

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Rezistence genových zdrojů *Cucumis* spp. a *Cucurbita* spp.
vůči patotypům *Pseudoperonospora cubensis***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jana Roháčková
Studijní program:	N1101 Matematika
Studijní obory:	Učitelství matematiky pro střední školy Učitelství biologie pro střední školy
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Termín odevzdání práce:	9. května 2014

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

V Olomouci dne

.....

Bc. Jana Roháčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala především panu Prof. Ing. Aleši Lebedovi, DrSc. za čas, ochotu a příkladné vedení během doby výzkumu a tvorby této diplomové práce.

Dále děkuji paní Drahomíře Vondrákové, která mne naučila všechno potřebné k mé práci v laboratoři i ve skleníku a ujala se náročného úkolu dohlížet nad mým testováním. Spolu s ní patří dík také paní Věře Zoubkové za péči o pokusné rostliny a všem členům fytopatologické laboratoře Katedry botaniky za dobré rady, ochotnou pomoc a příjemnou spolupráci.

Studie vznikla za finanční podpory MŠMT na specifický vysokoškolský výzkum jako součást následujících grantových projektů PrF_2010_001, PrF_2011_003, PrF_2012_001, PrF_2013_003 a IGA_PrF_2014001.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Jana Roháčková
Název práce:	Rezistence genových zdrojů <i>Cucumis</i> spp. a <i>Cucurbita</i> spp. vůči patotypům <i>Pseudoperonospora cubensis</i>
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice
Vedoucí práce:	Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
Rok obhajoby práce:	2014

ABSTRAKT

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

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

V návaznosti na toto testování byl proveden screening 22 genotypů *Cucumis melo* na odolnost vůči 8 izolátům *P. cubensis*. Díky převaze náchylných reakcí vzorků *C. melo* nebyly objeveny nové zdroje rezistence, rasová specifčnost interakce *C. melo* a *P. cubensis* však byla evidentní.

Výsledky této diplomové práce poskytují nové informace o vztahu hostitele a patogenu, které jsou použitelné v dalším výzkumu.

Klíčová slova:	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> , rod <i>Cucumis</i> a <i>Cucurbita</i> , interakce hostitele a patogenu, zdroje rezistence, šlechtění na rezistenci
Počet stran:	100
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname: Bc. Jana Roháčková
Title: Resistance of *Cucumis* spp. and *Cucurbita* spp. germplasm against pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis*
Type of thesis: Master thesis
Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc - Holice
Supervisor: Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc.
The year of presentation: 2014

ABSTRACT

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

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

Subsequently, 22 *Cucumis melo* genotypes were screened for resistance against 8 isolates of *P. cubensis*. Because of dominance of susceptible reactions of *C. melo* accessions, new sources of resistance wasn't found, but the race specificity of *C. melo* - *P. cubensis* interaction was evident.

The results of this master thesis provide new pieces of knowledge about host-pathogen relationship that are useful for further research.

Keywords: *Pseudoperonospora cubensis*, genus *Cucumis* and *Cucurbita*, host-pathogen interaction, sources of resistance, breeding for resistance
Number of pages: 100
Number of appendices: 1
Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1 Rod <i>Cucumis</i> a <i>Cucurbita</i>	10
3.1.1 Význam a charakteristika čeledi Cucurbitaceae	10
3.1.2 Taxonomie a biologie Cucurbitaceae	12
3.1.3 Taxonomie a biologie rodu <i>Cucumis</i>	16
3.1.4 Taxonomie a biologie rodu <i>Cucurbita</i>	18
3.1.5 Genofondy a genetická diverzita planých a pěstovaných druhů <i>Cucurbita</i> spp.	21
3.1.6 Genetická diverzita druhu <i>Cucumis melo</i>	23
3.2 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	26
3.2.1 Systematické zařazení druhu a fylogenetické vztahy uvnitř i vně rodu <i>Pseudoperonospora</i>	26
3.2.2 Parazitismus a příznaky napadení	28
3.2.3 Charakteristika a ekologie životního cyklu patogenu	30
3.2.4 Hostitelský okruh <i>P. cubensis</i>	32
3.2.5 Rozšíření <i>P. cubensis</i> ve světě, v Evropě a na území České republiky	33
3.3 Interakce hostitele (Cucurbitaceae) a patogenu (<i>P. cubensis</i>)	34
3.3.1 Variabilita patogenity <i>P. cubensis</i>	34
3.3.2 Variabilita <i>Cucurbita</i> spp. v interakci s <i>P. cubensis</i>	35
3.3.3 Variabilita druhu <i>Cucumis melo</i> v interakci s <i>P. cubensis</i>	36
3.3.4 Genetické, buněčné a molekulární aspekty interakce	37
3.3.4 Využití genových zdrojů <i>Cucurbita</i> spp. a <i>Cucumis melo</i> ve šlechtění na rezistenci	37
4. MATERIÁL A METODY	39
4.1 Rostlinný materiál	39
4.1.1 Soubor testovaných genotypů <i>Cucurbita</i> spp.	39
4.1.2 Soubor testovaných genotypů <i>Cucumis melo</i>	42
4.2 Izoláty <i>P. cubensis</i>	44
4.3 Příprava inokula, inokulace a inkubace	46

4.4 Metody hodnocení rezistence	47
4.5 Metody statistického zpracování dat.....	47
5. VÝSLEDKY	49
5.1 Výsledky testování interakce <i>Cucurbita</i> spp. – <i>P. cubensis</i>	49
5.1.1 Reakce genotypů <i>Cucurbita</i> spp. po inokulaci <i>P. cubensis</i>	49
5.1.2 Virulence izolátů <i>P. cubensis</i>	77
5.2 Výsledky testování interakce <i>Cucumis melo</i> – <i>P. cubensis</i>	78
5.2.1 Reakce genotypů <i>Cucumis melo</i> po inokulaci <i>P. cubensis</i>	78
5.2.2 Virulence izolátů <i>P. cubensis</i>	85
6. DISKUZE	86
6.1 Rezistence a náchylnost druhů <i>Cucurbita</i> spp. vůči <i>P. cubensis</i>	86
6.2 Rezistence a náchylnost druhu <i>Cucumis melo</i> vůči <i>P. cubensis</i>	87
6.3 Virulence izolátů <i>P. cubensis</i>	88
7. ZÁVĚR	90
8. LITERATURA	91
9. PŘÍLOHA.....	99

1. ÚVOD

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

Výsledky tohoto výzkumu, ale i dostupná konkrétní ochranná opatření, však dosud stále nestačí ke zcela úspěšnému boji s plísní a jejím šířením. Současné snahy se díky detailnějšímu a souhrnnějšímu poznání vlastností patogenu, hostitele a jejich vzájemné interakce mj. zaměřují na vyšlechtění nových odolných odrůd kulturních plodin (tzv. šlechtění na rezistenci) (Lebeda a Cohen, 2011) a tím na možnost snížení používaných dávek fungicidů (Call et al., 2013; Lebeda et al., 2007a). Geny rezistence vůči určitým patotypům (případně rasám) *P. cubensis*, využitelné v tomto šlechtění, jsou mj. známy u některých zástupců rodu *Cucumis*, především u druhu *Cucumis melo*, a rodu *Cucurbita* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Widrlechner, 2003).

Tento ekonomicky významný rod tykvovitých rostlin, pocházející z oblastí amerického kontinentu, vykazuje celkově velkou rozmanitost (Lebeda et al., 2007b). Rovněž interakce jednotlivých zástupců s *P. cubensis* je značně variabilní (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2004) a poskytuje předpoklad nalezení nových a zajímavých zdrojů rezistence. Totéž platí o variabilním druhu *Cucumis melo*, jehož odpověď na napadení *P. cubensis* je vysoce specifická a vzhledem k obecné důležitosti tohoto druhu podrobně zkoumána (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda et al., 2007a).

Z důvodu nedostatku dat o zdrojích rezistence v rámci rodu *Cucurbita* (Lebeda a Cohen, 2011) a nalezení nových zdrojů u druhu *Cucumis melo*, byly ve fytopatologické laboratoři Katedry botaniky PřF UP v Olomouci studovány reakce genových zdrojů planě rostoucích populací *Cucurbita* spp. (2001) a populací *Cucumis melo* (2012-2013) vůči různým patotypům *P. cubensis*. Analýza dat získaných z těchto testů rezistence navazuje na bakalářskou práci (Roháčková, 2012) a na publikaci Lebedy a Widrlechnera (2004).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo podrobnější studium a zpracování odborné literatury se zaměřením na biologii *Pseudoperonospora cubensis*, taxonomii a biologii rodů *Cucumis* a *Cucurbita* a variabilitu vzájemné interakce *Cucumis* spp./*Cucurbita* spp. a *P. cubensis* v návaznosti na předchozí bakalářskou práci (Roháčková, 2012).

Experimentální část zahrnovala screening vybraných genových zdrojů *Cucumis* spp. na odolnost vůči *P. cubensis*, zpracování výchozích dat testů rezistence *Cucumis* spp. a *Cucurbita* spp. vůči *P. cubensis*, detailní vyhodnocení získaných výsledků a jejich interpretaci.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Cucumis* a *Cucurbita*

3.1.1 Význam a charakteristika čeledi Cucurbitaceae

Čeď Cucurbitaceae (tykvovité) představuje pro lidstvo velmi významnou skupinu krytosemenných rostlin, a to jak z hlediska botanického, tak také ekonomického, kulturního a lékařského (Lebeda et al., 2007b). Tato důležitost je jí přikládána díky dnes téměř celosvětovému rozšíření, široké variabilitě, ale především díky rozsáhlému pěstování a šlechtění mnoha druhů, které se staly jedněmi z nejvýznamnějších plodin vůbec (Esteras et al., 2012b; Lebeda et al., 2011). Jejich charakteristickým znakem a ve většině případů stěžejní příčinou pěstování jsou plody rozmanitých tvarů, velikostí a zbarvení, které lidem slouží k obživě ve zralém, ale mnohdy i nezralém stavu (jedlá dužnina mnoha druhů) a k výrobě různých ozdobných i užitkových nádob, hudebních nástrojů, či dokonce mycích hub (rod *Luffa*) (Lebeda et al., 2007b; Paris et al., 2012). Jak uvádí Lebeda et al. (2007b), využití tykvovitých rostlin významně zasahuje také do oblastí tradiční medicíny (viz např. Shrivastava a Roy, 2013) a farmaceutického průmyslu. Obsah léčivých i toxických látek v různých částech rostlin planých i pěstovaných zástupců této čeledi (především v plodech, semenech a listech) je předmětem výzkumů, které reprezentuje například studie Edeogy et al. (2010) založená na screeningu čtyř planých druhů tykvovitých z oblasti jihovýchodní Nigérie za účelem určení jejich farmaceutického a terapeutického potenciálu.

Čeď Cucurbitaceae, s rozšířením převážně v tropech a subtropích, obecně zahrnuje jednoleté i vytrvalé byliny, jednodomé (běžnější) i dvoudomé, polokeře, několik druhů keřů a vzácných sukulentních stromů (Chrtková, 1990; Lebeda et al., 2007b). Jedná se často o rostliny s popínavými nebo plazivými lodyhami, jejichž úponky, pokud jsou přítomny, vyrůstají v paždí listů a mohou být i vícenásobně větvené (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Na stonku střídavě postavené řapíkaté listy (bez palistů) mají celistvý tvar nebo jsou členěné v úkrojky (Chrtková, 1990). Velikost úkrojků, celková velikost, textura, tvar a orientace listů představují důležité determinační znaky v rámci jednotlivých rodů tykvovitých (Lebeda et al., 2007b). Listy často obsahují extraflorní nektaria a ve struktuře jejich buněk můžeme nalézt fytolity (Lebeda et al., 2007b; Watson a Dallwitz, 1992). Zpravidla jednopohlavné, aktinomorfní květy zvonkovitého až nálevkovitého tvaru, jenž vzniká srůstem většinou 5-6 kališních a stejného počtu korunních lístků, se na

stoncích vytvářejí jednotlivě, případně v květenstvích (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Morfologické charakteristiky květu nepředstavují spolehlivé rozlišovací znaky uvnitř rodu, oproti tomu mezi různými rody jsou rozdíly v morfologii květu nápadné (Lebeda et al., 2007b). Opylení se děje prostřednictvím blanokřídlého hmyzu, nejčastěji různých druhů včel (Wehner a Maynard, 2003). Plodem tykvovitých je nejčastěji dužnatá, masitá bobule, dorůstající běžně velkých rozměrů, jak to známe i z našeho domácího pěstitelství (Chrtková, 1990; Smejkal, 1992). Neméně významné jsou však i vysychavé bobule se silnou kůrou a plody nabývající různých extrémních tvarů, velikostí a barev. Relativně velká semena všech zástupců neobsahují endosperm, zásobní látky pro vývoj embrya jsou proto obsaženy ve dvou větších dělohách (Lebeda et al., 2007b; Watson a Dallwitz, 1992). Morfologie povrchu semen je rovněž důležitým diagnostickým znakem na úrovni mezidruhové i mezidruhové (Esteras et al., 2012b).

Pěstované druhy čeledi Cucurbitaceae jsou schopny adaptace na velmi rozdílné pěstitelské podmínky prostředí (Lebeda et al., 2007b). Mezi plodiny s globálním ekonomickým významem řadíme zástupce rodů *Cucumis* (okurka setá, meloun cukrový), *Cucurbita* (tykve – dýně, cuketa) a *Citrullus* (meloun vodní) (Esteras et al., 2012b; Lebeda et al., 2007b). Produkce těchto kulturních rostlin na počátku nového tisíciletí zaznamenala výrazný vzestup a každým rokem vzrůstá (viz Tab. 3.1). V současné době jí s velkou převahou vévodí Čína, k níž se přidávají další asijské státy jako je Indie, Írán a Turecko. Velkými producenty tykvovitých jsou rovněž Spojené státy americké a Egypt (Lebeda et al., 2007b; FAO, 2014). Tato fakta nasvědčují tomu, že čeleď Cucurbitaceae je právem řazena mezi nejvýznamnější rostlinné čeledi světové ekonomiky.

Tab. 3.1 Růst světové produkce vodních melounů, okurek, melounů (cukrových) a tykví v rozmezí let 1997 – 2012 (v tunách).

Roční světová produkce (t)						
Plodina	1997	2000	2003	2006	2009	2012
vodní melouny	59 247 551	76 546 402	87 521 337	94 539 927	98 737 055	105 372 341
okurky	27 093 284	38 216 332	43 725 595	50 079 774	60 882 411	65 134 078
melouny	16 057 243	19 466 509	24 745 276	27 821 359	26 429 872	31 925 787
tykve	15 537 127	17 795 863	20 491 053	21 013 849	22 440 270	24 616 115

Zdroj dat: FAO (2014): *FAOSTAT Agricultural Database*, <http://faostat3.fao.org>.

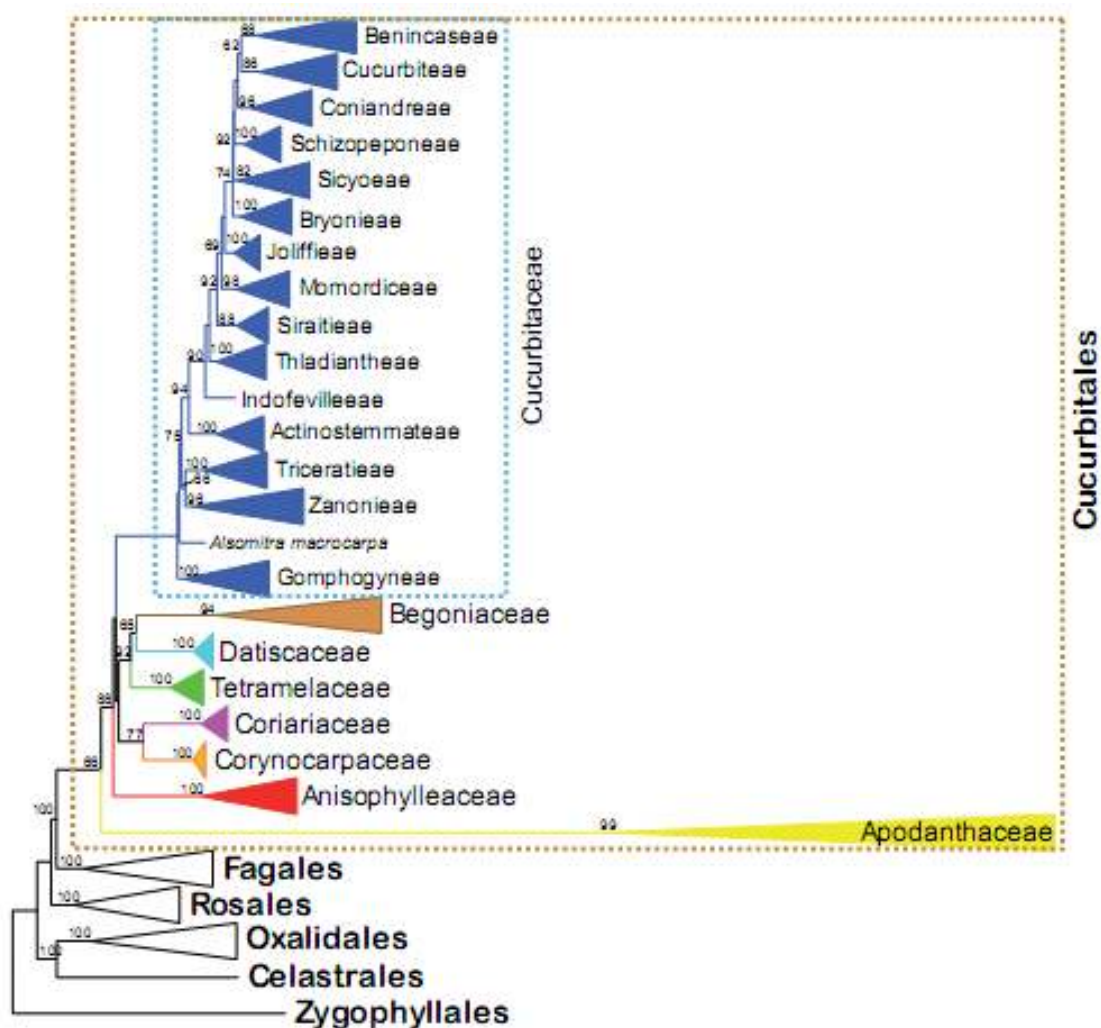
3.1.2 Taxonomie a biologie Cucurbitaceae

Současné výzkumy fylogenetické příbuznosti na molekulární úrovni přinášejí stále nové poznatky a s nimi spojené změny uspořádání jednotlivých taxonomických skupin v systému, což se významně dotýká také zkoumané čeledi Cucurbitaceae. Lebeda et al. (2007b) udává, že tykvovitě představují, od jiných geneticky příbuzných čeledí, izolovanou čeleď s vlastním monotypním řádem Cucurbitales a za jejich možné příbuzné jsou považováni členové čeledí Begoniaceae a Datisceae z řádu Begoniales. O významné separaci Cucurbitaceae od jiných čeledí se zmiňují také Wehner a Maynard (2003).

Podle nedávno získaných výsledků DNA analýz navrhuje Schaefer a Renner (2011) sdružit do řádu Cucurbitales celkem osm čeledí: co do počtu druhů největší Begoniaceae, pak Cucurbitaceae a 6 dalších menších čeledí, které byly dříve řazeny v různých méně příbuzných řádech. Ve fylogenezi řádu (viz Obr. 1) se podle těchto analýz první oddělila čeleď Apodanthaceae, pak postupně Anisophylleaceae a Cucurbitaceae, která představuje sesterskou skupinu k rozvětveným skupinám Coriariaceae a Corynocarpaceae, a Tetramelaceae, (Datisceae, Begoniaceae).

Z DNA analýz provedených o šest let dříve za spolupráce amerických a německých vědců (Zhang et al., 2006), jejichž cílem bylo odhalit příbuzenské vztahy taxonů uvnitř řádu, v mnoha aspektech vplynuly stejné závěry s výše zmíněným výzkumem. Na rozdíl od Schaefera a Renner (2011) však Zhang et al. (2006) považuje čeleď Cucurbitaceae za bližší příbuznou k větvi Tetramelaceae (Datisceae, Begoniaceae), než ke kladu Coriariaceae a Corynocarpaceae, malou čeleď Apodanthaceae vůbec nevyděljuje. Na základě této předpokládané taxonomie řádu a porovnání fenotypových znaků zástupců jednotlivých skupin byla postulována hypotéza evoluce morfologie daných znaků, souvisejících především se způsobem rozmnožování (viz Obr. 2).

Díky nejnověji publikovaným molekulárním datům a srovnání morfologických znaků došlo k jednomu z možných přeorganizování klasifikace Cucurbitaceae vymezením 95 rodů o 950-980 druzích (Schaefer a Renner, 2011). Přitom ještě v nedávné době se údaje o počtu taxonů pohybovaly okolo 118 rodů s 825 (Lebeda et al., 2007b), případně s 800 druhy (Zhang et al., 2006). Takto rozmanitou skupinu rostlin pocházející z Ameriky, Afriky a především z Asie i dnes tvoří převážně zástupci z tropických a subtropických oblastí těchto kontinentů (Lebeda et al., 2007b, 2011; Schaefer a Renner, 2011). Rozšíření planých druhů v temperátní zóně je vzácné, např. v Evropě jsou původní pouze dva rody: *Ecballium* (tykvice) a *Bryonia* (posed) (Chrtková, 1990).



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

Při zvažování příbuznosti rodů a kmenů čeledi Cucurbitaceae na základě anatomie a morfologie se taxonomové zaměřují především na zkoumání úponků a generativních orgánů, u nich pak konkrétně na srovnávání morfologie andrecea a gynecea, struktury pylových zrn a osemení (Chauhan a Pandey, 2012; Esteras et al., 2012b). Dle členění navrženého C. Jeffreyem (Jeffrey, 1990) existují dvě podčeledi tykvovitých o velmi odlišných parametrech. Zatímco podčeď Zanonioideae, označovaná dnes spíše jako Nhandiroboideae (Chauhan a Pandey, 2012; Esteras et al., 2012b), která je charakteristická malými žlábkovanými pylovými zrny, zahrnuje pouze 18 nepříliš významných rodů, do druhé podčeledi Cucurbitoideae řadíme okolo 100 rodů, mezi něž patří i ty nejpočetnější a nejvýznamnější. Jejich pylová zrna na povrchu žlábků nemají a čnělky samičích květů srůstají v jeden střední sloupek (Lebeda et al., 2007b). Pro taxonomii Cucurbitaceae jsou mimo analýzy morfologických znaků důležité také biochemické charakteristiky – schopnost rostlin produkovat toxické cucurbitaciny, způsobující hořkost rostlinných částí (Kirkbride, 1993), data z výzkumů na cytologické a především molekulární úrovni (analýzy struktury DNA, proteinů), schopnost vzájemného křížení taxonů a jejich koevoluce s opylovači a patogeny (Lebeda et al., 2007b). Molekulární studie v této oblasti nejsou záležitostí jen několika posledních let, jak potvrzují například výzkumy velikosti mitochondriálního genomu tykvovitých (Ward et al., 1981) nebo struktury proteinů semen (Pasha a Sen, 1991). Využitím současných možností sekvenčních analýz DNA byla zjištěna možná parafylie podčeledi Nhandiroboideae (Chauhan a Pandey, 2012), v podčeledi Cucurbitoideae byly rozlišeny tři hlavní vývojové větve s pomocí ITS oblasti jaderné rDNA u 18 druhů této podčeledi (Ali et al., 2009).

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

Pokud jde o taxonomické vztahy v rámci ekonomicky nejvýznamnějších rodů, pak se v tomto odstavci zaměříme na stručnou charakteristiku rodu *Citrullus*; taxonomii rodů *Cucumis* a *Cucurbita* jsou věnovány následující podkapitoly. Všechny druhy starobylého rodu *Citrullus* pocházejí z teplých oblastí Starého světa, hlavně z afrických tropů a pouští. Byly rozlišeny čtyři druhy, z nichž více rozšířené jsou dva: *C. lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai (lubenice obecná) a *C. colocystis* (L.) Schrad. (kolokvinta obecná). *Citrullus*

lanatus, známý jako vodní meloun, se hojně pěstuje na jihu Ruska a celého asijského kontinentu, především pak v Číně (Lebeda et al., 2007b). Ze všech tykvovitých dlouhodobě dosahuje největší roční produkce (FAO, 2014) a je řazen mezi třicet nejvýznamnějších rostlinných druhů sloužících lidské obživě (Lebeda et al., 2007b). Přestože je dnes pěstován téměř po celém světě, jeho zdomácnění stále zůstává záhadou stejně jako úplná klasifikace jeho forem. Zvažujeme-li další členění podčeledi Cucurbitoideae, bývá rod *Citrullus* zařazován do kmene *Benincaseae* se známými rody *Cucumis*, *Benincasa* a *Lagenaria* (Esteras et al., 2012b).

Kromě výše uvedených rodů čeledi Cucurbitaceae, většího hospodářského významu dosahují rody *Luffa*, *Sechium* a *Momordica* (Lebeda et al., 2007b). Oblast původu rodu *Sechium* je přibližně v oblasti dnešní Guatemaly a Mexika, dva zbývající rody pocházejí z tropických oblastí Indie a jihovýchodní Asie (Wehner a Maynard, 2003).

3.1.3 Taxonomie a biologie rodu *Cucumis*

Známý rod *Cucumis* zahrnuje několik desítek planých druhů (již Kirkbride (1993) rozlišuje 30 druhů, Sebastian et al. (2010) uvádí přibližný počet 66 druhů), převážně z pouštních a polopouštních oblastí Afriky a dva druhy běžně pěstované v mnoha oblastech světa, *C. sativus* L. (okurka setá) a *C. melo* L. (meloun cukrový), jež mají pravděpodobně asijské předky (Lebeda a Cohen, 2011; Sebastian et al., 2010). Kromě těchto dvou pěstovaných druhů jsou další dva plané druhy (*C. anguria* L. a *C. metuliferus* E. Meyer ex Naudin) využívány k získávání plodů (Lebeda et al., 2007b).

Vnitřní dělení rodu do dvou hlavních skupin, podrodů *Cucumis* a *Melo* (Kirkbride, 1993), lišících se geneticky, morfologicky i oblastmi přirozeného výskytu, je všeobecně přijímáno (Lebeda et al., 2007b). Podrod *Cucumis* (indočínského původu) tvoří pouze dva druhy: *C. sativus* a *C. hystrix* Chakr., zatímco podrod *Melo* (převážně afrického původu a výskytu) je taxonomicky složitý s velkou druhovou diverzitou (Kirkbride, 1993; Lebeda et al., 2007b; Renner et al., 2007). Některými autory bývá vymezován dokonce samostatný rod *Melo* (Lebeda et al., 2007b), avšak předpokládá se určitá propojenost evoluce a tedy blízká příbuznost obou zmiňovaných skupin, jak je determinuje Kirkbride; konkrétně *C. melo* (podrod *Melo*) je v kladogramu rodu sestaveného na základě kombinace sekvencí plastidové a jaderné DNA (Sebastian et al., 2010) řazen blíže skupině *C. sativus*, *C. hystrix* než většině zástupců podrodu *Melo*. Vzhledem k neustálým změnám v systému rodu je však docela možné, že by v budoucnosti mohlo dojít k vydělení rodu *Melo*, ovšem je

otázkou, které druhy by do něj patřily. Pro zkoumání evoluce rodu i celé čeledi se jako zajímavý nástroj jeví současné rozsáhlé studie genomů *C. sativus* (Huang et al., 2009) a *C. melo* (Garcia-Mas et al., 2012) a jejich srovnávání.

Místo původu a prvního pěstování okurky seté (*C. sativus*) je téměř jednoznačně situováno do podhůří Himalájí v Indii, kde leží areál výskytu planě rostoucího druhu *C. sativus* L. var. *hardwickii* (Royle) Alef., jejího pravděpodobného předchůdce, a nedaleko i areál sesterského druhu *C. hystrix* (Lebeda et al., 2007b; Sebastian et al., 2010; Wehner a Maynard, 2003). Nedostatečně klasifikovatelné fosilní nálezy semen však znemožňují bližší určení oblastí domestikace okurek a cest šíření tohoto druhu (Sebastian et al., 2010). Z historických záznamů však víme, že na našem území byly okurky pěstovány již v 9. století (Lebeda et al., 2007b).

Na rozdíl od *C. sativus* primární centrum původu dalšího ekonomicky významného zástupce tykvovitých, *C. melo* (melounu cukrového, obecně melounu), zůstává stále záhadou (Lebeda et al., 2007b; Leppik, 1966), ke které se váže velké množství současných i minulých názorů a hypotéz (viz Sebastian et al., 2010). Poněvadž jsou teplé a suché oblasti Afriky místem největší diverzity a pravděpodobně primárním genovým centrem rodu *Cucumis* (Kirkbride, 1993; Křístková et al., 2003; Leppik, 1996), domnívali se vědci, že také druh *C. melo* pochází z afrického kontinentu (Wehner a Maynard, 2003). Odkazovali se při tom mj. na identický počet chromozómů *C. melo* a planých afrických druhů ($2n = 24$). V současnosti se spíše přiklánějí k variantě asijského původu pěstovaného melounu na základě jeho blízké příbuznosti s druhy rodu *Cucumis* volně rostoucích v jižní Asii, severní Austrálii a přilehlých ostrovech (Renner et al., 2007; Sebastian et al., 2010), kterou poodhalily také analýzy částí genomu 100 vzorků afrických, asijských a australských taxonů *Cucumis* spp., jež uveřejnila Sebastian et al. (2010). Další možností je jisté propojení obou hypotéz v předpokladu rozdílného původu komerčně významných skupin odrůd *C. melo* - skupiny *Inodorus* a *Cantalupensis* na Blízkém východě (mohlo by jít o rozšíření z Afriky) a skupiny *Conomon* v Indii (Lebeda et al., 2007b). Zběžnou klasifikací kultivarů a krajových odrůd melounu cukrového se budeme zabývat v kapitole o jeho genetické diverzitě. Základní informace o české kolekci genových zdrojů *Cucumis* spp., jež zahrnuje plané i pěstované taxony, s morfologickým popisem jednotlivých položek a jejich třídění do skupin předkládá Křístková et al. (2003).

3.1.4 Taxonomie a biologie rodu *Cucurbita*

Rod *Cucurbita*, řadící se mezi nejvýznačnější rody čeledi tykvovitých, je dnes chápán jako skupina pouze 12 až 15 druhů, Sanjur et al. (2002) uvádí 12-14 druhů, které pocházejí z oblastí Nového světa, širokého pásma od USA po Argentinu (viz Tab. 3.2) (Lebeda et al., 2007b). Ačkoliv byly do Evropy některé druhy dovezeny již krátce po prvním osídlení amerického kontinentu, k první domestikaci pěti dnes hojně pěstovaných druhů došlo ještě před příchodem Evropanů tamějšími domorodými obyvateli, pro které byly zdrojem obživy jako jedny z prvních pěstovaných rostlin na tomto území (Lebeda et al., 2007b; Sanjur et al., 2002). Tento rod, se základním chromozómovým číslem $2n = 40$, nevykazuje blízkou příbuznost s jinými rody čeledi Cucurbitaceae (Lebeda et al., 2007b).

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

Tab. 3.2 Plané a pěstované taxony *Cucurbita* spp. a jejich rozšíření (Lebeda et al., 2007b)

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

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

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

Jednou z důležitých charakteristik čeledi Cucurbitaceae je její velká genetická diverzita, odlišnost typicky alogamních druhů, které ovšem tolerují určitý stupeň inbreedingu, důležitého pro selekci genů (forem) odolných k působení abiotických a biotických faktorů prostředí. Plané druhy slouží jako zdroj těchto genů díky nutnosti stále se adaptovat a vyvíjet nové strategie přežití a úspěchu (Chloupek, 2008). Tímto směrem se také ubírají snahy o vyšlechtění vysoce odolných plodin se zvýšenou produkcí a kvalitou plodů (Lebeda et al., 2007b). Neobyčejnou rozmanitost čeledi potvrzuje i vysoké procento (téměř 80 %) rodů s málo (maximálně 8) druhy (Chauhan a Pandey, 2012).

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

Jak již bylo uvedeno, za potomky linie mezofytních druhů je považováno i pět pěstovaných druhů rodu, které se však obvykle za běžných podmínek vzájemně nekříží. Jejich genofondy jsou charakterizovány genovými pooly, které zahrnují určité druhy rostlin z hlediska využití jejich genetického potenciálu ve šlechtění daných kulturních plodin (Chloupek, 2008). Primární genové pooly pěstovaných druhů *Cucurbita* spp. jsou tvořeny pouze jejich krajovými odrůdami a kultivary (šlechtěné odrůdy), tzn. že ke zcela úspěšnému křížení dochází jen v rámci druhu. Experimentálně vzniklí kříženci příslušníků rozdílných druhů bývají často neplodní nebo je jejich plodnost omezená (Lebeda et al., 2007b). Nejširší kompatibilitu křížení vykazuje *C. moschata*, ale také další zdomácnělé druhy *C. argyrosperma*, *C. pepo* a *C. maxima* mohou být kříženy se svými planě rostoucími příbuznými, což představuje významný zdroj variability uvnitř populací, jak uvádí Lebeda et al. (2007b). Dále pojednává o sekundárních genových poolech pěstovaných druhů (tj. populace se mohou křížit, často to však bývá spojeno se snížením fertility potomků) na základě výsledků hybridizačních pokusů a polního pozorování. Velmi dobrá slučitelnost byla pozorována mezi populacemi vývojově blízkých druhů *C. moschata* a *C. argyrosperma*. U tykve obrovské (*C. maxima*) sekundární genový pool reprezentuje planý druh *C. ecuadorensis*. Oproti těmto druhům vykazuje *C. ficifolia* velmi nízkou schopnost spontánního křížení s jinými druhy, vymezení jeho genových poolů je proto problematické podobně jako u posledního zdomácnělého druhu *C. pepo*. Ačkoliv má tento

významný druh, díky své obrovské diverzitě, velmi rozmanitý primární genový pool (patří do něj spousta jeho kultivarů, krajových odrůd, planých taxonů), není jím uchráněn před extrémní náchylností k nejdůležitějším virovým chorobám, které napadají pěstované druhy *Cucurbita* (Lebeda et al., 2007b). Terciární genové pooly daných druhů obsahují již mnohem širší škálu planých i pěstovaných druhů v rámci rodu, neboť do nich spadají všechny taxony schopné se s plodinou křížit za uměle navozených podmínek a postupů, většinou však na úkor plodnosti a životaschopnosti potomků (Chloupek, 2008; Lebeda et al., 2007b). Populace vzniklá mezidruhovým křížením *C. pepo* a *C. moschata* byla příkladně využita při tvorbě genetických map *C. pepo* (Esteras et al., 2012a).

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

Nejhojněji pěstované druhy *C. pepo*, *C. moschata* a *C. maxima* mají větší diverzitu na molekulární i morfologické úrovni, tvoří více krajových odrůd a kultivarů než zbývající dva druhy. Vysoký stupeň polymorfismu a genetické rozmanitosti zaznamenáváme především u *C. moschata*, jejíž odrůdy nacházíme na stanovištích s velmi rozdílnými ekologickými podmínkami a mezi některými kultivary existují podstatné rozdíly v náchylnosti nebo rezistenci vůči některým chorobám. Podobné charakteristiky platí také pro druh *C. maxima* (Lebeda et al., 2007b). Diverzita tohoto druhu byla dobře popsána morfologicky, méně však pomocí molekulárních markerů. Ve Španělsku byla provedena analýza pomocí RAPD a SBAP markerů, zkoumající míru genetické rozdílnosti 19 genofondových vzorků *C. maxima*, s cílem napomoci lepším pěstitelským výsledkům (Ferriol et al., 2003b). Nejvíce různých pozorování a analýz diverzity bylo a stále je uskutečňováno v rámci druhu *C. pepo* (viz např. Ferriol et al., 2003a; Gong et al., 2012; Paris et al., 2012). Jedná se totiž o nejvýznamnější druh rodu *Cucurbita*, jehož dvě hlavní evoluční linie určil r. 1988 Decker na úrovni poddruhů jako subsp. *pepo* a subsp. *ovifera* (Ferriol et al., 2003a; Lebeda et al., 2007b). Dnes se častěji užívá dělení do více poddruhů, přičemž kultivary náleží do subsp. *pepo* a subsp. *texana* (viz Obr. 3) a podle tvaru plodů tvoří 8 morfotypů (Esteras et al., 2012a; Paris et al., 2012). Jak uvádí Paris et al. (2012),

hlavním morfologickým znakem odlišujícím tyto dva taxony je povrch plodů; u subsp. *pepo* (s většími plody) se na něm nacházejí výčnělky, u subsp. *texana* naopak prohlubně, kopírující polohu cévních svazků v pletivu. Jen omezená diverzita je popsána u druhu *C. ficifolia*. Vzhledem k tomu, že je však pěstován v širokém rozmezí podmínek prostředí i kompetice, je možná přítomnost skrytých variant izoenzymů jako předchozí adaptace na podmínky prostředí (Lebeda et al., 2007b).



Obr. 3 Diverzita zralých plodů 32 kultivarů *Cucurbita pepo*: 21 plodů patří zástupcům subsp. *pepo*, 9 subsp. *texana* a zbylé 2 taxonům ležícím mezi těmito poddruhy (malé pruhované tykve v pravém dolním rohu) (Paris et al., 2012).

3.1.6 Genetická diverzita druhu *Cucumis melo*

Řada výzkumů zaměřených na problematiku původu a domestikace *C. melo*, které přinášejí častěji nové hypotézy než potvrzení předchozích poznatků, potvrzuje velkou rozmanitost tohoto kulturního druhu. Jak shrnuje Lebeda a Widrlechner (2003), velká diverzita *C. melo* je pozorována na úrovni morfologické, genetické i molekulární (Stepansky et al., 1999). Genové pooly tohoto druhu nebyly dodnes přesně definovány (Lebeda et al., 2007b), což ukazuje jeho složitou, ale zajímavou pozici v rámci rodu *Cucumis*, popř. podrodu *Melo*.

Do druhu *C. melo* jsou kromě komerčně využívaných typů zahrnovány také taxony plané, zplanělé a plevele (Stepansky et al., 1999). V tomto taxonomickém pojetí druh dělíme do dvou poddruhů: subsp. *agrestis* (zahrnuje spíše plané formy) a supsp. *melo* (obsahuje šlechtěné odrůdy a obchodní kultivary) (Lebeda et al., 2007b, Sensoy et al., 2007). Přibližně od počátku 90. let se v odborné terminologii užívá označení 8 morfotypů melounu jako skupin *Agrestis*, *Flexuosus*, *Conomon*, *Cantalupensis*, *Inodorus*, *Chito*, *Dudaim* a *Momordica* (Lebeda et al., 2007b). Toto rozdělení bylo později přehodnoceno do 16 skupin, představujících odrůdy *C. melo*, z nichž 5 skupin patří do poddruhu subsp. *agrestis* a 11 do subsp. *melo* (López-Sesé et al., 2003). V rámci každé odrůdy pěstované pro obchod lze rozlišit jednu či více tržních tříd (Staub et al., 2000).

Nejvýznamnější odrůdy (a tržní třídy) *C. melo* ve Spojených státech amerických, v Evropě a na Středním Východě jsou *Cantalupensis* (např. *Charentais*, *Shipper*, *Ogen* a *Galia*) a *Inodorus* (*Honeydew* a *Casaba*), jež bývají zařazovány mezi tzv. sladké typy (Staub et al., 2000; Stepansky et al., 1999). Evropská produkce melounů se soustřeďuje ve Španělsku, Itálii, Francii a Řecku (FAO, 2014). Mezi „nesladké typy“ patří indické kultivary *Momordica*, *Agrestis* a *Flexuosus*, jež měly a mají význam především pro tamější kuchyni a léčitelství. Ve východní Asii zaujímá přední místo v produkci specifická odrůda *Conomon* (Lebeda et al., 2007b; Stepansky et al., 1999).

Obdobně jak bylo referováno u druhů *Cucurbita* spp., také studium diverzity a taxonomie *C. melo* je dnes založeno na širokých možnostech aplikací molekulární genetiky (analýzy DNA markerů, izoenzymů či polymorfních proteinů). V detekování polymorfismu i mapování genomu melounu se jako nejúčinnější jeví AFLP markery (Garcia-Mas et al., 2000; Wang et al., 1997). Rozsáhlý výzkum v této oblasti byl realizován ve Španělsku (Garcia-Mas et al., 2000; López-Sesé et al., 2003; Monforte et al., 2008). Některé ze studií ukazují na možnost využití místních genových zdrojů pro rozšíření genetické diverzity komerčních kultivarů melounů: využití španělských krajových odrůd např. pro typ *Casaba* (López-Sesé et al., 2003), dobře křížitelných a vysoce variabilních tureckých genotypů pro významné „sladké typy“ (Sensoy et al., 2007) či středoafrikanických a indických melounů obecně (Monforte et al., 2008).

Největšího významu pak dosahují srovnávací studie využívající jak data molekulární, tak znaky morfologické, fenologické a biochemické (Lebeda et al., 2007b). Bohužel, ne vždy výsledky těchto rozdílných analýz vzájemně korespondují (López-Sesé et al., 2003). Stepansky et al. (1999) uvádí, že i podstatné rozdíly v morfologii mezi odrůdami (viz Obr. 4) mohou být zapříčiněny změnami malého množství genů, které nepostačují k vytvoření

vnitrodruhové klasifikace *C. melo*. Provedená shluková analýza však odhalila jasné oddělení kultivarů *Cantalupensis* a *Inodorus* od „exotických“ odrůd *Conomon*, *Chito*, *Dudaim*, *Agrestis* a *Momordica*. Lze tedy předpokládat jistou souvislost těchto výsledků s dělením druhu do dvou poddruhů (Staub et al., 2000; Stepansky et al., 1999).



Obr. 4 Morfologická diverzita plodů *Cucumis melo* na příkladu 13 vzorků s různými kódy užitých ve studii vnitrodruhové klasifikace (Stepansky et al., 1999). Měřítka ukazují délku v cm.

3.2 *Pseudoperonospora cubensis*

Pseudoperonospora cubensis (Peronosporales, Chromista), způsobující závažnou plísnivou chorobu tykvovitých rostlin, je dnes jedním z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších rostlinných patogenů (Lebeda a Cohen, 2011). Tento obligátní a vysoce specializovaný biotrofní parazit je příčinou nadměrných ztrát ve světové produkci okurek, melounů a tykví (Savory et al., 2011), přičemž napadá rostliny pěstované v polních podmínkách, ale i ve sklenicích či fóliovnících (Colucci a Holmes, 2010). Přes dlouhodobý a v posledních letech velmi intenzivní výzkum tohoto patogenu stále chybí informace z mnoha oblastí zkoumání, detailní poznatky a jejich kompletace k efektivnějším opatřením proti šíření choroby (vyvinutí nových rezistentních forem rostlin a účinných fungicidů) (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

3.2.1 Systematické zařazení druhu a fylogenetické vztahy uvnitř i vně rodu *Pseudoperonospora*

Druh *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostov. poprvé popsal r. 1868 Berkeley na herbářové rostlinné položce pocházející z Kuby (odtud druhové jméno *cubensis*). Byl tak identifikován rovněž nový rod *Pseudoperonospora* Berkeley (Lebeda a Cohen, 2011). K prvnímu určení patogenu na živých rostlinách a k jeho nové klasifikaci na základě schopnosti rozšiřování zoospor (zavedení dnešního označení místo chybného *Peronospora cubensis* Berk. et Curt.) došlo až v roce 1903 ruským botanikem Rostovzevem (Rostovzev, 1903). Před tímto objevem, ale i po něm bylo používáno množství zavádějících synonym označujících plíseň okurkovou, jak uvádí Lebeda a Cohen (2011).

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

Výzkum fylogenetických vztahů uvnitř třídy Peronosporomycetes pomocí úseků jaderné rDNA prokázal provázanost polyfyletických řádů Peronosporales a Pythiales (Riethmüller et al., 2002). Známý rod *Phytophthora*, jež patřil do řádu Pythiales, se v něm ukázal blíže příbuzný zástupcům čeledi Peronosporaceae než rodu *Pythium*, což potvrzují i další analýzy (např. Voglmayr, 2003), a v současnosti je již řazen do řádu Peronosporales.

Do čeledi Peronosporaceae zahrnujeme kromě rodu *Pseudoperonospora* nejméně 16 dalších, z nichž jsou ve vyspělých zemích nejrozšířenější rody *Bremia*, *Peronospora*, *Hyaloperonospora* a *Plasmopara*, jejichž zástupci jsou také původci významných chorob kulturních rostlin. Jednotlivé rody uvnitř čeledi charakterizuje mj. tvar a typ větvení sporangioforů a schopnost produkce a rozšiřování zoospor (Lebeda a Cohen, 2011; Palti a Cohen, 1980). *Pseudoperonospora*, jež za určitých podmínek tvoří zoospory schopné pohybu, pak pro typ dichotomicky větvených sporangioforů se sporangii podobného stáří na koncích sterigmat (Lebeda a Cohen, 2011), představuje jakýsi přechod mezi rodem *Plasmopara*, díky zoosporám podobného vzhledu a vlastností, a rodem *Peronospora*, který sice zoospory netvoří, ale jeho sporangiofory a také haustoria se stavbou nejvíce podobají těm, jež pozorujeme u zástupců rodu *Pseudoperonospora* (Rostovzev, 1903; Voglmayr, 2003). Palti a Cohen (1980) blíže specifikují rozdíly v morfologii a fyziologii sporangií: u rodu *Peronospora* je jejich stěna bez pórů a klíčí pouze přímo hyfou, kdežto sporangia rodu *Pseudoperonospora* jsou pravá s pórovitým apexem (papilum), jímž se uvolňují nepohlavně vzniklé zoospory, které následně klíčí.

Jak bylo potvrzeno moderními molekulárně fylogenetickými přístupy, rod *Pseudoperonospora* představuje v taxonomii monofyletickou skupinu, blíže příbuznou rodu *Peronospora*, který však v současném složení monofyletický není (Riethmüller et al., 2002; Voglmayr, 2003). Savory et al. (2011) do rodu *Pseudoperonospora* na podkladě článku Choie et al. (2005) sdružuje pět druhů: typový druh *P. cubensis*, dále *P. humuli*, *P. cannabina*, *P. urticae* a *P. celtidis* a dále zmiňuje možný šestý druh, zatím jen vzácně se vyskytující, s názvem *P. cassiae*. Oproti této hypotéze Runge et al. (2011) ve studii, v níž odhaluje možné kryptické druhy a netušenou diverzitu tohoto rodu i druhu *P. cubensis*, s určitostí rozlišuje již šest druhů. K prvním čtyřem jmenovaným, z nichž *P. cannabina* představuje bazální druh rodu, přidává další dva, které vznikly rozdělením druhu *P. celtidis* do dvou vývojových linií podle výskytu na různých hostitelích z rodu *Celtis* (břestovec). Nedávné výzkumy příbuznosti uvnitř rodu se soustředily především na složitý vztah *P. cubensis* a *P. humuli*. Jejich velká morfologická i genetická podobnost (v sekvenci ITS rDNA) nasvědčovala, že *P. humuli* by mohla být ekvivalentem *P. cubensis* (Choi et al., 2005). Ovšem, studie M. Mitchella a jeho kolegů z let 2009 - 2011 (Mitchell et al., 2011), odhalují podstatné rozdíly v konkrétních jaderných a mitochondriálních genech, jež potvrzují oddělení obou druhů (Savory et al., 2011). Tento názor je navíc podpořen rozdílnými hostitelskými okruhy a patogenní variabilitou obou druhů. *P. humuli* jako patogen chmelu (Cannabaceae) většinou není schopen infikovat zástupce tykvovitých,

výjimkou mohou být některé plané druhy (Runge a Thines, 2012), a *P. cubensis* působí jen mírné projevy choroby na rostlinách chmelu (Lebeda a Cohen, 2011; Mitchell et al., 2011). Nicméně z herbářových položek chmele japonského (*Humulus japonicus*) byly izolovány vzorky plísní, jež byly označeny za kryptické druhy komplexu *P. cubensis* a nikoli *P. humuli* (Runge et al., 2011); tento poznatek však zatím nebyl dalšími výzkumy podpořen.

Zkoumání vnitrodruhové diverzity *P. cubensis*, již se věnuje mj. Runge et al. (2011), je významné především kvůli variabilitě tohoto organismu jako patogenu tykvovitých (více v kapitole o interakci hostitele a patogenu). K hlubšímu náhledu na variabilitu celého rodu *Pseudoperonospora* je potřeba více komplexního přístupu a experimentálních (především molekulárních) dat (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

3.2.2 Parazitismus a příznaky napadení

Stejně jako u všech ostatních zástupců čeledi Peronosporaceae je životní formou *P. cubensis* obligátní biotrofní parazitismus. Mimo hostitelskou rostlinu může tento druh přežívat jen ve formě odolných pohlavních výtrusů, oospor (Palti a Cohen, 1980). Jako biotrofní parazit netvoří toxiny, ale pouze omezené množství enzymů k počátečnímu proniknutí skrz buněčnou stěnu. Při infikování pletiv rezistentní rostliny nastává často rychlá nekróza napadených částí jako přirozená obrana proti šíření patogenu, u náchylných hostitelů se tatáž reakce dostavuje až v pozdějších fázích napadení (Lebeda a Cohen, 2011), zatímco v počátečním stadiu může patogen dočasně stimulovat růst buněk (Lebeda a Schwinn, 1994).

Pro *P. cubensis* je typická vysoká specializace parazitismu, protože napadá výhradně listy tykvovitých (pozorována však také na částech stonkového původu a velmi vzácně na plodech), a to u rostlin všech vývojových stádií (Lebeda a Cohen, 2011). Nejdříve postiženy jsou starší spodní listy a děložní lístky (Ferguson et al., 2009; Lebeda a Cohen, 2011). Prvním viditelným příznakem napadení bývá nejčastěji vznik chlorotických oblastí vzhledu světle žlutých, někdy olejových skvrn na svrchní straně listu, kterým však za vlhkého počasí mohou předcházet hůře rozpoznatelné vodnaté skvrny (Colucci a Holmes, 2010). Vznikající leze u okurek a tykví bývají ohraničeny listovými žilkami (tzv. angulární skvrnitost). Jejich velikost se v průběhu choroby zvětšuje a při silné infekci se převážně v jejich centrech objevují nekrotická místa (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011). Symptomy choroby na listech okurky seté jsou patrné na Obr. 5. Na listech melounů (Obr. 6) typicky nacházíme nepravidelné skvrny bez ostrého ohraničení, které velmi rychle



▲ **Obr. 5** Příznaky napadení *P. cubensis* na listech *Cucumis sativus* a postupný vývoj choroby (vodnaté skvrny, angulární chlorotické leze a extenzivní nekróza listu). (Colucci a Holmes, 2010)



◀ **Obr. 6** Nepravidelné leze plísně na svrchní straně listů *Cucumis melo*. (Celetti a Roddy, 2010)

hnědnou (Colucci a Holmes, 2010). Voglmayr et al. (2008) pozoroval světle červené skvrny s tmavým okrajem způsobené *P. cubensis* na listech nového hostitelského druhu *Impatiens irvingii* (Balsaminaceae). Vždy dochází k rychlému vadnutí, postupnému znetvoření a odumírání napadených listů (Lebeda et al., 2011; Voglmayr et al., 2008). Rápidní pokles fotosyntetické aktivity pro rostlinu znamená nedostatečné množství asimilátů potřebných na správný růst a vývoj plodů, ale při závažnější infekci také pro její celkové přežití. Rostlina ve stádiu defoliace je náchylná k vysychání a spálení přímým slunečním zářením (Celetti a Roddy, 2010; Colucci a Holmes, 2010).

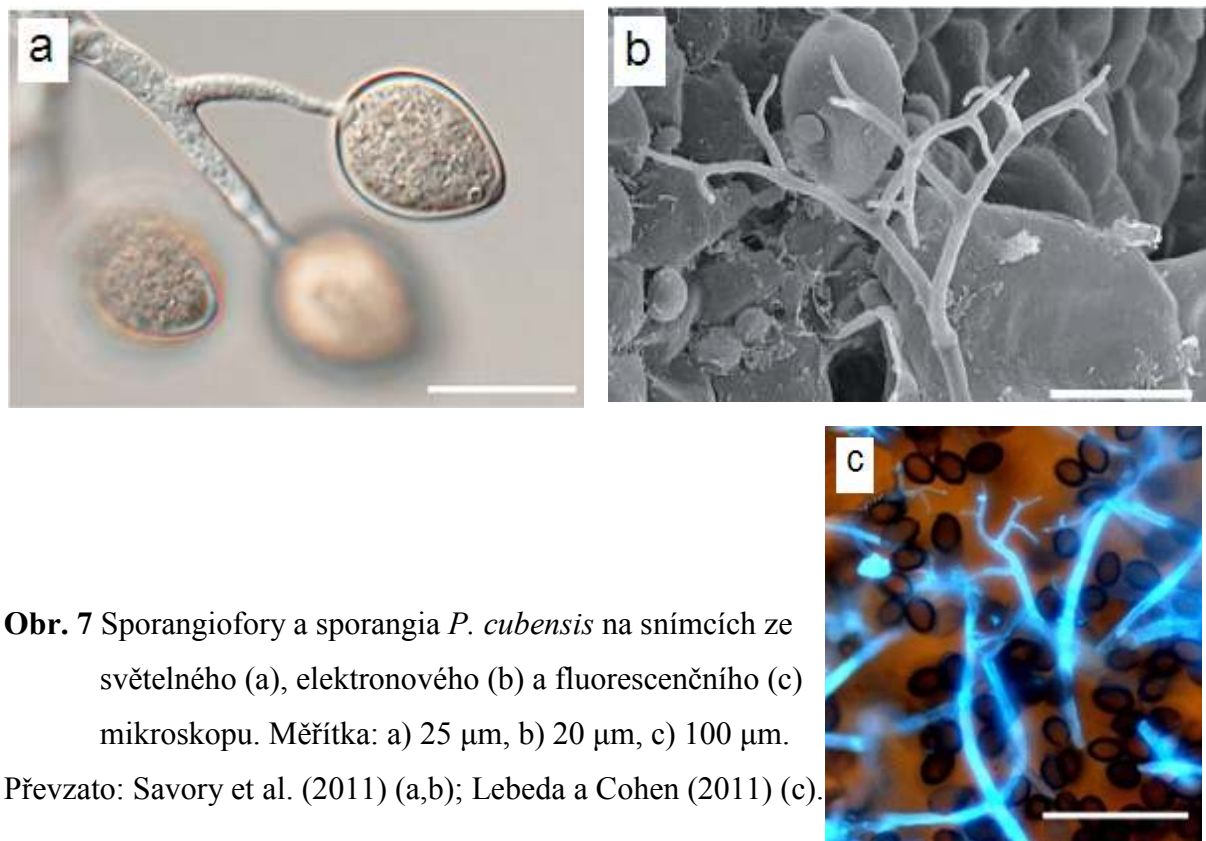
Typickým symptomem pokročilého vývoje onemocnění a jeho průkazným identifikačním znakem, podle kterého se řadí mezi tzv. „downy mildews“ („ochmýřené“ plísně), je vytváření oblastí pokrytých vrstvičkou sporangioforů, které nesou sporangia šedé, hnědé či nafialovělé barvy (Obr. 7), na spodní straně listové čepele (Colucci a Holmes, 2010). Toto „ochmýření“ se tedy ukazuje během reprodukční fáze patogenu, kdy dochází ke sporulaci (Lebeda a Cohen, 2011), a za určitých podmínek (nižší teploty než je potřeba k formaci lezí a relativní vlhkosti více než 90%) může být dokonce prvním příznakem choroby (Savory et al., 2011). Sporangiofory se sporangii jsou na spodní straně

listu nejlépe patrné ve vlhku (v ranních hodinách či po dešti) a zbarvení těchto oblastí se stává tmavším s vyšší hustotou a stářím sporangií (Colucci a Holmes, 2010).

Obecně všechny příznaky napadení tímto druhem plísně se mohou lišit v závislosti na hostiteli (jak mezi různými druhy, tak i mezi kultivary či genotypy jednoho druhu) a na podmínkách prostředí, které výrazným způsobem ovlivňují celý infekční a životní cyklus patogenu (Lebeda a Cohen, 2011). Vzhledem k poměrně dlouhé době inkubace (4-12 dní) a rychlému šíření choroby je pro pěstitele nutné učinit ochranná opatření porostů již před rozpoznáním prvních příznaků (Celetti a Roddy, 2010).

3.2.3 Charakteristika a ekologie životního cyklu patogenu

Hlavním prostředkem rozšiřování a infekce rostlin jsou na sporangioforech nepohlavně vzniklé spory (konidiosporangia, zoosporangia) typického oválného tvaru, které mohou být, přes svou poměrně krátkou životnost (většinou do dvou dní), šířeny větrem na velmi dlouhé vzdálenosti (viz kap. 3.2.5). K úspěšné infekci (inokulaci) cílové rostliny je potřeba zachycení sporangií na svrchní straně listu, jejich bezprostřední styk s vodou a příznivé teplotní a vlhkostní podmínky (Lebeda a Cohen, 2011). Optimální



Obr. 7 Sporangiofory a sporangia *P. cubensis* na snímcích ze světelného (a), elektronového (b) a fluorescenčního (c) mikroskopu. Měřítka: a) 25 μm , b) 20 μm , c) 100 μm . Převzato: Savory et al. (2011) (a,b); Lebeda a Cohen (2011) (c).

teplota se pohybuje okolo 15°- 20°C, při nižší či vyšší teplotě je nutná delší doba saturace listů (Savory et al., 2011, Neufeld a Ojiambo, 2012), ale spíše nižší relativní vlhkost vzduchu (Lebeda a Cohen, 2011). Neufeld a Ojiambo (2012) svou studií potvrdili, že teplota a doba saturace pletiv má významný vliv na uvolňování zoospor ze sporangii a na jejich schopnost infikovat rostlinu, a zkoumali, jak se liší intenzita těchto dějů u tří různých typů hostitelů (u okurky, melounu a tykve).

Formování penetračních hyf ze zoospor uvolněných ze sporangia a jejich pronikání přes epidermis listu je následováno růstem větveného cenocytického mycelia v mezibuněčných prostorech, jehož haustoria se vchlipují do membrán hostitelských buněk. Jak již bylo uvedeno, doba inkubace kolísá v poměrně širokém intervalu mezi 4 a 12 dny, a to v závislosti na vnější teplotě, fotoperiodě, množství inokula a době zavlažení pletiv. Při vyšší světelné intenzitě je celý proces urychlen až do reprodukční fáze, kdy je tvorba sporangii na sporangioforech, vyrůstajících za vysoké vzdušné vlhkosti průduchovými štěrbinami spodní pokožky, světlem inhibována (Savory et al., 2011). Mezi podmínky sporulace tedy patří setrvání infikovaného pletiva ve tmě, a to nejméně 6 hodin, přičemž by se na povrchu neměly nacházet větší kapky vody (Lebeda a Urban, 2010). Zralá sporangia jsou za sucha pasivně rozšiřována větrem, mezi sousedními rostlinami také srážkovou vodou nebo lidskou činností (Savory et al., 2011). V současné době je migrace sporangii nejlépe monitorována na území Spojených států amerických pomocí sítě stanic a internetového spojení (Lebeda a Cohen, 2011). Jedná se o součást integračního programu na ochranu proti škůdcům ipmPIPE, který mj. ke své studii použili Ojiambo a Holmes (2011). Pohyb sporangii *P. cubensis* byl v posledních letech zvláště sledován ve státě Michigan, významném produkci okurek, v důsledku vážného napadení rozsáhlých polí plísni okurkovou r. 2005. Výskyt těchto nepohlavních spor byl zaznamenáván v období června až října následujících čtyř let s nejvyšší koncentrací v dopoledních hodinách (8.00 – 13.00 hod) (Granke a Hausbeck, 2011).

Sexuální reprodukce je u tohoto houbového organismu vzácná a hůře prokazatelná kvůli velmi ojedinělému výskytu tlustostěnných odpočívajících pohlavních výtrusů (oospor), které by měly být produkovány na konci sezóny při odumírání listů hostitele. V mnoha zemích, včetně ČR, nebyly do této chvíle vůbec pozorovány, ve střední Evropě byl prokázán jejich výskyt pouze v Rakousku r. 1989. Avšak teprve v roce 2011 byla jejich tvorba a rovněž následné klíčení a infekce hostitelů indukována v laboratorních podmínkách (Cohen a Rubin, 2012). Ukázalo se, že *P. cubensis* je heterothalický druh se dvěma typy pohlavního rozmnožování, A1 a A2 (oospory vznikaly pouze tehdy, když bylo

inokulum připraveno smícháním dvou izolátů z odlišných typů). Ze zúčastněných hostitelských druhů se oospory nejlépe a v největším množství vyvíjely v mezofylu listů *C. sativus* a *C. melo*, u kterých později také způsobovaly poměrně vážnou infekci (Cohen a Rubin, 2012). Možnost časté sexuální reprodukce plísně okurkové v Izraeli, jež by vysvětlovala její vysokou variabilitu na tomto území a značnou odlišnost od jejích evropských forem, zmiňuje Polat et al. (2014). V našich podmínkách může být přezimování *P. cubensis* ve formě oospor částečně nahrazeno přežíváním na skleníkových kulturách tykvovitých rostlin (velký problém rozvoje choroby během zimy), většina inokula je však počátkem léta přinášena vzdušnými proudy z jihovýchodní Evropy (Lebeda a Cohen, 2011).

3.2.4 Hostitelský okruh *P. cubensis*

Ke zcela úspěšnému průběhu infekce a vývoje struktur *P. cubensis* dochází pouze u zástupců čeledi Cucurbitaceae. Do relativně širokého okruhu přirozených hostitelů (Runge et al., 2012) řadíme 50 až 60 druhů z 20 rodů tykvovitých rostlin, mezi nimi také 9 druhů z 12 běžně pěstovaných. Nejvíce druhů z tohoto souboru zahrnuje rod *Cucumis*, druhově nejpočetnější rod čeledi. Oba pěstované druhy, *C. sativus* a *C. melo*, jsou rovněž vysoce náchylnými hostiteli plísně okurkové, která právě podle výskytu na *C. sativus* získala své české pojmenování (Lebeda a Cohen, 2011; Savory et al., 2011).

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

Z ostatních ekonomicky důležitých rodů tykvovitých přirozeně podléhají napadení *P. cubensis* rody *Citrullus*, *Lagenaria*, *Benincasa* a *Luffa*. Jediný vytrvalý divoce rostoucí druh čeledi tykvovitých ve střední Evropě, *Bryonia dioica*, byl shledán náchylným vůči plísni okurkové při umělé inokulaci v laboratoři. Zda na něm plíseň může přezimovat, je předmětem výzkumů (Lebeda a Cohen, 2011; Runge a Thines, 2009).

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

V poslední době dochází k rozšiřování hostitelského okruhu díky výskytu nových genotypů *P. cubensis* v USA, EU a Izraeli (Polat et al., 2014).

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

Vzhledem k takřka celosvětovému rozšíření a hojnému pěstování tykvovitých rostlin můžeme jejich patogen *P. cubensis*, vykazující velkou variabilitu, označit za kosmopolitní druh. Hlavní ohniska výskytu leží v místech teplých klimatických pásů s dostatečnou vlhkostí, kde se tykvovité plodiny pěstují ve větším množství (Lebeda a Cohen, 2011; Ojiambo a Holmes, 2011). Bezkonkurenčně největší rozšíření je každoročně zaznamenáváno na zástupcích rodu *Cucumis*, především na okurkách a melounech. Vážné problémy s plísňovými epidemiemi okurek jsou řešeny především ve východních státech USA (Granke a Hausbeck, 2011) a v evropských zemích. Střední Amerika a pobřeží Karibského moře se staly centrem výskytu *P. cubensis* na taxonech *Cucurbita* spp., který je ohlášen přibližně ze 40 zemí, přičemž na území Evropy není příliš hojný. Podobně to platí pro distribuci patogenu na rodu *Citrullus*, jejíž hlavní oblastí jsou opět státy střední Ameriky (Lebeda a Cohen, 2011). Podle popsané situace ve Spojených státech sporangia (zdroj inokula) přezimují v teplých jižních státech (Florida, Texas) a každou sezónu jsou roznášena větrem do severně položených oblastí (Savory et al., 2011). Díky monitoringu výskytu plísně v letech 2008 a 2009 bylo zjištěno, že ačkoliv se choroba v každém z těchto roků objevila v jižní Floridě na přelomu února a března, k počátku jejího šíření do vzdálených oblastí došlo až v polovině června a průměrná vzdálenost sousedních míst výskytu byla přibližně 110 km v obou letech (Ojiambo a Holmes, 2011). Předpověď času a míst propuknutí choroby napomáhá k efektivnější ochraně porostů a tím ke snížení počtu výskytů plísně na území USA. Vyšší riziko je předpokládáno pro Středoatlantickou oblast (Ojiambo a Kang, 2013).

Evropou se *P. cubensis* začala šířit počátkem 20. století, krátce po jejím prvním popsání na živých rostlinách (v roce 1903) (Lebeda a Cohen, 2011, Lebeda et al., 2011). Klíčovou událost pro zvýšení zájmu Evropanů o studium patogenu a jeho působení představovala závažná epidemie okurek, která zasáhla velkou část kontinentu, především celou oblast střední Evropy, ve 2. polovině 80. let (Lebeda a Schwinn, 1994). Sporangia původem z jihovýchodní části Evropy (Savory et al., 2011), šířící se vzdušnými proudy do vzdáleností až několika set kilometrů, byla příčinou propuknutí choroby, která se v dalších letech stěhovala ještě více na sever, do Polska a Skandinávie. Zajímavý je fakt, že během

této katastrofální epidemie plíseň na postiženém území vůbec nenapadala zástupce rodu *Cucurbita* a druhu *Cucumis melo* (Lebeda a Gadasová, 2002), jak tomu bývá běžně např. v Izraeli, Japonsku či Indii (Lebeda a Cohen, 2011).

Také v Československu se projevil silný ekonomický dopad epidemie, a to v kritickém roce 1985 ztrátami okolo 80-90% obvyklé produkce okurek. V několika následujících letech zde nedošlo k výraznému ústupu epidemie, ale ztráty se snižovaly díky účinnější ochraně plodin. Podle hlavních ohnisek výskytu onemocnění docházelo k pravidelné migraci inokula přes oblasti jižního Slovenska, jižní a střední Moravy do východních a středních Čech (Lebeda a Cohen, 2011). V rámci těchto regionů Čech a Moravy byl zaznamenáván hojný výskyt *P. cubensis* na polních okurkách, čítající 80 až 100 lokalit, také v posledních letech (2001-2009) (Lebeda et al., 2011). Rozšíření plísně (převážně v období konce července a srpna) však zasahuje celou oblast České republiky s intenzitou lišící se mezi různými kraji, ale také mezi jednotlivými roky pozorování. Obecně má choroba na našem území velmi závažný charakter, index choroby (disease index, DI) se dle Lebedy a Cohena (2011) pohybuje v rozmezí 3-4 (silný až velmi silný stupeň napadení), nejtěžší stav infekce byl pozorován koncem srpna. Výskyt *P. cubensis* na polích postižených další hojnou chorobou okurek, „powdery mildew“ („práškovou“ plísní, zástupce padlí), je možný, ale silné projevy obou plísní se spíše vylučují. Napadení jiných druhů tykvovitých na území ČR, které bylo v letech 2009 a 2010 sledováno u porostů *Cucumis melo*, *Cucurbita* spp. a *Citrullus lanatus*, je vzácné, ale analyzované izoláty z těchto let mají jinou virulenci než ty z let předchozích, díky které jsou schopny založit přirozenou a vážnou infekci i u těchto hostitelských druhů. Navíc se virulence populací patogenu v průběhu let zvyšuje (Lebeda et al., 2013).

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

3.3.1 Variabilita patogenity *P. cubensis*

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

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

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

Patotypy, dále pak zvláště fyziologické rasy, jsou naopak často užívány k odlišení různých fyziologických forem patogenů rostlin v závislosti na jejich hostitelském druhu (patotypy), případně kultivaru v rámci jednoho druhu (rasy) (Lebeda a Cohen, 2011). Existence patotypů se studuje pomocí reakce různých izolátů na souboru diferenciačních hostitelů, k jejich určení byl zaveden systém číselných tetradových kódů (Lebeda a Widrechner, 2003). Používání označení „patotyp“ a „fyziologická rasa“ různými autory není jednotné (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda et al., 2006; Savory et al., 2011). Pravděpodobnost existence fyziologických ras patogenu se zvyšuje s větším polymorfismem hostitelského druhu. Například některé genotypy druhu *C. pepo* (Lebeda a Křístková, 1993) či *C. melo* (Lebeda, 1991; Lebeda et al., 2007a) mohou sloužit k determinaci rozdílných ras *P. cubensis*.

Rozdíly mezi rasami *P. cubensis* mohou být způsobeny jiným obsahem efektorových proteinů ve strukturách organismu. Složení těchto proteinů, jejich význam v infekčním cyklu patogenu i struktura genů, které je kódují, je předmětem výzkumu (Savory et al., 2012; Tian et al., 2011). Genetická diverzita *P. cubensis*, která se dnes zjišťuje například prostřednictvím kombinace AFLP a ITS sekvenční analýzy nebo ISSR a SRAP markerů úzce souvisí s diverzitou patogenní a mění se v čase a v různých geografických podmínkách (Polat et al., 2014; Savory et al., 2011).

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

Hostitelský rod *Cucurbita* zahrnuje široké spektrum geneticky rozdílných druhů, ale také odrůd a kultivarů v rámci jednotlivých druhů (Lebeda et al., 2007b). Vnitrodruhová variabilita interakce *Cucurbita* spp. s *P. cubensis* je tedy mnohem větší ve srovnání s tou, kterou vykazuje geneticky téměř homogenní druh *C. sativus* při interakci s tímto

patogenem (Lebeda a Cohen, 2011). Přesto byl výzkum rezistence zástupců tohoto rodu vůči plísni okurkové dlouhou dobu opomíjen (Lebeda, 1990).

Interakce hostitele a parazita je v případě rodu *Cucurbita* řízena rasově specifickými faktory, což se projevuje rozdílnými reakcemi genotypů na jednotlivé izoláty (od úplné rezistence až po zcela náchylnou reakci) (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2004). Výraznou rasově specifickou rezistenci/náchylnost nacházíme také mezi poddruhy, varietami a kultivary významného druhu *C. pepo* (Lebeda a Cohen, 2011), což je zřejmé mj. z výsledků laboratorních testů Lebedy a Křístkové (1993). V rámci nich byla zjištěna neúplná rezistence u mnoha genových zdrojů *C. pepo* subsp. *pepo*, která potvrzuje oddělení tohoto poddruhu od *C. pepo* subsp. *ovifera*, jehož genotypy byly zcela náchylné (kompatibilní) k alespoň jednomu ze tří izolátů *P. cubensis*. Jako jedna z možných příčin rozdílných reakcí kultivarů *C. pepo* je uváděna vícenásobná domestikace tohoto druhu (Lebeda a Křístková, 1993). Reakce planých druhů při umělé inokulaci plísni byla také značně variabilní (Lebeda a Widrlechner, 2004).

3.3.3 Variabilita druhu *Cucumis melo* v interakci s *P. cubensis*

Oproti vysoce náchylné reakci většiny kultivarů *C. sativus* vůči *P. cubensis* je interakce druhého pěstovaného zástupce rodu, variabilního druhu *C. melo*, s tímto patogenem rozmanitá a poskytuje zajímavé informace. Jedná se totiž o jediný druh rodu *Cucumis*, u kterého byla poměrně dobře prozkoumána rasová specifická interakce (Lebeda et al., 2007a) a díky odolnosti určitých genotypů zjištěna přítomnost možných genů rezistence, využitelných ve šlechtění melounů i okurek (viz kap. 3.3.4) (Lebeda a Widrlechner, 2003). Odolnost některých kultivarů byla pozorována také přímo v přirozeném prostředí (Lebeda a Schwinn, 1994).

Diferenční soubor tykvovitých pro odlišení patotypů *P. cubensis* obsahuje z celkových dvanácti položek tři genotypy *C. melo* z taxonů *C. melo* subsp. *melo*, *C. melo* var. *conomon* a *C. melo* var. *acidulus*. Tyto genotypy reprezentují tři rozdílné reakční schémata a o jejich variabilní interakci s evropskými izoláty *P. cubensis* referují Lebeda a Gadasová (2002).

Pozn.: Jak dokládají mnohé studie (např. Call et al., 2012b; Holdsworth et al., 2014; Shetty et al., 2002), studium reakční specifity s možností nalezení nových vysoce účinných zdrojů rezistence by nemělo být opomíjeno ani v rámci druhu *C. sativus*, a to jak mezi pěstovanými, tak planými taxony (Lebeda a Widrlechner, 2003).

3.3.4 Genetické, buněčné a molekulární aspekty interakce

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

Při prorůstání houbových hyf do pletiv hostitele (Cucurbitaceae) byla pozorována reakce buněk na přítomnost patogenu. U genotypů odolných vůči napadení se po rozpoznání cizích struktur signálními molekulami objevuje hypersenzitivní reakce, vyjádřená např. hromaděním vrstev kalózy na vnější části stěn hostitelských buněk (někdy také kolem buněk mycelia) spolu s mechanismy spějícími ke smrti buňky. Tyto projevy rezistence byly sledovány při studiu interakce *C. melo* a *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011). Molekulární povaha interakce byla blíže prozkoumána díky analýze sekvencí transkriptomu a zúčastněných genů *P. cubensis* během infekce náchylného kultivaru *C. sativus* (Savory et al., 2012).

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

Důležitou výzkumnou metodu, využívanou k ochraně pěstovaných tykvovitých rostlin (především okurek) proti infekci *P. cubensis*, představuje šlechtění na rezistenci, tj. vyšlechtění odolných forem kultivarů za použití genů rezistence pocházejících z příbuzných zástupců. Ty nacházíme nejvíce v genomu rostlin rostoucích v centrech původu druhů díky dlouhé koevoluci hostitele a parazita (Chloupek, 2008). Nedostatek zdrojů rezistence je velkým problémem u druhů s menší genetickou diverzitou, kam patří také *C. sativus* (Savory et al., 2011), naopak dobrá dostupnost zdrojů rezistence, založená na rasové specifičnosti interakce, charakterizuje variabilní druhy *Cucumis melo* a *Cucurbita pepo* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Urban, 2010).

Vzhledem k poměrně blízké příbuznosti druhů *C. melo* a *C. sativus*, která do určité míry umožňuje mezidruhové křížení s možností inkorporace genů (Lebeda a Widrlechner,

2003), je tento fakt vítaný a výzkum v této oblasti, probíhající již od 40. let 20. století, poměrně rozsáhlý. Navzdory tomu nebyl dosud objeven žádný kultivar s úplnou rezistencí vůči všem rasám *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda et al., 2007a) a šlechtění tykvovitých na rezistenci je stále v počátcích. V posledních letech se však rozvíjí šlechtění okurek na polní (kvantitativní) rezistenci vůči *P. cubensis*, o čemž svědčí i některé recentní publikace (Call et al., 2012b; Kozik et al., 2013; Holdsworth et al., 2014).

Vůbec první polní rezistence *C. pepo* vůči izolátům *P. cubensis* byla doložena na japonském kultivaru Soumen v r. 1986 (Lebeda, 1990). Vysoce rezistentní byly shledány rovněž některé plané taxony *Cucurbita* spp. (Lebeda a Widrlechner, 2004). Obecně však stále postrádáme údaje o zdrojích a charakteristice rezistence v rámci rodu *Cucurbita* (Lebeda, 1990; Lebeda a Cohen, 2011).

K hlubšímu prohloubení poznatků o této problematice byla také realizována tato studie, která navazuje na bakalářskou práci Roháčkové (2012) a dříve publikovanou práci Lebedy a Widrlechnera (2004).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

4.1.1 Soubor testovaných genotypů *Cucurbita* spp.

Testy rezistence vůči *P. cubensis* byly v období od 22. 1. 2001 do 18. 12. 2001 prováděny na vybraném souboru planě rostoucích taxonů rodu *Cucurbita*, příbuzných všem pěti pěstovaným druhům *Cucurbita* spp., jež reprezentují široké spektrum genetické diverzity tohoto rodu. Semena 97 testovaných genofondových vzorků byla poskytnuta pěti centry národního systému genových zdrojů rostlin USA (The National Plant Germplasm System (NPGS)). Tyto materiály pocházejí především z Ameriky, nejvíce vzorků (63) je z oblasti Mexika; jen malá část zahrnuje evropské a asijské odrůdy. Ve studovaném souboru je zastoupeno 14 taxonů z 10 druhů *Cucurbita* spp. (Lebeda a Widrlechner, 2004). Podrobné informace o jednotlivých položkách jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4.1).

Dostatečný počet semen z každé této položky a z kontrolního vzorku *Cucumis sativus* kultivar Marketer 430 (H39 – 0121, ČR) (srov. Štěpánková, 2006) byl použit k vypěstování pěti pokusných rostlin od každého genotypu. Vývoj rostlin, zasazených v plastových květináčích se zahradní zeminou, probíhal v růstové komoře (fytotronu) nebo ve skleníku za optimálních podmínek, jak je definují Lebeda a Urban (2010). Teplota prostředí byla ve dne udržována přibližně na 25°C, v noci na 15°C. Rostliny byly pravidelně zavlažovány a jednou týdně přihnojovány hnojivem Kristalon, verze „Květ a plod“ (Hydro Agri Rotterdam, Nizozemí; N 15%, P₂O₅ 5%, K₂O 30%, MgO 3%), přičemž nebyly jinak chemicky ošetřovány. K testování byly určeny vyvinuté listy 6-8 týdenních rostlin s 3-4 pravými listy, z nichž bylo na každou rostlinu odebráno 5 disků (Ø 20 mm, z jednoho listu), a to u tří rostlin z každého genotypu (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2003, 2004). Použití listových disků k testování poskytuje mnohé výhody, zejména prostorovou nenáročnost za možnosti současného testování velkého množství rostlin a možnost přesného definování podmínek v průběhu experimentu (Lebeda a Urban, 2010).

Tab. 4.1 Soubor testovaných vzorků *Cucurbita* spp.

Poř. číslo	Označení vzorku	Taxon <i>Cucurbita</i> spp.	Název odrůdy	Místo původu
1	PI 442192	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-006	Mexiko, Nuevo Leon
2	PI 442193	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-203	Mexiko
3	PI 442194	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-204	Mexiko
4	PI 442200	<i>Cucurbita foetidissima</i>	K 792-257	Mexiko, Zacatecas
5	PI 512094	<i>Cucurbita foetidissima</i>	LM - 280	Mexiko, Nuevo Leon
6	PI 318832	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Chichicayota	Mexiko, Sonora
7	PI 438832	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2286	Mexiko, Veracruz
8	PI 438833	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2304	Mexiko, Veracruz
9	PI 438834	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2311	Mexiko, Veracruz
10	PI 438835	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2363	Mexiko, Oaxaca
11	PI 438836	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	W-C 2395	Mexiko, Chiapas
12	PI 442345	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-180	Mexiko, Veracruz
13	PI 442348	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-258	Mexiko, Sinaloa
14	PI 442358	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K 792-290	Mexiko, Chiapas
15	PI 489696	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	K801 - 1	Mexiko, Chiapas
16	PI 494128	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	M27	Mexiko, Jalisco
17	PI 512204	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla	Mexiko, Colima
18	PI 512205	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla	Mexiko, Colima
19	PI 512209	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Ahuichichi	Mexiko, Jalisco
20	PI 512212	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Morchete or Morche	Mexiko, Veracruz
21	PI 512213	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla or Chicayote	Mexiko, Guerrero
22	PI 512214	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla or Chicayote	Mexiko, Guerrero
23	PI 512216	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Calabacilla, Chicayote, or Calabaza de cayote	Mexiko, Guerrero
24	PI 512218	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Cuacualaiztle (Zapotec Indian)	Mexiko, Oaxaca
25	PI 512219	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	LM392	Mexiko, Jalisco
26	PI 512220	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN26595	Mexiko, Veracruz
27	PI 512221	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN29350	Mexiko, Veracruz
28	PI 512222	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	MN29593	Mexiko, Veracruz
29	PI 512223	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	Morchete	Mexiko, Veracruz
30	PI 512224	<i>C. argyrosperma</i> subsp. <i>sororia</i>	GN-MEX-20	Mexiko, Nayarit
31	PI 196309	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Ovifera	Mexiko, Baja California
32	PI 318822	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicoyote	Mexiko, Sonora
33	PI 511985	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Sonora
34	PI 512198	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	E02-001	Mexiko, Sonora
35	PI 512199	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Halawe chipu (Warihio Indian)	Mexiko, Sonora
36	PI 512200	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicayote	Mexiko, Sonora
37	PI 512201	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chichicayote	Mexiko, Sonora
38	PI 512210	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Nayarit
39	PI 512211	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Calabacilla	Mexiko, Sinaloa
40	PI 512225	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora

41	PI 512226	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
42	PI 512227	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
43	PI 512228	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
44	PI 512229	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
45	PI 512230	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
46	PI 512231	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
47	PI 512232	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
48	PI 512233	<i>C. argyrosperma</i> var. <i>palmeri</i>	Chicayote, Adav (Pima)	Mexiko, Sonora
49	PI 653839	<i>Cucurbita cordata</i>	TWW 30	Mexiko, Baja California Norte
50	PI 240879	<i>Cucurbita digitata</i>	16589	Mexiko, Sonora
51	Grif 9446	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>	TWW 42	Ecuador, Guayaquil
52	PI 432443	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>		Ecuador
53	PI 540895	<i>Cucurbita ecuadorensis</i>	90	U. S., Kalifornie
54	Grif 9447	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 48	Argentina, Salta
55	Grif 9448	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 55	U. K., Anglie
56	Grif 9450	<i>Cucurbita ficifolia</i>	TWW 60	Mexiko, Chihuahua
57	PI 512680	<i>Cucurbita ficifolia</i>	V-CU-36	Španělsko, Alicante
58	PI 406683	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>		Mexiko
59	PI 438698	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	W-C 2295	Mexiko, Veracruz
60	PI 512099	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	Ts'oopiluthu (Huasteca)	Mexiko, San Luis Potosi
61	PI 512103	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	LM273	Mexiko, Veracruz
62	PI 512105	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	MN28990	Mexiko, Veracruz
63	PI 512106	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	MN29110	Mexiko, Veracruz
64	PI 540900	<i>C. okeechobeensis</i> subsp. <i>martinezii</i>	92	Mexiko, Veracruz
65	PI 442341	<i>Cucurbita pedatifolia</i>	K 792-063	Mexiko, San Luis Potosi
66	PI 173681	<i>Cucurbita pepo</i>	Yumurta	Turecko
67	PI 174178	<i>Cucurbita pepo</i>	Yumurta	Turecko, Kars
68	PI 222247	<i>Cucurbita pepo</i>	1419	Írán, Tehran
69	PI 274787	<i>Cucurbita pepo</i>	Yellow Round	Indie, Delhi
70	PI 357931	<i>Cucurbita pepo</i>	Prilepska	Makedonie
71	PI 512744	<i>Cucurbita pepo</i>	AN-CU-42	Španělsko, Cadiz
72	PI 532354	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	Calabacilla loca	Mexiko, Tamaulipas
73	PI 532355	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	179	Mexiko, Tamaulipas
74	PI 532356	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	180	Mexiko, Tamaulipas
75	PI 614683	<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	HDW 5531	Mexiko, Tamaulipas
76	PI 285213	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>		U. S., Texas

77	PI 540907	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	127	U. S., Kalifornie
78	PI 614684	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3163	U. S., Texas
79	PI 614685	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3180	U. S., Texas
80	PI 614686	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3162	U. S., Texas
81	PI 614687	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3173	U. S., Texas
82	PI 614688	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 3170	U. S., Texas
83	PI 614689	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 5299	U. S., Texas
84	PI 614690	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	HDW 5533	U. S., Texas
85	PI 614692	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 5	U. S., Mississippi
86	PI 614693	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	294	U. S., Mississippi
87	PI 614694	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	293	U. S., Mississippi
88	PI 614696	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	Ames 22733	U. S., Mississippi
89	PI 614697	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	14688	U. S., Mississippi
90	PI 614698	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	14712	U. S., Mississippi
91	PI 614699	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Populations 1 & 2	U. S., Mississippi
92	PI 614700	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 4	U. S., Mississippi
93	PI 614701	<i>C. pepo</i> var. <i>texana</i>	292 Population 3	U. S., Mississippi
94	NSL 91999	<i>C. pepo</i> var. <i>ovifera</i>	Bicolor Spoon	U. S., New York
95	G 5285	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		U. S.
96	G 29253	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		Argentina, Entre Rios
97	G 29254	<i>C. maxima</i> subsp. <i>andreana</i>		Argentina, Toledo

4.1.2 Soubor testovaných genotypů *Cucumis melo*

V období od 13. 12. 2012 do 17. 7. 2013 bylo provedeno testování rezistence 22 genotypů *Cucumis melo* vůči *P. cubensis*. Semena těchto genových zdrojů, zastupujících genetickou diverzitu tohoto druhu, byla vybrána ze široké genofondové kolekce druhu, která je uchovávána v NPGS (Ames, Iowa, USA). Většina rostlinného materiálu tohoto souboru má svůj původ v Indii a v Japonsku (celkem 19 genotypů); zbylé 3 vzorky jsou z Jižní Ameriky a Evropy. Informace o jednotlivých položkách shrnuje tabulka (Tab. 4.2).

Na začátku byl proveden výsev dostatečného množství semen z každého testovaného genotypu do malých plastových květináčů naplněných perlitem. Po zakořenění byly semenáčky přesazovány do velkých květináčů se zahradní zeminou (8 rostlin z každé položky). Pro vývoj rostlin ve skleníku byly zajištěny optimální podmínky, jak je uvedeno výše, a jejich růst byl sledován (viz fotodokumentace v příloze a na přiloženém CD). Pro účely testování byly z každého genotypu vybrány tři rostliny ve stáří 6-8 týdnů a z nich odebrány vyzrálé a zdravé listy, tj. listy s dobře vyvinutými pletivy, mechanicky nepoškozené a především nenapadené padlím okurek či jinou chorobou. Z listů jedné rostliny pak bylo vyseknuto 5 disků o průměru 15 mm, celkem tedy 15 disků od jednoho genotypu na testování jedním izolátem (Lebeda a Křístková, 1993; Lebeda a Widrlechner, 2003). Jako kontrolní genotyp byl použit kultivar *Cucumis sativus* - Marketer 430.

Tab. 4.2 Soubor testovaných vzorků *Cucumis melo*

Poř.č.	Označení vzorku	Taxon	Název genotypu/odrůdy	Země původu
1	PI 164433	<i>Cucumis melo</i>	Kakri; 8726	Indie, Rajasthan
2	PI 124111	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	2563	Indie, Bihar
3	PI 124112	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	2564	Indie, Bihar
4	PI 124113	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Phut; 2565	Indie, Bihar
5	PI 164187	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Kachhri; 8903	Indie, Rajasthan
6	PI 164492	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Phut; 8785	Indie, Rajasthan
7	PI 180280	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Kahkri; 10931	Indie, Gujarat
8	PI 180283	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Chapera Ki Kacheri; 10997	Indie, Gujarat
9	PI 183311	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	11204	Indie, Gujarat
10	PI 266932	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	New Melon	Japonsko
11	PI 313970	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	VIR 5682; Duplicate of PI 315410	Indie
12	PI 315410	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	VIR 5682	Indie
13	PI 370021	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Cu 70-01	Indie
14	PI 378059	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Ginsen Makuwa (Silver Spring)	Japonsko
15	PI 378061	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Nagagta kin Makuwa (Long Gold)	Japonsko
16	PI 378062	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Shirokawa nashi Makuwa	Japonsko
17	PI 379275	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Gradecka	Srbsko, Černá Hora
18	PI 403994	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Meloncillo	Kolumbie, Tolima
19	PI 420176	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Ginsen Makuwa (Silver Spring)	Japonsko, Hokkaido
20	PI 420177	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Kindawara Makuwauri (Makuwa Makino)	Japonsko, Kagawa
21	PI 420180	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Sanuki Shirouri (Conomon Makino)	Japonsko, Kagawa
22	PI 441988	<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	Smith's Perfect Seeds	Kolumbie, Tolima

4.2 Izoláty *P. cubensis*

Uvedený soubor genotypů *Cucurbita* spp. byl testován na rezistenci, resp. náchylnost vůči 11 izolátům *P. cubensis* (1/88, 6/96, 1/97, 6/97, 2/95, 1/00, 2/00, 3/00, 11/00, 12/00, 14/00), které byly v průběhu let 1988-2000 získány na území České republiky (8 izolátů) a po jednom izolátu z Francie, Španělska a Nizozemí (Tab. 4.3). Použité izoláty pocházejí většinou z *Cucumis sativus*, jen izolát 2/95 je z *Cucumis melo* (Lebeda a Gadasová, 2002), a na základě reakcí na diferenčním souboru Cucurbitaceae (viz Lebeda a Widrlechner, 2003) reprezentují 9 různých patotypů *P. cubensis*, které se navzájem významně liší ve svých patogenních vlastnostech. Jsou zde reprezentovány jak izoláty s nízkou patogenitou (nejnižší vykazoval izolát 3/00), tak s vysokým stupněm patogenity (např. izolát 1/97), jak ukazuje tabulka Tab. 4.3 (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Tab. 4.3 Izoláty *Pseudoperonospora cubensis*, použité k testování rezistence souboru *Cucurbita* spp., a jejich reakce s diferenčním souborem tykvovitých (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Widrlechner, 2004)

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

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

Druhý soubor, který byl tvořen genotypy *Cucumis melo*, byl studován z hlediska jeho interakce s 8 izoláty *P. cubensis* (2/95, 25/01, 71/01, 7/02, 53/02, 13/03, 43/06, 18/09), které zastupují širší spektrum různých patotypů. Každý z těchto izolátů v podstatě reprezentuje jiný patotyp, většina z nich má střední nebo vysokou patogenitu (viz Tab. 4.4). S výjimkou již zmíněného izolátu 2/95, který byl použit v obou testováních, byly tyto izoláty získány z porostů *C. sativus* v letech 2001-2009 na lokalitách Čech a Moravy (Lebeda et al., 2013).

Tab. 4.4 Izoláty *Pseudoperonospora cubensis*, použité k testování rezistence genotypů *Cucumis melo*, a jejich reakce s diferenciačním souborem tykvovitých (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Widrlechner, 2003)

Diferenciační genotyp	Izoláty <i>P. cubensis</i> (PC)							
	2/95	25/01	71/01	7/02	53/02	13/03	43/06	18/09
<i>Cucumis sativus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> subsp. <i>melo</i>	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>C. melo</i> var. <i>acidulus</i>	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>C. pepo</i> subsp. <i>texana</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>C. pepo</i> subsp. <i>fraterna</i>	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>C. maxima</i>	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>Citrullus lanatus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Benincasa hispida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Luffa cylindrica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Lagenaria siceraria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

PC – mezinárodní označení izolátů *P. cubensis* (číslo izolátu/rok sběru)
+ náchylná reakce (mírná až hojná sporulace *P. cubensis*)
- rezistentní reakce (žádná nebo značně omezená sporulace)

Kultivace (uchovávání a množení) izolátů byla prováděna na listových segmentech nebo discích silně náchylných genotypů *C. sativus* cv. Stela F1 a *C. sativus* cv. Marketer 430, který při testováních sloužil také jako náchylná kontrola (Lebeda a Widrlechner, 2004). Vždy po 10-14 dnech kultivace byl příslušný izolát reinokulován na čerstvý rostlinný materiál (Lebeda a Urban, 2010). Dlouhodobé uchovávání kultur (infikovaných listů se sporangiofory) v Petriho miskách (max. 6 měsíců) bylo realizováno za nízkých teplot (-80°C) v mrazicím boxu (Lebeda a Urban, 2010; Lebeda a Widrlechner, 2004).

4.3 Příprava inokula, inokulace a inkubace

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

V naší studii bylo k přípravě inokula využíváno listů/listových segmentů *C. sativus* cv. Marketer 430 (popř. *C. sativus* cv. Stela F1), infikovaných jednotlivými izoláty *P. cubensis*, jež byly umístěny v plastových nádobách (110 × 85 × 45 mm) nebo v Petriho miskách na vlhkém filtračním papíře svrchní stranou dolů, se sporangiofory na spodní straně (nejhojněji se vyskytujícími na čerstvých zelených úsecích listů). Oblasti pokryté sporangiofory se zralými (podle Lebedy a Křístkové (1993) 3-4 denními) sporangii (obvykle 7.-9. den po inokulaci), obklopené zdravým pletivem, byly sterilizovanými nůžkami nastříhány na malé kousky, které byly následně pomocí pinzety a laboratorní třepačky propírány v kádince s přibližně 5 ml destilované vody tak, aby došlo k uvolnění sporangii do kapaliny. Koncentrace roztoku byla dále zředěna přidáním destilované vody na optimální hodnotu 10^5 sporangii/ml (Lebeda a Urban, 2010).

Takto připravené inokulum bylo skleněným rozprašovačem rovnoměrně aplikováno na spodní stranu listových disků testovaných rostlin, uložených na vrstvě důkladně navlhčeného filtračního papíru a buničiny v plastových bednách, v průměrném množství 10 ml na jednu bednu. Před inokulací by měly terčičky přiléhat k navlhčenému materiálu celou svou plochou, v opačném případě totiž může dojít k omezené infekci a tím není zajištěna objektivnost výsledků testování (Lebeda a Urban, 2010). Bedny s disky byly přikryty skleněnými deskami pro udržení optimální vlhkosti.

Inkubační dobu silně ovlivňují podmínky okolního prostředí, proto bylo nutné ve fytotronu, kde byly napadené listové terčičky inkubovány *in vitro*, udržovat stabilní mikroklima. K němu patří stálá 12h fotoperioda a teplota 18°C za světla a 15°C za tmy, které byly nastaveny v průběhu inkubace po úvodních 24 hodinách uložení čerstvě inokulovaných disků ve tmě (přikrytí misek černou neprůsvitnou fólií). Inkubační doba se v *in vitro* podmínkách obvykle pohybuje v rozmezí 7-9 dnů (viditelná sporulace *P. cubensis*), v polních podmínkách je variabilnější: 4-12 dní (viz kap. 3.2.3) (Lebeda a Urban, 2010).

4.4 Metody hodnocení rezistence

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

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

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

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

4.5 Metody statistického zpracování dat

V návaznosti na původně získané údaje o interakcích genových zdrojů *Cucurbita* spp. a izolátů *P. cubensis* (2001), jejich následnou prezentaci (Lebeda a Widrlechner, 2004) a základní statistické zpracování (Roháčková, 2012) bylo v rámci této práce přistoupeno k detailní analýze těchto dat i nově získaných údajů z testování genotypů *Cucumis melo*, která je nezbytná k hlubšímu poznání charakteru interakce těchto druhů s *P. cubensis* a k

případnému využití získaných informací ve šlechtění na rezistenci. Pro účely tohoto zpracování byla v programu MS Office Excel pro každé testování zvlášť vytvořena výchozí souhrnná tabulka obsahující všechny získané hodnoty škály 0-4 (pro každý disk a izolát, veškerá hodnocení u všech genotypů), konečné verze těchto tabulek najdete na příloženém CD.

Reakce genotypů vůči konkrétnímu izolátu *P. cubensis* byly nejdříve zhodnoceny podle relativní četnosti disků ($n = 15$) jednoho genotypu v každém z pěti stupňů intenzity napadení 14. den po inokulaci (14 dpi). Pro snadnější orientaci a také pro porovnání reakcí genotypů vůči jednotlivým izolátům slouží 100% skládané pruhové grafy aplikace MS Office Excel (viz např. Štěpánková, 2006). Grafy stejného typu byly vytvořeny pro výsledné reakce 10 zastoupených druhů rodu *Cucurbita* vůči každému z 11 izolátů, které však kvůli výrazně nerovnoměrnému rozložení testovaných genotypů do jednotlivých druhů (viz Tab. 4.1) mají spíše orientační, než směrodatný charakter.

Podobným způsobem došlo k sestavení dvou grafů, které ukazují rozčlenění všech testovaných terčů, tj. 1455 z 1. testování/330 z 2. testování (bez kontrolního genotypu), do pětibodové stupnice hodnocení intenzity sporulace (14 dpi), zvlášť pro každý z 11/8 izolátů. Toto grafické vyjádření umožňuje srovnání izolátů z hlediska stupně virulence.

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

5. VÝSLEDKY

V rámci prováděných testů rezistence 97 genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči 11 izolátům (patotypům) *P. cubensis* bylo získáno velké množství dat, která již byla zběžně analyzována dříve (Lebeda a Widrlechner, 2004). V nedávné době (2012-2013) provedené testování reakce 22 gen. zdrojů *Cucumis melo* na souboru 8 izolátů *P. cubensis* poskytlo nová data ke zpracování. V rámci současné analýzy všech těchto dat je detailní pozornost věnována zejména reakci genotypů *Cucurbita* spp. a *Cucumis melo*, ale i virulenci izolátů *P. cubensis*. Na závěr je k oběma experimentům přiložena souhrnná tabulka kvalitativního hodnocení reakcí testovaných genotypů vůči použitým izolátům (Tab. 5.1a, 5.2a), vycházející z tabulky stupňů napadení (DI) genotypů těmito izoláty (Tab. 5.1b, 5.2b).

Pro ověření věrohodnosti výsledků byla vyžadována vysoce náchylná konečná reakce (převažující stupeň sporulace 4, u zbytku disků 3) kontrolního genotypu *Cucumis sativus* cv. Marketer 430, přiřazeného ke každé testované sadě. Pokud tento požadavek nebyl splněn, byl daný pokus zopakován.

5.1 Výsledky testování interakce *Cucurbita* spp. – *P. cubensis*

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

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

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

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

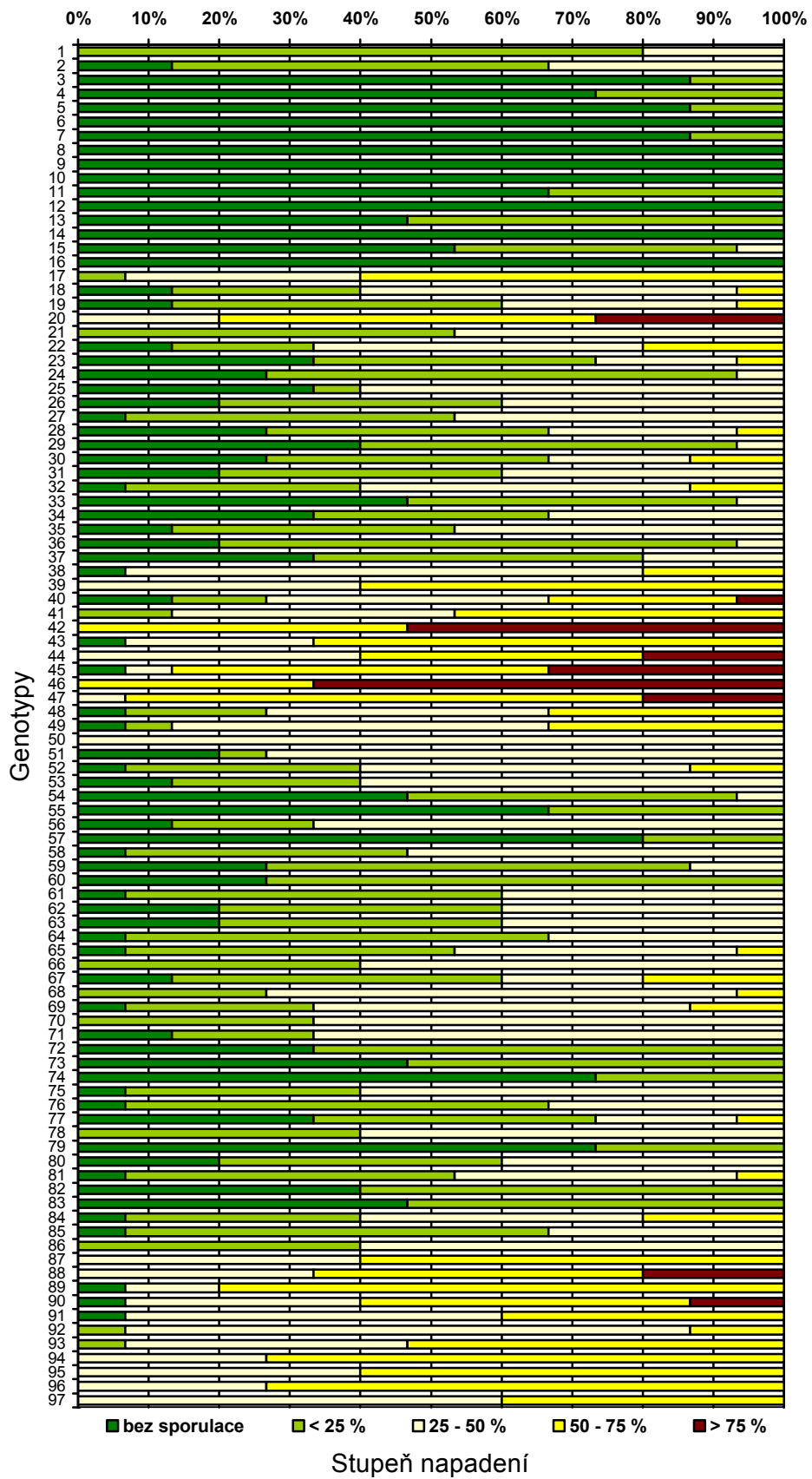
Důležitá data z hlediska dalšího výzkumu (zejména ve šlechtění tykvovitých rostlin na rezistenci) představují výsledky interakce hostitelského genotypu a patogenu, které byly hodnoceny jako zcela nebo částečně rezistentní reakce (disky bez sporulace nebo s mírnou sporulací) vůči všem nebo alespoň některým použitým izolátům/patotypům (Lebeda a Widrlechner, 2003; 2004). Tuto skutečnost lze vidět v grafech 1a-11a, kde je zastoupení reakcí stupně 0 v rámci konkrétního genotypu reprezentováno tmavě zelenou barvou příslušného sloupce. **Rezistence** (DI = 0-35%) vůči celému souboru použitých izolátů byla zjištěna pouze u 13 genotypů v rámci dvou druhů: *C. argyrosperma* (č. 7, 12, 13, 14, 15, 19, 24, 25, 27, 28, 29 a 37) a *C. foetidissima* (č. 4), přičemž prvních 11 jmenovaných patří k taxonu *C. argyrosperma* subsp. *sororia* (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Kromě výše uvedených výsledků extrémní rezistence 13 genotypů a naopak úplné náchylnosti 12 genotypů *Cucurbita* spp., většina testovaných genotypů *Cucurbita* spp. vykazovala v závěrečném hodnocení interakcí hostitele a parazita různé stupně rezistence/náchylnosti vůči odlišným patotypům (rasám) *P. cubensis*. Tyto interakce byly charakterizovány rasově specifickou odezvou, resp. rezistencí. Ačkoliv se v některých případech jednalo o neúplnou rezistenci se stupněm napadení DI = 0,1-35%, obecně lze konstatovat, že u převážné části studovaného souboru planých taxonů byla rasová specifická této interakce zřejmá. Nejvíce variabilní se ukázaly druhy *C. argyrosperma*, *C. foetidissima*, *C. okeechobeensis* a *C. pepo*, jak je patrné z grafů 1b-11b (Lebeda a Widrlechner, 2004).

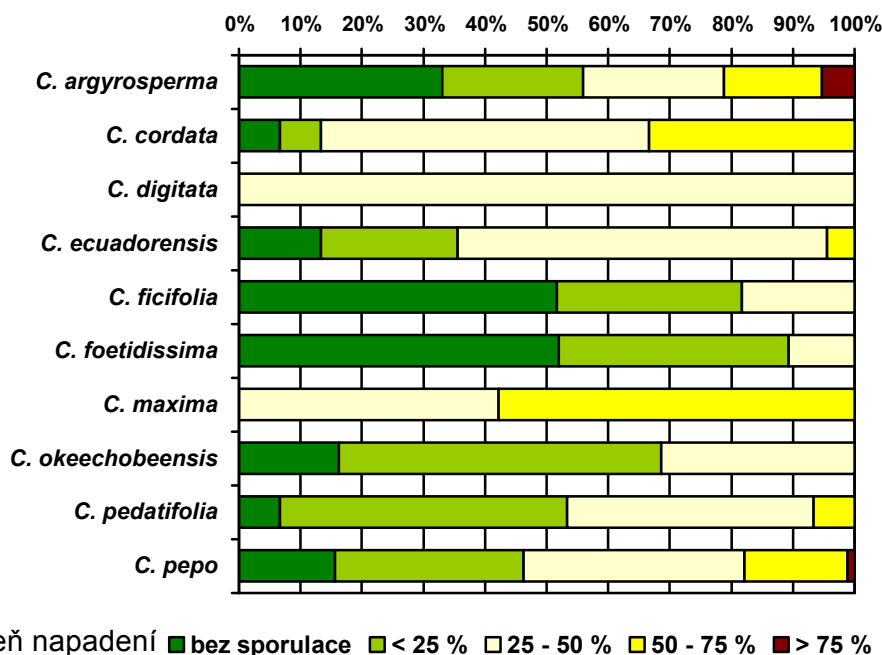
V průběhu hodnocení testování byl převážně pozorován pozvolný vývoj infekce od 6. po 14. den po inokulaci, přičemž při prvním hodnocení byla pozorována slabá či žádná sporulace (stupeň 0 a 1). Tyto údaje jsou dostupné v souhrnné tabulce získaných dat na CD.

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

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



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



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

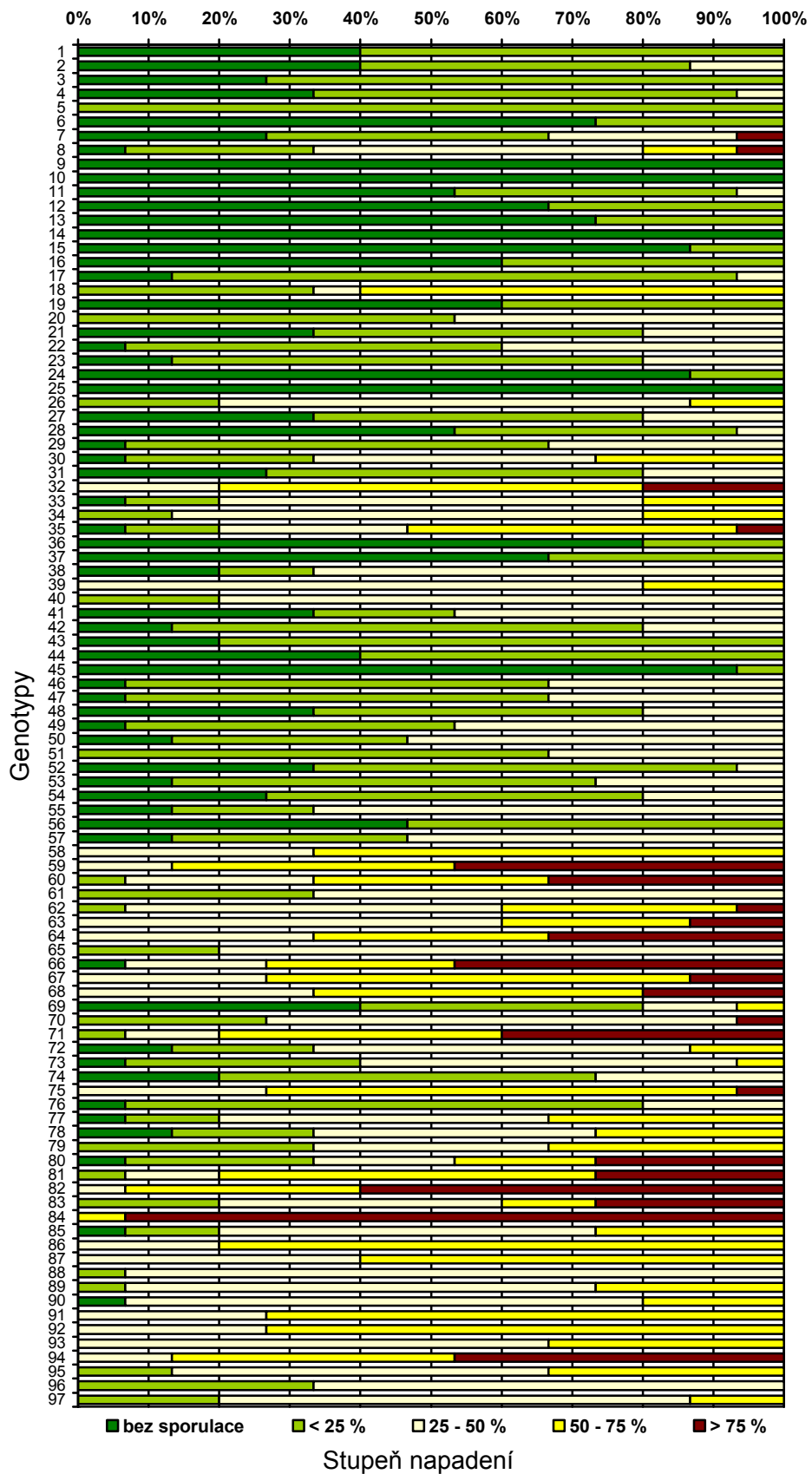
Následující text charakterizuje výsledné reakce genotypů a taxonů (druhů) na infekci konkrétními izoláty *P. cubensis*. Podrobněji se tak věnuje povaze a variabilitě zkoumané interakce.

5.1.1.1 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 1/88

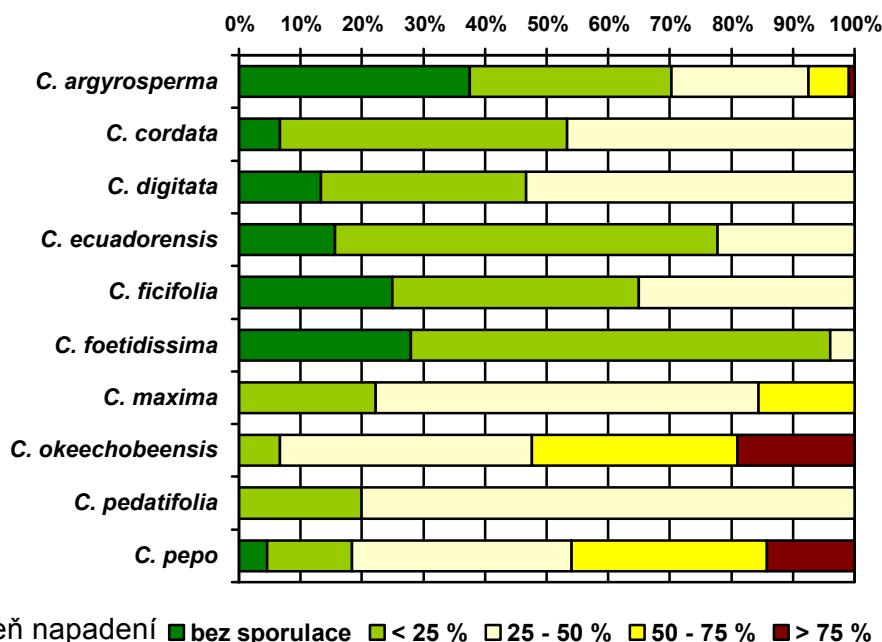
Z konečného hodnocení interakce, které je také výše znázorněno graficky (Graf 1a), lze vyzorovat velkou rozmanitost reakcí genotypů na izolát 1/88. Vyskytují se mezi nimi také některé výrazně heterogenní reakce (zahrnující celou škálu stupňů sporulace), a to u vzorku č. 40 a č. 45 z taxonu *C. argyrosperma* var. *palmeri*.

Úplná rezistence (DI = 0 %) byla zaznamenána pouze u genotypů *C. argyrosperma* subsp. *sororia* (č. 6, 8, 9, 10, 12, 14 a 16), extrémní náchylnost, při níž sporangiofory pokrývaly více než 50 % plochy všech disků (stupeň 3 a 4), naopak u 2 genotypů *C. argyrosperma* var. *palmeri* (č. 42 a 46). Tato skutečnost odkazuje na významnou variabilitu druhu *Cucurbita argyrosperma* v interakci s *P. cubensis*.

Druhý nejpočetněji zastoupený druh v tomto testování *C. pepo* byl rovněž v reakci s izolátem 1/88 značně variabilní. Jako nejodolnější se jeví (Graf 1b) druh *C. ficifolia* a *C. foetidissima*, které však byly reprezentovány pouze 4, resp. 5 položkami.



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



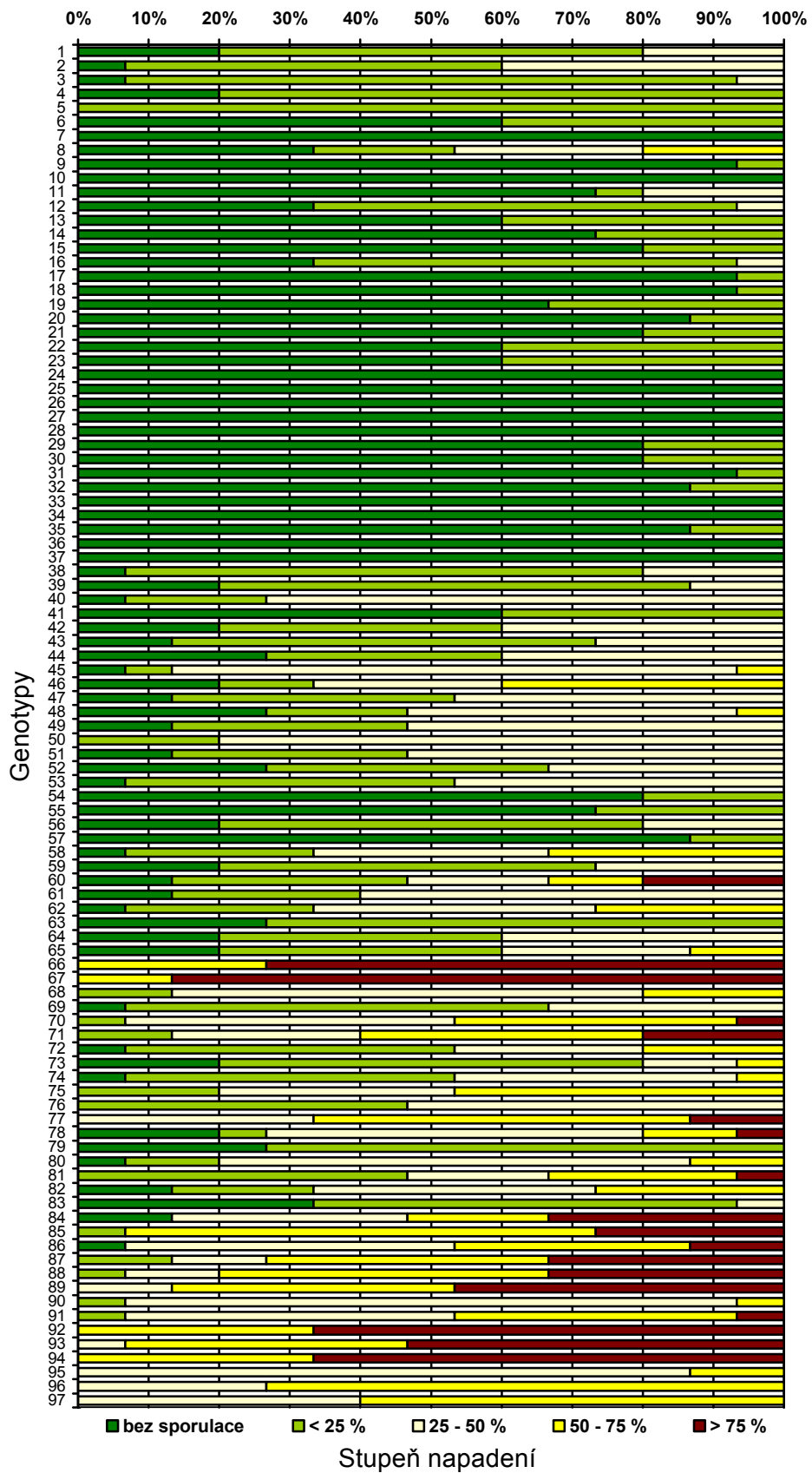
Graf 2b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/96, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.2 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 6/96

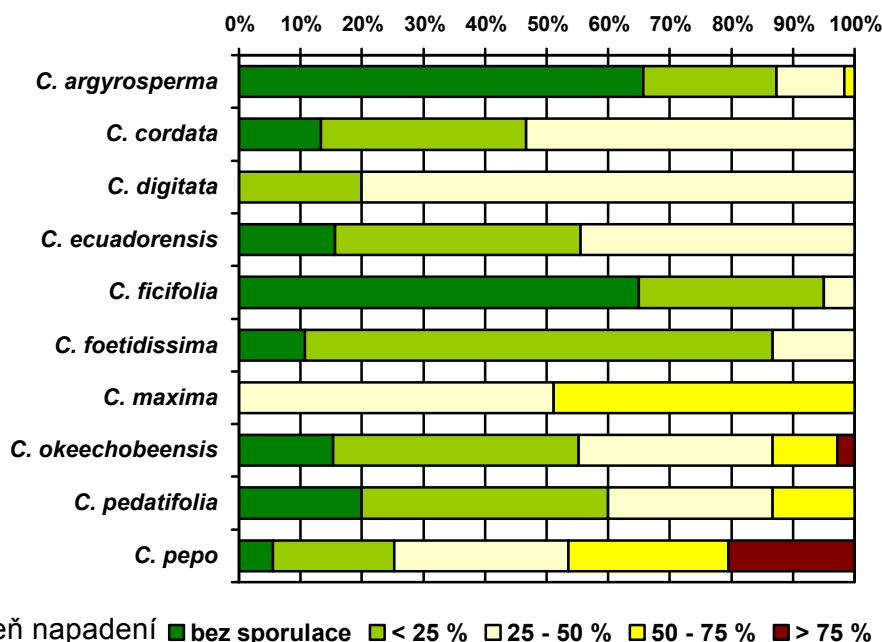
Ve studované interakci souboru genotypů s izolátem 6/96 pozorujeme velkou variabilitu, která se mj. projevuje vysokým počtem heterogenních odpovědí (se zastoupením čtyř až pěti různých stupňů sporulace). Například u genotypů č. 7, 8, 35, 66 a 80 (z různých taxonů) byly pozorovány 14 dní po inokulaci PC 6/96 disky bez sporulace i s téměř 100% sporulací.

Zcela rezistentní reakci vykazovaly genotypy č. 9, 10, 14 a 25, patřící do taxonu *C. argyrosperma* subsp. *sororia*. Na druhé straně jediný genotyp, který byl výrazně náchylný vůči tomuto izolátu, je ze skupiny *C. pepo* var. *texana* (č. 84).

Rezistenci, resp. náchylnost druhů *Cucurbita* spp. vůči izolátu 6/96 lze vyčíst z grafu 2b. Největší počet rezistentních reakcí byl zjištěn v rámci druhu *C. foetidissima* a *C. ecuadorensis*. Variabilita interakce byla výrazná u druhu *C. pepo*, v menší míře také u *C. argyrosperma* a *C. okeechobeensis*.



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



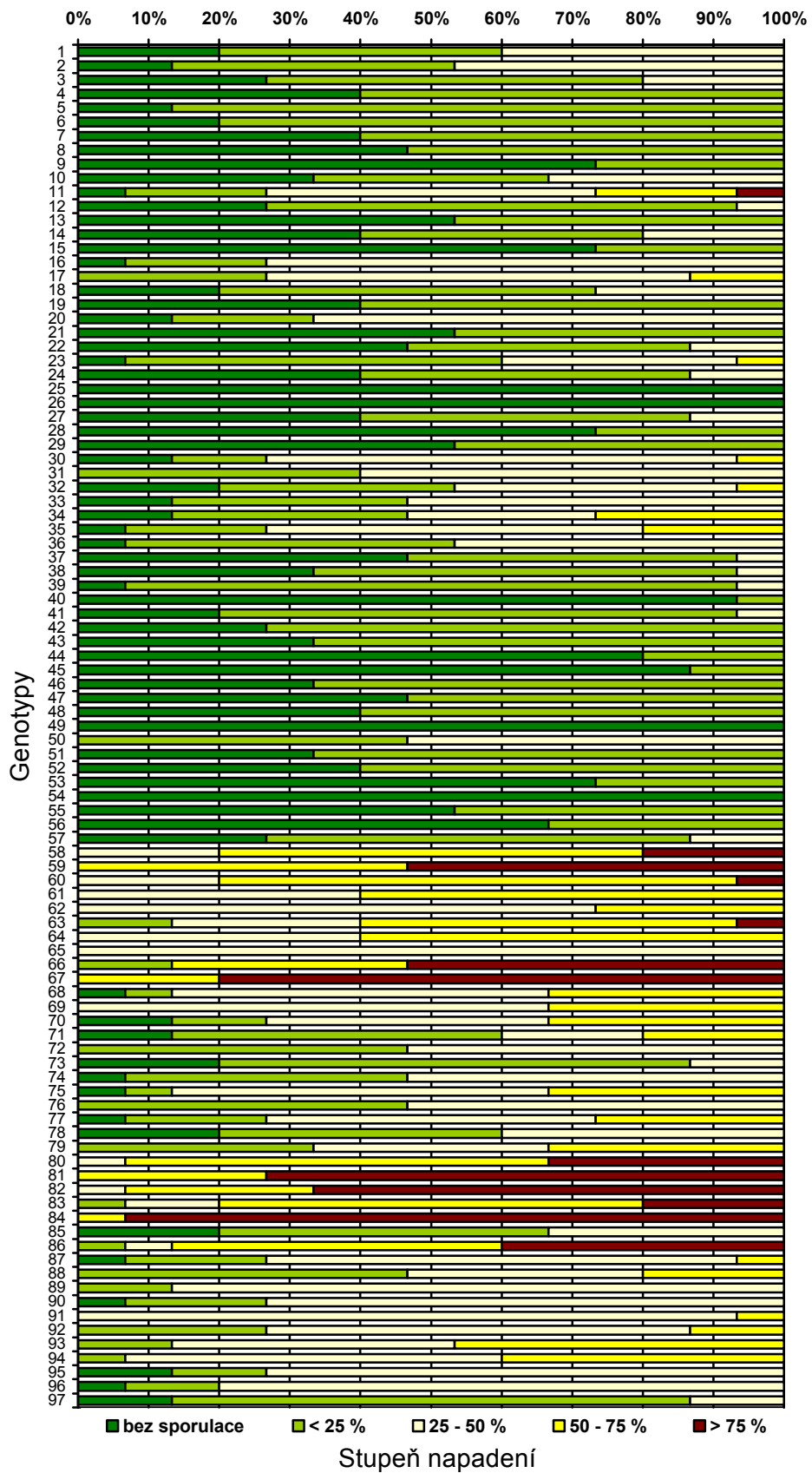
Graf 3b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/97, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.3 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 1/97

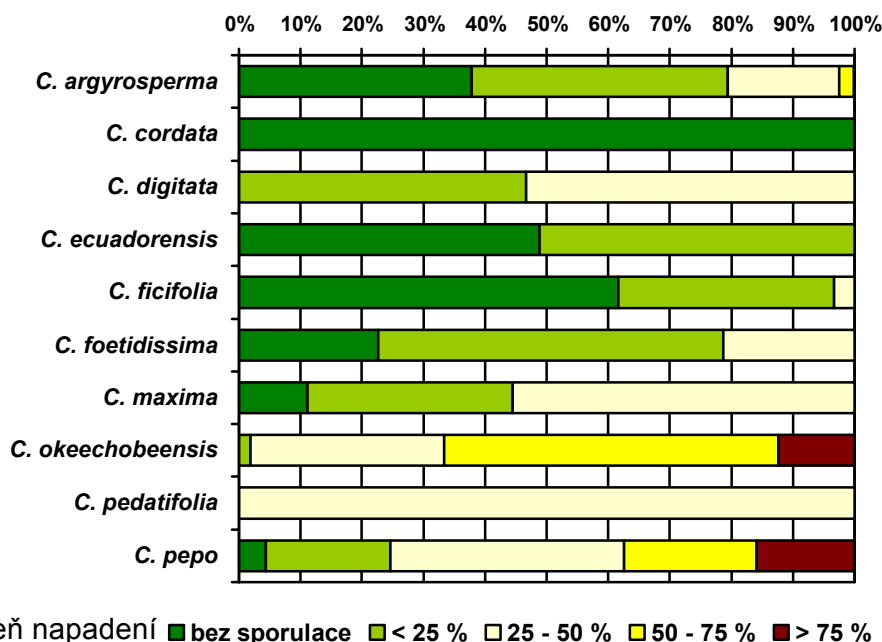
Z grafu 3a je patrná velká odlišnost výsledné reakce genotypů na vysoce virulentní izolát 1/97 (viz kap. 4.2) mezi dvěma částmi testovaného souboru. Zatímco genotypy z první části souboru vykazovaly spíše odolnost (a rezistentních reakcí v tomto případě byla podstatná část), reakce vzorků z druhé části jsou více variabilní – obsahují heterogenní (např. genotypy č. 60, 78, 84 a 86) i vysoce náchylné odpovědi.

Úplná rezistence byla pozorována u 7 genotypů *C. argyrosperma* subsp. *sororia* a 4 genotypů *C. argyrosperma* var. *palmeri* (viz Graf 3a); náchylnost (stupeň sporulace 3 a 4 u všech terčků) projevily 4 genotypy ze 3 taxonů *C. pepo* (č. 66, 67, 92 a 94).

Nejvariabilnější druhy v interakci s izolátem PC 1/97 byly *Cucurbita pepo* a *Cucurbita okeechobeensis*. Oproti tomu málo variabilní, zato nejvíce rezistentní reakci projevila druh *C. ficifolia*.



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



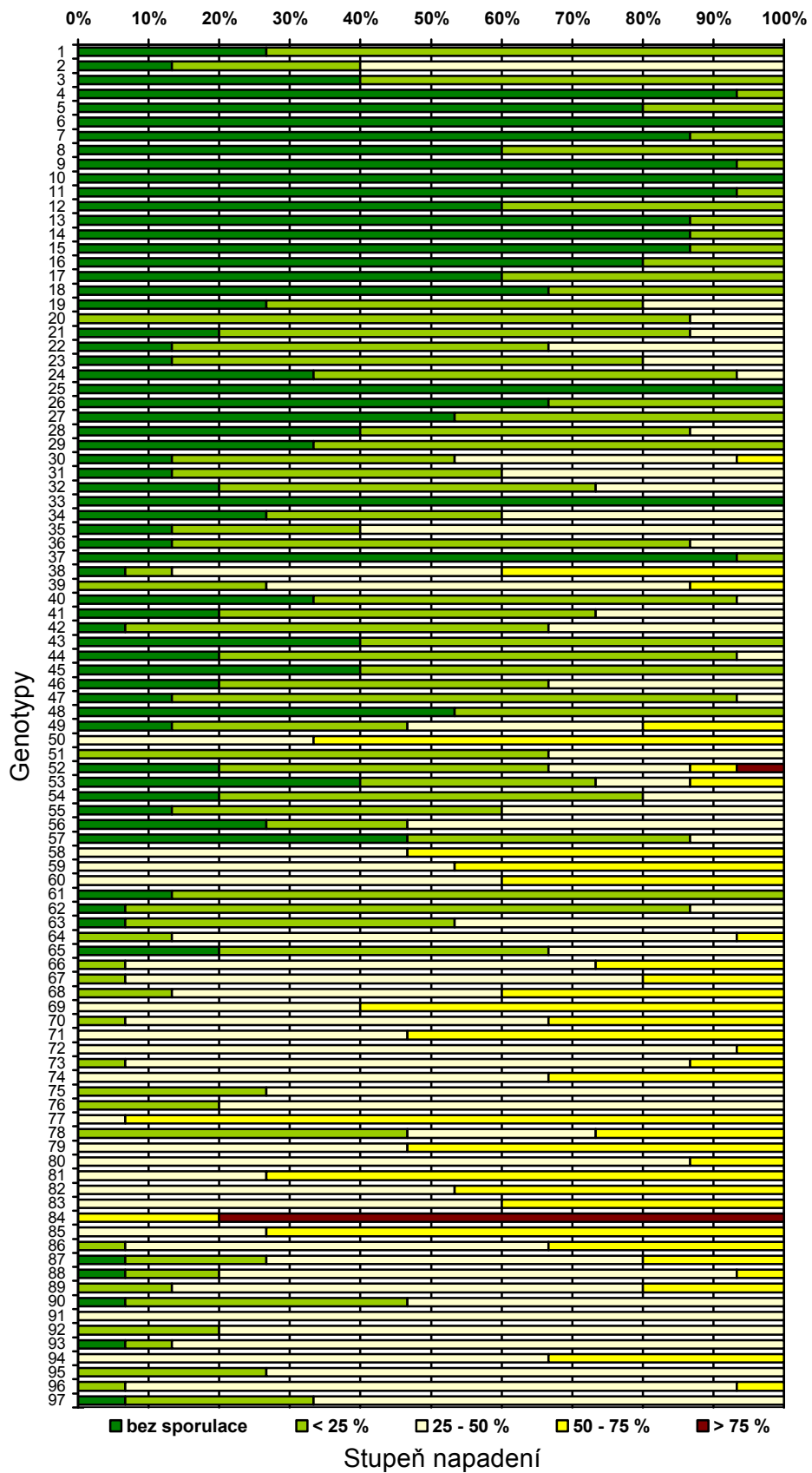
Graf 4b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 6/97, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.4 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 6/97

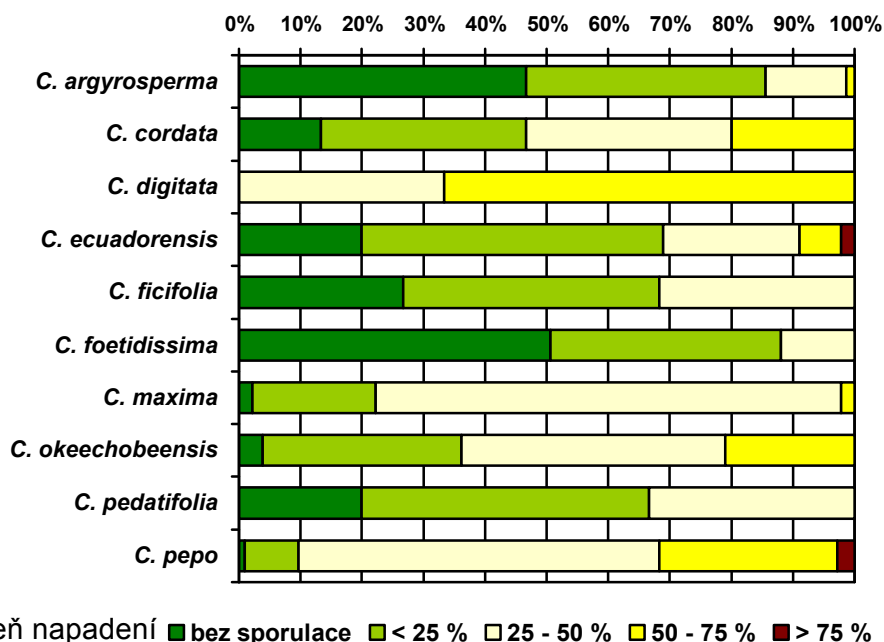
Izolát *P. cubensis* 6/97 patří oproti předchozímu izolátu (vzhledem k reakci na diferenční soubor) k izolátům s nízkou virulencí. To však neznamená, že má také nižší virulenci vůči danému souboru a tento příklad je toho důkazem (viz řada náchylných reakcí především v druhé části testovaného souboru). Výrazně heterogenní reakce byla pozorována jen u genotypu č. 11, avšak odlišná reakce mezi různými rostlinami stejného genotypu nebyla výjimečná.

Všechny disky genotypů č. 25, 26 (*C. argyrosperma* subsp. *sororia*), 49 (*C. cordata*) a 54 (*C. ficifolia*) zůstaly bez sporulace, což značí odolnost těchto genotypů vůči PC 6/97. Vysoce náchylné vůči tomuto izolátu byly genotypy č. 59, 67, 81 a 84.

Jak již bylo předesláno, variabilita této interakce v rámci jednotlivých genotypů nebyla příliš vysoká, přesto v rámci druhu *C. pepo* byly zastoupeny disky se všemi stupni sporulace. Souhrn reakcí zástupců ostatních druhů lze vidět na grafu 4b. Při jeho zkoumání je však nutné mít na paměti nerovnoměrné rozložení genotypů do druhů. Odolnými vůči izolátu 6/97 byli především zástupci druhů *C. cordata*, *C. ecuadorensis* a *C. ficifolia*.



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



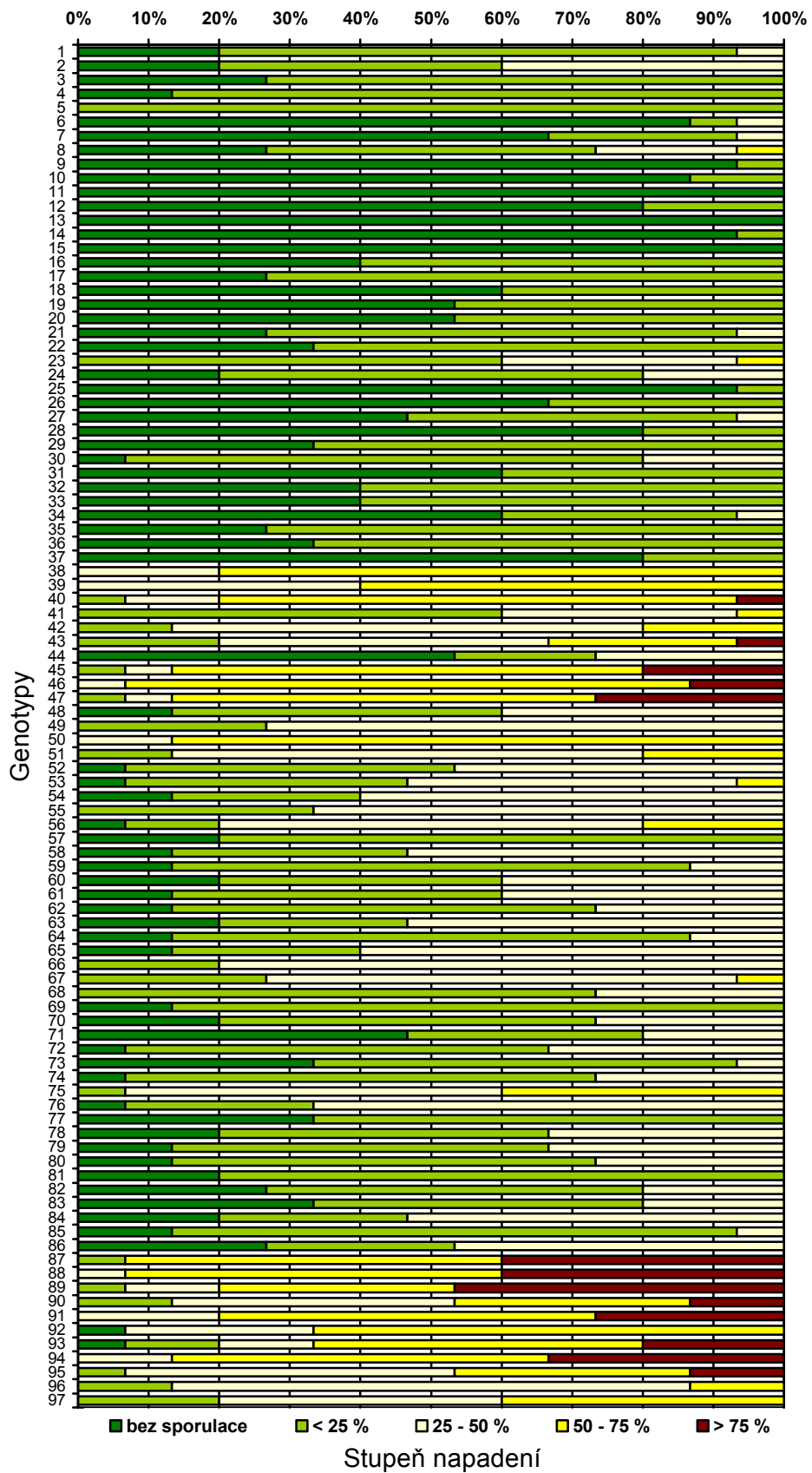
Graf 5b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/95, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.5 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 2/95

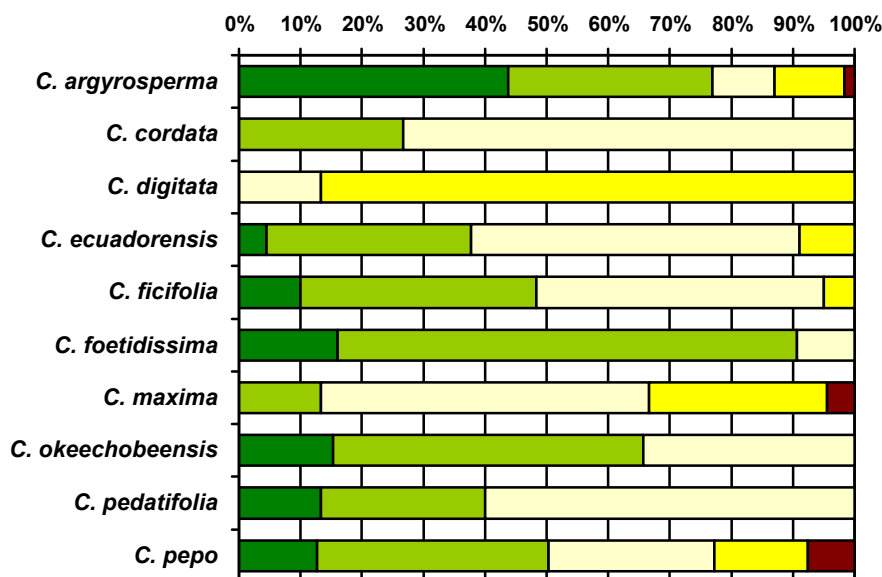
Genotypy *Cucurbita* spp. vykazovaly vůči izolátu PC 2/95 většinou homogenní odpověď (heterogenní jen u č. 52) a v této reakci se jen zřídka objevil stupeň sporulace 4 (pouze o dvou genotypů).

Rezistence (DI = 0 %) byla zaznamenána u genotypů z první části testovaného souboru z druhu *C. argyrosperma* (č. 6, 10, 25 a 33), zatímco extrémní náchylnost jen u jednoho genotypu *C. pepo* var. *texana* (č. 84).

Z hlediska interakce s izolátem 2/95 se nejvíce variabilní jeví druhy *C. ecuadorensis* a *C. pepo*, rezistence je patrná u druhu *C. foetidissima*.



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



Stupeň napadení ■ bez sporulace ■ < 25 % □ 25 - 50 % ■ 50 - 75 % ■ > 75 %

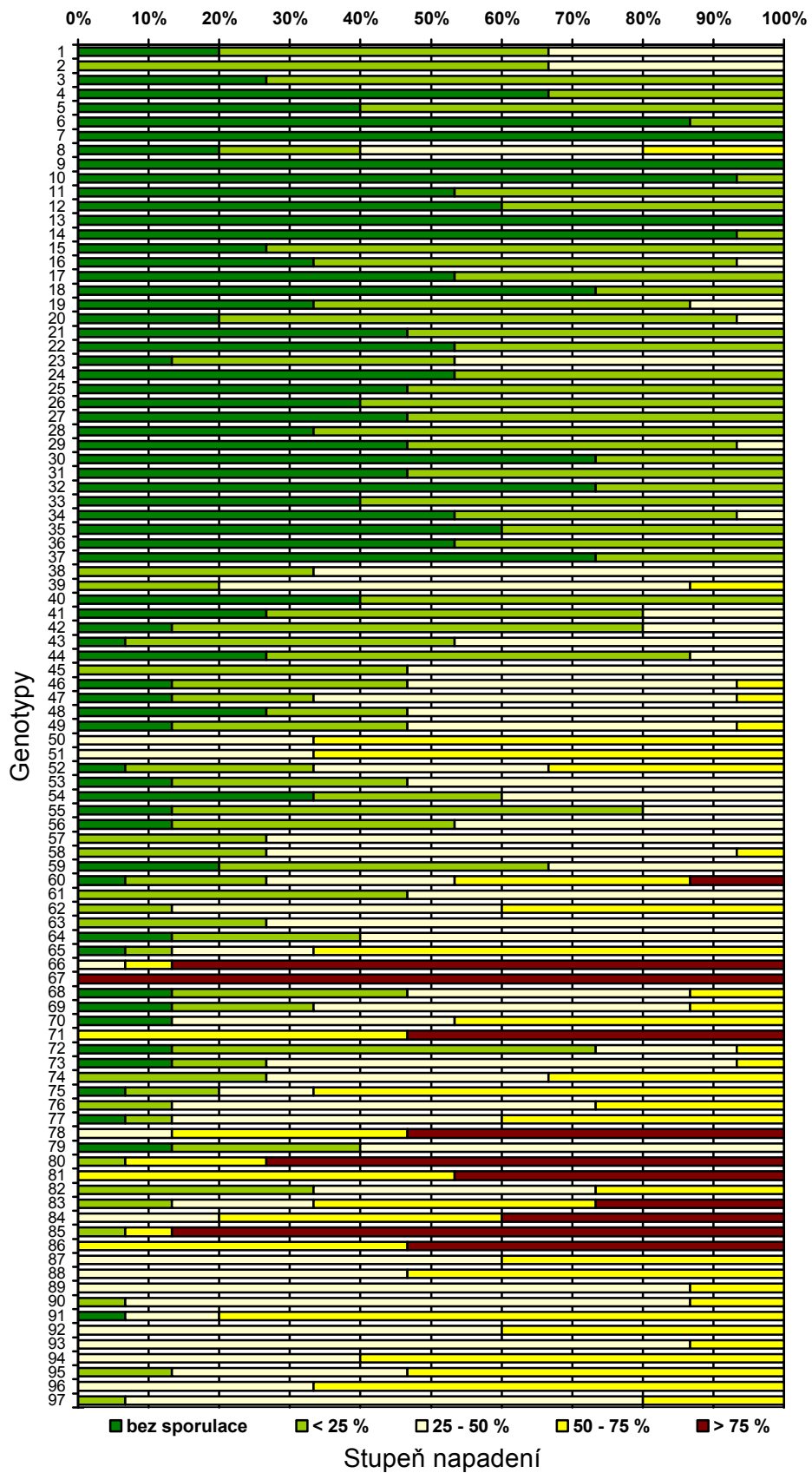
Graf 6b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 1/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.6 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 1/00

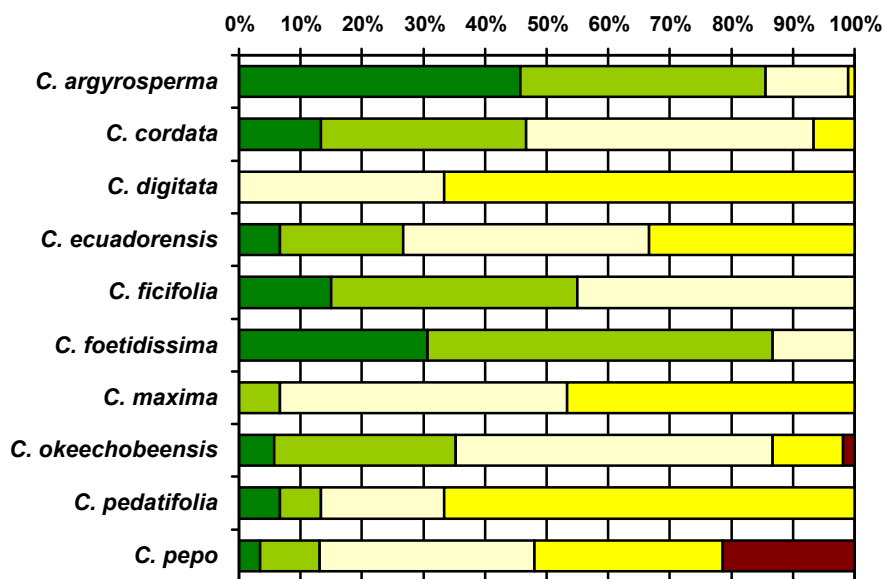
Podle charakteru interakce testovaných genotypů s izolátem PC 1/00, lze tento izolát označit za málo virulentní. V reakcích rostlin převažuje rezistence, jak lze vypožorovat z tabulky kvalitativního hodnocení (Tab. 5.1a) i z převládající zelené barvy v grafu 6a. Heterogenní odpověď se vyskytovala jen velmi vzácně (např. u č. 93).

Navzdory časté neúplné rezistentní reakci genotypů, byla úplná rezistence (bez jediné leze *P. cubensis* na disku) pozorována jen u tří genotypů (č. 11, 13 a 15) taxonu *C. argyrosperma* subsp. *sororia*. Vysoce náchylná reakce na tento izolát nebyla mezi genotypy *Cucurbita* spp. pozorována, ale celkové množství disků se stupněm sporulace 4 nebylo zanedbatelné.

Nejvíce variabilními v interakci s izolátem 1/00 se ukázaly druhy *C. pepo* a *C. argyrosperma*, reakce většiny ostatních druhů by mohla být označena za homogenní. Největší odolnost prokázal druh *Cucurbita foetidissima*.



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



Stupeň napadení ■ bez sporulace ■ < 25 % □ 25 - 50 % ■ 50 - 75 % ■ > 75 %

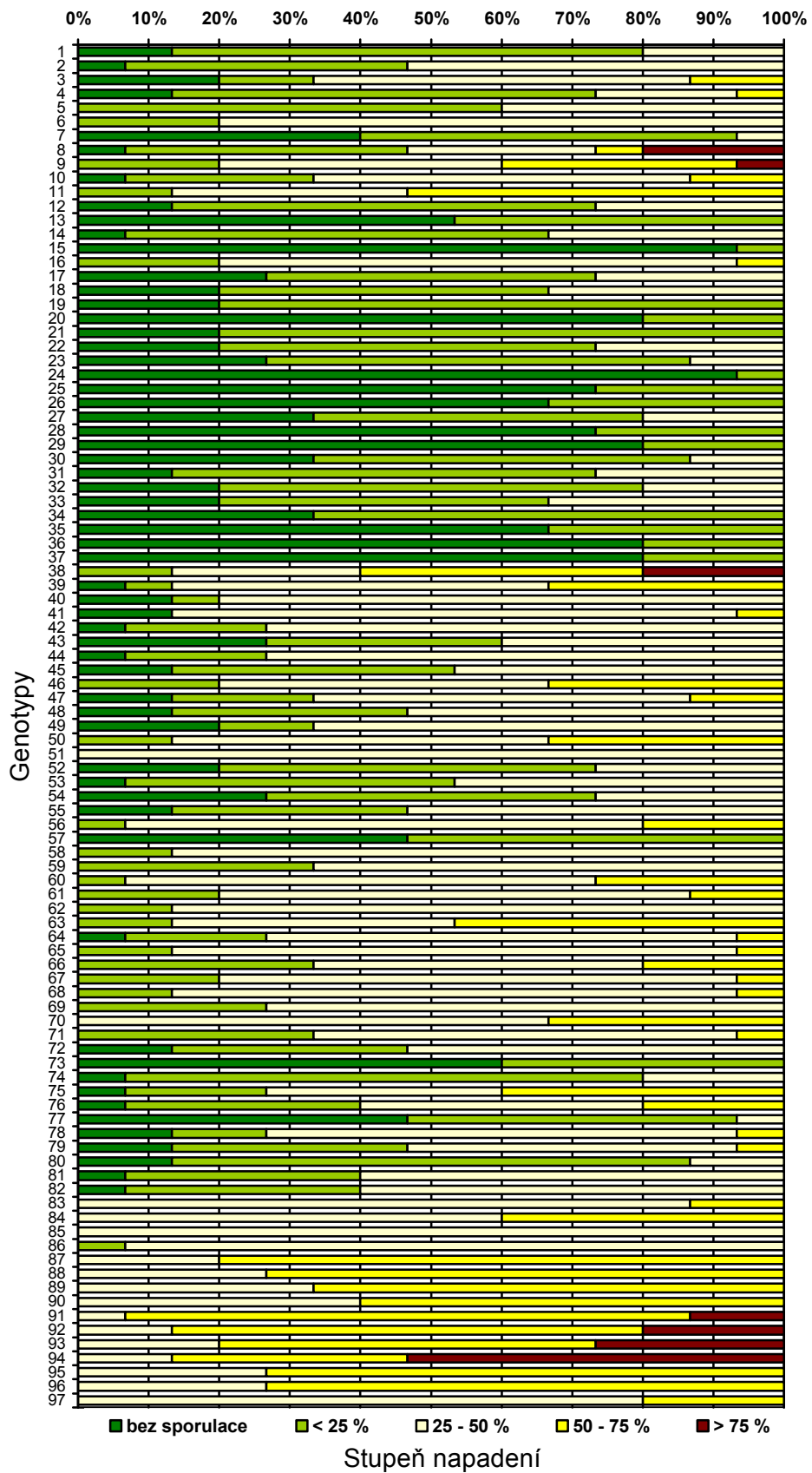
Graf 7b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.7 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 2/00

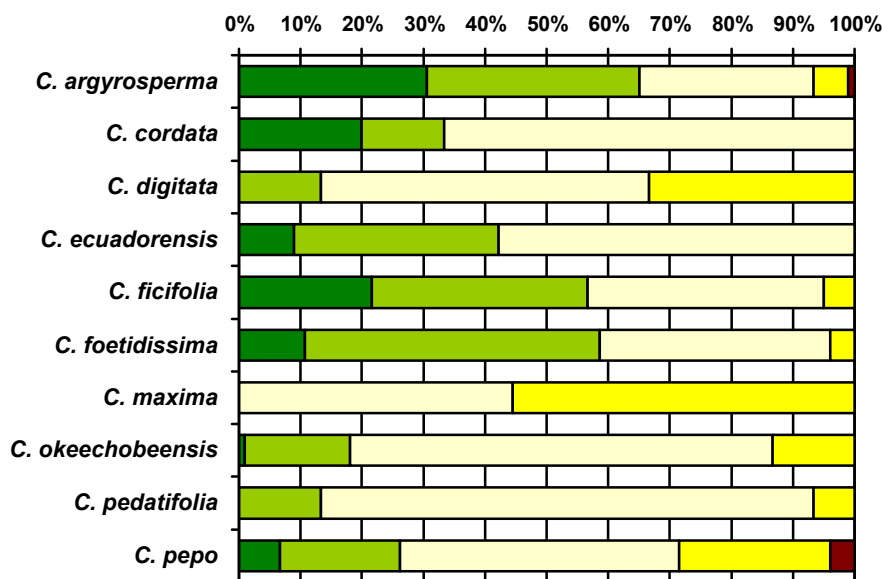
V reakcích genotypů testovaného souboru na izolát 2/00 byla zastoupena jak úplná rezistence, tak výrazná náchylnost. Většina genotypů však neprokázala takovou jednoznačnost odpovědi, i když většina pozorovaných reakcí měla homogenní charakter. Extrémní heterogenita reakce byla hodnocena pouze u genotypu č. 60, náležící do taxonu *C. okeechobeensis* var. *martinezii*.

Zcela odolné, se stupněm napadení 0 %, byly genotypy s pořadovými čísly 7, 9 a 13. Maximální náchylnost se stupněm napadení 100 % vykázal genotyp č. 67 (*C. pepo*), vysoký stupeň náchylnosti byl zaznamenán také u genotypů č. 71, 81 a 86, patřících rovněž do druhu *C. pepo*.

Také díky náchylným reakcím zmíněných genotypů byly nejvíce variabilními druhy v této interakci *C. pepo* a *C. okeechobeensis*. Druh *C. foetidissima* byl nejvíce rezistentní ze všech 10 druhů a určitý stupeň odolnosti byl vypořádan ve finální reakci genotypů druhu *C. argyrosperma* na daný izolát.



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



Stupeň napadení ■ bez sporulace ■ < 25 % □ 25 - 50 % □ 50 - 75 % ■ > 75 %

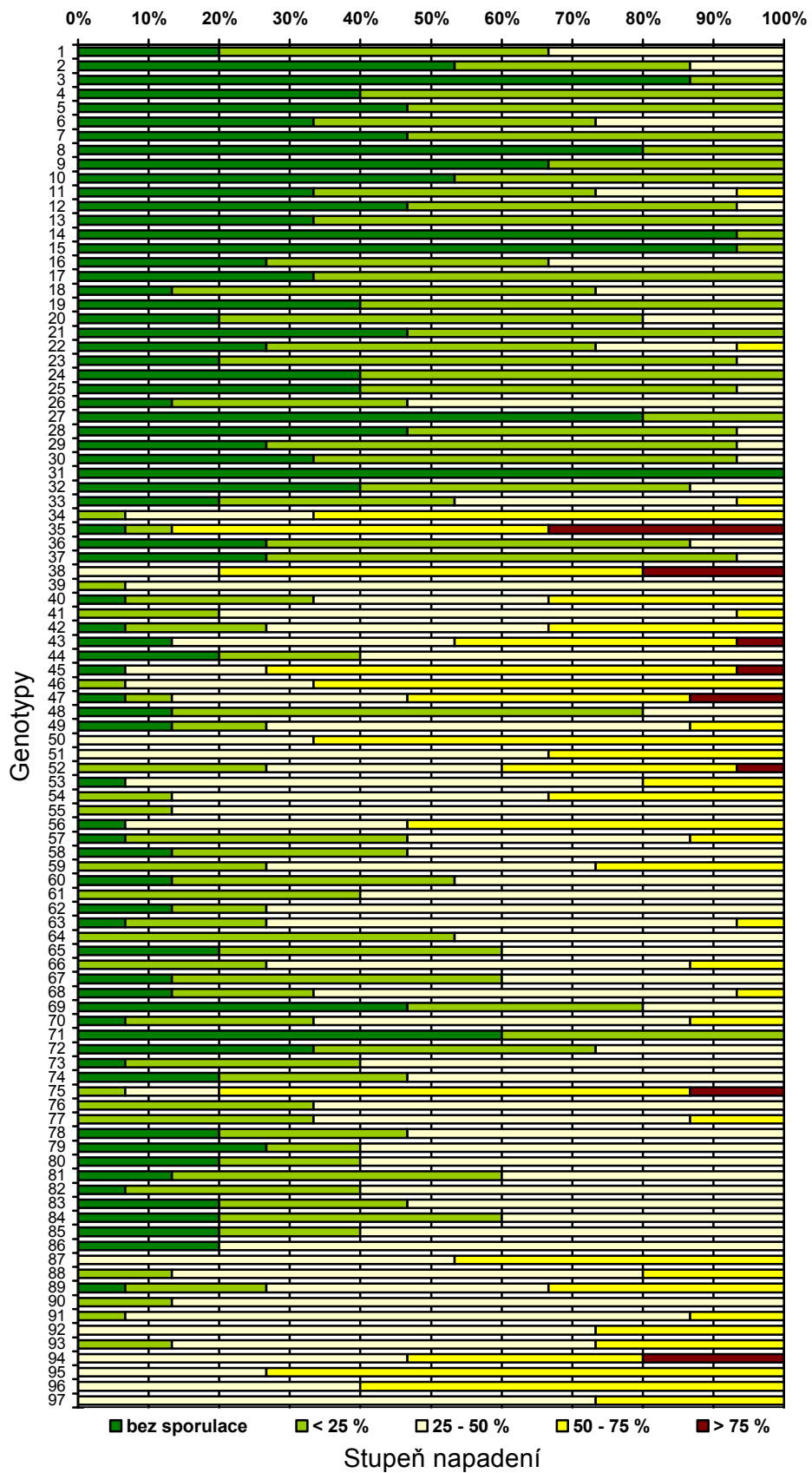
Graf 8b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 3/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.8 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 3/00

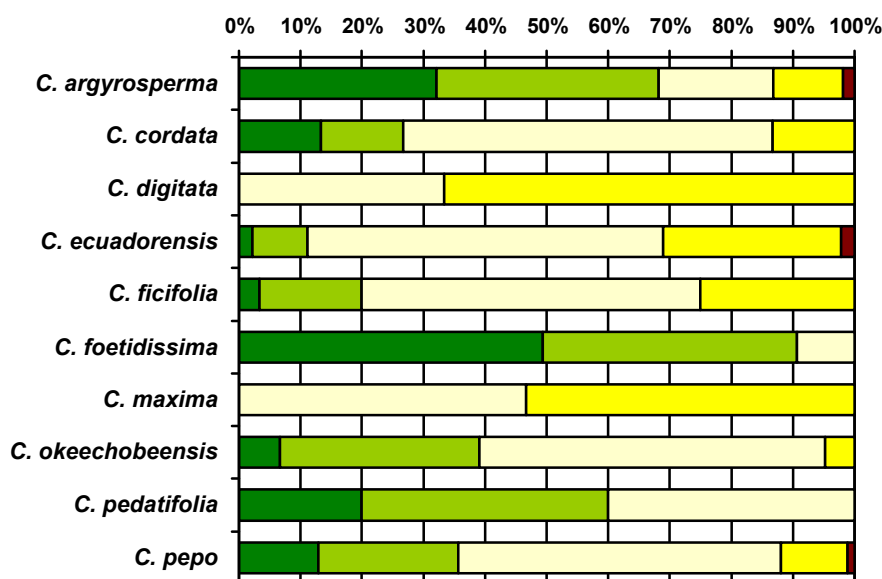
Disky testovaných genotypů *Cucurbita* spp. byly z velké části izolátem 3/00 snadno napadeny, velice často se vyskytoval stupeň sporulace 2, ale také 1 a 3 (viz grafy 8a a 8b). Přestože extrémní hodnoty nebyly časté a v souboru nebyl přítomen ani jeden genotyp, který by byl zcela rezistentní či výrazně náchylný vůči PC 3/00, je tento izolát hodnocen za jeden z nejvíce virulentních, které byly ve studii použity.

Zajímavá je také skutečnost, že heterogenní odpověď vykazaly dva genotypy *C. argyrosperma* subsp. *sororia* (č. 8 a 9), které byly vůči většině ostatním izolátům rezistentní.

Mezi druhy s největší variabilitou reakce byly i v tomto případě zařazeny *C. pepo* a *C. argyrosperma*. U všech druhů převládly vyšší stupně napadení, jen u druhu *C. argyrosperma* frekvence stupňů 0 a 1 (žádné či mírné sporulace) překročila 60% plochy všech disků.



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



Stupeň napadení ■ bez sporulace ■ < 25 % □ 25 - 50 % ■ 50 - 75 % ■ > 75 %

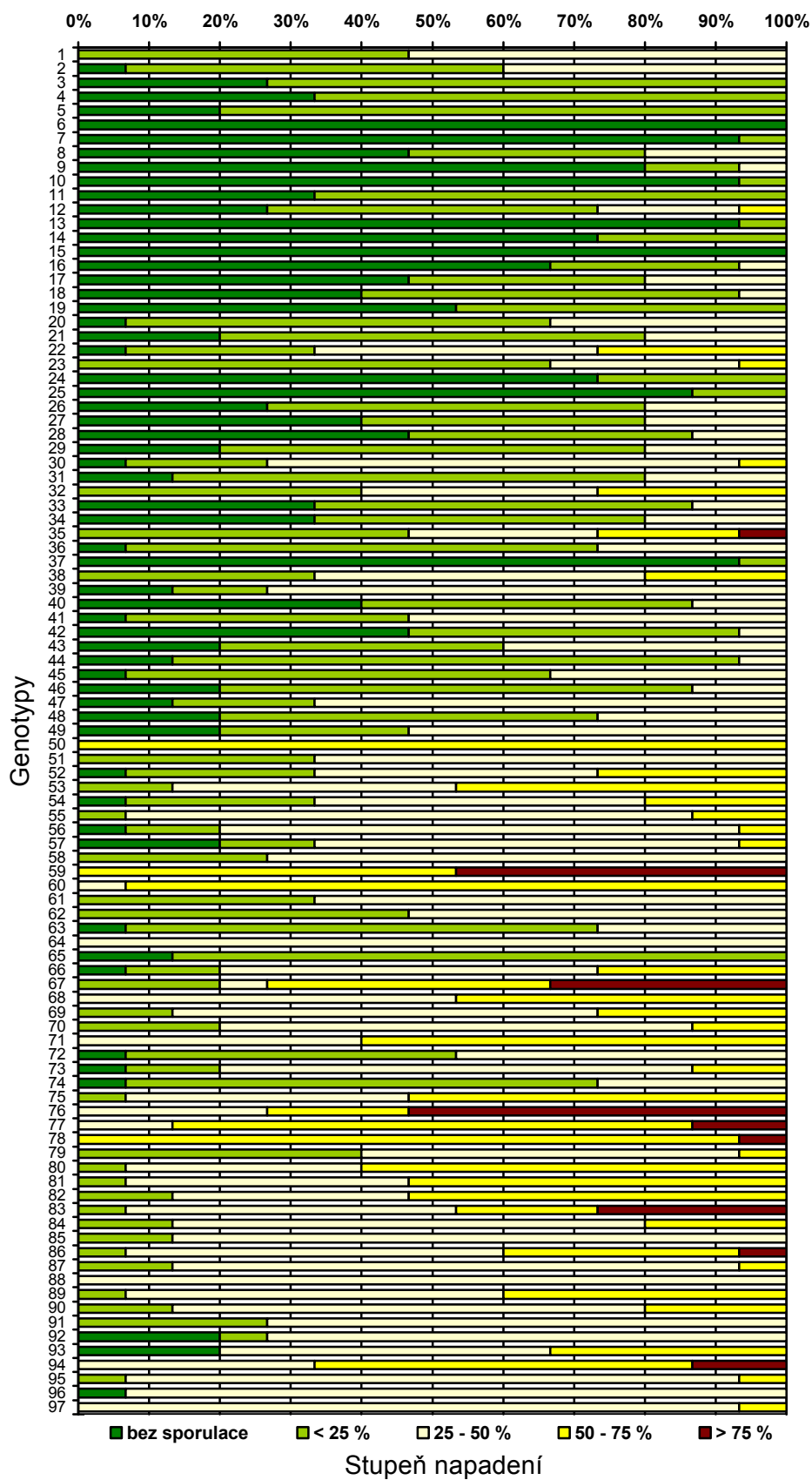
Graf 9b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 11/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.9 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 11/00

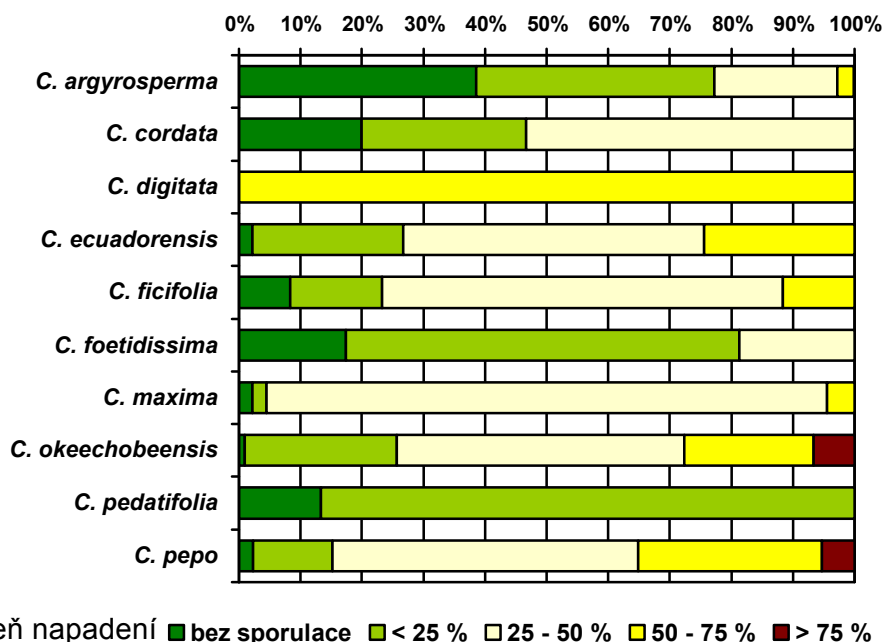
Oproti několika předchozím izolátům se v rámci interakce 97 genotypů s izolátem PC 11/00 vyskytlo poměrně velké množství heterogenních reakcí (viz např. reakce genotypů *C. argyrosperma* var. *palmeri* č. 35, 43, 45 a 47). Variabilita reakce určitých genotypů tedy byla celkem vysoká, ale jednalo se jen o ojedinělé případy.

Zcela rezistentní byl pouze genotyp č. 31, zástupce stejného taxonu, *C. argyrosperma* var. *palmeri*. Stupeň sporulace č. 4 se mezi výslednými reakcemi disků vykytoval jen sporadicky. U žádného z genotypů tedy nebyla pozorována výrazná náchylnost.

Mezi druhy, u nichž se v konečné reakci na izolát 11/00 objevily všechny stupně sporulace (0 až 4), byly dva nejhojněji zastoupené (*C. argyrosperma* a *C. pepo*) a jeden s pouhými třemi položkami (*C. ecuadorensis*).



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



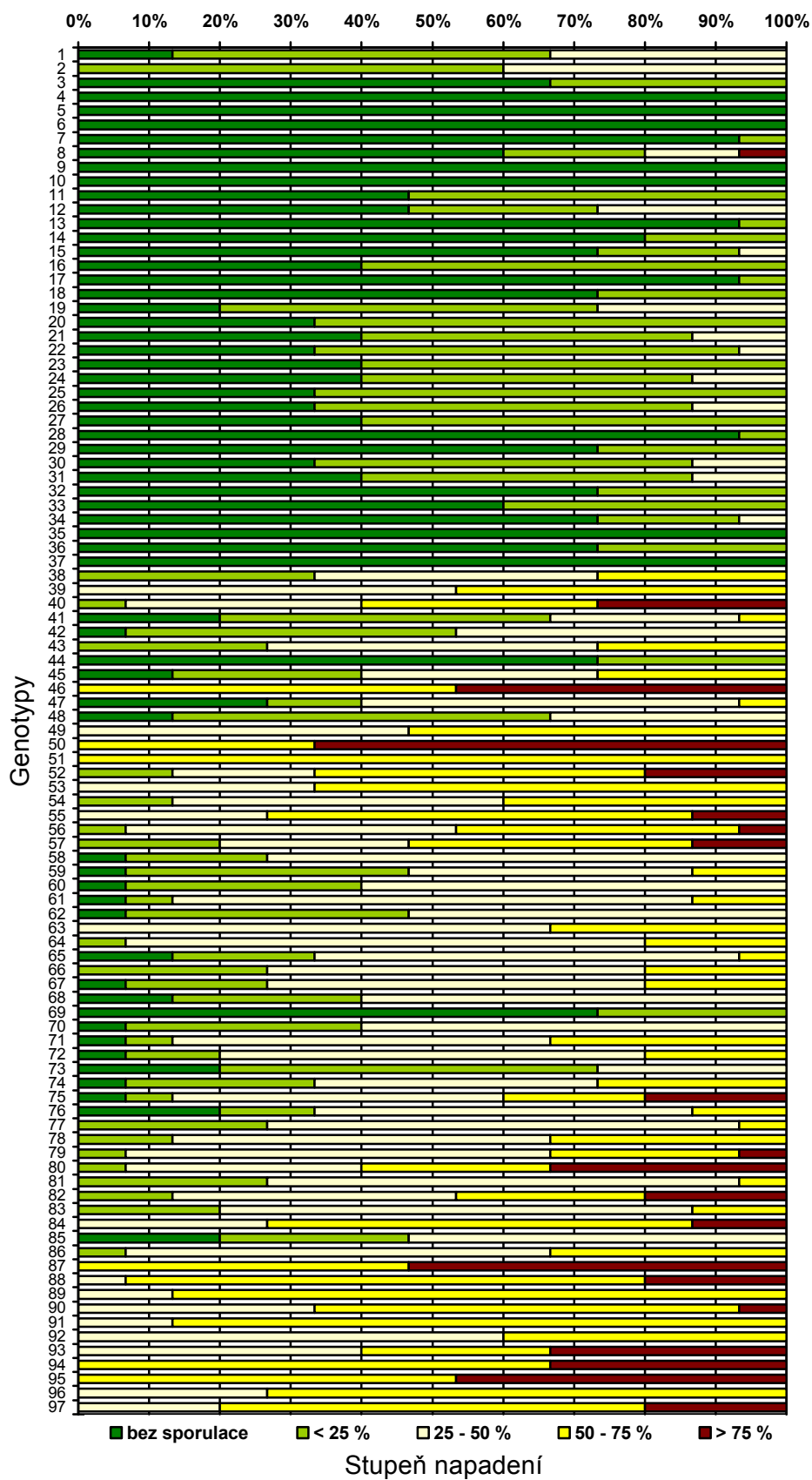
Graf 10b: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 12/00, 14 dpi) u jednotlivých druhů *Cucurbita* spp.

5.1.1.10 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 12/00

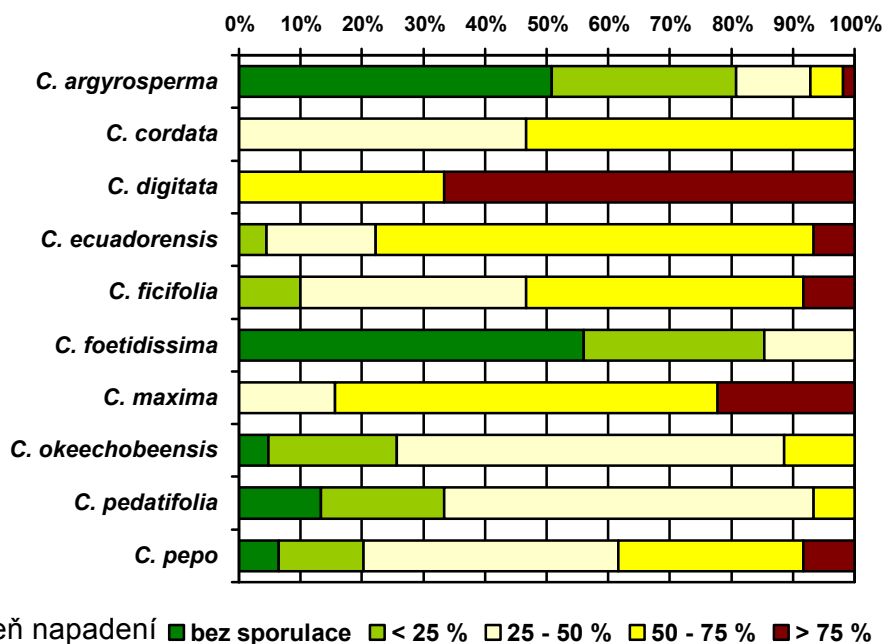
V první polovině testovaného souboru měla interakce genotypů s izolátem 12/00 charakter rezistence nebo mírné náchylnosti, v druhé polovině se náchylnost genotypů zvyšovala a infekce se stávala závažnější (převažují stupně sporulace 2 a 3). S pohledem na graf 10a lze říci, že reakce popsané v předchozích větách měly až na pár výjimek homogenní ráz.

Genotypy s absolutní odolností se nacházejí v první polovině souboru (č. 6 a 15), na druhé straně nejvíce náchylné genotypy najdeme v druhé části (č. 50, 59 a 78). Naposledy zmíněné položky patří po řadě do druhů *C. digitata*, *C. okeechobeensis* subsp. *martinezii* a *C. pepo* var. *texana*.

Právě druhy *C. okeechobeensis* a *C. pepo* byly nejvíce variabilní v interakci s izolátem PC 12/00, jak ukazuje graf 10b. Významnou odolnost kromě druhu *C. foetidissima* prokázal také druh *C. pedatifolia*, který byl však v testování reprezentován pouze jedním genotypem.



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



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

5.1.1.11 Reakce genotypů a taxonů *Cucurbita* spp. na izolát PC 14/00

V interakci genotypů *Cucurbita* spp. s izolátem *P. cubensis* 14/00 byla pozorována významná variabilita, která se více projevovala mezi genotypy než mezi testovanými terčíky jednoho genotypu. Relativně vysoký počet (13) genotypů reagoval extrémně rezistentně či extrémně náchylně. Pouze u genotypů č. 8 a 75 nebyla zjištěna jasná odpověď (některé disky byly velmi náchylné, jiné naopak odolné).

Jako zcela rezistentní vůči PC 14/00 se ukázaly genotypy patřící do druhů *C. foetidissima* (č. 4, 5 a 6) a *C. argyrosperma* (č. 9, 10, 35 a 37). Náchylnost nejvyššího stupně (stupeň sporulace 3 a 4) vykazalo celkem šest genotypů z šesti různých taxonů (č. 46, 50, 51, 87, 94 a 95), což bezesporu představuje zajímavý fakt.

Z grafu 11b je patrná velká různorodost reakcí v rámci zastoupených druhů. K variabilním druhům této interakce, jako jsou *C. pepo* a *C. argyrosperma*, lze přiřadit také druhy *C. ficifolia* a *C. ecuadorensis*. Přes 80 % disků se stupněm sporulace 0 a 1 bylo zaznamenáno u *C. foetidissima* a *C. argyrosperma*, které představují nejvíce odolné druhy interakce s izolátem 14/00.

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

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

Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)										
	1/88	6/96	1/97	6/97	2/95	1/00	2/00	3/00	11/00	12/00	14/00
51	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
52	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
53	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
54	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
55	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
56	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
57	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
58	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
59	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
60	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
61	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
62	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
63	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
64	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
65	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
68	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
69	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
70	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
71	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
72	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
73	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
74	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
77	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
78	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
79	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
80	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
81	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
82	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
83	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
84	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
85	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
86	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
97	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 5.1b Stupeň napadení (DI) genotypů *Cucurbita* spp. izoláty *P. cubensis* (% , 14 dpi)

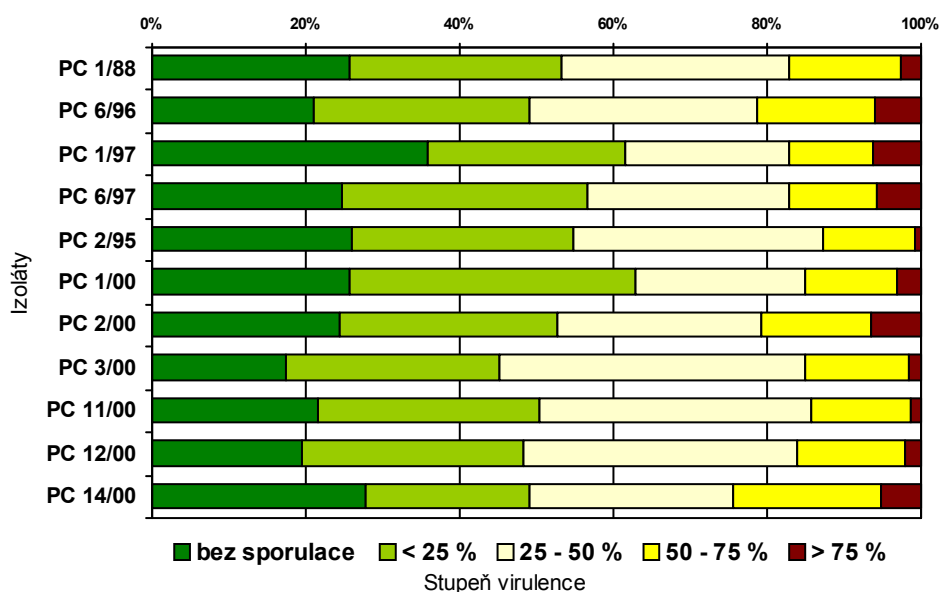
Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)										
	1/88	6/96	1/97	6/97	2/95	1/00	2/00	3/00	11/00	12/00	14/00
1	30,0	15,0	25,0	30,0	18,3	21,7	28,3	26,7	28,3	38,3	30,0
2	30,0	18,3	33,3	33,3	36,7	30,0	33,3	36,7	15,0	33,3	35,0
3	3,3	18,3	25,0	23,3	15,0	18,3	18,3	40,0	3,3	18,3	8,3
4	6,7	18,3	20,0	15,0	1,7	21,7	8,3	30,0	15,0	16,7	0,0
5	3,3	25,0	25,0	21,7	5,0	25,0	15,0	35,0	13,3	20,0	0,0
6	0,0	6,7	10,0	20,0	0,0	5,0	3,3	45,0	23,3	0,0	0,0
7	3,3	30,0	0,0	15,0	3,3	10,0	0,0	16,7	13,3	1,7	1,7
8	0,0	46,7	33,3	13,3	10,0	26,7	40,0	48,3	5,0	18,3	18,3
9	0,0	0,0	1,7	6,7	1,7	1,7	0,0	56,7	8,3	6,7	0,0
10	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0	3,3	1,7	43,3	11,7	1,7	0,0
11	8,3	13,3	11,7	50,0	1,7	0,0	11,7	60,0	25,0	16,7	13,3
12	0,0	8,3	18,3	20,0	10,0	5,0	10,0	28,3	15,0	26,7	20,0
13	13,3	6,7	10,0	11,7	3,3	0,0	0,0	11,7	16,7	1,7	1,7
14	0,0	0,0	6,7	20,0	3,3	1,7	1,7	31,7	1,7	6,7	5,0
15	13,3	3,3	5,0	6,7	3,3	0,0	18,3	1,7	1,7	0,0	8,3
16	0,0	10,0	18,3	41,7	5,0	15,0	18,3	46,7	26,7	10,0	15,0
17	63,3	23,3	1,7	46,7	10,0	18,3	11,7	25,0	16,7	18,3	1,7
18	38,3	56,7	1,7	26,7	8,3	10,0	6,7	28,3	28,3	16,7	6,7
19	33,3	10,0	8,3	15,0	23,3	11,7	20,0	20,0	15,0	11,7	26,7
20	76,7	36,7	3,3	38,3	28,3	11,7	21,7	5,0	25,0	31,7	16,7
21	36,7	21,7	5,0	11,7	23,3	20,0	13,3	20,0	13,3	25,0	18,3
22	43,3	33,3	10,0	16,7	30,0	16,7	11,7	26,7	26,7	46,7	18,3
23	25,0	26,7	10,0	35,0	26,7	36,7	33,3	21,7	21,7	35,0	15,0
24	20,0	3,3	0,0	18,3	18,3	25,0	11,7	1,7	15,0	6,7	18,3
25	31,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	13,3	6,7	16,7	3,3	16,7
26	30,0	48,3	0,0	0,0	8,3	8,3	15,0	8,3	35,0	23,3	20,0
27	35,0	21,7	0,0	18,3	11,7	15,0	13,3	21,7	5,0	20,0	15,0
28	28,3	13,3	0,0	6,7	18,3	5,0	16,7	6,7	15,0	16,7	1,7
29	16,7	31,7	5,0	11,7	16,7	16,7	15,0	5,0	20,0	25,0	6,7
30	30,0	46,7	5,0	41,7	35,0	28,3	6,7	20,0	18,3	43,3	20,0
31	30,0	23,3	1,7	40,0	31,7	10,0	13,3	28,3	0,0	26,7	18,3
32	41,7	75,0	3,3	33,3	26,7	15,0	6,7	25,0	18,3	46,7	6,7
33	15,0	48,3	0,0	35,0	0,0	15,0	15,0	28,3	33,3	20,0	10,0
34	25,0	51,7	0,0	41,7	28,3	11,7	13,3	16,7	65,0	21,7	8,3
35	33,3	58,3	3,3	46,7	36,7	18,3	10,0	8,3	75,0	46,7	0,0
36	21,7	5,0	0,0	35,0	25,0	16,7	11,7	5,0	21,7	30,0	6,7
37	21,7	8,3	0,0	15,0	1,7	5,0	6,7	5,0	20,0	1,7	0,0
38	51,7	36,7	28,3	18,3	55,0	70,0	41,7	66,7	75,0	46,7	48,3
39	65,0	55,0	23,3	25,0	46,7	65,0	48,3	53,3	48,3	40,0	61,7
40	50,0	45,0	41,7	1,7	18,3	70,0	15,0	41,7	48,3	18,3	70,0
41	58,3	28,3	10,0	21,7	26,7	36,7	23,3	45,0	46,7	36,7	30,0
42	88,3	26,7	30,0	18,3	31,7	51,7	26,7	41,7	50,0	15,0	35,0
43	63,3	20,0	28,3	16,7	15,0	55,0	35,0	28,3	56,7	30,0	50,0
44	70,0	15,0	28,3	5,0	21,7	18,3	21,7	41,7	35,0	23,3	6,7
45	76,7	1,7	46,7	3,3	15,0	75,0	38,3	33,3	66,7	31,7	43,3
46	91,7	31,7	46,7	16,7	28,3	76,7	36,7	53,3	65,0	23,3	86,7
47	78,3	31,7	33,3	13,3	23,3	76,7	40,0	41,7	61,7	38,3	35,0
48	50,0	21,7	33,3	15,0	11,7	31,7	31,7	35,0	26,7	26,7	30,0
49	53,3	35,0	35,0	0,0	40,0	43,3	36,7	36,7	43,3	33,3	63,3
50	50,0	35,0	45,0	38,3	66,7	71,7	66,7	55,0	66,7	75,0	91,7

Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)										
	1/88	6/96	1/97	6/97	2/95	1/00	2/00	3/00	11/00	12/00	14/00
51	38,3	33,3	35,0	16,7	33,3	51,7	66,7	50,0	58,3	41,7	75,0
52	41,7	18,3	26,7	15,0	33,3	35,0	48,3	26,7	55,0	46,7	68,3
53	36,7	28,3	35,0	6,7	25,0	38,3	35,0	35,0	51,7	58,3	66,7
54	15,0	23,3	5,0	0,0	25,0	36,7	26,7	25,0	55,0	45,0	56,7
55	8,3	38,3	6,7	11,7	31,7	41,7	26,7	35,0	46,7	51,7	71,7
56	38,3	13,3	25,0	8,3	31,7	48,3	33,3	53,3	60,0	45,0	61,7
57	5,0	35,0	3,3	21,7	16,7	20,0	43,3	13,3	40,0	38,3	61,7
58	36,7	66,7	48,3	75,0	63,3	35,0	45,0	46,7	35,0	43,3	41,7
59	21,7	83,3	26,7	88,3	61,7	25,0	28,3	41,7	50,0	86,7	40,0
60	18,3	73,3	48,3	71,7	60,0	30,0	56,7	55,0	33,3	73,3	38,3
61	33,3	41,7	36,7	65,0	21,7	31,7	38,3	48,3	40,0	41,7	48,3
62	30,0	60,0	46,7	56,7	26,7	28,3	56,7	46,7	40,0	38,3	36,7
63	30,0	63,3	18,3	63,3	35,0	33,3	43,3	58,3	43,3	30,0	58,3
64	31,7	75,0	30,0	65,0	48,3	25,0	36,7	43,3	36,7	50,0	53,3
65	36,7	45,0	33,3	50,0	28,3	36,7	61,7	48,3	30,0	21,7	40,0
66	40,0	76,7	93,3	81,7	55,0	45,0	95,0	46,7	46,7	50,0	48,3
67	36,7	71,7	96,7	95,0	53,3	45,0	100,0	46,7	31,7	71,7	46,7
68	45,0	71,7	51,7	53,3	56,7	31,7	38,3	48,3	40,0	61,7	36,7
69	43,3	21,7	31,7	58,3	65,0	21,7	41,7	43,3	18,3	53,3	6,7
70	41,7	46,7	61,7	48,3	56,7	26,7	55,0	58,3	43,3	48,3	38,3
71	38,3	78,3	66,7	36,7	63,3	18,3	88,3	43,3	10,0	65,0	53,3
72	16,7	41,7	40,0	38,3	51,7	31,7	30,0	35,0	23,3	35,0	48,3
73	13,3	40,0	26,7	23,3	51,7	18,3	41,7	10,0	38,3	46,7	26,7
74	6,7	26,7	36,7	36,7	58,3	30,0	51,7	28,3	33,3	30,0	46,7
75	38,3	70,0	56,7	53,3	43,3	58,3	60,0	51,7	71,7	61,7	60,0
76	31,7	28,3	38,3	38,3	45,0	40,0	53,3	43,3	41,7	81,7	40,0
77	25,0	51,7	70,0	48,3	73,3	16,7	55,0	15,0	45,0	75,0	45,0
78	40,0	45,0	45,0	30,0	45,0	28,3	85,0	41,7	33,3	76,7	55,0
79	6,7	50,0	18,3	50,0	63,3	30,0	36,7	36,7	33,3	41,7	58,3
80	30,0	58,3	46,7	81,7	53,3	28,3	90,0	25,0	35,0	63,3	71,7
81	36,7	75,0	48,3	93,3	68,3	20,0	86,7	38,3	31,7	61,7	45,0
82	15,0	88,3	45,0	90,0	61,7	23,3	48,3	38,3	38,3	60,0	63,3
83	13,3	61,7	18,3	73,3	60,0	21,7	70,0	53,3	33,3	66,7	48,3
84	43,3	98,3	65,0	98,3	95,0	33,3	80,0	60,0	30,0	51,7	71,7
85	31,7	50,0	78,3	28,3	68,3	23,3	93,3	50,0	35,0	46,7	33,3
86	40,0	70,0	61,7	80,0	56,7	30,0	88,3	48,3	40,0	60,0	56,7
87	65,0	65,0	73,3	43,3	46,7	81,7	60,0	70,0	61,7	48,3	88,3
88	71,7	48,3	76,7	43,3	45,0	83,3	63,3	68,3	51,7	50,0	78,3
89	66,7	55,0	83,3	46,7	51,7	80,0	53,3	66,7	50,0	58,3	71,7
90	65,0	51,7	50,0	41,7	36,7	61,7	51,7	65,0	46,7	51,7	68,3
91	56,7	68,3	61,7	51,7	50,0	76,7	66,7	76,7	51,7	43,3	71,7
92	51,7	68,3	91,7	46,7	45,0	63,3	60,0	76,7	56,7	38,3	60,0
93	61,7	58,3	86,7	58,3	45,0	65,0	53,3	76,7	53,3	48,3	73,3
94	68,3	83,3	91,7	58,3	58,3	80,0	65,0	85,0	68,3	70,0	83,3
95	65,0	55,0	53,3	40,0	43,3	63,3	60,0	68,3	68,3	50,0	86,7
96	68,3	41,7	68,3	43,3	50,0	50,0	66,7	68,3	65,0	46,7	68,3
97	60,0	48,3	65,0	25,0	40,0	55,0	53,3	55,0	56,7	51,7	75,0

5.1.2 Virulence izolátů *P. cubensis*

Každý z 11 izolátů *P. cubensis*, použitých k testování rezistence/náchylnosti (viz kap. 4.2), byl rovněž hodnocen z hlediska jeho virulence na souboru genotypů *Cucurbita* spp. (na základě frekvence různých stupňů napadení (0-4) listových disků testovaných genotypů, tj. celkem 1455 disků 97 genotypů *Cucurbita* spp.). Pro srovnání virulence reakcí jednotlivých izolátů 14. den po inokulaci byl sestaven graf (Graf 12), z něhož je podle zastoupení různých kategorií virulence zřejmý rozdíl ve virulenci použitých izolátů *P. cubensis*. Obecně lze soubor izolátů charakterizovat nízkým až středním stupněm virulence vzhledem k testovanému souboru *Cucurbita* spp. Odchyly lze pozorovat v četnosti úplné avirulence (0 resp. -) a úplné virulence (4 resp. +). Jako nejméně virulentní se ukázaly izoláty 1/97 a 1/00; naopak za izoláty s vyšším stupněm virulence lze označit 6/96, 6/97, 2/00, 3/00, 12/00 a 14/00.

Tato fakta, která lze vypožorovat z grafu 12, korespondují také s poměrem rezistentních (-) a náchylných (+) reakcí testovaných genotypů *Cucurbita* spp. vůči daným izolátům, které demonstruje tabulka kvalitativního hodnocení (Tab. 5.1a). Například vůči izolátu 1/97 bylo z celkového počtu 97 reakcí 62 rezistentních, vůči izolátu 1/00 dokonce 65. Oproti tomu nejméně rezistentních reakcí bylo zaznamenáno postupně pro izoláty 3/00 (43), 12/00 (45), 14/00 (46) a 6/96 (48). Také z těchto údajů je však patrná celková vyrovnanost souboru použitých izolátů v patogenních vlastnostech, které se však liší v závislosti na hostitelském genotypu, jak bylo popsáno v kapitolách 5.1.1.1 – 5.1.1.11.



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

5.2 Výsledky testování interakce *Cucumis melo* – *P. cubensis*

5.2.1 Reakce genotypů *Cucumis melo* po inokulaci *P. cubensis*

Reakce souboru 22 genotypů melounu cukrového (*Cucumis melo*) na napadení konkrétním izolátem *P. cubensis* byly hodnoceny podle intenzity sporulace na listových discích (stupeň 0-4) tak, jak bylo popsáno v kapitole 4.4. Reakce pozorovaná 14. den po inokulaci je považována za výslednou, a proto bylo konečné hodnocení studované interakce prováděno v tento den. Pro každý z osmi izolátů byl sestaven graf (Graf 13-20) ukazující frekvenci jednotlivých stupňů sporulace *P. cubensis* u každého genotypu při tomto závěrečném hodnocení.

Hned v úvodu je nutné poznamenat, že genotypy č. 5, 8 a 17 nebyly testovány všemi osmi izoláty z důvodu špatné klíčivosti a vývoje rostlin. Chybějící reakce jsou uvedeny v grafech i v tabulce kvalitativního hodnocení (Tab. 5.2a) adekvátním způsobem.

V zastoupení jednotlivých stupňů sporulace 0 až 4 nebyla mezi genotypy *Cucumis melo* pozorována tak velká variabilita jako v případě genotypů *Cucurbita* spp. z předchozího testování, variabilita jejich odpovědi se však výrazně lišila mezi jednotlivými izoláty (viz Graf 13-20). Heterogenní reakce na napadení konkrétním izolátem *P. cubensis*, projevující se mezi disky z různých rostlin daného vzorku *Cucumis melo*, se nevyskytovala často, ale vzhledem k celkovému počtu testovaných reakcí (171), zaujímá relativně významnou část výsledků testování. Většina studovaného souboru genotypů však vykazovala buďto jednoznačnou náchylnost, nebo naopak rezistenci. Homogenita těchto reakcí byla evidentní.

Z tabulky kvalitativního hodnocení (Tab. 5.2a) je zřejmé, že většina reakcí byla v konečné podobě klasifikována jako náchylná. Jednalo se o 146 ze 171 testovaných reakcí, což je více než 85 %. Jistý podíl na tom nese fakt, že se mezi reakcemi nad očekávání velmi často (vůbec nejčastěji ze všech stupňů sporulace) vyskytovala silně náchylná reakce (v grafech vyznačena červenou barvou). Kompletní **náchylnost** (DI > 35,1 %) vůči všem 8 izolátům však byla zaznamenána pouze u 4 genotypů, a to s vyššími pořadovými čísly: 18, 19, 21 a 22, z nichž dva pocházejí z Japonska a dva z Kolumbie (viz Tab. 4.2). Podstatně více genotypů bylo náchylných vůči 6 či 7 izolátům. Náchylná reakce na alespoň 6 izolátů *P. cubensis* byla pozorována u 20 testovaných genotypů *C. melo*. Zbylé 2 genotypy (č. 1 a 9) vykazovaly vůči 3 různým izolátům neúplnou rezistenci.

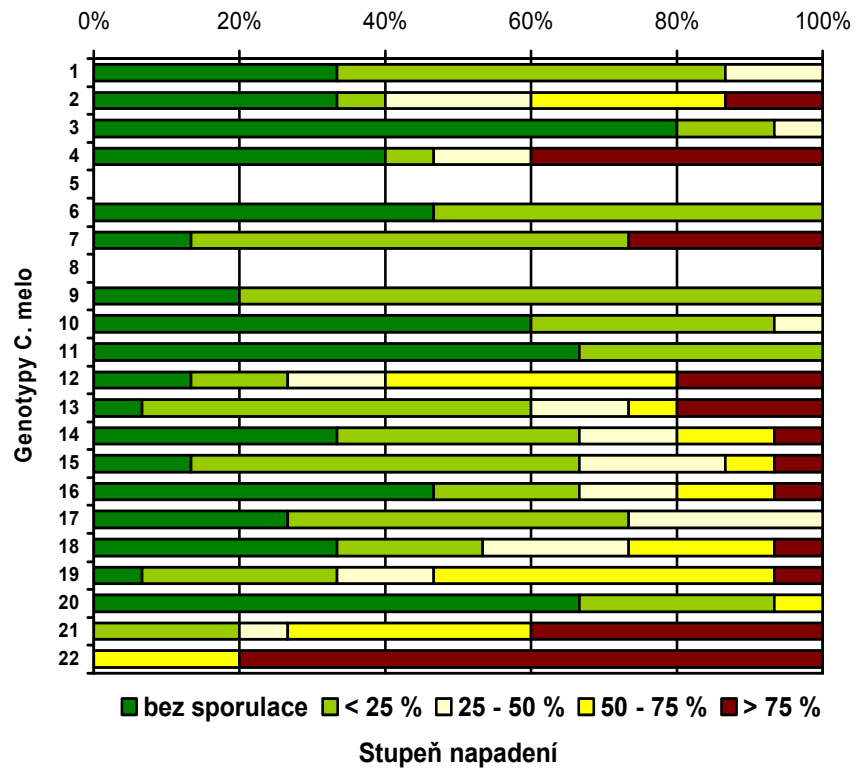
Zcela rezistentní genotypy vůči všem daným izolátům v tomto souboru hostitelů nalezeny nebyly. Přitom právě rezistentní reakce vůči většině použitých izolátů/patotypů

představují cenná data pro další výzkum a možnost jejich odhalení v rámci variabilního druhu *C. melo* byla také hlavním cílem této práce. V následujících grafech je četnost odolných disků konkrétního genotypu znázorněna délkou tmavě zeleného sloupce, světle zelená barva pak označuje mírnou sporulaci.

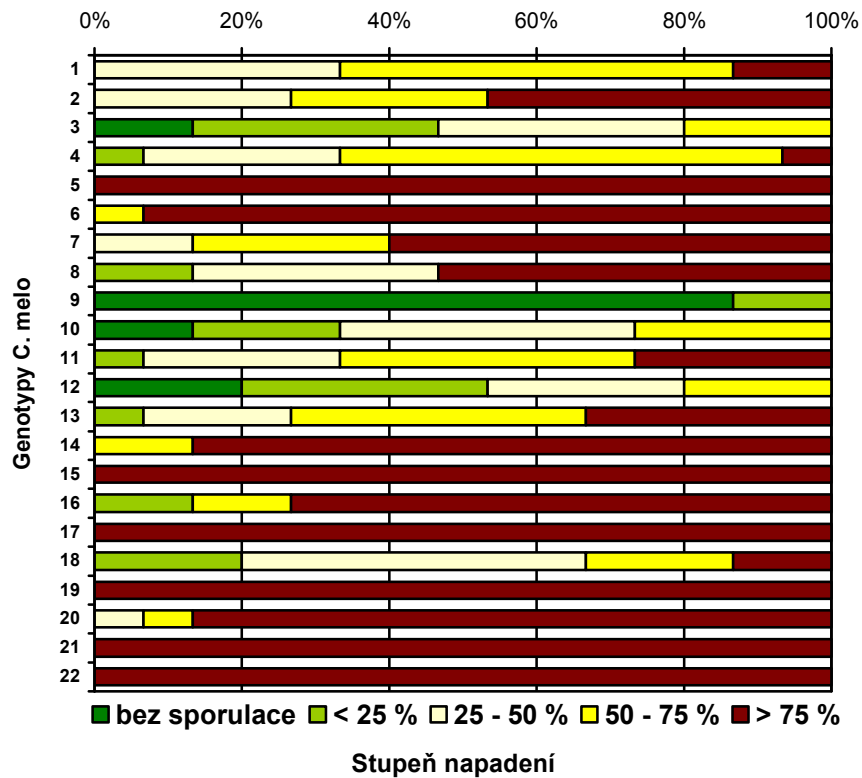
Přestože získané reakce byly charakteristické nízkým výskytem rezistence (jen 25 výsledných reakcí genotypů ze 171), která byla navíc ve všech případech neúplná (DI = 0,1 – 35 %), lze mezi jednotlivými genotypy rozlišit celkem 8 reakčních schémat, které jsou určeny specifíčností jejich interakce s jednotlivými izoláty (patotypy) *P. cubensis*. Tato různorodost reakce zástupců hostitelského druhu *C. melo* vůči odlišným patotypům (rasám) patogenu jednoznačně dokládá přítomnost rasově specifické rezistence/náchylnosti v rámci tohoto druhu a jeho interakce s *P. cubensis*. Ačkoliv tento závěr není z výsledků testování na první pohled zřejmý, při podrobnější analýze byla rasově specifická variabilita reakcí souboru genotypů potvrzena.

Časový průběh infekce se různil mezi jednotlivými studovanými interakcemi. U velké části z nich docházelo k rychlému rozvoji sporulace na discích (do 6. až 8. dne po inokulaci), která se v dalších dnech už výrazně nevyvíjela. Všechna průběžná hodnocení jsou obsažena v souhrnné tabulce interakce *C. melo* - *P. cubensis* na přiloženém CD.

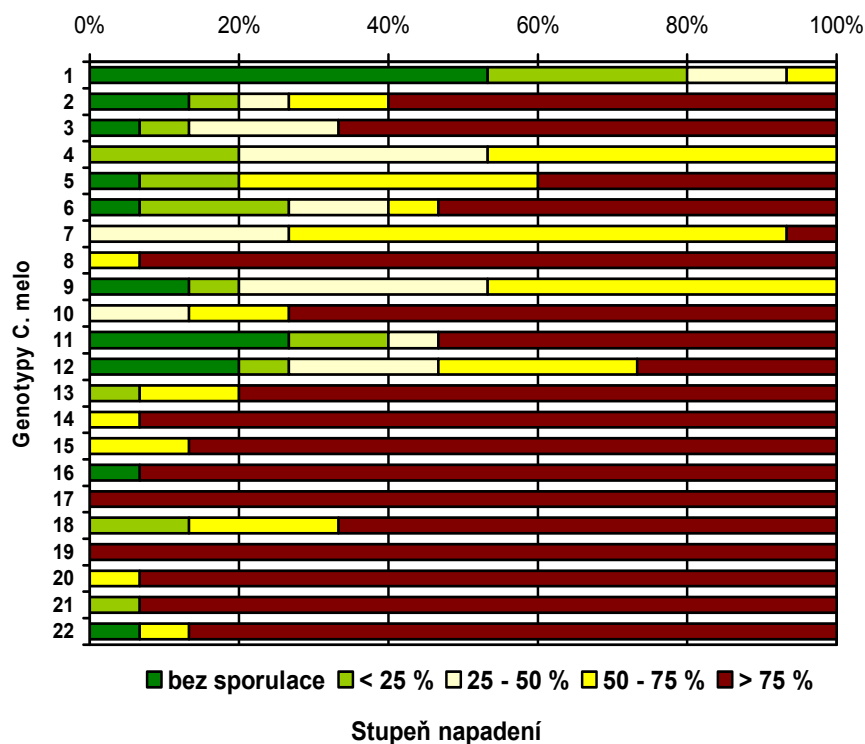
Graf 13-20: Pořadová čísla 1-22 reprezentují jednotlivé genotypy *Cucumis melo*, jež jsou detailně popsány v seznamu položek testovaného souboru (Tab. 4.2). Reakce kontrolního genotypu nejsou v těchto grafech zahrnuty.



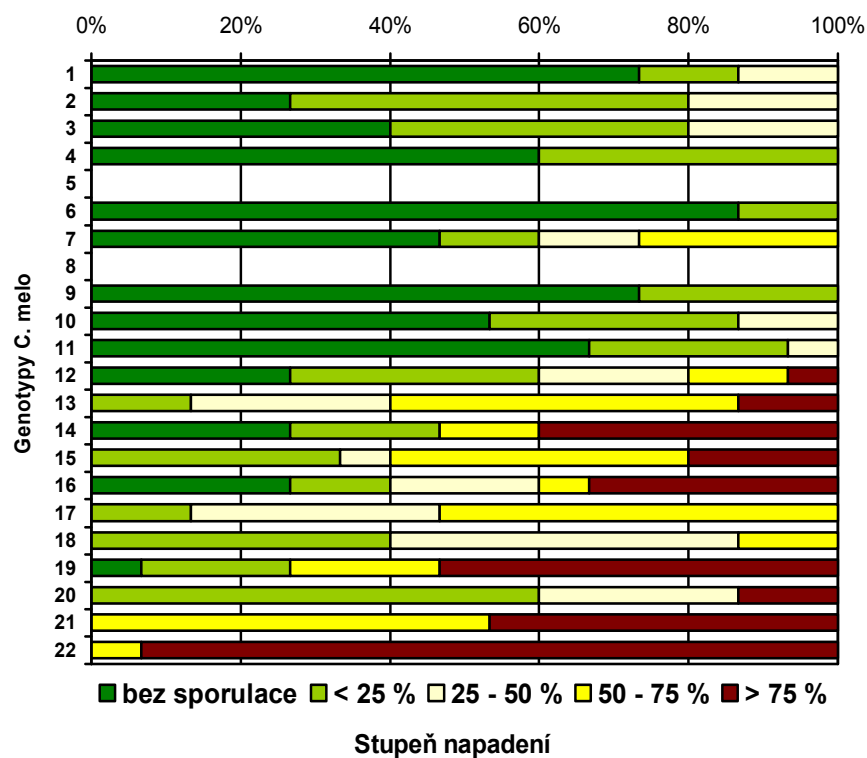
Graf 13: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 2/95, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



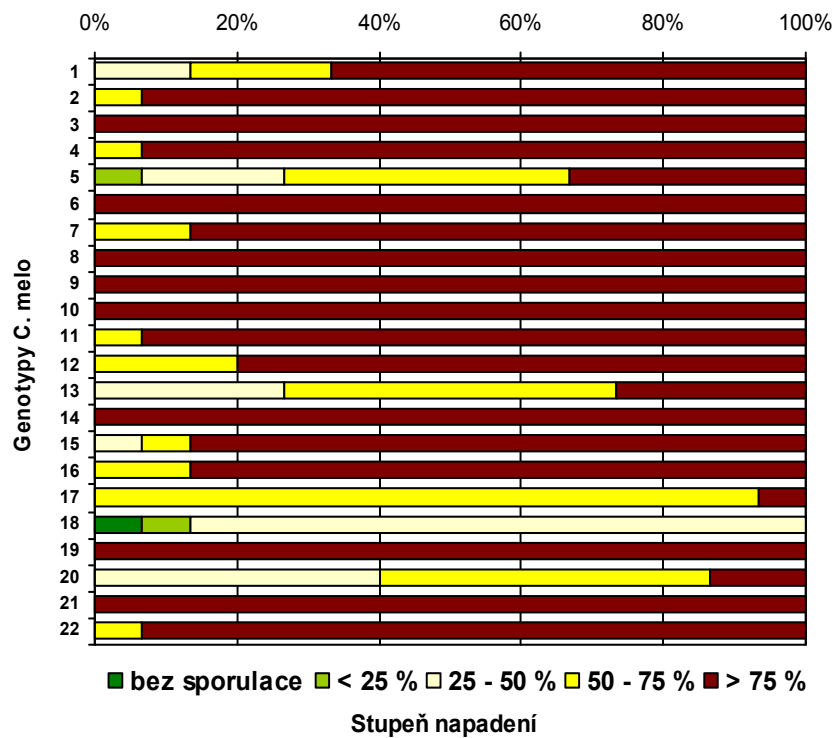
Graf 14: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 25/01, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



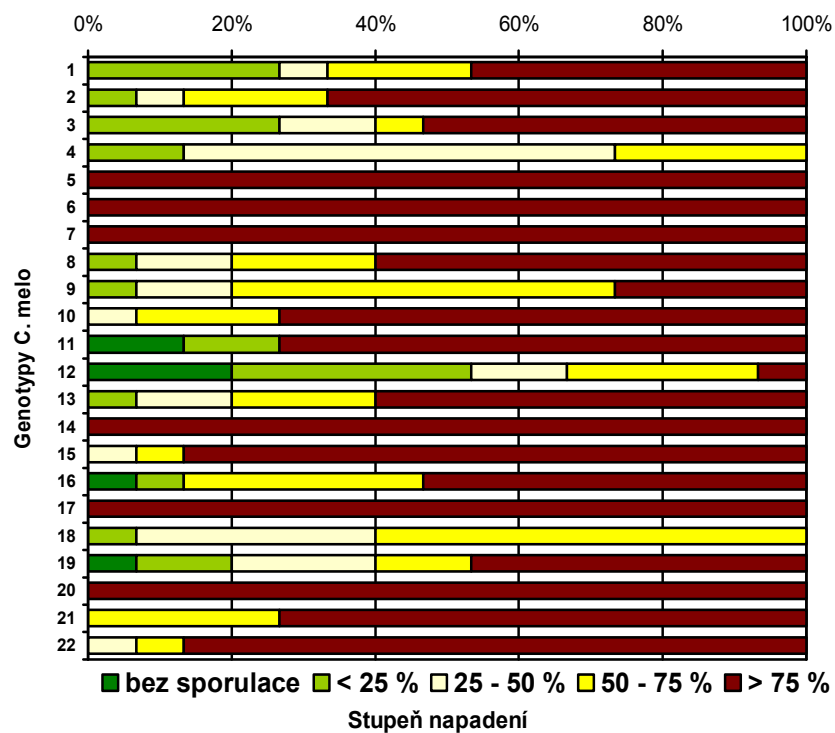
Graf 15: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 71/01, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



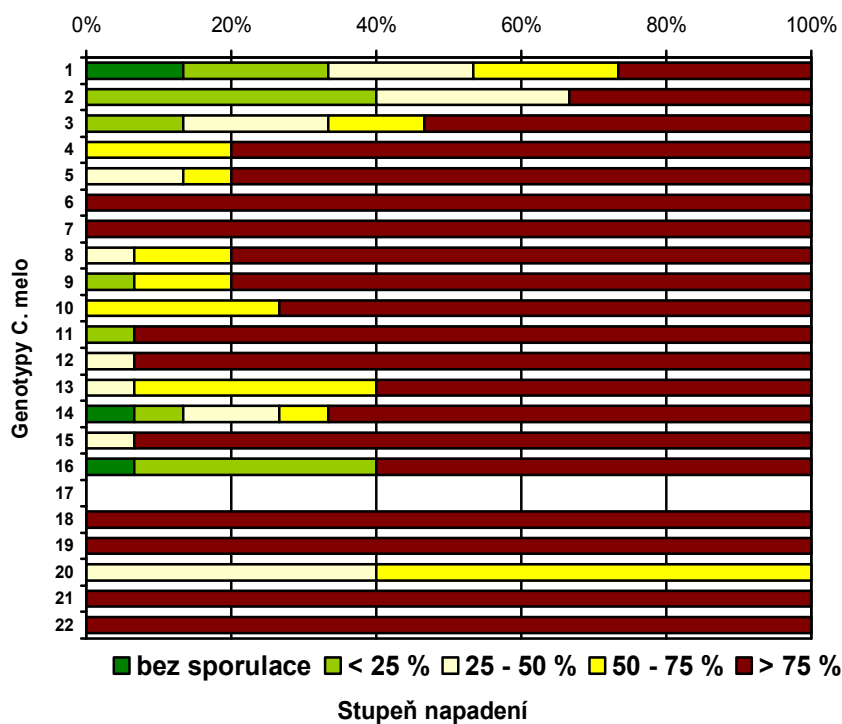
Graf 16: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 7/02, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



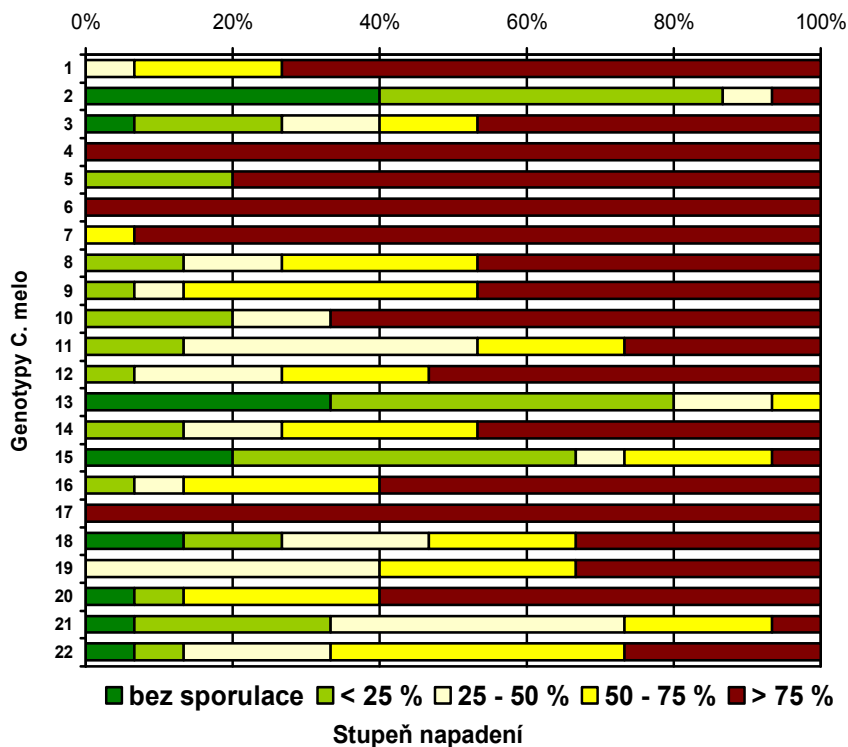
Graf 17: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 53/02, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



Graf 18: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 13/03, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



Graf 19: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 43/06, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*



Graf 20: Frekvence (%) stupňů napadení *P. cubensis* (izolát 18/09, 14 dpi) u jednotlivých genotypů *Cucumis melo*

Tab. 5.2a Kvalitativní hodnocení reakcí genotypů *Cucumis melo* vůči izolátům *P. cubensis* (14 dpi); - = rezistentní reakce (DI = 0-35%), + = náchylná reakce (DI = 35,1-100%), · = reakce nebyla testována

Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)							
	2/95	25/01	71/01	7/02	53/02	13/03	43/06	18/09
1	-	+	-	-	+	+	+	+
2	+	+	+	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	+	+	+
4	+	+	+	-	+	+	+	+
5	·	+	+	·	+	+	+	+
6	-	+	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+	+	+	+
8	·	+	+	·	+	+	+	+
9	-	-	+	-	+	+	+	+
10	-	+	+	-	+	+	+	+
11	-	+	+	-	+	+	+	+
12	+	+	+	-	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	-
14	-	+	+	+	+	+	+	+
15	-	+	+	+	+	+	+	+
16	-	+	+	+	+	+	+	+
17	-	+	+	+	+	+	·	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+

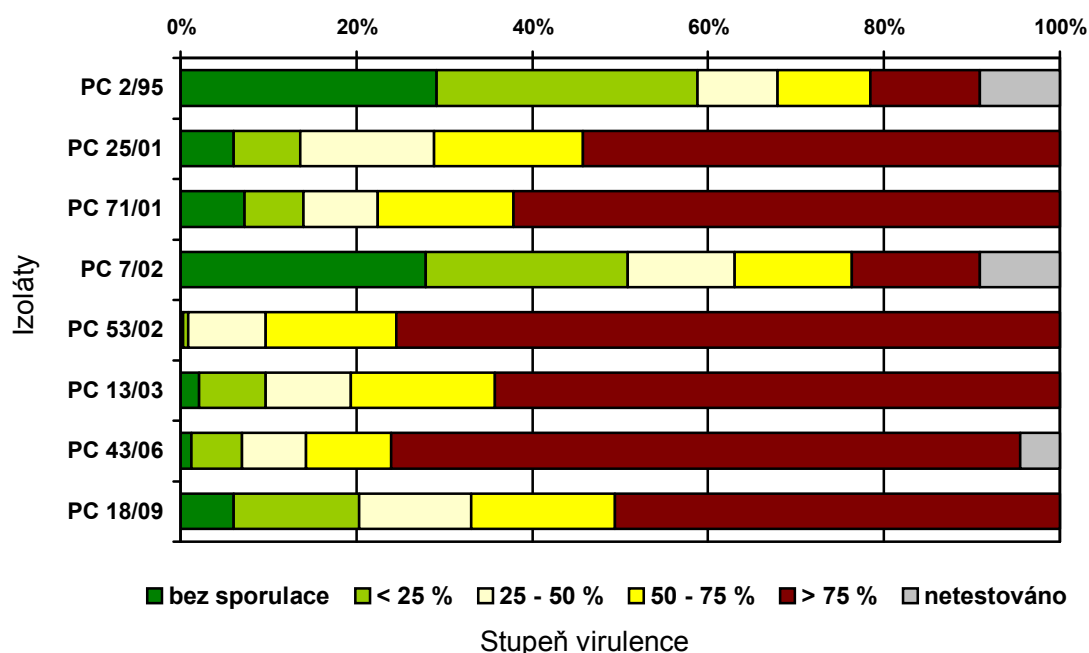
Tab. 5.2b Stupeň napadení (DI) genotypů *Cucumis melo* izoláty *P. cubensis* (% , 14 dpi)

Poř. č. genotypu	Izoláty <i>Pseudoperonospora cubensis</i> (PC)							
	2/95	25/01	71/01	7/02	53/02	13/03	43/06	18/09
1	20,0	70,0	18,3	10,0	88,3	71,7	56,7	91,7
2	45,0	80,0	75,0	23,3	98,3	86,7	56,7	21,7
3	6,7	40,0	78,3	20,0	100,0	71,7	76,7	68,3
4	48,3	66,7	56,7	10,0	98,3	53,3	95,0	100,0
5	·	100,0	73,3	·	75,0	100,0	91,7	85,0
6	13,3	98,3	70,0	3,3	100,0	100,0	100,0	100,0
7	41,7	86,7	70,0	30,0	96,7	100,0	100,0	98,3
8	·	73,3	98,3	·	100,0	83,3	93,3	76,7
9	20,0	3,3	53,3	6,7	100,0	75,0	91,7	81,7
10	11,7	45,0	90,0	15,0	100,0	91,7	93,3	78,3
11	8,3	71,7	60,0	10,0	98,3	76,7	95,0	65,0
12	60,0	36,7	58,3	35,0	95,0	41,7	96,7	80,0
13	45,0	75,0	91,7	65,0	75,0	83,3	88,3	23,3
14	31,7	96,7	98,3	55,0	100,0	100,0	80,0	76,7
15	35,0	100,0	96,7	61,7	95,0	95,0	96,7	36,7
16	28,3	86,7	93,3	51,7	96,7	80,0	68,3	85,0
17	25,0	100,0	100,0	60,0	76,7	100,0	·	100,0
18	36,7	56,7	85,0	43,3	45,0	63,3	100,0	61,7
19	55,0	100,0	100,0	73,3	100,0	70,0	100,0	73,3
20	11,7	95,0	98,3	41,7	68,3	100,0	65,0	81,7
21	73,3	100,0	95,0	86,7	100,0	93,3	100,0	48,3
22	95,0	100,0	91,7	98,3	98,3	95,0	100,0	68,3

5.2.2 Virulence izolátů *P. cubensis*

Charakteristika 8 izolátů *Pseudoperonospora cubensis*, použitých k testování odolnosti genových zdrojů *Cucumis melo*, je popsána v kapitole 4.2. I když byla tato práce primárně zaměřena na zkoumání reakce hostitelských genotypů, bylo také možné vyhodnotit stupeň virulence použitých izolátů *P. cubensis*. K usnadnění srovnání jejich patogenních vlastností slouží graf (Graf 21), který zahrnuje konečné reakce disků všech genotypů, rozdělených podle stupně napadení konkrétním izolátem do pěti kategorií (šestý, šedě zbarvený sloupec zastupuje reakce, které nebyly testovány). Podle četnosti disků v těchto 5 (6) skupinách (z celkového počtu 330) je v rámci daného souboru izolátů zřetelná určitá rozdílnost ve virulenci.

Reakce použitých izolátů *P. cubensis* na studovaném souboru genotypů *C. melo* se obecně vyznačovala střední až vysokou virulencí. Nejvýraznější rozdíly lze pozorovat ve frekvenci stupňů 0, 1 a 4. Vysoce virulentní byly izoláty 25/01, 71/01, 13/03, 43/06, 18/09. Za nejvíce virulentní lze považovat izolát PC 53/02 (viz Graf 21), vůči kterému byly náchylné všechny testované genotypy, jak ukazuje Tab. 5.2a, přičemž 8 z nich bylo dokonce napadeno na 100 % (Tab. 5.2b). Podstatně nižší virulenci vykazovaly na daném souboru hostitelů izoláty PC 2/95 a PC 7/02 (11, resp. 10 rezistentních reakcí z 20 (Tab. 5.2a)).



Graf 21: Frekvence (%) různých stupňů virulence izolátů *P. cubensis* na základě jejich sporulace na listových discích *Cucumis melo* (14 dpi)

6. DISKUZE

6.1 Rezistence a náchylnost druhů *Cucurbita* spp. vůči *P. cubensis*

Přítomnost rasově specifických reakcí v rámci rodu *Cucurbita*, které byly zaznamenány v průběhu testování a především pak ve výsledných reakcích genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis*, potvrzuje i dřívější výzkum Lebedy a Křístkové (1993), kdy byla specifita reakce hostitele na odlišné formy (rasy) tohoto patogenu zjištěna u genotypů různých kultivarů *C. pepo*. Variabilita odpovědi genotypů tohoto druhu na inokulaci *P. cubensis* očividně koresponduje s jeho velkou genetickou diverzitou (viz např. Ferriol et al., 2003a; Gong et al., 2012; Lebeda et al., 2007b) a polymorfismem plodů (Paris et al., 2012), jak uvádějí také Lebeda a Křístková (1993). Na tomto místě je nutné zdůraznit, že výše popsaný výzkum byl prováděn na pěstovaných taxonech poddruhů *C. pepo* (subsp. *pepo* a subsp. *ovifera*), které prošly určitým procesem domestikace a šlechtění (Lebeda a Křístková, 1993). Výsledky současné studie planých taxonů *Cucurbita* spp., které odhalily celkem 19 reakčních schémat mezi 29 testovanými genotypy *C. pepo* (Lebeda a Widrlechner, 2004) (viz tabulka kvalitativního hodnocení Tab. 5.1a), rozšiřují poznatky o specifitě rezistence *C. pepo* vůči patotypům *P. cubensis* s možností existence efektivních genů rezistence (Lebeda a Cohen, 2011) také v genomu planých zástupců tohoto druhu. Z tohoto hlediska se jako kontroverzní jeví tvrzení Parise (Paris, 2001), který *C. pepo* označuje za nedostačující vzhledem k dostupným zdrojům rezistence vůči plísni okurkové.

Patotypově (rasově) specifická interakce hostitele s *P. cubensis* byla dříve popsána také pro další variabilní druhy *Cucurbita* spp., konkrétně pro *C. maxima* a *C. moschata* (Lebeda a Widrlechner, 2003). O charakteru rezistence planých taxonů zastoupených v tomto experimentu však v dostupné literatuře neexistují téměř žádné zmínky. Z tohoto důvodu mohou být výsledky této analýzy velmi cenné pro další výzkum, především pak ale v oblasti šlechtění okurek a tykví na rezistenci (Lebeda a Widrlechner, 2004). Šlechtění polních okurek, které se v současné době začíná rozvíjet a slaví první úspěchy, však využívá pouze kultivarů *C. sativus*, vykazujících určitý stupeň tzv. polní rezistence vůči *P. cubensis* (Call et al., 2012b; Holdsworth et al., 2014; Kozik et al., 2013); za hranice tohoto druhu pro potenciální zdroje rezistence se zatím výzkum nedostal. O šlechtění jiných druhů tykvovitých na odolnost vůči plísni okurkové nejsou dostupné žádné informace (Lebeda et al., 2007b; Lebeda a Cohen, 2011).

6.2 Rezistence a náchylnost druhu *Cucumis melo* vůči *P. cubensis*

Vysoká morfologická, genetická i molekulární diverzita druhu *Cucumis melo* (Stepansky et al., 1999), se významně projevuje také ve velké variabilitě interakce s patogenem *P. cubensis*. Současná studie, která zahrnuje poměrně variabilní soubory genotypů *C. melo* a izolátů *P. cubensis*, zcela nepotvrdila toto tvrzení (výsledná reakční schémata nebyla natolik odlišná, jak bylo očekáváno). Ve velké míře projevená náchylnost testovaných genotypů, které patří převážně do taxonu *C. melo* subsp. *melo*, však určitým způsobem koresponduje s vysokou náchylností tohoto taxonu ve studii Lebedy a Gadasové (2002) a s další studií Lebedy (1991), ve které byla zjištěna vysoká míra rezistence pouze u jedné linie melounu cukrového ze šesti. Nízkou variabilitu reakcí a převládající náchylnost vzorků *C. melo*, z nichž bylo 14 použito i v této práci, zaznamenal také Lebeda et al. (2007a) ve studii, která navazuje na diplomovou práci Štěpánkové (2006) a zabývá se podobným tématem jako tato diplomová práce. Pro srovnání - jediný vysoce odolný genotyp ve studii Lebedy et al. (2007a), PI 315410, původem z Indie, v současné studii jako položka č. 12 vykázal rezistenci jen vůči izolátu PC 7/02, což prokazuje rasovou specifičnost reakce tohoto genotypu vzhledem k použití zcela odlišného souboru izolátů *P. cubensis* v obou studiích. Tento fakt také potvrzuje náročnost hledání zdrojů rezistence (Call et al., 2012a), kterou vystihuje tvrzení, že dosud nebyl objeven žádný kultivar, který by byl rezistentní vůči všem rasám *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011). Míra odolnosti kultivarů se spíše liší v interakci s různými lokálními patotypy *P. cubensis* (Shetty et al., 2002).

Neobvykle velká převaha náchylných reakcí genotypů, zaznamenaná v tomto testování, však může být například důsledkem změněných vlastností rostlin pěstovaných sice ve skleníku, ale přesto v jiných klimatických podmínkách, či extrémně velké virulence izolátů vůči danému souboru nebo souhrou těchto i jiných faktorů. Jedním z nich může být také nevelké množství dat získaných v tomto testování, které nedosahuje statistického významu jako tomu bylo v předchozím testování. Přesto tyto údaje poskytují zajímavé informace o interakci *C. melo* a *P. cubensis*.

Také v tomto případě byla totiž zjištěna rasová specifičnost interakce, projevující se přítomností osmi odlišných reakčních schémat v rámci daného souboru genotypů. Jak uvádí Lebeda a Widrlechner (2003), rasově specifická rezistence druhu *Cucumis melo* vůči *P. cubensis*, poskytující možné zdroje této rezistence, byla opakovaně výzkumy potvrzena (např. Lebeda, 1991; Lebeda et al., 2007a).

6.3 Virulence izolátů *P. cubensis*

Během testů rezistence *Cucurbita* spp. a *Cucumis melo* bylo použito celkem 18 izolátů *P. cubensis* (1/88, 2/95, 6/96, 1/97, 6/97, 1/00, 2/00, 3/00, 11/00, 12/00, 14/00, 25/01, 71/01, 7/02, 53/02, 13/03, 43/06, 18/09), které reprezentují patogenní variabilitu tohoto organismu ze skupiny Oomycota. Sedm z těchto izolátů bylo zahrnuto ve studii genetické diverzity patogenu pomocí ISSR a SRAP markerů (Polat et al., 2014).

V rámci testování interakce *Cucurbita* spp – *P. cubensis*, při němž bylo použito 11 izolátů, bylo rozlišeno velké množství reakčních schémat, jak uvádí Lebeda a Widrlechner (2004), které odkazuje na rozdíly ve virulenci zkoumaných izolátů. Jak již bylo uvedeno, ale i výsledky potvrzeno, míra virulence izolátu na daném testovaném souboru však nemusí korelovat s mírou jeho virulence na diferenčiacním souboru hostitelů. Například izolát PC 1/97, který v této studii vykázal poměrně nízkou virulenci, je zástupcem vysoce virulentního patotypu 15.10.11. Oproti tomu izoláty s velkou virulencí v této studii, 6/97 a 3/00, reprezentují patotypy 1.2.10 a 3.0.0 (Lebeda a Gadasová, 2002; Lebeda a Widrlechner, 2003). Pro objektivní posouzení virulence použitých izolátů je tedy nutné detailní studium jejich reakcí na diferenčiacních souborech tykvovitých rostlin (viz Lebeda a Gadasová, 2002, Lebeda a Widrlechner, 2003), kde mezi nimi bylo rozlišeno 9 různých patotypů. Zástupci stejného patotypu 1.10.10, izoláty 11/00, 2/95 a 6/96, v současné studii vykázaly poměrně blízké stupně virulence, představující střední hodnoty při srovnání stupně virulence všech použitých izolátů, ale výsledky jejich interakce s jednotlivými genotypy byly výrazně odlišné.

Soubor osmi izolátů *P. cubensis*, použitých při testování rezistence genotypů *Cucumis melo*, lze podle míry virulence na daném souboru hostitelů rozdělit na dvě skupiny, z nichž první tvoří šest vysoce virulentních izolátů (25/01, 71/01, 53/02, 13/03, 43/06 a 18/09) a druhou dva izoláty se střední virulencí (2/95 a 7/02). Virulence těchto izolátů, které pocházejí z porostů *Cucumis sativus* v ČR, může mít souvislost s ročníkem sběru. Jak referuje Lebeda et al. (2013), populace patogenu, zkoumané v průběhu let 2001 – 2010 na území ČR, výrazně měnily svou virulenci a ke konci sledovaného období byly schopny napadat i jiné druhy tykvovitých, konkrétně také druh *Cucumis melo*. Ve srovnání s reakcemi těchto izolátů na diferenčiacním souboru (Lebeda et al., 2013; Lebeda a Widrlechner, 2003) nacházíme jisté rozdíly, ale i podobnosti. V tomto souboru zastoupený taxon *C. melo* subsp. *melo* byl rezistentní vůči izolátu 2/95, což se zčásti shoduje

s výsledky této studie, ale jeho rezistence vůči PC 43/06 či náchylnost vůči PC 7/02 představují výsledky odlišné od závěrů současné studie.

Vysoká variabilita populací *P. cubensis* ve světě, projevující se v existenci velkého množství lokálních patotypů (Lebeda a Cohen, 2011; Polat et al., 2014; Salati et al., 2010; Shetty et al., 2002), musí být vážně brána v úvahu při šlechtění na rezistenci a ochraně tykvovitých plodin (Lebeda a Widrlechner, 2003). Tato skutečnost je zřejmá i v rámci Evropy, kde je patogen značně variabilní (Lebeda a Cohen, 2011; Polat et al., 2014), zejména pak mezi populacemi *P. cubensis* z České republiky (Lebeda et al., 2013).

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce, jež navazuje na bakalářskou práci (Roháčková, 2012), je součástí dlouhodobého studia interakcí rostlin z čeledi Cucurbitaceae a patogenu *Pseudoperonospora cubensis* (plíseň okurková), realizovaného ve Fytopatologické laboratoři Katedry botaniky PřF UP v Olomouci (Lebeda a Cohen, 2011).

Ačkoliv za posledních 30 let došlo k výraznému pokroku ve výzkumu vlastností tohoto významného rostlinného patogenu (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Schwinn, 1994; Polat et al., 2014) a jeho výskytu na *Cucumis sativus* (okurka setá) (viz např. Call et al., 2012a, 2013; Granke a Hausbeck, 2011; Lebeda et al., 2011; Wehner a Shetty, 1997), studium jeho interakce s ostatními rody (a druhy) tykvovitých rostlin bylo a stále zůstává opomíjeno. Je to dáno zejména tím, že se dosud nerozvinula dostatečná mezinárodní spolupráce na tomto poli (Lebeda et al., 2006; Lebeda a Cohen, 2011).

Velká variabilita zástupců rodu *Cucurbita* (Lebeda et al., 2007b) a jejich interakcí s *P. cubensis* byla potvrzena také současnou analýzou dat testování rezistence planě rostoucích taxonů *Cucurbita* spp. vůči izolátům *P. cubensis* z roku 2001 (Lebeda a Widrlechner, 2004). Dostatek rezistentních reakcí testovaných genotypů v rámci tohoto experimentu poskytuje možnost identifikace nových zdrojů rezistence, potřebných k dalšímu postupu ve šlechtění tykvovitých na rezistenci vůči *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a Widrlechner, 2004). Rezistence, resp. náchylnost studovaného souboru *Cucurbita* spp. je rasově specifického charakteru (Lebeda a Widrlechner, 2004).

Screening vybraných genových zdrojů *Cucumis melo* na rezistenci vůči *P. cubensis* jednoznačně potvrdil existenci rasově specifické interakce, resp. rezistence. Díky nedostatku dat a převaze náchylných reakcí však je k objevení nových efektivních zdrojů rezistence v rámci variabilního druhu *C. melo* nezbytný důkladnější výzkum interakce zástupců tohoto druhu s *P. cubensis*.

Výsledky této diplomové práce poskytují nové informace o povaze interakce *P. cubensis* s druhy *Cucumis melo* a *Cucurbita* spp., které jsou použitelné pro další základní fytopatologický výzkum, ale i šlechtitelskou praxi. Velmi cenné jsou především poznatky o interakci planých taxonů *Cucurbita* spp. a *P. cubensis*.

8. LITERATURA

- Ali, M. A., Pandey, A. K. & Lee, JoongKu (2009): Taxonomic relationships among the genera of subfamily Cucurbitoideae (family Cucurbitaceae) from India inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Phytomorphology*, 59 (3/4), 127-140.
- Call, A. D., Criswell, A. D., Wehner, T. C., Ando, K. & Grumet, R. (2012a): Resistance of cucumber cultivars to a new strain of cucurbit downy mildew. *HortScience*, 47(2), 171-178.
- Call, A. D., Criswell, A. D., Wehner, T. C., Klosińska, U. & Kozik, E. U. (2012b): Screening cucumber for resistance to downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostov. *Crop Science*, 52, 577-592.
- Call, A. D., Wehner, T. C., Holmes, G. J. & Ojiambo, P. S. (2013): Effects of host plant resistance and fungicides on severity of cucumber downy mildew. *HortScience*, 48(1), 53-59.
- Celetti, M. & Roddy, E. (2010): Downy mildew in cucurbits. Factsheet - Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario. (order no. 10-065).
- Choi, Y. J., Hong, S. B. & Shin, H. D. (2005): A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data. *Mycological Research*, 109(7), 841-848.
- Chauhan, V. & Pandey, A. K. (2012): Phylogeny of subfamily Nhandiroboideae (Cucurbitaceae) based on DNA sequence data: a review. In: Maiti, G. & Mukherjee, S. K. (eds.): *Multidisciplinary Approaches in Angiosperm Systematics, Volume 1*. University of Kalyani, India, pp. 297-305.
- Chloupek, O. (2008): Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia, Praha, p. 32.
- Chrtková, A. (1990): 62. Cucurbitaceae Juss. – dýňovité. In: Hejný, S. & Slavík, B. (eds.): *Květena České republiky, díl 2*. Academia, Praha, pp. 439-452.
- Cohen, Y. & Rubin, A. E. (2012): Mating type and sexual reproduction of *Pseudoperonospora cubensis*, the downy mildew agent of cucurbits. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 577-592.
- Colucci, S. J. & Holmes, G. J. (2010): Downy mildew of cucurbits. *The Plant Health Instructor*. (doi: 10.1094/PHI-I-2010-0825-01).

- Edeoga, H. O., Osuagwu, G. G. E., Omosun, G., Mbaebie, B. O. & Osuagwu, A. N. (2010): Pharmaceutical and therapeutic potential of some wild Cucurbitaceae species from South-East Nigeria. *Recent Research in Science and Technology*, 2(1), 63–68.
- Esteras, C., Gómez, P., Monforte, A. J., Blanca, J., Vicente-Dólera, N., Roig, C., Nuez, F. & Picó, B. (2012a): High-throughput SNP genotyping in *Cucurbita pepo* for map construction and quantitative trait *loci* mapping. *BMC Genomics*. (doi:10.1186/1471-2164-13-80).
- Esteras, C., Nuez, F. & Picó, B. (2012b): Genetic diversity studies in cucurbits using molecular tools. In: Kole, C. et al. (eds.): *Genetics, Genomics and Breeding of Cucurbits*. Science Publishers and Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 140-198.
- FAO (2014): *FAOSTAT Agricultural Database*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Dostupné na: <http://faostat3.fao.org>.
- Ferguson, G., Cerkauskas, R. & Celetti, M. (2009): Downy mildew of greenhouse cucumber. Factsheet - Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ontario. (order no. 09-013W).
- Ferriol, M., Picó, B. & Nuez, F. (2003a): Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 271-282.
- Ferriol, M., Picó, B. & Nuez, F. (2003b): Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50, 227-238.
- Garcia-Mas, J., Oliver, M., Gómez-Paniagua, H. & de Vicente, M. C. (2000): Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 860-864.
- Garcia-Mas, J. et al. (2012): The genom of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11872–11877.
- Gong, L., Paris, H. S., Nee, M. H., Stift, G., Pachner, M., Vollmann, J. & Lelley, T. (2012): Genetic relationships and evolution in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as revealed by simple sequence repeat polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 875-891.

- Granke, L. L. & Hausbeck, M. K. (2011): Dynamics of *Pseudoperonospora cubensis* sporangia in commercial cucurbit fields in Michigan. *Plant Disease*, 95(11), 1392-1400.
- Holdsworth, W. L., Summers, C. F., Glos, M., Smart, C. D. & Mazourek, M. (2014): Development of downy mildew-resistant cucumbers for late-season production in the northeastern United States. *HortScience*, 49(1), 10-17.
- Huang, S. et al. (2009): The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41(12), 1275-1283.
- Jeffrey, C. (1990): Systematics of the Cucurbitaceae: an overview. In: Bates, D. M. et al. (eds.): *Biology and Utilization of the Cucurbitaceae*. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New York, pp. 3-7.
- Kirkbride, J. H., Jr. (1993): *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae): botanical identification of cucumbers and melons*. Parkway Publishers, Boone, North Carolina.
- Kozik, E. U., Klosińska, U., Call, A. D. & Wehner, T. C. (2013): Heritability and genetic variance estimates for resistance to downy mildew in cucumber accession Ames 2354. *Crop Science*, 53, 177-182.
- Křístková, E., Lebeda, A., Vinter, V. & Blahoušek, O. (2003): Genetic resources of the genus *Cucumis* and their morphological description (English-Czech version), *Horticultural Science (Prague)*, 30(1), 14–42.
- Lebeda, A. (1990): Biologie a ekologie plísně okurkové (Biology and ecology of cucurbit downy mildew). In: Lebeda, A. (ed.): *Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew)*. Československá vědecká společnost pro mykologii při ČSAV (Czechoslovak scientific society for mycology by Czechoslovak Academy of Sciences), Praha, pp. 13-45.
- Lebeda, A. (1991): Resistance in muskmelons to Czechoslovak isolates of *Pseudoperonospora cubensis* from cucumbers. *Scientia Horticulturae*, 45(3-4), 255-260.
- Lebeda, A. & Cohen, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)-biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 157-192.
- Lebeda, A. & Gadasová, V. (2002): Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and some other European countries. *Acta Horticulturae*, 588, 137-141.

- Lebeda, A. & Křístková, E. (1993): Resistance of *Cucurbita pepo* and *Cucurbita moschata* varieties to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). *Plant Varieties and Seeds*, 6, 109-114.
- Lebeda, A., Pavelková, J., Sedláková, B. & Urban, J. (2013): Structure and temporal shift in virulence of *Pseudoperonospora cubensis* populations in Czech Republic. *Plant Pathology*, 62(2), 336-345.
- Lebeda, A., Pavelková, J., Urban, J. & Sedláková, B. (2011): Distribution, host range and disease severity of *Pseudoperonospora cubensis* on cucurbits in the Czech Republic. *Journal of Phytopathology*, 159, 589-596.
- Lebeda, A. & Schwinn, F. J. (1994): The downy mildews-an overview of recent research progress. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 101(3), 225-254.
- Lebeda, A., Štěpánková, J., Kršková, M. & Widrlechner, M. (2007a): Resistance in *Cucumis melo* germplasm to *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *Advances in Downy Mildew Research*, 3, 157-167.
- Lebeda, A. & Urban, J. (2010): Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*), Chapter 18. In: Spencer, M. M. & Lebeda, A. (eds.): *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease*. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria, pp. 285-294. (ISBN 978-92-0-105110-3).
- Lebeda, A. & Widrlechner, M. P. (2003): A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(4), 337-349.
- Lebeda, A. & Widrlechner, M. P. (2004): Response of wild and weedy *Cucurbita* L. to pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostov. (Cucurbit downy mildew). In: Spencer-Phillips, P. & Jeger, M. (eds.): *Advances in downy mildew research, Vol. 2*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 203-210.
- Lebeda, A., Widrlechner, M. P., Staub, J., Ezura, H., Zalapa, J. & Křístková, E. (2007b): Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.), Chapter 8. In: Singh, R. J. (ed.): *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series, Vol. 3 – Vegetable Crops*. CRC Press, Boca Raton, pp. 273-377.
- Lebeda, A., Widrlechner, M. P. & Urban, J. (2006): Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. In: Holmes, G. J. (ed.): *Proceedings of Cucurbitaceae 2006*. Universal Press, Raleigh, North Carolina, USA, pp. 453-467.

- Leppik, E. E. (1966): Searching gene centers of the genus *Cucumis* through host-parasite relationship. *Euphytica*, 15, 323-328.
- López-Sesé, A. I., Staub, J. E. & Gómez-Guillamón, M. L. (2003): Genetic analysis of Spanish melon (*Cucumis melo* L.) germplasm using a standardized molecular-marker array and geographically diverse reference accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 41-52.
- Monforte, A. J., Garcia-Mas, J. & Arus, P. (2008): Genetic variability in melon based on microsatellite variation. *Plant Breeding*, 122(2), 153-157.
- Mitchell, M. N., Ocamb, C. M., Grünwald, N. J., Mancino, L. E. & Gent, D. H. (2011): Genetic and pathogenic relatedness of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli*. *Phytopathology*, 101(7), 805-818.
- Neufeld, K. N. & Ojiambo, P. S. (2012): Interactive effects of temperature and leaf wetness duration on sporangia germination and infection of cucurbit hosts by *Pseudoperonospora cubensis*. *Plant Disease*, 96(3), 345-353.
- Ojiambo, P. S. & Holmes, G. J. (2011): Spatiotemporal spread of cucurbit downy mildew in the eastern United States. *Phytopathology*, 101(4), 451-461.
- Ojiambo, P. S. & Kang, E. L. (2013): Modeling spatial frailties in survival analysis of cucurbit downy mildew epidemics. *Phytopathology*, 103(3), 216-227.
- Palti, J. & Cohen, Y. (1980): Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. *Phytoparasitica*, 8(2), 109-147.
- Paris, H. S. (2001): History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Review*, 25, 71-170.
- Paris, H. S., Lebeda, A., Křístková, E., Andres, T. C. & Nee, M. H. (2012): Parallel evolution under domestication and phenotypic differentiation of the cultivated subspecies of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 20(10), 1-20.
- Pasha, M. K. & Sen, S. P. (1991): Seed protein patterns of Cucurbitaceae and their taxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 19(7), 569-576.
- Polat, İ., Baysal, Ö., Mercati, F., Kitner, M., Cohen, Y., Lebeda, A. & Carimi, F. (2014): Characterization of *Pseudoperonospora cubensis* isolates from Europe and Asia using ISSR and SRAP molecular markers. *European Journal of Plant Pathology* (in press).

- Renner, S. S., Schaefer, H. & Kocyan, A. (2007): Phylogenetics of *Cucumis* (Cucurbitaceae): Cucumber (*C. sativus*) belongs in an Asian/Australian clade far from melon (*C. melo*). *BMC Evolutionary Biology*, 7(58).
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2002): Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94(5), 834-849.
- Roháčková, J. (2012): Rezistence genových zdrojů *Cucurbita* spp. vůči plísni okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, vedoucí práce Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc., Olomouc, 66 p.
- Rostovzev, S. I. (1903): Beiträge zur kenntnis der Peronosporeen. *Flora oder Allgemeine Botanische Zeitung*, 92, 405-430.
- Runge, F., Choi, Y. J. & Thines, M. (2011): Phylogenetic investigations in the genus *Pseudoperonospora* reveal overlooked species and cryptic diversity in the *P. cubensis* species cluster. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 135-146.
- Runge, F., Ndambi, B. & Thines, M. (2012): Which morphological characteristics are most influenced by the host matrix in downy mildews? A case study in *Pseudoperonospora cubensis*. *PLoS ONE*, 7(11), e44863.
- Runge, F. & Thines, M. (2009): A potential perennial host for *Pseudoperonospora cubensis* in temperate regions. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 483-486.
- Runge, F. & Thines, M. (2012): Reevaluation of host specificity of the closely related species *Pseudoperonospora humuli* and *P. cubensis*. *Plant Disease*, 96(1), 55-61.
- Salati, M., Wong, M. Y., Sariah, M. & Masdek, H. N. (2010): Host range evaluation and morphological characterization of *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4897-4903.
- Sanjur, O. I., Piperno, D. R., Andres, T. C. & Wessel-Beaver, L. (2002): Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: Implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 535-540.

- Savory, E. A., Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Vaillancourt, B., Buell, C. R. & Day, B. (2012): mRNA-seq analysis of the *Pseudoperonospora cubensis* transcriptome during cucumber (*Cucumis sativus* L.) infection. *PLoS ONE*, 7(4), e35796.
- Savory, E. A., Granke L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Varbanova, M., Hausbeck, M. K. & Day, B. (2011): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular Plant Pathology*, 12(3), 217-226.
- Schaefer, H. & Renner, S. S. (2011): Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon*, 60(1), 122-138.
- Sebastian, P., Schaefer, H., Telford, I. R. H. & Renner, S. S. (2010): Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14269–14273.
- Sensoy, S., Büyükalaca, S. & Abak, K. (2007): Evaluation of genetic diversity in Turkish melons (*Cucumis melo* L.) based on phenotypic characters and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1351-1365.
- Shetty, N. V., Wehner, T. C., Thomas, C. E., Doruchowski, R. W. & Vasanth Shetty, K. P. (2002): Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. *Scientia Horticulturae*, 94, 231-239.
- Shrivastava, A. & Roy, S. (2013): Cucurbitaceae: A ethnomedicinally important vegetable family. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 1(4), 16-20.
- Smejkal, M. (1992): Systém a evoluce vyšších rostlin. In: Rosypal, S. et al. (eds.): *Fylogeneze, systém a biologie organizmů*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, pp. 205-350.
- Staub, J. E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N. & Katzir, N. (2000): Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers. *Euphytica*, 115, 225-241.
- Stepansky, A., Kovalski, I. & Perl-Treves, R. (1999): Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics and Evolution*, 217, 313-332.
- Štěpánková, J. (2006): Rezistence genových zdrojů *Cucumis melo* vůči patotypům plísně okurkové (*Pseudoperonospora cubensis*). Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, vedoucí práce Prof. Ing. Aleš Lebeda, DrSc., Olomouc, 118 p.

- Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F. & Day, B. (2011): 454 genome sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* reveals effector proteins with a QXLR translocation motif. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 543-553.
- Voglmayr, H. (2003): Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycological Research*, 107(10), 1132-1142.
- Voglmayr, H., Piątek, M. & Mossebo, D. C. (2008): *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew disease on *Impatiens irvingii* in Cameroon: a new host for the pathogen. *New Disease Reports*, 18, 17.
- Wang, Y.-H., Thomas, C. E. & Dean, R. A. (1997): A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 791-798.
- Ward, B. L., Anderson, R. S. & Bendich, A. J. (1981): The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell*, 25(3), 793-803.
- Watson, L. & Dallwitz, M.J. (1992): The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 4th March 2011. Dostupné na: <http://delta-intkey.com>.
- Wehner, T. C. & Maynard, D. N. (2003): Cucurbitaceae (vine crops). In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing.
- Wehner, T. C. & Shetty, N. V. (1997): Downy mildew resistance of the cucumber germplasm collection in North Carolina field tests. *Crop Science*, 37(4), 1331-1340.
- Zhang, L.-B., Simmons, M. P., Kocyan, A. & Renner, S. S. (2006): Phylogeny of the Cucurbitales based on DNA sequences of nine loci from three genomes: Implications for morphological and sexual system evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(2), 305-322.

9. PŘÍLOHA

► **Obr. P1:**

Pokusné rostliny *Cucumis melo* (č. 12-22) ve stáří 2,5 týdne (semenáčky), zasazené v perlitu a umístěné ve skleníku v kóji pro klíčení rostlin (foto: J. Roháčková).



▼ **Obr. P2:**

Pokusné rostliny *Cucumis melo* (č. 12-15) ve stáří 4 týdnů, přesazené do větších květináčů se zahradní zeminou a umístěné ve skleníku (foto: J. Roháčková).



▼ **Obr. P3:**

Pokusné rostliny *Cucumis melo* (č. 12-15 v popředí, č. 16-20 v pozadí) ve stáří 8 týdnů (foto: J. Roháčková).



► **Obr. P4:**
Sporulace *P. cubensis* (izolát 71/01) na listu
Cucumis sativus cv. Marketer 430 (7 dpi)
(foto: J. Roháčková).



▼ **Obr. P5:**
Testovací sada listových disků genotypů
Cucumis melo č. 1-11 po napadení
P. cubensis (izolát 13/03, 14 dpi)
(foto: J. Roháčková).



▼ **Obr. P6:**
Listové disky genotypů *Cucumis melo* č. 7-10 po napadení *P. cubensis* (izolát 13/03), 14
dpi. Patrné rozdíly v rezistenci, resp. náchylnosti (foto: J. Roháčková).

