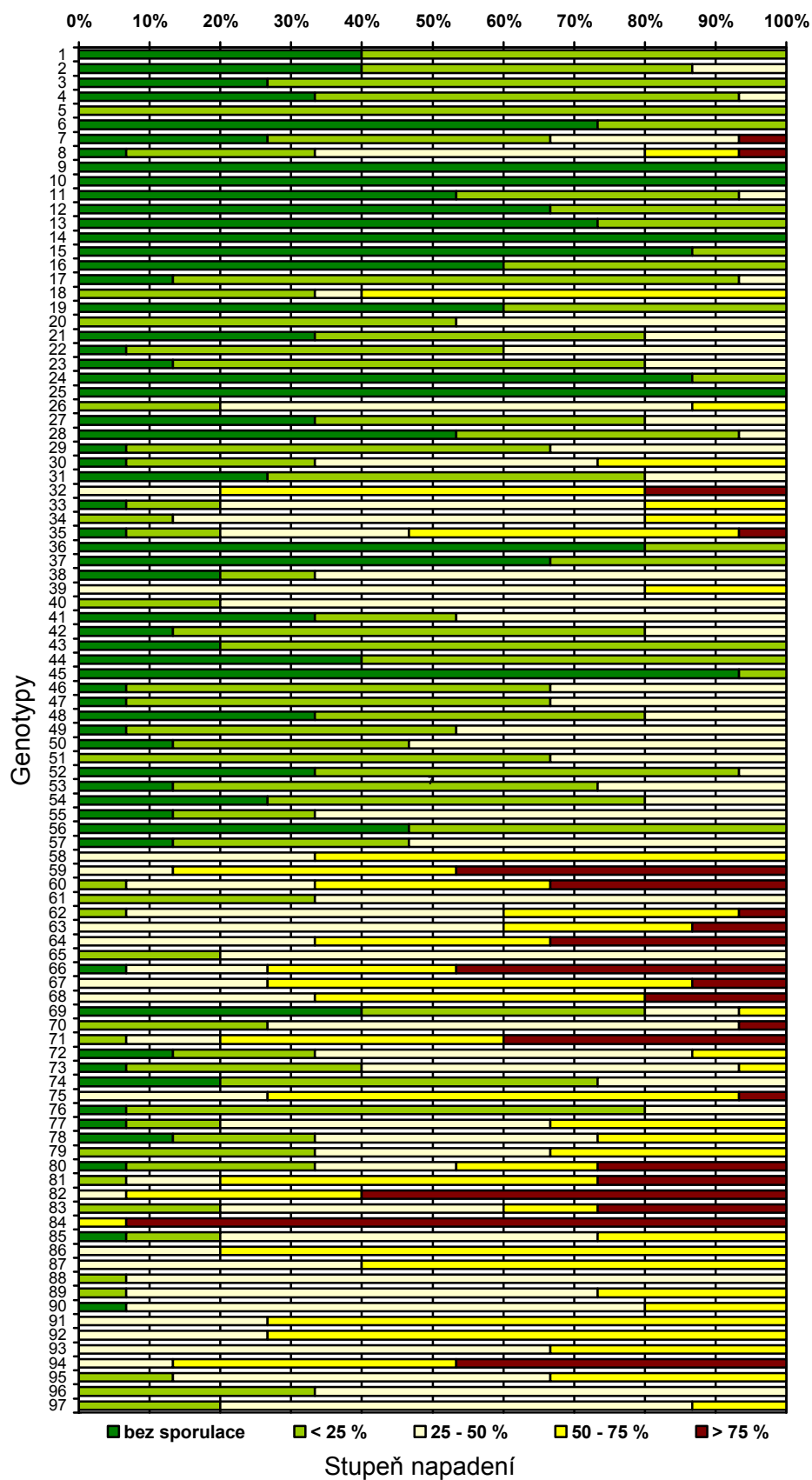
Graf 1a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/88, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



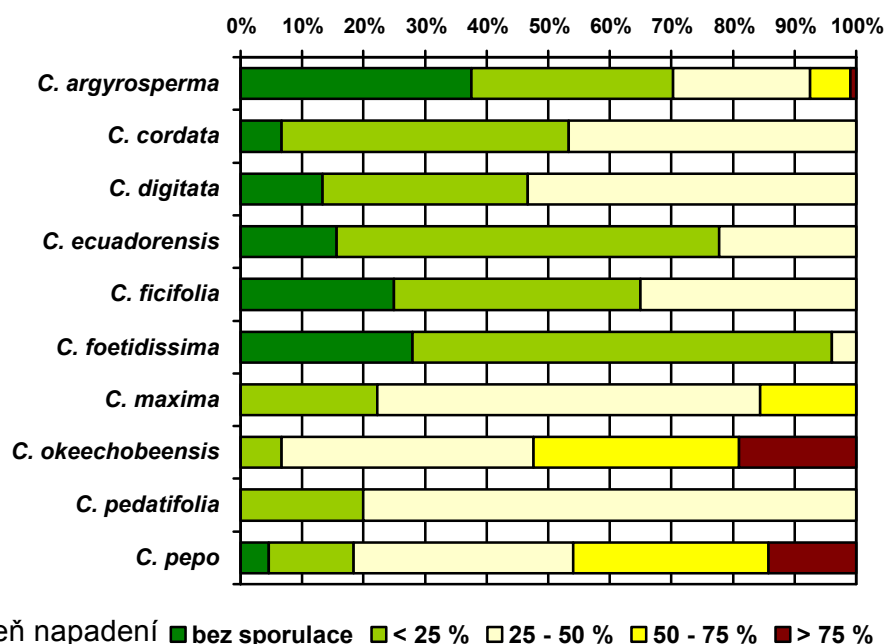
Graf 1b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/88, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

Podstatná část výsledků testování rezistence *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis* (pocházejících převážně z *Cucumis sativus*) byla tvořena náchylnými reakcemi s převahou stupňů napadení 2 a 3, zastoupení silně náchylné reakce (stupeň 4) nebylo tak časté. Náchylnost vůči všem 11 izolátům byla zaznamenána jen u 10 genotypů *C. pepo*, a to s pořadovými čísly 66, 75, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 a 94 (viz Tab. 4.1), a 2 genotypů *C. maxima*, č. 95 a 96 (Lebeda a Widrlechner, 2004); početné náchylné reakce na jednotlivé izoláty nacházíme také u dalších vzorků, především z 2. poloviny testovaného souboru.

Důležitá data z hlediska dalšího výzkumu (zejména ve šlechtění tykvovitých rostlin na rezistenci) představují výsledky interakce hostitelského genotypu a patogenu, které byly hodnoceny jako zcela nebo částečně rezistentní reakce (disky bez sporulace nebo s mírnou sporulací) vůči všem nebo alespoň některým použitým izolátům/patotypům (Lebeda a Widrlechner, 2003; 2004). Tuto skutečnost lze vidět v grafech 1a-11a, kde je zastoupení reakcí stupně 0 v rámci konkrétního genotypu reprezentováno tmavě zelenou barvou příslušného sloupce.



Graf 2a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/96, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.

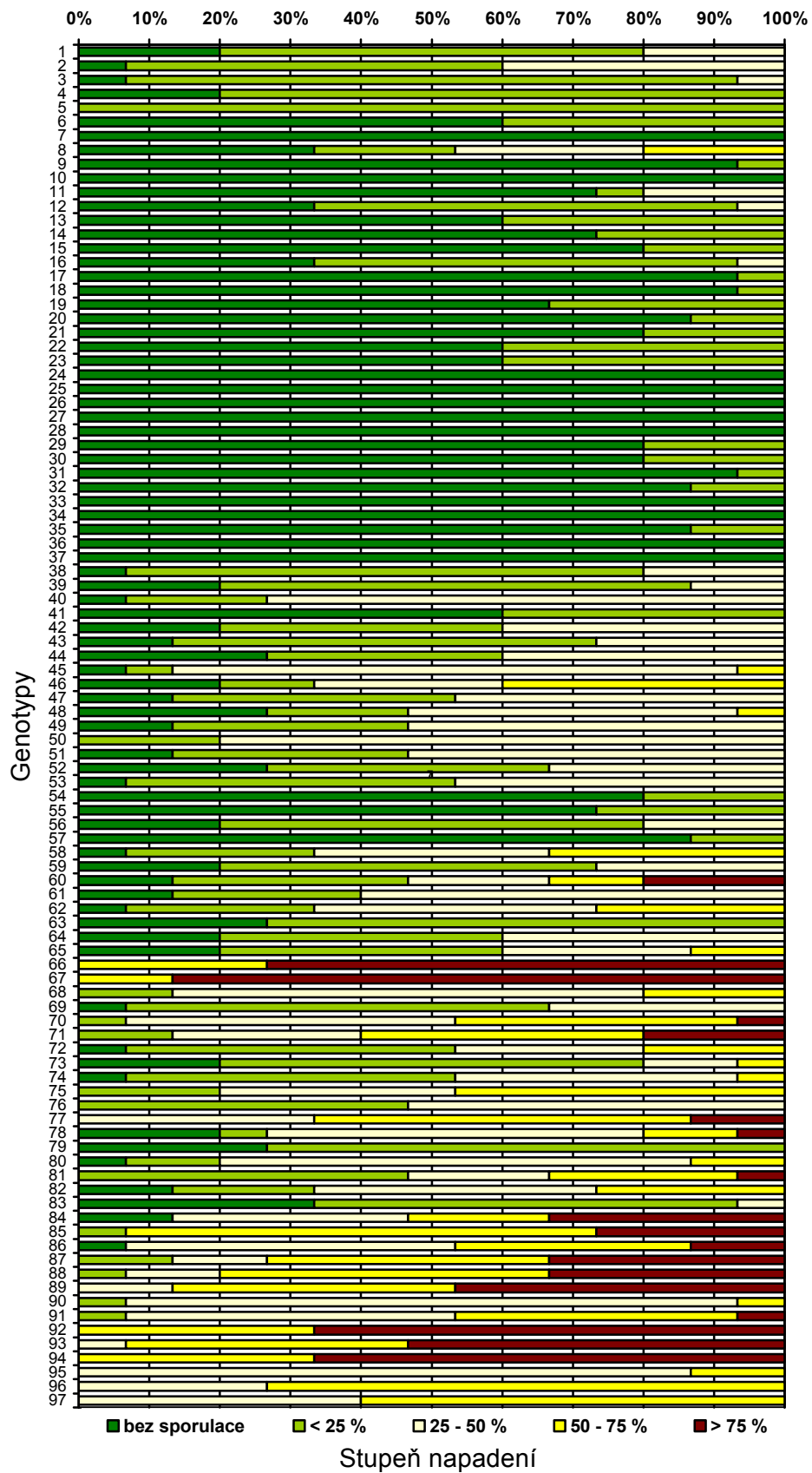


Graf 2b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/96, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

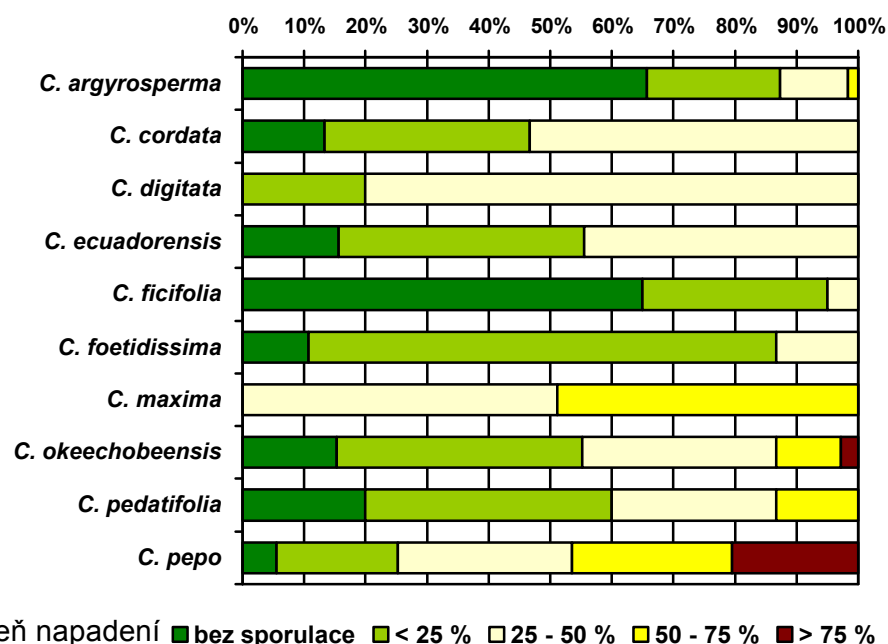
Rezistence (DI = 0-35%) vůči celému souboru použitých izolátů *P. cubensis* byla zjištěna pouze u 13 genotypů v rámci dvou druhů: *C. argyrosperma* (č. 7, 12, 13, 14, 15, 19, 24, 25, 27, 28, 29 a 37) a *C. foetidissima* (č. 4), přičemž prvních 11 jmenovaných patří k taxonu *C. argyrosperma* subsp. *sororia* (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Kromě výše uvedených výsledků extrémní rezistence 13 genotypů a naopak úplné náchylnosti 12 genotypů *Cucurbita* spp., většina testovaných genotypů *Cucurbita* spp. vykazovala v závěrečném hodnocení interakcí hostitele a parazita různé stupně rezistence/náchylnosti vůči odlišným patotypům (rasám) *P. cubensis*. Tyto interakce byly charakterizovány rasově specifickou odezvou, resp. rezistencí. Ačkoliv se v některých případech jednalo o neúplnou rezistenci se stupněm napadení DI = 0,1-34%, obecně lze konstatovat, že u převážné části studovaného souboru planých a plevelných taxonů byla rasová specifičnost této interakce zřejmá. Nejvíce variabilní se ukázaly druhy *C. argyrosperma*, *C. foetidissima*, *C. okeechobeensis* a *C. pepo*, jak ukazují grafy 1b-11b (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Přítomnost rasově specifických reakčních schémat v rámci rodu *Cucurbita* potvrzuje i dřívější výzkum Lebedy a Křístkové (1993), kdy byla tato interakce zjištěna u genotypů



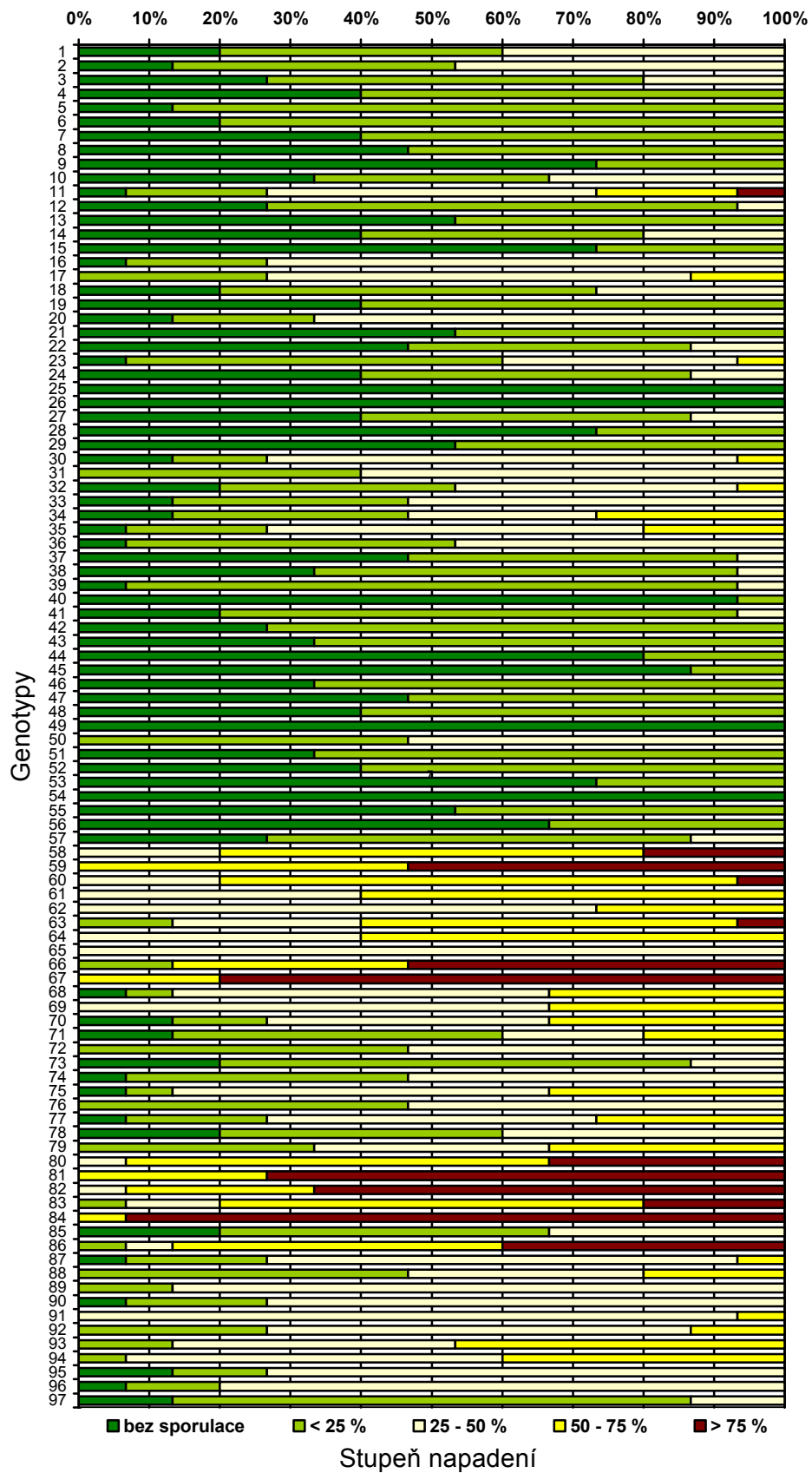
Graf 3a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/97, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



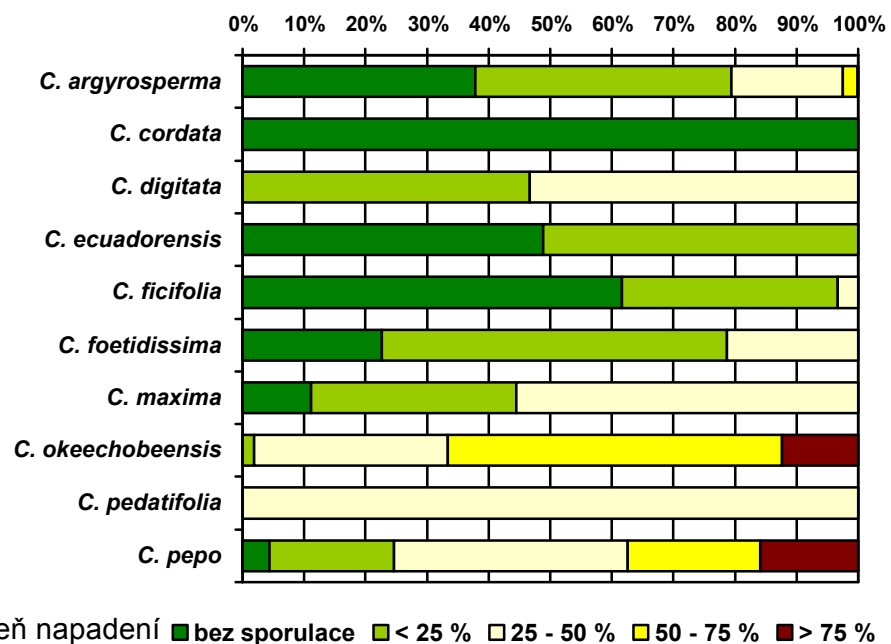
Graf 3b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/97, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

různých kultivarů *C. pepo*. Variabilita odpovědi genotypů tohoto druhu na inokulaci *P. cubensis* očividně koresponduje s jeho velkou genetickou diverzitou (viz např. Ferriol et al., 2003a; Gong et al., 2012; Lebeda et al., 2007) a polymorfismem plodů (Paris et al., 2012), jak uvádějí také Lebeda a Křístková (1993). Výsledky současné studie, které odhalily celkem 20 reakčních schémat mezi 29 testovanými genotypy *C. pepo* (Lebeda a Widrlechner, 2004) (viz tabulka kvalitativního hodnocení Tab. 5.1), rozšiřují poznatky o specifičnosti rezistence *C. pepo* vůči patotypům *P. cubensis* s možností existence efektivních genů rezistence (Lebeda a Cohen, 2011). Z tohoto hlediska se jeví jako kontroverzní tvrzení Parise (Paris, 2001), který *C. pepo* označuje za nedostačující vzhledem k dostupným zdrojům rezistence vůči plísni okurkové.

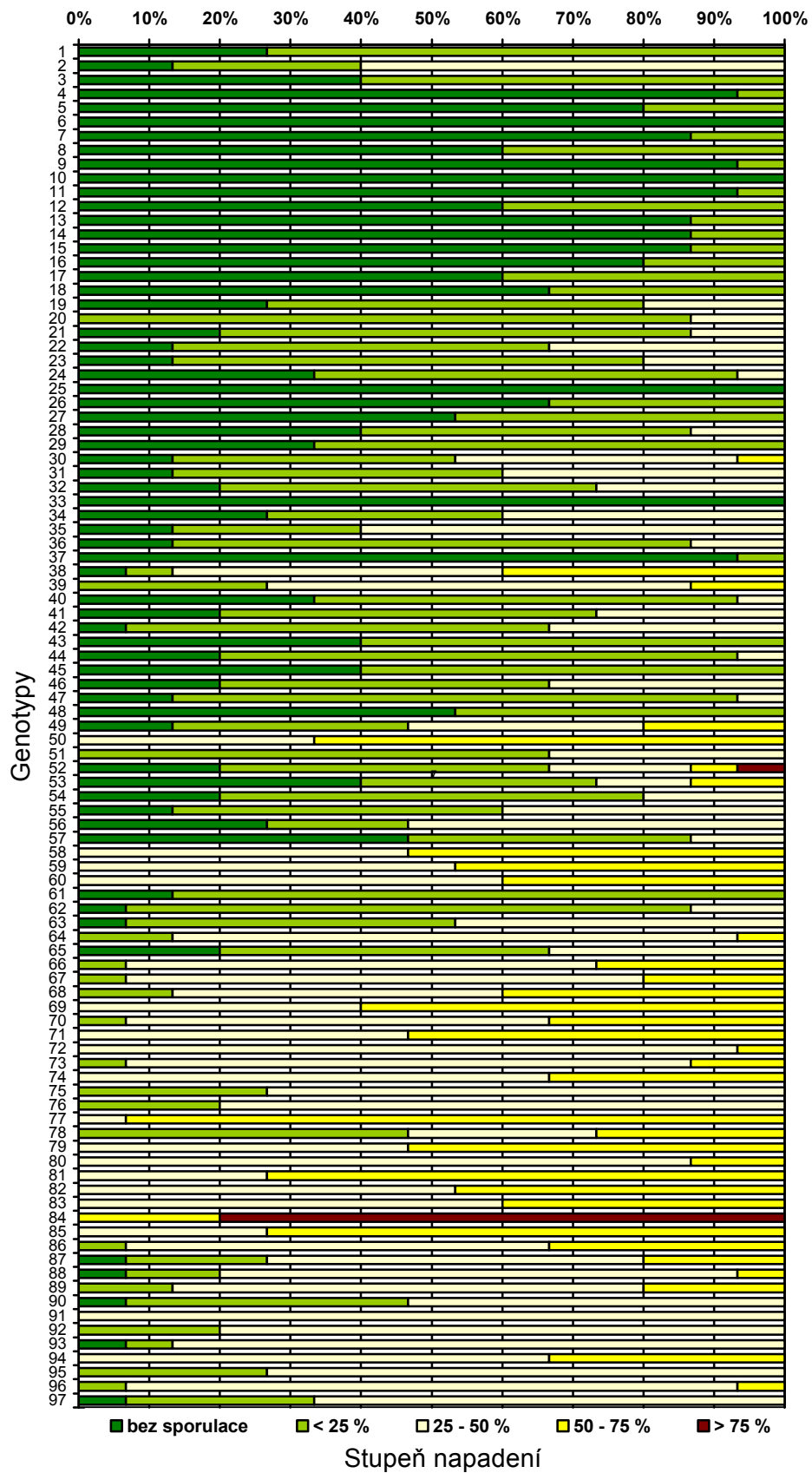
Patotypově (rasově) specifická interakce hostitele s *P. cubensis* byla dříve popsána také pro další variabilní druhy *Cucurbita* spp., konkrétně pro *C. maxima* a *C. moschata* (Lebeda a Widrlechner, 2003). O charakteru rezistence planých a plevných taxonů zastoupených v tomto experimentu však v dostupné literatuře neexistují téměř žádné zmínky. Z tohoto důvodu mohou být výsledky této analýzy velmi cenné pro další výzkum v této oblasti.



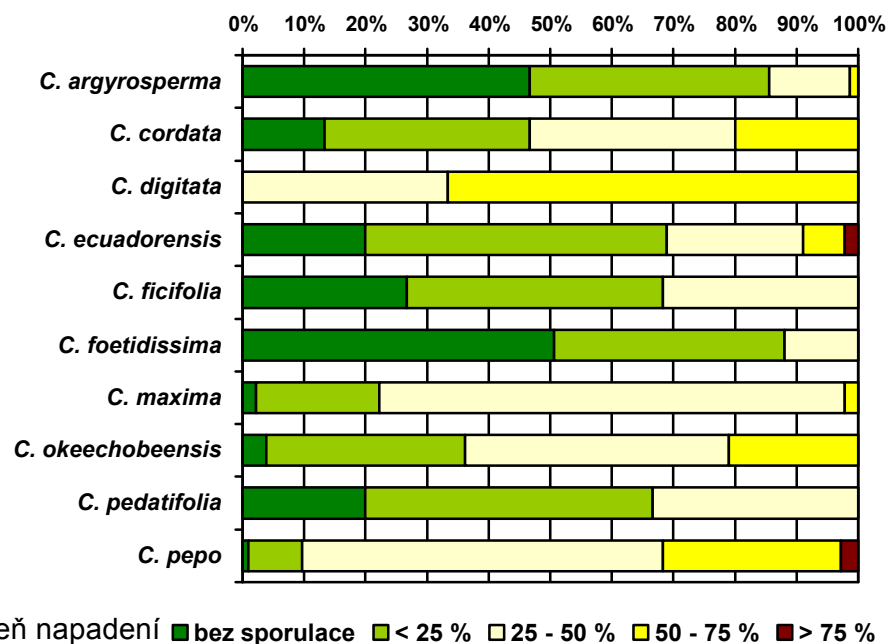
Graf 4a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/97, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



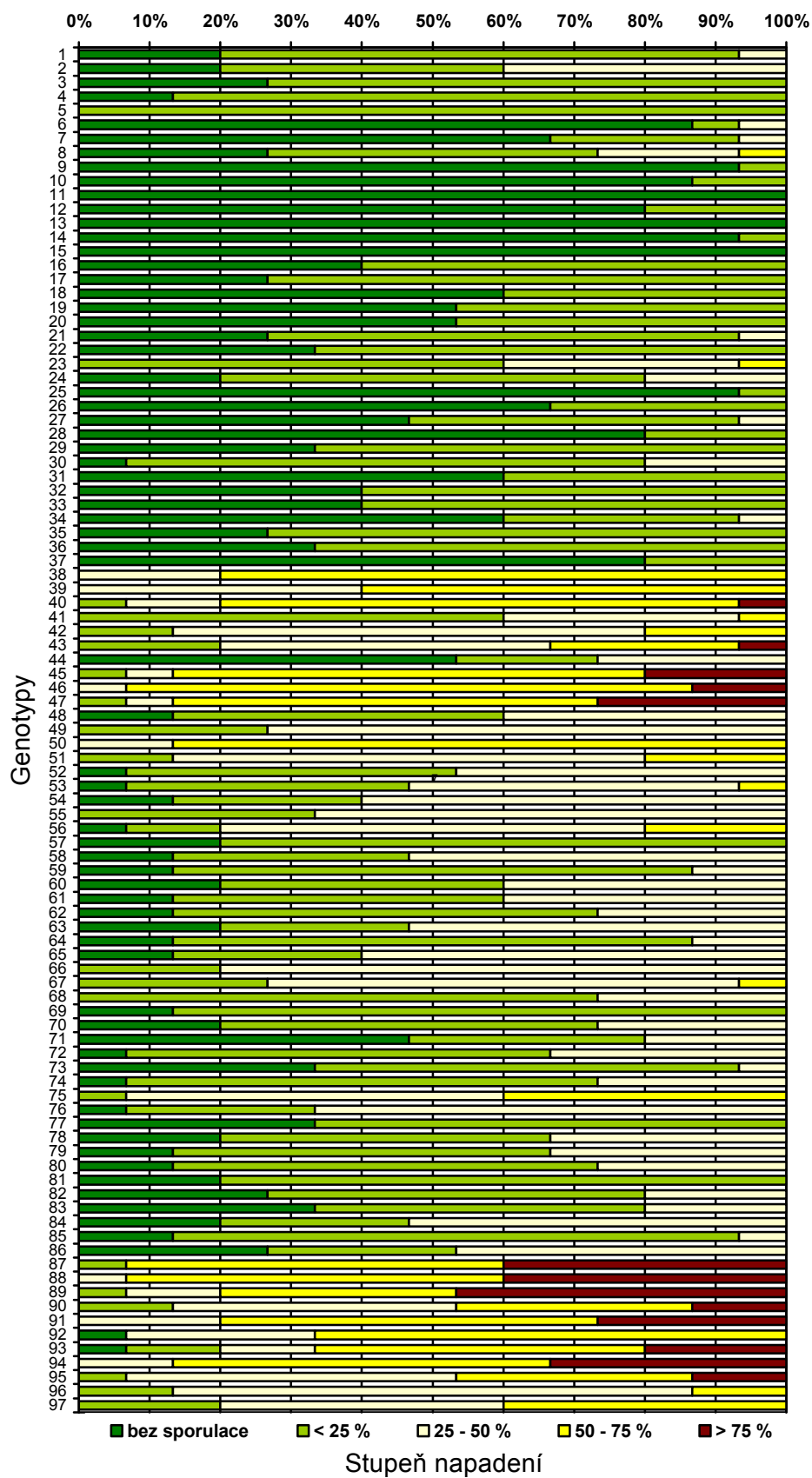
Graf 4b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/97, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



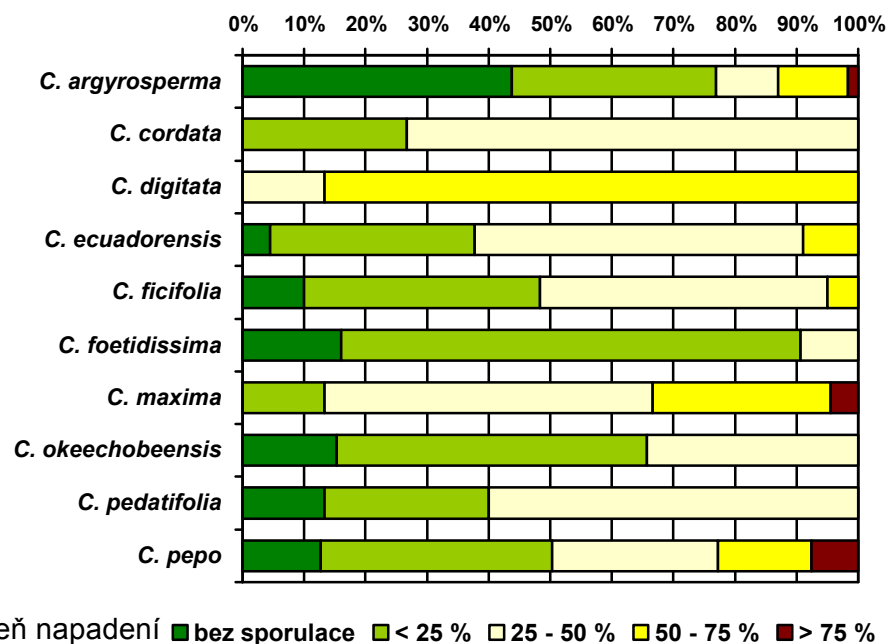
Graf 5a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/95, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



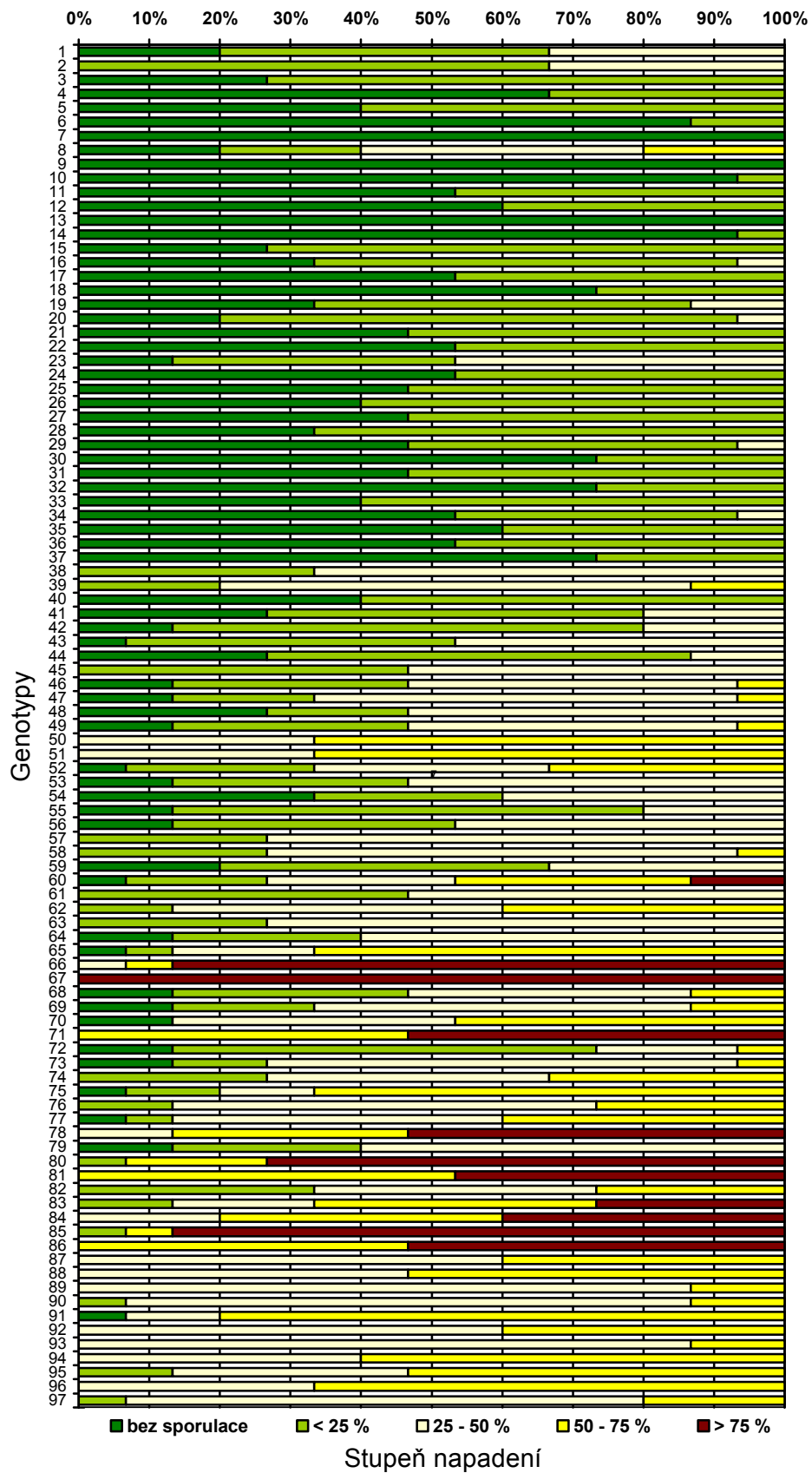
Graf 5b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/95, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



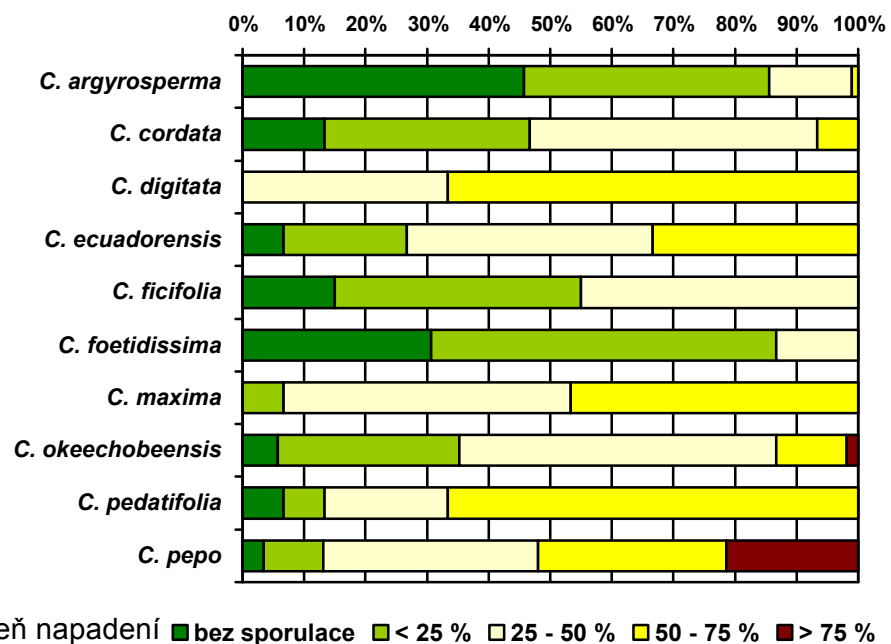
Graf 6a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



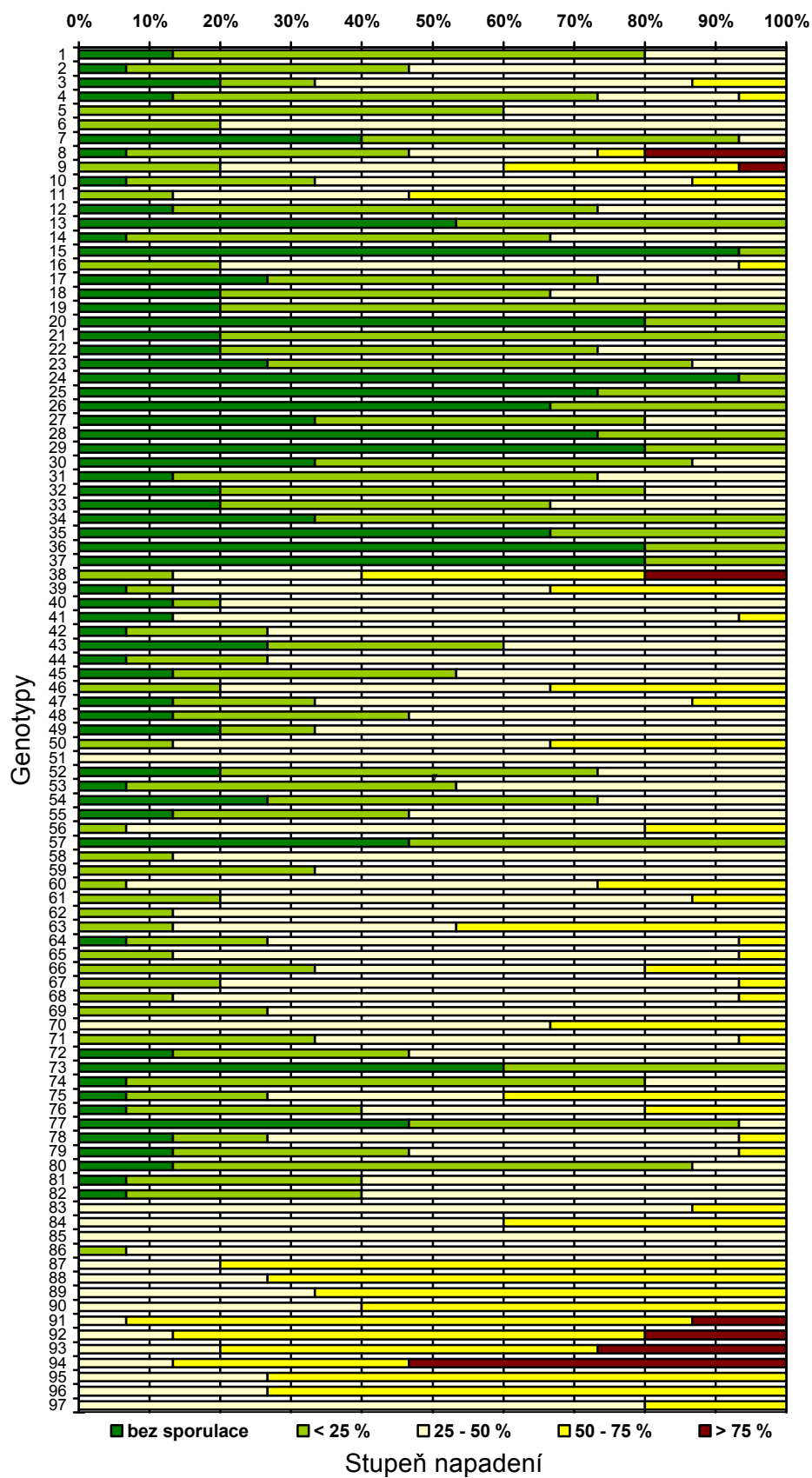
Graf 6b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



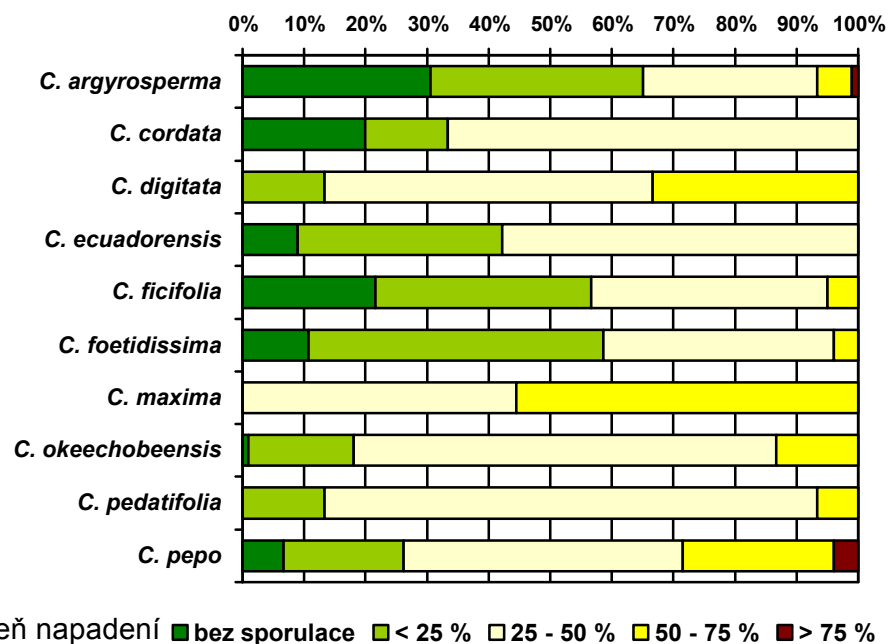
Graf 7a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



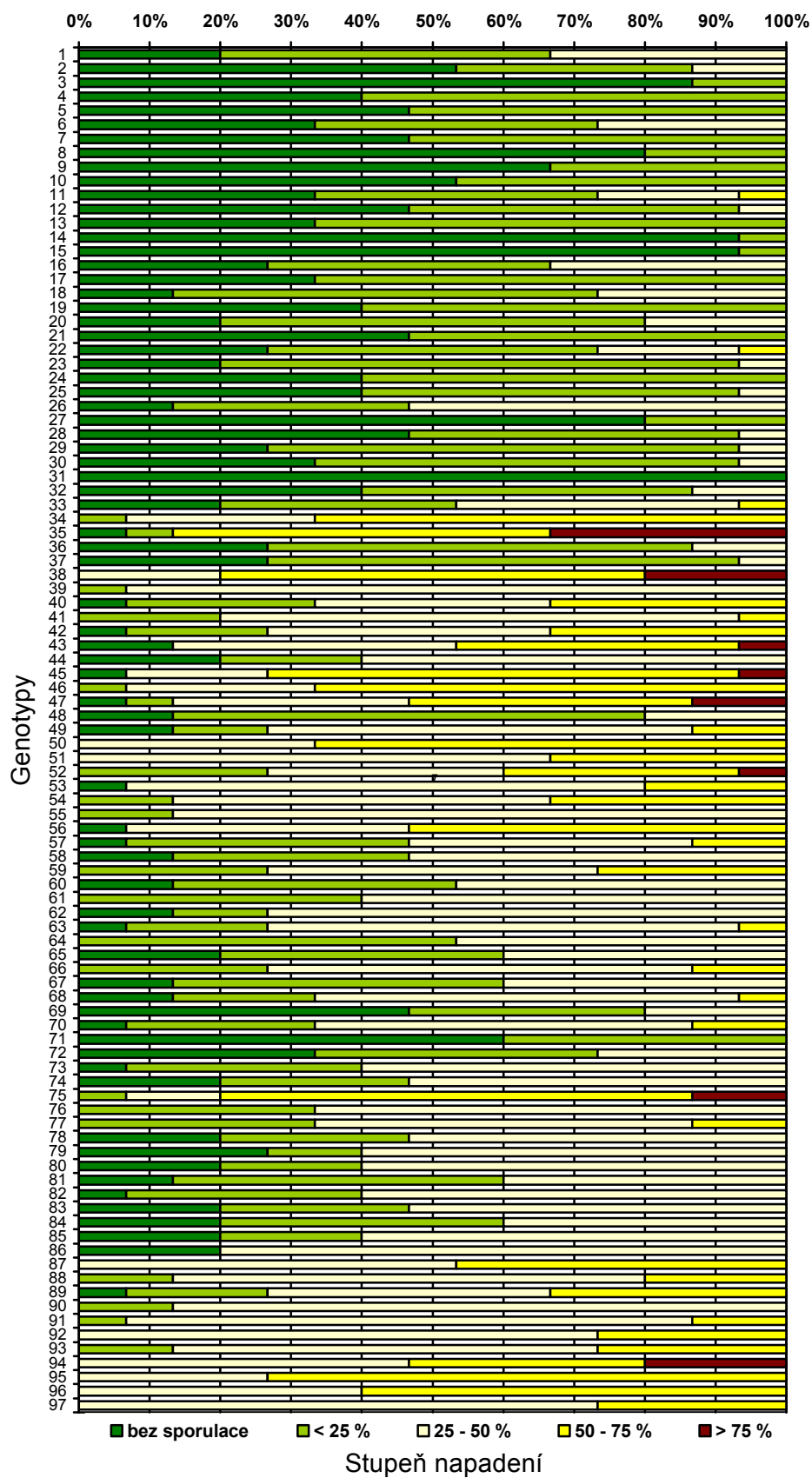
Graf 7b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



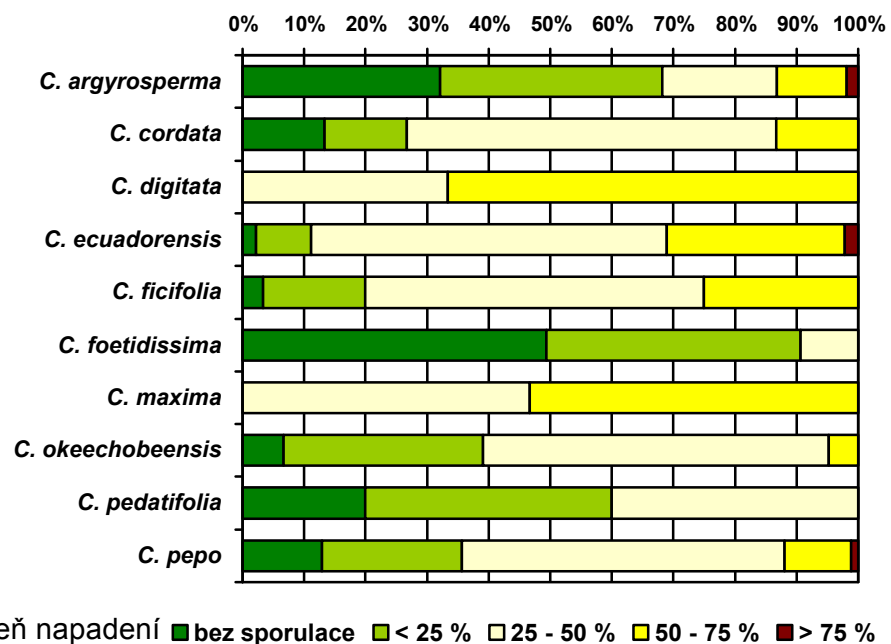
Graf 8a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 3/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



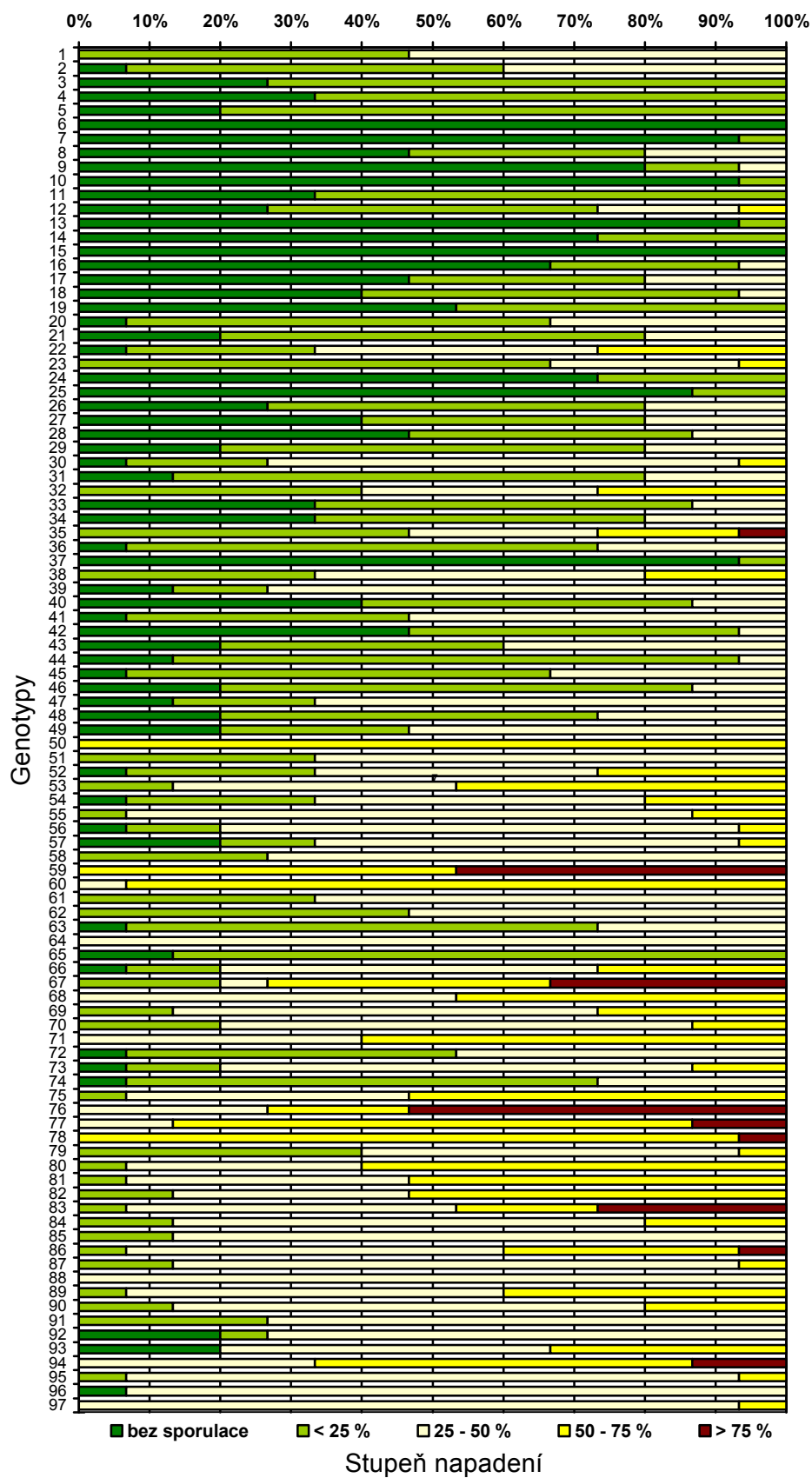
Graf 8b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 3/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



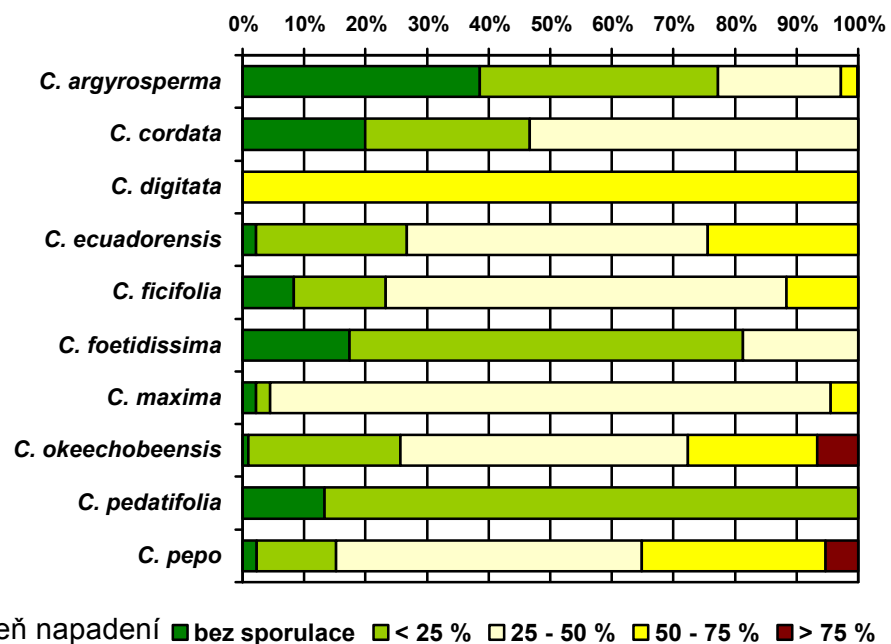
Graf 9a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 11/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



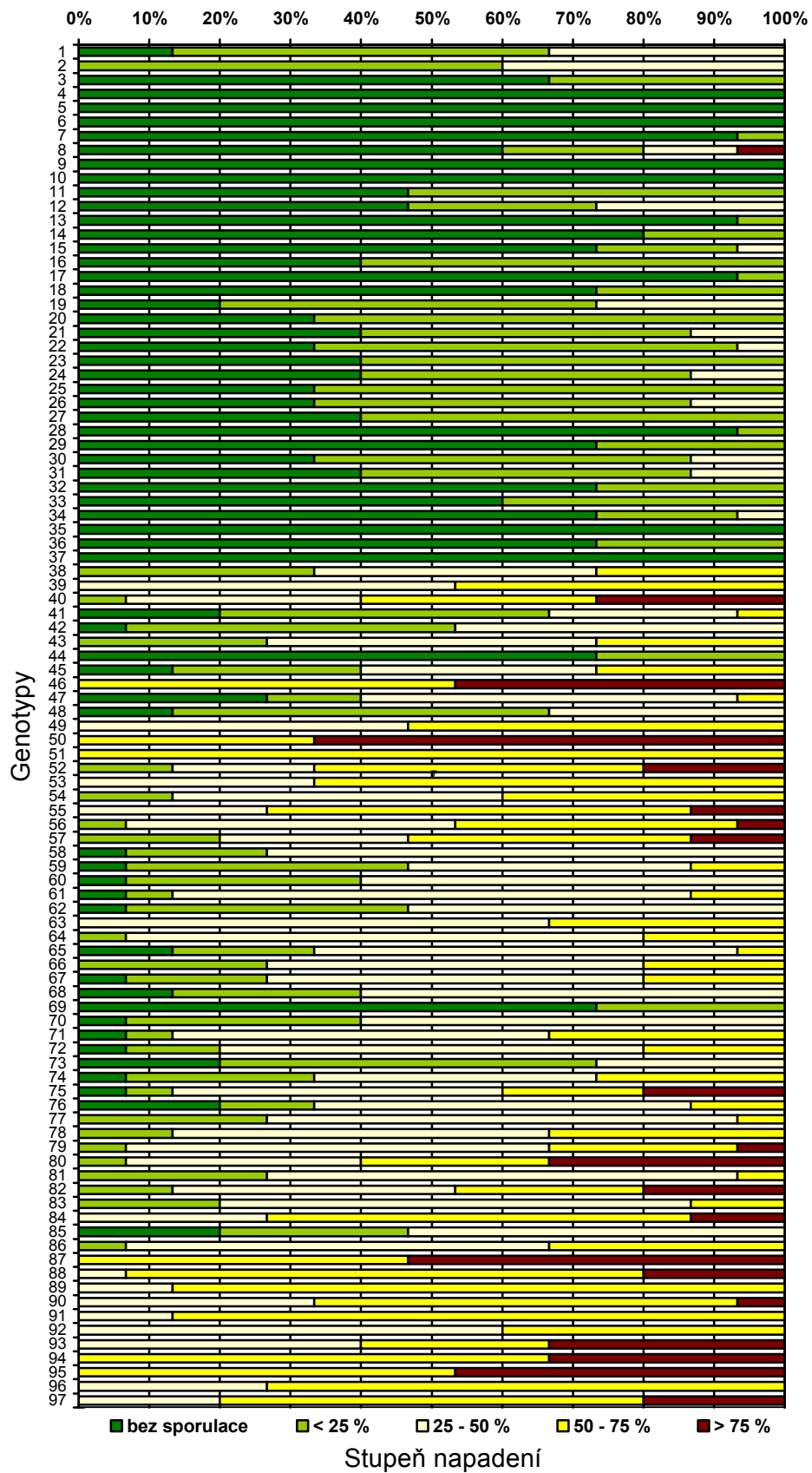
Graf 9b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 11/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



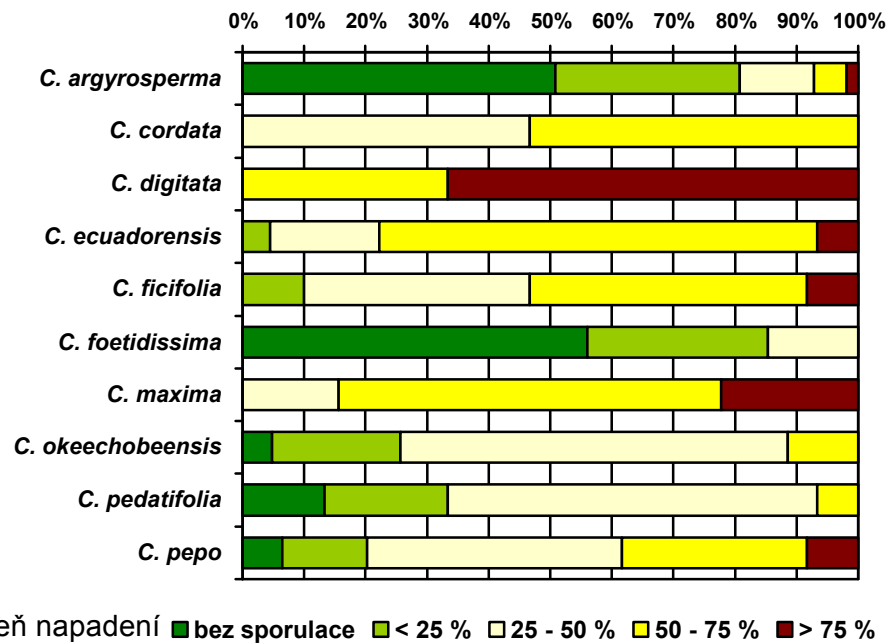
Graf 10a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 12/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



Graf 10b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 12/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.



Graf 11a: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 14/00, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucurbita* spp.



Graf 11b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 14/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

Tab. 5.1 Kvalitativní hodnocení reakcí genotypů *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis* (14 dpi); - = rezistentní reakce (DI = 0-35%), + = náchylná reakce (DI = 35,1-100%)

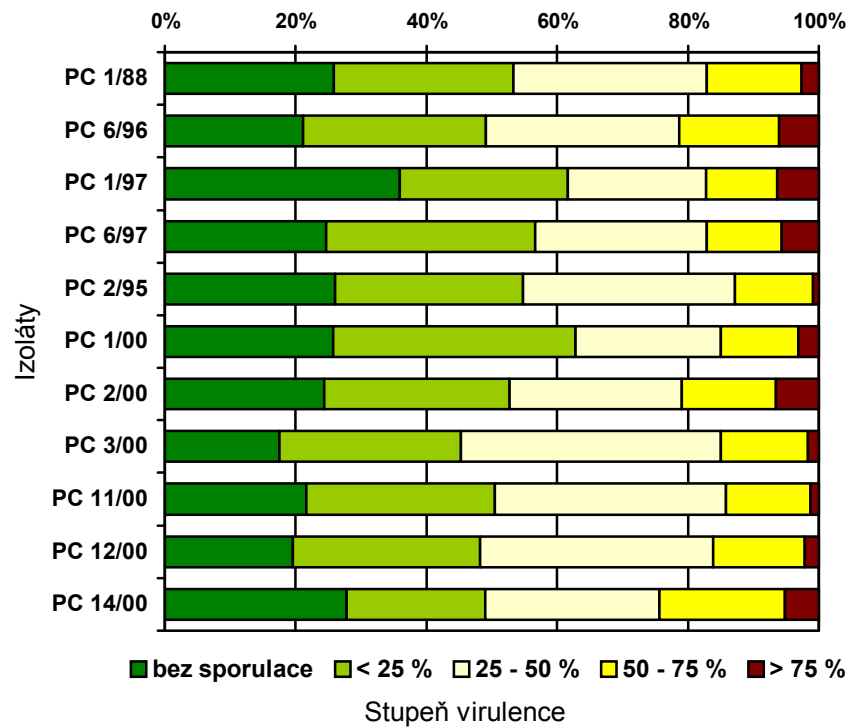
Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)										
	1/88	6/96	1/97	6/97	2/95	1/00	2/00	3/00	11/00	12/00	14/00
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
11	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
17	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
31	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
32	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
33	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
35	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
41	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
42	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
43	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
44	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
45	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
46	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
47	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
50	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

51	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
52	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
53	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
54	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
55	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
56	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
57	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
58	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
59	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
61	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
62	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
63	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
64	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
65	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
68	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
69	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
70	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
71	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
72	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
73	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
74	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
78	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
79	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
80	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
81	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
82	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
83	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
84	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
85	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
86	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

5.2 Patogenita izolátů *P. cubensis*

Každý z 11 izolátů *P. cubensis*, použitých k testování rezistence/náchylnosti (viz kap. 4.2), byl rovněž hodnocen z hlediska jejich virulence na souboru genotypů *Cucurbita* spp. (na základě frekvence různých stupňů napadení (0-4) listových disků testovaných genotypů, tj. celkem 1455 disků 97 genotypů *Cucurbita* spp.). Pro srovnání virulence reakcí jednotlivých izolátů 14. den po inokulaci byl sestaven graf (Graf 12), z něhož je podle zastoupení různých kategorií virulence zřejmý rozdíl ve virulenci použitých izolátů *P. cubensis*. Obecně lze soubor izolátů charakterizovat nízkým až středním stupněm virulence vzhledem k testovanému souboru *Cucurbita* spp. Odchytky lze pozorovat v četnosti úplné avirulence (0 resp. -) a úplné virulence (4 resp. +). Jako nejméně virulentní se ukázaly izoláty 1/97 a 1/00; naopak za izoláty s vyšším stupněm virulence lze označit 6/96, 6/97, 3/00, 12/00 a 14/00.

Pro objektivní posouzení virulence těchto izolátů je však nutné detailní studium jejich reakcí na diferenčních souborech tykvoovitých rostlin (viz Lebeda a Gadasová, 2002, Lebeda a Widrlechner, 2003), kde mezi nimi bylo rozlišeno 9 různých patotypů. Vysoká variabilita populací *P. cubensis* ve světě, projevující se v existenci velkého množství lokálních patotypů (Lebeda a Cohen, 2011; Salati et al., 2010; Shetty et al., 2002; Lebeda et al., 2012), musí být vážně brána v úvahu při šlechtění na rezistenci a ochraně tykvovitých plodin (Lebeda a Widrlechner, 2003). Tato skutečnost je zřejmá i v rámci Evropy, kde je patogen značně variabilní (Lebeda a Cohen, 2011; Call et al., 2012b), zejména pak mezi populacemi *P. cubensis* z České republiky (Lebeda et al., 2012).



Graf 12: Frekvence (%) různých stupňů virulence *P. cubensis* na základě jejich sporulace na listových discích *Cucurbita* spp. (14 dpi)

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je součástí dlouhodobého studia interakcí rostlin z čeledi Cucurbitaceae a patogenu *Pseudoperonospora cubensis* (plíseň okurková), realizovaného ve Fytopatologické laboratoři Katedry botaniky PřF UP v Olomouci (Lebeda a Cohen, 2011).

Ačkoliv za posledních 30 let došlo k výraznému pokroku ve výzkumu vlastností tohoto významného rostlinného patogenu (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Schwinn, 1994) a jeho výskytu na *Cucumis sativus* (okurka setá) (viz např. Call et al., 2012a; Granke a Hausbeck, 2011; Lebeda et al., 2011; Wehner a Shetty, 1997), studium jeho interakce s ostatními rody (a druhy) tykvovitých rostlin bylo a stále zůstává opomíjeno. Je to dáno zejména tím, že se dosud nerozvinula dostatečná mezinárodní spolupráce na tomto poli (Lebeda et al., 2006; Lebeda a Cohen, 2011).

Velká variabilita zástupců rodu *Cucurbita* (Lebeda et al., 2007) a jejich interakcí s *P. cubensis* byla potvrzena také současnou analýzou dat testování rezistence planých a plevelných taxonů *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis* z roku 2001 (Lebeda a Widrlechner, 2004). Dostatek rezistentních reakcí testovaných genotypů v rámci tohoto experimentu poskytuje možnost identifikace nových zdrojů rezistence, potřebných k dalšímu postupu ve šlechtění tykvovitých na rezistenci vůči *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Widrlechner, 2004). Rezistence, resp. náchylnost studovaného souboru *Cucurbita* spp. je rasově specifického charakteru (Lebeda a Widrlechner, 2004). Získané výsledky se nabízí k dalšímu uplatnění ve výzkumu a vzhledem k dosud nedostatečnému poznání interakce *Cucurbita* spp. - *P. cubensis* se jedná o velmi cenné poznatky.

7. LITERATURA

- Call, A. D., Criswell, A. D., Wehner, T. C., Ando, K. & Grumet, R. (2012a): Resistance of cucumber cultivars to a new strain of cucurbit downy mildew. *HortScience*, 47(2), 171-178.
- Call, A. D., Criswell, A. D., Wehner, T. C., Klosinska, U. & Kozik, E. U. (2012b): Screening cucumber for resistance to downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostov. *Crop Science*, 52, 577-592.
- Choi, Y. J., Hong, S. B. & Shin, H. D. (2005): A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data. *Mycological Research*, 109(7), 841-848.
- Chrtková, A. (1990): 62. Cucurbitaceae Juss. – dýňovitě. In: Hejtný, S. & Slavík, B. (eds.): *Květena České republiky, díl 2*. Academia, Praha, pp. 439-452.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A. J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., Nuez, F. & Picó, B. (2012a): High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait *loci* mapping. *BMC Genomics*. (doi:10.1186/1471-2164-13-80).
- Esteras, C., Nuez, F. & Picó, B. (2012b): Genetic diversity studies in cucurbits using molecular tools. In: Kole, C. (ed.): *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*. Science Publishers and Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 140-198.
- Ferriol, M., Picó, B. & Nuez, F. (2003a): Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 271-282.
- Ferriol, M., Picó, B. & Nuez, F. (2003b): Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 227-238.
- Gong, L., Paris, H. S., Nee, M. H., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J. & Lelley, T. (2012): Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 875-891.
- Granke, L. L. & Hausbeck, M. K. (2011): Dynamics of *Pseudoperonospora cubensis* sporangia in commercial cucurbit fields in Michigan. *Plant Disease*, 95(11), 1392-1400.

- Jeffrey, C. (1990): Systematics of the Cucurbitaceae: an overview. In: Bates, D. M. et al. (eds.): *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, pp. 3-7.
- Lebeda, A. (1990): Biologie a ekologie plísně okurkové (Biology and ecology of cucurbit downy mildew). In: Lebeda, A. (ed.): *Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew)*. Československá vědecká společnost pro mykologii při ČSAV (Czechoslovak scientific society for mycology by Czechoslovak Academy of Sciences), Praha, pp. 13-45.
- Lebeda, A. & Cohen, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)-biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 157-192.
- Lebeda, A. & Gadasová, V. (2002): Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and some other European countries. *Acta Horticulturae*, 588, 137-141.
- Lebeda, A. & Křístková, E. (1993): Resistance of *Cucurbita pepo* and *Cucurbita moschata* varieties to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). *Plant Varieties and Seeds*, 6, 109-114.
- Lebeda, A., Pavelková, J., Sedláková, B. & Urban, J. (2012): Structure and temporal shift in virulence of *Pseudoperonospora cubensis* populations in Czech Republic. *Plant Pathology*, (in press).
- Lebeda, A., Pavelková, J., Urban, J. & Sedláková, B. (2011): Distribution, host range and disease severity of *Pseudoperonospora cubensis* on cucurbits in the Czech Republic. *Journal of Phytopathology*, 159, 589-596.
- Lebeda, A. & Schwinn, F. J. (1994): The downy mildews-an overview of recent research progress. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 101(3), 225-254.
- Lebeda, A. & Urban, J. (2010): Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*), Chapter 18. In: Spencer, M. M. & Lebeda, A. (eds.): *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease*. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria, pp. 285-294. (ISBN 978-92-0-105110-3).
- Lebeda, A. & Widrlechner, M. P. (2003): A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(4), 337-349.

- Lebeda, A. & Widrechner, M. P. (2004): Response of wild and weedy *Cucurbita* L. to pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostov. (Cucurbit downy mildew). In: Spencer-Phillips, P. & Jeger, M. (eds.): *Advances in downy mildew research, Vol. 2*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 203-210.
- Lebeda, A., Widrechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J. & Křístková, E. (2007): Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.), Chapter 8. In: Singh, R. J. (ed.): *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series, Vol. 3 – Vegetable Crops*. CRC Press, Boca Raton, pp. 273-377.
- Lebeda, A., Widrechner, M. P. & Urban, J. (2006): Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. In: Holmes, G. J. (ed.): *Proceedings of Cucurbitaceae 2006*. Universal Press, Raleigh, North Carolina, USA, pp. 453-467.
- Mitchell, M. N., Ocamb, C. M., Grünwald, N. J., Mancino, L. E. & Gent, D. H. (2011): Genetic and pathogenic relatedness of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli*. *Phytopathology*, 101(7), 805-818.
- Ojiambo, P. S. & Holmes, G. J. (2011): Spatiotemporal spread of cucurbit downy mildew in the eastern United States. *Phytopathology*, 101(4), 451-461.
- Paris, H. S. (2001): History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Review*, 25, 71-170.
- Paris, H. S., Lebeda, A., Křístková, E., Andres, T. C. & Nee, M. H. (2012): Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 20(10), 1-20.
- Pasha, M. K. & Sen, S. P. (1991): Seed protein patterns of Cucurbitaceae and their taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19(7), 569-576.
- Runge, F. & Thines, M. (2012): Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis*. *Plant Disease*, 96(1), 55-61.
- Salati, M., Wong, M. Y., Sariah, M. & Masdek, H. N. (2010): Host range evaluation and morphological characterization of *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4897-4903.
- Sanjurjo, O. I., Piperno, D. R., Andres, T. C. & Wessel-Beaver, L. (2002): Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas

- of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 535-540.
- Savory, E. A., Granke L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Varbanova, M., Hausbeck, M. K. & Day, B. (2011): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular Plant Pathology*, 12(3), 217-226.
- Schaefer, H. & Renner, S. S. (2011): Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon*, 60(1), 122-138.
- Shetty, N. V., Wehner, T. C., Thomas, C. E., Doruchowski, R. W. & Vasanth Shetty, K. P. (2002): Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. *Scientia Horticulturae*, 94, 231-239.
- Smejkal, M. (1992): Systém a evoluce vyšších rostlin. In: Rosypal, S. et al. (eds.): *Fylogeneze, systém a biologie organizmů*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, pp. 205-350.
- Štěpánková, J. (2006): Rezistence genových zdrojů *Cucumis melo* vůči patotypům plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, katedra botaniky, vedoucí práce Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc., Olomouc, 118 p.
- Voglmayr, H., Piątek, M. & Mossebo, D. C. (2008): *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew disease on *Impatiens irvingii* in Cameroon: a new host for the pathogen. *New Disease Reports*, 18, 17.
- Ward, B. L., Anderson, R. S. & Bendich, A. J. (1981): The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell*, 25(3), 793-803.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. (1992): The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 4th March 2011. Dostupné na: <http://delta-intkey.com>.
- Wehner, T. C. & Shetty, N. V. (1997): Downy mildew resistance of the cucumber germplasm collection in North Carolina field tests. *Crop Science*, 37(4), 1331-1340.