

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Variabilita populací *Plasmopara halstedii* v ČR

Bc. Tomáš Bartůšek

Diplomová práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Ochrana a tvorba životního prostředí

v prezenční formě studia

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

Olomouc 2015

Tato diplomová práce byla řešena na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty
Univerzity Palackého v Olomouci s podporou interních grantů UP
IGA_PrF_2014001 a IGA_PrF_2015-001.

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

V Olomouci dne

.....

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Tomáš Bartůšek

Název práce: Variabilita populací *Plasmopara halstedii* v ČR

Typ práce: Diplomová práce

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

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

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt: *Plasmopara halstedii* je biotrofním parazitem okolo 100 druhů rostlin z čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*), včetně zemědělsky významné plodiny slunečnice roční (*Helianthus annuus*). K boji s plísní je využívána chemická ochrana a šlechtění plodiny na rezistenci. Selekcční tlak však vede ke vzniku nových agresivních a odolných ras patogenu. Současné pojetí ochrany slunečnic tak není dlouhodobě udržitelné. Tato diplomová práce je zaměřena na studium vnitrodruhové variability *P. halstedii* v ČR a citlivosti izolátů vůči metalaxylu, který je účinnou složkou používaných fungicidů. Vnitrodruhová variabilita byla testována pomocí metody inokulace semenáčků (WSI) 15 linií diferenciačního souboru slunečnice. Pro studium českých izolátů byl rozšířený diferenciační soubor použit vůbec poprvé (dosud byly testy prováděny na 9 liniích). Testovány byly izoláty *P. halstedii* pocházející z České republiky z let 2013 a 2014. V roce 2013 byly v populacích *P. halstedii* identifikovány rasy 70471 (lokalita Lednice), 71461 (lokalita MENDELU-Lednice) a 71060 (lokality Olomouc–Holice a Brno). V roce 2014 potom rasy 70571, 71571 (lokalita Podivín) a 70060 (lokalita Olomouc–Holice). Pomocí metody listových disků (LDI) bylo zjištěno, že žádný z testovaných izolátů nevykazoval rezistenci vůči metalaxylu.

Klíčová slova: metalaxyl, *Plasmopara halstedii*, plíseň slunečnicová, rasa, rezistence, slunečnice

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Tomáš Bartůšek

Title: Populations variability of *Plasmopara halstedii* in the Czech Republic

Type of thesis: Master

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

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

The year of presentation: 2015

Abstract: *Plasmopara halstedii* is a biotrophic parasite of more than 100 plant species from Asteraceae family, including sunflower (*Helianthus annuus*). Fungicides and breeding for resistance are the main approaches used in the crop protection against *P. halstedii*. This forms a selection pressure resulting in new races with higher aggressiveness. The main objective of my thesis was to determine intraspecific variability and metalaxyl resistance of *P. halstedii* isolates, originating from the Czech Republic and collected in 2013 and 2014. Intraspecific variability of *P. halstedii* was studied by the whole seedling inoculation (WSI) method using an extended differential set of sunflower lines. Though 15 differentials of sunflower are already used in abroad, in the Czech Republic this approach was used for the first time (a set with 9 lines has been used so far). Among isolates collected in 2013 following races were determined: 70471 (from Lednice), 71461 (MENDELU-Lednice), and 71060 (Olomouc–Holic and Brno). Among those collected in 2014 races 70571 and 71571 (from Podivín) and 70060 (Olomouc–Holic) were determined. None of the tested isolates was found to be resistant to metalaxyl which is good news for the crop growers.

Keywords: metalaxyl, *Plasmopara halstedii*, race, resistance, sunflower downy mildew, sunflower

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

Seznam tabulek	viii
Seznam obrázků	ix
Poděkování	x
1. Úvod	1
2. Cíle práce	2
3. Literární úvod	3
3.1. <i>Plasmopara halstedii</i>	3
3.1.1. Nomenklatura a taxonomie <i>P. halstedii</i>	3
3.1.2. Životní cyklus <i>P. halstedii</i>	5
3.1.3. Hostitelský okruh <i>P. halstedii</i>	6
3.1.4. Vnitrodruhová variabilita <i>P. halstedii</i>	7
3.1.4.1. Metody inokulace semenáčků	8
3.1.4.2. Alternativní metody	9
3.1.5. Výskyt a vnitrodruhová variabilita <i>P. halstedii</i>	9
3.1.5.1. Výskyt a vnitrodruhová variabilita <i>P. halstedii</i> ve světě	10
3.1.5.2. Výskyt a vnitrodruhová variabilita <i>P. halstedii</i> v ČR	12
3.1.6. Rezistence <i>P. halstedii</i> vůči fungicidům	14
3.2. Plísňovitost slunečnice	15
3.2.1. Symptomy choroby	15
3.2.2. Přenos choroby	17
3.2.3. Ochrana slunečnic vůči plísňovitosti	17
4. Materiál a metody	19
4.1. Rostlinný materiál – <i>Helianthus annuus</i>	19
4.2. Příprava diferenčního souboru genotypů slunečnice	20
4.3. Sběr izolátů <i>P. halstedii</i> v terénu	21
4.4. Subkultivace a uchovávání izolátů <i>P. halstedii</i>	22
4.5. Identifikace ras <i>P. halstedii</i> pomocí metody inokulace semenáčků	23
4.6. Reakce izolátů <i>P. halstedii</i> na metalaxyl	26

5. Výsledky	28
5.1. Rasy <i>P. halstedii</i> zaznamenané v České republice v letech 2013 – 2014.....	28
5.2. Zastoupení ras v populacích <i>P. halstedii</i> v České republice v letech 2009 – 2014	35
5.3. Rezistence <i>P. halstedii</i> vůči metalaxylu.....	36
6. Diskuse	38
7. Souhrn	42
8. Seznam použité literatury	43

Seznam tabulek

Tabulka 1. Výčet zemí kde byla <i>P. halstedii</i> zaznamenána (www.eppo.int)	10
Tabulka 2. Seznam testovaných izolátů <i>P. halstedii</i>	21
Tabulka 3. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné	29
Tabulka 4. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné	30
Tabulka 5. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné	31
Tabulka 6. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2014 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné	32
Tabulka 7. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2014 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné	33
Tabulka 8. Souhrnný přehled otestovaných izolátů <i>P. halstedii</i>	34
Tabulka 9. Zastoupení ras v populacích <i>P. halstedii</i> v České republice v letech 2009 – 2014 (Bartůšek, 2013)	35
Tabulka 10. Výsledky testování <i>P. halstedii</i> na rezistenci vůči metalaxylu.....	36
Tabulka 11. Výsledky testování <i>P. halstedii</i> na rezistenci vůči metalaxylu.....	37

Seznam obrázků

Obrázek 1. <i>P. halstedii</i> A – sporangiofor, B – zoosporangia, C – uvolnění zoospor, B – zoosporangia, C – zoospory	5
Obrázek 2. Orientační mapa rozšíření <i>P. halstedii</i> ve světě.....	11
Obrázek 3. Orientační mapa výskytu <i>P. halstedii</i> v České republice	13
Obrázek 4. Symptomy způsobené <i>P. halstedii</i> A – zakrslost, B – chlorotická léze na listu, C – sporulace na spodní straně listu, D – sporulace po vniku zoospor do tkáně při sekundární infekci.	16
Obrázek 5. Slunečnice se sporulující <i>P. halstedii</i>	23
Obrázek 6. Semikvantitativní stupnice napadení rostlin <i>P. halstedii</i> . A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).....	25
Obrázek 7. Listové disky, A – listový disk se sporulací <i>P. halstedii</i> , B – listový disk bez sporulace <i>P. halstedii</i>	27

Poděkování

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literatury, užitečné rady a laskavou pomoc se psaním odborného textu; Mgr. Zuzaně Trojanové a Mgr. Romaně Pospíchalové za předání praktických zkušeností při práci v laboratoři; pracovníkům fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci - paní Drahomíře Vondrákové a Věře Zoubkové za pomoc při pěstování rostlin.

Děkuji také rodičům, přítelkyni a kamarádům za podporu, kterou mi poskytovali po dobu studia.

1. Úvod

V České republice jsou každoročně spotřebovány miliony tun přípravků na ochranu rostlin. Od roku 1996 spotřeba těchto látek roste a v roce 2013 dosáhla 5 519 828 kg/rok. Z toho jedna čtvrtina připadá na fungicidy a mořidla používaná v boji proti houbovým patogenům. Narůst spotřeby fungicidů je celosvětovým problémem, zatěžujícím životní prostředí (www.cenia.cz).

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. & De Toni (1888) česky vřetenatka slunečnicová či plíseň slunečnice je biotrofním parazitem rostlin z čeledi *Asteraceae* (hvězdicovitě). Jejím ekonomicky nejvýznamnějším hostitelem je *Helianthus annuus* L. (slunečnice roční). *P. halstedii* se v současnosti vyskytuje ve všech oblastech světa, kde je slunečnice pěstována, včetně České republiky. Na napadených slunečnicích způsobuje chorobu tzv. plísnovitost slunečnice (Kúdela et al., 2012). V zemědělských monokulturách slunečnic působí značné ekonomické ztráty a díky své schopnosti přežít v půdě až 10 let, je zařazena mezi karanténní choroby v ČR i EU (www.eagri.cz).

Ochrana pěstovaných slunečnic spočívá ve využívání rezistentních kultivarů slunečnic, moření osiva a aplikaci fungicidů. Na patogen je tak vytvářen neustálý selekční tlak, což vede k selekci nových izolátů *P. halstedii*, rezistentních k běžným koncentracím fungicidů. Stoupá také patogenní variabilita *P. halstedii*, kdy jsou infikovány další, dříve odolné, kultivary slunečnic. Vzhledem k vysoké adaptabilitě patogenu není současné pojetí ochrany slunečnic dlouhodobě udržitelné.

Pro udržení kontroly nad tímto patogenem je proto nutné monitorovat výskyt nových ras a spektrum jejich virulence, aby bylo možné na případné změny včas zareagovat.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo získání informací o aktuálním stavu populací *Plasmopara halstedii* v ČR.

Základem bylo zpracování literární rešerše o:

- problematice vnitrodruhové variability *P. halstedii* (popis jak na genové, tak na fenotypové úrovni fyziologických ras)
- výskytu a rozšíření ras *P. halstedii* ve světě a v České republice
- problematice vývoje diferenciacního souboru slunečnic a alternativních metod popisujících vnitrodruhovou variabilitu plísňě slunečnicové

Praktickými cíli práce bylo:

- podílet se na monitorování, sběru a testování izolátů *P. halstedii* na území ČR
- přemnožit nové linie rozšířeného diferenciacního souboru genotypů slunečnice (v prvním roce řešení DP)
- použít diferenciacní soubor slunečnice k determinaci ras dostupných izolátů *P. halstedii* ze sbírky Katedry botaniky PřF UP v Olomouci metodou inokulace celých semenáčků (v druhém roce řešení DP)
- zhodnotit výsledky, analyzovat a porovnat rasy určené pomocí stávajícího a rozšířeného diferenciacního souboru, vyvodit příslušné závěry

3. Literární úvod

3.1. *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. & De Toni (1888) je biotrofní mikroorganismus parazitující na některých planě rostoucích i kulturně využívaných rostlinách z čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité). Jejím nejvýznamnějším hostitelem je *Helianthus annuus* L. (slunečnice roční) na které způsobuje chorobu tzv. plísňovitost slunečnice (Kůdela et al., 2012). Devastující infekce poškozují klíčící i dospělé slunečnice a způsobují značné ekonomické ztráty. U napadených rostlin dochází ke snížení výnosu semen, nebo dokonce květy vůbec netvoří.

P. halstedii pochází ze Severní Ameriky, odkud byla nejspíše s osivem rozšířena do dalších částí světa (Virányi a Spring, 2011). Z nálezových dat vyplývá, že se v současnosti vyskytuje ve všech oblastech, kde je slunečnice pěstována (Gulya, 2007).

3.1.1. Nomenklatura a taxonomie *P. halstedii*

Poprvé byl tento patogen popsán v roce 1876 v Severní Americe W. S. Halstedem na *Eupatorium purpureum* L. (sadci červeném). O šest let později ho W. G. Farlow zařadil do rodu *Peronospora* a pojmenoval jako *Peronospora halstedii* Farl. Svůj současný a platný název *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni získal v roce 1888, když ho P. A. Saccard přejmenoval a přeřadil do rodu *Plasmopara* (Lebeda et al., 2006). O další přejmenování se pokusila Novotel'nova, která v polovině 20. století zavedla název *Plasmopara helianthi* Novot. Při pozorování *P. halstedii* ze Severní Ameriky a Evropy totiž zjistila rozdíly v jejich morfologii a fyziologii. Na základě toho rozlišovala 3 formy (formae speciales) f. *helianthi*, f. *perennis*, f. *patens* (Novotel'nova, 1962). Název však nebyl odbornou veřejností přijat s tím, že takovéto rozdělení je platné pouze v oblasti Krasnodar v Rusku, nikoli ve světě. V literatuře se tak můžeme setkat se třemi odbornými názvy tohoto patogenu, *Peronospora halstedii* Farl. (1882) *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni (1888) a *Plasmopara helianthi* Novot. (1962). Český odborný název není ustálený ani v současnosti. Setkáváme se s názvy jako plíseň slunečnicová, peronospora slunečnicová nebo vřetenatka slunečnicová. Podobně i choroba, kterou patogen způsobuje je nazývána různě. Můžeme narazit na název plísňovitost slunečnice, prosazovaný českými fytopatology na začátku

tisíciletí, ale i jiné. Posledním a v současnosti platným názvem je označení plíseň slunečnice (Kúdela et al., 2012).

Stejně jako nomenklatura tak i taxonomie tohoto mikroorganismu prošla složitým vývojem (Hudspeth et al., 2003). Řád *Peronosporales* a s ním i *P. halstedii* byly v minulosti taxonomicky několikrát přeraženy. Carl Linné řád *Peronosporales* v polovině 18. století zařadil do říše *Plantae*. V polovině 19. století byly zástupci řádu *Peronosporales* přesunuty Haeckelem do nové říše *Promista*, která sdružovala prakticky všechny jednobuněčné organismy. V roce 1996 byly peronospory Wittakrem zařazeny do říše *Fungi*. A konečně Cavalier-Smith je přesunul do říše *Chromista*. Poslední uvedené zařazení je platné i v současnosti (Lebeda et al., 2006). *P. halstedii* je tak nyní zařazena v říši *Straminipila*, podříši *Chromobiotae*, kmenu *Heterokonta*, oddělení *Bigyra*, pododdělení *Peronosporomycotina*, třídě *Peronosporomycetes*, podtřídě *Peronosporomycetidae*, řádu *Peronosporales*, čeledi *Peronosporaceae*, rodu *Plasmopara*. Můžeme se však dočkat dalších změn v taxonomii tohoto organismu, především díky poznatkům molekulární biologie.

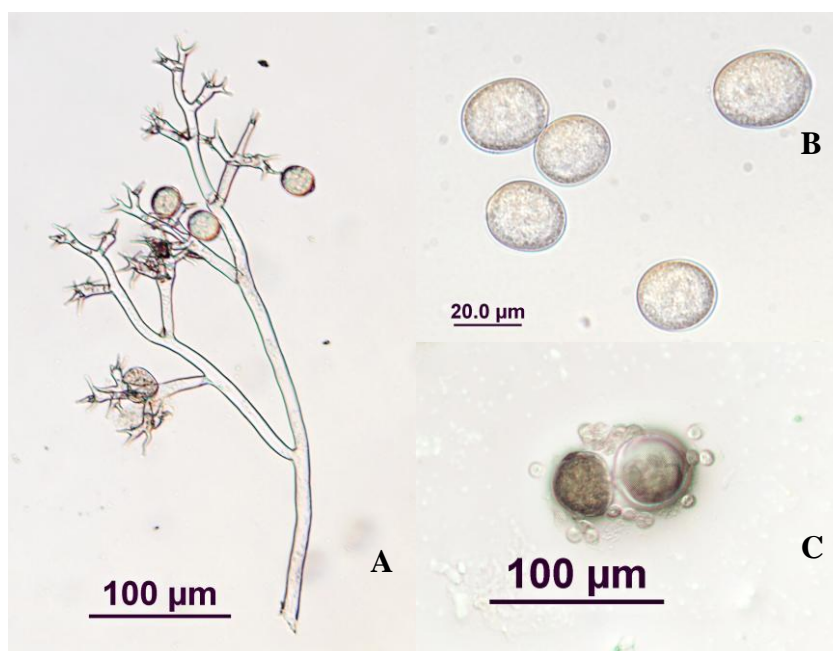
Hudspeth (2003) potvrdili molekulárními metodami rozdělení třídy *Peronosporomycetes* do tří podtříd: *Saproleginomycetidae*, *Rhipidiomycetidae* a *Peronosporomycetidae*. Ke změnám v taxonomii by mohlo dojít u čeledi *Albuginaceae*, která byla v minulosti považována za blízkou příbuznou s *Peronosporaceae*, avšak není tomu tak a mohla by být povýšena na samostatný řád. Naopak velkou příbuznost k peronosporám podle molekulárních dat vykazuje rod *Phytophthora*. Spory se vedou o monofyletickém původu peronospor. Zatím co Voglmayr (2008) monofyletický původ vyvrací, práce Göker (2006) ho potvrzuje.

Třída *Peronosporomycetes* zahrnuje v současnosti okolo 1000 druhů organismů (Lebeda et al., 2006). Kromě rodu *Plasmopara* zahrnuje čeleď *Peronosporaceae* několik dalších rodů, které jsou rovněž patogeny zemědělsky využívaných rostlin. Jednotlivé rody jsou rozděleny podle morfologických a ekologických synapomorfii. Větev sdružující peronospory s barevnými sporangii (rody *Peronospora* a *Pseudoperonospora*); s měchýřkovitými a elipsoidními haustorii (rody *Basidiophora*, *Bremia*, *Benua*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna* a *Protobremia*) a větev peronospor parazitujících na zástupcích čeledi *Brassicaceae* (rody *Hyaloperonospora* a *Perofascia*) (Göker et al., 2006). Rod *Plasmopara* se vyznačuje laterálně větvenými sporangiofory s tupě zakončenými větévkami.

V souvislosti s peronosporami můžeme v literatuře narazit na termín „fungi like organisms“, v českém překladu houbám podobné organismy. Toto označení nabralo na významu po tom, co byly peronospory přesunuty z říše *Fungi* do říše *Protista*. Tento termín naznačuje skutečnost, že peronospory taxonomicky nespádají do říše *Fungi*, avšak způsobem života, symptomy i významem jsou houbovým patogenům blízké. Peronospory se od hub liší například přítomností celulózy v buněčné stěně, bičíkatými stádii nebo trijdílným mastigonematem na jednom z bičíků (Dick, 2001).

3.1.2. Životní cyklus *P. halstedii*

Životní cyklus *P. halstedii* je rozdělen na pohlavní a nepohlavní fázi. Nepříznivé klimatické podmínky přežívá vřetenatka ve formě tlustostěnných, vytrvalých oospor, které vznikly na konci vegetační sezony pohlavním rozmnožováním. Oospory jsou obsaženy ve zbytcích těl hostitelských rostlin a v půdě. Tam přežívají až 10 let. Při vhodných podmínkách na začátku vegetační sezony vyklíčí z oospory vždy jeden zoosporangiofor nesoucí zoosporangium (Delanoë, 1972). Ze zoosporangia jsou uvolňovány do prostředí zoospory, které jsou ve vodním prostředí díky dvěma bičíkům schopné pohybu a chemotakticky vyhledávají pletivo hostitele (Obrázek 1.) (Virányi, 1988).



Obrázek 1. *P. halstedii* A – sporangiofor, B – zoosporangia, C – uvolnění zoospor.

Právě přítomnost vody je jedním ze základních předpokladů k tomu, aby došlo k tzv. primární infekci hostitelské rostliny. Při primární infekci pronikají zoospory do těla hostitele přes rhizodermis a kořenové vlášení. Dokážou ale překonat i epidermis a infikovat rostlinu prostřednictvím stonku nebo listu.

V hostiteli ze zoospor roste intercelulární nepřehrádkované mycelium, které prorůstá tělem rostliny směrem k jejímu vrcholu. Při ideálních podmínkách může dojít k systémové infekci, při které je napadena celá rostlina. Živiny získává patogen prostřednictvím haustorií, která prorůstají do buněk hostitele (Spring, 2001). Následující období prorůstá vřetenatka tělo svého hostitele a čeká na příznivé klimatické podmínky. Při vysoké vzdušné vlhkosti a teplotách okolo 17° C nastává sporulace. Při sporulaci stromečkovité zoosporangiofory prorůstají přes průduchy nebo epidermis ven z rostliny a vytváří zoosporangia. Ta jsou roznášena deštěm nebo větrem na jiné části hostitelské rostliny nebo na potencionální hostitele v jejím okolí. Téměř okamžitě dochází k uvolňování zoospor ze zoosporangií. Zoospory tentokrát častěji přes epidermis listů a stonku pronikají do těla hostitele. Právě v tomto okamžiku dochází k tzv. sekundární infekci hostitelské rostliny (Spring, 2001). V místě, kde zoospora pronikla do rostliny, vyrůstá intercelulární mycelium a tvoří ohraničenou lézi. Výjimečně mycelium prorůstá do dalších částí rostliny. Nikdy však neprorůstá směrem k zemi. Nemůže tak už dojít k systémové infekci (Mouzeyar et al., 1994). Mycelium při vhodných podmínkách znovu tvoří nové zoosporangiofory, zoosporangia a zoospory. Tento nepohlavní cyklus (sekundární infekce hostitelské rostliny) trvá za příznivých podmínek 14 dní a může proběhnout několikrát za sezonu. Na konci vegetační sezony dochází v pletivu hostitele k pohlavnímu rozmnožování vřetenatky, tzv. oogametangiogamii. Anteridia jsou hormonálně přitahována k oogoniím. Po jejich kontaktu vzniká oplozená oosféra a z ní se dále vyvíjí tlustostěnná oospora, která přezimuje a celý životní cyklus se opakuje (Spring, 2001).

3.1.3. Hostitelský okruh *P. halstedii*

Plasmopara halstedii je biotrofní parazit rostlin z řádu *Asterales* (hvězdicotvaré) zastoupený jedinou čeledí rostlin *Asteraceae* (hvězdicovitě). Její hostitelský okruh zahrnuje celosvětově přes 100 druhů rostlin z této čeledi. Je infekční pro rody *Ambrosia* (ambrozie), *Ageratum* (celestýna) *Artemisia* (pelyněk), *Aster* (hvězdice), *Bidens* (dvouzubec), *Centaurea* (chrpa), *Cineraria* (cinerarie), *Coreopsis* (krásnoočko), *Dimorphotheca* (dimorphotecie), *Erigeron* (turan), *Eupatorium*

(sadec), *Helianthus* (slunečnice), *Rudbeckia* (třapatka), *Scorzonera* (hadí mord), *Senecio* (starček), *Silphium* (mužák), *Solidago* (zlatobýl), *Tragopogon* (kozí brada), *Verbesina* (sporýšovka), *Verbena* (sporýš) a *Xanthium* (řepeň) a další (Walcz et al., 2000; Virányi, 2002; Spring et al., 2003). Ekonomicky nejvýznamnějším hostitelem *P. halstedii* je *Helianthus annuus* (slunečnice roční), konkrétně její zemědělsky využívané hybridy. Slunečnice byla v roce 2008 pěstována v 60 zemích světa na bezmála 23 milionech hektarů (FAO, 2008).

Ani v současnosti není jasné, jakou roli hrají planě rostoucí hostitelé ve vztahu k pěstovaným slunečnicím. Někteří autoři se přiklání k názoru, že planě rostoucí hostitelé napomáhají šíření a přežívání *P. halstedii* v přírodě (Agrios, 2005). Přenos choroby mezi komerčně pěstovanými slunečnicemi a planými druhy však zatím pozorován nebyl. Za významné hostitele z hlediska ekonomického a šíření choroby můžeme považovat též druhy využívané pro svůj estetický vzhled v zahrádkářství a krajinářství. Například autor Rivera (2014) popisuje decimaci porostu *Rudbeckia fulgida* (třapatka) v komerčních školkách na východě USA nebo autor Duarte (2013) na okrasném druhu *Gerbera jamesonii* (gerbera) ve státě Minas Gerais v Brazílii.

3.1.4. Vnitrodruhová variabilita *P. halstedii*

Studium vnitrodruhové variability *P. halstedii* začalo ve 40. letech 20. století. Savulescu (1941) a následně Savulescu a Vanky (1956) popsali dva mikrodrohy *P. halstedii* parazitující na slunečnicích v Rumunsku. Následně pak autor Yagodkina (1956) uvádí, že nová virulentní forma je příčinou velmi rychlého šíření tohoto patogenu v oblasti Krasnodar v severním Kavkazu (Orellana, 1970). Novotelnova (1962) na základě umělé inokulace a pozorování vzorků zjistila odlišnosti těchto ras v morfologii a fyziologii, od vzorků ze Severní Ameriky. Na základě toho rozlišovala tzv. „formae speciales“ (f. *helianthi*, f. *perennis*, f. *patens*). Její myšlenka však nebyla vědeckou společností přijata (Novotelnova, 1962). Od 70. let 20. století působila *P. halstedii* ztráty v zemědělství a ve stejném období byla také potvrzena existence ras tohoto patogenu. Podle místa vzniku byly rozlišovány dvě základní rasy. Evropská rasa, označovaná číslem 100 a rasa z USA, tzv. Red River Valley rasa, označovaná číslem 300. Určení ras bylo založeno na schopnosti patogenu překonat gen rezistence slunečnice PI1, který zajišťoval odolnost k Evropské rase (Zimmer, 1974).

Vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* se ve velkém začala rozvíjet s nástupem intenzivního pěstování slunečnice v Evropě a Severní Americe. Tento rozvoj byl

nejspíše reakcí patogenu na selekční tlak vytvořený masivním používáním fungicidů a šlechtěním rezistentních kultivarů slunečnice (Rashid, 1993). S růstem vnitrodruhové variability v dalších desetiletích nastal ve světě chaos. Neexistovala jednotná metoda určování, hodnocení ani pojmenování ras. Zlom pro studium vnitrodruhové variability *P. halstedii* nastal v roce 1991, kdy T. Gulya navrhl společnou metodiku pro určování ras *P. halstedii* (Gulya et al., 1991). Po devítiletém připomínkování a upravování se v roce 2000 světoví fytopatologové dohodli na jednotném diferenciacním souboru složeném z devíti kultivarů slunečnice a na metodice vyhodnocení a pojmenování ras pomocí tzv. tripletního trojmístného kódu. *P. halstedii* však pružně reaguje na selekční tlak a produkuje nové, virulentnější rasy. Původní používaný diferenciacní soubor už nebyl tyto rasy schopen rozlišit. Proto byl schválen návrh na rozšíření diferenciacního souboru o další dva triplety (Tourvieille de Labrouhe, 2012).

3.1.4.1. Metody inokulace semenáčků

V 70. letech 20. století byla potvrzena existence dvou ras *P. halstedii*, rasy 100 a rasy 300. Jejich identifikace spočívala ve schopnosti *P. halstedii* překonat gen rezistence slunečnice P11, který způsoboval rezistenci k rase 100 (Zimmer, 1974). Toto testování bylo předchůdcem dnešních testů. S rozvojem pěstování slunečnice jako zemědělské plodiny rostla vnitrodruhová variabilita *P. halstedii*. Na světě však neexistoval jednotný způsob identifikace nově vzniklých ras. Na to reagoval roku T. Gulya et al., (1991) který přišel s návrhem jednotné metodiky identifikace ras *P. halstedii*. Jeho diferenciacní soubor byl složen z 15 diferenciacních linií (HA–300, RHA–266, HIR–34, DM–2, RHA–325, HA–61, RHA–274, DM–4, DM–5, DM–6, HA–335, HA–337, RHA–340, HA–R4 a HA–R5), které obsahovaly různé varianty genu P1 (Gulya et al., 1991).

V roce 2000 se světoví fytopatologové na konferenci v Toulouse dohodli na úpravě a aktualizaci diferenciacního souboru. Nový diferenciacní soubor byl složen z 9 diferenciacních linií (HA–304, RHA–265, RHA–274, PMI–3, PM–17, 803–1, HAR–4, QHP–1 a HA–335).

Reakce na další rychlý vývoj populací *P. halstedii* přišla v roce 2012. Stávající diferenciacní soubor již nebyl schopen rozlišit nově vznikající rasy patogenu. Po bezmála deseti letech tak došlo k další aktualizaci diferenciacního souboru. Ten byl složen z 15 diferenciacních linií (GB, RHA–265, RHA–274, PMI–3, PM–17, 803–1, HAR–4, QHP–2, HA–335, Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, VAQ a RHA–419). Podrobné

molekulární charakteristiky genů rezistence v diferenciacních liniích zatím nejsou k dispozici (Tourvieille de Labrouhe, 2012). Podle Tourvieille de Labrouhe, (2012) bude nutné provádět změny v nomenklatuře a diferenciacním souboru každých 10 let.

3.1.4.2. Alternativní metody

Mezi alternativní metody identifikace ras *P. halstedii* patří metoda inokulace listových disků LDI (Leaf disk inoculation). Metoda inokulace listových disků funguje na podobném principu jako metoda inokulace semenáčků s tím rozdílem, že k testování nejsou používány celé rostliny, ale pouze listové disky z jejich listů. Metoda listových disků je méně náročná na spotřebu rostlinného materiálu, místo i čas, než metoda inokulace semenáčků (Sackton et al., 1998). Bartůšek (2013) však zjistil jisté nesrovnalosti výsledků při porovnání obou metod. Hlavním rozdílem je to, že při použití metody listových disků, je rostlina přopravena o hypokotyl nacházející se v jejím stonku, ve kterém dochází k hlavní obranné reakci rostliny.

Metodu 454 sekvenování použil ve své práci Falah et al. (2011) ke stanovení genetické odlišnosti ras 100, 304, 703 a 710.

Chen et al. (2005) analyzoval molekulární variabilitu 92 izolátů *P. halstedii* z 12 zemí světa pomocí TRAP marker techniky.

3.1.5. Výskyt a vnitrodruhová variabilita *P. halstedii*

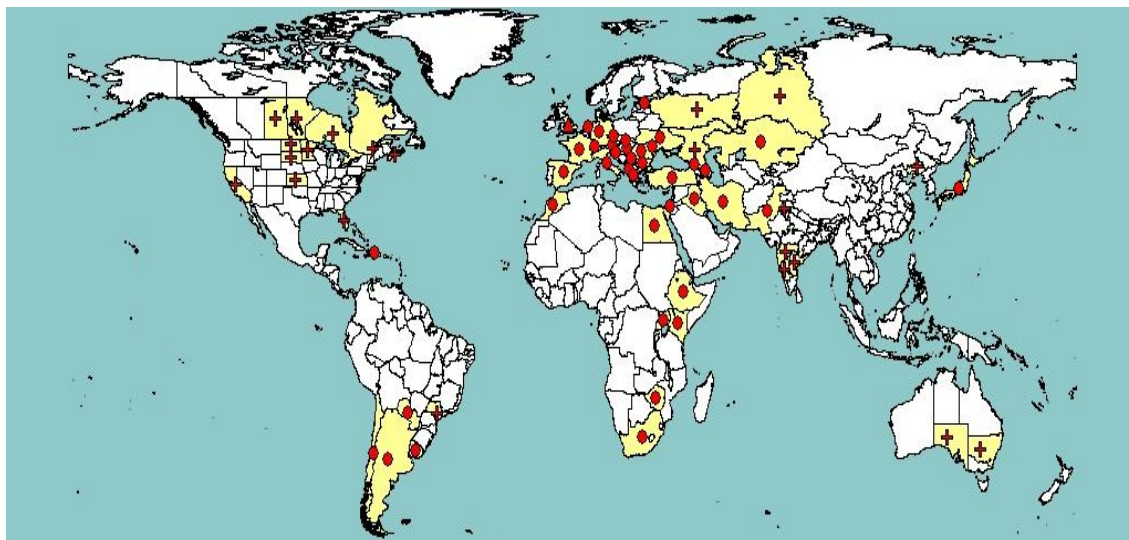
P. halstedii pochází ze Severní Ameriky, kde je známa největší rozmanitost ras tohoto patogenu. V současnosti je rozšířena ve všech oblastech pěstování slunečnice. Na hranici USA a Mexika se nachází primární centrum jejího rozšíření (Sackston, 1981). Odtud se *P. halstedii* rozšířila do Jižní Ameriky, Evropy a následně dál do světa (Virányi, 2002). Hlavní roli při šíření tohoto patogenu sehrál člověk. Při přepravě rostlinného materiálu mezi kontinenty dochází k šíření tohoto mikroorganismu (Gulya, 2007; Virányi, 2002; Virányi a Spring, 2011).

3.1.5.1. Výskyt a vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* ve světě

V Severní Americe bylo zjištěno 24 ras, v Evropě 21 ras, v Africe 10 ras, v Jižní Americe 5 ras a v Asii 5 ras. K roku 2007 bylo v rámci celého světa identifikováno celkem 36 ras (Gulya, 2007). Země s výskytem *P. halstedii* jsou v Tabulce 1. mapa výskytu *P. halstedii* ve světě je na Obrázku 2. I přes rychlou mikroevoluci *P. halstedii* a globalizaci, která usnadňuje přesun patogenu mezi kontinenty, existují rasy typické pro určité oblasti. Naopak některé rasy např. 100, 300, 330, 700, 703, 710, 730 a 770 jsou rozšířeny po celém světě. V současnosti není jisté, zda všech 36 ras stále existuje. V minulosti byly dominantní rasy 100 a 300, v současnosti však převládají virulentnější rasy 700, 710, 730 a 770. Vzhledem k principu testování ras pomocí diferenciačního souboru není jasné, zda jsou méně virulentní rasy 100 a 300 pouze maskovány rasami virulentnějšími, nebo došlo k jejich vymizení (Gulya, 2007).

Tabulka 1. Výčet zemí kde byla *P. halstedii* zaznamenána (www.eppo.int).

Oblast, kontinent	Stát
Evropa	Albánie, Rakousko, Bulharsko, Česká republika, Egypt, Estonsko, Francie, Německo, Maďarsko, Itálie, Moldavsko, Maroko, Polsko, Rumunsko, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko, Rusko, Ukrajina
Asie	Azerbajdžán, Čína, Gruzie, Indie, Irán, Irák, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Pakistán, Rusko, Turecko
Afrika	Egypt, Etiopie, Keňa, Maroko, Zimbabwe, Uganda
Severní Amerika	Kanada, USA (Kalifornie, Kansas, Minnesota, Severní Dakota, Jižní Dakota)
Střední Amerika, Karibik	Dominikánská republika
Jižní Amerika	Argentina, Brazílie, Chile, Uruguay, Paraguay
Oceánie	Austrálie pouze na <i>Arctotheca calendula</i> , pravděpodobně i Nový Zéland



Obrázek 2. Orientační mapa rozšíření *P. halstedii* ve světě.

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

Kanada měla v roce 2007 nejvíce popsanych ras. Byly zde identifikovány rasy 300, 310, 323, 333, 502, 563, 700, 702, 703, 710, 722, 723, 730, 731, 723, 733, 743, 770 a 772 (Gulya, 2007).

Ze států Jižní Ameriky je nejlépe zmapovaná situace v Argentině. Zde byly identifikovány rasy 300, 330, 700, 707, 710, 730 a 770 (Gulya, 2007).

Výskyt a vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* je detailně zmapována v Evropě. Ve Francii bylo k roku 2007 identifikováno 14 ras *P. halstedii*. Stejně jako v ostatních zemích byl i zde v 90. letech 20. století pozorován ústup ras 100 a 300. Postupem času byly objeveny rasy 304, 307, 314, 334, 700, 703, 704, 707, 710, 714, 717 a 730 (Gulya, 2007).

Ve Španělsku bylo od roku do roku 2007 identifikováno 8 ras. Patřili mezi ně rasy 100, 300, 310, 700, 703, 710, 730, 770 (Molinero-Ruiz et al., 2002).

V Itálii byla roku 1997 objevena rasa 100 a v roce 2004 rasa 300. T. Gulya (2007) ve svém článku informoval o rasách 700, 703 a 704, které byly na území Itálie zaznamenány.

V Maďarsku v současnosti dominují rasy 700, 710 a 730. Dále byly identifikovány rasy 100, 330 a 770 (Gulya, 2007). Posledními popsánymi rasami byly v roce 2014 rasa 704 (Bán et al., 2014) a rasa 714 (Bán et al., 2014).

V Bulharsku byly v letech 1991 až 1997 identifikovány rasy 100 a 300. Do roku 2005 však dominovala rasa 700. Další objevenou rasou byla 730 (Gulya, 2007).

V Rumunsku byly objeveny rasy 100, 300 a v roce 2006 pro tento stát nové rasy 310, 330 a 700 (Gulya, 2007).

Dobře prozkoumaný je výskyt a vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* v Německu. V roce 1994 zde byly objeveny rasy 100, 300, 730 a 770. Významná je identifikace rasy 770, která byla v Německu poprvé objevena mimo území USA. Do roku 1999 byly v Německu identifikovány ještě rasy 330 a 710. Gulya (2007) informoval o výskytu ras 310, 330, 700, 703 a 720.

V Srbsku byla do roku 1990 identifikována pouze rasa 100. V roce 1991 byla identifikovaná rasa 730 a v roce 1996 byla poprvé popsána rasa 700 a později v roce 2005 rasa 770. Z izolátů odeslaných k identifikaci do USA byly zjištěny rasy 710, 713 a 730 (Gulya, 2007).

V Rusku bylo do roku 2007 zaznamenáno 7 ras. V oblastech Severního Kavkazu převládali rasy 330, 710, 310, 700 a 730. V regionu Krasnodar byla nejčastěji identifikována rasa 710 spolu s rasami 330, 700 a 310 (Gulya, 2007).

Z izolátů pocházejících z Maroka identifikovali američtí vědci rasy 100, 300, 330, 730 a 732 (Gulya, 2007).

3.1.5.2. Výskyt a vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* v ČR

V roce 1956 a 1957 byla na území tehdejšího Československa poprvé zaznamenána *P. halstedii*. Bojňanský (1956, 1957) ji popsal v okresech Brno–venkov, Zlín, Bratislava a Nitra. V roce 1999 byl patogen opakovaně identifikován na experimentálním pozemku Mendelovy univerzity v Brně (Veverka a Křížková–Kudlíková, 2006). Intenzivní monitoring *P. halstedii* v naší republice začal v roce 2007. Od roku 2007 do roku 2012 bylo monitorováno 128 lokalit, přičemž výskyt patogenu byl potvrzen pouze na 7 z nich (Obrázek 3.) (Sedlářová et al., 2013). Na lokalitě v areálu Biocentra PřF UP v Olomouci–Holici byla v roce 2007 zjištěna rasa 700. V roce 2008 byla rasa 700 identifikována v areálu Biocentra PřF UP v Olomouci–Holici, na provokačním poli odrudové zkušebny ÚZKUZ v Brně–Chrlicích a na porostech slunečnice VÚZ v Kroměříži kromě rasy 700 i rasa 770. V roce 2009 přibyly další dvě lokality s výskytem *P. halstedii* u nás. Na poli u Podivína byly identifikovány rasy 700 a 770 a v UKZUZ Čáslav rasa 700.

Výzkum probíhající od roku 2010 do roku 2012 identifikoval na našem území rasy 700, 704, 710 a 714. Rasa 710 byla identifikována na pozemku v areálu Biocentra PřF UP v Olomouci-Holici, na poli u Podivína a na provokačním poli Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici.

Rasa 700 byla identifikována na pozemku v areálu Biocentra PřF UP v Olomouci-Holici a na na provokačním poli Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v Brně–Chrlicích. Rasa 704 byla identifikována u izolátů z provokačního pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici a z komerčního pole u Podivína. Rasa 714 byla zjištěna na poli u Podivína (Sedlářová et al., 2013).



Obrázek 3. Orientační mapa výskytu *Plasmopara halstedii* v České republice.

* místo potvrzeného výskytu *P. halstedii*

3.1.6. Rezistence *P. halstedii* vůči fungicidům

Při ochraně pěstovaných slunečnic proti *P. halstedii* hrají důležitou roli fungicidy. Mezi nejznámější patří metalaxyl a látky od něho dovozené, které jsou aplikovány formou postřiku nebo mořením osiva. Metalaxyl byl uveden na trh v roce 1979 a byl masivně používán nejen proti plísňovitosti slunečnice, ale také proti dalším chorobám, které způsobují ostatní druhy z řádu *Peronosporales*. Již v roce 1980 byla v Irsku popsána rezistence *Phytophora infestans* (Mont.) de Bary 1863 vůči této látce. Dlouhodobé a masivní používání metalaxylu, vedlo k vytvoření rezistence i u *P. halstedii*. V roce 1995 byla zaznamenána první rezistentní rasa *P. halstedii* ve Francii (Albourie et al., 1998). Gulya et al. (1999) informoval o první rezistentní rase v USA nalezenou v roce 1998 a následně tentýž autor popsal 190 izolátů s rezistencí získaných v roce 1999 (Gulya et al. 2002). Další tolerantní rasy byly popisovány např. v roce 2003 ze Španělska (Molinero Ruiz et al., 2003) a v roce 2005 z Německa (Spring et al., 2006). Studie, kterou provedl Baldini et al., (2008) signalizuje výskyt tolerantních ras i v severní Itálii.

Autor Albourie et al., (1998) popisuje rozdílnou účinnost fungicidních přípravků na primární a sekundární infekci rostlin v letech 1995 a 1996 ve Francii. Fungicidy propamocarb, fluazinam, folpet a mancozeb a směsi fungicidu dimethomorph, mancozeb, cymoxanil, mancozeb, obrace a folpet byl byly účinné proti primární infekci ale ne proti sekundární infekci. Směs metalaxylu s fluazinamem, folpetem nebo mancozebem byla účinnější proti primární infekci než samotný metalaxyl.

Výsledky rozsáhlé studie na účinnost fungicidů proti *P. Halstedii* byly zveřejněny v roce 2002 v USA. Třicet fungicidů bylo testováno v polních i skleníkových experimentech po dobu tří let. Žádný z testovaných fungicidů použitý samostatně nebo v kombinaci s jiným nepřinesl úplnou kontrolu nad patogenem (Gulya et al. 2002).

3.2. Plísňovitost slunečnice

Slunečnice je po řepce naší nejdůležitější pěstovanou olejnatou plodinou. V Evropě je tato rostlina známa již od 16. století. *P. halstedii* je patogen, který slunečnicím způsobuje chorobu tzv. plísňovitost slunečnice. Díky pěstování vyšlechtěných rezistentních kultivarů slunečnic není plísňovitost naší nejrozšířenější chorobou této plodiny (Čača et al., 1981). Ekonomické ztráty, které působí, však nejsou zanedbatelné. Od 70. let 20. století se díky monokulturnímu pěstování slunečnic plošně rozšířila (Virányi, 2002). Oospory *P. halstedii* přežívají v půdě až 10 let. Zamoří tak pozemek na dlouhou dobu a hrozí další šíření této choroby. Díky tomu patří plísňovitost slunečnice mezi významné onemocnění pěstovaných slunečnic a je zařazena jako karanténní choroba v celé EU (Delmotte et al., 2008).

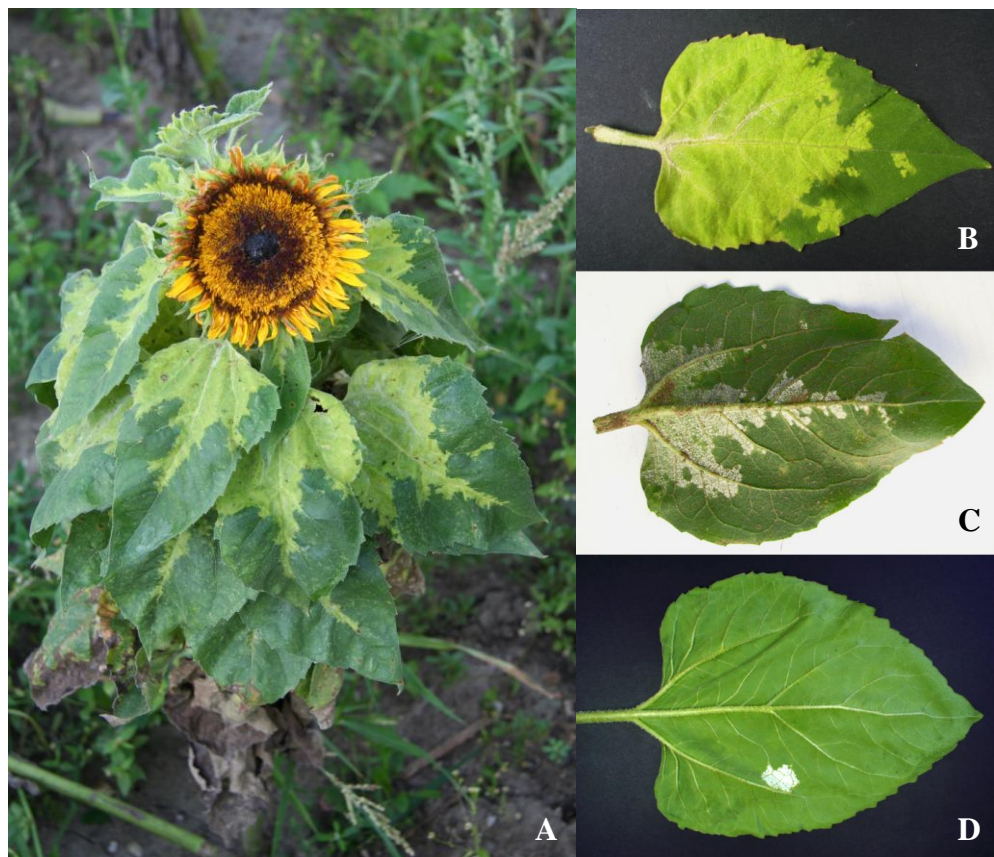
3.2.1. Symptomy choroby

Na slunečnicích napadených *P. halstedii* můžeme pozorovat různé symptomy. Projev choroby závisí především na stáří hostitele, odrůdové reakci, typu infekce, množství zoospor a klimatických podmínkách prostředí. Choroba se může projevit v průběhu celého života hostitele. Mezi nejdůležitější symptomy patří: 1/ padání klíčících rostlin, 2/ ohraničené chlórické léze na listech, 3/ zpomalený růst a následná zakrslost hostitele, 4/ deformace listů, 5/ bělavý až šedavý povlak zoosporangioforů na nadzemních částech rostliny, 6/ změny metabolismu hostitelské rostliny, 7/ smrt hostitele jako následek infekce (Spring et al., 1991; Spring 2001; Ljubich and Gulya, 1988). Typické symptomy jsou na Obrázku 4.

V zemědělské praxi je pro sílu a druh symptomů rozhodující typ infekce. Jinými slovy to, zda byla rostlina infikována tzv. primární nebo sekundární infekcí. Při primární infekci jsou klíčící semenáčky infikovány inokulem z půdy, což ve většině případů vede k systémové infekci hostitelské rostliny. Tato infekce má za následek padání klíčících rostlin způsobené nekrotickou stonkou a tvorbou bílého až šedého povlaku na děložních listech (Spring et al., 1991). Rostlinám, které tyto první příznaky přežijí, patogen prorůstá dál do těla. Napadené slunečnice jsou zakrslé s potlačeným růstem lodyh. Rostliny mají blízko nad sebou nadsazené listy a vzhledově působí hustým habitatem. Listy jsou deformované a podél listové žilnatiny dochází k tvorbě světle zelených až nažloutlých lézí (Šedivý et al., 1977). Jak patogen postupuje žilnatinou, dochází k tvorbě lézí od báze listu směrem k jeho špičce. Při vhodných

klimatických podmínkách dochází opět ke sporulaci, a to i na starších rostlinách. Bělavý až šedavý vyvýšený povlak se objevuje nejdříve na nejstarších listech, později na mladších. Většina infikovaných rostlin odumírá před dozráním semen. Úbory jsou malé, deformované a produkují neživotaschopná semena. Výnos klesá až o 75% (Čača et al., 1981).

Při sekundární infekci dochází k tvorbě chlorotických lézí v místě vniku zoospor do tkáně. Ze zoospor mohou znovu vyrůst zoosporangiofory a tvořit další bělavé povlaky. Sekundární infekce prostřednictvím zoosporangií je schopná v průběhu sezony vyvolat v rostlinách latentní (bezpříznakové) onemocnění (www.eagri.cz).



Obrázek 4. Symptomy způsobené *P. halstedii* A – zakrslost, B – chlorotická léze na listu, C – sporulace na spodní straně listu, D – sporulace po vniku zoospor do tkáně při sekundární infekci.

3.2.2. Přenos choroby

P. halstedii je přenosná třemi způsoby. Myceliem v zárodku semene, zoosporangiem a oosporami (www.eppo.int). Šíření choroby pomocí semen je popisováno spíše výjimečně. Ministerstvo zemědělství ČR (2008) uvádí informaci, že počet semen napadených *P. halstedii* je méně než 1% z 1000 semen ze systémově infikovaných slunečnic. Přesto se předpokládá, že díky infikovanému osivu byl patogen rozšířen mezi kontinenty (Viranyi and Spring, 2011).

Mnohem častější a běžnější je šíření choroby pomocí zoosporangií. Zoosporangia jsou do okolí hostitelské rostliny roznášena větrem nebo deštěm. V monokulturách slunečnic tak dochází k sekundárním infekcím a řetězová reakce nezřídka končí epidemií (Sackton, 1981).

Další způsob přenosu choroby je pomocí oospor, které jsou v půdě schopny přežít až 10 let (Sedlářová et al., 2010). Z toho důvodu je značně obtížné až nemožné chorobu eradikovat, pokud se v nějaké oblasti rozšíří (Eagri, 2008). Oospory jsou obsažené v půdě nebo ve zbytcích hostitelských rostlin a po lokalitě jsou rozšiřovány z pravidla dvěma způsoby. Prvním způsobem je šíření v půdním prostředí pomocí tekoucí vody. Druhým způsobem je šíření při obdělávání pozemku, např. vláčením nebo orbou. Oospory v půdě infikují rostliny a způsobují tzv. primární infekci (Spring, 2001).

3.2.3. Ochrana slunečnic vůči plísňovitosti

Ochrana pěstovaných slunečnic je založena na dodržování a zavádění fyto-sanitárních opatření a aplikaci principů ochrany rostlin. Mezi významná fyto-sanitární opatření patří zařazení *P. halstedii* mezi karanténní organismy v zemích EPPO (Evropská a středozevní organizace ochrany rostlin) (Delmotte et al., 2008). S tím jsou spojeny speciální požadavky EU na osivo slunečnice roční. Osivo musí pocházet z oblastí, kde se *P. halstedii* nevyskytuje, nebo musí být prokázáno, že bylo vhodně ošetřeno, pokud se nejedná o kultivar odolný všem známým rasám *P. halstedii*. Co se samotné ochrany rostlin týče, je doporučováno využít vždy kombinaci několika přístupů. Prvním přístupem je pěstování hybridů slunečnice odolných proti známým rasám *P. halstedii*. Druhým přístupem je aplikace fungicidů a třetím přístupem je dodržování agrotechnických opatření. Tedy nepěstovat slunečnici na jednom pozemku v rozmezí kratším než 10 let, používat certifikované osivo a dokonale zaorávat

zbytky rostlin po sklizni. U malých pozemků je vhodné aktivně vyhledávat infikované rostliny a včas je z lokality odstranit.

Tak jak uvádí Albourie et al. (1998), plísňovitost slunečnice můžeme mít do jisté míry pod kontrolou, pokud správně využíváme kombinaci ochrany rostlin a fyto-sanitární zásady. Problém nastává s novými rasami *P. heliothii*, které jsou schopné tuto ochranu překonat.

4. Materiál a metody

4.1. Rostlinný materiál – *Helianthus annuus*

Pro identifikaci ras *P. halstedii* byla použita metoda inokulace semenáčků (WSI). Testování probíhalo na rozšířeném diferenciacním souboru 15 genotypů slunečnice (Tourvieille de Labrouhe, 2012). Osivo pro testování bylo získáno vlastním přesevem z originálního osiva v létě 2014. Originální osivo diferenciacních linií poskytli Reinhard Zipper z Univerzity Hohenheim, Německo (HA-304, PMI-3 a QHP-1), Dr. Thomas Gulya z ARS USDA ve Fargu, Severní Dakota, USA (RHA-265, RHA-274, DM-2, PM-17, 803-1, HAR-4) a Prof. Karel Veverka z VÚRV Praha-Ruzyně (HA-335). A profesor Virányi (Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, VAQ, RHA-419). Vlastní osivo získané z přesevu bylo důkladně usušeno, vyčištěno a v semenářských sáčcích skladováno v mrazáku při teplotě -20 °C. Sáčky s diferenciacními liniemi, které byly každodenně používány pro testování, byly uloženy v lednici při teplotě -4 °C bez přístupu světla.

Pro udržování a množení izolátů *P. halstedii* a pro testování reakce *P. halstedii* na metalaxyl, byl používán kultivar *H. annuus* cv. Giganteus (Benary, Han.-Münden, Německo). Tento vyšlechtěný kultivar postrádá geny rezistence proti *P. halstedii* a je tak vhodný pro přemnožování tohoto patogenu.

Příprava semenáčků pro subkultivaci *P. halstedii*, identifikaci ras *P. halstedii* a testování reakce *P. halstedii* k metalaxylu probíhala následujícím způsobem. Semena slunečnice byla dezinfikována 15% roztokem Sava (Bochemie a.s., Bohumín, Česká republika) ve skleněné kádince. Pro lepší smáčivost semen byla do roztoku přikápnuta kapka Jaru (Procter & Gamble Czech Republic s.r.o.). Za občasného míchání byla ponořená semena v roztoku dezinfikována 15 minut a po uplynutí této doby byla 1 minutu proplachována proudem čisté vody a promnuta v dlaních. Vydezinfikovaná semena byla vložena do Petriho misky, na jejímž dně byl filtrační papír. Následně byla Petriho miska zalita destilovanou vodou tak, aby semena plavala. Po 3 hodinovém máčení bez přístupu světla byla přebytečná voda z misek vylita a semena byla rozmístěna tak, aby se nedotýkala. Klíčení semen probíhalo v uzavřených Petriho miskách při teplotě 20 °C bez přístupu světla po dobu 2 – 4 dnů. Stav semen byl kontrolován každý den a v případě kontaminace (*Rhizopus* sp., bakterie, plíseň) byla napadená semena odstraněna. Pro další použití, byla vybírána semena s 1 – 2 cm

dlouhým kořínkem a dobře vyvinutým kořenovým vlášením. Semenáčky vyschlé, kontaminované bakteriemi nebo mikromycetami, s poškozeným kořínkem nebo semenáčky příliš mladé (s kořínkem kratším než 1 cm) nebyly dále používány. Z vybraných semen bylo šetrně odstraněno osemení.

4.2. Příprava diferenciačního souboru genotypů slunečnice

Pro testy (test, kterým byla určena rasa jednoho izolátu) bylo použito osivo diferenciačních linií z přesevu. Přesev byl uskutečněn v roce 2014 na poli Katedry botaniky PŘF UP v Olomouci, Šlechtitelů 11, 78371 Olomouc–Holice a proběhl následujícím způsobem. Pozemek o rozměrech 8 x 22 m byl pokryt netkanou textilií. Do textilie byla nožem vyříznuta hnízda kruhového tvaru s průměrem 20 cm. Hnízda byla vytvořena v několika řadách. Řady byly od sebe vzdáleny 120 cm, přičemž rozteč mezi hnízdy v jednom řádku byla 70 cm. Výsev proběhl 12. 5. 2014. Do jednoho hnízda bylo vysazeno vždy 5 předklíčených semen jednoho genotypu slunečnice a hnízda byla označena cedulkou s názvem genotypu slunečnice. Příprava osiva je popsána v kapitole 5.1. Rostlinný materiál – *Helianthus annuus*.

Pro přesev bylo použito pouze originální osivo diferenciačních linií. Během růstu slunečnic byl pravidelně odstraňován plevel. Květenství slunečnic bylo před kvetením včas obaleno uhelonem, aby nedošlo k neplánovanému křížení jednotlivých kultivarů. K cílenému přenosu pylu mezi květenstvími rostlin stejného kultivaru byl použit štěteček. V období kvetení bylo opylení prováděno každý den. Po dozrání semen byla květenství slunečnic ostříhána a sušena na stinném, suchém místě při pokojové teplotě. Z usušených květenství byla ručně vybrána pouze kvalitní, životaschopná semena. Takto přebraná semena byla zatavena do semenářských pytlíků a skladována po dobu minimálně 3 týdnů v mrazáku při -4 °C. Po uplynutí této doby byl proveden test klíčivosti. Tento test probíhal následujícím způsobem. Padesát semen od každého kultivaru bylo připraveno způsobem popsaným v kapitole 5.1. Rostlinný materiál – *Helianthus annuus* Klíčivost byla vyjádřena v procentech vyklíčených semen z celkového počtu.

4.3. Sběr izolátů *P. halstedii* v terénu

Sběr izolátů *P. halstedii* v terénu realizovaly každoročně od roku 2007 do roku 2014 pracovníci Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením prof. Ing. Aleše Lebedy, DrSc. Seznam izolátů testovaných v této práci je v Tabulce 2. Od května do července byly monitorovány vytipované lokality na území České republiky. Pokud byla nalezena infekce *P. halstedii*, bylo postupováno následujícím způsobem. Z napadené slunečnice byl sterilními nůžkami odstřižen list se sporulující *P. halstedii*. Tento list byl položen na destilovanou vodu zvlhčený filtrační papír a uzavřen do plastové krabičky, aby nevysychal. Takto připravený izolát byl označen příslušným kódem. Téhož dne po sběru byly izoláty dále zpracovány v laboratoři. Část každého izolátu byla uložena jako originální vzorek do sbírky mikroorganismů Katedry botaniky PřF UP. Zbytek izolátu byl dále přemnožen nebo zmražen stejným postupem, který je uveden v kapitole 5.4. Subkultivace a uchování izolátů *P. halstedii*.

Tabulka 2. Seznam testovaných izolátů *P. halstedii*

Označení izolátu	Rok sběru	Název lokality
1303	2013	Lednice
1306	2013	Lednice
1307	2013	MENDELU – Lednice
1308	2013	Brno
1309	2013	Brno
1313	2013	Brno
1315	2013	Olomouc – Holice
1316	2013	Olomouc – Holice
1317	2013	Olomouc – Holice
1318	2013	Olomouc – Holice
1319	2013	Olomouc – Holice
1402	2014	Podivín
1406	2014	Podivín
1410	2014	Podivín
1418	2014	Olomouc – Holice
1419	2014	Olomouc – Holice
1420	2014	Olomouc – Holice

4.4. Subkultivace a uchovávání izolátů *P. halstedii*

Pro úspěšné testování *P. halstedii* je zapotřebí namnožit a uchovat izoláty sebrané v terénu. Subkultivace a skladování izolátů v laboratorních podmínkách probíhalo podle upravené metodiky Stojaspala (2009) a Bartůška (2013), jejímž původním autorem je Gulya (1991, 1996).

Subkultivaci můžeme rozdělit na čtyři hlavní části. Přípravu osiva pro inokulaci, inokulaci, pěstování rostlin a vyvolání sporulace. Přemnožení jednoho izolátu trvá 9 – 13 dní a bude popsáno v následujícím textu.

K subkultivaci *P. halstedii* byl použit kultivar *Helianthus annuus* cv. Giganteus postrádající geny rezistence vůči *P. halstedii*. Semena slunečnice byla připravována způsobem popsaným v kapitole 5.1 Rostlinný materiál – *Helianthus annuus*.

Inokulace, jinými slovy přenos patogenu na hostitele, probíhala následujícím způsobem. Zoosporangia byla získávána z čerstvých nebo zamražených listů *H. annuus* se sporulující *P. halstedii*. Zmražené listy byly ponechány několik minut při pokojové teplotě, aby rozmrzli. List s patrnou sporulací byl sterilní pinzetou vložen do plastové falkonky a zalit 1 – 5 ml destilované vody. K efektivnímu smývání zoosporangií byla použita třepačka (3x protřepáno po dobu 3 vteřin s nastavením na 1500 rpm). Omyté listy byly z falkonky odstraněny. Inokulum bylo dále upraveno tak, aby obsahovalo přibližně 10000 – 50000 živých zoosporangií na 1 ml. Do falkonky s inokulem byly vkládány připravené semenáčky a to tak, aby byly v suspenzi ponořeny. Samotná inokulace, tedy uvolnění zoospor a jejich průnik do pletiva hostitele, probíhala bez přístupu světla po dobu 3 hodin při 19 °C. Po 3 hodinách je inokulace dokončena a následovalo pěstování rostlin.

Inokulované semenáčky byly z falkonky pinzetou vysazeny do květináčků s Perlitem a pěstovány v kultivační skříně při teplotě 19 °C přes den, 17 °C přes noc s fotoperiodou 12/12 hodin po dobu 9 – 13 dní. Podle velikosti rostlin a závažnosti symptomů, byly rostliny po 9 – 13 dnech růstu, připraveny na vyvolání sporulace. Ta byla vyvolána následujícím způsobem.

Květináčky se slunečnicemi byly vloženy do plastových sáčků. Byl brán zřetel na to, aby se rostliny nedotýkali stěn sáčku. Stěny sáčku i rostliny byly následně zvlhčeny rozprašovačem s destilovanou vodou. Sáček s rostlinou byl zavázán, aby se uvnitř vytvořila 100% vlhkost a byl přesunut do kultivační skříně. Zde byl po dobu 16 – 24 hodin ponechán bez přístupu světla při teplotě 17 °C. Zoosporangia

vyrostlá na listech slunečnic byla dále použita k opětovnému přemnožení izolátu, nebo byla uchována pro další použití (Obrázek 5.) Pokud byly vzorky uchovávány, bylo postupováno podle následujícího postupu.

Děložní listy *H. annuus* byly sterilními nůžkami ostříhány a zabaleny do alobalu. Tyto balíčky byly následně umístěny buď do mrazáku -20 °C (pro krátkodobé skladování v řádech měsíců) nebo do mrazícího boxu -80 °C (pro dlouhodobé uchování v řádech let).



Obrázek 5. Slunečnice se sporující *P. halstedii*

4.5. Identifikace ras *P. halstedii* pomocí metody inokulace semenáčků

Identifikace ras *P. halstedii* probíhala pomocí metody inokulace semenáčků – WSI (whole seedling inoculation) popsanou v práci Gulyi et al., (1991, 1998). K testování byl použit rozšířený diferenciační soubor těchto genotypů slunečnic: (HA-304, PMI-3, QHP-1, RHA-265, RHA-274, DM-2, PM-17, 803-1, HAR-4, HA-335, Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, VAQ, RHA-419). Pro tzv. patotest, kterým byla určena rasa jednoho izolátu, bylo zapotřebí vždy 10 semenáčků od každé diferenciační linie. Příprava semenáčků probíhala dle postupu popsaném v kapitole 5.1. Rostlinný materiál – *Helianthus annuus*. Vždy 10 semenáčků od každé diferenciační linie bylo

vysázeno v řadách do tácu, který byl naplněný ze 2/3 zvlhčeným perlitem. Bylo dbáno na to, aby kořínek semenáčku směřoval kde dnu tácu a byl celý zasypaný substrátem. Z testovaného izolátu bylo následně vytvořeno inokulum (směs zoosporangií v destilované vodě). Postup přípravy inokula je popsán v kapitole 5.4. Subkultivace a uchování izolátů *P. halstedii*. Inokulum pro patotesty bylo připravováno vždy z čerstvých děložních lístků, nikoli ze zamražených. Koncentrace připraveného inokula byla zjištěna pomocí Bürkerovy počítací komůrky a spočítána podle vzorce

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

kde X = počet zoosporangií v 1 ml a Y = průměrný počet zoosporangií v 10 čtvercích Bürkerovy komůrky. Následně byl vypočítán objem směsi, který při dané koncentraci obsahuje cca 10 000 životaschopných zoosporangií a to podle vzorce:

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

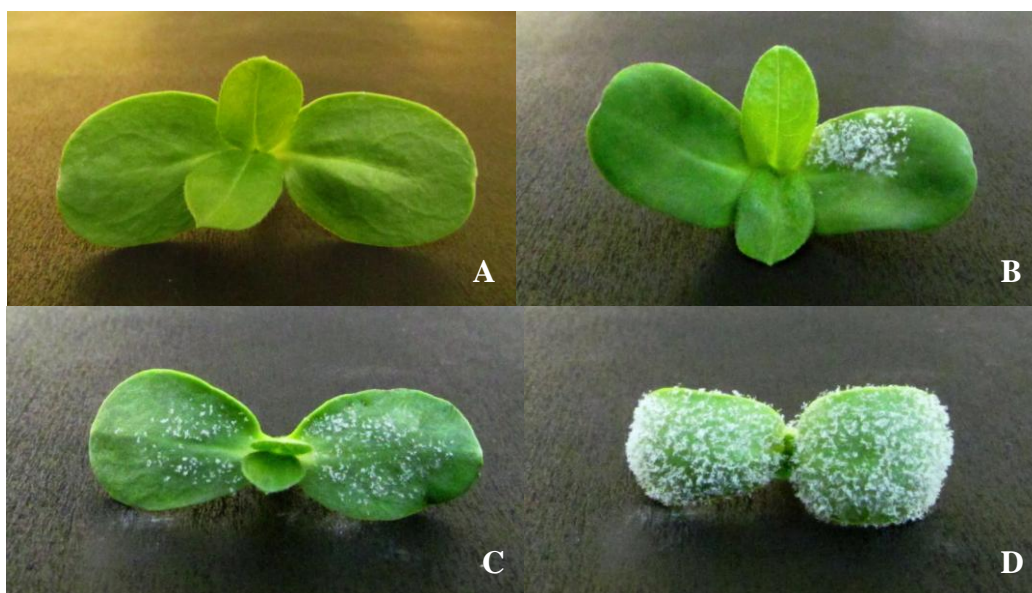
kde Z = objem inokula obsahující 10000 zoosporangií a X = počet zoosporangií v 1 ml. Objem inokula vhodný pro inokulaci je v rozmezí 15–30 µl. Pokud se vypočítaný objem pohyboval mimo toto rozmezí, bylo nutné inokulum zkoncentrovat přidáním dalších zoosporangií nebo ho naředit destilovanou vodou a znovu stanovit koncentraci a objem obsahující 10000 zoosporangií.

Pomocí automatické pipety, byl na každý semenáček patotestu napipetován objemem inokula, který obsahoval 10 000 zoosporangií. Aby byla zachována homogenní směs a nedocházelo k usazování zoosporangií, bylo inokulum před odebráním každé dávky protřepáno. Po dokončení inokulace všech semenáčků patotestu byla na stávající vrstvu substrátu nanесena další cca 0,5 cm silná vrstva zvlhčeného perlitu. Tác s rostlinami byl poté přemístěn do fytotronu a prvních 12–16 hodin byl kultivován bez přístupu světla při 17 °C. Po uplynutí této doby byl tác přemístěn do kultivační skříně. Růst rostlin probíhal při 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc. Rostliny byly pravidelně zalévány tak, aby na dně tácu byla neustále tenká vrstva vody. Třináctý den od inokulace byly vytvořeny vhodné podmínky pro sporulaci patogenu (tma a 100% vzdušná vlhkost). Tác byl vložen do neprůhledné plastové bedny s víkem a rostlinky byly pomocí rozprašovače navlhčeny destilovanou vodou. Uzavřená bedna s tácem byla přesunuta do fytotronu, kde byla při 17 °C ponechána 24 hodin. Čtrnáctý

den probíhalo hodnocení. Pomocí semikvantitativní stupnice byla odhadnuta míra napadení každé rostliny (Obrázek 6.). Podle toho, na kolika procentech plochy děložních lístků se vyskytovala sporulace, byl rostlině přidělen jeden ze čtyř stupňů napadení. Následoval výpočet míry napadení pro každou z diferenciacních linií a to podle vzorce:

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

kde P = míra napadení diferenciacní linie, n = počet rostlin s příslušným stupněm napadení, v = příslušný stupeň napadení, x = rozsah stupnice, N = celkový počet hodnocených rostlin v diferenciacní linii.



Obrázek 6. Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *P. halstedii*. A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).

Podle procentuálně vyjádřené míry napadení jednotlivých diferenciacních linií bylo určeno, které linie jsou rezistentní a které naopak náchylné. Aby byl patotest považován za průkazný, musela být kontrolní linie cv. *Giganteus* napadena minimálně ze 70%. Ostatní linie byly hodnoceny následovně. Pokud byl stupeň napadení diferenciacní linie roven nebo větší než 50 %, byla tato linie hodnocena jako náchylná. Pokud byl stupeň napadení diferenciacní linie roven nebo menší než 30 %, byla linie

hodnocena jako rezistentní. Pokud se stupeň napadení diferenciační linie pohyboval v rozmezí 30 – 50 %, byly napadené rostliny diferenciační linie odebrány a použity jako zdroj zoosporangíí pro nový patotest. Pokud se procento napadení u diferenciační linie, ze které byl izolát přemnožen, zvýšilo, byl původní izolát považován za směs několika ras, ve které se nově přemnožená a testovaná rasa vyskytuje v nižší frekvenci. Poslední částí experimentu bylo přiřazení třímístného kódu podle pravidel tripletového kódovacího systému, čímž byla určena a pojmenována rasa testovaného izolátu.

4.6. Reakce izolátů *P. halstedii* na metalaxyl

Reakce izolátů *P. halstedii* na metalaxyl byla testována metodou listových disků – LDI (leaf disc inoculation), kterou popsali Rozynek a Spring (2001). Jako první tuto metodu použil Sackston et al. (1988). Osivo bylo připraveno způsobem popsáním v kapitole 5.1. Semenáčky byly vysázeny do plastových květináčů s Perlitem (Agroperlit, Nový Jičín, Česká Republika) a pěstovány ve skleníku po dobu 14 dní. Rostlinky byly během pěstování 1x týdně přihnojeny hnojivem značky Kristalon (Agro CS a. s., Říkov, Česká Republika).

Z vypěstovaných rostlin byly sterilní pinzetou a nůžkami ostříhány děložní lístky. Z nich byly korkovrtem vyřezány kruhové listové disky s průměrem 6 mm. Ihned po vyřezání byly disky vloženy do kádinky s destilovanou vodou, aby došlo k vyplavení fenolických látek a sekundárních metabolitů. Samotný metalaxyl test probíhal na plastové kultivační destičce s 24 komůrkami (Nunc 24–well Multidish). Do komůrky A1 – B6 v horní polovině destičky bylo napipetováno 900 μ l destilované vody. Do komůrek C1 – D6 ve spodní části plata bylo nepipetováno 900 μ l roztoku metalaxylu (N–(2,6–Dimethylphenyl)–N–(methoxyacetyl)–D–alanine methyl ester, analytical standard, Fluka) o koncentraci 10 mg/l. Listové disky byly osušeny mezi dvěma vrstvami buničiny. Disky zlomené nebo jinak mechanicky poškozené nebyli dále používány. Poté byl do každé komůrky vložen jeden listový disk a to tak, aby plaval na své svrchní (adaxiální) straně. Inokulum bylo připraveno způsobem již popsáním v kapitole 5.4. Subkultivace a uchování izolátů *P. halstedii*. Určení ras izolátů metodou WSI. Inokulum bylo upraveno tak, aby 10000 sporangií v objemu 10–15 μ l. Vypočtený objem inokula byl opatrně pipetován na střed každého z plovoucích listových disků a to tak, aby kapka inokula z disku nestekla. Abychom mohli pozorovat klíčivost spor, byla jedna dávka inokula nepipetována také přímo do destilované vody v levé horní komůrce A1 a jedna dávka do metalaxylu v levé spodní komůrce D1.

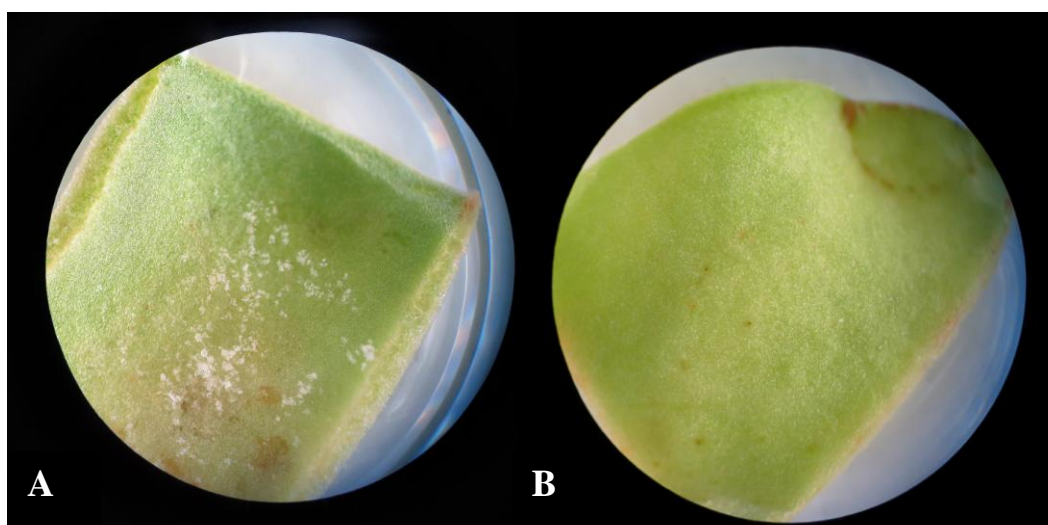
Takto připravené plato bylo ponecháno 12 hodin bez přístupu světla při 18–19°C. Po uplynutí 12 hodin bylo plato kultivováno při 18 19 °C s fotoperiodou den/noc 12/12 hodin.

Klíčivost zoosporangií byla hodnocena imerzním mikroskopem v komůrce A1 a D2 po 24 hodinách kultivace. Hodnocení probíhalo následujícím způsobem. V komůrce A1 a D1 bylo při zvětšení mikroskopu 100x nalezeno místo s homogenně distribuovanými sporangii. V zorném poli byla spočítána zvlášť zoosporangia která zoospory neuvolnila a zoosporangia prázdná, která vyklíčila. Klíčivost zoosporangií v metalaxylu a destilované vodě byla spočítána podle rovnice:

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

Kde C = klíčivost zoosporangií, A = nevyklíčených zoosporangií, B = počet vyklíčených zoosporangií.

Čtrnáctý den po inokulaci byl test vyhodnocen. Každý listový disk na platu byl kontrolován pod binokulární lupou, zda jsou přítomny zoosporangiofory *P. halstedii* (Obrázek 7.) Jako izolát rezistentní k metalaxylu byl označen ten, u kterého byly zoosporangia *P. halstedii* přítomny na 75 % listových disků kultivovaných v komůrkách C1 D6 s roztokem metalaxylu. Test byl označen jako průkazný, pokud byla zoosporangia přítomna na 75 % listových disků s destilovanou vodou (Spring et al., 1997).



Obrázek 7. Listové disky, A – Listový disk se sporulací *P. halstedii*, B – Listový disk bez sporulace *P. halstedii*.

5. Výsledky

5.1. Rasy *P. halstedii* zaznamenané v České republice

v letech 2013 – 2014

Pomocí metody inokulace semenáčků (WSI) bylo otestováno 17 izolátů *P. halstedii* získaných v letech 2013 a 2014. Celkem bylo identifikováno 6 ras patogenu a to rasy 70060, 70471, 70571, 71060, 71461, 71571. U izolátů pocházejících z roku 2013 byly zjištěny následující výsledky. Na lokalitě Lednice byla u dvou izolátů identifikována rasa 70471. Na lokalitě MENDELU–Lednice byla z jediného izolátu zjištěna rasa 71461. Tři izoláty z lokality Brno byly identifikovány jako rasa 71060. Na lokalitě Olomouc–Holicе byla zaznamenána rasa 71060 u všech 5 sebraných izolátů. U izolátů, které pocházely z roku 2014, byly zjištěny následující rasy. Na lokalitě Podivín byla identifikována rasa 70571 u jednoho izolátu a rasa 71571 u dvou testovaných izolátů. Na lokalitě Olomouc–Holicе byla u dvou izolátů identifikována rasa 70060 a u jednoho izolátu rasa 71060. Výsledky testování včetně procentuálně vyjádřeného stupně napadení jednotlivých diferenciačních linií jsou uvedeny v Tabulkách 3., 4., 5., 6. a 7. Souhrnný přehled výsledků všech testovaných izolátů je v Tabulce 8.

Tabulka 3. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciacní linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciacní linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů							
	1303	1303	1306	1306	1307	1307	1308	1308
GB	74	93	70	77	90	100	100	87
RHA–265	80	83	60	63	57	73	85	53
RHA–274	83	80	77	86	73	76	83	73
PMI–3	0	0	0	0	67	80	70	63
PM–17	0	0	0	0	0	0	0	0
803–1	0	0	0	0	0	0	0	0
HAR–4	0	0	0	0	0	0	0	0
QHP–2	0	0	0	0	0	0	0	7
HA–335	77	80	70	97	97	80	0	0
Y7Q	94	93	90	93	11	10	0	3
PSC8	100	87	87	100	84	93	76	100
XA	90	97	90	93	87	74	73	70
PSS2RM	87	80	93	83	94	80	0	7
VAQ	0	0	0	0	0	0	0	0
RHA–419	0	0	0	0	0	0	0	0
Giganteus	94	97	87	93	94	80	90	87
Rasa	70471	70471	70471	70471	71461	71461	71060	71060

^a osivo diferenciacní linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM–2, data nejsou uvedena) je diferenciacní linie vyhodnocena jako náchylná

^b osivo diferenciacní linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM–2, data nejsou uvedena) je diferenciacní linie vyhodnocena jako rezistentní

Tabulka 4. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označené diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů							
	1309	1309	1313	1313	1315	1315	1316	1316
GB	90	73	70	100	80	73	100	83
RHA–265	93	90	73	73	93	53	93	87
RHA–274	83	100	90	70	87	70	90	87
PMI–3	83	97	67	81	83	53^a	90	81
PM–17	0	0	0	0	0	0	0	0
803–1	0	0	0	0	0	0	0	0
HAR–4	0	0	0	0	0	0	0	0
QHP–2	0	3	0	0	0	0	0	3
HA–335	0	0	0	0	0	0	0	0
Y7Q	0	7	0	0	0	0	7	3
PSC8	73	80	80	93	63	73	97	73
XA	83	80	83	83	67	63	83	90
PSS2RM	7	3	0	0	0	0	0	7
VAQ	0	0	0	0	0	0	0	0
RHA–419	0	0	0	0	0	0	0	0
Giganteus	90	100	90	77	87	86	97	90
Rasa	71060	71060	71060	71060	71060	71060	71060	71060

^a osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM–2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

^b osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM–2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní

Tabulka 5. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2013 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označeny diferenciacní linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciacní linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů					
	1317	1317	1318	1318	1319	1319
GB	83	87	74	90	87	74
RHA-265	100	90	83	74	83	100
RHA-274	89	83	87	70	78	90
PMI-3	83	73	73	83	73	73
PM-17	0	0	0	0	0	0
803-1	0	0	0	0	0	0
HAR-4	0	0	0	0	0	0
QHP-2	0	0	0	0	0	0
HA-335	0	0	0	0	0	0
Y7Q	0	7	0	0	3	0
PSC8	87	87	74	73	77	94
XA	93	73	63	57	67	78
PSS2RM	0	0	0	0	0	0
VAQ	0	0	0	0	3	3
RHA-419	0	0	0	0	0	0
Giganteus	93	93	100	97	100	80
Rasa	71060	71060	71060	71060	71060	71060

^a osivo diferenciacní linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciacní linie vyhodnocena jako náchylná

^b osivo diferenciacní linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciacní linie vyhodnocena jako rezistentní

Tabulka 6. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2014 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označeny diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů					
	1402	1402	1406	1406	1410	1410
GB	94	97	100	100	100	100
RHA-265	100	100	100	87	67	84
RHA-274	100	70	90	87	73	100
PMI-3	0	20 ^b	80	77	73	90
PM-17	0	0	0	0	0	0
803-1	0	0	0	0	0	0
HAR-4	87	74	87	100	77	90
QHP-2	0	0	0	0	0	0
HA-335	100	100	100	100	90	100
Y7Q	94	100	80	100	67	94
PSC8	74	87	77	100	100	100
XA	64	100	70	84	80	90
PSS2RM	77	94	67	87	80	84
VAQ	0	0	0	0	0	0
RHA-419	0	0	0	0	0	0
Giganteus	84	97	90	100	83	80
Rasa	70571	70571	71571	71571	71571	71571

^a osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

^b osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní

Tabulka 7. Výsledky testů určení rasy izolátů z roku 2014 metodou inokulace semenáčků. Tučně jsou označeny diferenciační linie, které byly po vyhodnocení označeny jako náchylné.

diferenciační linie	Označení a stupeň napadení jednotlivých izolátů					
	1418	1418	1419	1419	1420	1420
GB	90	100	67	100	90	80
RHA-265	80	100	73	90	87	80
RHA-274	90	100	80	93	87	77
PMI-3	17 ^b	13 ^b	13 ^b	23 ^b	87	80
PM-17	0	0	0	0	0	0
803-1	0	0	0	0	0	0
HAR-4	13	26	13	27	23	7
QHP-2	0	0	0	0	0	0
HA-335	0	0	0	0	0	0
Y7Q	0	0	0	0	0	0
PSC8	100	90	74	94	90	84
XA	90	87	80	97	70	67
PSS2RM	0	3	0	0	0	0
VAQ	0	0	0	0	0	0
RHA-419	0	0	0	0	0	0
Giganteus	100	93	74	100	100	97
Rasa	70060	70060	70060	70060	71060	71060

^a osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako náchylná

^b osivo diferenciační linie reaguje nestandardně, po porovnání s kontrolou (DM-2, data nejsou uvedena) je diferenciační linie vyhodnocena jako rezistentní

Tabulka 8. Souhrnný přehled otestovaných izolátů *P. halstedii*.

Označení izolátu	Rok sběru	Lokalita	Rasa
1303	2013	Lednice	70471
1306	2013	Lednice	70471
1307	2013	MENDELU–Lednice	71461
1308	2013	Brno	71060
1309	2013	Brno	71060
1313	2013	Brno	71060
1315	2013	Olomouc–Holice	71060
1316	2013	Olomouc–Holice	71060
1317	2013	Olomouc–Holice	71060
1318	2013	Olomouc–Holice	71060
1319	2013	Olomouc–Holice	71060
1402	2014	Podivín	70571
1406	2014	Podivín	71571
1410	2014	Podivín	71571
1418	2014	Olomouc–Holice	70060
1419	2014	Olomouc–Holice	70060
1420	2014	Olomouc–Holice	71060

5.2. Zastoupení ras v populacích *P. halstedii* v České republice v letech 2009 – 2014

Zastoupení ras v populacích *P. Halstedii* v České republice v letech 2009 – 2014 je v Tabulce 9. Pro zachycení celkové situace byly použity výsledky, které publikoval Bartůšek (2013) a to pro roky 2009 – 2012. V letech 2013 a 2014 byly rasy identifikovány pomocí rozšířeného diferenciacního souboru. Z tohoto důvodu je v tabulce použit pouze kód získaný z prvních třech tripletů diferenciacního souboru.

Na lokalitě Olomouc–Holice byly během 6 let studie zaznamenány rasy 700 a 710. Zajímavá je situace na lokalitě Podivín. Z časové řady je patrné, že jsou zde prakticky každoročně identifikovány agresivnější rasy, než tomu bylo v roce předešlém. Lokalita Podivín má nejvyšší variabilitu ras ze sledovaných lokalit. Na lokalitě Brno byla jednou zaznamenána rasa 700 a dvakrát rasa 710. Tři rasy byly během 6 leté studie zaznamenány na lokalitě Lednice. Na lokalitě MENDELU Lednice byla *P. halstedii* zaznamenána pouze jednou v roce 2013 a jednalo se o rasu 714.

Tabulka 9. Zastoupení ras v populacích *P. halstedii* v České republice v letech 2009 – 2014 (Bartůšek, 2013).

Lokalita	Rok sběru a zjištěné rasy					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Olomouc – Holice	700	–	700, 710	710	710	700, 710
Podivín	700	710	700, 704, 714	704	–	705, 715
Brno	–	710	700	–	710	–
Lednice	–	–	700, 710	–	700, 704	–
MENDELU Lednice	–	–	–	–	714	–

5.3. Rezistence *P. halstedii* vůči metalaxylu

Metodou inokulace listových disků (LDI), kterou byly testovány izoláty *P. halstedii* na rezistenci vůči metalaxylu, byly zjištěny následující výsledky. U žádného z testovaných izolátů z let 2013 – 2014 nebyla prokázána rezistence vůči fungicidu metalaxyl. Výsledky jsou v Tabulce 10. a 11.

Tabulka 10. Výsledky testování *P. halstedii* na rezistenci vůči metalaxylu.

Označení izolátu	Reakce na metalaxyl	Procento listových disků napadených <i>P. halstedii</i>		Procento klíčících zoosporangií <i>P. halstedii</i>	
		Kontrola	Metalaxyl	Kontrola	Metalaxyl
1307	Náchylný	92	0	91	91
1307	Náchylný	83	0	92	91
1315	Náchylný	92	0	95	90
1315	Náchylný	83	0	92	98
1316	Náchylný	92	0	99	97
1316	Náchylný	83	0	100	90
1317	Náchylný	100	0	96	97
1317	Náchylný	92	0	93	97
1318	Náchylný	83	0	90	96
1318	Náchylný	92	0	97	98
1319	Náchylný	100	0	100	100
1319	Náchylný	92	0	96	99

Tabulka 11. Výsledky testování *P. halstedii* na rezistenci vůči metalaxylu.

Označení izolátu	Reakce na metalaxyl	Procento listových disků napadených <i>P. halstedii</i>		Procento klíčících zoosporangií <i>P. halstedii</i>	
		Kontrola	Metalaxyl	Kontrola	Metalaxyl
1402	Náchylný	75	0	98	93
1402	Náchylný	83	0	92	94
1406	Náchylný	83	0	97	98
1406	Náchylný	75	0	94	91
1410	Náchylný	83	0	96	99
1410	Náchylný	83	0	97	96
1418	Náchylný	92	0	92	94
1418	Náchylný	100	0	100	95
1419	Náchylný	75	0	90	92
1419	Náchylný	83	0	93	90
1420	Náchylný	92	0	94	100
1420	Náchylný	83	0	90	94

6. Diskuse

Během dvouleté studie bylo otestováno celkem 17 izolátů *P. halstedii* pocházejících z České republiky z let 2013 a 2014. Pro studium vnitrodruhové variability byla použita metoda inokulace semenáčků (WSI), kterou popsal ve své práci Gulya et al. (1991) a která je pro určování ras patogenu běžně používána jak v České republice, tak v zahraničí.

Nově byl pro testování použit rozšířený diferenciační soubor slunečnic, popsán Tourvieille de Labrouhe et al. (2012). Došlo tak ke změně nomenklatury ras. Doposud byly rasy označovány trojmístným kódem (Bartůšek, 2013). Po rozšíření a úpravě diferenciačního souboru jsou rasy nově označovány kódem pětímístným. Proto bude nutná revize všech dosud určených izolátů. Podle Tourvieille de Labrouhe et al. (2012) bude nutné provádět změny v nomenklatuře a diferenciačním souboru každých 10 let, kvůli rychle se měnící virulenci patogenu. Díky rozšíření diferenciačního souboru navíc vzrostla náročnost metody WSI na prostor, rostlinný materiál i čas.

Osivo používané pro testování bylo získáno z vlastního přesevu z originálního osiva. Původní diferenciační linie byly přemnoženy bez komplikací. Jako problematické se však ukázalo přemnožení nových diferenciačních linií PSS2RM a PSC8. I přes úsilí při pěstování, bylo z každé rostliny tohoto genotypu získáno pouze několik desítek použitelných, životaschopných semen.

Diferenciační linie PMI-3 reagovala během testování nejednoznačně. Proto byl do diferenciačního souboru přidán genotyp DM-2. Genotyp DM-2 nese stejné geny rezistence jako genotyp PMI-3. Sloužil tak jako plnohodnotná kontrola. Předpokládáme, že nejednoznačná reakce může mít dvě příčiny. První je skutečnost, že osivo používané pro testování, bylo získáno vlastním přesevem z osiva originálního. Nemůžeme tak vyloučit, že nedošlo ke zkřížení s některou z ostatních diferenciačních linií. Druhou příčinou může být sama nedokonalost vyšlechtěného genotypu. Kultivar PMI-3 je totiž náhradou za nejednoznačně reagující linii DM-2. Vzhledem k tomu, že v novém diferenciačním souboru genotyp PMI-3 zůstal zachován, je pravděpodobnější chyba v přesevu. Při hodnocení, zda je nebo není linie PMI-3 náchylná, byla rozhodující reakce kontrolní linie DM-2.

Pokud při testování některé linie reagovaly nejednoznačně, bylo z disků se sporulací vytvořeno inokulum a patotest byl zopakován. Tímto opatřením jsme vyvrátili podezření, že testovaný izolát je směsí několika ras.

Ze současné literatury vyplývá, že metoda inokulace semenáčků (WSI) je pro testování vhodnější, než alternativní metoda listových disků (LDI). Mouzeyar et al., (1993) totiž zjistil, že hlavní obranná reakce rostliny proti *P. halstedii* probíhá v jejím hypokotylu. Ten však při použití metody LDI chybí. Skutečnost, že obě metody mohou přinášet různé výsledky, potvrdil i Bartůšek (2013).

I po 15 letech vývoje metody WSI se liší názory vědců na hranici, kdy má být rostlina hodnocena jako náchylná a kdy jako rezistentní. Gulya et al. (1991) hodnotí náchylnost rostliny podle napadení děložních lístků. Tourvieille et al. (2000) bere jako stěžejní napadení pravých lístků. V této práci byla použita stupnice hodnocení podle sporulace od Lebedy a Petrželové (2010), původně vyvinutá pro *Bremia lactucae* (plíseň salátovou). V našich patotestech některé genotypy reagovaly jako slabě rezistentní nebo slabě náchylné.

Přes to, že je metodika inokulace semenáčků detailně zpracována v řadě odborných článků, a že se vědci snaží o její maximální unifikaci, je hodnocení a určení ras *P. halstedii* zčásti subjektivní činností, kterou ovlivňuje zkušenost a rutina výzkumníka. Kvůli výše zmíněným problémům se vědci snaží o vyvinutí molekulárních metod, které by tyto komplikace vyřešili (Intelmann and Spring, 2002; Roeckel–Drevet et al., 2003; Delmotte et al., 2008; As–sadi et al., 2011; Viranyi and Spring, 2011). Dosud však nebyly nalezeny markery pro spolehlivé odlišení vnitrodruhové variability *P. halstedii* (Thines et al., 2005).

Pro to, aby genetické analýzy přinášeli kvalitní data, je nutná homogenita genetického materiálu. V případě *P. halstedii* je využívána tvorba monozoosporických izolátů. Monozoosporický izolát je vytvořen z jediné zoospory, čímž je zajištěna jeho genetická homogenita. Vytvoření takového izolátu je však provázáno řadou problémů (Doudová, 2013).

K rozvoji molekulárních metod jistě přispěje i publikování sekvence genomu *P. halstedii*, který připravuje německý tým pod vedením dr. Marco Thinese (Sedlářová, 2015, ústní sdělení).

U českých izolátů pocházejících z roku 2013 byly zjištěny následující výsledky. Na lokalitě Lednice byla identifikována rasa 70471. Na lokalitě MENDELU–Lednice byla zjištěna rasa 71461. Na lokalitě Brno potom rasa 71060 a na lokalitě Olomouc–Holice rasa 71060. U izolátů, které pocházely z roku 2014, byly zjištěny následující rasy. Na lokalitě Podivín byly identifikovány rasy 70571 a 71571 a na lokalitě Olomouc–Holice potom rasy 70060 a 71060. I přes to, že byl rozšířený diferenciacní

soubor použit pro testování českých izolátů poprvé, je možné tyto výsledky porovnat s výsledky získanými v minulosti. Podle Tourvieille de Labrouhe (2012) má totiž linie HA-304 stejné geny rezistence jako GB a linie QHP-1 stejné geny rezistence jako QHP-2. I přes úpravu nomenklatury a změnu diferenciačního souboru, je tak možné porovnávat první trojčíslí kódu ras určených novým diferenciačním souborem s kódem získaným za pomoci diferenciačního souboru předchozího, neboť původní diferenciační soubor zůstal zachován až na linie HA-304 a QHP-1.

Na Lokalitě Lednice byly v letech 2009 – 2012 identifikovány rasy 700 a 710. Podle výsledků této práce byl pomocí rozšířeného diferenciačního souboru potvrzen výskyt rasy 700. Naopak rasa 710 znovu identifikována nebyla, ale byla zaznamenána rasa 704, která je pro tuto lokalitu nová. Na lokalitě Olomouc-Holice byly v letech 2009 – 2012 identifikovány rasy 700 a 710. Výskyt těchto dvou ras potvrdily i výsledky této studie. Na lokalitě Brno byly letech 2009 – 2012 identifikovány rasy 700 a 710. Naše studie potvrdila výskyt rasy 710. Na lokalitě Lednice-MENDELU byla zaznamenána rasa 714. Porovnatelná data k této lokalitě nejsou k dispozici.

Zajímavá je situace na lokalitě Podivín. Byly zde identifikovány rasy 705 a 715. Nebyly zde však nalezeny rasy identifikované v letech 2009 – 2013 a to 700, 704, 710 a 714. Vzhledem k tomu, že testování neprobíhalo z monosporických izolátů, je možné, že se pod rasou 715 ukrývá směs méně virulentních ras (Virányi a Gulya, 1995), nebo že rasy virulentnější vytlačují rasy méně virulentní. V úvahu musíme vzít také fakt, že *P. halstedii* přežívá v půdě až 10 let. Není tak vyloučeno, že se některá z dříve zaznamenaných ras, objeví na lokalitě v příštích letech. Bohužel se část lokality v Podivíně stala stavebním pozemkem a od jara 2015 zde probíhá výstavba rodinných domů, což výzkum v dalších letech komplikuje.

Z výsledků, které máme k dispozici z minulých let (Bartůšek 2013) plyne, že byly poprvé v České republice identifikovány rasy 705 a 715 a to na lokalitě Podivín. Nově byla identifikována rasa 704 pro lokalitu Lednice a rasa 714 pro lokalitu MENDELU-Lednice.

V Evropě bylo doposud zaznamenáno 14 ras *P. halstedii*. Například ve Francii byly doposud zaznamenány rasy 100, 300, 304, 307, 314, 334, 700, 703, 704, 707, 710, 714, 717 a 730 (Delmotte et al., 2012). V Maďarsku rasy 700, 704, 710, 714, 730, 100, 330 a 770 (Gulya, 2007; Bán et al., 2014). Ve Španělsku rasy 100, 130, 310, 330, 700, 703, 710, 730, 731 a 753 (Molinero-Ruiz et al., 2002). Nebo v Německu rasy 100, 300, 730, 770, 770, 330, 710, 310, 330, 700, 703 a 720 Gulya (2007). Vnitrodruhová

variabilita *P. halstedii* u nás je tak nižší a má výskyt plísně má pouze lokální význam v porovnání s ostatními státy Evropy.

Testování *P. halstedii* na rezistenci vůči fungicidu metalaxylu bylo negativní. V České republice se dosud nenašel izolát odolný vůči této látce, což je pozitivní zpráva. Vzhledem k situaci v Evropě můžeme však počítat s tím, že se tato situace do budoucna změní. Okolní státy jako Německo (Spring et al., 2006), Francie (Albourie et al., 1998) nebo Itálie (Baldini et al., 2008) rezistenci již zaznamenaly. Proto je nutný další výzkum, aby bylo možné na případné zjištění rezistentního izolátu včas zareagovat. Moření osiva fungicidy je totiž nejen v České republice považováno za jeden z významných způsobů boje s tímto patogenem.

Na závěr je třeba poznamenat, že *P. halstedii* je v České republice pod kontrolou díky dodržování karanténních opatření, používání fungicidů a dodržování osvědčených zemědělských postupů. Když už se u nás patogen vyskytne, jde nejčastěji o rostliny vyrostlé z výdrolu. Z nálezových dat plyne, že plísnovitost slunečnice není nejvýznamnějším onemocněním slunečnic u nás, na významu nabývá *Sclerotinia sclerotiorum* a *Botryotinia buckeliana*.

7. Souhrn

V této diplomové práci jsem se zabýval studiem vnitrodruhové variability *P. halstedii* a její rezistencí vůči fungicidu metalaxylu v České republice v letech 2013 a 2014. Osobně jsem se podílel na monitorování a sběru izolátů *P. halstedii* v terénu.

V prvním roce práce jsem přemnožil nové linie rozšířeného diferenciačního souboru genotypů slunečnice. Získané osivo jsem použil pro testování. Pomocí metody inokulace semenáčků (WSI) a nového, rozšířeného diferenciačního souboru genotypů slunečnic byly identifikovány rasy 70060, 70471, 70571, 71060, 71461, 71571.

Rezistence *P. halstedii* vůči metalaxylu byla testována pomocí metody inokulace listových disků (LDI). U žádného z testovaných izolátů nebyla rezistence zaznamenána.

8. Seznam použité literatury

- Agrios, G.N. (2005): Plant Pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press, Burlington, 922 p.
- Albourie, J.M., Tourvieille, J., Tourvieille de Labrouhe, D. (1998): Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. European Journal of Plant Pathology, 104: 235–242.
- As-sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M., Bordat, A., Boniface, M., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L., Vincourt, P. (2011): Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. BMC Genomics, 12: 498.
- Baldini, M., Danuso, F., Turi, M., Sandra, M., Raranciuc, S. (2008): Main factors influencing downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection in high-oleic sunflower hybrids in northern Italy. Crop Protection, 27: 590–599.
- Bán, R., Kovács, A., Körösi, K., Perczel, M., Turoczi, Gy. (2014): First Report on the Occurrence of a New Pathotype, 714, of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew) in Hungary. Disease Notes, 98: 1580.
- Bán, R., Kovács, A., Körösi, K., Perczel, M., Turoczi, Gy. (2014): First Report on the Increased Distribution of Pathotype 704 of *Plasmopara halstedii* in Hungary. Disease Notes, 98: 844.
- Bartůšek, T. (2013): Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii* a rezistence vůči metalaxylu v České republice. Bakalářská práce, 44 p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.
- Bojňanský, V. (1956): Peronospora slnečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. & de Toni) v ČSR. Pôlnohospodárstvo 3: 397–401.
- Bojňanský, V. (1957): Bude peronospora slnečnicová i u nás vážnou chorobou?. Za vysokou úrodu 6: 19.
- Čača, Z., Kolár, V., Novák, J.B., Závra, J. (1981): Zemědělská fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 344 p.

- Delanoë, D. (1972): Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). CETIOM Informations Techniques, 29: 1–49.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richars–Cervera, S., Mbaya, J., Vear, F., Tourvielle, J., Waleser, P., de Labrouhe, D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection Genetics and Evolution*, 8(5): 534–540.
- Dick, M.W. (2001): Straminipilous fungi. Kluwer Academic, Dordrecht Publisher, 670 p.
- Doudová, T. (2013): Techniky kultivace a izolace plísně slunečnicové. Diplomová práce, 46 p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.
- Duarte, L.L., Choi, Y.J., Barreto, R.W. (2013): First Report of Downy Mildew Caused by *Plasmopara halstedii* on *Gerbera jamesonii* in Brazil. *Disease notes*, 97(10): 1382.
- As-sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Paslier, M., Bordat, A., Boniface, M., Brunel, D., Gouzy¹, J., Godiard, L., Vincourt, P. (2011): Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics*, 12: 1–15
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Oberwinkler, F. (2006): How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 105–122.
- Gulya, T.J., Miller, J.F., Virányi, F., Sackston, W.S. (1991): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11–20.
- Gulya, T.J., Draper, D., Harbour, J., Holen, C., Knodel, J., Lamey, A., Mason, P. (1999): Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America. *Proceedings of 21st Sunflower Research Workshop*. National Sunflower Association: Bismarck, ND, USA: 118–123.
- Gulya, T.J. (2002): Efficacy of single and two-way fungicide seed treatments for the control of metalaxyl resistant strains of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In *The BCPC conference – pests and diseases 2002*, p. 575–581.

- Gulya, T.J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda A., Spencer–Phillips P.T.N. (eds.): Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings 2nd International Downy Mildews Symposium. Palacký University in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hané, p. 121–134.
- Gulya, T.J. (1996): Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. In: Proc. 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, U.S.A., 11.–12. 1. 1996, p. 39–48.
- Hudspeth, D.S.S., Stenger, D., Hudspeth. M.E.S. (2003): A *cox2* phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. Fungal Diversity, 13: 47–57.
- Intelmann, F., Spring, O. (2002): Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. Canadian Journal of Microbiology, 108(3): 555–559.
- Kůdela, V., Kocourek, F., Bárnet, M. (2012): České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. Česká akademie zemědělských věd, Praha 272 p.
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006): Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92 p.
- Ljubich, A., Gulya, T.J. (1988): Cotyledon-limited systemic downy mildew infection. In: Proceedings of 1988 Sunflower Research Workshop, Bismarck, USA, National Sunflower Association, p. 9.
- Molinero–Ruiz, M.L., Melero–Vara, J.M. Domínguez, J. (2002): Inheritance of resistance to race 330 of *Plasmopara halstedii* in three sunflower lines. Plant Breeding, 121: 61–65.
- Molinero–Ruiz, M.L., Melero–Vara, J.M., Gulya, T.J., Dominguez, J. (2003): First report to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. Plant Disease, 87(6): 749–749.
- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (1994): Effect of host–race combination on resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). Journal of Phytopathology, 141: 249–258.

- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (1993): Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal of Phytopathology*, 139: 289–297.
- Novotěl'nova, N. S. (1962): *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni as a conspecies. *Botanical Journal of Academy of Sciences of USSR*, 47: 970–981.
- Orellana, R.G. (1970): Resistance and susceptibility to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 97: 91–97.
- Rashid, K.Y. (1993): Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988–1991. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 15(3): 206–210.
- Rivera, Y., Rane, K., Crouch, J.A. (2014): First report of Downy Mildew caused by *Plasmopara halstedii* on Black-eyed Susan (*Rudbeckia fulgida* cv. 'Goldsturm') in Maryland. *Plant disease*, 98: 1005–1006.
- Roeckel–Drevet, P., Tourvieille, J., Gulya, T., Charmet, G., Nicolas, P., de Labrouhe, D. (2003): Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(8): 942–502.
- Rozynek, B., Spring, O. (2001): Leaf disc inoculation, a fast and precise test for screening of metalaxyl tolerance in sunflower downy mildew. *Journal of Phytopathology*, 149: 309–312.
- Sackston, W.E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: *The downy mildews* (Ed. by Spencer, D.M.), pp. 545–575. Academic Press, London, UK.
- Sackston, W.E., Vimard, B. (1988): Leaf disc immersion (LDI) inoculation of sunflower with *Plasmopara halstedii* for in vitro determination of host-pathogen relationships. *Plant Disease*, 72: 227–229.
- Savulescu, T. (1941): Die auf Compositen parasitierenden *Plasmopara* Arten. *Bull. Sect. Sci. Acad. Roumania*, 24: 46–47.
- Savulescu, T., Vanky, L. (1956): Beitrag zur Kenntnis der Peronosporaceae. *Arch. d. Fresende. d. Naturg in Mecklengurg*, 2: 336–365.
- Sedlářová, M., Stojaspal, K., Lebeda, A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České Republice. *Rostlinolékař*, 1: 17–20.

- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on Sunflower in the Czech Republic. *Plant protect. Sci*, 49: 1–10.
- Spring, O. (2001): Nonsystemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108: 329–336.
- Spring, O., Benz, A., Causy, V. (1991): Impact of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) infection on development and metabolism of sunflower. *Journal of Plant Disease and Protection*, 98: 597–604.
- Spring, O., Rozynek, B., Zipper, R. (1997): Leaf disc inoculation - a useful tool for selecting infections of sunflower downy mildew at low inoculum concentration, but inappropriate to pathotype characterization. *Journal of Phytopathology* 145: 189–191.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethuller, A., Oberwinkler, F. (2003): Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus × laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress*, 2(3): 163–170.
- Spring, O., Zipper, R., Heller–Dohmen, M. (2006): First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 224.
- Šedivý, J., Chod, J., Kodys, F., Kúdela, V., Sychrová, E., Šebesta, J. (1977): Klíč k určování chorob a škůdců polních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 485 p.
- Stojaspal, K. (2009): Studium interakcí slunečnice-*Plasmopara halstedii*. Diplomová práce, 58p. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.
- Thines, M., Komjati, H., Spring, O. (2005): Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. *European Journal of Plant Pathology*, 112(4): 395–398.

- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P., Vear, F. (2012): Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proceedings of 18th International Sunflower Conference, Mar Del Plata & Balcarce, Argentina. 27.2. – 1.3. 2012. 6p.
- Veverka, K., Křížková-Kudlíková, I. (2006): Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin, ČZU Praha. 12.9. – 14.9. 2006. 287–288.
- Virányi, F., Spring, O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 207–220.
- Voglmayr, H. (2008): Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1): 3–18.
- Virányi, F. (1988a): *Plasmopara halstedii*. In: European handbook of plant diseases (Ed. by Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A.).
- Virányi, F. (1988b): Factors affecting oospore formation in *Plasmopara halstedii*. *Proceedings of the 12th International Sunflower Conference, Novi Sad 2*, 32–37.
- Virányi, F. (2002): The sunflower – *Plasmopara halstedii* pathosystem: Natural and artificially induced coevolution. In: Spencer – Philips, P.T.N, Gisi, U., Lebeda, A., (eds.): *Advances in Downy Mildew Research. Volume 1*. Kluwer Academic Publisher, London, UK, p. 167–172.
- Virányi, F., Spring, O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology*, 129(2): 207–220.
- Walcz, I., Bogár, K., Virányi, F. (2000): Study on an *Ambrosia* isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 23: 19–24.
- Yagodkina, V.P. (1956): Downy mildew of sunflowers in the Krasnodar region. *Bull. Nauch. Tech. Inf. Zas Rast*, 1: 33–34.
- Zimmer, D.E. (1974): Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology*, 64: 1465–1467.

Internetové zdroje

<http://issar.cenia.cz/issar/page.php?id=314> (přístup 16. 7. 2015)

<http://www.eppo.int> (přístup 22. 7. 2015)

http://eagri.cz/public/web/file/59919/Plasmopara_halstedii.pdf (přístup 16. 7. 2015)

Zdroje obrázků:

Obrázek 1 – Tomáš Bartůšek

Obrázek 2 – <http://www.eppo.int>. (přístup 22. 7. 2015)

Obrázek 3 – Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

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

Obrázek 5 – Tomáš Bartůšek

Obrázek 6 – Tomáš Bartůšek

Obrázek7 – Tomáš Bartůšek