

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky



**Stanovení kódu virulence a metody uchovávání
peronospor *Plasmopara halstedii* a *Bremia lactucae***

Diplomová práce

Klára Dobešová

Studijní obor: Učitelství biologie – geologie a ochrany životního prostředí pro střední školy (N1501)

Forma studia: Prezenční

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

Olomouc 2021

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Michaely Sedlářové, Ph.D. Veškerou literaturu a další zdroje, které jsem v práci použila, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. Klára Dobešová

Zpracování diplomové práce bylo podpořeno projekty IGA UP PrF_2018_001, PrF_2019_004, PrF_2020-03, PrF-2021-01.

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí práce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za vstřícné a ochotné jednání při konzultacích. Obrovské díky patří Monice Klíčové a Mgr. Barboře Machalové za jejich obětavou pomoc v laboratoři a oddělení fytopatologie a mikrobiologie za jejich vstřícnost. Díky patří také RNDr. Davidovi Novotnému, Ph.D. za jeho čas a ochotu při návštěvě v laboratoři Ekologie a diagnostiky houbových patogenů VÚRV v Praze-Ruzyni. Pracovníkům ZS ÚKZÚZ v Lednici za umožnění sběru vzorků *Plasmopara halstedii*. V neposlední řadě děkuji také svým rodičům a přátelům za trpělivost a podporu, kterou mi poskytli při zpracovávání této diplomové práce.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Bc. Klára Dobešová

Název práce: Stanovení kódu virulence a metody uchovávání peronospor *Plasmopara halstedii* a *Bremia lactucae*

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holic, Česká republika

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

Rok obhajoby práce: 2021

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá metodami fenotypového hodnocení kódu virulence dvou biotrofních peronospor *Plasmopara halstedii* (plísň slunečnicové) a *Bremia lactucae* (plísň salátové) a jejich uchovávání. V teoretické části jsou charakterizovány biotrofní peronospory (čel. Peronosporaceae, tř. Peronosporomycetes, říše Stramenopiles), včetně metod jejich krátkodobého a dlouhodobého uchování, a dále biologie a patogenní variabilita *P. halstedii* a *B. lactucae*. V praktické části byly stanoveny fyziologické rasy: rasa 704 71 u šesti izolátů *P. halstedii* pocházejících ze slunečnice roční z let 2018 a 2019 a rasa EU-B 16/37/00/00 u izolátu *B. lactucae* z lociky kompasové z roku 2019. V rámci diskuse byly vlastní výsledky porovnány s dostupnými aktuálními daty a byly vyvozeny příslušné závěry.

Klíčová slova: diferenční soubor, fyziologická rasa, plíseň salátová, plíseň slunečnicová, Peronosporomycetes

Počet stran: 98

Počet příloh: 4

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Klára Dobešová

Title: Virulence code determination and methods of conservation in downy mildews *Plasmopara halstedii* and *Bremia lactucae*

Type of thesis: Diploma

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holic, Czech Republic

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

The year of defence: 2021

Abstract:

This thesis deals with methods of phenotypic evaluation of the virulence code of two biotrophic downy mildews *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) and *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew) and their conservation. In the theoretical part, biotrophic downy mildews (family Peronosporaceae, class Peronosporomycetes, kingdom Stramenopiles) are characterized, including methods of their short- and long-term conservation, biology and pathogenic variability *P. halstedii* and *B. lactucae*. In practical part, the physiological races have been determined: race 704 71 for six *P. halstedii* isolates originating from *H. annuus* from the 2018 and 2019 and race EU-B 16/37/00/00 for *B. lactucae* from *Lactuca serriola* from 2019. Results were discussed and compared with the available recent data and according conclusions were drawn.

Keywords: differential set, physiological race, lettuce downy mildew, sunflower downy mildew, Peronosporomycetes

Number of pages: 98

Number of appendices: 4

Language: Czech

Obsah

1.	Klasifikace třídy Peronosporomycetes.....	13
1.1.	Klasifikace řádu Peronosporales.....	14
1.1.1.	Klasifikace čeledi Peronosporaceae.....	14
1.2.	Hostitelský okruh řádu Peronosporales.....	15
1.3.	Fylogenetický vývoj třídy Peronosporomycetes.....	16
1.4.	Životní strategie třídy Peronosporomycetes.....	16
1.5.	Přírodní stanoviště rostlinných patogenů třídy Peronosporomycetes.....	17
1.6.	Průběh infekce patogenu z třídy Peronosporomycetes.....	17
1.7.	Rezistence rostlin vůči fytopatogenům.....	18
2.	Biologie <i>Plasmopara halstedii</i>	20
2.1.	Hostitelský okruh <i>Plasmopara halstedii</i>	20
2.2.	Taxonomie druhu <i>Plasmopara halstedii</i>	21
2.3.	Patogenní variabilita <i>Plasmopara halstedii</i>	21
2.4.	Životní cyklus <i>Plasmopara halstedii</i>	22
2.5.	Příznaky infekce <i>Plasmopara halstedii</i>	23
2.6.	Ochrana rostlin vůči <i>Plasmopara halstedii</i>	25
2.7.	Rozšíření <i>Plasmopara halstedii</i> ve světě.....	27
2.8.	Rasy <i>Plasmopara halstedii</i> v České republice.....	29
2.9.	Vznik nových ras <i>Plasmopara halstedii</i>	29
3.	Biologie plísně salátové, <i>Bremia lactucae</i>	31
3.1.	Taxonomie druhu <i>Bremia lactucae</i>	31
3.2.	Hostitelský okruh <i>Bremia lactucae</i>	32
3.3.	Faktory ovlivňující šíření <i>Bremia lactucae</i>	32
3.4.	Životní cyklus <i>Bremia lactucae</i>	33
3.5.	Příznaky infekce <i>Bremia lactucae</i>	35
3.6.	Virulence <i>Bremia lactucae</i>	37
3.7.	Rezistence rostlin vůči <i>Bremia lactucae</i>	38
3.8.	Koevoluce <i>Lactuca serriola</i> a <i>Bremia lactucae</i>	39
3.9.	Metapopulace <i>Lactuca serriola</i> v Evropě.....	39
3.9.1.	Metapopulace <i>Lactuca serriola</i> v České republice.....	40
4.	Uchovávání hub a peronospor.....	41
4.1.	Metody uchovávání peronospor.....	41
4.1.1.	Sériové uchovávání.....	42
4.1.2.	Uchovávání pod minerálními oleji.....	43
4.1.3.	Uchovávání pod sterilní destilovanou vodou.....	43
4.1.4.	Uchovávání na silikagelu.....	43
4.1.5.	Uchovávání lyofilizací.....	44
4.1.6.	Kryokonzervace v tekutém dusíku.....	45
4.1.7.	Kryoprotektivní média.....	47

4.2.	Rozmražení uložených izolátů	48
5.	Materiály a metody	49
5.1.	Sběr izolátů <i>Plasmopara halstedii</i>	49
5.2.	Rostlinný materiál <i>Helianthus annuus</i>	50
5.2.1.	Příprava rostlinného materiálu	50
5.3.	Přemnožení izolátů metodou WSI	51
5.3.2.	Pěstování naočkovaných rostlin a následná sporulace patogenu	53
5.4.	Patotesty metodou SDI.....	53
5.4.1.	Inokulace metodou SDI.....	54
5.4.2.	Vyhodnocení patotestu.....	56
5.5.	Sběr izolátů <i>Bremia lactucae</i>	58
5.6.	Rostlinný materiál <i>Lactuca serriola</i>	58
5.6.1.	Příprava rostlinného materiálu	58
5.7.	Příprava inokula <i>B. lactucae</i>	59
5.8.	Určení rasy <i>Bremia lactucae</i>	59
6.	Výsledky	63
6.1.	Určení ras izolátů <i>Plasmopara halstedii</i>	63
6.1.1.	Rasy <i>Plasmopara halstedii</i> z roku 2019	63
6.2.	Stanovení ras izolátů <i>Bremia lactucae</i>	66
6.2.1.	Rasa <i>Bremia lactucae</i> z roku 2019.....	66
7.	Diskuse.....	71
7.1.	<i>Plasmopara hastedii</i>	71
7.2.	<i>Bremia lactucae</i>	73
7.3.	Uchovávání peronospor a podmínky patotestů	76
8.	Závěr	78
9.	Didaktická část školní projekt v rámci výuky biologie „Mikroskopické houby a peronospory – význam a využití“	79
9.1.	Písemná příprava úvodní hodiny.....	79
9.2.	Obsah učiva: Mikroskopické houby a peronospory	81
9.3.	Písemná příprava biologické praktikum.....	84
9.4.	Protokol – verze pro žáky	85
9.5.	Protokol – doplněná verze pro učitele.....	87
9.6.	Exkurze – vinařství	89
9.7.	Badatelská činnost.....	89
10.	Literatura.....	90
13.	Seznam příloh	98

Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Klasifikační hypotézy třídy Peronosporomycetes.
- Obrázek 2:** Genetická podstata rezistence rostliny doprovázená hypersenzitivní reakcí.
- Obrázek 3:** Sporangiofory *Plasmopara halstedii* se zoosporangii.
- Obrázek 4:** Symptomy plísně slunečnicové: a) zakrslost rostliny; b) chlorotické skvrny na listech.
- Obrázek 5:** Symptomy plísně slunečnicové: a) chlorotická skvrna na svrchní straně listu slunečnice; b) sporulace na spodní straně listu.
- Obrázek 6:** Konidiofor s konidii *Bremia lactucae*.
- Obrázek 7:** Nepohlavní rozmnožování *Bremia lactucae*.
- Obrázek 8:** Symptomy *Bremia lactucae*: chlorotické skvrny na listech salátu.
- Obrázek 9:** Symptomy *Bremia lactucae*: a) chlorotické skvrny na listu; b) sporulace na spodní straně listu.
- Obrázek 10:** Lyofilizační přístroj: z laboratoře VÚRV v Praze.
- Obrázek 11:** a) chladicí komora ve VÚRV v Praze; b) držák na vzorky.
- Obrázek 12:** Nádoba s kapalným dusíkem na uchovávání vzorků.
- Obrázek 13:** Provokační pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) v Lednici.
- Obrázek 14:** Osivo dezinfikované v 15% roztoku Sava.
- Obrázek 15:** Osivo *Helianthus annuus*: a) po ošetření; b) po 3–4 dnech klíčení.
- Obrázek 16:** Pomůcky na přípravu inokula a květináč s nasporulovanými listy slunečnice.
- Obrázek 17:** Patotest na určení rasy *Plasmopara halstedii* 14. den.
- Obrázek 18:** Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *Plasmopara 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).
- Obrázek 19:** Intenzita sporulace – kvantitativní hodnocení *Plasmopara halstedii*.
- Obrázek 20:** Intenzita sporulace – kvalitativní hodnocení *Bremia lactucae*.

Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Diferenciační linie na patotest pro určení rasy *Plasmopara halstedii*.
- Tabulka 2:** Příklad výpočtu kódu virulence, tj. stanovení rasy *Plasmopara halstedii*.
- Tabulka 3:** Diferenciační set B (soubor genotypů *Lactuca sativa* a *L. serriola* pro diferenciaci ras *Bremia lactucae*).
- Tabulka 4:** Příklad výpočtu kódu virulence, tj. stanovení rasy *Bremia lactucae*.
- Tabulka 5:** Vyhodnocení fenotypové reakce *Plasmopara halstedii* u izolátů z roku 2019.
- Tabulka 6:** Stanovení rasy *Bremia lactucae* izolátu Beroun 2019.
- Tabulka 7:** Stanovení rasy *Bremia lactucae* izolátu Beroun 2019, pouze vybrané izoláty.

Seznam zkratek

Bl	<i>Bremia lactucae</i>
DL	diferenciační linie
DMSO	dimethylsulfoxid
DSFF	„dry spore, fast freezing“ kryokonzervace v tekutém dusíku
EF	entomopatogenní houby
HR	hypersenzitivní reakce
LN	„liquid nitrogen“, tekutý dusík
Ph	<i>Plasmopara halstedii</i>
PhV	<i>Virus Plasmopara halstedii</i>
Pl	gen rezistence vůči Ph
PVP	polyvinylpyrrolidin
ROS	„reactive oxygen species“ reaktivní kyslík
RNS	„reactive nitrogen species“ reaktivní dusík
RSS	„reactive sulfur species“ reaktivní síra
SDI	„soil drench inoculation“ inokulace přímo na semenáčky
WSI	„whole seedling inoculation“ inokulace celých semenáčků

Cíle práce

Hlavním cílem diplomové práce bylo vypracovat literární rešerši o obligátních biotrofních parazitech rostlin ze třídy Peronosporomycetes, se zaměřením na *Plasmopara halstedii*, plíseň slunečnicovou a *Bremia lactucae*, plíseň salátovou. Dále byla práce zaměřena na metody krátkodobého a dlouhodobého uchovávání peronospor. Praktická část navazuje na bakalářskou práci, jež byla zaměřena na variabilitu virulence *Plasmopara halstedii* v ČR v letech 2015 až 2017. Cílem této diplomové práce bylo přemnožit a stanovit fenotyp virulence izolátů *Plasmopara halstedii* a *Bremia lactucae* ze sbírky UPOC na KB PřF UP v Olomouci z let 2018 a 2019. V neposlední řadě byla pravidelně přemnožována a testována životnost izolátů při různých postupech dlouhodobé kryoprezervace vybraných kmenů. V rámci diskuse bylo cílem zhodnotit výsledky, srovnat informace s dostupnými aktuálními daty a vyvodit příslušné závěry a stanovit vhodné metody dlouhodobého uchovávání peronospor.

Úvod

Tato diplomová práce se zaměřuje na peronosporu, obligátní parazity rostlin z čel. Peronosporaceae (řád Peronosporales, tř. Peronosporomycetes, odd. Peronosporomycota, říše Stramenopiles, vývojová větev (SAR), které napadají nejen rostliny běžně rostoucí v přírodě, ale také hospodářsky významné plodiny (Thines, 2014).

Fytopatogeny hrají podstatnou roli ve struktuře, dynamice a vývoji přirozených rostlinných společenstev. Mohou způsobit úhyn celé rostliny, zpomalit její růst či regulovat tvorbu semen, a tím dramaticky ovlivnit strukturu a složení rostlinných populací (Gilbert, 2002). Na druhou stranu koevoluce s patogeny přispívá k udržení druhové diverzity rostlinných společenstev a ke genetické rozmanitosti populací hostitelských druhů (Lebeda *et al.*, 2008).

Významnými rostlinnými patogeny jsou druhy z čeledi Peronosporaceae. Většina rodů je úzce hostitelsky specifická (Thines, 2014). Na hvězdnicovitých rostlinách (Asteraceae) se vyskytují mj. zástupci rodů *Bremia* a *Plasmopara*. Tato práce je zaměřena na *Plasmopara halstedii*, která je významným patogenem slunečnice roční a *Bremia lactucae*, která napadá *Lactuca spp.* Oba patogeny mohou způsobit velké hospodářské ztráty (Spring *et al.*, 2019).

Pro detailní studium interakcí rostlin a jejich patogenů je důležité mít dostatek materiálu a vzorků k testování. Výzkum probíhá celoročně a není možné mít neustále k dispozici čerstvý materiál. Proto se vzorky peronospor uchovávají nejčastěji kryoprezervací spolu s hostitelským pletivem. *Plasmopara halstedii* a *Bremia lactucae* jsou obligátní biotrofní patogeny, to znamená, že nemohou růst a rozmnožovat se mimo svého hostitele a jsou na svém hostiteli zcela závislí v celé délce životního cyklu. Tím pádem je velmi obtížné tyto patogeny uchovávat tak, aby se zachovala jejich vysoká životaschopnost a patogenita (Smith *et al.*, 2001). Další problém u těchto druhů je spojený s jejich vysokým obsahem vody v zoosporangiích. Při zamražení se intracelulární voda mění na led, který může poškodit buněčné struktury. Proto se při uchovávání chrání různými kryoprotektivními médii, která zabraňují tvorbě ledu (Gulya *et al.*, 1993).

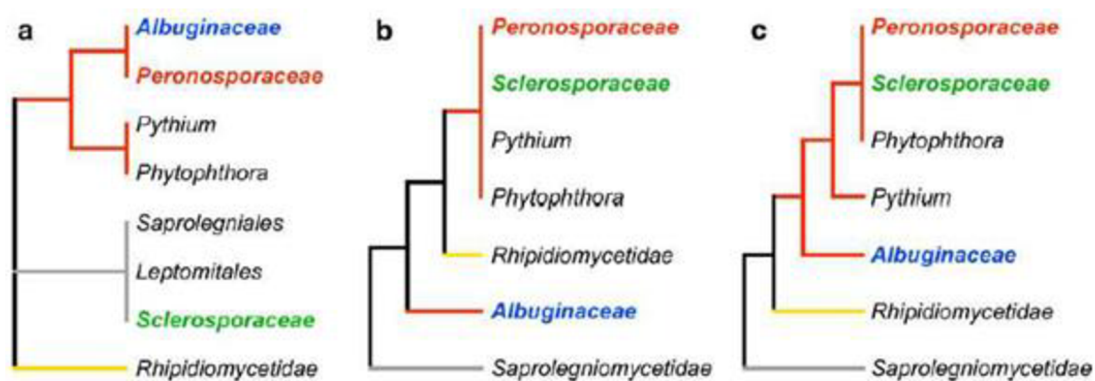
1. Klasifikace třídy Peronosporomycetes

Peronospory jsou eukaryotické organismy. Jedná se o samostatnou vývojovou linii. Přestože se peronospory vzhledem podobají houbám, fylogeneticky s nimi nijak nesouvisí. Peronospory mají chemicky odlišnou stavbu hyf (Thines, 2014). Jedním z nejdůležitějších rozdílů, kterými se liší od hub je nepohlavní rozmnožování. Rozmnožování peronospor probíhá pomocí biflagelátních zoospor, které mají na svém povrchu dva bičíky místo jednoho. Jeden z bičíků peronospor je pokrytý typickými chloupky, které jsou základním znakem říše Stramenopila, do které peronospory patří (Dick, 2001). Dalším charakteristickým znakem této třídy je typ oospory, kterou můžeme zaznamenat při pohlavním rozmnožování (Thines, 2014).

Říše Stramenopila zahrnuje nejen Peronosporomycota, ale i Chrysophyta, hnědé řasy a některá Protista (Rietman *et al.*, 2010). Současné taxonomické uspořádání peronospor je do velké míry výsledkem práce významných systematiků Sparrowa (1960, 1976) a Dicka (2001). Při zařazování peronospor do systému bylo navrženo, aby byly všechny peronospory přiřazeny ke dvěma zastřešujícím taxonomickým skupinám. První skupina zahrnovala převážně saprofytní řády vodních forem a druhá skupina čítala rostlinné patogeny řádu „peronosporales“ (Rhipidiales, Pythiales a Peronosporales) (Beakes *et al.*, 2012).

V současné době jsou peronospory rozděleny do tří podtříd, Saprolegniomycetidae, Rhipidiomycetidae a Peronosporomycetidae (Dick, 1995). Molekulární fylogenetické analýzy toto členění do značné míry potvrdily (Dick *et al.*, 1999). Nicméně klasifikace na nižších úrovních je díky jejich složitosti stále nejasná a otevřená (Thines a Spring, 2005).

Zjednodušené schéma klasifikace peronospor lze vidět na obrázku 1. Třída Peronosporomycetes má tři podtřídy. Do podtřídy Saprolegniomycetidae (označená na obr. 1 šedou barvou) patří řád Saprolegniales, což jsou převážně saprofitní až nekrotrofní organismy. Do podtřídy Rhipidiomycetidae (označená na obr. 1 žlutou barvou) spadá řád Rhipidiales, kam patří vodní saprofité. Třetí podtřída Peronosporomycetidae (označená na obr. 1 červenou barvou) zahrnuje významné biotrofní parazity spadající do řádů jako jsou Pythiales, Peronosporales a Albuginaceae (Voglmayr, 2008).



Obrázek 1: Klasifikační hypotézy v rámci třídy Peronosporomycetes: a) klasifikace dle morfologie (Dick, 2001); b) klasifikace dle cox2 sekvenčních dat (Hudspeth *et. al.*, 2003); c) klasifikace dle LSU rDNA sekvenčních dat (Riethmüller *et. al.*, 2002). Převzato z Voglmayr, 2008.

1.1. Klasifikace řádu Peronosporales

Ukázalo se, že taxony Peronosporales jsou polyfyletické nebo parafyletické (Voglmayr, 2008). Problém s klasifikací u Peronosporales nastává při konkrétním vymezování druhů. I přesto, že většina z nich jsou obligátní parazité a často mají konkrétního hostitele, často představují geneticky odlišné druhy. Specifičnost hostitele není vždy paralelní s morfologickou odlišností. Proto je při klasifikaci důležité uvést, podle jakých kritérií je druh klasifikován (Voglmayr, 2008).

Původní rozdělení Peronosporales je založené hlavně na morfologii konidioforů nebo sporangioforů. Hodnotí se dichotomické či monopodiální větvení sporangioforů, tvar terminální větve a přítomnost sporangií. Interpretace těchto morfologických znaků není vždy jednoznačná a závisí do značné míry na pohledu a názoru pozorovatele (Thines, 2007). V současné době se klasifikuje spíše na základě genetických podobností. S postupným molekulárním přezkoumáním se ukázalo, že současná genetická klasifikace je poměrně odlišná od té původní morfologické klasifikace (Voglmayr, 2008).

1.1.1. Klasifikace čeledi Peronosporaceae

Pravé plísně (downy mildew) jsou nejbohatší rod čeledi Peronosporaceae. Zahrnuje více než 700 známých druhů plísni. Všechny patří mezi fytopatogeny, kteří se navzájem liší svou morfologií haustorií, kterými pronikají do hostitele (Lebeda *et al.*, 2008). Pravděpodobně se jedná o monofyletický rod, který se dělí na tři hlavní monofyletické skupiny (Göker *et al.* 2007). Tyto tři hlavní skupiny obsahují výlučně patogeny dvouděložných rostlin (Thines, 2014).

První skupinu tvoří patogeny DMCC, které se šíří pomocí konidií. Zahrnují rody *Peronospora* a *Pseudoperonospora*. Druhou skupinou jsou patogeny BDM, které se liší svými kulovitými hystoriemi. Jsou to například rody *Hyaloperonospora* a *Perofascia* (Göker *et al.*, 2004). Poslední skupinou jsou mikromycety (DMPH), které mají svá haustoria spíše elipsovitého tvaru. Do této skupiny se řadí velký počet rodů jako jsou *Basidiophora*, *Bremia*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna* a *Protobremia* (Voglmayr *et al.* 2004).

Konkrétní určování druhů je pak založeno na morfologii a typu větvení sporogioforů nebo konidioforů. Například u mikromycet jsou velmi variabilní. Mohou být buď nerozvětvené (*Basidiophora*), víceméně monopodiálně rozvětvené (*Plasmopara*) nebo dichotomicky rozvětvené (*Paraperonospora*, *Bremia*). Je třeba poznamenat, že interpretace morfologie konidioforů a sporogioforů je někdy nejednoznačná a obtížně rozpoznatelná, což vedle k odlišným hypotézám o fylogenetických vztazích mezi druhy (Voglmayr *et al.*, 2004).

1.2. Hostitelský okruh řádu Peronosporales

Jak uvádí Thines ve své studii z roku 2014, patogeny v peronosporální linii jsou převážně obligátně biotrofní parazité krytosemenných rostlin. Uvnitř saprolegniální linie mají parazité tendenci spíše k hemibiotrofii. Hostitelský okruh krytosemenných rostlin se dělí na jednoděložné a dvouděložné hostitele. Většina rostlinných patogenů napadá hlavně dvouděložné druhy rostlin. Ovšem existuje pár známých druhů patogenů, kteří parazitují i na jednoděložných rostlinách. Jedním z nich je *Albugo macalpineana*, která napadá *Pterostylis* z čeledi vstavačovitých (Orchidaceae). Jedná se o jediný druh z čeledi Albuginaceae, neboli bílé rzi, který parazituje na jednoděložných rostlinách. Také u pravých plísní (downy mildew) je známo pár druhů parazitujících na jednoděložných rostlinách, hlavně na čeledi lipnicovitých (Poaceae).

Z toho vyplývá, že drtivá většina pravých plísní a bílých rzí jsou parazité převážně dvouděložných rostlin s občasnou odchylkou od hostitelského spektra. Nejčastějšími hostiteli pro pravé plísně jsou druhy z čeledi Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae a Fabaceae. Zejména v Asteraceae a Brassicaceae existuje několik druhů, které mohou být hostitelem jak pro pravé plísně (downy mildew), tak pro bílé rzi (Thines, 2014).

Předpokládá se, že rostliny a jejich patogeny podléhají dlouhodobému působení koevoluce, zejména pokud se jedná o obligátní biotrofní patogeny. Protože se tyto

fytopatogeny nedokáží rozmnožovat bez přítomnosti svého hostitele, jsou s ním úzce spjaty (Thines, 2014). V liniích peronospor je zřejmé, že během vývoje pravých plísni došlo k několika hostitelským změnám. Což jsou události, díky kterým došlo ke kolonizaci nových hostitelských spekter (Göker *et al.*, 2004).

I když se zdá být dosti pravděpodobné, že změny v hostitelích jsou hlavní příčinou diverzity peronospor, stále není jasné, co tyto změny spustilo. Velikost hostitelské variability klesá se zvyšující se genetickou odlišností hostitelů. Čím větší je variabilita hostitelů, tím je napadení pro patogen obtížnější. Pokud dříve neexistovaly žádné předchozí epizody koevoluce mezi hostitelem a patogenem, vzniká tak větší problém pro vývoj specifických obranných mechanismů patogena. Naopak při koevoluci s hostitelem, který má podobnou fyziologii a podobný primární metabolismus je vývoj parazita jednodušší. Díky jejich vzájemné podobnosti může parazit využívat obdobné manipulační strategie (Thines, 2014).

1.3. Fylogenetický vývoj třídy Peronosporomycetes

Je pozoruhodné, že nejběžnějšími druhy peronospor jsou obligátně biotrofní patogeny (Spring *et al.*, 2019). Podle studií byl původním druhem saprofyt. Myšlenka, že by původní druh peronospor byl holokarpický parazit (Beakes *et al.*, 2012) se z evolučního hlediska zdá být velmi nepravděpodobná. Nepředpokládá se, že by se obligátní biotrof mohl přeměnit zpět na konkurenčního saprofyta. U biotrofů dochází ke ztrátě některých metabolických cest a enzymů, které jsou u saprofytů potřebné pro jejich růst. Opětovné získání těchto metabolických cest se zdá být vysoce nepravděpodobné, ne-li nemožné. Stejně tak jako návrat parazitických rostlin k fotosyntéze, které tuto schopnost ztratily. Biotrofní peronospory se tedy vyvinuly pravděpodobně proto, aby unikly konkurenci s jinými organismy nebo se saprotrofytními holokarpickými druhy (Thines, 2014). Parazitismus na angiospermech se u peronospor vyvíjel nezávisle na druzích (Spring *et al.*, 2019).

1.4. Životní strategie třídy Peronosporomycetes

Životní strategie rostlinných patogenů zahrnují různé stupně od biotrofie až po nekrotrofii. Pro biotrofickou interakci mezi patogenem a rostlinou je nutné, aby byla rostlina zachována a nebyla patogenem zcela usmrcena, aby tak mohlo dojít k dokončení

životního cyklu. Obligátně biotrofní peronospory jako jsou Peronosporaceae (downy mildew) a Albuginaceae (bílé rzi) mají obvykle úzké spektrum hostitelů (Rietman *et al.*, 2010). V obou těchto čeledích vedla adaptace na biotrofii k redukci některých metabolických drah, a proto je patogen zcela závislý na živých rostlinných buňkách (Thines, 2014).

Druhy rodu *Phytophthora* většinou začínají životní cyklus jako biotrofové, ale v pozdějších stádiích životního cyklu přecházejí na nekrotrofní strategii. Na rozdíl od obligátních biotrofů se tyto patogeny mohou kultivovat na umělých médiích (Rietman *et al.*, 2010). Druhy rodu *Pythium* jsou téměř vždy nekrotrofní. Zástupci jsou převážně půdní patogeny, kteří se šíří kořenovým systémem, což má za následek zpomalení růstu semenáčků (Rietman *et al.*, 2010). Nekrotrofní druhy jsou schopné zamořit široké spektrum taxonomicky odlišných hostitelů. Naproti tomu biotrofní peronospory často napadají velmi úzké hostitelské spektrum v rodu nebo dokonce jen druhu (Spring *et al.*, 2019).

1.5. Přírodní stanoviště rostlinných patogenů třídy

Peronosporomycetes

Peronospory se díky svým různým životním strategiím přizpůsobily téměř všem přírodním stanovištím. Kolonizovaly téměř všechny ekosystémy. Lze je nalézt v arktických oblastech, v tropických mangrovech, v polosuchých oblastech až pouštích. Setkáváme se s nimi také u nás v oblasti mírného pásu. Peronospory mají tedy kosmopolitní rozšíření a lze je považovat za jednu z nejúspěšnějších tříd eukaryot. Většina peronospor je terestrická, ale lze je nalézt i ve vodním prostředí, odkud pochází původní druhy (Dick, 2001).

1.6. Průběh infekce patogenu z třídy Peronosporomycetes

Primární infekce rostlin často probíhá přes půdu do kořenového systému rostliny. Infekce může začít buď vytvořením pohlavní diploidní oospory nebo častěji z nepohlavní diploidní spory (nebo konidie), pro kterou je typické šíření pomocí větru. Pro počátek infekce je nutné vlhké prostředí, aby mohlo dojít ke klíčení spor, které se u různých rodů liší. Například u rodu *Peronospora* se vyvinulo klíčení sporangia přímé, což je činí méně závislými na vodě a vzdušné vlhkosti. U rodu *Phytophthora* se vyvinulo fakultativní

přepínání mezi přímým a nepřímým klíčením. Podobný mechanismus se nachází také u *Bremia lactucae* (Spring *et al.*, 2019).

Penetrace neboli průnik do hostitelské rostliny je stejně rozmanitý jako klíčení. Spring *et al.* (2019) uvádí, že peronospory mohou pronikat do pletiva rostliny buď přímo přes rhizodermální buňky nebo přes střední lamelu buněk (např. *Pythium*). Další druhy pronikají do rostliny přes listy (např. *Plasmopara halstedii*).

Pro další růst se u peronospor vyvinuly různé životní strategie. U nekrotrofií (například u rodu *Pythium*) jsou přímo napadány hostitelské buňky a tím dochází k úhynu celé rostliny. U biotrofů (Peronosporaceae, Albuginales) se vytváří specializované buněčné struktury (haustoria), které pronikají buňkami hostitele a slouží k získávání živin z rostliny a zároveň potlačují obranu hostitelské rostliny. Takto zůstávají postižené rostlinné buňky naživu a jejich metabolismus nepřetržitě vyživuje patogen. Biotrofní peronospory tvoří velmi odolné pohlavní oospory, které se ukládají v půdě a tím patogenu umožňují přežít nepříznivé vegetační období (Spring *et al.*, 2019).

1.7. Rezistence rostlin vůči fytopatogenům

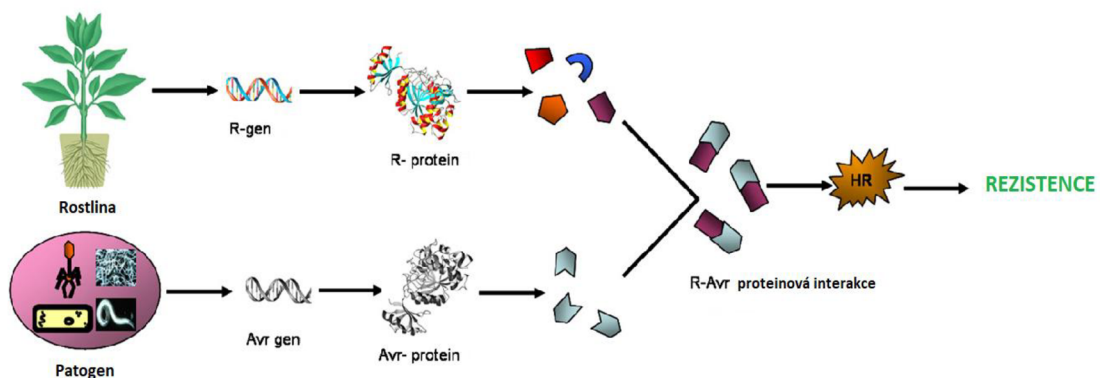
V přírodě jsou rostliny obecně odolné vůči většině patogenům díky své vrozené schopnosti rozpoznat patogenní molekuly a zahájit vysoce vyvinuté obranné reakce (Tör, 2008).

Rostliny reagují na infekci vrozenou imunitní obranou. V membráně rostlinných buněk jsou receptory, které dokáží detekovat velké množství patogenů. Pomocí molekulárního vzorce (PAMP) rozpoznávají patogen a zahajují obranné reakce, které je chrání před šířením rostlinného patogenu. Tato imunita vyvolaná PAMP je první indukovatelná obrana rostliny proti patogenům (Gururani *et al.*, 2012).

Gururani *et al.* (2012) popisuje druhou obranu rostliny, kterou tvoří geny rezistence (R). Tyto geny mají schopnost detekovat patogen a usnadňují obranu proti patogenu (viz obr. 2). Tato reakce pomáhá hostitelské rostlině vyhnout se další infekci. Rezistence vyvolaná R geny k různým patogenům je obvykle rasově specifická a je účinná pouze proti patogenům, kteří exprimují příbuzný efektorový protein (Avr protein).

Tato rezistence je často spojená s hypersenzitivní reakcí (HR), která vyvolává buněčnou smrt napadlých buněk a v některých případech i smrt několika okolních buněk, jak je patrné na obr. 2 (Rietman *et al.*, 2010). U velmi odolných rostlin hraje HR hlavní

obranou funkci. Načasování a rozsah HR se liší v závislosti na interagujícím patogenu a rostlinném genotypu (Kamoun *et al.*, 1999).



Obrázek 2: Genetická podstata rezistence rostliny doprovázená hypersenzitivní reakcí. Převzato z Gururani *et al.*, 2012

I přesto, že biotrofní patogeny nezabíjejí svého hostitele úplně, může být jejich ekonomický dopad v zemědělství ničující (Spring *et al.*, 2019). Rostlinné patogeny nejenže snižují výnosnost úrody, ale také snižují kvalitu plodin a uvolňují toxické látky, které mohou ovlivňovat lidské zdraví (Gururani *et al.*, 2012). Proto se na plodiny aplikují různé fungicidy, což je další možný způsob ochrany rostlin. Jedná se o tzv. integrovanou ochranu. Pravidelná aplikace však často u patogenu vede k rychlému rozvoji rezistence vůči fungicidům (Spring *et al.*, 2019). Proto se v dnešní době ochrana kombinuje také se šlechtěním a využíváním genů rezistence (Gururani *et al.*, 2012).

2. Biologie *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii (Farl.) Berlese et de Toni je obligátní biotrofní patogen s velmi úzkou hostitelskou specifikací (Spring *et al.*, 2018). Napadá rod *Helianthus* a způsobuje plíseň slunečnicovou, která negativně ovlivňuje hlavně produkci slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Patogen je rozšířen téměř po celém světě, hlavně v zemích s vysokou zemědělskou produkcí slunečnice (Gulya, 2007). Výjimku tvoří Nový Zéland a Austrálie, kde byl rod *Plasmopara* pozorován také na rostlinách z čeledi Asteraceae, které ale neslouží k zemědělskému využití (Trojanova *et al.*, 2018).

Slunečnice napadené tímto patogenem se vyznačují nízkou výnosností a způsobují v zemědělství obrovské ekonomické ztráty. *P. halstedii* může také svými oosporami kontaminovat půdu a tím znemožňuje využívání zemědělské půdy až po dobu několika let. Plíseň slunečnicová je na seznamu karanténních chorob od roku 1992. V České republice byl patogen zapsán na tento seznam o deset let později (Sedlářová *et al.*, 2016). V dnešní době se globální ztráty v produkci slunečnice odhadují pouze na 3,5 % komerční produkce, a to díky zavedeným kontrolním opatřením (Gascuel *et al.*, 2015).

2.1. Hostitelský okruh *Plasmopara halstedii*

Všechny pravé plísně jsou obligátně biotrofní parazité, kteří pro svůj životní cyklus potřebují živé hostitele. Většina z nich, včetně *P. halstedii*, zatím ještě nebyla úspěšně kultivovaná v podmínkách *in vitro* (Gascuel *et al.*, 2015). Rod *Plasmopara* poškozuje různé rostlinné druhy. *P. viticola* napadá vinnou révu, *P. umbelliferarum* napadá Umbelliferae, *P. geranii* a *P. pusilla* poškozují pelargónie (Constantinescu *et al.*, 2005).

Dříve se v literatuře uvádělo, že patogen ovlivňuje široké spektrum druhů čeledi Asteraceae. Novější fylogenetika řadí *P. halstedii* do několika charakteristických taxonů s velmi úzkou hostitelskou nikou (Spring *et al.*, 2018). Nejběžnějším hostitelem pro *P. halstedii* jsou různé druhy rodu *Helianthus*, např. *H. argophyllus*, *H. debilis*, *H. petiolaris* a hospodářsky významná *H. annuus* (Gascuel *et al.*, 2015). Plíseň *P. halstedii* může ovšem napadat i okrasné druhy z čeledi Asteraceae. Mezi nově objevené hostitele patří druh *Coreopsis grandiflora*. Jedná se o oblíbenou okrasnou rostlinu z čeledi Asteraceae. *C. grandiflora* je hojně rozšířená ve střední a východní části Severní Ameriky. V červnu 2018 byly na těchto rostlinách poprvé zaznamenané viditelné příznaky plísně slunečnicové. (Salgado-Salazar *et al.*, 2019). Dalším nově objeveným hostitelem je druh

okrasné rostliny *Ageratum houstonianum*. Patří také do čeledi Asteraceae a je původním druhem ze Střední a Jižní Ameriky. Běžně se pěstuje jako speciální okrasná rostlina, a to hlavně na Floridě (Pisani *et al.*, 2019).

2.2. Taxonomie druhu *Plasmopara halstedii*

První, kdo patogen popsal, byl Farlow v roce 1883. Na základě pozorování pojmenoval patogen *Peronospora halstedii*. O tři roky později Schröter oddělil rod *Plasmopara* od r. *Peronospora* na základě odlišného klíčení zoospor. Berlese et de Toni roku 1888 zařadili taxon do úplně nového rodu pod názvem *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese et de Toni. Externím pozorováním nebyly symptomy patogenu objeveny na hostitelských rostlinách jiných než *H. annuus* a pár další druhů rodu *Helianthus*. Díky této hostitelské specifikaci se Novotelnova rozhodla tento druh přejmenovat. Zachovala Farlowovo rodové jméno *Plasmopara* a pojmenovala patogen jako *Plasmopara helianthi* Novot. Její druhové pojmenování však nikdy nezískalo přijetí široké vědecké veřejnosti, a tak je plíseň slunečnicová stále pro většinu známá pod názvem *Plasmopara halstedii* (Virányi a Spring, 2011).

Plasmopara halstedii spadá do říše Stramenopila (Gascuel *et al.*, 2015). Nižší taxonomické jednotky se po dlouhou dobu neustále měnily, až molekulární a genetický vývoj zásadně ovlivnil fylogenezi peronospor a upřesnil klasifikaci na všech taxonomických úrovních (Virányi a Spring, 2011). Nyní víme, že *Plasmopara halstedii* patří do řádu Peronosporales, který se také nazývá pravé plísně. Je to největší řád rostlinných patogenů třídy Peronosporomycetes (Michelmore a Wong, 2008). Existuje několik stovek druhů pravých plísní, které jsou rozděleny do čtrnácti rodů. Pro snadnější klasifikaci byly tyto rody rozděleny do čtyř morfologicko-ekologických podskupin. Ve druhé podskupině jsou zahrnuty rody *Basidiophora*, *Bremia*, *Paraperonospora*, *Protobremia* a také právě rod *Plasmopara* (Göker *et al.*, 2007).

2.3. Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii se podle mezinárodního systému nomenklatury člení na různé rasy neboli patotypy. Proto Gulya v roce 1995 navrhl trojmístný kódovací systém, díky kterému došlo ke sjednocení a zlepšení nomenklatury. Systém je založený na virulenci diferenčních souborů inbredních linií slunečnice (Gulya *et al.*, 1998). Postupně byly

populace *Plasmopara halstedii* důkladně testovány a zařazeny do ras. V průběhu let byly některé diferenciacní linie nahrazeny jinými, aby došlo k optimalizaci biologických testů. Obecné vzorce rezistence a číslování zůstalo víceméně stejné (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

V roce 2012 došlo k rozšíření třímístného systému na nový pětímístný kódovací systém (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Tím došlo k lepšímu rozlišení konkrétních ras. Tento systém je však doposud aplikovaný pouze ve Francii a České republice (Trojanova *et al.*, 2018). Důvodem může být mnohem pracnější a náročnější testování a také nákladné poskytování dostatečného množství osiva a všech 15 diferenciacních linek požadovaných pro testování (Gascuel *et al.*, 2015).

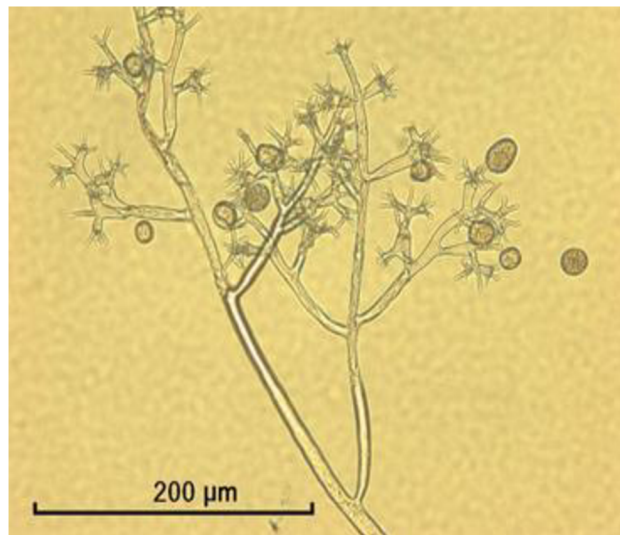
2.4. Životní cyklus *Plasmopara halstedii*

U peronospor jsou zaznamenány dva typy pohlavní reprodukce. Prvním typem je homotalizmus, ve kterém jsou pohlavní buňky (oogonia a antheridia) produkovány stejným organismem. Druhým typem pohlavní reprodukce je heterotalizmus, ve kterém jsou pohlavní buňky produkovány dvěma různými organismy. *Plasmopara halstedii* je diploidní, homotalický druh. Dokáže se rozmnožovat pohlavně i nepohlavně (Spring, 2000). Morfologie patogenu a jeho životní cyklus byl poprvé popsán Nishimurou v roce 1922 a později podrobněji Novotelnovou v roce 1966. Význam pohlavní reprodukce v životním cyklu *P. halstedii* byl dlouhou dobu podceňován. Později se zjistilo, že oospory hrají klíčovou roli při šíření patogenu i na větší vzdálenosti. Napadají semena, která se díky globálnímu obchodu s osivem a zemědělství šíří do celého světa. Zároveň oospory umožňují patogenu přezimovat v půdě a přečkat nepříznivá období i po dobu deseti let (Spring a Zipper, 2000).

Životní cyklus *P. halstedii* začíná na jaře, kdy dochází ke klíčení pohlavních oospor. U peronospor existují dva způsoby klíčení spor, nepřímé klíčení a přímé klíčení. Rod *Plasmopara* využívá hlavně nepřímé klíčení oospor. Ačkoli se může *P. halstedii* šířit větrem, vodou i přes kontaminovaná semena, jedná se většinou o půdní patogen (Ioos *et al.*, 2007). Při kontaktu oospor s kořenem slunečnice dochází k encystaci a k samotné infekci. *P. halstedii* obsahuje proteiny, které umožňují průnik patogenu přes hostitelské pletivo (Spring *et al.*, 2018). Do kořenového pletiva vstupují třemi různými způsoby. Většinou vytváří hyfy. Dále může patogen proniknout do rostliny při mechanickém poškození nebo může napadnout rostlinu přímým průnikem bez hyf do epidermálních

buněk rostliny. Pomocí hyf vytvoří v epidermálních buňkách kořene infekční vezikuly, které pak spouštějí systémovou infekci. Ta vyvolá primární příznaky nemoci (Spring, 2000). Infikované rostliny mají tendenci být nedostatečně vyvinuté, zakrslé, s chlorotickými skvrnami na listech a pokryté bílou sporulací (Jocić *et al.*, 2012).

V létě, za vlhkých podmínek, se začnou vytvářet nepohlavní zoosporangia (viz obr. 3). Zoosporangium *Plasmopara halstedii* může uvolnit až dvacet pohyblivých zoospor. Každá zoospora má dva bičíky, které jí slouží k pohybu. Zoospory tak v rostlině vyvolávají sekundární infekci a patogen se může šířit v prostoru (Spring, 2009). Díky kutikule na povrchu listů slunečnice není dosud jasné, jak *P. halstedii* napadá jejich pletiva (Gascuel *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Sporangiofory *Plasmopara halstedii* se zoosporangii. Převzato z OEPP/EPPO, 2008

2.5. Příznaky infekce *Plasmopara halstedii*

Příznaky primární a sekundární infekce jsou hlavní příčinou ekonomických ztrát v pěstování slunečnice. Infekce způsobuje celou řadu příznaků, které mají vliv na výnosnost slunečnice. Podle toho, ve které růstové fázi slunečnice dojde k infekci, se začnou objevovat charakteristické symptomy. Mezi příznaky plísně slunečnicové patří: úhyn mladých semenáčků, zakrslost rostlin, bílá sporulace na listech a tvorba neplodných jedinců. *P. halstedii* způsobuje dva typy infekce.

Primární infekce je způsobena pohlavními oosporami, které se do rostliny dostávají přes kořenový systém slunečnice. Vede buď k úhynu mladých semenáčků, k poruše růstu rostliny či ke žloutnutí jejich listů, jak je patrné na obr. 4 (Gascuel *et al.*,

2015). Příčina zakrslosti slunečnic není zatím zcela známá. Může to být způsobeno hormonální změnou nebo poruchou příjmu živin.

A)



B)



Obrázek 4: Symptomy plísňě slunečnicové: a) zakrslost rostliny; b) chlorotické skvrny na listech. Převzato ze Sedlářová *et al.*, 2013

Sekundární infekce způsobená nepohlavními zoosporami se projevuje hlavně na listech rostliny. Za vhodných podmínek začne vytvářet viditelnou bílou sporulaci na spodní straně listu slunečnice a na svrchní straně listu způsobuje chlorotické skvrny (viz obr. 5). Sekundární infekce je zodpovědná za napadení sousedních rostlin a šíření patogenu. Příznaky vyvolané sekundární infekcí jsou často méně závažné než ty, jež jsou vyvolané primární infekcí (Gulya *et al.*, 1998).

Rozsah poškození, které patogen způsobuje, je ovlivněn několika faktory. Prvním faktorem jsou podmínky prostředí, zejména vlhkost vzduchu a teplota (Wehtje a Zimmer, 1978). Druhým faktorem je potenciál patogenu a životaschopnost jeho zoosporangia (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Posledním faktorem je pak genetická odolnost nebo náchylnost rostliny (Jocić *et al.*, 2012).

A)



B)



Obrázek 5: Symptomy plísně slunečnicové: a) chlorotická skvrna na svrchní straně listu slunečnice; b) sporulace na spodní straně listu. Převzato ze Sedlářová *et al.*, 2013

2.6. Ochrana rostlin vůči *Plasmopara halstedii*

Plasmopara halstedii je velmi odolný patogen. Účinná ochrana před plísní slunečnicovou vyžaduje v první řadě správné pochopení základní biologie patogenu, molekulární mechanismus infekce, jeho vývoj a reprodukci. Opatření pro potlačení infekce je spousta (Jocić *et al.*, 2012).

Jedním z nich jsou agrotechnická opatření, která zabraňují šíření patogenu. Jedná se především o používání zdravého osiva ošetřeného fungicidy a správné střídání plodin. Musí se dodržovat interval 4–5 let mezi opětovným výsevem slunečnice na stejné zemědělské půdě. Při nedodržení intervalu hrozí, že půda bude zamořena patogenem a následující sklizeň bude vysoce ztrátová. Dnes je na trhu k dispozici široká škála komerčních fungicidů. Nejčastěji se používají deriváty metalaxylu. Používání fungicidů má i své negativní stránky spojené se vznikem nových ras odolných proti fungicidům (Virányi a Spring, 2011). Dalším negativním faktorem je vliv na životní prostředí. Dále se bere v úvahu také ekonomický dopad na proveditelnost opatření (Jocić *et al.*, 2012).

Mezinárodní problematikou je šíření patogenu při nákupu osiva z různých zemí. Musí se dodržovat přísné karanténní předpisy pro obchod s osivem, ale je téměř nemožné dokonale ošetřit semena v tak velkých šaržích (Spring *et al.*, 2018). Proto se jako primární ochrana semen před infekcí používají fungicidy. Bohužel stejně jako mnoho další patogenních druhů peronospor si i *P. halstedii* rychle vyvíjejí odolné genotypy na používané fungicidy (Jocić *et al.*, 2012).

Biokontrolními organismy jsou entomopatogenní houby (EF), což jsou druhy hub, které napadají hmyz. Entomopatogenní houby mohou bránit rostlinu před plísněmi, ale také podporují růstu a výživu rostlin. Nedávno se zjistilo, že druhy *B. bassiana* a *M. brunneum* inhibují půdní patogenní houby a také snižují vadnutí slunečnic. Navzdory

předchozím studiím mohou EF způsobovat i řadu nežádoucích účinků. Ty by mohly být způsobeny přímou konkurencí o živiny mezi rostlinou a houbou. Dále použití EF může na rostlinu působit jako stresový faktor, čímž je ohrožena výnosnost plodiny. Kolonizace i endofytické chování je do značné míry závislé na inokulačním postupu, hostitelské rostlině a druhu patogenu (Miranda-Fuentes *et al.*, 2021).

Dalším možností ochrany rostliny jsou geny rezistence označované jako *Pl* geny. Dnešní genotypy slunečnic nesou jeden nebo i více dominantních genů rezistence. Doposud bylo identifikováno dvacet dva genů rezistence (*Pl1*; *Pl2*; *Pl5-Pl8*; *Pl13-Pl16*; *Pl21*; *PlArg*). Geny jsou většinou odebrány z planých druhů (Spring *et al.*, 2018). Například gen *Pl6* byl objeven u druhu *H. annuus* (Miller a Gulya, 1991), *Pl7* v *H. praecox* (Miller a Gulya, 1991) a *Pl8* a *PlArg* v *H. argophyllus* (Miller a Gulya, 1991). Tyto geny mají dva možné fenotypové projevy. První typ je úplná rezistence a nepřítomnost patogenních symptomů. Druhým typem je neúplná rezistence s projevem symptomů ve slabé míře, a to pouze ve spodní části rostliny. Příznaky se nikdy neprojeví na pravých listech slunečnice. Fenotypový projev závisí na konkrétních *Pl* genech (Gascuel *et al.*, 2015). Stejně tak, jak se vyvíjí nové geny rezistence, tak se vyvíjí i nové rasy. Během posledních dvaceti let se objevily nové rasy *P. hastedii*, které překonaly téměř všechny rezistentní *Pl* geny (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). Pouze gen *PlArg* je stále funkční a rezistentní vůči cca. 40 různým rasám *P. halstedii* (Virányi *et al.* 2015). Protože jsou *Pl* geny specifické pro jednotlivé rasy, existuje velká pravděpodobnost, že budou vznikat nové rasy plísně slunečnicové, které budou rezistentní vůči *Pl* genům. Přestože monogenní rezistence není trvalá, introgrese genů *Pl* je stále nejúčinnější metodou proti infekci (Jocić *et al.*, 2012). Inbrední linie RHA 340 je nejčastěji používaná linie ke šlechtění nových odolných hybridů. Uklývá *Pl* gen odvozený z *H. argophyllus* poskytující odolnost vůči všem dosud popsaným patotypům *P. halstedii* v Evropě (Martín-Sanz *et al.*, 2019).

Genetickou rezistenci lze rozdělit do dvou kategorií. První je kvalitativní neboli monogenní rezistence. Slunečnice a plíseň mají typický „vztah mezi geny“ – pro každý gen virulence přítomný v patogenu existuje odpovídající gen rezistence v hostitelské rostlině. Pokud má rostlina účinný gen rezistence, který bude působit proti genu virulence v patogenu, infekce bude zastavena v blízkosti penetrace. To je způsobeno hypersenzitivní reakcí (HR), která se projevuje jako rozsáhlá buněčná smrt v pletivu infikovaných buněk. V rostlině se v pletivu vyskytuje řada propojených procesů, které aktivují jejich kaskádu, tím se zrychlí dýchání, zvyšuje se produkce oxidu dusnatého

(NO) a reaktivního kyslíku (ROS). To vede k oxidačnímu výbuchu. Výsledkem je neutralizace patogenních buněk (Jocić *et al.*, 2012).

Druhým typem geneticky podmíněné rezistence je polní rezistence řízená geny vedlejšího účinku. Obvykle není specifická pro rasu a odhaduje se, že je polygenní. Zdá se, že částečná rezistence nemá tak silný selekční účinek na populaci patogenů jako monogenní rezistence. Kombinací částečné rezistence se specifickou rezistencí lze dosáhnout trvalé odolnosti rostliny (Jocić *et al.*, 2012).

Indukovaná rezistence, často nazývaná systémová nebo získaná rezistence jsou specifické chemické sloučeniny, které spouští obranné mechanismy rostlin. Tato metoda je efektivní při obraně rostliny již během infekce, bez použití genetické rezistence. Aby se prodloužila schopnost rezistence u rostliny, je třeba uplatnit několik kontrolních opatření současně (Jocić *et al.*, 2012).

Virus Plasmopara halstedii (PhV) je jeden z mála virů u peronospor. PhV byl objeven na svém hostiteli, izolátu *P. halstedii*, v roce 1990 (Gulya *et al.*, 1990). Virus infikuje svého hostitele velmi snadno a rychle se množí (Grasse a Spring, 2015). Z pokusu Grasse z roku 2013 vyplývá, že virus PhV dokáže snížit účinky plísně *P. halstedii* na jejich hostitelích. Potlačení infekčnosti může mít praktické využití v ochraně právě slunečnic. Výskyt PhV nesouvisí přímo s konkrétní rasou *P. halstedii*. Dokáže celkově snížit infekci *P. halstedii* a podpořit rezistenci slunečnice.

2.7. Rozšíření *Plasmopara halstedii* ve světě

První zmínka o existenci *P. halstedii* pochází ze Severní Ameriky na počátku 20. století. O padesát let později se plíseň slunečnicová, díky zvýšenému mezinárodnímu obchodu s osivem na trhu se zemědělskými plodinami, rozšířila až do západní Evropy a Ruska. (Virányi *et al.*, 2015). V roce 1960 byly na světě zaznamenány pouze dvě rasy *P. halstedii*, tzv. Evropská rasa 1 (označovaná číslem 100) a rasa 2 (číslo 300) z Ameriky z údolí Red River (Zimmer, 1974).

O dvacet let později se opět v Severní Americe objevila nová rasa, kterou popsal Carson a označil ji jako rasa 3 (číslo 700). Později Gulya *et al.* (1991a) identifikoval v Minnesotě rasu 4 (č. 730). V 90. letech determinoval nové patotypy se složitější virulencí, jako byly rasy 6 a 7 (č. 310 a č. 330).

Od roku 1992 je *P. halstedii* v Evropské unii na seznamu patogenů s přísně karanténní regulací (Gascuel *et al.*, 2015). Poslední výzkumy uvádí globální stav

populace *P. halstedii* na 60 evidovaných rasách, z toho 36 patotypů ze Severní a Jižní Ameriky a 24 patotypů z Evropy (Trojanova *et al.*, 2018). Zbylé kontinenty, jako jsou Asie a Afrika, neprovádí pravidelný monitoring a nemají tolik dostatečných výsledků na vytvoření relevantních závěrů (Roeckel-Drevet *et al.*, 2003). Počet ras *P. halstedii* neustále významně roste. Nejvyšší patogenní diverzita *P. halstedii* se vyskytuje v Kanadě, USA a Francii (Virányi *et al.*, 2015).

Ve Spojených státech, stejně jako v Kanadě, dominuje hlavně rasa 730 (Virányi *et al.*, 2015). V Jižní Americe je situace poněkud odlišná. Díky odlišným klimatickým podmínkám, které nejsou příznivé pro vývoj patogenů je diverzita velmi nízká a za poslední desítky let se příliš nezměnila (Bertero de Romano *et al.*, 2010).

V západní Evropě jsou dominantní zcela odlišné rasy než v Americe. Nejpočetnější patotypy v Evropě jsou rasy 700; 710 a 730. V Evropě neustále vznikají nové patotypy. Navzdory tomu však tyto rasy zůstávají dominantní a stále nejběžnější (Virányi *et al.*, 2015). Stát s největší virulencí a diverzitou patogenu je Francie. Vzájemné kombinace ras a interakce s rezistentními hostiteli dávají snadno vzniknout novým patotypům (Gascuel *et al.*, 2015). Dominance ras *P. halstedii* a její rozložení se geograficky dost odlišuje. Nedávno se však v Německu objevila nová rasa 354, která je schopná překonat odolnost využívaného genu rezistence *Pl-6* (Spring a Zipper, 2018). Ve Španělsku je situace relativně odlišná a za posledních deset let zde diverzita vzrostla na 22 popsanych ras (Miranda-Fuentes *et al.*, 2021). Stejně jako v Německu a dalších státech EU se i zde vyskytují rasy překonávající rezistenci *Pl-6* genu. Zajímavostí je genotyp slunečnice RHA-340. Tento genotyp je odolný vůči izolátu 715 ze Španělska a zároveň náchylný na izoláty rasy 715 z Francie a Itálie (Miranda-Fuentes *et al.*, 2021).

Ve státech východní Evropy se rozmanitost ras dosti shoduje. I když je Rusko jeden z prvních evropských států, kde se *P. halstedii* vyskytla, tak pravidelných a důvěryhodných záznamů moc není. Dá se říct, že relevantní výsledky jsou teprve z nedávné doby. V roce 2016 se v Rusku objevila nová rasa 734. V některých případech se jednalo o směs rasy 334 s 710 nebo 730. Rasa 734 spolu s rasou 334 jsou jedny z mála ras, které jsou schopné překonat rezistenci genu *Pl6* (Iwebor *et al.*, 2018). Nejpodrobnější výsledky z východní Evropy pochází z Maďarska (Virányi *et al.*, 2015).

2.8. Rasy *Plasmopara halstedii* v České republice

První zmínka o plísní slunečnicové se v České republice (v dřívějším Československu) objevila v 50. letech minulého století. Nicméně podrobné a pravidelné studie výskytu a patogenní variability *P. halstedii* jsou záležitostí až současné doby. Od roku 2007 bylo postupně identifikováno osm patotypů *P. halstedii*, konkrétně rasy 700; 704; 705; 710; 714; 715; 730 a 770 (Sedlářová *et al.*, 2013). Tyto doposud zjištěné rasy se velmi podobají až shodují s rasami ze středoevropských zemí, jako je Maďarsko (Virányi *et al.* 2015).

Nejběžnější rasou v České republice je patotyp 700 a 710. Rasa 700 je u nás prokázána již od počátku prvních studií v roce 2007. Druhá nejčastější rasa 710, která u nás byla poprvé zaznamenána v roce 2011. Zároveň lze říct, že rasa 700 je nejčastější a převládající patotyp v celé Evropě a je přítomná až v deseti zemích Evropské unie (Virányi *et al.*, 2015). V poslední době se zdá, jako by rasa 700 v České republice zcela vymizela. Dá se ale předpokládat, že je stále přítomná v hybridní podobě v jiných více virulentních rasách (Trojanova *et al.*, 2018). Další rasy 704 a 714 byly nalezeny v období tří let. Zbylé ostatní rasy byly zaznamenány pouze v jedné vegetační sezóně (rasa 730 v roce 2010 a rasy 705 a 715 v roce 2014). U všech nových ras (č. 704; 705; 714 a 715) se prokázalo, že jsou schopné překonat gen rezistence Pl6, což může znamenat pro pěstování slunečnice velký problém (Sedlářová *et al.*, 2013).

Od roku 2013 se začaly získané izoláty testovat podle nově uvedené metodiky, kdy se diferenciacní řada rozšířila na 15 diferenciacních linií. Daná rasa se tak místo třímístného kódu nyní označuje pětímístným kódem virulence. Později v roce 2014 byly zaznamenány rasy 704 71; 705 71; 710 60; 714 61 a 715 71 (Trojanova *et al.*, 2018).

Nejnovější výzkumy od roku 2015 do současnosti využívají pětímístného označení rasy. Na území České republiky byla nově zaznamenána rasa 714 71 (dominantní v roce 2016 a 2017). Je možné, že rasa 714 71 vznikla křížením ras 704 71 a 710 60, které se v těchto letech také hojně vyskytovaly (Dobešová, 2018).

2.9. Vznik nových ras *Plasmopara halstedii*

P. halstedii je patogen s vysokou virulencí, agresivitou a velkým potenciálem pro vývoj nových ras (Jocić *et al.*, 2012). Vznik nových ras *P. halstedii* může mít několik příčin. Například intenzivní pěstování slunečnice či zavádění nových slunečnicových genotypů s novými geny rezistence (*Pl*). Selekcční tlak širokého spektra genů rezistence může nutit

patogen přizpůsobit se novým podmínkám a vytvořit tak nové rasy (Virányi *et al.*, 2015). Díky podrobnějšímu genetickému pozorování a testování se v roce 2007 přišlo na další proces, který hraje klíčovou roli při vzniku nových ras. Jedná se o outcrossing (Gascuel *et al.*, 2015). Například rekombinace mezi izoláty patotypu 703 a 704 z Francie pravděpodobně vedly ke vzniku nové rasy 707 (Delmotte *et al.*, 2008). Dále nepohlavní genetická rekombinace mezi *P. halstedii* izoláty v kombinaci s mutací v klonových liniích může vést ke vzniku nových ras (Trojanova *et al.*, 2018). V dnešní době nedochází pouze ke vzniku nových ras, ale také k zániku starých ras, např. patotypů 100, 300 a 700. Kromě toho ne všechny patotypy mají stejný ekonomický dopad. Například rasa 714 má vysokou úroveň virulence a rezistence vůči fungicidům, což může v budoucnu znamenat velké problémy (Virányi *et al.*, 2015).

3. Biologie plísně salátové, *Bremia lactucae*

Bremia lactucae Regel je původce plísně salátové (Lebeda *et al.*, 2008a). Plíseň salátová je jedna z nejběžnějších chorob salátu (*Lactuca sativa*). Vyznačuje se velkými rozdíly ve fenotypové expresi symptomů a stupněm infekce (Petrželová a Lebeda, 2004a). *B. lactucae* napadá rostlinná pletiva svého hostitele, ale může způsobit také úhyn celé rostliny, což má obrovský dopad na celosvětovou ekonomiku a distribuci salátu (Spring *et al.*, 2019). *B. lactucae* je vysoce variabilní patogen s širokým hostitelským spektrem. Nejčastějším hostitelem *B. lactucae* jsou přirozená společenstva *Lactuca serriola* (locika kompasová). Může napadat spoustu dalších druhů *Lactuca* spp. (Lebeda *et al.*, 2002). *B. lactucae* se vyskytuje zejména v oblastech s mírným podnebím. Příznaky infekce na rostlinných hostitelích je možné pozorovat během celé vegetační sezóny salátu, což je od začátku dubna až do konce listopadu (Petrželová a Lebeda, 2004a).

3.1. Taxonomie druhu *Bremia lactucae*

Bremia lactucae spadá do stejného řádu jako *P. halstedii* (plíseň slunečnicová), a to do řádu Peronosporales. Od ostatních rodů se liší hlavně svým nepohlavním rozmnožováním (Spring *et al.*, 2019). V taxonomii rodu *Bremia* došlo na základě molekulárních studií ke změnám. Dříve byly uznávány dva druhy: *B. graminicola* a *B. lactucae*, které se od sebe lišily pouze svým hostitelským spektrem (Lebeda *et al.*, 2002). *B. graminicola* je spíše patogen travních druhů *Arthraxon beauv*, čeledi Poaceae. Má velmi charakteristické konidie, které jsou snadno odlišitelné od *B. lactucae* (Crute a Dixon, 1981). Nedávno se však došlo na to, že *B. graminicola* nijak nesouvisí s druhem *B. lactucae*, a byla proto přearažena do nového rodu *Graminivora* (Spring *et al.*, 2019).

Molekulární výzkumy potvrdily rozmanitost druhu *B. lactucae* a přispěly k dalšímu rozdělení rodu na více než 10 odlišných druhů s velmi úzkým hostitelským spektrem (Choi a Thines, 2015). Rod *Bremia* (Regel 1843) obsahuje patogeny parazitující na široké škále hvězdicovitých rostlin, které jsou běžné v mírných a subtropických oblastech severní polokoule (Thines *et al.*, 2010). Z devíti odlišných fylogenetických linií odpovídá část již dříve popsáným druhům. Kromě *B. lactucae*, *B. lapsanae*, *B. sonchicola*, a *B. taraxaci*, existují ještě dva další blíže nepopsané druhy, jeden parazituje na *Hieracium murorum* a další parazituje na *Leontodon hispidus* (Thines *et al.*, 2010). Na základě těchto studií se *B. lactucae* považuje za monotypický patogen, který způsobuje

pouze plíseň salátovou na *Lactuca sativa* a úzce příbuzných druzích *Lactuca* spp. (Spring *et al.*, 2019).

3.2. Hostitelský okruh *Bremia lactucae*

Bremia lactucae Regel je obligátní biotrofní patogen, který způsobuje plíseň salátovou. Napadá nejen rostliny rodu *Lactuca*, ale také více než 200 druhů a asi 40 rodů z čeledi Asteraceae (Lebeda *et al.*, 2002). I přes zdánlivě široký hostitelský okruh, jsou jednotlivé izoláty *B. lactucae* vysoce specifické a většinou jsou omezeny jen na určitý hostitelský rod či druh (Mieslerová *et al.*, 2013).

V rámci rodu *Lactuca* existuje zhruba 100 druhů, ale pouze 14 z nich se prokázalo jako přirozený hostitel *B. lactucae* (Lebeda *et al.*, 2002). Petrželová a Lebeda (2004a) uvádí, že nejběžnějším hostitelem ve střední Evropě je planý druh *L. serriola* (locika kompasová) a hospodářsky významný druh *L. sativa* (locika setá). Pravidelné studie prokázaly, že izoláty *B. lactucae* jsou výrazně více patogenní pro druh *L. serriola* než *L. sativa* (Lebeda *et al.*, 2002). Mezdruhový přenos se prokázal pouze v rámci rodů *Lactuca* a *Sonchus* (Petrželová a Lebeda, 2004a). Plevel *S. oleraceus* (mléč zelinný) je nejčastější hostitel pro *B. lactucae* mimo rod *Lactuca* spp. (Lebeda *et al.*, 2008b). Ojedinělý výskyt *B. lactucae* byl zaznamenán také u některých druhů, např. *Cirsium arvense*, *Carduus crispus*, *Lapsana communis*, *Sonchus arvensis* a *Sonchus asper* (Lebeda *et al.*, 2008a).

3.3. Faktory ovlivňující šíření *Bremia lactucae*

Prvním a logickým předpokladem výskytu patogenu je přítomnost jeho hostitele. Druhým velmi důležitým faktorem jsou obecné klimatické podmínky a specifické mikroklimatické podmínky v jednotlivých regionech (Lebeda *et al.*, 2008a). S tím souvisí doba výskytu patogenu během roku. Nejčasnější výskyt patogenu je od druhé poloviny dubna, kdy jsou mikroklimatické podmínky v některých lokalitách již vhodné pro raný růst salátů a pro jejich časnou infekci. Nejčastěji se však *B. lactucae* vyskytuje během letních měsíců (červen až srpen). Poslední možná infekce *B. lactucae* je obvykle koncem září, kdy je většina populace salátu již na konci svého životního cyklu. V populacích jiných druhů Asteraceae infekce přetrvávala ještě déle, často až do zimních měsíců (Petrželová a Lebeda, 2004a).

Faktory prostředí jako je teplota, relativní vlhkost vzduchu, rychlost větru a sluneční záření jsou faktory, které určují rozsah infekce, produkci konidií, jejich disperzi a uchycení na hostiteli (Fall *et al.*, 2016). Teplota prostředí má velmi významný účinek na sporulaci. Teplotní rozsah umožňující sporulaci *B. lactucae* se pohybuje od 4 do 20 °C, přičemž optimum je v rozmezí od 10 do 15 °C. Sporulace upřednostňuje co nejdélejší období při optimálních teplotách (Su *et al.*, 2004). Hlavní oblast výskytu *B. lactucae* je mírná až subtropická část severní polokoule na všech kontinentech, kde se salát pěstuje. K infekci plísňě salátové však dochází i v suché oblasti (např. Kalifornie a Arizona v USA a Izrael), kde se salát pěstuje pod zavlažovacím systémem (Spring *et al.*, 2019). Pro úspěšnou sporulaci mikromycet je důležitá vysoká relativní vlhkost, až 90–100% (Lebeda a Petrželová, 2010). *B. lactucae* vyžaduje alespoň 80% relativní vlhkost vzduchu. Další vnější faktor, který přímo souvisí s vlhkostí vzduchu je rychlost větru (Su *et al.*, 2004). Vítr může snížit relativní vlhkost vzduchu povrchu listu, tím se zvýší rychlost transpirace rostliny, a tak může potenciálně inhibovat sporulaci (Su *et al.*, 2004). Rychlost větru hraje také důležitou roli při disperzi konidií (Fall *et al.*, 2016). Pokud rychlost větru překročí 0,5 m/s, je potlačena sporulace úplně (Su *et al.*, 2004).

Kromě vnějších faktorů jsou důležité také konkrétní vlastnosti hostitele, jako je třeba stáří rostliny. Infekce v raných stádiích rostlinného růstu může způsobit nevratné poškození a následnou hnilobu mladých rostlin (Petrželová a Lebeda, 2004a). Velikost populace je také důležitým faktorem. Malé populace s nízkou hustotou výsevu jsou většinou infikovány mírněji nebo dokonce vůbec. Velké populace, které jsou buď husté, nebo rozložené na velkých plochách jsou vždy silně napadené (Petrželová a Lebeda, 2004a).

Důležitou roli v epidemiologii patogenu hraje i genetika. Zejména genotyp hostitel a patogenu. Genetická rozmanitost hostitele a jeho šířka rezistence má značný vliv na výskyt patogenu. Pro patogen je naopak důležitý jeho rozsah virulence. Čím větší je genetická rezistence hostitele, tím více klesá riziko napadení patogenem. Bohužel míra rezistence hostitele je evolučně úzce spjatá s virulencí patogenu (Lebeda *et al.*, 2004a).

3.4. Životní cyklus *Bremia lactucae*

B. lactucae je obligátní biotrofní parazit. Její životní cyklus má dvě fáze. Zahrnuje primární (pohlavní) a sekundární (nepohlavní) fázi životního cyklu. Během pohlavního

cyklu vytváří půdní oospory, které dokáží přezimovat na zbytcích rostlin a na jaře se stávají primárním zdrojem infekce (Fall *et al.*, 2016).

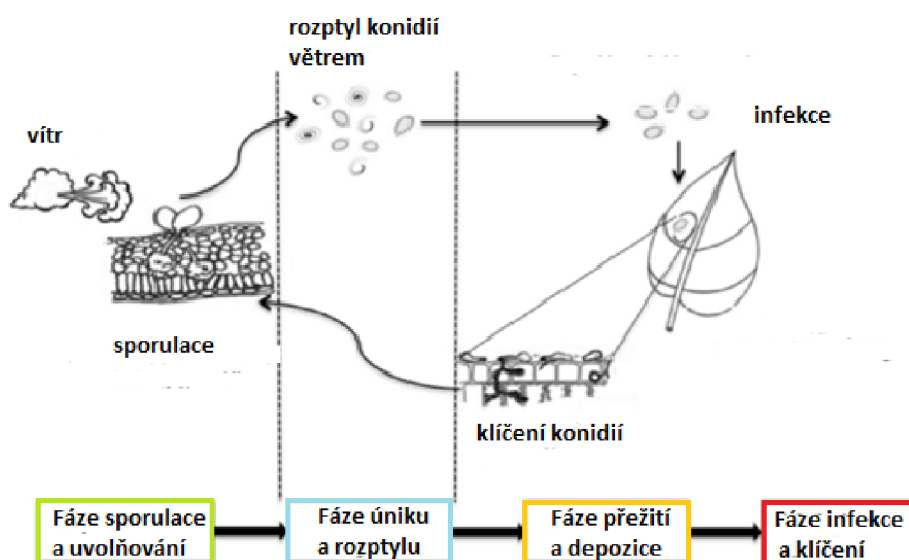
Při klíčení oospor dochází k primární infekci. K té může dojít dvěma základními způsoby. Nejčastěji přímou penetrací přes epidermis, případně méně častým způsobem (1–5 %), kterým je nepřímá (stomatální) penetrace (Lebeda *et al.*, 2001). Spory *B. lactucae* během penetrace musí překonat několik ochranných bariér rostliny – kutikulu a buněčnou stěnu (Lebeda *et al.*, 2001). *B. lactucae* při pronikání do rostliny využívá kombinaci mechanického tlaku a enzymů, které umožní degradaci buněčné stěny (Lebeda *et al.*, 2008b). *B. lactucae* uvnitř epidermálních buněk tvoří primární infekční struktury, následně pomocí intercelulární hyfy a haustorií dochází ke kolonizaci rostlinných pletiv (Lebeda *et al.*, 2008b).

Po primární infekci následuje nepohlavní fáze životního cyklu patogenu, která probíhá během hlavní vegetační sezóny salátu. Mezibuněčné hyfy *B. lactucae* rostou a využívají živiny hostitelských rostlinných buněk. Pokud jsou vnější podmínky příznivé, může probíhat systémová infekce velmi rychle. Za vysoké relativní vlhkosti vzduchu se na spodní straně listu začne vytvářet bílý povlak, stejně jako u *Plasmopara*. Bílý povlak vzniká díky sporulaci konidií, což jsou nepohlavní buňky na konidioforech patrné na obr. 7 (Fall *et al.*, 2016).

V nepohlavní fázi *Bl* vytváří konidie (viz obr. 7), které jsou uzpůsobeny k šíření větrem. Nejprve konidie, které přistanou na listech hostitele vyklíčí a kolonizují epidermální buňky listové. Za vhodných podmínek (vysoká vlhkost a nízká rychlost větru) se začnou konidie množit (Wu *et al.*, 2000). Se zvyšující se rychlostí větru nastává druhá fáze šíření konidií na další rostliny salátu (úniková a rozptylová fáze). Ve třetí fázi se konidie přichytí na okolních listech salátu (fáze přežití a depozice). V konečné fázi je zapotřebí na povrchu listu voda, aby mohlo dojít k vyklíčení konidie (fáze infekce a klíčivosti) (Fall *et al.*, 2016). Konidie *B. lactucae* přichycené na listech salátu mohou přežít poměrně dlouho, víceméně i za nepříznivých podmínek prostředí, protože transpirace listů rostlin zajišťuje dostatečnou vlhkost konidií a ony se nevysuší, ani když je okolní vzduch suchý (Wu *et al.*, 2000).



Obrázek 6: Konidiofor s konidii *Bremia lactucae*. Převzato z Watt, Bugwood.org



Obrázek 7: Nepohlavní rozmnožování *Bremia lactucae*. Upraveno dle Fall *et. al.*, 2016

3.5. Příznaky infekce *Bremia lactucae*

Existuje široké spektrum symptomů při napadení patogenem *B. lactucae*. Symptomy nemoci mohou být rozděleny do několika kategorií – podle základního charakteru reakce, tvaru léze a intenzitě sporulace. Tyto příznaky jsou rasově specifické a jsou podmíněny geny rezistence (Lebeda *et al.*, 2008b).

První kategorie příznaků zahrnuje infekci bez viditelného narušení. Je typická pro rostlinné genotypy s úplnou rezistencí. Jsou charakteristické pouze malými chlorotickými nažloutlými skvrnami na listech, které jsou ohraničeny žilnatinou. Na spodní straně listů tvoří bohatou sporulaci, která napomáhá šíření patogenu na okolní rostliny (viz obr. 8, 9).

U odolných rostlin je proces infekce zastaven hypersenzitivními reakcemi, díky čemuž se na zbytku rostliny neobjevují jakýchkoli další viditelné příznaky (Lebeda *et al.*, 2008a). Druhým typem fenotypového projevu infekce je omezená sporulace spojená s malými nekrotickými skvrnami, které se projevují u rostlin s částečnou rezistencí.

Poslední kategorií jsou příznaky neodolných genotypů, u kterých je infekce spjatá s velmi nápadnými chlorotickými skvrnami, které se mohou změnit v rozsáhlou nekrotizaci, která končí odumřením celé rostliny (Lebeda *et al.*, 2008a). Obecně platí, že boj proti pravým plísním stojí rostlinu větší energii. Buď potřebuje energii na vyvolání obranných reakcí nebo ke snížení sacharidů v těle rostliny. Infekce vede ke zničení chlorofylu a možnému zablokování procesů fixace CO₂. Rostliny infikované *B. lactucae* mají pomalejší fotosyntézu, dochází k inhibici transportu elektronů ve fotosystému II (Prokopová *et al.*, 2010).



Obrázek 8: Symptomy *Bremia lactucae*: chlorotické skvrny na listech salátu. Převzato z Petrželová a Lebeda, 2011

A)



B)



Obrázek 9: Symptomy *Bremia lactucae*: a) chlorotické skvrny na listu; b) sporulace na spodní straně listu. Převzato z Petrželová, 2004

3.6. Virulence *Bremia lactucae*

B. lactucae velmi často tvoří fyziologicky specializované jedince (fyziologické rasy) charakteristické určitým typem patogenity (tj. vzorce virulence), které jim umožňují překonat rezistenci různých genotypů salátu a divokých *Lactuca* spp. (Lebeda a Zinkernagel, 2003a).

První, kdo se věnoval virulenci *B. lactucae*, byl pravděpodobně Schweizer, který předpokládal existenci určitých fyziologických ras. První důkaz byl však doložen až ve 40. letech 20. století v experimentech, které prováděl Ogilvie. V pozdějším testování se díky intenzivnímu screeningu virulence *B. lactucae* odhalil vysoký stupeň patogenní diverzity (Spring *et al.*, 2019).

Nejběžnější testování se provádí na základě infekčních biotestů různých diferenciačních sad genotypů salátu. V minulosti se v různých zemích používaly odlišné diferenciační sady, což znemožnilo srovnání a porovnání výsledků (Crute a Dixon, 1981). Proto Crute a Johnson vynalezli pokročilejší systém pro označení fenotypů virulence *B. lactucae*. Biotest byl založen na klasifikaci genů rezistence (Dm geny nebo R-faktory) v diferenciačních souborech genotypů salátů. Konkrétní diferenciační soubor se označoval

písmenem-A (1999). Později byl pozměněn. Došlo k nahrazení a přidání některých genotypů salátu. Nový soubor se označoval písmenem-B (2010). Výsledkem biotestu byl šestimístný kód, který charakterizoval konkrétní izolát *B. lactucae*. V roce 2016 byl tento systém opět nahrazen novým diferenačním souborem-C, kde bylo mnoho předchozích genotypů salátu vynecháno. Nyní se rasa *B. lactucae* označuje zkratkou BL a následuje šestimístný kód virulence (Spring *et al.*, 2019).

3.7. Rezistence rostlin vůči *Bremia lactucae*

Salát obsahuje látky, které jsou během infekce uvolňovány a napomáhají rostlině v boji proti infekci *B. lactucae*. Reaktivní kyslík (ROS), dusík (RNS) a meziprodukty síry (RSS) kombinované s transportem fytohormonů patří mezi rané chemické látky během interakce s patogenem. ROS zpomaluje průběh infekce, posiluje rezistentní reakce (Delledonne *et al.*, 2003) a spouští naprogramovanou buněčnou smrt (Kamoun *et al.*, 1999). Aktivita je spojena s expresí rasově specifické rezistence salátu (Sedlářová *et al.* 2007a). Hypersenzitivní reakce neboli programovaná buněčná smrt (Kamoun *et al.*, 1999), je jednou z nejdůležitějších vlastností rasově specifické rezistence salátu vůči *B. lactucae*. Životní strategie parazitů je založena na využívání živin z hostitelských pletiv rostliny. Pokud pletivo odumře, nemá z čeho patogen čerpat živiny a uhynie dřív, než se stihne v rostlině rozšířit (Lebeda *et al.*, 2008b).

U salátu existují tři kategorie rezistence: specifická rezistence daná geneticky, rasově nespecifická rezistence a rezistence populace. Specifická rezistence je charakteristická fenotypovou expresí infekce. Specifičnost je určena dominantními geny rezistence (Dm geny), případně R-faktory v hostiteli. Nespecifická rezistence je určena několika geny s nespecifickým fenotypovým projevem rezistence vůči širokému spektru patotypů *B. lactucae*. Rezistence populace je komplexní epidemiologický jev (Lebeda *et al.*, 2002), kdy v populacích salátu pěstovaného k zemědělskému využití je pozorovaná nižší rezistence než u přírodních populací *Lactuca* spp. (Lebeda *et al.*, 2008b).

V současné době bylo v *L. serriola* identifikováno více než 45 Dm genů nebo R-faktorů rezistence (Lebeda *et al.*, 2002). Předpokládá se, že existuje stejný počet avirulentních (Avr) genů a faktorů v patogenu *B. lactucae*. Také je pravděpodobné, že počet dalších genů rezistence v populacích *L. serriola* není konečný. Nicméně zatím jsou k dispozici pouze omezené informace o distribuci rasově specifické rezistence v přirozených populacích *L. serriola*. U hospodářsky pěstovaného salátu *L. sativa* se na

jeho ochranu používají pouze určité typy rezistentních genů. V Evropě jsou nejčastěji používané geny Dm3; Dm4; Dm5/8; Dm6; Dm7; Dm11; Dm16; Dm18 a jejich kombinace (Lebeda a Petrželová, 2010).

Další faktory, které mohou hrát rozhodující roli v obraně rostliny jsou fytohormony, zejména hladina cytokininů. Hrají zásadní roli v regulaci primárního metabolismu a metabolismu cukrů (Prokopová *et al.*, 2010).

3.8. Koevoluce *Lactuca serriola* a *Bremia lactucae*

Obrovskou variabilitu ve specifičnosti interakce mezi *B. lactucae* a *L. serriola* lze vysvětlit pomocí zdlouhavého procesu koevoluce hostitel-parazit (Lebeda, 2002). Velmi důležitou roli v populacích *B. lactucae* hraje pohlavní reprodukce. Během reprodukce dochází ke genetické rekombinaci, která je považovaná za hlavní zdroj variability v patogenitě (Lebeda *et al.*, 2008a).

Interakce mezi *L. serriola* a *B. lactucae* obecně odpovídá vztahu „gen za gen“. Tento vztah je založený na rezistenci hostitele, která je dána dominantními rezistentními Dm geny. Většina rezistence je považována za rasově specifickou (Lebeda *et al.* 2002). Druhým činitelem je patogen a jeho virulence, která je určena dominantními avirulentními faktory (Mieslerová *et al.*, 2013). Ve vztahu „gen za gen“ je tedy míra rezistence závislá na patogenu. V průběhu let se množství rezistentních genotypů salátu zvyšovalo, zároveň však došlo ke zvýšení stupně virulence u patogenu. Úroveň genetické rezistence hostitele silně ovlivňuje jeho populační dynamiku a rovnováhu interagujících druhů (Lebeda a Zinkernagel, 2003a). Zavedení nových odolných genotypů salátu je často následováno vytvořením nových virulentních ras patogenu. Proto je tento typ rezistence považovaný za nedokonalou a krátkodobou ochranu před plísní salátovou (Lebeda *et al.*, 2008a).

3.9. Metapopulace *Lactuca serriola* v Evropě

Populace druhu *L. serriola* se mezi sebou liší. Mohou existovat mírné regionální rozdíly mezi populacemi díky působení místních selekčních tlaků. Selektce vyvíjí druh podle působících faktorů prostředí, které mají za následek rozdíly v rámci populace a tím vznikají drobné, navzájem se lišící matapopulace (Petrželová a Lebeda, 2011). Tok genů způsobuje změny v genových frekvencích mezi populacemi. Zvyšuje variace v rámci

populace. Lokální adaptace je intenzivně ovlivněna dynamikou a mírou migrace hostitele či patogenu, neboli tokem genů (Laine, 2005).

Koncept metapopulace, neboli propojení místních populací pomocí toku genů a migrace, má obzvlášť velký význam v parazitických interakcích s rostlinou (Petrželová a Lebeda, 2011). Jelikož je patogen po celý svůj život zcela závislý na svém hostiteli a postrádá fáze volného života, je v takových případech účinek fragmentace a stupně izolace populace mnohem horší (Burdon *et al.* 2006). To platí zejména v patosystémech, jako je *Lactuca* spp., *B. lactucae*, které dodržují principy teorie „gen za gen“ (Lebeda *et al.*, 2002).

V Evropě existují velké rozdíly v rezistencích v rámci metapopulace, a to jak na úrovni populací, tak jednotlivců. Celková rezistence v Evropě je poměrně nízká. Je známo, že R-fenotypově zcela odlišné rostliny *L. serriola* se mohou vyskytovat a růst v těsné blízkosti. Rozmanitost R-fenotypů *L. serriola* v Evropě je docela rovnoměrně rozložena (Petrželová a Lebeda, 2011).

3.9.1 Metapopulace *Lactuca serriola* v České republice

Metapopulace *L. serriola* v České republice jsou v rámci Evropy nejvariabilnější, co se týká rezistence rostlin a samotné fenotypové frekvence populace. České populace mají vysokou variabilitu v reakci na jednotlivé rasy *B. lactucae*. Velká část populace *L. serriola* je velmi náchylná na *B. lactucae*. Na druhou stranu je Česká republika jedním z geografických regionů, v rámci distribuce *L. serriola*, kde v místních metapopulacích byly nalezeny populace s vysokou mírou rezistence. Co se týká variability na úrovni jedince, je variabilita velmi vysoká. Liší se jak svou strukturou, tak i složitostí fenotypové rezistence. Spousta jednotlivců vykazovala rasově specifické obranné mechanismy. V přírodě v asociacích hostitel-patogen je polymorfismus v populacích udržován cykly koevoluce v kombinaci s příležitostnými migracemi nových genů rezistence a virulence (Petrželová a Lebeda, 2011).

4. Uchovávání hub a peronospor

Fytopatogenní houby se dlouhodobě velmi obtížně uchovávají, často dochází ke ztrátě patogenity, virulence a schopnosti sporulace (Dahmen *et al.*, 1983). Biotrofy ze třídy Peronosporomycetes nelze pěstovat na umělých mediích, pouze na živém hostiteli. Tito parazité se proto uchovávají přímo na infikovaném pletivu svého hostitele (Smith *et al.*, 2001).

Správné uchovávání snižuje nebo zcela odstraňuje riziko kontaminace, které může být způsobené opakovaným přemnožováním. Uchovávání v nízké teplotě omezuje nebo zcela blokuje metabolismus patogenu, a tím zachovává původní vlastnosti vzorku (Laviola *et al.*, 2006). Primárním cílem uchovávání organismů je tedy jejich udržení v životaschopném stavu bez morfologické, fyziologické nebo genetické změny, dokud není potřeba jeho dalšího budoucího využití třeba u důležitých výzkumných a průmyslových izolátů (Smith *et al.*, 2001).

4.1. Metody uchovávání peronospor

Metody pro konzervaci houbových organismů lze rozdělit do tří skupin. První metodou je technika krátkodobého uchovávání izolátu v živém stavu. Jedná se o nepřetržité přemnožování vzorků, dokud nevyčerpají živiny ze zdroje. Časté přemnožování vzorků může být zpomaleno uchováváním izolátů v chladničce či mrazničce (při -10 °C až -20 °C), pod vrstvou parafinového oleje nebo v destilované vodě. Druhou metodou je sušení vzorku v klidové fázi (např. spor, cyst). Organismy lze zakonzervovat a vysušit pomocí silikagelu nebo v půdě či písku. Poslední metodou je kryokonzervace, kdy velmi nízkou teplotou, -20 až -80 °C a méně, dojde k zastavení metabolismu daného vzorku. Nízkou teplotou se ve vzorku odstraní voda a tím se metabolismus zastaví (Morris, 1981). Spory mikromycet mají nižší obsah vody než vegetativní hyfy a jsou schopny lépe odolat vysychání, tím je snazší je následně oživit (Smith *et al.*, 2001).

Lyofilizace a uchovávání vzorků v kapalném dusíku jsou nejčastěji používané techniky, se kterými se konzervuje velké množství organismů ze třídy Peronosporomycetes (Dahmen *et al.*, 1983). Neexistuje žádná univerzální technika na uchovávání peronospor. U přežití izolátu při dlouhodobém uchovávání hraje roli několik faktorů. Tyto faktory zahrnují samotné vlastnosti vzorků, které mají být konzervovány. Zásadní je také stupeň teploty, rychlost zmrazení a rozmrazení nebo povaha ochranného

média atd. (Laviola *et al.*, 2006). Nejspolehlivější techniky dlouhodobé kryokonzervace vyžadují velmi chladné teploty. Důležité je pochopit, že čím chladnější je teplota při konzervaci, tím větší bude pravděpodobnost životaschopnosti vzorků i po delší době (Humber, 1997). Jiné techniky, jako je uchovávání v minerálním oleji, půdě nebo vodě mohou být užitečné pro širokou škálu patogenů, ale úspěšná doba uchovávání je poměrně krátká. Lyofilizace umožňuje přežít pouze robustnějším sporám. Spory s tenkými stěnami a vysokým obsahem vody jsou na tom hůře a musí být zvolena jiná metoda (Smith *et al.*, 2001).

Co se týká samotného dlouhodobého uchovávání vzorků, je nejlepší využívat mrazničky na kapalný dusík. Ovšem jejich provoz je poměrně drahý a nákladný. Proto spousta laboratoří uchovává vzorky v mrazničkách s teplotou od -80 do -120 °C. Ultrachladné mrazničky jsou velmi dobré pro uchovávání většiny hubových organismů. Doporučuje se k nim připojit záložní zařízení na kapalný dusík, aby se udržela teplota při výpadku proudu. Teploty v těchto mrazničkách se blíží teplotám, které z dlouhodobého hlediska představují určitá rizika v životaschopnosti zmrazených vzorků. Nejjednodušší zařízením k uchovávání jsou obyčejné mrazničky s teplotou okolo -20 °C. Konzervace v těchto mrazničkách se však nedoporučuje pro dlouhodobé uchovávání, ale spíše na kratší sezónní uchovávání vzorků (Humber, 1997).

4.1.1. Sériové uchovávání

Sériová subkultura je široce používána metoda a je zřejmě i nejjednodušší a finančně nejefektivnější metodou v laboratoři, zvláště pokud jsou vzorky často využívány. Problém může nastat při kontaminaci izolátu s jinými mikroorganismy, jako jsou bakterie nebo spory jiných druhů mikromycet. Média, na kterých jsou vzorky uchovávány, by neměla podporovat nadměrnou sporulaci, protože meiotické dělení může zvyšovat genetickou variabilitu a nově vzniklé genotypy se tak mohou lišit od rodičovských genotypů. Navzdory nejlepšímu managementu se to však časem nevyhnutelně stane, pokud jsou izoláty udržovány v kultuře po příliš dlouhou dobu (Smith *et al.*, 2001). Opakovaná subkultivace může vést k takovým škodlivým změnám, jako jsou ztráty patogenity, virulence nebo sporulace (Humber, 1997). Často se používá chlazení pod pokojovou teplotou, protože prodlužuje interval subkultury, čímž se potlačí rychlost metabolismu. Uchovávání při teplotě 4–7 °C v chladničce nebo v chladné místnosti může

prodloužit životaschopnost až o 2 měsíce. Omezení živin může výrazně snížit růst kmene a prodloužit období mezi dalším přemnožením (Smith *et al.*, 2001).

4.1.2. Uchovávání pod minerálními oleji

Uchovávání vzorků pod vrstvou sterilního minerálního oleje, jako je např. ropa, je jednou z nejstarších, nejjednodušších a nejméně nákladných metod pro dlouhodobé uchování izolátů. Tento přístup se stále používá zejména u mikromycet, které netolerují lyofilizaci nebo je jejich kryogenní konzervace příliš nákladná. Olej zabraňuje vysychání a snižuje výměnu plynů, čímž se redukuje metabolismus mikromycet (Humber, 1997). Pokrytím vzorku minerálním olejem se zabraňuje jeho dehydrataci (Smith *et al.*, 2001). Izoláty uchovávané pod minerálním olejem mohou zůstat životaschopné po celá desetiletí (Humber, 1997).

4.1.3. Uchovávání pod sterilní destilovanou vodou

Uchovávání metabolicky neaktivních mikromycet pod vrstvou destilované vody je velmi nenáročná metoda, a to jak pro svou snadnou aplikaci, tak pro nízké náklady. Délka konzervace je často omezená a pro některé mikromycety je tato metoda zcela nevhodná. Považuje se za užitečnou pouze pro krátkodobé uchování (2–5 let) a měla by být zálohována metodami dlouhodobějšího uchovávání (Smith *et al.*, 2001). Příliš mnoho inokula na objem vody může ohrozit schopnost izolátu vydržet dlouhodobé uchovávání. Tomu se lze vyhnout při použití nejméně 40krát většího množství vody než inokula. Tato metoda je užitečná zejména pro mikromycety, které nelze lyofilizovat, jako jsou třeba peronospory (Humber, 1997).

4.1.4. Uchovávání na silikagelu

Použití silikagelu na uchovávání pravých plísní je velmi úspěšná metoda. Sporující organismy lze konzervovat po dobu 7–18 let. Tyto organismy pak úspěšně zůstávají morfologicky stabilní i po znovu oživení kmene (Smith *et al.*, 2001). Tato technika je poměrně jednoduchá. Suspenze se sporami se naočkuje na studený silikagel. Izolát se poté dehydratuje a tím umožní konzervaci bez růstu či aktivity metabolismu organismu. Uchovávání na silikagelu má řadu výhod, je jednoduché a nevyžaduje drahé zařízení. Izoláty jsou relativně stabilní a umožňují uchovat širokou škálu sporulujících hub.

Uchovávání na silikagelu má také své nevýhody. Omezuje se pouze na sporulující houbové organismy. Mikromycety s vysokými obsahem vody nejsou vhodné pro konzervaci na silikagelu. Nevhodnými izoláty jsou právě organismy ze třídy Peronosporomycetes a Entomophthorales nebo mikromycety s tenkostěnnými spory (Smith *et al.*, 2001). Spory na sterilním bezvodém silikagelu se doporučuje uchovávat v mrazničce s teplotou okolo -20 °C. Naočkovaný silikagel je možné uchovávat také při pokojové teplotě, ale životaschopnost izolátu se tak rychleji snižuje (Humber, 1997).

4.1.5. Uchovávání lyofilizací

Lyofilizaci neboli vysoušení mrazem objevili roku 1911 vědci D. L. Harris a L. F. Shackell, kterým se podařilo úspěšně lyofilizovat vir vztekliny. Mrazové sušení je nejužitečnější technika dlouhodobého uchovávání, která udržuje patogenní izoláty stabilní. Buňky zůstávají v suchém stavu nečinné a metabolicky neaktivní (Smith, 1983).

Lyofilizace je užitečnou metodou pro uchování mnoha hub (Zygomycotina, Ascomycotina). Sušení mrazem je účinná konzervační metoda také pro sporulující mikromycety. Spory s vyšším obsahem vody jsou však na poškození mrazem náchylnější (Smith, 1983). Proto tato metoda není vhodná pro organismy ze třídy Peronosporomycetes a Entomophthorales. Ty mají velmi vodnaté buňky s velkými vakuolami (Humber, 1997). Lyofilizace teda není vhodná zejména pro druhy Peronosporaceae (Laviola *et al.*, 2006). Úspěšnost lyofilizace se liší i mezi izoláty stejného druhu. Obecně platí, že ty mikromycety, které dobře rostou a sporulují, proces přežijí, zatímco slabé nebo nějak poškozené izoláty mají tendenci nepřežít. Obecně špatně přežívají lyofilizaci mladé vegetativní hyfy (Smith *et al.*, 2001).

Lyofilizace se provádí v lyofilizačním přístroji (viz obr. 10). Během lyofilizace dochází k odstranění vody přímo ze zamraženého materiálu pomocí sublimace ve vakuu. Pokud je metoda provedena správně, lyofilizace zabrání smrštění buněk, tím zabrání strukturálním změnám a napomáhá vzorkům zachovávat si jejich životaschopnost. Použitím vhodného ochranného média lze zlepšit přežívání materiálu během zamrazování. Médium by mělo být snadno dostupné, snadno připravitelné a poskytovat dostatečnou ochranu během lyofilizace. Konečný doporučený obsah vody ve vzorku po vysušení je mezi 1 a 2 % (hmotn./obj.). Je důležité teplotu během lyofilizace důkladně sledovat. Teplota vzorku nesmí stoupnout nad bod tání, dokud nebude většina vody odstraněna (Smith *et al.*, 2001).



Obrázek 10: Lyofilizační přístroj z laboratoře VÚRV v Praze. Foto: K. Dobešová

Oproti jiným metodám má lyofilizace spoustu výhod. Jednou z nich je, že snižuje pravděpodobnost infekce a kontaminace vzorku. Izoláty mají obecně dobrou životaschopnost a stabilitu. Lze je tak uchovávat velmi dlouhou dobu. Metoda má ovšem i své nevýhody. Není zcela univerzální, nedá se aplikovat na izoláty, které obsahují vyšší množství vody. Proces lyofilizace je relativně složitý, může být časově náročný a je i poměrně drahý (Smith *et al.*, 2001).

4.1.6. Kryokonzervace v tekutém dusíku

Konzervace v kapalném dusíku (DSFF) je jedna z nejlepších metod především kvůli své spolehlivosti, relativně nízkým nákladům a poměrně jednoduchému postupu (Gulya *et al.*, 1993). Úspěšné uchovávání široké škály živého materiálu (sperma, krvinek atd.) v kapalném dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedlo k aplikaci této metody také při uchovávání houbových organismů. Řada mikroorganismů je běžně uchovávána v kapalném dusíku i v pivovarnictví a fermentačním průmyslu (Dahmen *et al.*, 1983). Od roku 1965 se uchovávání v tekutém dusíku používá jako alternativa lyofilizace (Hwang, 1966). Pomocí tekutého dusíku lze uchovat většinu hub. Životaschopnost izolátu se obvykle zvyšuje použitím ochranného média (Gulya *et al.*, 1993). Nižší teplota snižuje rychlost metabolismu biologického materiálu. Metabolická aktivita se snižuje již při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při

teplotách nižších než $-139\text{ }^{\circ}\text{C}$ dochází k rekrystalizaci ledu, což může způsobit poškození vzorku během konzervace (Smith *et al.*, 2001).

Metoda kryokonzervace je následující. Spory a myceliární suspenze s ochranným médiem se dávkuje do kryogenních skladovacích lahvíček. Používají se vzorky o objemu 1,5 ml. Konečná hustota spor se pohybuje většinou od 106 do 108 spor na mililitr v závislosti na druhu plísňě (Dahmen *et al.*, 1983). Nejprve se musí komora chladičího zařízení ochladit na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pak se dovnitř vložit držáky se vzorky (viz obr. 11). Do komory se musí vložit také sonda obsahující pouze sterilní médium.

A)



B)



Obrázek 11: a) chladičí komora ve VÚRV v Praze; b) držák na vzorky. Foto: K. Dobešová

Vzorky jsou chlazeny pomocí programovatelného chladiče. Materiál se nejčastěji ochlazuje rychlostí $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu až dokud teplota neklesne na $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Použitá rychlost chlazení je druhově specifická (Morris *et al.*, 1988). Některé méně náchylné izoláty dobře reagují i na rychlejší ochlazení a nemusí se použít ani ochranné médium. Jakmile zmrazená suspenze dosáhne $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, může se přenést do 320l nádoby s kapalným dusíkem, kde je ochlazování dokončeno (viz obr. 12). Kapalným dusíkem má teplotu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Smith *et al.*, 2001). Je však zásadní neustále sledovat hladinu dusíku v mrazáku, aby bylo zajištěno, že se materiál po celou dobu udrží pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konzervace ve vyšší teplotě může ohrozit stabilitu vzorků. Proto se pro dlouhodobé uchování doporučuje teplota pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Smith *et al.*, 2001).

Stejně jako u jiných metod uchovávání má kryokonzervace v kapalném dusíku své výhody i nevýhody. Hlavní výhodou je délka uchovávání, která je považována téměř za neomezenou, pokud je teplota udržována pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Většina organismů přežívá kryokonzervaci dobře, což dává metodě široký rozsah úspěšné aplikace. Organismy zůstávají při konzervaci v uzavřených ampulích, což brání kontaminaci izolátu. Nevýhodou uchovávání v kapalném dusíku jsou jeho vysoké náklady na provoz, což zahrnuje cenu samotného přístroje a nepřetržitý přísun tekutého dusíku (Smith *et al.*, 2001).



Obrázek 12: Nádoba s kapalným dusíkem na uchovávání vzorků. Foto: K. Dobešová

4.1.7. Kryoprotektivní média

Voda zamrzá do dvou různých podob, buď do amorfního (skelného) skupenství nebo do krystalického stavu. Kryoprotektanty způsobí, že intracelulární voda zamrzne jako celek, nikoli jako ledové krystaly, které mohou narušit nebo zničit membránové struktury. Existuje mnoho různých kryoprotektantů zabraňujících během zmrazování, uchovávání a rozmrazování izolátů tvorbě ledových krystalů (Humber, 1997). Kryoprotektanty umožňují šetrnou ztrátu vody při tvorbě ledu. Zvyšují viskozitu, která zpomaluje růst a tvorbu ledových krystalů. Snižují rychlost difúze vody způsobenou nárůstem rozpuštěných látek ve vodě (Smith *et al.*, 2001).

Jedním z nejpoužívanějších ochranných médií je glycerol (10%). Má velmi dobré ochranné schopnosti na širokou škálu izolátů, ale potřebuje čas, aby pronikl do organismu. Některé mikromycety mohou být tímto pomalým nástupem poškozeny. Druhé ochranné médium, dimethylsulfoxid (DMSO), proniká do organismu rychleji a tím

je jeho ochrana účinnější. Méně užívané kryoprotektivní látky jsou cukry a makromolekulární látky, jako jsou polyvinylpyrrolidin (PVP). Trehalosa je relativně úspěšné ochranné médium, ale je dost drahé (Smith *et al.*, 2001). Odstředěné mléko se používá jako ochranný roztok spíše pro lyofilizaci. Obecně lze říct, že DMSO, odstředěné mléko a glycerol poskytují nejlepší ochranu pro většinu vzorků před mrazovým poškozením (Dahmen *et al.*, 1983).

Houbové organismy se v reakci na zamražení liší. U většiny druhů Ascomycetes, Hyphomycetes a Peronosporomycetes dochází při nízkých rychlostech ochlazování ke smršťování. Při vyšších rychlostech se začne tvořit intracelulární led. Nukleační teplota pro tvorbu intracelulárního ledu a její vztah k rychlosti ochlazování jsou druhově specifické (Morris *et al.*, 1988). Sporangia peronospor jsou při rychlém zamražení deformovaná a dochází k plazmolýze (Dahmen *et al.*, 1983).

U Peronosporomycet a Bazidiomycet je pro zdárné uchovávání ochranné médium nutné. Hyfy peronospor jsou poměrně náchylné na chlad. V přítomnosti s kryoprotektivním médiem dojde ke zpomalení rychlosti tvorby intracelulárního ledu (Morris *et al.*, 1988). Konkrétně zoosporangia *Plasmopara halstedii*, původce plísňe slunečnicové, zůstávají při uchovávání v kapalném dusíku infekční déle než 4 roky (Gulya *et al.* 1993).

4.2. Rozmražení uložených izolátů

Vzorky se mohou rozmrazovat různými způsoby. Nejjednodušší je pomalé rozmrazování v lednici a pak při pokojové teplotě po dobu 20 až 30 minut, aby nedošlo k teplotnímu šoku a k následnému popraskání struktury. Druhou možností je meziproductové rozmrazování, kdy jsou skladovací ampule se vzorky vloženy do vodní lázni o teplotě 20 °C na dobu 5 až 7 minut. Poslední metodou je rychlé rozmrazení, kdy se ampule vkládají do velmi teplé vodní lázně (40 °C) na relativně krátkou dobu, pouze 2 až 4 minuty. Ve všech případech se ampule se vzorky vytahují až ve chvíli, kdy roztaje poslední led. Rychlost rozmrazení závisí na konkrétním druhu zmrazeného vzorku. Po rozmrazení se vzorky mohou přenést opět do vhodného růstového média. Při správném zacházení a podmínkách se většina izolátů za pár dní znovu obnoví. Některé vzorky mohou růst pomaleji než je jejich standardní inkubační doba. Proto je důležité dát znovuoživeným vzorkům dostatek času, než jsou vyhodnoceny za neživotaschopné (Smith *et al.*, 2001).

5. Materiály a metody

5.1. Sběr izolátů *Plasmopara halstedii*

Veškeré izoláty pocházely z území České republiky. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci pořádá každoročně koncem jara sběry izolátů *P. halstedii*. Vzorky z roku 2018 pocházely ze dvou různých lokalit v České republice. V prvním případě se jednalo o soukromou zahradu v Kroměříži a v druhém případě o experimentální pole výzkumného ústavů v Lednici (UKZÚZ). Vzorky z roku 2019 pocházely pouze z jedné lokality, a to z experimentálního pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (UKZÚZ) v Lednici (viz obr. 13). Byly odebrány celé rostliny se sporulací a každá zvlášť vložena do plastových krabiček se zvlhčenou vrstvou buničiny. Následně byly vzorky převezeny do laboratoře Oddělení fytopatologie a mikrobiologie UPOL.

Bylo získáno celkem 6 izolátů *P. halstedii* (jeden z každé rostliny). Čerstvé izoláty byly zamrazeny v mrazničce s teplotou $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Část z nich byla rovnou přemnožena na náchylném genotypu slunečnice (*Helianthus annuus*), např. Giganteus, který postrádá rezistentní geny vůči *P. halstedii* (Gulya *et al.*, 1991a). Symptomatické listy bez sporulace byly opláchnuty pod tekoucí vodou z vodovodu, aby se zbavily nečistot. Umístily se do plastových krabiček s buničinou a nechaly se přes noc ve tmě při teplotách $15\text{--}18\text{ }^{\circ}\text{C}$. U žádného ze vzorků nebyla druhý den zjištěna další sporulace.



Obrázek 13: Provokační pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (UKZÚZ) v Lednici. Foto: K. Dobešová

5.2. Rostlinný materiál *Helianthus annuus*

Pro růst a přemnožení izolátů *P. halstedii* byl použit genotyp Giganteus, který postrádá geny rezistence. Pro stanovení rasy *P. halstedii* bylo použito 15 diferenciálních linií slunečnice podle Tourvieille de Labrouhe *et al.*, (2012). Semena slunečnice pocházela z Francie a od Dr. T. Gulyi (linie GB, QHP2, Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, VAQ, RHA419). Zbytek osiva (linie RHA-265, RHA-274, PMI-3, PM-17, 803-1, HAR-4, Ha-335) byl získán vlastním přesevem originálního osiva v letech 2016 a 2017.

5.2.1. Příprava rostlinného materiálu

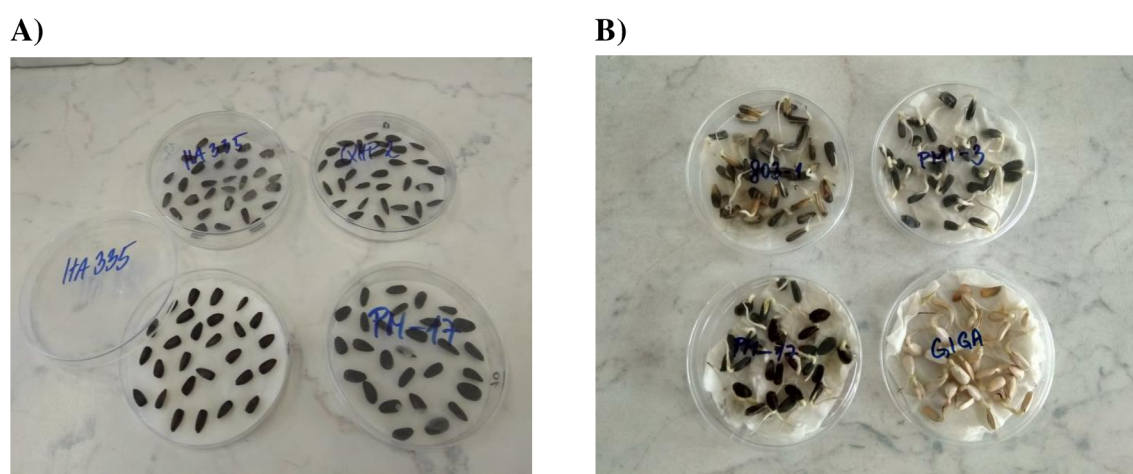
Před jakoukoliv prací s osivem musela být semena *Helianthus annuus* nejprve ošetřena, aby nedošlo ke kontaminaci osiva. Semena byla dezinfikována v 15% roztoku Sava (Biochemie, Bohumín, Česká republika), do kterého bylo přidáno malé množství čistícího prostředku na nádobí, který napomáhá lepšímu smáčení semen (Sedlářová *et al.*, 2016). Semena byla namočená po dobu 10–15 minut (viz obr. 14).



Obrázek 14: Osivo dezinfikované v 15% roztoku Sava. Foto: K. Dobešová

Poté byla semena důkladně opláchnuta pod tekoucí vodou z vodovodu a destilovanou vodou. Delší ponoření nemá žádný nepříznivý účinek na životaschopnost semen a kvůli rehydrataci může urychlit klíčení semen. Umyté osivo bylo umístěno do označených Petriho misek na vlhkou vrstvu buničiny a filtračního papíru (Sedlářová *et al.*, 2016). Jednotlivá semena byla umístěna v miskách tak, aby se vzájemně nedotýkala (viz obr. 15a).

Petriho misky s osivem byly po celou dobu klíčení uloženy v temné místnosti, případně v krabici s pokojovou teplotou (20–24 °C). Doba klíčení semen do optimální délky kořene pro očkování byla obvykle 3–4 dny, v závislosti na genotypu a teplotě (viz obr. 15b). Je třeba zdůraznit, že různé genotypy vyžadují různou dobu na vyklíčení do potřebné velikosti pro inokulaci. Například genotypy Y7Q, PSC8, XA a PSS2RM patřily mezi pomaleji rostoucí genotypy, a proto se nechávaly naklíčit o jeden nebo dva dny dříve než ostatní rychle rostoucí kultivary. Alternativně lze vybrat semenáčky s vhodnou velikostí kořene a skladovat je při 4 °C až do doby, kdy pomaleji klíčící semenáčky dosáhnou správné velikosti (Trojanová *et al.*, 2017).



Obrázek 15: Osivo *Helianthus annuus*: a) po ošetření; b) po 3–4 dnech klíčení. Foto: K. Dobešová

5.3. Přemnožení izolátů metodou WSI

Přemnožování a udržování izolátů *P. halstedii* bylo prováděno metodou „whole seedling inoculation“ (WSI). Tato metoda byla použita pouze na přemnožení izolátů, protože nezaručuje rovnoměrnou inokulaci semenáčků a je zapotřebí velkého množství inokula o koncentraci 10 000 a 50 000 zoosporangií na 1 ml. Tím pádem je vysoká spotřeba materiálu *P. halstedii* (Gulya, 1996). Na přemnožení bylo použito osivo *H. annuus* genotypu Giganteus, které neobsahuje geny rezistence. Na inokulaci byla použita pouze semena, která měla naklíčený kořínek o délce 0,5–1,5 cm (viz obr. 15b), nebyla nijak kontaminovaná ani nijak mechanicky poškozena. Nejprve byla semena opatrně zbavena osemení tak, aby nedošlo k poškození semene, které by mohlo vést k růstovým poruchám nebo k sekundárním infekcím (Trojanová *et al.*, 2017).

5.3.1. Příprava inokula *Plasmopara halstedii*

Inokulum lze připravit z čerstvých zoosporangií, ze sporulujících děložních lístků rostliny nebo ze zmražených zoosporangií uchovávaných na děložních listech, zabalených v alobalu a skladovaných při teplotě -20 °C. Nasporulované části děložních listů byly vloženy do plastové zkumavky (viz obr. 16) a zality asi 1–5 ml destilované vody (objem vody odpovídal množství zoosporangia a množství potřebné pro inokulaci). Při nízké koncentraci inokula se místo destilované vody použil roztok CaCl₂, který zvýšil účinnost patogenu. Zoosporangia se do inokula uvolnila jemným protřepáním na třepáčce. Poté byly zbytky rostliny vytaženy sterilní pinzetou ven ze zkumavky a pod mikroskopem se zkontrolovala koncentrace inokula, aby mělo dostatečnou hustotu.



Obrázek 16: Pomůcky na přípravu inokula a květináč s nasporulovanými listy slunečnice. Foto: K. Dobešová

Do připraveného inokula byla vložena naklíčená semena *Giganteus* tak, aby byla všechna semena dostatečně ponořena pod vrstvou inokula. Inokulace probíhala po dobu 3–5 hodin. Pro dosažení tmy byly zkumavky s osivem a inokulem vloženy do krabice a položeny na třepáčku v kultivační skříní o teplotě 16–20 °C. Za pomoci mikroskopu bylo během inokulace neustále kontrolováno uvolňování zoospor ze zoosporangia. Po třech hodinách inokulace byly semenáčky vloženy do květináčů se zvlhčeným perlitem a označeny štítkem. Dezinfekce květináčů a dalších nástrojů je velmi důležitá, aby nedošlo ke kontaminaci *Plasmopara halstedii* virem, který způsobuje hypovirulenci plísně, nebo jiným patogenem (Grasse *et al.*, 2013). K dezinfekci byl použit roztok 1% KOH.

5.3.2. Pěstování naočkovaných rostlin a následná sporulace patogenu

Semenáčky byly pokryty tenkou vrstvou perlitu a vloženy do kultivační skříně o teplotě 18-21 °C. Prvních 12–16 hodin byly uchovány ve tmě a přikryté černou folií. Růst rostlin následoval při stejné teplotě s fotoperiodou 12/12 h (den/noc) po dobu 9–13 dnů. Obvykle jsou vyšší teploty (20–24 °C) vhodné pro růst rostliny, zatímco nižší teploty (16–20 °C) jsou příznivé pro vývoj patogenů a sporulaci (Trojanová *et al.*, 2017).

Naočkované semenáčky byly pravidelně mírně zalévány tak, aby nebyly květináče se semenáčky zcela podmáčené. Anoxie může vyvolat u rostliny stres, dojde ke zkrácení kořenů a systémová infekce se nemusí dobře nevyvíjet (Gulya, 1996). Navíc může zvýšená vlhkost způsobit předčasnou sporulaci patogenu, který může napadnout další izoláty *P.hasteditii* pěstované ve stejné místnosti (Trojanová *et al.*, 2017). Je důležité zdůraznit, že pouze rostliny naočkované stejným izolátem by měly být umístěny při sporulaci ve stejné místnosti čímž je minimalizována křížová kontaminace (Trojanová *et al.*, 2017). Všechny tyto drobnosti mohou hrát klíčovou roli při správném určování rasy *P. halstedii*.

Průměrně 10. den inokulace byly rostliny pomocí rozprašovače navlhčily destilovanou vodou, vloženy do sáčku, aby se nastavily podmínky 100% vlhkosti a celé byly vloženy do plastové bedny s víkem, kde byly uchovány 12 hodin ve tmě. Následující den byla sporulace na děložních listech. Tyto listy mohly být dále použity na přípravu inokula pro další experimenty nebo se uložily do mrazničky s teplotou -20 °C.

5.4. Patotesty metodou SDI

Rasy izolátů byly určeny pomocí patotestů. Princip patotestů byl založen na testování odolnosti diferenciačního souboru slunečnic (viz tabulka 1). Inokulace byla provedena metodou SDI neboli, „soil drench inoculation“, kdy byl očkovaný každý semenáček zvlášť. Každý soubor obsahoval 15 diferenciačních linií a 1 kontrolní linii. Každá linie se skládala z 10 stejných genotypů slunečnice. Jako kontrolní linie byl použit genotyp Giganteus.

Tabulka 1: Diferenciační linie slunečnice pro určení rasy *Plasmopara halstedii*.

Triplet	Diferenciační linie	Virulence	Pl geny	Tourvieille de Labrouhe <i>et al.</i> (2012)
1	D1	1	-	GB
	D2	2	Pl ₁	RHA-265
	D3	4	Pl ₂ /Pl ₉ /Pl ₂₁	RHA-274
2	D4	1	Pl ₂ /Pl ₅	PMI3
	D5	2	Pl ₅	PM-17
	D6	4	Pl ₅₊	803-1
3	D7	1	Pl ₁₅	HAR-4
	D8	2	Pl ₁ /Pl ₁₅	QHP2
	D9	4	Pl ₆	HA-335
4	D10	1	Pl ₆	Y7Q
	D11	2	Pl ₂	PSC8
	D12	4	Pl ₄	XA
5	D13	1	Pl ₆ /Pl ₂₁	PSS2RM
	D14	2	Pl ₅	VAQ
	D15	4	Pl _{Arg}	RHA-419

Nejprve bylo potřeba nechat naklíčit potřebné osivo (stejně jako v kap. 5.2.1). Naklíčené osivo bylo vysázeno v řadách do tácu s navlhčeným perlitem. Tác byl nadepsaný lihovým fixem, obsahoval číslo izolátu, datum inokulace a název genotypu každé diferenciační linie. Následovala příprava inokula. Inokulum na patotesty bylo vždy připravováno z čerstvě nasporulovaných listů, aby byl test co nejpřesnější. Nasporulované listy byly vloženy do plastové zkumavky a zalité destilovanou vodou (stejně jako v kap. 5.3.1.).

5.4.1. Inokulace metodou SDI

Jakmile bylo inokulum připravené, došlo k inokulaci metodou SDI. Automatickou pipetou bylo nanášeno na každý semenáček určité množství inokula. Množství záviselo na koncentraci zoosporangia v inokulu. Ta se počítá pod mikroskopem přes Bürkerovy počítací komůrky za použití vzorce:

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

kde X = počet zoosporangií v 1 ml a Y = průměrný počet zoosporangií v 10 počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky. Výsledek se rovná množství tekutiny, která obsahuje asi 10 000 životaschopných zoosporangií.

Podle vzorce:

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

se vypočítá objem inokula potřebný pro inokulaci. Kde Z = objem inokula s 10 000 zoosporangií a X = počet zoosporangií v 1 ml. Správné inokulum mělo objem v rozmezí 20–40 μ l. Pokud vypočítaný objem neodpovídal doporučenému rozmezí. Muselo být inokulum podle potřeby buď zředěno nebo zahuštěno.

Při aplikaci inokula byl kladen důraz na pečlivou aplikaci inokula na hypokotylovou část a inokulaci každého semenáčku pouze jednou. Jakmile byly všechny semenáčky nainokulovány, tak byl tác posypal jemnou vrstvou zvlhčeného perlitu (asi 1 cm). Poté byl tác s patotestem vložen do fytotronu. Následně byl tác překryt černou fólií pro navození podmínek den a noci. Druhý den byla folie oddělena a tác s rostlinami byl uchován v konstantních podmínkách 21/17 °C, 12/12h den a noc. Hladina vody v tácu byla každý den kontrolována a doplňována. Očkované rostliny byly pěstovány za těchto podmínek po dobu 11–14 dnů do doby, než první pravé listy dosáhly délky 1 cm. Sporulace vyžaduje 100% relativní vlhkost. Té bylo dosaženo postříkáním rostlinek rozprašovačem s destilovanou vodou. Navlhčené tácy s patotesty byly vloženy do plastových neprůsvitných beden s víkem. Bedny s tácy byly ponechány ve fytotronu při teplotě 21/17 °C, 12/12h den a noc. Následující den byl patotest vyhodnocen (viz obr. 17). Pěstování semenáčků déle než 14 dní může mít za následek smrt rostlin díky systémové infekci, což znemožňuje využití zoosporangia na inokulum pro následné experimenty (Trojanová *et al.*, 2017).



Obrázek 17: Patotest na určení rasy *Plasmopara halstedii* 14. den. Foto: K. Dobešová

5.4.2. Vyhodnocení patotestu

Stupeň infekce a stanovení rasy *Plasmopara halstedii* bylo určeno ve dvou krocích. První hodnocení patotestu bylo provedeno 14. den po inokulaci. Byla hodnocena rezistence prvních děložních lístků. O týden později byl táč znovu postříká vodou a byla hodnocena tzv. hypokotylová rezistence, neboli systémová infekce na pravých listech (Sedlářová *et al.*, 2016). Pěstování sazenic déle než 14 dní může mít díky systémové infekci za následek smrt celé rostliny, což minimalizuje množství vyprodukovaných zoosporangií, která se používají na inokulum pro další testování. Pro vyšší spolehlivost byl každý izolát testován dvakrát až třikrát.

Stanovení rasy bylo určeno ve třech krocích. Nejprve byla vyhodnocena intenzita sporulace na každé rostlině zvlášť. Pro hodnocení intenzity sporulace bylo použito semikvantitativní hodnocení procentuální sporulace na rostlině (viz obr. 18). Semikvantitativní hodnocení má stupnici od 0 do 3, kdy 0 se připisuje k rostlině, která nemá žádnou viditelnou sporulaci na listech. Stupeň 1 připadá na rostliny s omezenou sporulací do 25 % jejich listové plochy. Stupeň 2 připadá na rostliny se sporulací do 50 % listové plochy a hodnota 3 se připisuje k rostlině se sporulací vyšší než 50 % jejich listové plochy. Interpretace výsledků a hodnocení testů patogenity je do jisté míry dosti subjektivní dle hodnotitele.

A)



B)



C)



D)



Obrázek 18: Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *Plasmopara 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). Foto: K. Dobešová

Druhým krokem pro určení rasy bylo stanovení míry sporulace pro každou diferenciací linii (10 rostlin). Procentuálně byla vyhodnocena jejich míra napadení a tím bylo určeno, zda je daná diferenciací linie k izolátu *P. halstedii* náchylná nebo rezistentní. Pokud bylo napadení u více než 50 % rostlin v linii, tak byl genotyp označen za náchylný. Není zcela jasná hranice mezi rezistencí a náchylnou reakcí naočkovaných rostlin. Pokud byl celkový stupeň infekce nižší než 30 % a žádný děložní list neměl sporulaci s hodnotou 2 nebo 3, byla diferenciací linie považována za rezistentní. Hojná sporulace a zakrslost rostliny byla hlavním kritériem pro náchylnost. V poslední části hodnocení byl stanoven výsledný pětimístný kód konkrétní rasy *P. halstedii*. Kód byl určen pomocí tripletového systému (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Příklad výpočtu kódu virulence, tj. stanovení rasy *Plasmopara halstedii*.

Diferenciační linie	D1 D2 D3	D4 D5 D6	D7 D8 D9	D10...
Virulence	1 2 4	1 2 4	1 2 4	1...
Sporulace	S S S	S S R	S R R	R...
	1+2+4=7	1+2+0=3	1+0+0=1	0+...

S= susceptible- náchylná interakce, R= rezistence interakce

5.5. Sběr izolátů *Bremia lactucae*

Pro určení rasy *Bremia lactucae* byl vybrán izolát na planě rostoucí *Lactuca serriola* (locika kompasová). Izolát pocházel z ČR a byl odebrán v roce 2019 z lokality u Berouna, cca 1 km za městem u cyklostezky směr Srbsko. Při sběru byly odebrány infikované listy se sporulací a vloženy do plastových krabiček na zvlhčenou vrstvu buničiny. Následně byl vzorek převezen do laboratoře Oddělení fytopatologie a mikrobiologie KB PřF UPOL, kde byl následně zařazen do sbírky mikroorganismů pod označením UPOC-FUN-281.

5.6. Rostlinný materiál *Lactuca serriola*

Přemnožení izolátu *B. lactucae* bylo prováděno na náchylném genotypu *Lactuca serriola* LSE/57/15. Osivo pocházelo ze sbírky semen fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Při určení rasy byl použit diferenciační set EU–B, který obsahuje 24 genotypů salátu, jako kontrola se použil genotyp LSE/57/15, který postrádá geny rezistence (viz abulka 3).

5.6.1. Příprava rostlinného materiálu

Nažky *L. serriola* (LSE/57/17) pro přemnožení *B. lactucae* byly rovnoměrně umístěny do označených plastových misek (8 cm v průměru), v případě diferenciačního setu byl soubor vyset jednotlivě do řádků v plastové misce o velikosti cca 30x40 cm na vlhkou vrstvu buničiny (3–4 listy) a filtračního papíru (1 list). Uzavřené nádoby byly kultivovány ve fytotronu s teplotou 10–15 °C a s 12hodinovou fotoperiodou. Po 5–6 dnech byly z plně rozvinutých děložních lístků odstraněny zbytky osemení a byla provedena inokulace semenáčků.

Tabulka 3: Diferenciační set B (soubor genotypů *Lactuca sativa* a *L. serriola*) pro stanovení ras *Bremia lactucae*.

Sextet	diferenciač. set B	Dm geny	Sextet	diferenciač. set B	Dm geny
	Green Towers	Dm0			
1	Lednický	Dm1	3	NunDm15	Dm15
	UCDM2	Dm2		CGDm16	Dm16
	Dandie	Dm3		NunDm17	Dm17
	R4T57D	Dm4		Colorado	Dm18
	Valmaine	Dm5/8		Ninja	Dm36
	Sabine	Dm6		Discovery	Dm37
	LSE/57/15	Dm7		Argeles	Dm38
2	UCDM10	Dm10	4	RYZ2164	Dm25
	Capitan	Dm11		RYZ910457	R?
	Hilde II	Dm12		Bedford	R?
	Pennlake	Dm13		Balesta	R?
	UCDM14	Dm14		Bellisimo	R?

5.7. Příprava inokula *B. lactucae*

Inokulum lze připravit z čerstvého materiálu nebo ze zmražených konidií na děložních listech salátu uchovaných v Petriho miskách. Misky byly zabalené v alobalu a skladovány při teplotě -20 °C. Nasporulované části děložních listů byly vloženy do skleněné kádinky a zality destilovanou vodou (objem vody odpovídal množství nasporulovaného materiálu a množství potřebného pro inokulaci). Jemným protřepáním na třepačce byly uvolněny konidie. Poté byly zbytky rostliny vytaženy sterilní pinzetou ven z kádinky a pod mikroskopem byla zkontrolována životaschopnost konidií a koncentrace inokula, aby bylo dostatečně husté cca 10^5 .

Připravené inokulum bylo rozprašovačem aplikováno na děložní lístky salátu v nádobách. Kultivace probíhala opět ve fytotronu při teplotě 10–15 °C a 12hodinové fotoperiodě, prvních 24 h po inokulaci ve tmě. Po uplynutí 9–10 dnů od inokulace byly nádoby opět na 24 h umístěny do tmy pro vyvolání sporulace.

5.8. Určení rasy *Bremia lactucae*

Tác s 24 diferenciačními liniemi setu –B a s kontrolní linií LSE/57/17 (viz tabulka 3) vysázených v řádcích po cca 20–25 semenáčcích byl nainokulován a inkubován, jak je

popsáno výše v této práci. Hodnocení sporulace plísňe salátové u diferenčního setu bylo prováděno zpravidla ve dvou intervalech 6. a 14. den po inokulaci. Určení konkrétní rasy *B. lactucae* bylo provedeno až 14. den po inokulaci. V případě velmi náchylných genotypů byla sporulace na děložních listech už 6. či 7. den po inokulaci. Za rezistentní byly označeny genotypy, které ani 14. den nevykazovaly žádnou sporulaci. V případě heterogenní reakce byly v testovaném souboru rostliny jak zcela náchylné, tak i rezistentní. U některých genotypů byla stanovena rovněž neúplná rezistence v důsledku velmi nízkého stupně sporulace, což bylo obvykle doprovázeno žloutnutím a nekrotizací pletiva děložních lístků. Proto byly testy pro kontrolu opakovány.

Pro určení rasy bylo použito kvantitativní a kvalitativní hodnocení. Základem kvantitativního hodnocení je stanovení intenzity sporulace izolátu *B. lactucae*. Pro hodnocení intenzity sporulace (viz obr. 19) na semenáčcích byla použita stupnice v rozsahu 0–3 (Lebeda a Petrželová, 2010):

- 0 = žádné viditelné konidiofory na listech;
- 1 = omezená sporulace, sporadická přítomnost konidioforů;
- 2 = < 50 % listové plochy pokryté konidiofory;
- 3 = > 50 % plochy děložních listů pokryté konidiofory.



Obrázek 19: Intenzita sporulace – kvantitativní hodnocení *Plasmopara halstedii*. Foto: K. Dobešová

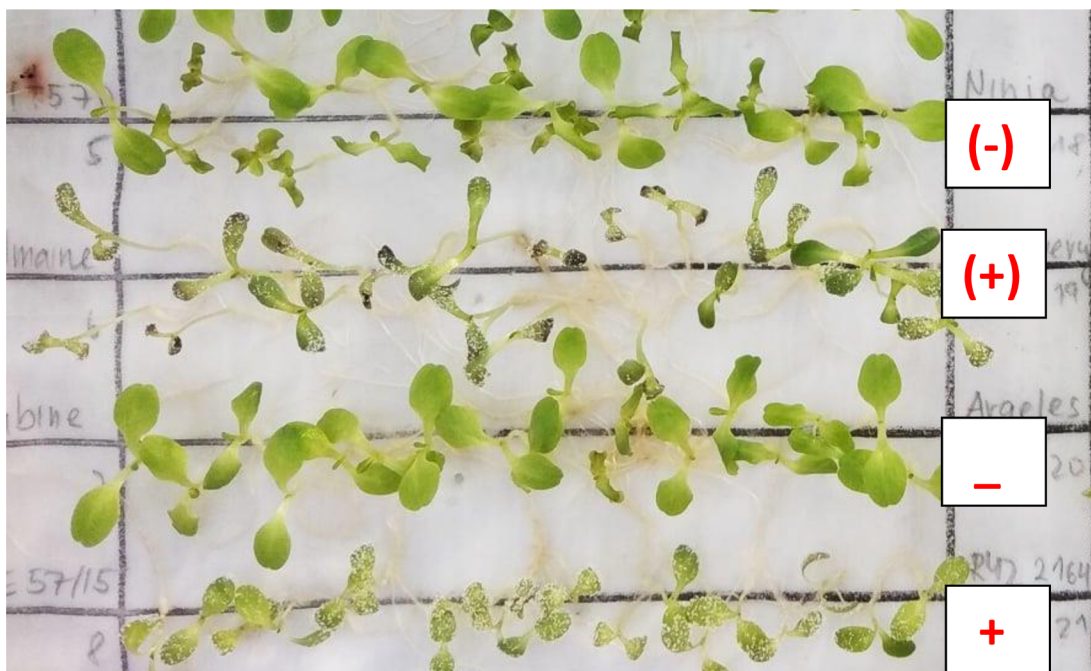
V dalším kroku se intenzita sporulace vyjadřuje jako procento maximální možné sporulace. Výsledná hodnota se počítá podle Townsenda a Heubergera (1943):

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

kde: P = celkový stupeň napadení; n = počet rostlin v každé kategorii; v = stupeň napadení; x = rozsah stupnice napadení; N = celkový počet hodnocených rostlin.

Intenzita sporulace je také posouzena z pohledu kvalitativního hodnocení. Hodnotilo se podle následujících kritérií (viz obr. 20):

- + náchylná reakce: makroskopicky viditelná hojná sporulace (50–100 %) semenáčků. Rostliny hodnoceny převážně stupněm 2 a 3.
- rezistentní reakce: žádná viditelná sporulace na semenáčcích. Rostliny hodnoceny stupněm 0.
- (-) neúplně rezistentní reakce: velmi omezená sporulace (1–25 %), po které často následuje makroskopicky viditelná nekróza nebo chloróza pletiva. Rostliny hodnoceny stupněm 0 nebo 1.
- (+) neúplná náchylná reakce: snížená sporulace (25–50 %), směsný fenotyp reakce zahrnuje zcela náchylné a odolné rostliny. Sporulace rozložená rovnoměrně mezi všemi stupni.



Obrázek 20: Intenzita sporulace – kvalitativní hodnocení *Bremia lactucae*. Foto: K. Dobešová

V poslední části hodnocení byl stanoven výsledný kód virulence, tj. konkrétní rasa *B. lactucae*. Pomocí sextetového systému (příklad viz tabulka 4). Každá diferenciací linie měla konkrétní hodnotu virulence. Pokud byla linie rezistentní, bylo započítáno do součtu sextetu číslo 0. Pokud byla linie náchylná, bylo započítáno do součtu jí příslušné číslo virulence. Na závěr byla čísla sečtena po šesti a byl vytvořen výsledný kód virulence.

Tabulka 4: Příklad výpočtu kódu virulence, tj. stanovení rasy *Bremia lactucae*.

Diferenciací linie	1 2 3 4 5 6	7 8 9 10 11 12	13 14 15 16 17 18	19....24
Virulence	1 2 4 8 16 32	1 2 4 8 16 32	1 2 4 8 16 32	1.....32
Sporulace	+ - - + + +	+ + + + + +	+ + - - - -	-.....-
	1+0+0+8+16+32=57	1+2+4+8+16+32=63	1+2+0+0+0+0=3	0+...=0
Sextetový kód:	57/63/03/00			
	+ náchylná reakce, - rezistence			

6. Výsledky

6.1. Určení ras izolátů *Plasmopara halstedii*

Tato diplomová práce navazuje na výsledky z mé bakalářské práce. Byly hodnoceny izoláty *P. halstedii* z roku 2018 a 2019. Určení rasy bylo prováděno pomocí tzv. patotestů, což je diferenciační soubor 15 genotypů *H. annuus*. Byla hodnocena intenzita sporulace diferenciačního souboru a výsledkem byl pětimístný kód virulence. Inokulace diferenciačního souboru byla provedena metodou „soil drench inoculation“ (SDI). V mé práci byly určeny rasy pouze z izolátů z roku 2019, protože originální izoláty z roku 2018 se nepodařilo oživit a přemnožit, tím pádem nebylo provedeno určení rasy z tohoto roku.

6.1.1. Rasy *Plasmopara halstedii* z roku 2019

V roce 2019 bylo hodnoceno celkem šest izolátů *P. halstedii* (označeny jako 1901; 1902; 1903; 1904; 1905; 1906) původem z Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) v Lednici. Všechny vzorky byly určeny jako rasa 704 71. Určená rasa byla u všech izolátů stejná, v některých tripletech se však reakce diferenciačních linií slunečnice na izoláty mírně odlišovaly. Z výsledků bylo uvažováno také nad možnými rasami 714 71 nebo 714 61. Aby byla ověřena správnost výsledků a byly vyloučeny možné chyby při postupu, bylo hodnocení u každého izolátu provedeno nejméně dvakrát. Pokud určení rasy bylo i po třetím opakovaném hodnocení nejasné, byl znovu testován pouze konkrétní triplet, aby nebylo plýtváno osivem.

6.1.1.1. Izolát 1901 (*Plasmopara halstedii*)

Izolát 1901 byl po třetím hodnocení určen jako rasa 704 71. Výsledek prvního patotestu byl vyhodnocen jako rasa 704. Druhé opakování patotestu bylo hodnoceno jako rasa 714. Kvůli sporným výsledkům z hodnocení byl izolát 1901 hodnocen ještě potřetí. Jako výsledná rasa byla ověřena rasa 704 71. Jak je patrné z výsledků, problém s určením rasy byl hlavně ve 2. tripletu, konkrétně v genotypu PMI3. V prvním hodnocení vyšel genotyp rezistentní, ve druhém hodnocení náchylný na patogen a až ve třetím hodnocení byla jeho rezistence potvrzena (viz tabulka 5). Problém s vyhodnocením byl také u posledních dvou tripletů. U osiva těchto genotypů byla zjištěna špatná klíčivost, a proto často nemohla být součástí výsledného hodnocení. Genotyp XA a PSS2RM se podařilo vyhodnotit až ve třetím hodnocení rasy.

6.1.1.2. Izolát 1902 (*Plasmopara halstedii*)

Tento izolát byl také testován třikrát. Výsledkem hodnocení byla rasa 704 71. U tohoto izolátu byl problém ve 4. tripletu. V prvním hodnocení byl genotyp Y7Q rezistentní a bylo zvažováno nad možnou rasou 704 60. Ve druhém hodnocení byla na genotypu Y7Q zaznamenána sporulace. Proto bylo provedeno i třetí hodnocení, kde byla náchylnost genotypu Y7Q vůči *P. halstedii* potvrzena (viz tabulka 5).

6.1.1.3. Izolát 1903 (*Plasmopara halstedii*)

Izolát 1903 byl vyhodnocen jako rasa 704 71. I u tohoto izolátu byl problém se stanovením virulence 4. tripletu. Problematický byl jak genotyp Y7Q, tak genotyp XA. V prvním hodnocení byl náchylný genotyp PSC8 a XA. Ve druhém hodnocení byl náchylný genotyp Y7Q a PSC8, naopak genotyp XA byl zcela rezistentní. Ve třetím hodnocení byla potvrzena náchylnost všech tří genotypů (viz tabulka 5). Určení posledního tripletu bylo náročné, protože u genotypu PSS2RM byl neustále problém s nízkou klíčivostí a nedostatkem osiva.

6.1.1.4. Izolát 1904 (*Plasmopara halstedii*)

Čtvrtý izolát byl dosti podobný izolátu 1902. Nejenže byl shodný s výslednou rasou 704 71, ale měl i shodné odlišnosti ve virulenci u genotypu Y7Q ve 4. tripletu. Izolát byl zpočátku určen spíše jako rasa 714 61. Při prvním hodnocení byl genotyp Y7Q spíše rezistentní. Ve druhém hodnocení byla jeho náchylnost částečně potvrzena. A proto bylo provedeno ještě třetí hodnocení, kdy genotyp vyšel jako zcela náchylný k infekci *P. halstedii*. U genotypu Y7Q byla velmi častá heterogenost výsledků. Při hodnocení byly objeveny jak rostliny zcela rezistentní, tak velmi náchylné (viz tabulka 5).

6.1.1.5. Izolát 1905 (*Plasmopara halstedii*)

Izolát 1905 byl poměrně problematický. Jeho sporulace byla velmi slabá i u použité kontroly Giganteus. Byly provedeny pouze dvě hodnocení rasy, protože u tohoto izolátu byl problém i se samotným přemnožením. Bylo obtížné určit, zda výsledky určené rasy byly relevantní. V prvním hodnocení byla kontrola napadena pouze z 50 %. Virulence ve 4. tripletu byla velmi heterogenní. Ve druhém hodnocení byla sporulace u kontroly vyšší a ve 4. tripletu byla opět velká heterogenita. Lze předpokládat že se jednalo o stejnou rasu jako u ostatních izolátů (viz tabulka 5).

Tabulka 5: Vyhodnocení fenotypové reakce *Plasmopara halstedii* u izolátů z roku 2019.

Izolát:			1901			1902			1903			1904			1905		1906		
Triplet	Diferenciač. linie	Hodnota virulence	1. 8.8. 2019	2. 22.8. 2019	3. 26.11. 2019	1. 25.7. 2019	2. 8.8. 2019	3. 28.8. 2019	1. 25.7. 2019	2. 13.8. 2019	3. 6.12. 2019	1. 1.8. 2019	2. 13.8. 2019	3. 12.12. 2019	1. 1.8. 2019	2. 28.8. 2019	1. 8.8. 2019	2. 22.8. 2019	3. 6.12. 2019
1	GB	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RHA-265	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	RHA-274	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	PMI-3	1	(-)	(+)	-	(-)	-	-	-	(-)	-	(-)	(-)	-	-	(-)	-	(-)	-
	PM-17	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	803-1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	HAR-4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	QHP-2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HA-335	4	+	(+)	+	+	+	+	+	(-)	+	(+)	+	+	(+)	(+)	(-)	+	+
4	Y7Q	1	(+)	-	+	(-)	(+)	+	(-)	(+)	+	(-)	(-)	+	(-)	(-)	(+)	+	+
	PSC8	2		(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)		+	+
	XA	4			+	+	+	+	(+)	-	+	(+)	(+)	+	(+)		(-)	(+)	+
5	PSS2RM	1			+		+	+			+	(+)	(+)	+	(-)	(+)	(-)	(+)	+
	VAQ	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	RHA-419	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	GIGA		+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+
Rasa Ph			704	714	7??	704	7??	7?4	704	700	7?4	704	704	704	704	704	700	704	7?4
			??	??	71	6?	71	71	6?	3?	71	61	61	71	60	21	??	71	71

- = náchylnost
+ = rezistence

(-) = neúplná rezistence
(+) = neúplná náchylnost

červeně značené = výsledná rasa Ph (704 71)

6.1.1.6 Izolát 1906 (*Plasmopara halstedii*)

Izolát 1906 byl po hodnocení určen jako rasa 704 71. U tohoto izolátu bylo hodnocení virulence poměrně jasné, pouze v 5. tripletu u genotypu PSS2RM byly jemné odchylky ve sporulaci. U prvního hodnocení byl genotyp rezistentní. Ve druhém hodnocení byl izolát náchylný a ve třetím hodnocení byla jeho náchylnost vůči patogenu potvrzena (viz tabulka 5).

6.2. Stanovení ras izolátů *Bremia lactucae*

V roce 2019 byl testován pouze jeden izolát *Bremia lactucae*, který byl odebrán z pole v okolí Berouna v České republice. Odebraný izolát se podařilo přemnožit a následně i otestovat. Na přemnožení byl použitý genotyp LSE/57/15, který neobsahuje geny rezistence. Inokulum pro určení rasy bylo vždy připraveno z čerstvě nasporulovaného materiálu. Pro určení rasy byl použit diferenciální set EU-B. Výsledkem hodnocení byl šestimístný kód konkrétní rasy. Kód byl určen sextetovým systémem virulence.

6.2.1. Rasa *Bremia lactucae* z roku 2019

Výsledná rasa izolátu z roku 2019 byla určena až po sedmém hodnocení. První hodnocení rasy *B. lactucae* z roku 2019 bylo zahájeno téhož roku. Třetí hodnocení bylo provedeno o rok později. Kvůli heterogenitě výsledků z těchto dvou období byly provedeny poslední tři hodnocení rasy *B. lactucae* ještě v roce 2021. Důležitým ukazatelem správnosti výsledků byl kontrolní diferenciální soubor, který neobsahuje geny rezistence. V tomto případě to byl genotyp Green Towers a LSE/57/15. Celé hodnocení komplikovalo také špatné klíčení osiva, zejména pak genotypů Bedford, Balesta a dalších.

6.2.1.1 První stanovení rasy *Bremia lactucae* z roku 2019

V prvním hodnocení z roku 2019 byly téměř všechny genotypy rezistentní na *Bl*. Pouze genotyp Green Towers měl náchylný fenotypový projev u 60 % rostlinek a genotyp Captain byl náchylný z 55 %. Kontrola LSE/57/15 naklíčila, proto tento genotyp nemohl být vyhodnocen. Jako výsledná rasa byla stanovena rasa 00/05/00/00 (viz tabulka 6).

6.2.1.2 Druhé stanovení rasy *Bremia lactucae* z roku 2019

Ve druhém hodnocení v roce 2019 nevyšla kontrola se 100% náchylnou reakcí. V případě Green Towers to byla 50% intenzita sporulace a v případě LSE/57/15 byla sporulace o něco vyšší, okolo 75 %. Výsledná rasa byla určena jako rasa 00/05/00/00. Z toho je zřejmé, že většina genotypů diferenciačního setu B byla vůči patogenu rezistentní. V prvním sextetu nebyla sporulace prokázána na žádném genotypu, proto byl výsledek 00. Ve druhém sextetu byla sporulace viditelná u dvou genotypů, a to LSE/57/15 a Captain. Výslednou hodnotou tohoto sextetu bylo číslo 05. U třetího a čtvrtého sextetu opět nebyla pozorována žádná sporulace. Občas byl náznak pouze mírné deformace děložních lístků, ale sporulace se nevytvořila, tak tomu bylo například u genotypu RYZ910457 (viz tabulka 6).

6.2.1.3 Třetí vyhodnocení rasy *Bremia lactucae* z roku 2020

Třetí hodnocení bylo provedeno až v roce 2020. Kontrola LSE/57/15 měla sporulaci 100 % stejně tak kontrola Green Tower měla sporulaci 75 % což je více než v předchozích hodnoceních. V prvním sextetu byla 100% sporulace na genotypu Valmaine, dále byla sporulace na genotypu UCDM2, ale u něj byla reakce slabší, okolo 70 %. Proto bylo výsledné číslo tohoto sextetu 18. Druhý sextet měl sporulaci na třech genotypech, a to na LSE/57/15, Captain a UCDM14. Výslednou hodnotou tohoto sextetu bylo číslo 37. Třetí sextet byl totožný s prvním hodnocením (číslo 00). Rozdíl od předchozích hodnocení následoval i v posledním, čtvrtém sextetu. Zde byla sporulace pouze na jednom genotypu Argeles. Tři genotypy z tohoto sextetu vůbec nevyklíčily, a proto nemohly být hodnoceny. Jednalo se o genotypy RYZ2164, Bedfor a Balesta. Výsledná hodnota byla odhadnuta jako 1. Výsledná rasa třetího hodnocení byla určena jako rasa 18/37/00/01 (viz tabulka 6).

6.2.1.4 Čtvrté stanovení rasy *Bremia lactucae* z roku 2021

Čtvrté hodnocení bylo provedeno v dubnu roku 2021. U tohoto hodnocení bylo problematické klíčení osiva. Nepodařilo se naklíčit šest genotypů, bohužel některé z nich byly klíčové, a proto muselo být hodnocení opakováno. Výsledky čtvrtého hodnocení byly shodné více s hodnocením z roku 2019, ale stejně jako u těchto hodnocení byla kontrola téměř bez sporulace. V prvním sextetu byly všechny genotypy rezistentní. Klíčový genotyp Valmaine nevyklíčil, a tak nemohl být hodnocen. Druhý sextet byl relativně shodný s druhým hodnocením. Výsledek tohoto

sextetu byl 36. Sporulace byla nalezena také na genotypu LSE/57/15, ale činila pouze 18 % a proto byla vyhodnocena jako neúplně rezistentní. Třetí sextet byl shodný se všemi předchozími hodnoceními. Všechny genotypy byly zcela rezistentní. Poslední, čtvrtý sextet byl shodný s prvními hodnoceními. Problém byl, že genotyp Argeles nevyklíčil a nemohl být hodnocen. Výsledkem čtvrtého hodnocení byla rasa 00/37/00/00 (viz tabulka 6).

6.2.1.5 Páté stanovení rasy *Bremia lactucae* z roku 2021

Aby nedocházelo k plýtvání osivem, bylo následující hodnocení provedeno pouze na konkrétních sporných genotypech, v případě pátého hodnocení to byly genotypy Green Towers, UCDM2, Valmaine, LSE/57/15, UCDM14, Argeles, Bellisimo. U genotypu Green Towers byla potvrzena náchylnost na *B. lactucae*. U genotypu UCDM byla naopak potvrzena rezistence vůči patogenu. U genotypů Valmaine, LSE/57/15 a UCDM14 byla náchylnost také potvrzena. Genotyp Argeles byl vyhodnocen jako rezistentní, což potvrdilo celý sextet jako rezistentní. Zvláštní bylo, že genotyp Bellisimo v posledním hodnocení vyšel jako náchylný, ale v žádném z předchozích hodnocení nebyl na patogen náchylný. Výsledný kód virulence tohoto izolátu *B. lactucae* byl určen jako rasa 16/37/00/32 (viz tabulka 7).

6.2.1.6 Šesté vyhodnocení rasy *Bremia lactucae* z roku 2021

Šesté hodnocení bylo provedeno na stejných sporných genotypech jako v pátém hodnocení rasy *Bl* (Green Towers, UCDM2, Valmaine, LSE/57/15, UCDM14, Argeles, Bellisimo). Výsledné určení rasy bylo téměř totožné jako u pátého hodnocení *Bl*. Genotypy Green Towers, Valmaine, LSE/57/15 a UCDM14 měly náchylný fenotypový projev a UCDM2, Argeles a i Bellisimo měly fenotypový projev rezistentní. Jako výsledná byla určena rasa 16/37/00/00. Rozdíl od předchozího hodnocení je tedy ve fenotypovém projevu u linie Bellisimo (viz tabulka 7).

6.2.1.7 Sedmé vyhodnocení rasy *Bremia lactucae* z roku 2021

Poslední hodnocení bylo provedeno pouze na genotypech, které v předchozích hodnoceních vycházely sporně (Green Towers, UCDM14, Bellisimo a LSE/57/15). U genotypu Green Towers byla potvrzena fenotypová náchylnost na *B. lactucae*. Genotyp UCDM14 měl také náchylný fenotypový projev. Genotyp Bellisimo měl spíše neúplnou rezistentní reakci. Ve výsledku byla vyhodnocena rasa 16/37/00/00, stejně jako v posledních třech hodnoceních.

Tabulka 6: Stanovení rasy *Bremia lactucae* izolátu Beroun 2019.

Dif. číslo	Genotyp	Hodnota virulence	Sporulace 1. hodnocení 22. 7. 2019		Sporulace 2. hodnocení 19. 8. 2019		Sporulace 3. hodnocení 2. 10. 2020		Sporulace 4. hodnocení 14. 4. 2021	
0	<i>Green Towers</i>		(+)		(+)		+		(-)	
1	<i>Lednický</i>	1	-	0	-	0	-	0	-	0
2	<i>UCDM2</i>	2	-	0	-	0	(+)	2	-	0
3	<i>Dandie</i>	4	-	0	-	0	-	0	-	0
4	<i>R4T57D</i>	8	-	0	-	0	-	0	-	0
5	<i>Valmaine</i>	16	(-)	0	(-)	0	+	16		
6	<i>Sabine</i>	32	-	0	-	0	-	-	-	0
7	<i>LSE/57/15</i>	1			(+)	1	+	1	(-)	0
8	<i>UCDM10</i>	2	-	0	-	0			-	0
9	<i>Captain</i>	4	+	4	+	4	+	4	+	4
10	<i>Hilde II</i>	8	-	0	-	0	-	0	-	0
11	<i>Pennlake</i>	16	-	0	-	0	(-)	0	-	0
12	<i>UCDM14</i>	32	-	0	-	0	+	32	(+)	32
13	<i>NunDm15</i>	1	-	0	-	0	-	0	-	0
14	<i>CGDm16</i>	2	-	0	-	0	-	0	-	0
15	<i>NunDm17</i>	4	-	0	-	0	-	0	-	0
16	<i>Colorado</i>	8	-	0	-	0	(-)	0	-	0
17	<i>Ninja</i>	16	-	0	-	0	-	0		
18	<i>Discovery</i>	32	-	0	-	0	-	0	-	0
19	<i>Argeles</i>	1	-	0	-	0	+	1		
20	<i>RYZ2164</i>	2	(-)	0	(-)	0			(-)	0
21	<i>RYZ 910457</i>	4	-	0	-	0	-	0		
22	<i>Bedford</i>	8	-	0	-	0				
23	<i>Balesta</i>	16	-	0	-	0			-	0
24	<i>Bellisimo</i>	32	-	0	-	0	(-)	0	-	0
C	<i>LSE/57/15</i>				+		+			
Výsledná rasa BI			00/05/00/00		00/05/00/00		18/37/00/01		00/37/00/00	

- = rezistence
- + = náchylnost
- (-) = neúplná rezistence
- (+) = neúplná náchylnost

Tabulka 7: Stanovení rasy *Bremia lactucae* izolátu Beroun 2019, pouze vybrané izoláty.

Dif. číslo	Genotyp	Hodnota virulence	Sporulace 5. hodnocení 11. 5. 2021		Sporulace 6. hodnocení 8. 6. 2021		Sporulace 7. hodnocení 12.7.2021	
0	<i>Green Towers</i>		+		(-)		+	
1	<i>Lednický</i>	1	/	0	/	0	/	0
2	<i>UCDM2</i>	2	-	0	-	0	/	0
3	<i>Dandie</i>	4	/	0	/	0	/	0
4	<i>R4T57D</i>	8	/	0	/	0	/	0
5	<i>Valmaine</i>	16	+	16	+	16	/	16
6	<i>Sabine</i>	32	/	0	/	0	/	0
7	<i>LSE/57/15</i>	1	+	1	+	1	+	1
8	<i>UCDM10</i>	2	/	0	/	0	/	0
9	<i>Captain</i>	4	/	4	/	4	/	4
10	<i>Hilde II</i>	8	/	0	/	0	/	0
11	<i>Pennlake</i>	16	/	0	/	0	/	0
12	<i>UCDM14</i>	32	+	32	(+)	32	+	32
13	<i>NunDm15</i>	1	/	0	/	0	/	0
14	<i>CGDm16</i>	2	/	0	/	0	/	0
15	<i>NunDm17</i>	4	/	0	/	0	/	0
16	<i>Colorado</i>	8	/	0	/	0	/	0
17	<i>Ninja</i>	16	/	0	/	0	/	0
18	<i>Discovery</i>	32	/	0	/	0	/	0
19	<i>Argeles</i>	1	-	0	-	0	/	0
20	<i>RYZ2164</i>	2	/	0	/	0	/	0
21	<i>RYZ 910457</i>	4	/	0	/	0	/	0
22	<i>Bedford</i>	8	/	0	/	0	/	0
23	<i>Balesta</i>	16	/	0	/	0	/	0
24	<i>Bellisimo</i>	32	+	32	(-)	0	(-)	0
Výsledná rasa Bl			16/37/00/32		16/37/00/00		16/37/00/00	

- = rezistence
- + = náchylnost
- (-) = neúplná rezistence
- (+) = neúplná náchylnost

7. Diskuse

Stanovení fyziologických ras *Plasmopara halstedii* (*Ph*) a *Bremia lactucae* (*Bl*) bylo prováděno na základě fenotypové reakce 15 diferenciacních genotypů slunečnice (*Helianthus annuus*), resp. 24 genotypů locik (*Lactuca* spp.), dále označeny jako tzv. patotesty. Intenzita sporulace byla hodnocena po tripletech (*Ph*) či sextetech (*Bl*) a výsledkem byl pětimístný (*Ph*), resp. čtyřmístný (*Bl*) kód virulence.

7.1. *Plasmopara halstedii*

Pro *P. halstedii* se dříve patotest skládal pouze z 9 diferenciacních linií (DL), výsledkem byl třímístný kód virulence. Systém byl rozšířen o 6 DL po diskusích v rámci International Sunflower Asociation (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). V České republice se novým rozšířeným systémem DL hodnotí rasa *Ph* od roku 2013, tedy hned rok po oficiálním zavedení rozšířeného diferenciacního souboru (Drábková Trojanová *et al.* 2018). V některých zemích se stále používá základní hodnocení virulence na 9 DL. Některé DL se mohou v různých zemích lišit, např. v Kanadě nahradili genotyp HA 304 za genotyp HA 300 (Rashid, 2014). Ve Spojených státech používají genotyp DM-2 místo PMI3 a HA-R5 místo QHP1 a testování nově provádějí na 18 DL (Gilley *et al.*, 2020).

Přesto je sada 9 DL základem pro srovnání kódu virulence populací *P. halstedii* na celém světě. Vědci průběžně doplňují diferenciacní soubor, aby lépe porozuměli patogenu (Trojanová *et al.* 2017). Zatím poprvé byly použity další doplňkové linie k 15 mezinárodně uznávaným DL pro hodnocení virulence *Ph* ve Spojených státech, včetně: RHA 340 (*Pl8*), HA 458 (*Pl17*), HA-DM1 (*Pl18*), TX-16R (*Pl33*), RHA 428 (*Pl34*) a RHA 468 (*PlArg*) (Gilley *et al.*, 2020). Pomocí tohoto nového šestimístného kódu virulence bylo identifikováno celkem 16 ras a byly pozorovány rozdíly ve virulenci mezi několika izoláty, které byly původně řazeny do jedné rasy. To platí zejména pro izoláty ras 714, které se nyní rozlišují na rasu 714700 a 714710 (Gilley *et al.*, 2020).

Během vyhodnocení kódu virulence se může stát, že izolát vykazuje heterogenní fenotypový projev. Izolát se pak považuje za směsici různých ras (Gulya *et al.*, 1991a). Při heterogenních výsledcích rasy se často doporučuje využít inokulaci pouze jedním zoosporangiem. Nevýhodou těchto izolátů je často velmi nízká účinnost (asi 10–15%, T. J. Gulya, nepublikováno data). Inokulace jedním zoosporangiem

nezaručuje genetickou homogenitu vzorku, protože zoosporangium může obsahovat více druhů zoospor, které se mohou geneticky lišit (Trojanová *et al.*, 2017). Nejpresnější metodou fenotypizace virulence je použití monozoosporických izolátů (Trojanová *et al.*, 2017). Monozoosporické izoláty jsou vytvořeny z jediné zoospory, čímž zajišťují genetickou homogenitu vzorku. Vytvoření takového izolátu je však velmi časově náročné a nepraktické, pokud se jedná o velké množství izolátů (Bartůšek, 2015). Očkování jednou zoosporou má ještě nižší účinnost než u celých zoosporangií, cca. 1–2% (Trojanová *et al.*, 2017).

Během testování izolátů *Ph* z roku 2019 v rámci této DP byla stanovena rasa 704 71. Pro potvrzení, že se nejedná o rasy 714 71 nebo 714 61 byla provedena třetí hodnocení, kde byla rasa 704 71 ve všech případech potvrzena. Když porovnáme historický výskyt rasy 704 na našem území, poprvé byla tato rasa zaznamenána na lokalitě Podivín a Brno-Chrlice roku 2011 (viz tabulka P1 v Příloze 1). O rok později byla rasa 704 zaznamenána právě v Lednici, odkud pochází i izolát z roku 2019. V letech 2011 a 2012 se ještě nepoužíval pětímístný kód virulence, ale pouze třímístný (tabulka P1). Proto je těžké určit, zda se jednalo o naprosto identickou rasu jako v roce 2019.

Od roku 2013 se v ČR přešlo na vyhodnocení virulence pětímístným kódem, který se používá až do současnosti. Právě v tomto byl roce v Lednici potvrzen výskyt ras 704 71 a 714 61 (tabulka P1). Další izoláty z lokality Lednice pochází až z roku 2016, kdy byla zaznamenána rasa 714 71 (tabulka P1). Vzhledem k tomu, že testování v roce 2019 neprobíhalo z monozoosporických izolátů, je možné, že se pod rasou ukrývala směs méně virulentních ras (Virányi a Gulya, 1995), nebo že virulentnější rasa vytlačila rasy méně virulentní. V úvahu musíme vzít také fakt, že *P. halstedii* přežívá v půdě až 10 let (Bartůšek, 2015). To vysvětluje možné výkyvy virulence při hodnocení izolátu z roku 2019.

I když jsou informace o variabilitě *P. halstedii* omezené a nelze charakterizovat rozmanitost patogenu v celé České republice, trend k rozmanitější virulenci u populace *P. halstedii* jasně dokazují nové rasy 704; 705; 714 a 715, které jsou schopné překonat geny rezistence. Nové rasy 705 71; 714 61 a 715 71 jsou schopné infikovat větší počet diferenciacních genotypů slunečnice (Drábková Trojanová *et al.*, 2018). *P. halstedii* zlepšila svoji schopnost geneticky se vyvíjet. Výsledkem je mnoho nových virulentních ras, které se objevily během relativně krátké doby (Virányi *et al.*, 2015).

Je potřeba neustále provádět hodnocení ras a sledovat variabilitu populace *P. halstedii* v ČR i v Evropě.

Obecně jsou v Evropě nejrozšířenější rasy 700; 710 a 730. Tyto rasy se samozřejmě vyskytují i v České republice. Zatím však nebyla odhalena žádná korelace mezi výskytem rasy v zemi a sousednímu státu. Zdá se tedy, že výskyt a rozšíření ras *P. halstedii* nemusí nutně odpovídat geografickým lokalitám a konkrétním zemím (Virányi *et al.* 2015). Celkově se v ČR vyskytují rasy 700; 704; 705; 710; 714; 730; 750; 770 (viz tabulka P1). Vnitrodruhová variabilita *P. halstedii* se u nás počítá spíše mezi nižší a výskyt plísně má pouze lokální význam v porovnání s ostatními státy (Bartůšek, 2015). Pokud hodnotíme rasu 704 v rámci Evropy, nachází se tato rasa ve Francii, která má celkovou variabilitu ras největší. V Maďarsku byla rasa 704 poprvé zaznamenána v roce 2010. Mezi velmi hojnou rasu v Maďarsku patří rasa 714, která byla nalezena v roce 2013 ve východní části země (Bán *et al.*, 2014b). S těmito dvěma rasami se v současné době maďarská populace patogenů skládá ze sedmi ras (Virányi *et al.* 2015). Další zemí Evropy, v níž se tato rasy vyskytuje je Itálie. Z hlediska nebezpečí nepředstavuje rasa 704 takovou hrozbu. Alarmující je situace spojená s rozšířením rasy 714 ve světě. Rasa 714 byla evidovaná u nás v České republice, Francii, Maďarsku, Itálii a USA (Virányi *et al.*, 2015). Tato rasa je schopná překonat geny rezistence a je velmi agresivní.

7.2. *Bremia lactucae*

Hovoříme-li o plísni salátové, je situace daleko komplikovanější. Stanovení fenotypových ras není celosvětově jednotné, a proto působí dosti chaoticky. První systém pro hodnocení fenotyp virulence *B. lactucae* zavedli Crute a Johnson v roce 1976. Klasifikace plísně salátové byla založena na základě genů rezistence. V roce 1999 byl vytvořen první diferenciační set salátu EU–A pro testování izolátů *B. lactucae*. Skládal se z genotypů Cobham Green, Lednický, UCDM2, Dandie, R4T57D, Valmaine, Sabine, LSE/57/15, UCDM10, Capitan, Hilde II, Pennlake, UCDM14, PIVT 1309, LSE/18, LS 102, Colorado, Ninja, Discovery a Argeles. Tento set byl v roce 2010 nahrazen setem EU–B. Některé genotypy byly pozměněny (Green Towers, NunDm15, CGDm16, NunDM17) a 5 nových genotypů bylo přidáno (RYZ2164, RYZ910457, Bedford, Balesta, Bellissimo). V roce 2016 byl tento systém nahrazen novým diferenciačním setem EU–C, kde bylo mnoho předchozích genotypů vynecháno (Lednický, UCDM2, Valmaine, Sabine, LSE/57/15, UCDM10, Capitan,

Hilde II, Pennlake, NunDM17, Colorado, Ninja, Discovery) a koncové genotypy pozměněny na Bartoli, Design, Kibrille (Spring *et al.*, 2019).

Systém stanovení fyziologických ras *B. lactucae* v USA byl vyvinut na univerzitě v Kalifornii v laboratoři R. W. Michelmora. Rasy byly označovány jako Patotyp I; Patotyp II; Patotyp III atd. (Ilott *et al.*, 1987). Později se označení změnilo na Patotyp CA I (Kalifornie/CA/), CA II, CA III atd. (Anonymous, 2018a). Kvůli odlišným systémům značení ras v Evropě a v USA se v roce 2015 celosvětová organizace IBEB (International Bremia Evaluation Board) rozhodla tento systém sjednotit. V současné době se americký systém určování ras *B. lactucae* zapisuje jako BI: 1US až BI: 9US (Anonymous, 2018a), označení patotyp bylo nahrazeno pojmem rasa. Pojmenování tak přispívá k lepší mezinárodní komunikaci a standardizaci nomenklatury ras plísně salátové (Spring *et al.*, 2019).

V roce 2020 byl laboratoří IBEB použit nový diferenciační set D, ve kterém jsou ve třetí sextetové skupině na 4., 5. a 6. pozici tři nové genotypy: Fenston, Bataille a RYZ20007 (Anonymous, 2021a). V současné době je potřeba podrobnější a komplexnější studie v oblasti virulence *B. lactucae*, aby ji bylo možné porovnat ze složitějšího pohledu (Spring *et al.*, 2019).

Já jsem ve své práci využila diferenciační set EU–B. Ze všech setů obsahuje nejvíce genotypů (celkem čtyři sextety), a proto byla výsledná hodnota velmi konkrétní. Na druhou stranu při mnohonásobném testování dochází k velké spotřebě osiva Výsledná rasa izolátu BI 1901 z Berouna byla po sedmi opakovaných testech označena jako EU-B-16/37/00/00.

V roce 2019 byla provedena první dvě hodnocení. Izolát z čerstvého materiálu byl nejprve přemnožen na genotypu LSE/57/15 a následně proveden patotest. Při prvních dvou hodnoceních byl izolát *B. lactucae* velmi rezistentní, dokonce i genotyp Green Towers, který nemá žádné geny rezistence nebyl zcela náchylný. Další zvláštností bylo, že kontrolní genotyp, který sloužil k přemnožení byl také neúplně náchylný. Proto bylo v roce 2020 provedeno třetí hodnocení. U tohoto hodnocení byly výsledky velmi odlišné od předchozích. Dokonce i genotypy jako je Lednický, UCDM2, Argeles vykazovaly neúplnou náchylnost (okolo 40 %). Je možné, že při dlouhodobém skladování došlo k nějakému poškození izolátu *B. lactucae*. Čtvrté hodnocení opět výslednou rasu nepotvrdilo. Genotyp Green Tower bez genů rezistence vyšel jako neúplně rezistentní, stejně jako kontrola LSE/57/15, na které byl izolát přemnožen. Je možné, že izolát 1901 Beroun byl směsný izolát. To by vysvětlovalo

rozdíly ve virulenci při těchto hodnoceních (např. odlišné fenotypové projevy genotypů UCDM14, Bellissimo a RYZ2164).

Až poslední 5., 6. a 7. opakování hodnocení potvrdily kód virulence 16/37/00/00. Tato hodnocení byla provedena ve stejném časovém období, a to na jaře v roce 2021. I když jsou všechny rostliny pěstovány ve fytotroních s nastavenou konstantní teplotou a světlem je možné, že rostlina má zachovány přirozené biorytmy a obecně platí, že v období jara je pěstování a hodnocení patotestů nejvhodnější. V České republice se plíseň salátová podrobněji studuje od 70. a 80. let (Lebeda, 1982). Od roku 1999 se *B. lactucae* a její virulence sleduje průběžně (Petrželová *et al.*, 2013).

V evropských odrůdách salátu bylo hojně používáno nejméně šest genů rezistence (Dm2, Dm3, Dm6, Dm7, Dm11 a DM16) proti plísni salátové (Crute, 1992a). Během posledních 50 let však v různých evropských zemích došlo k podstatným rozdílům v používání Dm genů. To byl pravděpodobně nejdůležitější faktor ovlivňující selekční tlak, který ovlivnil změny ve struktuře populací *B. lactucae*. Existuje velmi úzký vztah mezi zavedením nových genů Dm a rostoucí frekvencí faktorů rezistence (Lebeda a Zinkernagel, 2003). Zatím známe 28 genů rezistence a 23 faktorů rezistence (Parra *et al.*, 2016). Populace *B. lactucae* je pro konkrétní oblasti v důsledku odlišné historie používání Dm genů nebo R-faktorů odlišná. Hlavní distribuční oblasti *B. lactucae* je mírný pás a subtropické zóny (Crute a Dixon, 1981). Plíseň salátová se však také vyskytuje v sušších oblastech (např. v Kalifornii a Arizoně v USA; v Izraeli), kde se salát pěstuje pod zavlažováním. V Evropské unii je identifikováno asi 37 ras a v USA asi 9 ras (Spring *et al.*, 2019).

Bremia lactucae, původce plísně salátové, je geneticky vysoce variabilní. Mezinárodní výbor IBEB–EU hodnotil izoláty *Bremia* ze salátu pěstovaného v Evropě z let 2019 a 2020. Nejběžnějšími rasami byly tři nedávno pojmenované rasy Bl: 34EU, Bl: 35EU a Bl: 36EU. V roce 2020 však byla objevena nová rasa, která se z Francie rozšířila do Španělska, Portugalska, Itálie a je předpoklad jejího dalšího šíření v oblastech pěstování salátu (Anonymous, 2021a, b). IBEB–EU se rozhodl označit tento izolát jako Bl: 37EU (sextetový kód EU-C: D 46-15-14). Tato rasa je široce distribuována ve Francii, ale je také přítomná ve Španělsku, Portugalsku a Itálii. Tuto rasu lze popsat jako virulentnější variantu Bl: 36EU, protože dokáže překonat více genů rezistence (Anonymous, 2021a, b).

Někdy izoláty pouze regionálního významu představují vážné problémy. Tento typ rozmanitosti izolátů komplikuje oficiální pojmenování všech důležitých izolátů

Bremia. Trend k lokálnějším epidemiím může souviset s úspěšným zavedením stále širší škály genů rezistence šlechtitelskými společnostmi. Ačkoli šlechtitelské společnosti poskytují pěstitelům odrůdy hlávkového salátu, které mají odolnost vůči označeným rasám BI:16–37EU, neznamená to úplnou ochranu před rodem *Bremia* (Anonymous, 2021a, b).

7.3. Uchovávání peronospor a podmínky patotestů

Důležitým předpokladem pro správné vyhodnocení rasy je dobře připravené inokulum. Inokulum musí být dostatečně husté – okolo 10 000–50 000 zoosporangii na 1 ml destilované vody. V některých případech bylo dokumentováno, že koncentrace vyšší než 50 000 zoosporangii na 1 ml může způsobit utlumení růstu semenáčků, a tím pádem nemusí být vyhodnocení rasy správné (Gulya, 1996). V opačném případě, kdy je inokulum málo koncentrované, se dá použít roztok CaCl₂, který zvýší účinnost zoosporangia. Dr. Gulya v roce 1996 zjistil, že minimální množství vápníku (10 mM CaCl₂) výrazně zvyšuje účinnost patogenu, zvláště pak při nízkých koncentracích inokula. Protože vápníkové ionty dokáží signalizovat hostitelské rostliny o vývoji patogenních houbových organismů (Trojanová *et al.*, 2017). Při mých pokusech se tato teorie potvrdila a účinnost inokula byla opravdu vyšší. Použila jsem ji hlavně při přemnožování vzorků ze zamraženého materiálu, kdy byla aktivita zoospor nižší.

Inokulum lze připravit z čerstvého nebo zmrazeného materiálu. Pokud je to možné, je lepší využívat čerstvý materiál, protože čerstvá zoosporangia mají vyšší aktivitu a životaschopnost (Gulya *et al.*, 1991a; Gulya, 1996). Alternativní metodou je skladování zoosporangia přímo na listech slunečnice při 4 °C ve vlhkém prostředí. Takto nasporulovaný materiál lze použít k naočkování do 7 dnů po sporulaci (T. J. Gulya, nepublikované údaje). Zoosporangia mohou být uchována i po delší dobu při -20 °C, -80 °C nebo v kapalném dusíku. Zoosporangia uchovávaná v -20 °C zůstávají životaschopná až 3 měsíce (Virányi, 1985). Uchovávání v této teplotě je vhodné spíše pro krátkodobé uchovávání. Využila jsem ho hlavně pro izoláty, které se používaly, a to hlavně přes zimní období, kdy neprobíhalo žádné testování. Mě se povedlo takto uchované izoláty oživit i o 8–12 měsíců později. Samozřejmě spotřeba inokula byla větší a úspěšnost sporulace mnohem menší. Zoosporangia v mrazničkách s -80 °C mohou přežít až 1 nebo několik let, ačkoli životaschopnost s časem klesá (Sedlářová *et al.*, nepublikovaná data). Vakuovaná sporangia okamžitě zmrazená a uložená v kryozkumavkách v kapalném dusíku mohou být životaschopná až deset let. Obecně

nižší obsah vody v uložených zoosporangii prodlužuje dobu možného skladování (Gulya *et al.*, 1993).

Za použití techniky vysušení a rychlého zmrazení (DSFF) dokáží být zoosporangia *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnic, infekční až po dobu 5 let. Později začne jejich patogenita degradovat (Gulya *et al.*, 1993). Technika DSFF spočívá ve vysoušení zoosporangii na vzduchu. Umístní se do zkumavky bez kryoprotektantu a okamžitě jsou umístěny do kapalného dusíku. Schopnost vzduchem sušených zoosporangii odolávat tekutinám skladování dusíku bez kryoprotektantů se zdá být způsobena jejich nižším obsahem vody ve srovnání se sporami shromážděnými praním a filtrováním. Uchovávají se pouze spory, ne celé děložní listy, tím se minimalizují nároky na prostor a je tak možné uložit více vzorků (Gulya *et al.*, 1993).

I když existuje mnoho technik používaných k dlouhodobému skladování mikromycet, konzervace kapalným dusíkem (LN) je jedna z nejlepších metod. Peronosporales však konzervaci LN nesnáší dobře (Dahmen *et al.*, 1983). Obecně platí, že houbové organismy z třídy Peronosporomycetes mají špatnou dlouhodobou životaschopnost při uchovávání lyofilizací. Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících úspěšnost lyofilizace je obsah sporové tekutiny. Když se spory Peronospor nechají uschnout na vzduchu, jejich obsah vlhkosti se sníží a je podobný jako u mnoha ostatních spor (Gulya *et al.*, 1993). Metoda DSFF, nemusí být použitelná pro všechny oomycety a hyfy mohou reagovat odlišně od spor (Gulya *et al.*, 1993).

Většina vědců pracujících s pravými plísněmi běžně smývá spory z listů, což je rehydratuje. Když se zoosporangia *P. halstedii* nechají uschnout na vzduchu, jejich obsah vody se zmenší, podobně jako u mnoha dalších mikromycet (Mazur, 1968). Použití techniky DSFF umožnilo americkým fytopatologům dlouhodobě skladovat asi 200 izolátů *P. halstedii* shromážděných z 11 zemí za pět let, což by bez takové metody nebylo možné. Technika DSFF může být užitečná i u jiných peronospor a mikromycet a může pomoci zachovat cytoplazmu (Gulya *et al.*, 1993).

8. Závěr

Ve své diplomové práci jsem se zabývala stanovením kódu virulence, tj. fyziologických ras u českých izolátů *Plasmopara halstedii* (6) a *Bremia lactucae* (1). Ze šesti izolátů *Ph* bylo pět izolátů vyhodnoceno jako rasa 70471, u izolátu 1905 se nepodařilo rasu jednoznačně určit. V případě izolátu *B. lactucae* bylo prováděno hodnocení na setu EU-B opakovaně v letech 2019–2021. Výsledky nebyly jednotné, jedná se zřejmě o směsný izolát s převládající rasou EU-B-16/37/00/00. Do své práce jsem také zahrнула metody krátkodobého a dlouhodobého uchovávání peronospor, provedení experimentů ale bylo v posledních dvou letech významně omezeno restrikcemi v souvislosti s průběhem pandemie onemocnění covid-19. Při krátkodobém uchovávání vzorků jsem využila mrazničky s teplotou -20 °C. Při dlouhodobém uchovávání jsem využila mrazničky o teplotě -80 °C. Nejvhodnější metodou pro dlouhodobé uchovávání peronospor je v literatuře zmiňována technika DSFF za využití kapalného dusíku o teplotě -196 °C.

9. Didaktická část školní projekt v rámci výuky biologie „Mikroskopické houby a peronospory – význam a využití“

Školní projekt pro žáky SŠ (1. ročník vyššího gymnázia)

Doporučené datum realizace: duben/květen

Plánovaná struktura výuky:

1 x 45min Úvod do problematiky: mikroskopické houby a peronospory

2 x 45min Praktické cvičení: mikroskopování, tvorba protokolů a modelování

5 x 45min Exkurze: vinařství – mykózy révy vinné a kvasinky ve výrobě vína

9.1. Písemná příprava úvodní hodiny

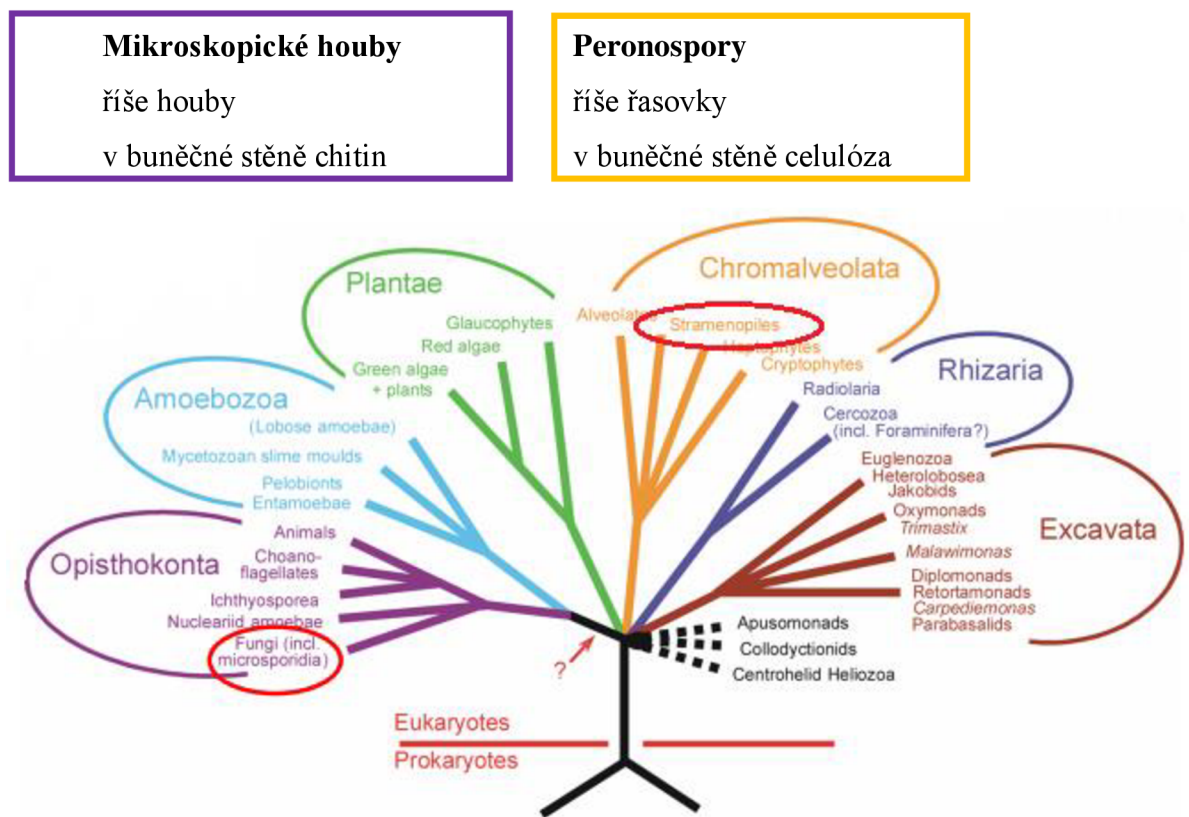
Předmět: Biologie
Téma: Mikromycety a peronospory
Výukové cíle: Žáci dokáží stručně charakterizovat a porovnat rozdíly mezi mikromycetami a peronosporami. Žáci získají přehled o významu a praktickém využití mikromycet a peronospor. Žáci dokáží fylogeneticky zařadit peronospory. Žáci dokáží jmenovat hlavní zástupce parazitických mikromycet a peronospor.
Klíčové kompetence: Kompetence k učení (žáci používají správnou terminologii; orientují se v přirozených systémech organismů a posuzují fyziologické vztahy). Kompetence k řešení problému (žáci určují druhy fytopatogenů dle získaných znalostí). Kompetence komunikativní (žáci se aktivně zapojují do diskusí a jsou schopni reagovat na otázky) Kompetence sociální a personální (žáci spolupracují během didaktické hry)
Analýza prekonceptů: Co jsou to makro- a mikromycety, peronospory, řasovky a jaké jsou jejich ekologické role? Jak se jednotlivé skupiny hub a peronospor rozmnožují? Jaké znáš zástupce hub a peronospor?
Strukturovaný obsah učiva: Definice a stručná charakteristika, systém houbových organismů se zaměřením na mikromycety a peronospory Výskyt, jednotlivé skupiny a zástupci mikromycet a peronospor
Základní termíny: mikromycety, peronospory, kvasinka, hyfa, mycelium (podhoubí), spory, (fyto)patogen, heterotrof, saprofyt, parazit, kvašení

Aktuální novinky, historická fakta: Klasifikace peronospor, výroba antibiotik, mykotoxiny, fungicidy		
Vyučovací metody, organizační formy výuky Metody: výklad; práce s učebnicí; didaktická hra. Formy: výuka základního typu		
Průřezová témata: Environmentální výchova: vliv fungicidů a antibiotik na zemědělství a lidské zdraví		
Mezipředmětové vztahy, možnosti integrace učiva: Chemie: alkoholové kvašení, fungicidy Dějepis: výroba antibiotik		
Motivační momenty výuky: didaktická hra: hledání dvojic: hostitel se symptomy – fytopatogen (viz Příloha 4)		
Materiální didaktické prostředky – pomůcky, didaktická technika, ICT: učebnice; obrázky; dataprojektor; tabule		
Forma zápisu na tabuli, PowerPointové prezentace: PowerPoint prezentace se základními informacemi a názornými obrázky.		
Otázky k závěrečnému opakování: Formou didaktické hry, hledání dvojic: hostitel se symptomy – fytopatogen		
Použité zdroje informací: Savická D: Mikroskopické vláknité houby jako producenti mykotoxinů. Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha. [online]. [cit. 2021-07-15]. Dostupné z: http://www.rostlinolekari.cz/sites/default/files/2017-12/Savick%C3%A11.pdf Jelínek, J., Zicháček, V. (2007): Říše: Houby (Fungi). Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část) (7.- rozšířené vydání.). Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN-978-80-7182-213-4 Ostrý V. (1998): Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Státní zdravotní stav. Praha. ISBN- 80-7071-102-7 Macháček T. et al. (2005): Biologie hub. Biomach, výpisky z biologie [online]. [cit. 2021-07-15]. Dostupné z: http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/biologie-hub#TOC-Oomycota		
Scénář hodiny: Úvod do problematiky – mikroskopické houby a peronospory		
Čas	Činnost žáka	Činnost učitele
2 min	Pozdrav povstáním; nahlášení chybějících spolužáků.	Zahájení hodiny; zapsání chybějících žáků do třídní knihy.
3 min	Zápis do sešitu. Odpovídání na otázky.	Zápis na tabuli: číslo a téma; seznámení s cíli hodiny. Zjišťování prekonceptů.
30 min	Tvorba zápisu; kladení doplňujících otázek k učivu.	Výklad učiva; popis obrázků, odpovídání studentům na dotazy.
10 min	Didaktická hra: ve skupinkách přiřazují fytopatogen k jeho hostiteli se symptomy choroby	Vysvětlení pravidel k didaktické hře, následně kontrola a vedení jejího průběhu.
		Ukončení hodiny.

9.2. Obsah učiva: Mikroskopické houby a peronospory

Jak mikromycety, tak peronospory jsou heterotrofní eukaryotické organismy, jejichž detaily jsou viditelné pouze pod mikroskopem. Vyskytují se prakticky ve všech prostředích, v ekosystémech nacházíme druhy:

- a) **saprophytické**
- b) **mutualistické** – symbióza s rostlinami (mykorrhiza, lichenismus)
- c) **parazitické**
 - fytopatogenní houby způsobují choroby rostlin
 - zoopatogenní houby způsobují choroby u zvířat včetně člověka



říše HOUBY (Fungi)

odd. Chytridiomycota

- vytvářejí mnohoaderné podhoubí
- rozmnožují se pomocí zoospor s jedním bičíkem
- **Zástupce:** rakovinovec bramborový – způsobuje rakovinu hlíz brambor

odd. Microsporidiomycota

- jsou to vnitrobuněční parazité
- **Zástupce:** hmyzomorka včelí – způsobuje úhyn včel

odd. Zygomycota = spájivé houby

- mají mnohojaderné trubicovité podhoubí
- z podhoubí vyrůstají výtrusnice s výtrusy
- rozmnožují se:
 - a) nepohlavně pomocí sporangiospor (endospory, vznik ve sporangiu)
 - b) pohlavně spájením a tvorbou zygospor
- **Zástupce:** plíseň hlavičková – tvoří povlaky na potravinách
kropidlovec černavý – tvoří plísňové povlaky na potravinách

odd. Ascomycota = vřeckovýtrusné houby

- mají přehrádkované hyfy, jednoduchá přepážka
- Rozmnožují se:
 - a) nepohlavně – konidiofory s **konidiemi** (exospory)
 - b) pohlavně – (většinou na plodnici (askokarp)) vytváří výtrusnici, která se nazývá vřecko (ascus), ve kterém se vytváří askospory (endospory)
- **Zástupce:** paličkovice – na obilí a travách tvoří námel – výroba léčiv
štětičkovec (*Penicillium*) – některé produkují antibiotika, jiné se používají na výrobu sýrů
padlí – parazité rostlin, způsobují „moučnaté“ povlaky na listech, stoncích a plodech rostlin
kropidlák – tvoří různě barevné povlaky na potravinách, produkuje aflatoxiny, karcinogeny a toxické sloučeniny
hlízenka ovocná – způsobuje zahnívání ovoce

odd. Basidiomycota = stopkovýtrusné houby

- mají přehrádkované hyfy, ztlustlé přepážky
- mají většinou dvojjaderné podhoubí
- vytváří plodnice (bazidiokarp), kde se na bazidii vytváří bazidiospory
- **Zástupce:** sněti – napadají většinou květenství, často způsobují nádory (sněť kukuřičná, sněti obilnin)
rzi – napadají většinou listy a stonky, komplikovaný životní cyklus, až 5 typů výtrusů

Morfologie mikromycet: a/ jednobuněčné houby s pučením, **kvasinky**
b/ (mnohobuněčné) **vláknité houby**

KVASINKY – nejedná se o taxonomickou skupinu!

- jsou jednobuněčné houby
- rozmnožují se nepohlavně pučením
- vytvářejí nepravá podhoubí (pseudomycelia)
- většinou zástupci vřeckovýtrusých, méně stopkovýtrusých hub
- **významný zástupce:** kvasinka pivní – používá se k výrobě těsta, piva, vína (přeměňuje cukr na alkohol); obsahuje vitamíny B, bílkoviny a další látky
- původci chorob – např. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

říše ŘASOVKY (Stramenopiles)

řád Peronosporales = peronospory, pravé plísně

- zahrnují významné biotrofní a hemibiotrofní parazity
- vláknité mnohojaderné mycelium, rozmnožují se pohlavně pomocí sporangií a tvorbou oospor, nepohlavně pomocí dvoubíčíkatých zoospor ve sporangiích nebo konidií

čel. Albuginaceae

Zástupce: albugo bělostné (*Albugo candida*) – obligátní rostlinný patogen, který infikuje hlavně druhy brukvovité a způsobuje „bílé rzi“

čel. Pythiaceae

Zástupce: rod *Pythium* – způsobuje hnilobu kořenů vedoucí k vadnutí rostliny. Pythium travní (*Pythium graminicola*) – infikuje širokou škálu hostitelů, např: trávy, obilniny, fazol, rýži, hrách.

čel. Peronosporaceae

Zástupce: *Bremia lactucae* – plíseň salátová

Peronospora destructor – vřetenatka cibulová

Phytophthora infestans – plíseň bramborová

Plasmopara halstedii – plíseň slunečnicová

Plasmopara nivea – plíseň miříkovitých

Plasmopara viticola – plíseň réвовá

Pseudoperonospora cubensis – plíseň okurková

9.3. Písemná příprava biologické praktikum

Předmět: Biologie			
Téma: Mikromycety a peronospor			
Výukové cíle: Žáci dokážou porovnat rozdíly ve velikosti a stavbě peronospor a mikromycet Žáci dokážou vytvořit model sporangia peronospor a mikromycet. Žáci dokážou popsat způsoby rozmnožování peronospor a mikromycet.			
Klíčové kompetence: Kompetence k učení (žáci používají správnou terminologii) Kompetence k řešení problému (posuzují rozdíly ve velikosti a stavbě peronospor a mikromycet) Kompetence komunikativní (aktivně si pomáhají ve skupinách a komunikují spolu o postupu práce a výsledcích)			
Analýza prekonceptů: Jak se liší vláknité houby, peronospor a kvasinky Jak se pracuje s mikroskopem?			
Základní termíny: spory, sporangia, mycelium			
Vyučovací metody, organizační formy výuky, práce s učebnicí či pracovními listy: Metody: laboratorní praktikum Formy: laboratorní cvičení			
Mezipředmětové vztahy, možnosti integrace učiva: Fyzika: optika Chemie: cukry Výtvarná výchova: kresba a modelování			
Motivační momenty výuky: Mikroskopování a modelování			
Výchovné aspekty výuky: Bezpečnost práce, zásady hygieny, alkoholismus			
Materiální didaktické prostředky – pomůcky, didaktická technika, ICT: učebnice; tabule, mikroskop a mikroskopovací pomůcky, pracovní list			
Forma zápisu na tabuli, PowerPointové prezentace: Pracovní list			
Celkový scénář hodiny			
Čas	Činnost žáka	Činnost učitele	Poznámky
2 min	pozdrav povstáním; nahlášení chybějících spolužáků	zahájení hodiny; zapsání chybějících žáků do třídní knihy	
2 min	poslouchají	poučení o BOZP	
10 min	tvorba preparátů	tvorba preparátů a pomáhání žákům s přípravou preparátů	
15 min	pozorování preparátů vypracování pracovního listu	pomáhání žákům a výklad pomáhá s pracovním listem	
10 min	modelování	pomoc	
5 min	oprava protokolů	oprava protokolů	
5 min	úklid pracovní plochy a třídy		

9.4. Protokol – verze pro žáky

1. Úkol: Doplň text

Kvasinky jsouhouby. Rozmnožují se..... Kvasinky slisované s moukou se prodávají pod názvem..... Používají se k přípravě kynutého těsta. Proces, kterým přeměňují kvasinky cukr na alkohol se nazývá..... Během tohoto procesu se uvolňuje plyn..... Je těžší než vzduch, a proto se drží při zemi. Tento plyn je v uzavřené místnosti nebezpečný, protože hrozí.....

2. Úkol: Pokus s kvasinkami

Do nádoby nalej:

- a) 0,2 l studeného mléka
- b) 0,2 l vroucí vody
- c) 0,2 l vlažného mléka

přidej droždí a lžici cukru. Sleduj, co se v nádobě bude dít. Po 5-10 minutách zapiš výsledek pozorování a srovněj, proč se to tak u jednotlivých variant stalo.

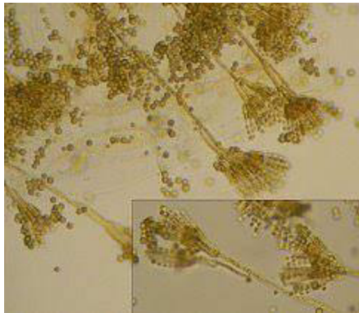
3. Úkol: Podle svého preparátu popiš následující obrázek



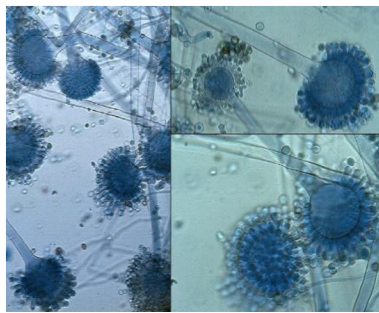
pliseň hlavičková

4. Úkol: Podle svých preparátů pozněj zástupce na obrázku:

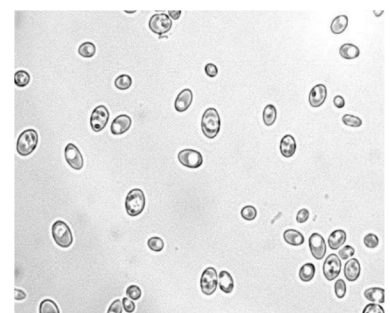
A)



B)



C)



5. Úkol: Vyber si jeden preparát a vymodeluj ho. Do protokolu zapiš jeho název a co o tomto druhu víš.

6. Úkol: Vyber pravdivá tvrzení o řasovkách:



9.5. Protokol – doplněná verze pro učitele

1. Úkol: Doplň text

Kvasinky jsou jednobuněčné houby. Rozmnožují se pučením. Kvasinky slisované s moukou se prodávají pod názvem droždí. Používají se k přípravě kynutého těsta. Proces, kterým přeměňují kvasinky cukr na alkohol se nazývá kvašení. Během tohoto procesu se uvolňuje plyn oxid uhličitý. Je těžší než vzduch, a proto se drží při zemi. Tento plyn je v uzavřené místnosti nebezpečný, protože hrozí udušení.

2. Úkol: Pokus kvasinky

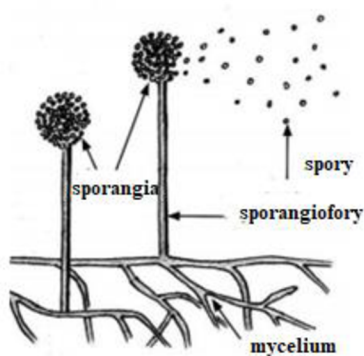
Do nádoby nalej:

- 0,2 l studeného mléka
- 0,2 l vroucí vody
- 0,2 l vlažného mléka

přidej droždí a lžici cukru. Sleduj, co se v nádobě bude dít. Po 5–10 minutách zapiš výsledek pozorování a srovněj proč se to tak u jednotlivých variant stalo.

- V nádobě se nic nestalo, cukr se pomalu rozpouštěl a droždí se nerozpustilo. Droždí nevytvořilo kvásek, protože mléko bylo příliš studené a kvasinky jsou v chladu neaktivní.
- V nádobě s horkou vodou se cukr rozpustil a droždí se také mírně rozpustilo. Droždí nevytvořilo kvásek, protože bod varu kvasinky zabíjí.
- V nádobě se začal tvořit kvásek, který zvětšil objem. Došlo k pučení kvasinek, jejich množení a tvorbě bublinek oxidu uhličitého z cukru.

3. Úkol: Podle svého preparátu popiš následující obrázek



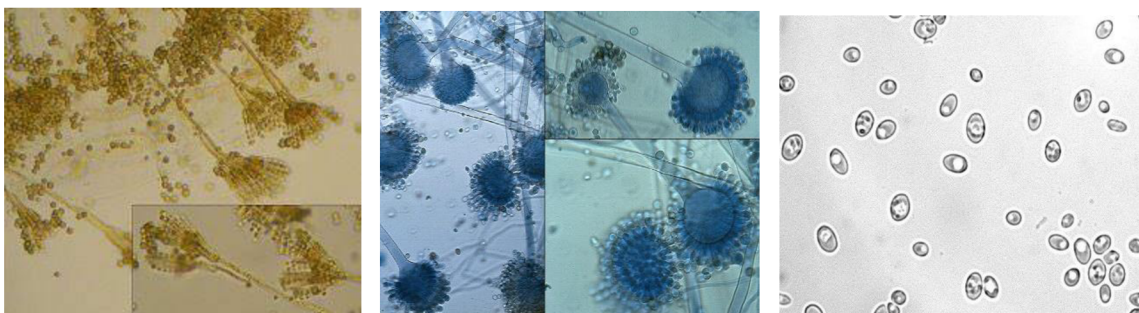
pliseň hlavičková

4. Úkol: Podle svých preparátů pozněj zástupce na obrázku:

A) štětíčkovec

B) kroupidlák

C) kvasinky



5. Úkol: Vyber si jeden preparát a vymodeluj ho. Do protokolu napiš jen jeho název a co o něm víš.

6. Úkol: Vyber pravdivá tvrzení o řasovkách:



9.6. Exkurze – vinařství

Stručný popis průběhu exkurze

V rámci biologie hub se sjedná návštěva místního vinařství. Celá exkurze bude trvat 5 vyučovacími hodinami, to znamená od 8:00 do 12:35h. Bude zajištěna doprava přímo k vinařství a zpět ke škole. S vedoucím vinařství bude domluvena prohlídka vinic a výrobních procesů vinařství. Pro lepší organizaci budou žáci rozděleni do dvou skupin. První skupina se seznámí s významnými houbovými chorobami vinné révy: plíseň révová (peronospora), padlí révové a plíseň šedá (botrytida). Druhá skupina žáků bude moci ve sklepech vinařství nahlédnout do procesu výroby vína. Názorně se seznámí s alkoholovým kvašením vína a poznají další metody využití kvasinek. Žáci si sami prakticky vyzkouší měření cukrů ve víně v různých fázích alkoholového kvašení, dále prakticky změří hodnoty síry ve víně. Prohlédnou si vybavení výrobní haly vinařství a zkusí porovnat s vybavením malých vinařství. Následně se skupiny vystřídají. Žáci si nejen osvojí učivo v praxi, ale také získají nový rozhled v možném budoucím pracovním odvětví. V průběhu exkurze budou žáci vypracovávat pracovní list. Následující hodinu biologie budou pracovní listy vyhodnoceny a výsledky budou využity ve výuce.

Očekávané výstupy žáků:

- a) Žáci budou umět vysvětlit proces alkoholového kvašení
- b) Žáci budou umět vypočítat množství cukru a síry ve víně
- c) Žáci budou umět porovnat množství síry v různých fázích ve výrobě vína
- d) Žáci budou umět identifikovat různé choroby vinné révy

9.7. Badatelská činnost

Podporovat studenty se zájmem o dané téma, informace o možnosti účasti v soutěžích SVOČ, Věda je zábava, Badatel a dalších.

10. Literatura

- Anonymous (2018): Minutes of the meeting of the International Bremia Evaluation Board in the European Union (IBEB-EU) on 16 April 2018 at PRI in Wageningen. IBEB, pp 1–3.
- Anonymous (2021a): Une nouvelle race de *Bremia lactucae*, BI: 37EU identifiée et dénommée en Europe. International Bremia Evaluation Board in the European Union (IBEB-EU) on 1 June 2021 in Gouda, pp 1-2. [online]. [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.gautiersemences.com/denomination-bremia-2021-bl37eu>
- Anonymous (2021b): A new race of *Bremia lactucae*, BI: 37EU identified and denominated in Europe. [online]. [cit. 2021-07-21]. Dostupné z: <https://www.naktuinbouw.com/vegetable/news/new-race-bremia-lactucae-bl-37eu-identified-and-denominated-europe>
- Bán, R., Kovács, A., Körösi, K., Perczel, M., Turóczy, Gy. (2014b): First report on the occurrence of a new pathotype, 714, of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. *Plant Disease* **98**: 1580–1580.
- Bartůšek, T. (2015): Variabilita populací *Plasmopara halstedii* v ČR. Olomouc, diplomová práce (Mgr.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Beakes, G. W., Glockling, S.L., Sekimoto, S. (2012): The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. *Protoplasma* **249**, 3–19.
- Bertero de Romano, A., Romano, C., Bulos, M., Altieri, E., Sala, C.A. (2010): A new gene for resistance to downy mildew in sunflower. In: Proc. of the Internat. Symposium: Sunflower Breeding on Resistance to Diseases, Krasnodar, Russia, June 23–24, 140–146.
- Burdon, J. J., Thrall, P. H., & Ericson, L. (2006): The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 19–39.
- Carson, M. L. (1981): New race of *Plasmopara halstedii* virulent on resistant sunflowers in South Dakota. *Plant Diseases* **65**, 842–3.
- Constantinescu, O., Voglmayr, H., Fatehi, J., Thines, M. (2005): *Plasmoverna* gen. nov., and the taxonomy and nomenclature of *Plasmopara* (Chromista, Peronosporales). *Taxon* **54**, 813–821.
- Crute, I. R., Dixon, G. R. (1981): Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel. In *The Downy Mildews*; Spencer, D. M., Ed. Academic Press: London, New York, San Francisco, 421–460.
- Crute, I. R. (1992a): The role of resistance breeding in the integrated control of downy mildew (*Bremia lactucae*) in protected lettuce. *Euphytica* **63**: 95–102.
- Dahmen, H., Staub, T., Schwinn, F.J. (1983): Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* **73**: 241–246.
- Delledonne, M., Polverari, A., Murgia, I. (2003): The functions of nitric oxide mediated signalling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidants and Redox Signaling* **5**, 33–41.

- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 534–540.
- Dick, M. W. (1995): Sexual reproduction in the Peronosporomycetes (chromistan fungi). *Canadian Journal of Botany*, **73**, 712–724.
- Dick, M. W., Vick, M. C., Gibbings, J. G., Hedderson, T. A., Lopez Lastra, C. C. (1999): 18S rDNA for species of Leptolegnia and other Peronosporomycetes: Justification of the subclass taxa Saprolegniomycetidae and Peronosporomycetidae and division of the Saprolegniaceae sensu lato into the Leptolegniaceae and Saprolegniaceae. *Mycological Research*, **103**, 1119–1125.
- Dick, M. W. (2001): Straminipilous fungi: Systematics of the peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Dobešová, K. (2018): Výskyt a variabilita plísně slunečnicové v ČR. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- Drábková Trojanová, Z., Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Lebeda, A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflowers in the Czech Republic. *Plant Pathology* **67**, 136-144.
- Fall, M. L., Van der Heyden, H., Carisse, O. (2016): A Quantitative Dynamic Simulation of *Bremia lactucae* Airborne Conidia Concentration above a Lettuce Canopy. *PLoS ONE* **11**(3)
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M. C., Vear, F., Pichon, M., Godiard, L. (2015): The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology* **16**(2), 109-122.
- Gilbert, G. S. (2002): Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 13–43.
- Gill, T. S., Davidson, J. A. (2005): A preservation method for *Peronospora viciae* conidia. *Australasian Plant Pathology* **34**: 259–260.
- Gilley, M. A., Gulya, T. J., Seiler, G. J., Underwood, W., Hulke, B. S., Misar, C. H., Markell, S. G. (2020): Determination of Virulence Phenotypes of *Plasmopara halstedii* in the United States. *Plant Disease* **104** (11): 5-23.
- Göker, M., Riethmüller, A., Voglmayr, H., Weiß, M., & Oberwinkler, F. (2004): Phylogeny of Hyaloperonospora based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mycological Progress*, **3**, 83–94.
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A., Oberwinkler, F. (2007): How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 105–122.
- Grasse, W., Zipper, R., Totska, M., Spring, O. (2013): *Plasmopara halstedii* virus causes hypovirulence in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew pathogen of the sunflower. *Fungal Genetics and Biology* **57**, 42–47.

- Grasse, W., Spring, O. (2015): Occurrence and genetic diversity of the *Plasmopara halstedii* virus in sunflower downy mildew populations of the world. *Fungal biology* **119**, 170-178.
- Grasse, W., Spring, O. (2017): ssRNA viruses from biotrophic Oomycetes form a new phylogenetic group between Nodaviridae and Tombusviridae. *Arch Virol.* **162**, 1319–1324.
- Gulya, T.J., Freeman, T.P., Mayhew, D.E. (1990): Virus-like particles in *Plasmopara halstedii*, sunflower downy mildew. *Phytopathology* **80**, 1032.
- Gulya, T. J., Miler, Virnanyi, F., Sackston W. E. (1991a): Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia* **14**,11-20.
- Gulya, T. J., Sackston, W. E., Viranyi, F., Masirevic, S., Rashid, K. Y., (1991b): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Journal of Phytopathology* **132**, 303-311
- Gulya, T. J., Masirevic, S., Thomas, C. E. (1993): Preservation of airdried downy mildew sporangia in liquid nitrogen without cryoprotectants or controlled freezing. *Mycological Research* **97**, 240–244.
- Gulya, T., Tourvieille de Labrouhe, D., Masirevic, S., Penaud A., Rashid, K., Viranyi, F. (1998): Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). ISA Symposium III: Sunflower Downy Mildew, Fargo (ND, USA) 13-14 January, 130-136.
- Gulya, T. J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N. (eds) *Advances in Downy Mildew Research*, vol. 3, Palacky University in Olomouc and JOLA, v.o.s., Kostelec na Hané (Czech Republic), 121–134.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, Ch.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K., Park, S.W. (2012): Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**, 51-65.
- Humber, R. A. (1997): Fungi: preservation of cultures. *Manual of techniques in insect pathology*. 5: 269-279.
- Hwang, S. (1966): Long-Term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.* **14** (5): 784-788.
- Choi, Y.-J., Thines, M. (2015): Host jumps and radiation, not co-divergence drives diversification of obligate pathogens. A case study in downy mildews and Asteraceae. *PLoS ONE* **10**.
- Ilott, T. W., Durgan, M. E., and Michelmore, R. W. (1987): Genetics of virulence in California populations of *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew). *Phytopathology* **77**: 1381–1386.
- Ioos, R., Laugustin, L., Rose, S., Tourvieille, J., & Tourvieille de Labrouhe, D. (2007): Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* **56**, 209–218.

- Iwebor, M., Antonova, T., Saukova, S. (2018): Occurrence and Distribution of Races 713, 733 and 734 of Sunflower Downy Mildew Pathogen in the Russian Federation. *Helia* **41** (69), 141–151.
- Jocić, S., Miladinović, D., Imerovski, I., Dimitrijević, A., Cvejić, S., Nagl, N., Kondić Špika, A. (2012): Towards sustainable downy mildew resistance in sunflower. *HELIA* **35** (56), 61-72.
- Kamoun, S., Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A. (1999): Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in plant science perspectives* Vol. 4, (5), 196-200.
- Laine, A.-L. (2005): Spatial scale of local adaptation in a plantpathogen metapopulation. *Journal of Evolutionary Biology* **18**, 930–938.
- Laviola, C., Cannizzaro, G., Conigliaro, G., Burruano, S. (2006): Simple techniques for long-term storage of *Plasmopara viticola*. *Phytopathol. Mediterr.* **45**: 271–275.
- Lebeda A. (1982): Geographic distribution of virulence factors in the Czechoslovakian population of *Bremia lactucae* Regel. *Acta Phytopath Acad Sci Hung* **17**:65–79.
- Lebeda, A., Pink, D. A. C., Mieslerová, B. (2001): Hostparasite specificity and defense variability in the *Lactuca* spp. – *Bremia lactucae* pathosystem. *J. Plant Pathol.* **83**, 25–35.
- Lebeda, A. (2002): Occurrence and variation in virulence of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *Advance of Downy Mildew research*. Spencer Phillips, P.T.N., Gisi, U., Lebeda, A. Kluwer academic publishers, Dordrecht. 179-183.
- Lebeda, A., Pink, D. A. C., Astley, D. (2002): Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A, eds. *Advances in Downy Mildew Research*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 85–117.
- Lebeda, A., Zinkernagel, V. (2003a): Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. *Plant Pathology* **52**, 41–51.
- Lebeda, A., Ryder, E. J., Grube, R., Doležalová, I., Křístková, E. (2007b): *Lettuce* (Asteraceae; *Lactuca* spp.). Singh, R. Ed. CRC Press: Boca Raton. *Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement Series* **3**, 377–472.
- Lebeda, A., Petrželová, I., Maryška, Z. (2008a): Structure and variation in the wild plant pathosystem: *Lactuca serriola*–*Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* **122**, 127–146.
- Lebeda, A., Sedlářová, M., Petřivalský, M., Prokopová, J. (2008b): Diversity of defence mechanisms in plant–oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol* **122**, 71–89.
- Lebeda, A., Petrželová, I. (2010): Screening for resistance to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease*; Spencer, M. M. and Lebeda, A., Eds. International Atomic Energy Agency (IAEA): Vienna, Austria, 245–256.

- Martín-Sanz, A., Rueda, S., García-Carneros, A. B., Molinero-Ruiz, L. (2019): First Report of a New Highly Virulent Pathotype of Sunflower Downy Mildew (*Plasmopara halstedii*) Overcoming the *Pl* Resistance Gene in Europe. *Plant disease* **104** (2), 597.
- Michelmore, R. W., Wong, J. (2008): Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, lettuce downy mildew. *Journal of Phytopathology* **122**, 19–30.
- Mieslerová, B., Lebeda, A., Petrželová, I., Korbelová, P. (2013): Incidence of Lettuce Downy Mildew (*Bremia lactucae*) and Powdery Mildew (*Golovinomyces cichoracearum*) in Natural Populations of Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Plant Protect. Sci.* **49**, 24–32.
- Miller, J.F., Gulya, T.J. (1991): Inheritance of resistance to race 4 of downy mildew derived from interspecific crosses in sunflower. *Crop Sci.* **31**, 40–43.
- Miranda-Fuentes, P., García-Carneros, A.B., Molinero-Ruiz, L. (2021): Updated Characterization of Races of *Plasmopara halstedii* and Entomopathogenic Fungi as Endophytes of Sunflower Plants in Axenic Culture. *Agronomy* **11**, 268.
- Molinero-Ruiz, M. L., Dominguez, J., Melero-Vara, J. M. (2002): Races of isolates of *Plasmopara halstedii* from Spain and studies on their virulence. *Plant Disease* **86**, 736–740.
- Morris, G. J., Smith, D., Coulson, G. E. (1988): A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi. *Journal of General Microbiology.* **134**: 2897–2906.
- Novotel'nova, N. S. (1966): Downy mildew of sunflower. *Nauka*, Moscow, Russia, 150.
- Ogilvie, L. 1944. Downy mildew of lettuce. A preliminary note on some greenhouse experiments. *Report of Agricultural and Horticultural Research Station*, University of Bristol, 90–94.
- Petrželová, I., Lebeda, A. (2004a): Occurrence of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *J. Phytopathol* **152**, 391–398.
- Petrželová, I., Lebeda, A. (2011): Distribution of race-specific resistance against *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. *Eur J Plant Pathol* **129**, 233–253.
- Petrželová, I., Lebeda, A., a Kosman, E. (2013): Distribution, disease level and virulence variation of *Bremia lactucae* on *Lactuca sativa* in the Czech Republic in the period 1999–2011. *J. Phytopathol.* **161**: 503–514.
- Pisani, C., Patel, P. C., Roskopf, E. N., Abbasi, M., Aime, M. C. (2019): First Report of Downy Mildew Caused by *Plasmopara halstedii* on *Ageratum houstonianum* in the United States. *Plant Disease* **103** (11), 2968.
- Prokopová, J., Špundová, M., Sedlářová, M., Husičková, A., Novotný, R., Doležal, K., Nauš, J., Lebeda, A. (2010): Photosynthetic responses of lettuce to downy mildew infection and cytokinin treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 716–723.
- Rietman, H., Champouret, N., Hein, I., Niks, R.E., Vleeshouwers, V.G.A.A. (2010): Plants and oomycetes, an intimate relationship: co-evolutionary principles and

- impact on agricultural practice. *Plant Sciences Reviews*. CAB International. Vol. 5, No. 20, 257-274.
- Roeckel-Drevet, P., Tourvieille, J., Gulya, T. J., Charmet, G., Nicolas, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2003): Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian journal of Microbiology* **49**(8), 492-502.
- Rozynek, B., Spring, O. (2000): Pathotypes of sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia* **23**(32), 27–34.
- Salgado-Salazar, C., Creswell, T.C., Ruhl, G., Crouch, J. A. (2019): First Report of *Plasmopara halstedii* on *Coreopsis grandiflora* in the United States. *Plant disease* **103** (4), 775-776.
- Sedlářová, M., Luhová, L., Petřivalský, M., Lebeda, A. (2007a). Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca spp.* *Plant Physiology and Biochemistry* **45**, 607–616.
- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013): Distribution and Harmfulness of *Plasmopara halstedii* on Sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **49**(1), 1-10.
- Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic-short communication. *Plant Protection Science* **52**(3), 182-187.
- Smith, D. (1983): A two stage centrifugal freeze drying method for the preservation of fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **80**, 333–337.
- Smith, D., Ryan, M. J., Day, J. G. (2001): The UK national culture collection (UKNCC) Biological Resource: Properties, Maintenance and Management. United Kingdom national culture collection, 72-86.
- Spring, O. (2000): Homothallic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. *Helia* **32**, 19–26.
- Spring, O. and Zipper, R. (2000): Isolation of oospores of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, and microscopical studies on oospore germination. *Journal of Phytopathology* **148**, 227–231.
- Spring, O. (2009): Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* – An underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecology*, **2**(2), 75-80.
- Spring O., Zipper R. (2018): New highly aggressive pathotype 354 of *Plasmopara halstedii* in German sunflower fields. *Plant Protection Science* **54**, 83–86.
- Spring, O., Gomez-Zeledon, J., Hadziabdic, D., Trigiano, R.N., Thines, M., Lebeda, A. (2019): Biological Characteristics and Assessment of Virulence Diversity in Pathosystems of Economically Important Biotrophic Oomycetes. *Critical review in plant sciences*. Vol. 37(6), 439-495

- Su, H., van Bruggen, A. H. C., Subbarao, K. V., Scherm, H. (2004): Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions. *Phytopathology* **94**, 396-401.
- Thines, M., Spring, O. (2005): A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). *Mycotaxon* **92**, 443-458.
- Thines, M. (2007): Evaluation of characters available from herbarium vouchers for the phylogeny of the downy mildew genera (Chromista, Peronosporales), with focus on scanning electron microscopy. *Mycotaxon*, 195-218.
- Thines, M., Runge, F., Telle, S., Voglmayr, H. (2010): Phylogenetic investigations in the downy mildew genus *Bremia* reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. *Eur J Plant Pathol* **128**, 81-89.
- Thines, M. (2014): Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *Eur J Plant Pathol* **138**, 431–447.
- Tör, M. (2008): Tapping into molecular conversation between oomycete plant pathogens and their hosts. *Eur J Plant Pathol* **122**, 57–69.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Gulya, T., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K., Virányi, F. (2000): New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference*. Toulouse, France: International Sunflower Association, vol. 1, 6-61.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D. *et. al.*, 2012: Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference*. Mar del Plata, vol. 1. Argentina 322–327.
- Trojanová, Z., Sedlářová, M., Gulya, T. J., Lebeda, A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower – a review. *Plant pathology* **66**, 171–185.
- Virányi, F. (2008): Research progress in sunflower diseases and their management. In: *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference*. Cordoba, Spain: International Sunflower Association, **1**, 1–12.
- Virányi, F., Spring, O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology* **129**(2), 207-220.
- Virányi, F., Gulya, T. J., Tourvieille de Labrouhe. (2015): Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew) populations from different continents. *Helia* **38**(63), 149-162.
- Voglmayr, H. (2003): Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycol Res*, **10**, 1132-1142.
- Voglmayr, H., Riethmuller, A., Goker, M., Weiss, M., Oberwinkler, F. (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycol Res*, **9**, 1011-1024.

- Voglmayr, H., Constantinescu, O. (2008): Revision and reclassification of three *Plasmopara* species based on morphological and molecular phylogenetic data. *Mycological Research*, Vol. 112, (5), 487-501.
- Voglmayr, H. (2008): Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *Eur J Plant Pathol* **122**, 3–18.
- Wehtje, G., Zimmer, D.E. (1978): Downy mildew of sunflower: biology of systemic infection and the nature of resistance. *Phytopathology* **68**, 1568-1571.
- Wu, B. M., Subbarao, K. V., van Bruggen, A. H. C. (2000): Factors affecting the survival of *Bremia lactucae* sporangia deposited on lettuce leaves. *Phytopathology* **90**, 827-833.
- Zimmer, D. E. (1974): Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology* **64**, 1465–1467.

13. Seznam příloh

Příloha 1	Tabulka P1
Příloha 2	Protokoly hodnocení <i>Plasmopara halstedii</i>
Příloha 3	Protokoly hodnocení <i>Bremia lactucae</i>
Příloha 4	Didaktická hra v PowerPoint (pouze na CD)