

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici

Bakalářska práce

Lednice 2016

Tomáš Holka

Mendelova univerzita v Brně
Zahradnická fakulta v Lednici



Rezistencia viniča voči hubovým
chorobám - známe mechanizmy
a molekulárne základy

Bakalárska práca

Vedúci práce:
doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Vypracoval:
Tomáš Holka

Lednice 2016

Čestné prehlásenie

Prehlasujem že som túto prácu: Rezistencia viniča voči hubovým chorobám – známe mechanizmy a molekulárne základy vypracoval samostatne a všetky použité zdroje a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby bola moja práca zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác. Som si vedomý, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Zb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy a užitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského zákona. Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok až do jej skutočnej výšky na úhradu nákladov spojených so vznikom diela.

V Lednici dňa

Podpis:

PodĎakovanie

Týmto by som rád poĎakoval môjmu vedúcemu bakalárskej práce, ktorým je doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D., za priebežné konzultácie, rady a pripomienky pri tvorení tejto bakalárskej práce. Ďalej ďakujem svojej rodine a priateľom za podporu.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cieľ práce	8
3	Pôvod a klasifikácia druhu <i>V. vinifera</i> L.	9
4	Peronospóra viniča (<i>Plasmopara viticola</i>)	11
4.1	Životný cyklus peronospóry viniča	11
5	Múčnatka viniča (<i>Erysiphe necator</i>)	13
5.1	Životný cyklus múčnatky viniča	13
6	Pleseň sivá (<i>Botrytis cinerea</i>)	15
6.1	Životný cyklus plesne sivej	15
7	Mechanizmus rezistencie viniča	17
7.1	Odolnosť viniča voči peronospóre	18
7.1.1	Mechanizmus odolnosti viniča voči peronospóre	18
7.1.2	Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť viniča k peronospóre.	23
7.1.3	Zdroje odolnosti k peronospóre viniča	23
7.2	Odolnosť viniča voči múčnatke	26
7.2.1	Mechanizmus odolnosti viniča voči múčnatke.....	26
7.2.2	Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť k múčnatke viniča.....	27
7.2.3	Zdroje odolnosti k múčnatke viniča	27
7.2.4	Gény citlivosti k múčnatke viniča	31
7.3	Odolnosť viniča voči plesni sivej.....	31
7.3.1	Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť viniča k plesni sivej ..	33
8	Indukovaná rezistencia u citlivých odrôd viniča	34
8.1	Obranné reakcie indukované elicitorami	35
9	Využitie súčasnej úrovne poznania v praxi	36
9.1	Šľachtenie odrôd viniča odolných k hubovým patogénom.....	36
9.2	Selekcia za asistencie markerov (MAS)	38
9.3	Pyramiding génov rezistencie	39
9.4	Elicitory pôsobiace na odolnosť viniča.....	43

10	Záver.....	46
11	Súhrn a Resume.....	47
12	Zoznam použitej literatúry	48
13	Zoznam použitých obrázkov a tabuliek.....	52

1 Úvod

Múčnatka (*E. necator*), peronospóra (*P. viticola*) a pleseň sivá (*B. cinerea*) sú agenti hlavných a najviac rozšírených hubových chorôb viniča hroznorodého (*V. vinifera*), ktoré často spôsobujú významné ekonomické straty vo vinohradníckych podnikoch na celom svete (viď kap. 4, 5 a 6). Aby pestovatelia týmto stratám predišli, využívajú programy pravidelnej chemickej ochrany na báze fungicídov. To má ekonomické nevýhody a navyše negatívny vplyv na životné prostredie a zdravie človeka. V rámci koevolúcie s patogénom si niektoré severoamerické a ázijské divoké druhy viniča vybudovali mechanizmy odolnosti voči týmto chorobám (viď kap. 3), ktoré v rôznej miere bránia úspešnej infekcii a ďalšiemu vývoju choroby. Bližšie študovanie týchto mechanizmov, ako aj ich genetického pozadia (viď kap. 7) môže byť využité v šľachtiteľských programoch zameraných na šľachtenie odrôd nesúcich znaky odolnosti k týmto patogénom. Kvôli nedostatočnej kvalite plodov Amerických a Ázijských druhov viniča, sú tieto druhy nevhodné k výrobe vína či hrozna, avšak disponujú spomínanými vlastnosťami rezistencie. To je dôvod, prečo cieľom rôznych šľachtiteľských programov je vývoj nových variet viniča s kombináciou vlastností dobrej kvality hrozna a odolnosti voči hubám, za použitia genetických zdrojov divokých druhov viniča. Viac než sto rokov úsilia viedlo k náležitému úspechu, čoho výsledkom sú nové odrody s profilom dobrej kvality a značným stupňom rezistencie voči múčnatke a peronospóre. Dlhý generačný cyklus viniča a časové i priestorové nároky na jeho pestovanie, ako aj nedostatok vedomostí o dedení dôležitých znakov poukazuje na enormné úsilie vložené do tohto procesu. Nedávny úspech v genetickom výskume viniča, ako je vývoj genetických máp, identifikácia lokusov kvantitatívnych znakov (QTL) dôležitých vlastností, vývoj molekulárnych markerov vo väzbe s týmito znakmi a sekvenovanie rôznych genómov predstavuje nádej pre lepšie a účinnejšie využitie zdrojov rezistentných druhov viniča v šľachtiteľských programoch (viď kap. 9).

2 Cieľ práce

Cieľom práce bolo zhromaždiť dostupné informácie o mechanizmoch rezistencie viniča hroznorodého voči hlavným hubovým patogénom, a to *P. viticola*, *E. necator* a *B. cinerea*. Vyhodnotiť možnosti umelej indukcie týchto mechanizmov na citlivých odrodách, ako aj využitie odrôd so znakmi odolnosti v šľachtení odrôd viniča rezistentných k daným patogénom.

3 Pôvod a klasifikácia druhu *V. vinifera* L.

Vinič hroznorodý (*V. vinifera* L.) sa vyvíjal v niekoľkých rôznych oblastiach sveta, čo viedlo k vzniku rôznych druhov. Pôvod pestovania *V. vinifera* L. je pravdepodobne južný Kaukaz, dnes zahŕňajúci severozápad Turecka, sever Iraku, Azerbajdžan a Gruzínsko. S počiatku bolo hrozno (*V. vinifera* ssp. *sativa*) zbierané v divočine, z úponkov rastúcich k vrcholu stromov. Spojitosť hrozna s dubom, dnes používaná vo vinárstve vo forme sudov v ktorých víno zreje, mohla prísť s viničom, ktorý používal dub ako oporu, nakoľko kvasinky druhu *S. cerevisiae* boli z dubu izolované.

Z botanického hľadiska je vinič drevnatá liana. Vinič netvorí pevný kmeň ako stromy, ale pre svoju oporu využíva kmene rastlín už vyskytujúcich sa v lesoch či buši. V prirodzených podmienkach sa vinič úponkami zachytáva iných rastlín až prerastá ich vrchol, čím sa dostáva do vrchnej časti svojho biotopu, kde môže efektívne asimilovať slnečné žiarenie. Vyzreté plody divokého viniča sú tmavo sfarbené bobule, ktoré konzumujú obzvlášť vtáky a tak šíria semená.

Na stonke klíčiaceho semena môžeme pozorovať dva kľúčne listy, čo je dôvodom, prečo vinič radíme do taxonomickej skupiny *Dicotyledonopsida*, ako väčšinu listnatých rastlín. Plod viniča je bobuľa obsahujúca semeno. Z tohto hľadiska je teda rastlina krytosemenná (*Angiospermae*). Vinič patrí k čeľadi *Vitaceae*, čo sú drevnaté, zväčša popínavé rastliny. Charakterizuje ich tvorba úponkou a kvetenstiev oproti listu. Rod *Vitis* L. delíme na dva podrody, a to *Euvitis* a *Muscadinia*. Jedna zo zvláštností tohto rodu je, že kališné lístky sa zrastajú v tzv. čiapočku. Podrody sa odlišujú počtom chromozómov (38 pri *Euvitis* a 40 pri *Muscadinia*) a morfológickými znakmi. Rozlišujeme tri druhy podrodu *Muscadinia* : *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* a *V. popenoei*. Kvôli odlišnému počtu chromozómov sa rastliny tohto podrodu nedajú prirodzene krížiť s druhmi *Euvitis*. Avšak, použitím techník tkanivovej kultúry, bolo kríženie uskutočnené. Tento fakt môže byť významný z hľadiska produkcie viniča so zvýšenou rezistenciou voči chorobám alebo s iným žiadaným znakom (Creasy a Creasy 2009).

Druhy podrodu *Euvitis* delíme do troch skupín podľa miesta ich pôvodu, a to na: severoamerickú, východoázijskú a euroázijskú. Z pestovateľského hľadiska je najvýznamnejšou skupinou euroázijská. Práve k nej druh *V. vinifera* L. radíme. Je druhom najrozšírenejším a delí sa na dva poddruhy. Prvým je ušľachtilý vinič – *Vitis*

vinifera ssp. *vinifera* (alebo *sativa*). Druhý poddruh predstavuje divoká forma, vinič lesný – *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*. Navzájom sa odlišujú morfológickými znakmi.

Severoamerická skupina predstavuje asi 30 druhov, niektoré sú hospodársky významné. Väčšina ich dlhodobo rastie v neustálom kontakte s pôvodcami peronospóry (*Plasmopara viticola*), múčnatky (*Erysiphe necator*) a fyloxérou (*Dactulosphaera vitifoliae*). V priebehu evolučného vývoja si preto tieto druhy vytvorili proti uvedeným chorobám a fyloxére mechanizmy rezistencie. Hybridy pôvodne pestované v USA vznikli z *V. labrusca*. Moderné šľachtenie odrôd so zvýšenou rezistenciou k hubovým chorobám využíva americké druhy *M. rotundifolia*, *V. berladnieri*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. cinerea* a *V. aestivalis*.

Jedno z hlavných génových centier ázijských druhov predstavuje Čína. Ázijské druhy *Vitis* spp. sa vyznačujú pozitívnymi vlastnosťami vrátane rezistencie k hubovým chorobám. Z Číny pochádza viac než 35 druhov. Významným ázijským druhom je *V. amurensis*, keďže je genetickým zdrojom vysokej mrazuvzdornosti a tiež odolnosti voči *P. viticola* (Pavloušek 2011).

Je zrejme, že americké divoké druhy viniča endemické k miestu pôvodu hubových chorôb, ako je peronospóra a múčnatka sa vyznačujú vlastnosťami rezistencie, toto však pozorujeme aj na divokých druhoch viniča pôvodom z Ázie. Ako už bolo spomenuté, odolnosť amerického divokého viniča sa pravdepodobne vyvinula v rámci koevolúcie rastliny s hubou, čo ale nemôže byť dôvodom zdroja rezistencie k týmto patogénom divokých druhov viniča z Ázie. To by mohlo naznačovať, že ázijské druhy disponujú iným mechanizmom rezistencie ako druhy pôvodom z Ameriky (Eibach 2010). Avšak nedávne výskumy demonštrovali, že divoké čínske druhy viniča sú takisto významným zdrojom major dominantných R-génov odolnosti k múčnatke. Existencia R-génov odolnosti proti múčnatke v druhoch viniča pôvodom z Číny a Strednej Ázie by mohlo vypovedať proti súčasnej dogme, že tento patogén pochádza zo Severnej Ameriky a rozšíril sa do všetkých regiónov pestovania viniča z tohto jedného zdroja. Viac pravdepodobný sa zdá byť výrok, že izoláty *E. necator* existovali v Číne a Strednej Ázii omnoho dlhšiu dobu, ako sme si pôvodne mysleli, čo by vysvetľovalo vývoj R-génov u divokých druhov viniča z týchto oblastí (Qiu et al. 2015). Podobný predpoklad nájdeme pre rezistenciu voči *P. viticola* objavenú u ázijských druhov, ako je *V. amurensis*, ktorá sa mohla vyvinúť ako odolnosť voči *P. cissii* a *P. amurensis*, ktoré sú v Ázii endemické (van Heerden et al. 2014).

4 Peronospóra viniča (*Plasmopara viticola*)

Plasmopara viticola (Berk. et Curt.) Berl. et deToni je obligátny biotrofný parazit žijúci na druhoch *Vitis* spp.. Tento patogén je pôvodom zo S. Ameriky, kde žil na tamojších divokých druhoch viniča. V Európe bol prvýkrát pozorovaný v roku 1878. Do Európy sa pravdepodobne dostal na odrezkoch viniča, ktorými boli obnovované vinohrady vo Francúzku zničené epidémiou fyloxéry (*Daktulosphaera vitifoliae* Fitch). Choroba sa rýchlo rozšírila do ďalších vinohradníckych oblastí Európy a spôsobila významné ekonomické straty (Gessler et al. 2011). Dnes sa v Strednej Európe považuje za významnú a takmer každoročne sa vyskytujúcu chorobu viniča (Šafránková 2007).

P. viticola radíme k triede *Oomycota*, čo sú hubám podobné eukaryotické mikroorganizmy, vyjadrujúc odlišnosť od organizmov ríše *Fungi*. Hlavné rozdiely sú v zložení bunkovej steny, ktorá primárne obsahuje celulózu a nie chitín, takisto medzibunkové septum nájdeme len v staršom mycéliu, ktoré je koenocytické. Vo vegetatívnom stave je jadro oomycét diploidné, zatiaľ čo pri askomycétach haploidné. *P. viticola* tvorí pohyblivé zoospóry disponujúce dvoma bičíkmi (Gessler et al. 2011).

4.1 Životný cyklus peronospóry viniča

P. viticola prezimuje vo forme oospór v opadnutom listí. Oospóry vznikajú oplodnením oogónia antherídiom, čo môžeme pozorovať koncom júla v mezofyle listu (Burruano 2000). Produkciu oospór neovplyvňuje teplota, ale zdá sa, že sú prednostne tvorené za podmienok sucha, keď je sporulácia potlačená, alebo pri senescencii listov. Oospóry zrejú počas zimy a len zrelé oospóry začnú na jar (10 °C, dostatočná vlhkosť pôdy), po kontakte s vodným filmom rapídne klíčiť. Za koniec procesu klíčenia považujeme prítomnosť primárneho zoosporangia (makrosporangium). Vo chvíli, keď sa makrosporangia dostanú na povrch listu v kvapke vody, alebo prenesené vetrom, sú vypustené zoospóry. Predpokladá sa, že podmienky nutné pre infekciu sú podobné, ak nie rovnaké, ako podmienky pre infekciu zoospórami uvoľnenými zo sekundárneho sporangia. Nedávny výskum odhalil, že patogén nebol schopný infekcie po inokulácii iba hornej strany listu, pričom inokulácia spodnej strany viedla, vo väčšine prípadov ku vzniku symptómov. Z mikroskopických pozorovaní bolo vyvedené, že zoospóry sú schopné plávať k prieduchu, usídlieť sa v jeho blízkosti, vyklíčiť a vniknúť do listu prieduchom v priebehu 3 h, pri teplote 20°C. To viedlo k poznatku, že peronospóra je schopná infekcie jedine prostredníctvom prieduchov (Gessler et al. 2011).

Po inokulácii na abaxiálnej strane povrchu listu zoospóry klíčia a tvoria klíčne vlákno, ktoré prerastá prieduchom rastliny. Následne sa vytvára substomatálny mechúrik, z ktorého vzniká intercelulárne mycélium s množstvom haustória penetrujúceho bunkové steny mezofylu. Za podmienok vysokej vlhkosti vlákno hýf prerastá substomatálnu dutinu, čo predchádza tvorbe sporangiofórov vystupujúcich prieduchom (vid' Obr. 2). Proces mitózy má za následok zrelé sporangiá obsahujúce až 7 jadier. Sporangia sú schopné vylúčiť životaschopné zoospóry za 14 hodín kontaktu s vodou. Od 16 do 24 hodín sa počet zrelých sporangií zvyšuje, zatiaľ čo čas potrebný pre uvoľnenie zoospór sa znižuje na 40-50 minút vo vode (Burruano 2000).

5 Múčnatka viniča (*Erysiphe necator*)

Erysiphe necator Schw. [syn. *Uncinula necator* (Schw.) Burr., anamorfa *Oidium tuckeri* Berk.] je obligátna biotrofná huba, radená do kmeňa *Ascomycota*. Pôvodom zo Severnej Ameriky sa do Európy rozšírila v roku 1845 (Anglicko). Múčnatka je špecializovaný parazit, žijúci na niekoľkých rodoch čeľade *Vitaceae*, a to *Vitis*, *Cissus*, *Parthenocissus* a *Ampelopsis* (Gadoury et al. 2012).

5.1 Životný cyklus múčnatky viniča

E. necator sa množí hlavne nepohlavne konidiospórami, ktoré sú šírené vetrom. Mycélium prezimuje v očku dormujúcej rastliny a po jeho vypučaní porastá mladé letorasty a listy. Na mycéliu sa tvoria konidiofóry s konídiami, ako zdroj primárnej infekcie (Šafránková 2007). Za priaznivých klimatických podmienok spóra klíči na fotosynteticky aktívnom pletive a tvorí apresórium. Klíčenie zahŕňa vylučovanie lytických enzýmov ako sú lipázy, esterázy a kutinázy, čo vedie k uvoľňovaniu derivátov mastných kyselín, ktoré podporujú klíčenie a ďalší vývoj. Zo spodnej strany apresória vyrastá penetračný hrot, ktorý prekonáva bunkovú stenu a narúša epidermálnu bunku, kde formuje haustórium (viď Obr. 4). Haustórium je špecializovaný intracelulárny útvar, tvoriaci rozhranie medzi hubou a hostiteľom, pričom zabezpečuje dynamickú výmenu molekúl medzi ich bunkami. Huba takto získava hexózy, aminokyseliny, vitamíny a ďalšie živiny, zatiaľ čo zároveň vylučuje proteíny na potlačenie obrany hostiteľa. Ak je založenie haustória a príjem živín úspešný, huba sa šíri ďalej po povrchu formou hýf a tvorí ďalšie apresória a haustória v pravidelných intervaloch. Po 5-25 dňoch nastáva sporulácia vo forme konidiofórov, rastúcich kolmo ku epidermis, kde sú produkované konídie, nepohlavné spóry, zodpovedné za sekundárnu infekciu (Qiu et al. 2015).

Prezimovanie múčnatky v zimných očkách nie je v chladnejších vinohradníckych regiónoch možné pozorovať, čo je spájané so zníženou mrazuvzdornosťou infikovaných očiek. Avšak je takisto možné, že patogén sám o sebe nie je schopný prežiť príliš nízke teploty na pletive dormantných očiek v tejto etape vývoja. Vo väčšine vinárskych regiónov huba prezimuje tiež vo forme kleistothécia, ako ďalší zdroj primárneho inokula v oblastiach, kde prezimovanie v očkách hostiteľa je bežné a hlavným a jediným zdrojom v oblastiach, kde to podmienky nedovoľujú. Kleistothécia sa primárne formujú na listoch, ale tiež na bobuliach a letorastoch vo

chvíli, keď závažnosť ochorenia dosahuje úrovne, kedy je možné párenie kompatibilných pohlavných typov na tom istom pletive. *E. necator* sa vyznačuje bipolárne heterotalickým systémom pohlavnej reprodukcie. Za optimálnej teploty je kleistothécium iniciované 24 h od kontaktu medzi hýfami kompatibilných pohlavných typov. Na jar dažďom, závlahou, alebo hmlou ovlhčené askokarpy uvoľňujú askospóry, ktoré sú schopné klíčiť pri teplote 10 °C (Gadoury et al. 2012).

6 Plesň sivá (*Botrytis cinerea*)

Botrytis cinerea Pers. [teleomorfa *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel] je nekrotrofická huba z oddelenia *Ascomycota* so širokým spektrom hostiteľov vrátane rastlín z mnoho odlišných rodov a čeľadí. Geograficky sa patogén vyskytuje po celom svete, kdekoľvek je vhodný hostiteľ pestovaný (Spies 2005; Šafránková 2007).

(Elad et al. 2007) vo svojej knihe opisujú plesň sivú, ako neobyčajne premenlivú hubu v zmysle variácií morfologicky vzdialených kultúrnych typov. Zvyčajne sú delené na myceliálne, sporulujúce (konídické) a sklerociálne, avšak vieme rozlíšiť aj podskupiny. Zvyčajne sú takéto morfotypy relatívne stabilné, keď pochádzajú z hromadného inokula, no subkultúry z jednej konídie sú často odlišné od rodičov, aj medzi sebou. Je zrejmé, že mycéliá, skleróciá a konídie majú rozdielnu schopnosť prežiť a šíriť sa a zodpovedajúce role týchto štruktúr sa budú významne líšiť, vzhľadom na ekosystém a ročné obdobie. Tento duálny výskyt by mohol byť výsledkom rušivej prirodzenej selekcie, keď napr. sklerociálne typy obľubujú drevnatých hostiteľov v období zimy a typy konídiálne jednoročných hostiteľov s hojným počtom infikovateľných kvetov (viď Valiuškaitė et al. 2010; Martinez et al. 2003).

6.1 Životný cyklus plesne sivej

Huba existuje v rôznych lokalitách, ako mycéliá, mikro- a makrokonídie, chlamydo-spóry, skleróciá, apothécia a askospóry a tie sa šíria rôznym spôsobom. Generalizovaný cyklus vývoja *B. cinerea* zahŕňa viac štádií a to: somatické (vegetatívne), myceliálny systém produkujúci asexuálne konídie (makrokonídie), skleróciá a mikrokonídie (spermacium) a štádium pohlavné vo forme apothécii a askospór. Pred úspešnou infekciou si musí patogén vydoberať priestor, to znamená presunúť sa z primárneho zdroja a pristáť na vhodnom pletive. Každá časť stielky tejto huby môže slúžiť ako jednotka šírenia. Tieto propagule sú šírené vetrom, dažďom a hmyzom. V dažďovej kvapke konídia na vhodnom hostiteľovi tvorí kľúčne vlákno 1-3 hodiny po inokulácii. Kľúčne vlákno obyčajne tvorí protoapresorium, priehľadné kľúčne vlákno priľnuté k hostiteľovi, na ktorého vrchole sa vytvára penetračný hrot. Po 6 hodinách (10-15 μm dlhé kľúčne vlákno) tvorí huba jednoduché apresória. Ak sú k dispozícii oxogénne živiny, huba tvorí infekčné vankúše a ďalšie multiceulárne štruktúry.

Po infekcii a smrti hostiteľského pletiva je *B. cinerea* schopná prežiť a sporulovať, ako saprofyt na nektrotickom pletive, alebo vytvoriť dlhodobu prežívajúcu štruktúru, ako sú skleróciá. Tieto štruktúry môžu byť spojené s telom živých rastlín, alebo s r. zvyškami na pôde, alebo v nej pochovaných. Skleróciá sú schopné prežiť nepriaznivé environmentálne podmienky a zvyčajne klíčia za účelom produkcie mycélia, alebo konídií. Avšak za vhodných podmienok a po oplodnení môžu formovať apothéciá (štádium teleomorfy *Botryotinia fickeliana*), ktoré obsahujú askospóry, ako výsledok meiózy. Väčšina izolátov *B. cinerea* je heterotalických, nesú jednu alebo druhú alelu génu pohlavných typov. Toto pohlavné štádium je však v poľných podmienkach len zriedkavé. Formácia sklerócií v prírode je obvyčajne spojená s rastlinným pletivom. Ale huba je schopná vyvíjať sa aj v tele hmyzu. Bol objavený dlhodobý vzťah medzi druhmi *Drosophila melanogaster* a *B. cinerea* počas života tohto dvojkrídlovca. Konídiá vyklíči v prednom čreve octovej mušky, vyvinie sa v mycélium, z ktorého sa diferencujú mikroskleróciá, tie môžu byť nesené muchou počas jej celého života. Keďže *D. melanogaster* prezimuje, ako dospeliec bolo usúdené, že by mohla hrať úlohu v zimnej konzervácii inokula *B. cinerea*. Ako vektorom plesne sivej boli označené aj druhy *Lobesia botrana*, *Thrips obscuratus* a *Ceratitis capitata* (Elad et al. 2007).

7 Mechanizmus rezistencie viniča

Pre obmedzenie preniknutia a rastu biotrofných hubových patogénov majú rastliny dve hlavné stratégie, a to: odolnosť ku vniknutiu a programovaná smrť bunky (PCD; z angl. programmed cell death). Odolnosť k vniknutiu bráni prielomu bunkovej steny a cytoplazmatickej membrány klíčiadou spórou, čím predchádza tvorbe haustória. PCD (tiež nazývaná ako hypersenzitívna reakcia; skr. HR) sa uplatňuje vo vnútri infiltrovanej epidermálnej bunky, ktorá následne odumiera. To zamedzí zásobovanie patogénu živinami, ktoré potrebuje k rastu a vývoju.

Vrodené imunitné reakcie v rastlinnej bunke prebiehajú v prepojenom slede vo dvoch základných formách: PAMP-triggered immunity (PTI) a effector-triggered immunity (ETI). PTI spúšťa interakcia receptorov rozpoznávajúcich molekulové vzory, ktoré sa nachádzajú na povrchu cytoplazmatickej membrány bunky hostiteľa a špecifických molekúl, ktoré vypúšťa patogén. Chitín, hlavná zložka bunkovej steny húb, sa uvoľňuje počas infekcie. Jej rozpoznanie spúšťa početné obranné reakcie, ako tvorba reaktívnych foriem kyslíku, aktivácia obranných génov, biosyntéza stresových hormónov, fytoalexínov a spevnenie bunkovej steny. PTI je prvá vrstva obrany a poskytuje ochranu proti väčšine mikrobov, ktorým rastlina čelí. V priebehu evolúcie sa však určité patogény adaptovali k danému hostiteľovi schopnosťou tvoriť tzv. efektor bielkoviny. Efektory sú molekuly vylučované do bunky hostiteľa, za účelom ovplyvniť jeho fyziológiu a potlačiť PTI. Aby čelili aktivite efektorov, vybrané druhy získali gény rezistencie (R), ktoré rozpoznávajú dané efektory, čo vedie k ETI. R gény komunikujúce s efektormi spúšťajú obranné reakcie, ktoré sa prekrývajú s dráhami PTI. ETI sa zvyčajne spája s hypersenzitívnou reakciou (HR), ktorá bráni patogénu zavrieť svoj životný cyklus. HR znižuje hromadnú produkciu a akumuláciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), ako je peroxid vodíka H_2O_2 , ktorý zapríčiňuje PCD infikovaného pletiva. H_2O_2 môže tiež pôsobiť, ako difúzivný signál pre navodenie rôznych obranných reakcií rastliny, ako je produkcia fytoalexínov, PR (pathogenesis-related) proteínov a polymérov bunkovej steny (Stotz et al. 2014; Delaunoy et al. 2014; Snowdon et al. 2015; Weng et al. 2014). HR mechanizmus bol popísaný u amerického druhu *V. rotundifolia*, ktorý je odolný k *E. necator* a niektorých jeho hybridných potomkov s *V. vinifera*. PCD aktivita bola takisto dokázaná pre dve odrody viniča Kishmish vatkana a Dzhandzhal kara, patriace k *V. vinifera* subsp. *sativa* proles *orientalis* subproles *antasiatica*, pôvodom z Uzbekistanu. Môže byť užitočné podotknúť, že ETI závisí na

aktivácií jednotlivých dominantných génov a môže byť prekonaná vymazaním alebo mutáciou jedného efektoru (Muganu a Paolocci 2013; Weng et al. 2014; Qiu et al. 2015).

Ďalším systémom, ktorý spúšťa rozpoznanie patogénu rastlinou sú systémové reakcie rastliny, tiež nazývané systémovo získaná rezistencia (SAR). SAR posilňuje obranné reakcie proti širokému spektru biotrofických patogénov v orgánoch rastliny, ktoré sú umiestnené ďaleko od pôvodného miesta infekcie. Už dlho sa predpokladá, že kys. salicylová (SA) je kľúčová signálová molekula pri obranných reakciách rastlín proti biotrofickým patogénom a je potrebná pri aktivácii SAR (Muganu a Paolocci 2013).

Rôzne obranné mechanizmy viniča spúšťajú produkciu fyzických bariér, alebo syntézu antimikrobiálnych zlúčenín, ktoré sú zapojené do stratégií odolnosti voči patogénom. Medzi tie patrí: syntéza kalózy, PR proteínov, syntéza stilbenov a ďalších fenolických zlúčenín.

Okrem vyššie popísaných mechanizmov, ktoré sú aktívne po rozpoznaní patogénu využíva rastlina aj konštitutívnu (trvalo prítomnú) obranu, ktorá je aktívna pred napadnutím patogénom. Konštitutívna obrana obmedzuje fázu vstupu parazita do hostiteľského pletiva priamou penetráciou, alebo už existujúcimi otvormi a odoláva prvým fázam infekcie. Konštitutívna obrana sa obvykle vzťahuje na morfo-anatomické vlastnosti listu, strapca a bobule vyvinuté nezávisle od útokov húb, alebo zahŕňajú konštitutívne zlúčeniny s antimikrobiálnou aktivitou. Syntéza niektorých antimikrobiálnych konštitutívnych zlúčenín môže byť tiež posilnená pri reakcii rastliny na stres. Mnoho týchto trvalo prítomných antimikrobiálnych zlúčenín môže spadať pod skupinu fytoanticipínov. Fytoanticipíny sú antimikrobiálne látky nízkej molekulárnej hmotnosti, ktoré sú prítomné v rastlinách, pred útokom mikroorganizmov, alebo sú produkované po infekcii z už pred tým prítomných prvkov. Tieto metabolity sú komplemetárne s fytoalexínmi, čo sú antimikrobiálne metabolity, ktorých syntéza nastáva po kontakte hostiteľa s patogénom (Muganu a Paolocci 2013; Heintz a Blauch 1990).

7.1 Odolnosť viniča voči peronospóre

7.1.1 Mechanizmus odolnosti viniča voči peronospóre

Mechanizmus odolnosti divokého viniča k *P. viticola* je študovaný viac ako pol storočia a kategórie na úrovni odolná/citlivá boli popísané pre mnohé druhy č. *Vitaceae*.

Nebola dokázaná jasná spojitosť medzi charakteristikou listu viniča a citlivosťou k peronospóre, kým podstatnejším sa zdá obsah antimikrobiálnych látok, ako je inositol a kys. kávoová v neinfikovaných listoch rezistentných odrôd. Tiež úroveň expresie génov spojených so stresom a obranou bola u rezistentných odrôd vyššia ako u citlivých odrôd bez inokulácie. Mikroskopické sledovanie ukázalo, že počiatok infekcie je zásadne rovnaký ako u odolných, tak u citlivých odrôd, čo značí, že odolávanie infekcie u rezistentných rastlín je založené na post-infekčnom mechanizme. Odolnosť Amerického viniča k *P. viticola* môžeme sledovať najskôr až po kontakte prvého haustoria s membránami buniek mezofylu, pričom časovanie a rozsah infekcie sa líši na základe vlastností genotypu hostiteľa. Mechanizmus gén proti génu bol popísaný pri procese rozpoznania patogénu na odrode Bianca, keď receptor-gény lokusu Rpv3 a následná HR bola prekonaná izolátom *P. viticola*, ktorý pravdepodobne niesol mutáciu v jeho géne avirulencie (Avr) (Gessler et al. 2011).

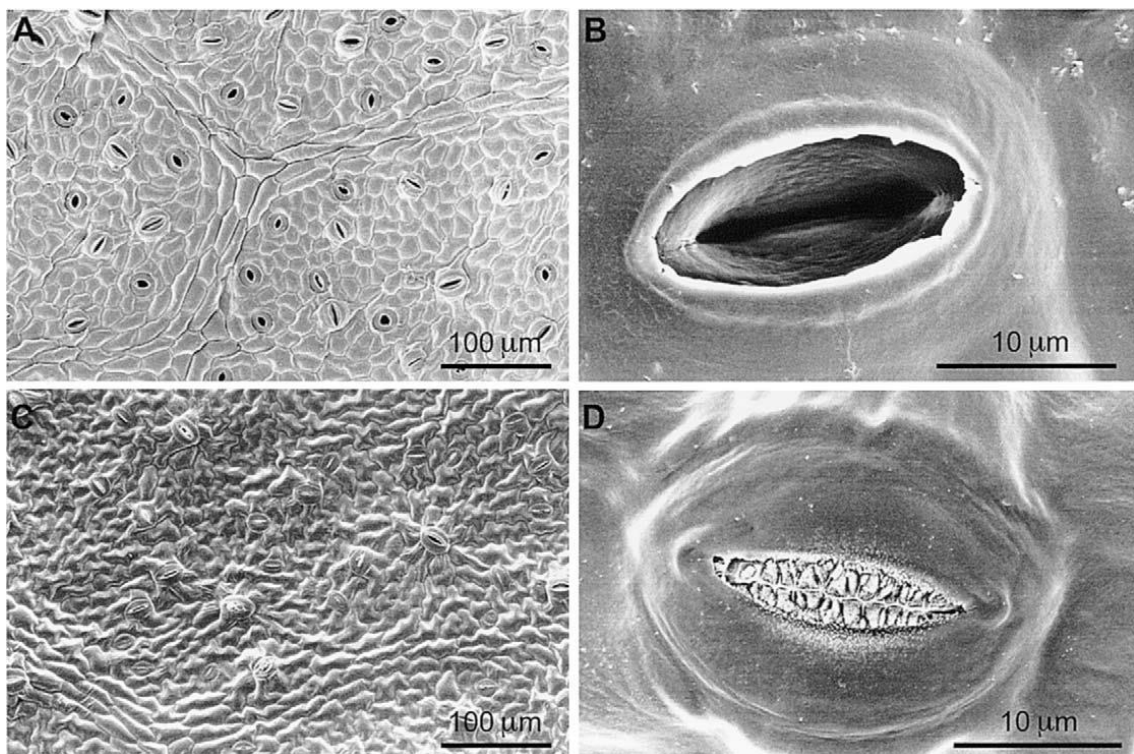
Mechanizmus post-infekčnej odolnosti na rezistentných odrodách zahŕňa vylučovanie kalózy v prieduchoch, obranné procesy v bunkovej stene, akumulácia reaktívnych foriem kyslíku, zvýšená aktivita peroxidázy a aktivácia HR (Gessler et al. 2011). Vylučovanie kalózy [(1-3)- β -D-glukóza] na prieduchoch bráni penetrácii substomatálnej dutiny zoospórmi 7 hodín po infekcii (hpi) a 24 hpi sú prieduchy obklopené nekrotickými oblasťami, vykazujúce reakcie podobajúce sa na HR. Vylučovanie kalózy bolo 120 hpi možné pozorovať aj v prieduchoch blízko miesta infekcie (viď Obr. 1) aj keď nekrotické ložiská sa nevyskytli. Podstatu signálov, ktoré pôsobia na susedné zdravé prieduchy zatiaľ nepoznáme, ale prítomnosť kalózy v týchto prieduchoch bráni sekundárnej infekcii, čo môžeme označiť za systémovo získanú rezistenciu (tzv. SAR; z angl. systemic acquired resistance) voči *P. viticola* (Muganu a Paolucci 2013; Li et al. 2015).

Na Obr. 3 môžeme pozorovať vylučovanie kalózy a HR na snímkach listov odrody Solaris ako reakciu na infekciu peronospóry, pričom na Obr. 2 sledujeme úspešnú infekciu a kolonizáciu peronospórou na citlivej odrode Chasselas, bez známky vylučovania kalózy.

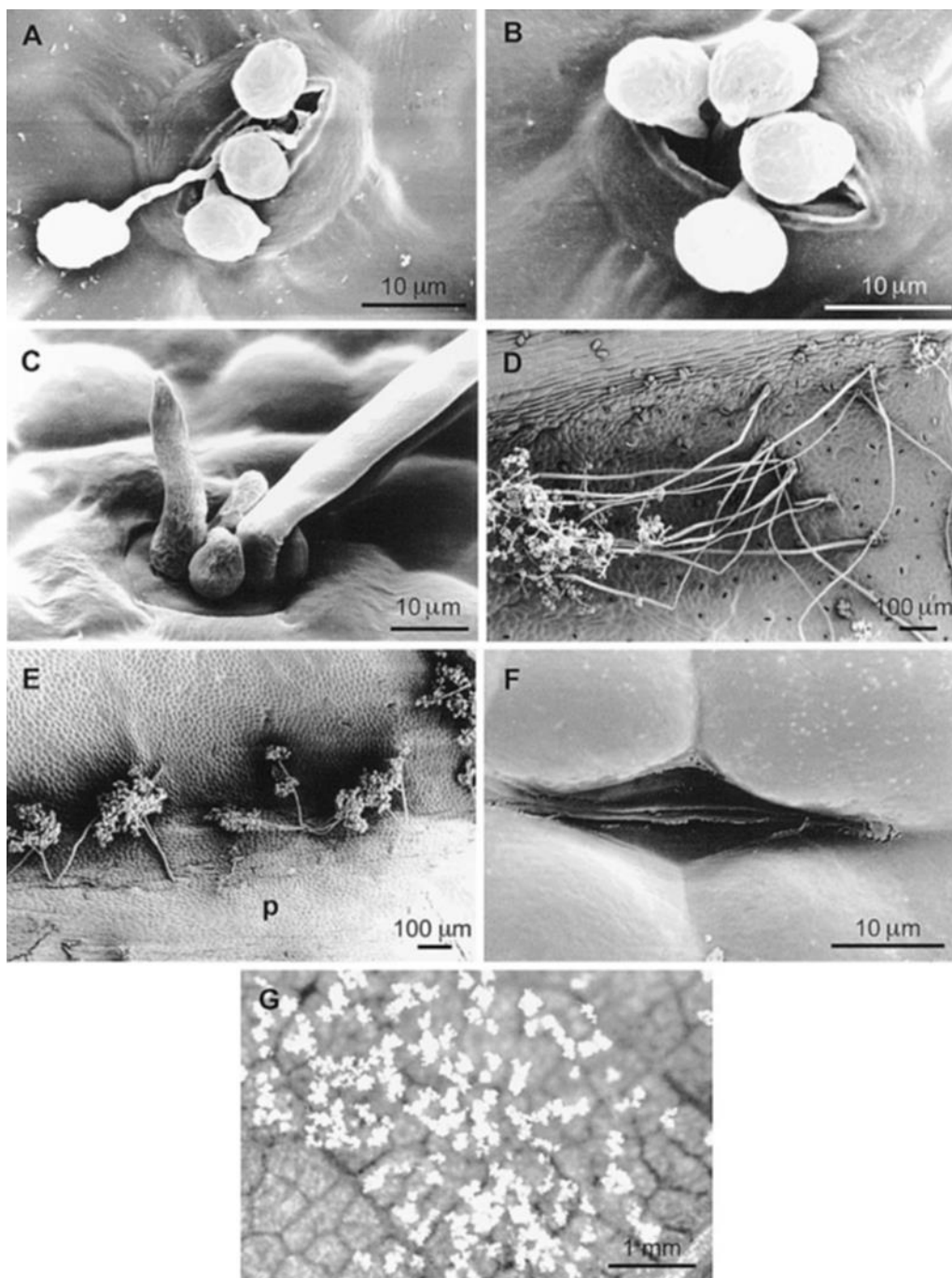
Rezistentné odrody reagujú na inokuláciu peronospóry prudkým navýšením génov kódujúcich proteíny spojené s patogenézou (PR) a génov spojených s prenosom obranných signálov a metabolických procesov, zahŕňajúcich fenyylpropanoidovú dráhu. Jedna z najdôležitejších reakcií viniča k hubovým infekciám je tvorba stilbenov a akumulácia ďalších antimikrobiálnych látok, ako sú viniferíny a resveratrol.

Pterostilben sa považuje za najviac toxickú zložku pôsobiacu proti peronospóre. Mikroskopickým sledovaním druhov *Vitis* spp. boli zistené tri rozdielne reakcie na inokuláciu týmto parazitom, a to:

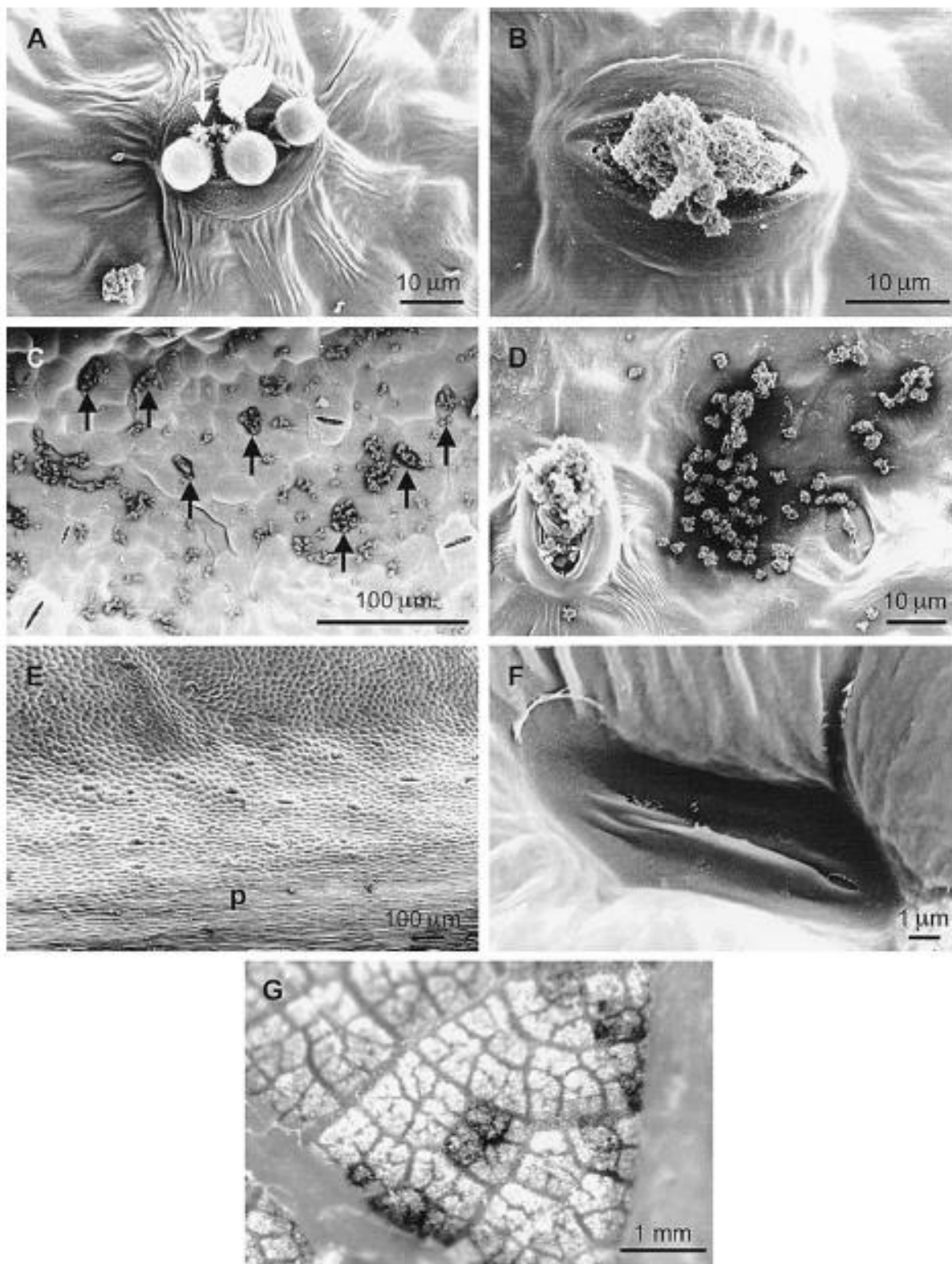
1. skorá inhibícia vývoja patogénu po prilnutí zoospóry, typická pre severoamerické a sibírske druhy, u ktorých bola dokázaná rezistencia
2. úspešná kolonizácia mezofylu hostiteľa (*V. vinifera*)
3. narušený vývoj, kedy patogén nepriľne k uzavieracej bunke, ale tvorí hýfy na povrchu listu bez rastu životaschopných sporangioforov. Toto je typické pre ostatné ázijské rezistentné druhy. Evolučne odlišné signálové dráhy medzi parazitom a hostiteľom môžu regulovať tieto tri typy interakcie. Detailná znalosť týchto signálov by mohla otvoriť nové možnosti v kontrole chorôb (Gessler et al. 2011; Muganu a Paolucci 2013).



Obr. 1. Mikroskopické sledovanie okolitých oblastí infekcie na spodnej strane listu 120 hodín po inokulácii peronosporou (Gindro et al. 2003). (A) Prieduchy na listoch citlivej odrody Chasellas, (B) detail pohľadu (A), (C) prieduchy upchaté sekréciou na listoch rezistentnej odrody Solaris, (D) detail pohľadu (C).



Obr. 2. Mikroskopické sledovanie listu citlivej odrody viniča Chasselas infikovanej *P. viticola* (Gindro et al. 2003). (A) Klíčenie encystovaných zoospór 7 h po inokulácii (ďalej len hpi). (B) Klíčenie encystovaných zoospór 24 hpi. (C) Novo sa vynárajúce sporangiofory z prieduchu 96 hpi. (D) Plne vyvinuté sporangiofory 120 hpi. (E) Sporulácia *P. viticola* na vrchnej strane listu pozdĺž hlavnej žilky (p) 120 hpi. (F) Otvory podobné prieduchom na hornej strane listu. (G) Sporulácia na spodnej strane listov 120 hpi (zväčšovacie slko)



Obr. 3. Mikroskopické sledovanie listov rezistentnej odrody Solaris infikovaných *P. viticola* (Gindro et al. 2003). (A) Klíčením encystovaných zoospór 7 hpi s izolovanými sekréciami okolo klíčnych vlákien zoospór (šípky). (B) Encystované zoospóry uviaznuté v sekrécii 24 hpi. (C) Sekrécia na povrchu kutikuly 120 hpi (šípky). (D) Detail (C). (E) Horný povrch listu popri hlavnej žilke (p) 120 hpi. (F) Otvory podobné prieduchom na hornej strane listu. (G) Formácia nekrotických oblastí na spodnej strane listov 120 hpi (zvážšovací sklo).

7.1.2 Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť viniča k peronospóre

Po násade bobúľ a vplyvom počasia sa prieduchy pokrývajú vrstvami vosku a tvoria lenticely. Táto morfológická transformácia bola spojená s akvizíciou ontogenetickej rezistencie k peronospóre i keď výskyt infekcie počas tejto fázy zostáva stále možný prostredníctvom stopky (Kennelly et al. 2005).

Hustota trichómov na spodnej strane listu je spojená s rôznym stupňom tolerancie druhov *Vitis* spp. voči patogénom. Napr. u *V. doaniana* a *V. davidii*, čo sú druhy odolné k peronospóre, trichómy redukovali zmáčavosť listov, čo bránilo vypúšťaniu zoospór zo zoosporangií a patogén tak nemohol dosiahnuť pletivo hostiteľa. Penetrácia viniča peronospórou prebieha výlučne cez prieduchy, zatiaľ čo sporulácia výnimočne prebieha cez iné otvory v pletive. Počas sporulácie môže hustota prieduchov ovplyvniť sekundárnu infekciu týmto patogénom. Mobilita zoospór k zdravým prieduchom bola spojená s procesom chemotaxie, ktorý je regulovaný chemickými zlúčeninami ako sú aminokyseliny, isoflavony, pektíny a fragmenty bunkovej steny, ktorých produkcia by mohla byť ovplyvnená otváraním prieduchov. Štúdie zamerané na variety druhu *V. vinifera* nemohli preukázať jasnú spojitosť medzi hustotou prieduchov na liste a citlivosťou k *P. viticola* (Muganu a Paolocci 2013).

7.1.3 Zdroje odolnosti k peronospóre viniča

Hoci európske odrody *V. vinifera* vykazujú vysokú citlivosť k patogénu, druhy *Muscadinia* spp. a niektoré americké a ázijské druhy *Vitis* spp. majú rôznu stupeň rezistencie k *P. viticola*. Spomínané divoké druhy vykazujúce rôznu stupeň rezistencie sú napr.: *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. lincedumii* a *Muscadinia rotundifolia*. Všetky severoamerické rezistentné druhy dovoľujú patogénu dokončiť svoj životný cyklus, avšak intenzita tvorby sporangií je na týchto rastlinách redukovaná. Niektoré rezistentné genotypy efektívne potláčajú prerastanie hýf mezofylom, pričom sporulácia a viditeľné symptómy nemožno pozorovať. Niektoré ázijské druhy zas tolerujú rast hýf na povrchu listovej čepele, zatiaľ čo bránia ich preniknutiu prieduchmi. *Vitis vinifera* môže byť krížená s rezistentnými druhmi viniča a zvyčajne tvorí plodné potomstvo s väčšinou divokých amerických a ázijských druhov *Vitis* spp. Divoké druhy sú osvedčeným zdrojom rezistencie k biotickým a abiotickým stresom. Pokusy vytvoriť kultivary viniča ktoré nesú gény rezistencie k peronospóre ukázali, že znaky rezistencie sú dedené kvantitatívne.

Hlavné lokusy kvantitatívnych znakov (ďalej QTL z angl. quantitative trait loci) pre rezistenciu k peronospóre boli nájdené mapovaním genómu a označené ako Resistance to *P. viticola* (Rpv). Do dnes bolo identifikovaných a zmapovaných viac ako 13 lokusov rezistencie na chromozómoch 4, 5, 7, 8, 9, 12, 14, 17 a 18 (viď Tab. 1). Mnohé z týchto lokusov boli pôvodne hlásené bez špecifických mien, ktorým boli neskôr priradené mená v katalógu zmapovaných lokusov rezistencie (<http://www.vivc.de/>), čo zanechalo zopár nahlásených lokusov bez mena. (Li et al. 2015; van Heerden et al. 2014; Gessler et al. 2011)

Rpv1 a Rpv2 boli lokalizované na chromozóme (ďalej chr.) 12 a chr. 18, a sú zodpovedné za rezistenciu získanú od *M. rotundifolia*, ako aj QTL nájdený v rovnakej oblasti genómu *V. riparia*. Kríženie medzi odolnou odrodou Regent a citlivou odrodou Lemberger vyniesol lokus rezistencie v rovnakej oblasti ako Rpv2, ale keďže Regent nemá žiadnych predkov *M. rotundifolia*, tento lokus bol prijatý za odlišný od Rpv2, a tak bol označený ako Rpv3. Lokus odolnosti v rovnakej pozícii ako Rpv3 na chr. 18 bol takisto objavený v krížení odrôd Chardonnay a Bianca. Keďže Bianca, odolný rodič, zdieľa spoločný rodokmeň s odrodou Regent, bolo usúdené, že sa jedná takisto o lokus Rpv3, pričom bol zistený jeho význam pri sklone k hypersenzitívnej reakcii (HR). Ale nový izolát *P. viticola*, ktorý prekonal monogenickú rezistenciu odrody Bianca, poukazuje na dôležitosť zapojenia viacerých génov rezistencie, pre získanie trvalo rezistentných jedincov (Gessler et al. 2011). Lokus odolnosti Rpv4 bol lokalizovaný na chr. 4. V krížení odrôd Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*) a Gloire de Montpellier (*V. riparia*) boli identifikované 2 lokusy odolnosti na chr. 9 a 12 a boli označené ako Rpv5 a Rpv6 jednotlivo. Rpv6 je druhý lokus rezistencie (po Rpv1), ktorý sa nachádza na chr. 12. Relatívna pozícia prepojených markerov pre Rpv6 a Rpv1, spolu s odlišným pôvodom naznačuje, že sú tieto dva lokusy naozaj odlišné. QTL odolnosti voči peronospóre Rpv7 bol lokalizovaný na chr. 7 pre odrodu Bianca. Lokus Rpv8 sa nachádza na chr. 14 a je spojený s markerom Chr14V015 lokalizovaným medzi markermi VVIP05 a VVIP22. QTL odolnosti Rpv9 na chr. 7 bol nájdený pomocou kríženia odrody Moscato Bianco (*V. vinifera*) a jedinca *V. riparia*, ktorý vykazoval odolnosť k peronospóre. Rpv10 bol nájdený na chr. 9 u odrody Solaris. Tento lokus bol zdedený od *V. amurensis*. Rpv11, lokus na chr. 5 bol nájdený u odrody Solaris, ale aj Chardonnay, odrody všeobecne vnímanej ako citlivá. Tretí QTL pochádzajúci z *V. amurensis*, bol zmapovaný na chr. 14 vo väzbe s markermi UDV014 a UDV370 a označený ako Rpv12. Na základe skúmania rôznosti fenotypu a nedostatku

protikladných informácií o markeroch autori vyvodili, že Rpv12 a Rpv8 pravdepodobne nie sú rôzne lokusy, ale alelické varianty rovnakého lokusu. Rpv13 bol odhalený v potomstve *V. vinifera* Moscato Bianco x *V. riparia* na chr. 12, pričom sa nachádza blízko údajnej pozície Rpv1. Okrem vyššie spomenutých lokusov niekoľko nepomenovaných lokusov génov malého účinku bolo hlásených na chr. 8, 12, 15 a 17 (van Heerden et al. 2014; Gessler et al. 2011; Merdinoglu a Wiedeman-Merdinoglu 2003; Fischer et al. 2004; Schwander et al. 2012; Venuti et al. 2013).

Tab. 1. Zistené lokusy znakov odolnosti viniča voči *P. viticola* (VIVC 2015)

Symbol	Chromozóm	Genotyp pôvodu	Odvodené z druhu	Referencia
Rpv 1	12	28-8-78	<i>M. rotundifolia</i>	Merdinoglu et al. (2003)
Rpv2	18	8624	<i>M. rotundifolia</i>	Wiedemann-Merdinoglu et al. (2006)
Rpv3	18	Regent Bianca		Welter et al. (2007) Bellin et al. (2009)
Rpv4	4	Regent		Welter et al. (2007)
Rpv5	9	Gloire de Montpellier	<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
Rpv6	12		<i>V. riparia</i>	Marguerit et al. (2009)
Rpv7	7	Bianca		Bellin et al. (2009)
Rpv8	14	Ruprecht	<i>V. amurensis</i>	Blasi et al. (2011)
Rpv9	7	Wr63	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
Rpv10	9	Solaris	<i>V. amurensis</i>	Schwander et al. (2012)
Rpv11	5	Regent Chardonnay Solaris		Fisher et al. (2004) Bellin et al. (2009) Schwander et al. (2011)
Rpv12	14	99-1-48 20/3	<i>V. amurensis</i> <i>V. amurensis</i>	Venuti et al. (2013)
Rpv13	12	Wr63	<i>V. riparia</i>	Moreira et al. (2011)
Rpv14				Fechter et al. (v príprave)
Rpv15	18	DVIT2027	<i>V. piasezkii</i>	Pap et al. (v príprave)

7.2 Odolnosť viniča voči múčnatke

7.2.1 Mechanizmus odolnosti viniča voči múčnatke

Ako jedna z reakcií listu viniča na infekciu *E. necator* je vylučovanie kalózy. V tomto prípade bola penetrácia haustóriom v bunkách epidermis zastavená formáciou papily, čo je štruktúra tvorená rôznymi vrstvami obsahujúcich uhľohydráty, kremík a fenolické zlúčeniny, pričom vylučovanie kalózy možno pozorovať okolo krku haustória a papily (Muganu a Paolocci 2013) (viď Obr. 4).

Viacero génov, ktoré kódujú proteíny spojené s odolnosťou viniča, vrátane pathogenesis-related (PR) proteínov, germin-like proteínov (GLPs) a stilbensyntáz sú indukované pri reakcii na infekciu múčnatkou u citlivých kultivarov *V. vinifera*. Extrahovateľné množstvo PR proteínov chitináza a β -1,3-glukanáza sa výrazne zvýšil po infekcii múčnatky v listoch a zelených bobuliach viniča a prípravky z týchto proteínov spôsobovali dezintegráciu kľúčnych vlákien *E. necator* v podmienkach *in vitro*. Gény GLP podskupiny 4 u jačmeňa (HvGLP4) a pšenice (TaGLP4) sa špecificky prejavili v bunkách epidermis penetrovaných múčnatkou. Bolo preukázané, že GLP gén VvGLP3 bol indukovaný u ontogeneticky odolných (starších), ale nie u ontogeneticky citlivých (mladších) bobúľ viniča po inokulácii *E. necator*. Zistilo sa, že indukcia VvGLP3 bola špecifická k infekcii múčnatkou a nebola spustená inými hubovými patogénmi viniča, alebo zraneniami (Weng et al. 2014; Muganu a Paolocci 2013).

Okrem syntézy obranných proteínov ako reakcia na infekciu múčnatky, sa takisto výrazne zvyšuje transkripcia génov zapojených do vnímania obranných signálov a ich transdukciou vrátane, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, mitogen-activated proteín kinázy a WRKY transcription factors (Qiu et al. 2015).

Napriek indukcii viacerých obranných dráh u viniča, ako reakcia na infekciu múčnatky, žiadny z týchto obranných proteínov alebo dráh nie je schopný kompletného obmedzenia rastu vývoja *E. necator* na kultivaroch *V. vinifera*. Predpokladá sa, že tento efekt je v prírode kvantitatívny, čo vysvetľuje minimálne rozdiely v citlivosti rôznych kultivarov *V. vinifera*. Dôležitejšia rola týchto obranných proteínov môže byť v zníženej citlivosti niektorých severoamerických druhov viniča, vykazujúcich konštitutívne zvýšenú úroveň chitinázy a β -1,3-glukanázy v neinfikovanom pletive listov (Gadoury et al. 2012; Weng et al. 2014).

7.2.2 Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť k múčnatke viniča

Bobule aj listy viniča prejavujú ontogenetickú odolnosť k múčnatke. To je obzvlášť pozorovateľné u vyvíjajúcich sa bobúľ odrôd *V. vinifera*, ktoré sú vysoko citlivé k infekcii 1-2 týždne po násade bobúľ, ale potom sa k penetrácii *E. necator* stávajú výrazne odolnejšie. Oproti tomu bobule väčšiny severoamerických druhov preukazujú silnú odolnosť vo všetkých štádiách vývoja bobúľ. Môžeme hovoriť o konštitutívnej odolnosti, ktorá sa mohla vyvinúť počas koevolúcie divokých druhov viniča a populácií múčnatky.

Kým genetické a mechanické základy ontogenetickej rezistencie viniča voči múčnatke sú stále neznáme, je dôležité podotknúť dve veci. Za prvé, ontogenetická rezistencia k múčnatke nie je unikátna pre vinič (pozorovaná napr. na listoch jahody). A za druhé, fenotyp ontogenetickej rezistencie sa zdá byť výsledkom zvýšenej PTI a nezdá sa byť spojená so zmenami v prístupnosti živín počas vývoja bobúľ, či listov. Taktiež zvýšená odolnosť k múčnatke nemohla byť pripísaná k zmenám v hrúbke kutikuly, alebo bunkovej steny počas vývoja bobúľ. Avšak hrúbka kutikuly listov rôznych odrôd viniča mala pozitívnu koreláciu s ich citlivosťou k tomuto patogénu. Na základe údajov prezentovaných v predošlej kapitole, ktoré poukazujú, že úspešná penetrácia epidermálnych buniek adaptovanými druhmi múčnatky je závislá na MLO-sprostredkovanom potlačení PTI hostiteľa, čo vedie k špekulácii, že zmeny v expresii, alebo aktivite MLO hostiteľa by mohli byť do procesu zapojené (Qiu et al. 2015; Muganu a Paolocci 2013; Gadoury et al. 2012).

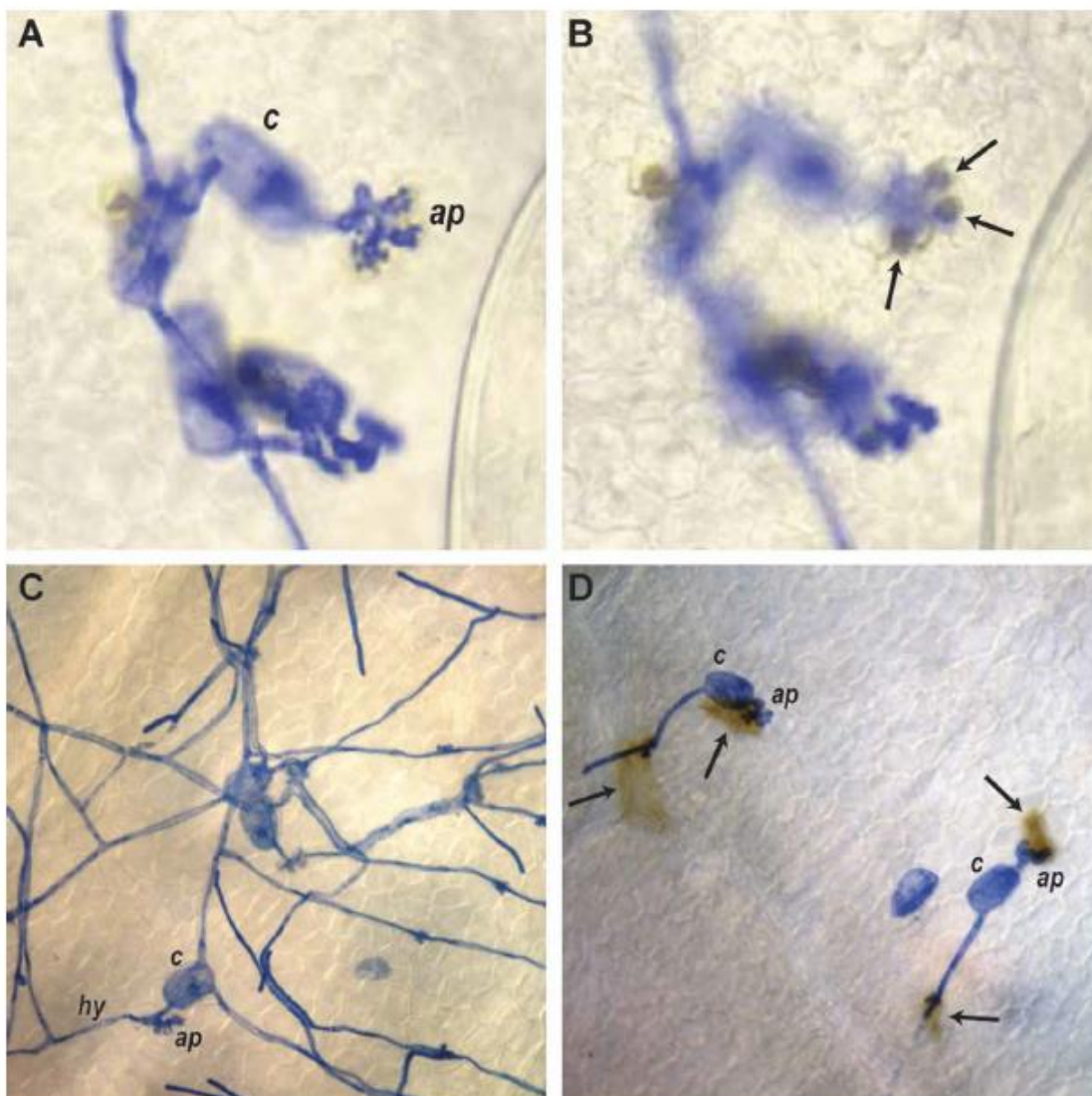
7.2.3 Zdroje odolnosti k múčnatke viniča

Pestovaný vinič *V. vinifera* je odolný k druhom múčnatky, ktoré nie sú adaptované k tomuto rastlinnému druhu. Napríklad *Erysiphe cichoracearum*, agent múčnatky na tekvici (*Cucurbita* sp.), vykazuje omnoho nižšiu intenzitu penetrácie epidermálnej bunky viniča, ako *E. necator*, a ako taký, nie je schopný úspešnej infekcie. Odolnosť k preniknutiu predstavuje hlavný komponent PTI proti neadaptovaným druhom múčnatky u väčšiny rastlinných druhov a pomocou tzv. priamej genetiky (angl. forward genetics) bola u arábkovky (*Arabidopsis* sp.) a jačmeňa (*Hordeum* sp.) odhalená prepojená akcia aspoň troch génov súvisiacich s penetráciou (PEN) : PEN1, PEN2, PEN3. Keďže je vinič drevnatá trvalka a o mnoho ťažšie sa geneticky transformuje, nebolo možné použiť podobnú metódu na odhalenie základných zložiek PTI proti múčnatke viniča. Avšak dôkazy zo štúdií za použitia iných experimentálnych

metód naznačujú, že dráhy podobné PEN1 a PEN2/PEN3 sú takisto dôležité zložky PTI u viniča (Qiu et al. 2015).

Najdôležitejšia skupina R-génov u rastlín sú tie čo kódujú proteíny s miestami pre väzbu nukleotidov obsahujúcich na leucin bohaté domény [tzv. NBS-LRR; z angl. nucleotid binding site-leucine-rich repeat domains]. Tieto NBS-LRR proteíny špecificky rozpoznávajú mikrobiálne efekty vylučované počas infekcie a iniciujú ETI, ktorá je veľmi efektívna proti biotrofickým patogénom ako je múčnatka. Genóm viniča kóduje širokú skupinu NBS-LRR génov. Do dnes bolo identifikovaných 9 lokusov v škále rôznych druhov viniča pôvodnom zo Severnej Ameriky, Číny, a Strednej Ázie, o ktorých sa predpokladá, že obsahujú R-gény s vysokou odolnosťou k *E. necator* (viď Tab. 2). Chromozómové umiestnenia týchto lokusov boli geneticky zmapované za použitia molekulárnych markerov, hoci presná pozícia na chromozóme je zatiaľ známa len pre lokus Resistance to *Uncinula necator* (Run1), ktorý je lokalizovaný spolu s lokusom Resistance to *Plasmopara viticola* (Rpv1) na chromozóme 12.

Run1 je jeden z troch lokusov rezistencie k múčnatke, ktoré boli odhalené u Severoamerického viniča *M. rotundifolia*. Sekvenovanie Run1/Rpv1 lokusu odhalilo, že obsahuje skupinu siedmich predpokladaných Toll/interleukin-1 receptorových R-génov (TIR)-NB-LRR typu. Tento gén, tiež označený ako MrRun1, poskytuje kompletnú odolnosť proti izolátom z Austrálie, Severnej Ameriky, a Francúzska tým, že rýchlo navodzuje PCD v penetrovaných bunkách epidermis (viď Obr. 4). Akokoľvek, izolát múčnatky (Musc4) získaný z juhovýchodnej oblasti Severnej Ameriky, kde je *M. rotundifolia* endemická, bol schopný rezistenciu MrRun1 prekonať. To naznačuje, že efektor rozpoznávaný MrRun1 proteínom buď zmutoval, alebo sa z izolátu Musc4 kompletne stratil. Ďalšie dva lokusy rezistencie k múčnatke identifikované v druhu *M. rotundifolia* sú lokalizované na odlišných chromozómoch ako Run1. Alelické varianty lokusu Run2, Run2.1 a Run2.2 na chromozóme 18, boli jednotlivo nájdené v kultivároch Magnolia a Trayshed, kým Run1 by mal pochádzať z odrody Thomas. Zaujímavé je, že hoci Run2.1-sprostredkovaná rezistencia voči múčnatke sa nezdá byť tak silná, ako Run1, nebola prelomená izolátom Musc4, čo robí z tohto lokusu potencionálneho kandidáta pre tzv. pyramiding (viď nižšie) s Run1. Ren5 bol odvodený z *M. rotundifolia* kultivaru Regale a bol zmapovaný do hornej časti chromozómu 14. Podstata mechanizmu rezistencie sprostredkovanej Ren5 nebol doposiaľ zistený, ale zdá sa, že jeho iniciácia nastáva v post-penetračnej fáze infekcie (Qiu et al. 2015).



Obr. 4. Mechanizmus odolnosti viniča proti *E. necator*. Spóry múčnatky boli inokulované na oddelených listoch druhov *M. rotundifolia* (A,B), *V. vinifera* Cabernet Sauvignon (C) a jedinca z potomstva spätného kríženia s *V. vinifera*, ktorý nesie gén odolnosti k múčnatke MrRun1 (D). Panely A a B reprezentujú rovnaký pohľad ale v rôznych úrovniach k ukážke vyklíčenej konídie (c) a apresória (ap) na povrchu listu (panel A) a globulárne papily (šípky) pod apresóriom (B), ktoré bránia penetrácii a rastu haustoria. Panel C ukazuje normálny rast hýf múčnatky (hy) na povrchu listu citlivej odrody viniča. Panel D ukazuje indukciu PCD v penetrovaných bunkách epidermis (šípky) sprostredkovanú génom MrRun1, čo efektívne zastavuje ďalší rast tohto biotrofickeho patogénu (Qiu et al. 2015).

Nedávne výskumy ukázali, že divoké druhy viniča pôvodom z Číny takisto reprezentujú dôležitý zdroj dominantných R-génov s vysokým účinkom na rezistenciu k múčnatke. Ren4 bol úspešne vnesený do *V. vinifera* z Čínskeho druhu *V. romanetii*. Ren4-prostredkovaná rezistencia je spustená po penetrácii a zahŕňa 2 rozdielne mechanizmy: v penetrovaných bunkách epidermis pozorujeme PCD, alebo sú haustóriá obklopené kalózou, čo efektívne blokuje ich príjem živín. Je dôležité podotknúť, že rezistencia Ren4 takisto nebola prelomená izolátom Musc4, čo by mohlo znamenať, že Ren4 je zameraný na iný efektor *E. necator*, ako ten, ktorý rozpoznáva proteín Run1.

To by mohol byť výsledok koevolúcie Ren4 s izolátmi múčnatky v Číne, ktoré sa odlišujú od izolátov zo S. Ameriky. Divoký druh viniča z Číny *V. pieasezkii*, taktiež obsahuje aspoň dva lokusy rezistencie k múčnatke, označené Ren6 a Ren7 na chromozómoch 9 a 19 jednotlivo. Dva kultivary *V. vinifera* z Uzbekistanu Kishmish vatkana a Dzhandzhal kara vykazujú PCD v penetrovaných bunkách epidermis (Ren1 na ch. 13) vo väčšej frekvencii, ako citlivé odrody, ale rýchlosť indukcie PCD bola výrazne pomalšia, ako pri genotypе obsahujúcom Run1 (Gadoury et al. 2012; Qiu et al. 2015).

V inej štúdii (Fischer et al. 2004; van Heerden et al. 2014) boli dva lokusy, ktoré spôsobujú čiastočnú rezistenciu k múčnatke viniča, nájdené v Severoamerických druhoch *Vitis* spp. a zmapované na rôznych chromozómových oblastiach. QTL pre rezistenciu k múčnatke označený, ako Ren2 pochádza od druhu *V. cinerea*, rodiča interšpecifického hybridu Illinois 547-1. A Ren3, QTL pre rezistenciu k múčnatke, pochádzajúci z neurčitého Severoamerického druhu *Vitis* sp. bol zmapovaný na interšpecifickom hybride Regent.

Okrem špecifických R-génov, ktoré stoja za ETI v penetrovaných bunkách epidermis, niekoľko ďalších génov spôsobuje rezistenciu k múčnatke v istých druhoch *Vitis* spp. Tieto gény boli nájdené tak, že vykazujú zvýšenú transkripciu počas infekcie múčnatky a vykazujú rozdielnu úroveň expície medzi odolnými a citlivými druhmi viniča k múčnatke. Napríklad gén označený ako Arabidopsis Enhanced Disease Seseptibility 1 (EDS1), mal rozdielnu intenzitu expície, pri reakcii na inokuláciu múčnatky u odrody Norton odvodenej od *V. aestivalis* (S. Amerika) a odrody Cabernet Sauvignon, pričom u odrody Norton bola úroveň transkripcie vyššia. Aspoň 5 rôznych génov pôsobiacich na odolnosť k *E. necator* bolo nájdených pre divoký vinič z Číny *V. pseudoreticulata*. Po inokulácii tohto druhu múčnatkou bol indukovaný transkripčný faktor VpWRKY1, pričom úroveň expície korelovala s úrovňou odolnosti (Qiu et al. 2015).

Symbol	Chromozóm	Pôvodný genotyp	Odvodené z druhu	Referencia
Ren1	13	Kishmish vatkana	<i>V. vinifera</i>	Hoffmann et al. (2008)
Ren2	14	Illinois 547-1		Dalbo et al. (2001)
Ren3	15	Regent		Welter et al. (2007)
Ren4	18	C-166-043	<i>V. romanetii</i>	Riaz et al. (2012)
		C87-41	<i>V. romanetii</i>	Mahanil et al. (2012)

Ren5	14		<i>M. rotundifolia</i>	Blanc et al. (2012)
Ren6	9			Pap et al. (v príprave)
Ren7	19			Pap et al. (v príprave)
Run1	12	VRH3082-1-42	<i>M. rotundifolia</i>	Barker et al. (2015)
Run2.1	18	Magnolia	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz et al. (2011)
Run2.2	18	Trayshed	<i>M. rotundifolia</i>	Riaz et al. (2011)

Tab. 2. Zistené lokusy znakov odolnosti viniča voči *E. necator* (VIVC 2015)

7.2.4 Gény citlivosti k múčnatke viniča

Ako už bolo opísané, adaptované druhy múčnatky sú schopné úspešne preniknúť do špecifického hostiteľa sekréciou efektor proteínov, ktoré potláčajú PTI hostiteľa. Avšak zdá sa, že úspešná penetrácia adaptovaných druhov múčnatky je závislá na prítomnosti funkčnej alely Mildew resistance Locus O (MLO) u hostiteľských druhov, ako je jačmeň (*Hordeum* sp.), arábkovka (*Arabidopsis* sp.), paradajka (*Solanum* sp.) a hrach (*Pisum* sp.).

MLO proteíny patria k širokej skupine génov unikátnych pre rastliny, ktoré kódujú proteíny so siedmimi transmembránovými doménami neznámej biochemickej aktivity, lokalizovaných na plazmatickej membráne. Mechanizmus, ktorým MLO proteíny pôsobia, rovnako ako faktory citlivosti sú neznáme. Jedna z možností je, že druhy múčnatky sú schopné využiť tieto špecifické MLO proteíny, aby potlačili hostiteľskú PTI. To pomocou sekrécie efektora, ktorý je mierený na MLO priamo, alebo nepriamo cez iný proteín. 3 zo 17 MLO génov viniča vykazujú vysoký stupeň sekvenčnej podobnosti a transkripcionálnej regulácie s MLO génmi citlivosti jačmeňa, arábkovky a rajčiny. To naznačuje, že by mohli mať význam v regulácii citlivosti viniča k *E. necator* (Qiu et al. 2015; Gadoury et al. 2012).

7.3 Odolnosť viniča voči plesni sivej

Stilbeny pôsobia v nedrevnatom pletive viniča, ako sú kvety, listy a bobule, a to ako následok napadnutia patogénmi, ako je *Botrytis cinerea*, ale aj *P. viticola*, *E. necator*, *Phomopsis viticola*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus* spp. a *Trichoderma viride*. Stilbeny, alebo stilbenické fytoalexíny sú schopné inhibovať niektoré ATP-ázy húb a respiráciu hubovej bunky a ich efektívnosť je spojená s intenzitou ich syntézy. Stilbensyntáza je kľúčovým enzýmom syntézy resveratrolu. Obsah resveratrolu v bobuli klesá počas dozrievania a akumulácia cukrov stúpa s citlivosťou k *B. cinerea*. Spomedzi stilbenov resveratrol nevykazuje okamžitý antimikrobiálny účinok, napriek tomu

dlhodobá inkubácia patogénu s resveratrolom inhibuje klíčenie konídií a kľúčneho vlákna. Bolo zistené, že u *B. cinerea* sa vyvinula schopnosť detoxifikovať fytoalexíny viniča za aktivity stilbenoxidázy (Muganu a Paolocci 2013).

V infikovaných listoch viniča plesňou sivou boli namerané zvýšené hodnoty chitinázy a glukanázy. Bola takisto zistená expresia génov kódujúcich proteíny súvisiace s odolnosťou ako sú fenylalanín amoniaklyáza, stilbensyntáza, acidická chitináza (VCH3), bázická chitináza (VCHIT1b) a polygalakturonázu inhibujúce proteíny (PGIP) (Li et al. 2015).

Konštitutívne fenolické zlúčeniny prítomné v rastline nezávisle od útokov patogénu vykazujú antimikrobiálnu aktivitu, ako je konštitutívny pterostilben, ktorý má fungicídne vlastnosti proti *B. cinerea*. Pterostilben bol v nízkej koncentrácii nájdený v mladých bobuliach odolných k plesni sivej, ale jeho toxická aktivita voči patogénu bola posilnená vysokým obsahom kys. glykolovej počas násady bobúľ. Ďalšie konštitutívne fenoly, ako je katechín, epikatechín-3-O-galan, kys. kaftarová a kutarová sú schopné inhibovať aktivitu stilbenoxidázy húb medzi kvitnutím a zamákaním, pričom vysoký obsah katechínu bol nájdený u odrôd viniča odolných k *B. cinerea* po zamákaní plodov. Nešpecifická inhibícia lytických enzýmov *B. cinera* bola spojená s odhalením proantokyanidínov, polymerických flavonoidov, ktoré sa považujú za inhibítory oxidatívneho enzýmu húb lakázy, zodpovedného za detoxifikáciu pterostilbenu. Ak uvážime, že pokles obsahu proantokyanidínov počas dozrievania bobúľ vedie k zvýšeniu citlivosti k plesni sivej, proantokyanidíny môžeme považovať za ukazovatele odolnosti viniča voči *B. cinerea* (Muganu a Paolocci 2013).

I keď bola zaznamenaná genetická variabilita druhov v rámci odolnosti voči *B. cinerea*, nebol identifikovaný žiadny systém rezistencie typu gén proti génu. Rezistentné odrody viniča akumulujú fytoalexíny a ich kutikula má menej a menšie póry. (Elad et al. 1996).

Odroda Norton (*V. aestivalis* x *V. labrusca*) je jedna z mála komerčne pestovaných modrých odrôd viniča, ktorá môže byť pestovaná pod zvýšeným tlakom *B. cinerea*. Genetický výskum vlastností odrody Norton, ktoré sú zapojené do odolnosti neboli zatiaľ plne objasnené. Takisto molekulárny mechanizmus, ktorý stojí za odolnosťou voči plesni sivej nebol zatiaľ popísaný. Citovaná práca predstavuje genetické mapovanie populácie kríženia variet Norton x Cabernet Sauvignon za použitia SSR markerov (Sapkota et al. 2015).

7.3.1 Ontogenetická a morfo-anatomická odolnosť viniča k plesni sivej

Morfologické vlastnosti strapca a bobúľ môžu ovplyvňovať odolnosť viniča voči patogénu. Husté strapce sú spojené s prítomnosťou mikroklimatických podmienok v zóne hrozna, ako je zvýšená teplota vzduchu, nízka ventilácia a relatívna vlhkosť, ktoré môžu podporiť rast patogénov, ako je *B. cinerea*. Okrem toho, že hustá stavba strapca môže spôsobovať praskliny v šupke bobúľ, čo vedie k uvoľneniu vody potrebnej ku klíčeniu konídie plesne sivej, zvýšený fyzický kontakt medzi bobuľami počas rastu vedie k vývoju sploštených oblastí v mieste dotyku a narúša štruktúru epikutikulárneho vosku. Množstvo epikutikulárneho vosku bobule pozitívne ovplyvňuje odolnosť rôznych variet *V. vinifera* voči plesni sivej, keďže zvyšuje hydrofobicitu šupky bobule a znižuje adhéziu schopnosť patogénu. Bola zistená pozitívna korelácia medzi odolnosťou bobúľ k plesni sivej a hrúbkou šupky bobúľ a takisto množstvom vrstiev epidermálnych buniek (Muganu a Paolocci 2013).

B. cinerea je oportunistický patogén, ktorý ľahko napadne slabé, poškodené alebo staré pletivá. Odolnosť k plesni sivej slabne so starnutím či zrením obzvlášť v kvetoch a bobuliach (Elad et al. 1996).

8 Indukovaná rezistencia u citlivých odrôd viniča

I keď je ušľachtilí vinič (*V. vinifera*) k patogénom, ako *P. viticola* citlivý, je schopná brániť sa iným patogénom. To naznačuje, že obranné mechanizmy sú dostupné, ale nie sú pri reakcii na tento patogén aktivované. Analýzy génovej expresie ukázali, že citlivý vinič reaguje na inokuláciu aktiváciou expresie génov spojených s obranou, ale táto reakcia nie je dostatočná, aby zastavila, alebo predchádzala infekcii. Transkripčné zmeny spojené so skorými štádiami infekcie *P. viticola* indikujú prítomnosť slabých obranných reakcií u citlivého viniča. Neschopnosť citlivých rastlín spustiť efektívnu obrannú reakciu je pravdepodobne spôsobená faktom, že ich gény rezistencie nemajú vyvinutý špecifický systém rozpoznávania *P. viticola*, keďže *V. vinifera* sa nevyvíjala v prítomnosti tohto patogénu. Akokoľvek, poznáme látky, ktorých aplikácia spôsobuje zvýšenú odolnosť citlivých odrôd viniča a výrazne redukujú symptómy peronospóry (Gessler et al. 2011).

Elicitory sú alternatívne produkty s veľmi špecifickým účinkom: látky schopné navodiť špecifickú obranu a pomôcť rastline vyvinúť odolnosť k ďalšiemu útoku patogénu. Tieto produkty môžu mať rôznorodý pôvod vrátane purifikovaných molekúl, surových prírodných extraktov z rastlín a mikroorganizmov, odvary a čaje (žihľava, praslička, atď.), alebo minerály (ílové minerály, vápnik, atď.). Čo sa týka surových extraktov, efektívne látky proti patogénu nie sú vždy známe a spôsob ich pôsobenia nie je úplne objasnený. Niektoré rastlinné hormóny ako kys. salicylová (SA), kys. jasmonová (JA), deriváty hormónov a analogické zlúčeniny ako 1,2,3-benzothiadiazol (BTH) sú niekedy takisto popisované ako elicitory. Dnešná definícia opisuje elicitory presnejšie ako špecifickú skupinu purifikovaných molekúl pochádzajúcich z mikroorganizmov, alebo rastlín, ktoré sú schopné stimulovať vrodennú imunitnú odozvu v rastline. Vrodené obranné reakcie sú spustené vo chvíli, keď receptory bunky hostiteľskej rastliny rozpoznajú molekulové vzory spojené s patogénom (exogénny elicitor), alebo mol. vzory spojené s nebezpečím, ktoré sú uvoľnené rastlinnou bunkou pri infekcii (endogénny elicitor). Táto idea takisto zahŕňa rozpoznanie efektorov, ktoré patogén vylučuje, tzv. špecifický elicitor. Tieto elicitory majú rôznorodý pôvod (proteíny, glykany a lipidy) (Delaunoy et al. 2014).

8.1 Obranné reakcie indukované elicitorami

Imunitný systém rastliny, ktorý vníma „vlastné“ a „cudzie“ elicitory spúšťa široký rozsah obranných reakcií. Tieto reakcie sú esenciálne pre úspešnú odolnosť rastlín a preto prispievajú k ich imunite. Prvotné reakcie po rozpoznaní elicitoru sú charakterizované procesmi signalizácie vrátane prúdenia iónov, aktivácie kaskády MAP-kináz (z angl. mitogen-activated protein kinase) a produkcie reaktívnych foriem kyslíka. Kľúčové signalizačné molekuly, ako SA a JA sú takisto produkované v priebehu niekoľko hodín po napadnutí patogénom. Tieto signalizačné molekuly sú zapojené do regulácie obranných downstream génov. Napokon obranné reakcie rastliny zahŕňajú spevnenie bunkovej steny a tvorbu antimikrobiálnych zlúčenín, ako sú fytoalexíny a PR proteíny (pathogenesis-related), ktoré spolu hrajú kľúčovú úlohu v obmedzení patogénu. Vnímanie elicitorov takisto zvyšuje úroveň odolnosti rastliny voči budúcim útokom patogénu. Tento fenomén je známy ako indukovaná rezistencia a zahŕňa lokálne získanú rezistenciu, systémovo získanú rezistenciu, a indukovanú systémovú rezistenciu, ktoré sú špecificky spustené užitočnými mikroorganizmami, alebo molekulami z nich odvodenými (Delaunoy et al. 2014; Walters et al. 2005).

Indukovaná odolnosť je často spájaná s javom zvaným priming, alebo fenoménom potenciácie, pričom tento efekt vyvolávajú isté molekuly vnímané rastlinou. Priming je definovaný ako fyziologický stav rastliny majúci za následok zachovanie pohotovosti obranných systémov následne po biotickom či abiotickom stimule. Rastliny v tomto stave vykazujú rýchlejšiu a silnejšiu aktiváciu obranných reakcií, keď sú následne pod infekčným tlakom mikrobov, hmyzu a abiotického stresu, čo má často za následok zlepšenie odolnosti v porovnaní s neošetrenými rastlinami. Mechanizmus fenoménu priming bol až doteraz relatívne neznámy, avšak nedávne hypotézy odhadujú, že akumulácia dormantných MAPK, modifikácie chromatinu a zmeny v primárnom metabolizme by mohli byť s týmto procesom spojené (Delaunoy et al. 2014; Gessler et al. 2011).

9 Využitie súčasnej úrovne poznania v praxi

9.1 Šľachtenie odrôd viniča odolných k hubovým patogénom

Cielené šľachtenie viniča sa datuje začiatkom 19. st. hlavne v Severnej Amerike. Kolonisti zlyhali pri pestovaní obľúbených odrôd *V. vinifera*, kvôli silnému poškodeniu mrazom a taktiež deštrukcii viniča škodcami ako je fyloxéra, alebo hubovými chorobami, ako sú múčnatka a peronospora. Na druhej strane odolné divoké americké druhy, ktoré mohli byť pestované bez problémov, produkovali víno silnej chuti, ktorá sa im nepáčila. V roku 1882 vedci z Harvard University nabádali k vývoju hybridov medzi európskym a severoamerickým viničom, pre skombinovanie mrazuvzdornosti a odolnosti Amerického viniča a žiadanej chuťovej kvality druhu *Vitis vinifera* (Eibach a Töpfer 2014).

Prvý Americký hybrid bola odroda Alexander, objavená roku 1740 pri vinohrade v štáte Virginia. Toto kríženie vzniklo náhodne medzi lokálnou odrodou a odrodami, ktoré boli dovezené z Európy. Tieto väčšinou neprežili dlhšie ako rok, čo bránilo možnosti prirodzene sa krížiť s domácim viničom. Typické americké odrody pochádzajúce z kríženia *V. labrusca* s neznámou odrodou sú Catawba a Concord, pričom Concord mohol vzniknúť spätným krížením *V. labrusca* s odrodou Catawba. Ďalšie staršie americké odrody sú Clinton (*V. labrusca* x *V. riparia*) a Isabella pochádzajúca z kríženia *V. labrusca* s neznámou odrodou *V. vinifera*. Ďalej spomínané americké hybridy sú Ada, Herbemont, Brighton a Diamond (Gessler et al. 2011; Eibach a Töpfer 2014).

Vo chvíli, keď Francúzke vinohradníctvo objavilo možnosť štepenia tradičných ušľachtilých odrôd na podnože odolné k fyloxére a zároveň nadobudlo zlepšenie v chemickej ochrane k peronospóre, pestovanie rezistentných hybridov začalo upadať. Tomuto napomohol zákon ustanovujúci zákaz ďalšieho vysádzania rezistentných alebo interšpecifických hybridov vo Francúzku. Vo Francúzku, Taliansku ani Španielsku šľachtenie odrôd rezistentných k *P. viticola* viac už nebol prioritou. Rezistentné odrody prvej generácie, ako napr. Marechal, Foch, Leon, Millot, a Seyval Blanc z komerčných vinohradov nakoniec takmer úplne vymizli. V niektorých oblastiach Francúzka sú stále populárne interšpecifické odrody Chambourcin a Baco Blanc.

V Nemecku začalo šľachtenie odolných kultivarov r. 1926. Výsledkom prvých generácií boli odrody, ako Aris, Siegfriedrebe, tie ale na trhu neuspeli. Nedávno tu boli

vyšľachtené kultivary, ako Johanniter, Merzling, Solaris, Rondo, Regent, alebo Phoenix.

Otázka šľachtenia nových rezistentných odrôd sa stáva dôležitou v nových vinárskych regiónoch, alebo regiónoch opúšťajúcich konvenčné systémy ochrany proti hubovým chorobám na systémy ekologické. Pri pestovaní viniča v systéme integrovanej, alebo biologickej produkcie nastával problém vyhnúť sa veľkým stratám spôsobených peronosporou. Odroda Chambourcin je jedným z rodičov k hubám odolnej odrody Regent, ktorú vyšľachtil Gerhardt Alleweldt (Šľachtiteľský Ústav Geilweilerhof, Nemecko, 1967). Je to skorá, tmavá, muštová odroda, ktorá vznikla krížením odrody Diana (Silvaner x Müller-Thurgau) s interšpecifickou odrodou Chambourcin. Odroda Regent sa v Nemecku časom stala veľmi obľúbenou, na ploche 2,183 ha v r. 2006 bola najviac vysádzanou rezistentnou odrodou v Nemecku. S istým úspechom bola odroda pestovaná aj v Anglicku. Avšak, stálosť rezistencie odrody Regent spochybnil nález izolátu *P. viticola*, ktorý bol schopný napadnutia a sporulácie na tejto rastline. Existuje názor, že odolnosť odrody Regent, by teda mohla byť závislá na biologickej spôsobilosti a genotype izolátov *P. viticola*. Za rezistenciou kultivaru Regent stoja tri hlavné QTL nachádzajúce sa na génových väzbových skupinách LG 9, LG 10 a LG 18. Už spomínaná maďarská odroda Bianca tiež vykazuje znaky sľubnej kvality hrozna a zároveň vysokej odolnosti k peronospóre. Avšak odolnosť tejto hybridnej odrody je podmienená iba jedným génom a v niekoľkých testujúcich vinohradoch sa tiež objavila citlivosť kultivaru Bianca k chorobe (Gessler et al. 2011).

Šľachtiteľské aktivity stojace za zmienku boli založené v US, alebo aj v krajinách východnej Európy, ako Maďarsko, bývalá Juhoslávia, bývalé Československo, bývali ZSSR a ďalšie.

Na základe historickej skúsenosti môžeme konštatovať, že viac ako 100 rokov šľachtenia viniča na rezistenciu v rôznych krajinách sveta viedlo k mimoriadnemu pokroku v zmysle vylepšených kultivarov kombinujúcich kvalitu, ako aj znaky odolnosti. Napriek tomu tento pokrok je spojený s ohromným úsilím a dobou, čo je trochu znepokojujúce. A to hlavne z dôvodu, že vinič má dlhý generačný cyklus a jeho šľachtenie zaberá veľa času, miesta a práce. Ďalší dôležitý dôvod je nedostatok vedomostí ohľadom spôsobu dedenia dôležitých znakov. V posledných rokoch však môžeme konštatovať veľké úspechy, v oblasti genetického výskumu. Intenzívny výskum v rôznych krajinách viedol k vzniku rôznych genetických máp a umožnil kombináciu fenotypovania a identifikácie QTL pre široký rozsah

fenotypových vlastností. Navyše sekvenovanie rôznych genómov viniča viedlo k vývoju molekulárnych markerov spojených s špecifickým znakom. To malo za následok bežné zavádzanie techník selekcie za asistencie markerov (MAS; z anglického marker assisted selection) v šľachtiteľských programoch viniča (Eibach a Töpfer 2014).

9.2 Selekcia za asistencie markerov (MAS)

Selekcia za asistencie markerov je proces využívajúci markerov (morfologických, biochemických, alebo molekulárnych, to je založených na DNK variácii) k nepriamej selekcii determinantu znaku záujmu (produktivita, odolnosť voči chorobám, tolerancia abiotického stresu a kvalita) a využíva sa v šľachtení (Johnson 2004).

Informácia získaná testovaním DNK v kombinácii s pozorovanými vlastnosťami jedincov ponúka lepšiu presnosť selekcie a zvyšuje možnosť identifikovať organizmy so žiadanými a nežiadanými znakmi v skorej fáze vývoja.

Až do nedávna sa výskumníci spoliehali na informáciu získanú z pozorovania fenotypu a prejavu organizmov, aby mohli skúmať gény ktoré vlastnia. Dnes môžeme použiť molekulárne markery aby sme našli gény záujmu kontrolujúce požadovaný fenotyp. Markery môžu byť priame alebo nepriame, pričom nepriame markery sa nachádzajú na chromozóme neďaleko génu záujmu (sú s génom vo väzbe), zatiaľ čo priame markery sú priamo časťou génu záujmu sami osebe. Ako zdroj molekulárnych markerov je možné používať najrôznejšie techniky schopné detekovať DNK polymorfizmus. Jednou z najstarších je technika založená na sledovaní polymorfizmu dĺžky restrikčných fragmentov (RFLP, z angl. restriction fragment length polymorphisms). Medzi hojne používané ďalej patria techniky sledujúce počet opakovaní krátkych repetícií, tiež zvané mikrosatelity (SSR, z angl. simple sequence repeats) a technika sledujúca jednonukleotidový polymorfizmus (SNP, z angl. single nucleotide polymorphisms). Akonáhle je priamy alebo marker vo väzbe s daným fenotypom lokalizovaný, charakterizovaný a sekvenovaný, môže byť použitá metóda zvaná polymerázová reťazová reakcia (PCR, z angl. polymerase chain reaction) k tvorbe kópií tejto špecifickej oblasti DNK v takom množstve, ktoré je detekovateľné a umožní vykonať príslušný test. Ďalší prístup používaný k detekcii markerov je založený na sekvenovaní DNK. DNK sekvenovanie je proces určujúci presné poradie báz A, T, C a G v danom úseku DNK (Acquaah 2012; Collard et al. 2008).

V tradičných šľachtiteľských programoch zameraných na odolnosť viniča k hubám prechádzajú semenáče krokom selekcie, kedy selekčný tlak je spôsobený umelou alebo prirodzenou infekciou. Takýto druh selekcie fenotypu funguje dobre, pokiaľ uvažujeme len o jednom zdroji odolnosti ležiacom na jednom lokuse genómu. Kombinovanie rôznych zdrojov rezistencie k jednému patogénu lokalizovaných na odlišných lokusoch genómu je veľmi žiadané, pretože môžeme predpokladať vyššiu udržateľnosť tejto odolnosti. Ale prostým sledovaním fenotypu tieto genotypy s kombinovanými lokusmi odolnosti môžu byť ťažko odlišiteľné. Aplikácia molekulárnych markerov, ktorésú vo väzbe s lokusmi ovplyvňujúcimi ich odolnosť, predstavuje možné riešenie tohto problému. V praxi šľachtiteľské programy fenotypovú a genotypovú selekciu často kombinujú. V prvom kroku je kontrolovaný fenotyp k eliminácii citlivých semenáčov z potomstva a v druhom kroku prichádza na rad MAS pre identifikáciu genotypov s pyramidizovanými génmi rezistencie (Eibach a Töpfer 2014).

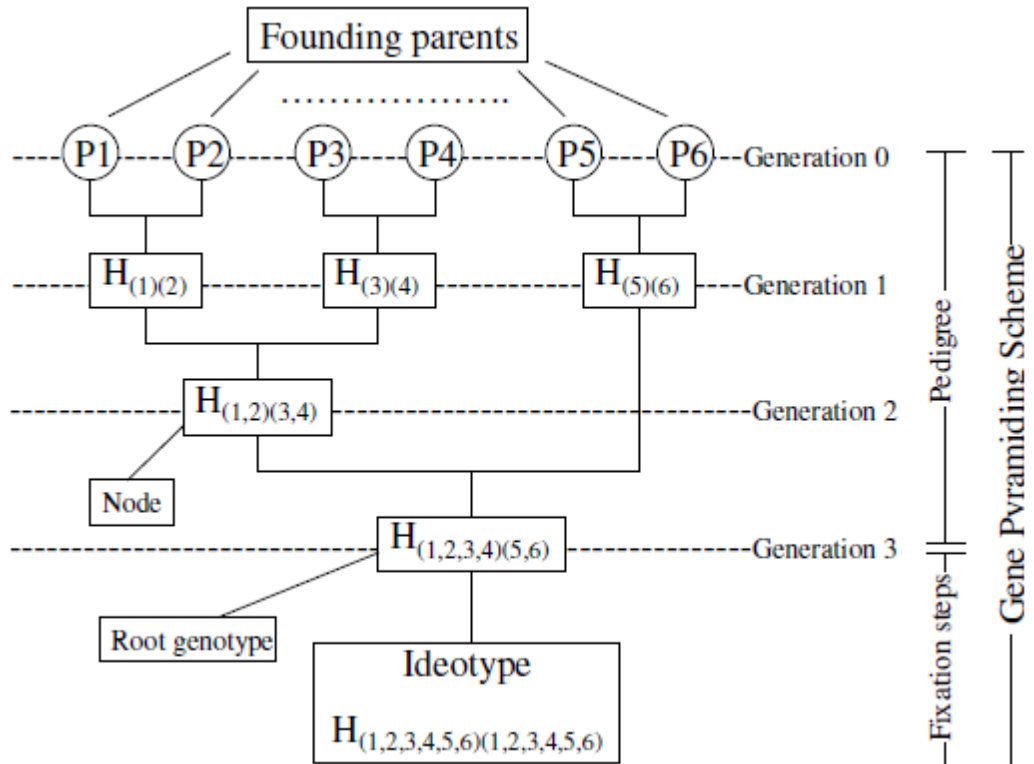
9.3 Pyramiding génov rezistencie

Stratégia pyramidizácie pozostáva v kumulovaní génov, určujúcich požadovanú vlastnosť, identifikovaných u viacero rodičov do jedného genotypu. Použitie DNK markerov umožňuje kompletnú a rýchlu identifikáciu génov v potomstve každej generácie, zvyšuje tak výrazne rýchlosť procesu pyramidizácie. Pyramidizácia génov sa obecne zameriava na vyšľachtenie ideálneho genotypu, ktorý by bol homozygotný v žiadaných alelách a na všetkých lokusoch. Schéma pyramidizácie (viď Obr. 5) môže byť rozdelená na dve časti. Prvá časť sa nazýva rodokmeň (pedigree), ktorá je zameraná na kumuláciu všetkých cieľových génov do jediného genotypu zvaného koreňový genotyp. Druhá časť je zvaná fixácia (fixation step), ktorá je zameraná na fixáciu cieľových génov do homozygotného stavu, to je vytvoriť ideálny genotyp z jediného genotypu. Každá vetva stromu sa nazýva prechodný genotyp a má dvoch rodičov. A každý z týchto prechodných genotypov môže byť rodičom pre ďalšie kríženie. Prechodné genotypy nie sú ľubovoľný potomkovia daného kríženia, ale je to presný genotyp vybraný spomedzi potomstva tak, že nesie všetky cieľové gény svojich rodičov. Krok „rodokmeňa“ je bežný, v kroku fixácie môže byť použitých niekoľko rôznych procedúr (Kumar Joshi a Nayak 2010).

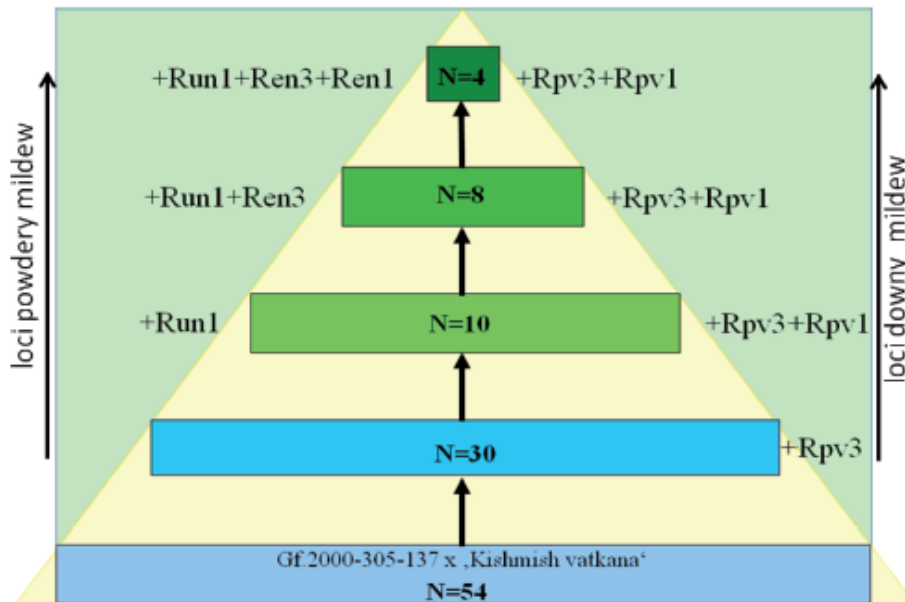
Najbežnejšie používané metódy produkcie homozygotných jedincov je tvorba rekombinantných príbuzných línií (RIL, z angl. recombinant inbred lines) a

populácií zdvojených haploidov (DH, z angl. doubled-haploid). S prístupnými frekvenciami rekombinácií medzi cieľovými génmi môže byť vypracovaný podiel žiadaného genotypu a použitím binomickej distribúcie potom vieme určiť minimálnu potrebnú veľkosť populácie. RIL ako aj DH môže byť použitá, pokiaľ potrebná veľkosť populácie je prakticky dosiahnuteľná a náklady na genotypovanie sú cenovo prístupné. Pokiaľ RIL ani DH nie sú realizovateľné, je nutná opakovaná selekcia vo viac ako jednej nasledujúcej segregáčnej generácii. V tomto prípade môže byť použité bezprostredné samoopelenie vo všetkých nasledujúcich generáciách. Avšak, samoopelenie koreňového genotypu vedie k porušeniu už založených väzieb medzi žiadanými alelami. Ďalšou možnosťou je kríženie s jedným z pôvodných rodičov. Výhoda kríženia s pôvodným rodičom je, že pravdepodobnosť získať genotyp, ktorý je homozygotný pre cieľové gény, ktoré vniesol pôvodný rodič a heterozygotný na ostatných cieľových alelách je vysoká. A preto cieľový gén nemusí byť následne fixovaný, čo zvyšuje pravdepodobnosť získania cieľového genotypu. Druhou možnosťou kríženia koreňového genotypu k získaniu ideotypu je kríženie so slepou líniou, ktorá neobsahuje žiadnu zo žiadaných alel. Použitie slepej línie zvyšuje šancu získania genotypu nesúceho všetky žiadané alely vo väzbe, a tak zvyšuje frekvenciu cieľového genotypu v nasledujúcich generáciách. Pokiaľ počet potrebných generácií a celková veľkosť populácie je príliš veľká a genotypovanie nie je prípustné, tak cieľ práce je príliš ambiciózný a nedosiahnuteľný a počet vrstvených génov musí byť znížený (Ye a Smith 2008; Kumar Joshi a Nayak 2010).

Ako príklad pyramidizácie génov viniča môžeme uviesť prácu Eibach et al. (2007), kde za použitia MAS bolo identifikované potomstvo kríženia medzi varietami VRH3082-1-42 a Regent. Selekcia bola cielená na genotypy nesúce lokus odolnosti k múčnatke a peronospóre Run1/Rpv1 zdedený od VRH3082-1-42, ako aj lokusy odolnosti k múčnatke Ren3 a peronospóre Rpv3 zdedené od rodiča Regent. Takto selektovaný genotyp bol použitý na ďalšie kríženie s odrodou Kishmish vatkana. Táto odroda pôvodom z Uzbekistanu nesie lokus odolnosti k múčnatke Ren1. Schéma na Obr. 6 znázorňuje procedúru MAS, ktorej výsledkom sú štyri genotypy s navrstvenými lokusmi odolnosti od oboch rodičov. Tieto genotypy vlastnia tri lokusy súvisiace s odolnosťou voči múčnatke a dva lokusy súvisiace s odolnosťou voči peronospóre. V nasledujúcom šľachtiteľskom kroku sa navrhuje pridať ďalší lokus odolnosti k peronospóre, aby sme získali pokiaľ možno vysoký stupeň odolnosti, ako aj vysokú udržateľnosť odolnosti voči obojoch chorobám (Eibach 2010).

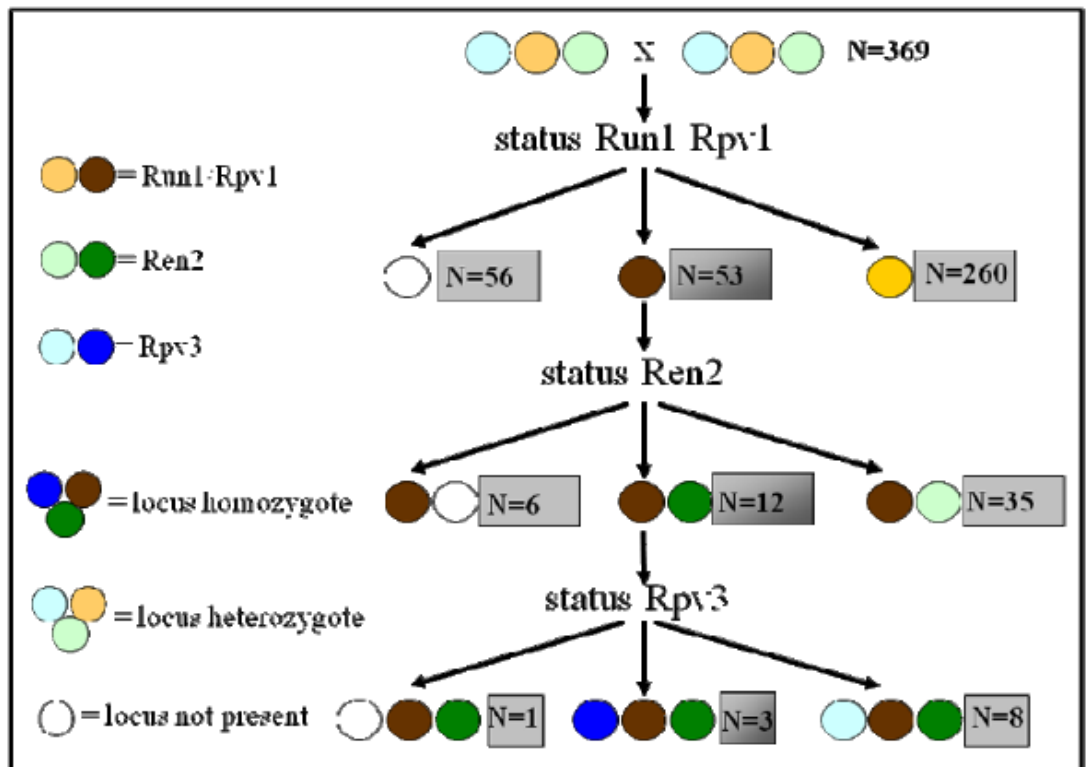


Obr. 5. Schéma pyramidizácie vzdialených génov kumulujúca šesť cieľových génov (Kumar Joshi a Nayak 2010).



Obr. 6. Schéma selekcie prechodného genotypu, nesúceho navrstvené lokusy odolnosti voči múčnatke a peronospóre, v potomstve kríženia variet Gf.2000-305-137 x Kishmish vatkana. Gf2000-305-137 disponuje lokusmy Run1, Ren3 (súvisiace s odolnosťou k múčnatke) a lokusy Rpv1 a Rpv3 (súvisiace s odolnosťou voči peronospóre). Kishmish vatkana disponuje lokusom Ren1 (spojený s rezistenciou k múčnatke). N predstavuje počet jedincov selektovaných z celej populácie potomstva tohto kríženia, ktorý zdedili sledovaný lokus. 54 jedincov (N=54) bolo selektovaných na základe testu fenotypu na odolnosť voči peronospóre a múčnatke. Metódou MAS bolo ďalej selektovaných 30 jedincov nesúcich lokus Rpv3. Ďalšími krokmi selekcie nakoniec získavame štyroch jedincov, ktorý zdedili všetky lokusy svojich rodičov (Run1, Ren1, Ren3, Rpv1 a Rpv3) (Eibach 2010).

Schéma na Obr. 6 predstavuje ukážku procesu selekcie prechodného genotypu, pričom po navrhovanom pridaní ďalšieho lokusu by sme rovnakým procesom získali koreňový genotyp. Pokiaľ by koreňový genotyp disponoval lokusmi Run1/Rpv1, Ren3 a Rpv3 a v kroku fixácie by sme zvolili samoopelenie koreňového genotypu, následnú selekciu ideotypu (genotypu nesúceho všetky žiadané gény v homozygotnom stave) by opisovala schéma na Obr. 7.



Obr. 7. Schéma identifikácie genotypov s homozygotnými lokusmi odolnosti, ktoré vznikli zo samoopelenia genotypu s pyramidizovanými lokusmi odolnosti Run1/Rpv1, Ren3 a Rpv3 (krok fixácie). Genotyp nesúci lokusy Run1/Rpv1, Ren3 a Rpv3 v heterozygotnom stave bol samoopelený. 53 semenáčov z celého potomstva obsahujúceho celkovo 369 semenáčov prešlo testom na homozygotnosť alel lokusu Run1/Rpv1. Z tejto skupiny 12 semenáčov zdedilo lokus Ren2 v homozygotnom stave a nakoniec 3 semenáče niesli všetky tri lokusy odolnosti v homozygotnom stave (Eibach a Töpfer 2014).

Použitie týchto ideotypov pre ďalšie šľachtenie by viedlo k potomstvu, v ktorom by všetky jedince niesli všetky dané lokusy odolnosti. To by posilnilo genetickú variáciu v šľachtení pre ďalšie znaky, ako sú vlastnosti kvality. Okrem vetiev s kompletnou homozygotnosťou vo všetkých lokusoch odolnosti, mohli byť identifikované aj ostatné semenáče s časťou homozygotných lokusov, čo môže byť takisto užitočné v ďalších šľachtiteľských programoch (Eibach a Töpfer 2014).

9.4 Elicitory pôsobiace na odolnosť viniča

Bakteriálne rhamnolipidy (ďalej len RL) boli nedávno charakterizované ako elicitory zapojené do nešpecifickej imunity viniča. RL pôvodom z *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia plantarii* spúšťajú silné obranné reakcie u viniča vrátane skorej bunkovej signalizácie ako je Ca²⁺ influx, produkcia reaktívnych foriem kyslíku a aktivácia MAP kináz. Tieto RL takisto indukujú širokú skupinu génov obrany vrátane niektorých génov kódujúcich syntézu PR proteínov a génov zapojených v dráhach biosyntézy oxylipínov a fytoalexínov a takisto boli schopné aktivácie PCD v listovom pletive viniča. RL takisto iniciujú aj obranné reakcie indukované inými elicitorami. Ošetrovanie viniča týmito RL indukuje odolnosť proti *B. cinerea*. Z húb pochádzajúce elicitory alebo ich deriváty sa osvedčili byť veľmi účinné v stimulácii prirodzenej imunity viniča. Dezacetylované deriváty chitínu (chitosan) spustili obranné reakcie a ochranu proti *B. cinerea* a *P. viticola*. β -1-3-glukan laminarín odvodенý z riasy *Laminaria digitata* je takisto účinný elicitor obranných reakcií v bunkách viniča pôsobiacich proti týmto dvom chorobám. Delaunoy et al. (2014) ďalej uvádza elicitory indukujúce odolnosť u viniča ako oligogalakturonidy, oligoglukuronany a cyklické oligosacharidy (cykloextríny).

Gessler et al. (2011) uvádza zvýšenie odolnosti viniča proti peronospóre pri ošetrovaní látkami ako chitosan, laminarín, laminarín sulfát, oligogalacturonid, β -aminobutánová kyselina, acybenzolar-S-methyl, fosetyl-Al. Taktiež organické doplnky a extrakty z rastlín, alebo mikroorganizmov ako vodný extrakt *Penicillium chrysogenum*, extrakt *Solidago canadensis*, *Aureobasidium pullulans*, a *Trichoderma harzanium* kmeň T39 boli všetky schopné zvýšiť odolnosť viniča k peronospóre.

Ako ďalšie elicitory indukujúce odolnosť viniča voči plesni sivej sú bakteriálne elicitory ako flagellin, harpin, ergosterol a elicitin pôvodom z *Pythium oligandrum*. Extrakt z riasy *Ulva armoricana* a rastlinný extrakt menom Milsana z *Fallopia japonica* boli hlásené ako látky indukujúce rôznu úroveň odolnosti k múčnatke. Proteínové hydrolyzáty zo sóje a kaseínu redukovali symptómy peronospóry indukciou génov spojených s obranou a produkciou fytoalexínov (Nesler et al. 2015).

Na rozdiel od veľkého počtu elicitorov študovaných v laboratórnych podmienkach, počet na trhu prístupných prípravkov zostáva obmedzený. Štúdie elicitorov v poľných podmienkach len zriedka vykazujú akceptovateľný účinok voči patogénom ako je napr. *P. viticola*. Štúdií elicitorov pôsobiacich na odolnosť viniča k *B.*

cinerea je zatiaľ len málo, čo je pravdepodobne dôvodom, že tu k boju voči *B. cinerea* nie je alternatívna cesta použitia elicitorov namiesto konvenčnej chemickej ochrany. V priebehu niekoľkých rokov bolo testovaných veľké množstvo komerčných produktov na indukciu odolnosti viniča voči múčnatke a peronospóre, avšak väčšina poskytla iba čiastočný efekt s vysokou variabilitou účinku. To by mohlo byť vysvetlené ich zložením, pretože obvykle predstavujú molekuly s širším módom účinku. Variabilita výsledkov by sa tiež mohla vzťahovať na vonkajšie podmienky a systém prostredie/rastlina/patogén. Tlak patogénu a vývojová fáza viniča hrá takisto kľúčovú úlohu účinku týchto látok. Momentálne neexistuje elicitor, ktorý by mohol nahradiť konvenčnú ochranu (Delaunoy et al. 2014; Gessler et al. 2011).

Na druhú stranu Nesler et al. (2015) prezentuje prvý dôkaz konzistentného účinku elicitorov založených na proteínoch voči *E. necator* v poľných podmienkach, počas troch sezón s rôznym tlakom choroby. Stupeň kontroly choroby bol veľmi vysoký na listoch aj strapcoch. Ako elicitor bola v tomto prípade použitá komplexná zmes extraktov z mäsa a kvasiniek.

V Tab. 3 môžeme vidieť zoznam niektorých prípravkov dostupných na trhu a výsledky testov ich účinku v poľných podmienkach.

Tab. 3. Účinnosť niektorých na trhu prístupných prípravkov na odolnosť viniča voči rôznym patogénom (Delaunoy et al. 2014).

Formulácia neúčinný samostatne znamená nedostatočne odlišný od neošetreného materiálu. Neúčinný až mierne účinný – variabilné výsledky, ktoré potrebujú ďalšie preskúmanie. Mierne účinný - o 20-30 % nižšia účinnosť ako pri konvenčnej ochrane. Dobrý stupeň účinnosti – podobá sa účinku fungicidov. Žiadna účasť na účinku – produkty použité v kombinácii s polovičnou dávkou fungicidu, pričom účinok sa bez prídavku produktov nemenil.

Obchodný názov (rok skúšky)	Výrobca/p redajca	Pôvod/účinná látka	Cieľový patogén	Stupeň účinnosti
Micill M500 (1984,1985)	Goëmar	Extrakt z riasy	Peronospóra	Mierny až dobrý
Protea (1991)	Euphytor	Extrakt z riasy	Peronospóra	Neúčinný
Cuivrol (1992)	Samabiol	Síran meďnatý, oligoelementy	Peronospóra	Žiadna účasť na účinku
ForMn 48 (1992)	Samabiol	Oligoelementy	Peronospóra	Neúčinný
Ulmasud (1990-1991-1992-1998)	Biofa	Algatholith	Peronospóra	Neúčinný
IN 91/41 (1994)	Intrachem	Fosforečnan draselný	Peronospóra	Mierny (strapce) až dobrý (listy)
Solucuire (1998)	Proval	Meď	Peronospóra	Žiadna účasť na účinku

Mycosin (1998-200)	Schaette	Extrakt z riasy, kamenný prach, íl, praslička	Peronospóra	Neúčinný až mierne účinný
Cellulase (1999)	Syigma	Enzýmy	Peronospóra	Neúčinný až mierne účinný
SILK (2001)	GMCR Agro	Abies siberica	Peronospóra	Neúčinný
Aminocuvre (2002)	Agriclean	Meď, aminokyseliny	Peronospóra	Žiadna účasť na účinku, fytotoxický
Osmobio (2002)	Agriclean	Hydroxid meďnatý	Peronospóra	Neúčinný
Fungifend (2001)	Lang	Fosfáty	Peronospóra	Neúčinný
Ferti Duo (2002)	UFAB	Meď	Peronospóra	Neúčinný a fytotoxický
Stifénia (2005-2006-2007)	SOFT	Senovka grécka	Múčnatka	Neúčinný
Stifénia (2005)	SOFT	Senovka grécka	Peronospóra	Neúčinný
Trafos Mg Ca Si (2007)	Tradecorp	Kyselina fosforečná, oligoelementy	Múčnatka	Mierny
Timorex (2007-2008)	Biomor	<i>Melaleuca altermifolia</i> (olej)	Peronospóra	Neúčinný
GC37 (1994)	Goëmar	Extrakt z riasy	Pleseň sivá	Žiadna účasť na účinku
Nettle manure (1998)	JC Chevalard	Neznámy	Peronospóra	Mierny
Tomaxsil (1999)	Sodifra	Okysličená voda	Peronospóra	Neúčinný
Abion (2001)	Nufram	Deriváty parafrínov	Peronospóra	Neúčinný
LBG 01F34 (2004)	De Sangosse	Kyselina fosforečná	Peronospóra	Dobrý
Milsana (2009)	KHH Bioscience	Extrakt z prasličky	Múčnatka	Mierny
Semafort (2007-2008)	Tribo technologies	Kyselina fosforečná, oligoelementy, riasy	Peronospóra	Neúčinný až mierne účinný
Stimulase (2004)	Agronutrition	Síran horečnatý, enzýmy <i>Trichoderma</i>	Múčnatka	Neúčinný až mierne účinný
Trafos Mg B Mn Fe (2007)	Tradecorp	Kyselina fosforečná, oligoelementy	Peronospóra	Dobrý
Trafos Mg Ca Si (2007)	Tradecorp	Kyselina fosforečná, oligoelementy	Múčnatka	Dobrý

10 Záver

Rastliny vyvíjajúce sa pod neustálym tlakom patogénov sa v prvom rade spoliehajú na trvalo prítomné bariéry, ako je hrúbka kutikuly a bunkovej steny, či konštitutívne zlúčeniny, ako fytoanticipíny. Hlavné hubové patogény viniča (*P. viticola*, *E. necator* a *B. cinerea* sú za vhodných podmienok veľmi úspešné v penetrácii a kolonizácii pletív citlivých odrôd viniča (*V. vinifera*), a to vďaka schopnosti produkovať efekty, ktoré potláčajú základné vrstvy vrodenej obrany týchto odrôd. Severoamerické a ázijské divoké druhy si v rámci koevolúcie s patogénom (peronospora a múčnatka) vyvinuli mechanizmy, ktoré po rozpoznaní daného efektora úspešne bránia penetrácii týmito parazitmi. Tieto reakcie môžu zahŕňať PCD, produkciu fytoalexínov (napr. resveratrol, pterostilben), PR proteínov a kalózy. I keď podobné reakcie môžeme pozorovať aj u citlivých odrôd, ich intenzita nie je dostatočná k zastaveniu rastu parazita. Štúdie genómu viniča nám umožnili odhaliť niektoré lokusy zodpovedné za dané mechanizmy rezistencie tohto druhu voči múčnatke (Tab. 2) a peronospóre (Tab. 1). Vedomostí ohľadom mechanizmov odolnosti viniča voči *B. cinerea* je významne menej v porovnaní k ďalším dvom chorobám. Dôkazom je, že napríklad zatiaľ u tejto choroby nebol odhalený žiadny systém typu gén proti génu. Akokoľvek, bola zistená inhibícia plesne sivej u niektorých druhov viniča založená hlavne na konštitutívnych látkach, ako je pterostilben a ďalšie konštitutívne fenoly.

Dostupnosť informácií o genóme viniča nám prináša príležitosť nových šľachtiteľských cieľov. Použitím vhodných molekulárnych markerov môžeme prenášať oblasti génov rezistencie medzi divokými a ušľachtilými odrodami viniča efektívnejšie (MAS a pyramiding). Avšak, aby boli tieto poznatky využiteľné v šľachtení a v systémoch vinohradníckej produkcie, je potreba zmapovať gény či genómové oblasti zodpovedné za dôležité poľnohospodárske vlastnosti. To by dovoľovalo šľachtiť nové odrody s podobnou alebo vyššou kvalitou bobúľ, akou disponujú pestované odrody a zároveň s optimálnou odolnosťou ku chorobám v danej pestovateľskej oblasti.

Elicitory (zväčša výťažky z rastlín, či mikroorganizmov) sú zlúčeniny schopné posilniť imunitný systém rastliny voči patogénom. Umelá indukcia rezistencie u citlivých odrôd viniča elicitorami je skúmaná už dlhší čas, ale jej využitie v poľných podmienkach bez použitia chemickej ochrany zatiaľ nie je možné. Preto je potrebné ďalšie skúmanie pôsobenia týchto látok v prirodzených podmienkach.

11 Súhrn a Resume

Rezistencia viniča voči hubovým chorobám – známe mechanizmy a molekulárne základy

Bakalárska práca je predovšetkým zameraná na popis známych mechanizmov odolnosti viniča hroznorodého (*V. vinifera*) a jeho príbuzných druhov (*V. spp*) voči hlavným trom hubovým chorobám, a to peronospóre (*P. viticola*), múčnatke (*E. necator*) a plesni sivej (*B. cinerea*). Takisto sleduje genetický základ týchto reakcií a šírku ich poznania. Stručne popisuje dané patogény a ich životný cyklus, ako aj botanický profil a pôvod viniča hroznorodého. Charakterizuje elicitory a ich pôsobenie v indukcii odolnosti viniča voči daným chorobám. Ďalej zhŕňa historický vývoj šľachtienia odolných odrôd viniča a predstavuje MAS a pyramidizáciu génov ako pokrokový nástroj šľachtienia rezistentných odrôd viniča.

Kľúčové slová: odolnosť viniča (*V. vinifera*), peronospóra (*P. viticola*), múčnatka (*E. necator*), plesen sivá (*B. cinerea*), šľachtienie viniča

Resistance of grapevine against fungal diseases – known mechanisms and molecular basis.

Bachelor's thesis is primarily focused on describing known mechanisms of grapevine (*V. vinifera*) resistance and its related species (*Vitis spp.*) against three main fungal diseases which are downy mildew (*P. viticola*), powdery mildew (*E. necator*) and grey mold (*B. cinerea*). It also observes genetic basis of these reactions and range of its general knowledge. It briefly characterize given pathogens and their life cycle as well as botanic profile and origin of grapevine. The work also characterize elicitors and their role within induction of grapevine resistance to these diseases. Further it summarize historical progress in breeding of resistant grapevine cultivars and introduce MAS and gene pyramiding as progressive tools in breeding of resistant grapevine varieties.

Key words: grapevine (*V. vinifera*) resistance, downy mildew (*P. viticola*), powdery mildew (*E. necator*), grey mold (*B. cinerea*), grapevine breeding

12 Zoznam použitej literatúry

ACQUAAH, George, 2012. Marker assisted selection. *Principles of Plant Genetics and Breeding* [online]. s. 424–435. ISSN 0014-2336. Dostupné z: doi:10.1002/9781118313718

BURRUANO, Santella, 2000. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist* [online]. roč. 14, č. 4, s. 179–182. ISSN 0269-915X. Dostupné z: doi:10.1016/S0269-915X(00)80040-3

COLLARD, Bertrand C Y, David J MACKILL a Phil Trans R Soc B, 2008. Marker-assisted selection : an approach for precision plant breeding in the twenty-first century Marker-assisted selection : an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* [online]. roč. 363, č. August 2007, s. 557–572. ISSN 0962-8436. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2007.2170

CREASY, G. L. a L. L. CREASY, 2009. History, uses and production. In: *Grapes* [online]. Wallingford: CABI, s. 1–10 [vid. 23. únor 2016]. ISBN 9781845934019. Dostupné z: doi:10.1079/9781845934019.0001

DELAUNOIS, Bertrand, Giovanni FARACE, Philippe JEANDET, Christophe CL??MENT, Fabienne BAILLIEUL, St??phan DOREY a Sylvain CORDELIER, 2014. Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. roč. 21, č. 7, s. 4837–4846. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-013-1841-4

EIBACH, R, 2010. Use of genetic diversity for grapevine resistance breeding. *Mitt ...* [online]. roč. 60, s. 332–337. Dostupné z: http://bundesamt.weinobstklsterneuburg.at/upload/downloads/332_2010.pdf

EIBACH, R. a R. TÖPFER, 2014. Progress in grapevine breeding. *Acta Horticulturae* [online]. roč. 1046, s. 197–210. ISSN 05677572. Dostupné z: doi:10.1007/BF00265585

EIBACH, R., E. ZYPRIAN, L. WELTER a R. TÖPFER, 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis - Journal of Grapevine Research*. roč. 46, č. 3, s. 120–124. ISSN 00427500.

ELAD, Y. (ARO, BET DAGAN, Israel.) a K. EVENSEN, 1996. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology (USA)* [online]. [vid. 6. duben 2016]. ISSN 0031-949X. Dostupné z: http://agris.fao.org/agris-

search/search.do?recordID=US9625290

ELAD, Y., B. WILLIAMSON, Paul TUDZYNSKI a Nafiz DELEN, 2007. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands [vid. 30. března 2016]. ISBN 978-1-4020-2624-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4020-2626-3

FISCHER, B. M., I. SALAKHUTDINOV, M. AKKURT, R. EIBACH, K. J. EDWARDS, R. T?PFER a E. M. ZYPRIAN, 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. roč. 108, č. 3, s. 501–515. ISSN 00405752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-003-1445-3

GADOURY, David M., Lance CADLE-DAVIDSON, Wayne F. WILCOX, Ian B. DRY, Robert C. SEEM a Michael G. MILGROOM, 2012. Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): A fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* [online]. roč. 13, č. 1, s. 1–16. ISSN 14646722. Dostupné z: doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x

GESSLER, Cesare, Ilaria PERTOT a Michele PERAZZOLLI, 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* [online]. roč. 50, č. 1, s. 3–44. ISSN 1593-2095. Dostupné z: doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360

GINDRO, Katia, Roger PEZET a Olivier VIRET, 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. roč. 41, č. 9, s. 846–853. ISSN 09819428. Dostupné z: doi:10.1016/S0981-9428(03)00124-4

HEINTZ, C. a R. BLAICH, 1990. Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist* [online]. roč. 115, č. 1, s. 107–117. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.1990.tb00928.x

JOHNSON, 2004. *Marker-assisted selection*. 2004.

KENNELLY, Megan M, David M GADOURY, Wayne F WILCOX, Peter A MAGAREY a Robert C SEEM, 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* [online]. 12., roč. 95, č. 12, s. 1445–52 [vid. 11. dubna 2016]. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-95-1445

KUMAR JOSHI, Raj a Sanghamitra NAYAK, 2010. Gene pyramiding-A broad

spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review* [online]. roč. 5, č. 3, s. 51–60. ISSN 1538-2273. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/BMBR>

LI, Xinlong, Jiao WU, Ling YIN, Yali ZHANG, Junjie QU a Jiang LU, 2015. Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* [online]. B.m.: Elsevier Masson SAS, roč. 95, s. 1–14. ISSN 1873-2690. Dostupné z: doi:10.1016/j.plaphy.2015.06.016

MARTINEZ, Fabian, Dominique BLANCARD, Pascal LECOMTE, Caroline LEVIS, Bernadette DUBOS a Marc FERMAUD, 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* [online]. roč. 109, č. 5, s. 479–488. ISSN 09291873. Dostupné z: doi:10.1023/A:1024222206991

MERDINOGLU, D a S WIEDEMAN-MERDINOGLU, 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta ...* [online]. [vid. 17. duben 2016]. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400112702>

MUGANU, Massimo a Marco PAOLOCCI, 2013. Adaptation of Local Grapevine Germplasm: Exploitation of Natural Defence Mechanisms to Biotic Stresses. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive* [online]. Dostupné z: doi:10.5772/51976

PAVLOUŠEK, P, 2011. *Pěstování révy vinné : Moderní vinohradnictví*. Praha: Grada publishing, a. s. ISBN 978-80-247-3314-2.

QIU, Wenping, Angela FEECHAN a Ian DRY, 2015. Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. *Horticulture research* [online]. roč. 2, č. April, s. 15020. ISSN 2052-7276. Dostupné z: doi:10.1038/hortres.2015.20

SAPKOTA, S D, Li-ling CHEN a Chin-feng HWANG, 2015. Genetic Study of *Botrytis* Bunch Rot Resistance in Grapevine. s. 149–152.

SCHWANDER, Florian, Rudolf EIBACH, Iris FECHTER, Ludger HAUSMANN, Eva ZYPRIAN a Reinhard TÖPFER, 2012. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* [online]. 1., roč. 124, č. 1, s. 163–76 [vid. 17. duben 2016]. ISSN 1432-2242. Dostupné z:

doi:10.1007/s00122-011-1695-4

SNOWDON, Rod, Wilfried LÜHS a Wolfgang FRIEDT, 2015. Brassica oilseeds: breeding and management. In: A. KUMAR, S. S. BANGA, P. D. MEENA a P. R. KUMAR, ed. *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement* [online]. Wallingford: CABI, s. 195–230. ISBN 9781780644837. Dostupné z: doi:10.1079/9781780644837.0000

SPIES, Christoffel F. J., 2005. The inoculum ecology of *Botrytis cinerea* in Rooibos nurseries. č. April.

STOTZ, Henrik U, Georgia K MITROUSIA, Pierre J G M DE WIT a Bruce D L FITT, 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in plant science* [online]. 8., roč. 19, č. 8, s. 491–500 [vid. 6. duben 2016]. ISSN 1878-4372. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2014.04.009

ŠAFRÁNKOVÁ, Ivana, 2007. *Poruchy, poškození a choroby révy vinné* [online]. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-100-5. Dostupné z: https://katalog.mendelu.cz/documents/91742?back=https://katalog.mendelu.cz/search?type=global&q=poruchy+a+po%C5%A1kozen%C3%AD+revy#?type=global&q=poruchy%20a%20po%C5%A1kozen%C3%AD%20revy&id=DDcHg_H

VALIUŠKAITĖ, Alma, Elena SURVILIENĖ a Danas BANIULIS, 2010. Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis* spp . isolated from horticultural hosts. *Agriculture*. roč. 97, s. 85–90.

VAN HEERDEN, Carel J., Phyllis BURGER, Abraham VERMEULEN a Renée PRINS, 2014. Detection of downy and powdery mildew resistance QTL in a „Regent" × „RedGlobe" population. *Euphytica* [online]. s. 281–295. ISSN 00142336. Dostupné z: doi:10.1007/s10681-014-1167-4

VENUTI, Silvia, Dario COPETTI, Serena FORIA, Luigi FALGINELLA, Sarolta HOFFMANN, Diana BELLIN, Petar CINDRIĆ, Pál KOZMA, Simone SCALABRIN, Michele MORGANTE, Raffaele TESTOLIN a Gabriele DI GASPERO, 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *PloS one* [online]. B.m.: Public Library of Science, 12.1., roč. 8, č. 4, s. e61228 [vid. 17. duben 2016]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0061228

VIVC, 2015. Traits and alleles relevant for breeding and genetics. *Jülius-Kühn Institut*. roč. 40024, s. 1–2.

WALTERS, Dale, David WALSH, Adrian NEWTON a Gary LYON, 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology* [online]. roč. 95, č. 16, s. 1368–1373. ISSN 0031-949X. Dostupné z: doi:10.1094/PHYTO-95-1368

WENG, Kai, Zhi-Qian LI, Rui-Qi LIU, Lan WANG, Yue-Jin WANG a Yan XU, 2014. Transcriptome of *Erysiphe necator*-infected *Vitis pseudoreticulata* leaves provides insight into grapevine resistance to powdery mildew. *Horticulture Research* [online]. roč. 1, č. August, s. 14049. ISSN 2052-7276. Dostupné z: doi:10.1038/hortres.2014.49

YE, Guoyou a Kevin F SMITH, 2008. Marker-assisted Gene Pyramiding for Inbred Line Development: Basic Principles and Practical Guidelines. *International Journal of Plant Breeding*. roč. 2, č. 1, s. 1–10.

13 Zoznam použitých obrázkov a tabuliek

Obr. 1. Mikroskopické sledovanie okolitých oblastí infekcie na spodne strane listu 120 hodín po inokulácii peronosporou (Gindro et al. 2003).....	20
Obr. 2. Mikroskopické sledovanie listu citlivej odrody viniča Chasselas infikovanej <i>P. viticola</i> (Gindro et al. 2003).	21
Obr. 3. Mikroskopické sledovanie listov rezistentnej odrody Solaris infikovaných <i>P. viticola</i> (Gindro et al. 2003)..	22
Obr. 4. Mechanizmus odolnosti viniča proti <i>E. necator</i> (Qiu et al. 2015).	29
Obr. 5. Schéma pyramidizácie vzdialených génov kumulujúca šesť cieľových génov (Kumar Joshi a Nayak 2010).	41
Obr. 6. Schéma selekcie prechodného genotypu (Eibach 2010).	41
Obr. 7. Schéma identifikácie genotypov s homozygotnými lokusmi odolnosti (krok fixácie) (Eibach a Töpfer 2014).	42
Tab. 1. Zistené lokusy znakov odolnosti viniča voči <i>P. viticola</i> (VIVC 2015)	25
Tab. 2. Zistené lokusy znakov odolnosti viniča voči <i>E. necator</i> (VIVC 2015)	31
Tab. 3. Účinnosť niektorých na trhu prístupných prípravkov na odolnosť viniča voči rôznym patogénom (Delaunois et al. 2014).	44