

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Studium variability padlí na salátu
(*Golovinomyces cichoracearum*)

Bakalářská práce

Kristýna Michalcová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: doc. RNDr. Barbora Mieslerová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Barbory Mieslerové, Ph.D. a s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, 27. 4. 2015

.....
Kristýna Michalcová

Souhrn

Cílem této bakalářské práce bylo studovat patogenní variabilitu izolátů původce padlí čekankového, *Golovinomyces cichoracearum sensu stricto*.

V teoretické části je uvedena charakteristika patogena (taxonomie, morfologická charakteristika, životní cyklus, šíření, hostitelský okruh, vztah patogena a hostitele, chemická a biologická kontrola patogena) a metody používané ke studiu variability padlí (testy virulence, identifikace idiomorf párovacího typu a techniky využívající molekulární markery). Experimentální část je zaměřena na studium variability virulence 26 izolátů *G. cichoracearum*, sbíraných převážně v České republice v roce 2013 a 2014, na diferenčním souboru 13 genotypů rodu *Lactuca* použitím metody listových disků.

Na základě výsledků těchto experimentů lze dospět k závěru, že izoláty *G. cichoracearum* se liší ve své virulenci. Rozdíl ve virulenci izolátů testovaných v roce 2013 a 2014 byl však nepatrný. Výsledky také podporují očekávání, že interakce v patosystému *Lactuca–G. cichoracearum* jsou rasově specifické.

Summary

The aim of this bachelor thesis was to study pathogenic variability among isolates of the causal agent of lettuce powdery mildew, *Golovinomyces cichoracearum sensu stricto*.

In the theoretical part, characteristic of pathogen (taxonomy, morphological characteristic, life cycle, spreading, host range, geographical distribution, host–pathogen relationship, chemical and biological control of pathogen) and methods used for studying variability of powdery mildew fungi (virulence tests, identification of mating type idiomorphs and molecular marker techniques) are presented. The experimental part is focused on study of virulence variability among 26 isolates of *G. cichoracearum*, collected mostly in the Czech Republic in 2013 and 2014, across differential set of 13 accessions of *Lactuca* species by using leaf disc bioassay.

On the basis of the results of these experiments, it can be concluded that isolates differ in their virulence. However, only negligible virulence variation between isolates tested in 2013 and 2014 was observed. The results also support the expectations that the interactions in *Lactuca–G. cichoracearum* pathosystem are race–specific.

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Barboře Mieslerové, Ph.D. za vstřícný přístup v průběhu vedení mé bakalářské práce, za názorné vysvětlení metodických postupů a za udělování cenných připomínek a doporučení týkajících se písemného zpracování celé práce. Děkuji také paní Věře Zoubkové za pomoc s pěstováním a péčí o pokusné rostliny.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Literární rešerše.....	9
3.1. Charakteristika <i>Golovinomyces cichoracearum</i>	9
3.1.1. Taxonomické zařazení.....	9
3.1.2. Morfologické znaky	9
3.1.3. Příznaky napadení.....	10
3.1.4. Životní cyklus	11
3.1.5. Šíření patogena a vliv vnějších podmínek na jeho vývoj	12
3.1.6. Vztah rodu <i>Golovinomyces</i> s hostiteli v kontextu evoluce	13
3.1.7. Hostitelský okruh	14
3.1.8. Geografická distribuce	14
3.1.9. Variabilita interakcí mezi <i>G. cichoracearum</i> a rodem <i>Lactuca</i>	14
3.1.10. Vliv <i>G. cichoracearum</i> na hostitele na molekulární a buněčné úrovni....	15
3.1.11. Obranné strategie hostitele.....	17
3.1.12. Fungicidní a biologická ochrana	18
3.2. Metody studia variability padlí	20
3.2.1. Testy virulence.....	20
3.2.2. Determinace a studium idiomorf párovacího typu	20
3.2.3. Využití DNA markerů	21
3.2.3.1. RFLP markery	22
3.2.3.2. RAPD markery	23
3.2.3.3. AFLP markery	24
4. Materiál a metodika	26
4.1. Sběr a udržování izolátů <i>G. cichoracearum</i>	26
4.2. Rostlinný materiál.....	27
4.3. Inokulace a inkubace.....	28
4.4. Hodnocení stupně napadení a virulence	29
5. Výsledky	30
6. Diskuze	37
7. Závěr.....	40
8. Použitá literatura	41
9. Příloha	51

1. Úvod

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem variability padlí na salátu, jehož původcem je obligátní biotrofní houbový parazit kosmopolitního rozšíření, *Golovinomyces cichoracearum sensu stricto*. Charakteristickým příznakem napadení je rozvoj bílého mycelia práškovité struktury na povrchu listů a stonků rostlin. Infekce padlím je problémem zejména v případě pěstování rostlin ve skleníku, protože kvůli vyšší teplotě okolí a nedostatku vody ulpívající na povrchu listů dochází k vytvoření optimálních podmínek pro rozvoj mycelia. V důsledku silného napadení rostlina roste pomaleji a její listy mohou usychat a odumírat, což je nežádoucí například pro zemědělskou produkci, protože dochází ke snížení výnosu i kvality salátu.

Možností ochrany salátu proti padlí je chemická nebo biologická ochrana rostlin, prostřednictvím přípravků obsahujících látky s fungicidním účinkem, ale mnohem efektivnějším způsobem ochrany je pěstování odolných odrůd salátu. K hledání odolných odrůd rostlin jsou používány klasické fytopatologické metody, zaměřené zejména na studium fenotypového projevu infekce, ale i metody využívající techniky molekulární biologie. Důležité je lépe porozumět nejen mechanismům a faktorům ovlivňujícím virulenci patogena či rezistenci rostlin, ale také vzájemnému vztahu hostitele a patogena.

2. Cíle práce

Cílem teoretické části mé práce bylo vypracování literární rešerše pojednávající o charakteristice padlí čekankového (*Golovinomyces cichoracearum*) a metodách studia variability padlí. Cílem experimentální části práce bylo udržování izolátů padlí čekankového (*G. cichoracearum*) a testování jejich patogenní variability na souboru genotypů rodu *Lactuca*.

3. Literární rešerše

3.1. Charakteristika *Golovinomyces cichoracearum*

3.1.1. Taxonomické zařazení

Se zohledněním klasifikace organismů do vyšších taxonomických kategorií (doména, říše, podříše) je v současné době přijímáno řazení druhu *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V.P. Heluta do: domény Eukarya (Woese *et al.*, 1990), říše Fungi (Cavalier–Smith, 1998), podříše Dikarya (Hibbett *et al.*, 2007), oddělení Ascomycota, pododdělení Pezizomycotina, třídy Leotiomycetes (Wang *et al.*, 2006), řádu Erysiphales, čeledi Erysiphaceae (Braun *et al.*, 2012), tribu Golovinomyceteae (Braun *et al.*, 2000) a rodu *Golovinomyces* (Braun, 1999).

Přezkoumáním původní taxonomické klasifikace, do té doby založené pouze na popisu morfologických znaků (Braun, 1987), nabyly pro účely taxonomie většího významu znaky anamorfního stádia, jako je struktura konidií, která byla detailně studovaná pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (Cook *et al.*, 1997). Na základě výsledků molekulárně fylogenetické analýzy (Braun *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2002) došlo k úpravě a upřesnění klasifikace v rámci čeledi Erysiphaceae, která nyní zahrnuje pět tribů – Erysipheae, Golovinomyceteae, Cystothecae, Phyllactinieae a Blumerieae. Změny se týkaly také klasifikace v rámci původního pojetí rodu *Erysiphe*, jehož jednou ze tří sekcí byla sekce *Golovinomyces*, která byla povýšena na úroveň rodu a rod *Golovinomyces* byl následně zařazen do tribu Golovinomyceteae (Braun, 1999; Braun *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2002). Tribus Golovinomyceteae je monofyletický a zahrnuje celkem tři rody: *Golovinomyces*, *Neoerysiphe* a *Arthrocladiella* (Matsuda *et al.*, 2003). V důsledku uvedených změn byl odvozen název *Golovinomyces cichoracearum* (DC.) V.P. Heluta, namísto dřívějšího označení *Erysiphe cichoracearum* DC.

3.1.2. Morfologické znaky

Hyfy (vlákna) *G. cichoracearum* vytvářejí mycelium, které je hyalinní (průhledné), septální (buňky ve vláknech jsou odděleny přepážkami) a tenkostěnné. V hyfách o šířce 4 – 8 μm a délce 40 – 90 μm (Lebeda *et al.*, 2011) se nacházejí jednojaderné buňky obsahující vakuoly (Braun, 1995). Na konci klíčného vlákna se nachází apresorium, což je specializovaná infekční struktura obuškovitého

tvary, která určuje místo penetrace (průniku) patogena přes buněčnou stěnu hostitele (Micali *et al.*, 2008). Po penetraci se vytváří haustorium, což je struktura důležitá v procesu vstřebávání živin z hostitelské buňky do mycelia.

Bazální buňka poměrně dlouhého konidioforu je široká 9 – 15 μm , dlouhá 40 – 140 μm a za ní následují 1 – 3 kratší buňky. Konidiofor obsahuje elipsoidní konidie o šířce 14 – 22 μm a délce 25 – 45 μm , které jsou bezbarvé, jednobuněčné, jednojaderné, tenkostěnné a bez fibrozinových tělísek (Lebeda *et Mieslerová*, 2011). Konidie představují anamorfní stádium, které slouží k nepohlavnímu (asexuálnímu) rozmnožování.

Teleomorfní stádium, sloužící k pohlavnímu (sexuálnímu) rozmnožování, je představováno pohlavními plodnicemi (askokarpy), které Braun *et al.* (2002) nazval chasmothecia. Ta mají kulovitý tvar o průměru 85 – 160 μm , tmavě hnědou až černou barvu a vyvinuté přívěsky variabilních délek. Uvnitř plodnice se nacházejí buňky stejné velikosti i tvaru. V askokarpu se nachází 5 – 25 vřecek (vřecko = askus) o rozměrech 50 – 80 μm x 25 – 45 μm , která jsou přisedlá nebo pouze s krátkou stopkou (Lebeda *et Mieslerová*, 2011). Vřecka jsou diploidní a každé obsahuje dvě jednobuněčné haploidní askospory vzniklé meiotickým dělením. Askospory mají rozměry 18 – 30 μm x 11 – 20 μm (Braun, 1995).

3.1.3. Příznaky napadení

Na rostlinách rodu *Lactuca* lze příznaky napadení pozorovat od brzkého léta do začátku podzimu (Lebeda *et Mieslerová*, 2011). *G. cichoracearum* je charakteristické vytvářením bílých mycelií práškovitého vzhledu na povrchu listů (viz Obrázek 1 v příloze), a to na svrchní i spodní straně, a také na stoncích hostitelských rostlin. Mycelium nejprve vytváří menší okrouhlé útvary, které se postupně mohou spojovat, až pokryjí celý povrch listu. Nejdříve a nejintenzivněji jsou napadány nejstarší listy (Lebeda *et Mieslerová*, 2011). Napadení listů je doprovázeno výskytem chlorotických skvrn a v případě silného a rozsáhlého napadení usychají a odumírají nejen listy, ale i celá rostlina. Na náchylných rostlinách rodu *Lactuca*, jako je například *L. serriola* (LSE/57/15), pěstovaných ve skleníku, je možné zaznamenat první známky napadení na povrchu nejspodnějších listů už u šestitýdenních rostlin.

3.1.4. Životní cyklus

G. cichoracearum je obligátní biotrofní parazit rostlin, což znamená, že jeho růst a rozmnožování, s výjimkou klidového stádia, jsou procesy závislé na přísunu živin z živých buněk pletiva hostitele (Matsuda *et* Takamatsu, 2003). Kompletní životní cyklus zahrnuje jak sexuální, tak asexuální reprodukci. Asexuální vývoj *G. cichoracearum* je prozatím nejpodrobněji popsán Micali *et al.* (2008), ale protože jako hostitelská rostlina byla v těchto experimentech použita *Arabidopsis thaliana*, která náleží do čeledi *Brassicaceae*, jedná se, s ohledem na současně uznávané taxonomické pojetí *G. cichoracearum*, patrně o popis vývoje druhu *G. orontii*. Popisem vývoje infekčních struktur *G. cichoracearum* přímo na rodu *Lactuca* se ve svých pracích zabývá Filová (2012, 2014).

Asexuální vývoj patogena podle Micali *et al.* (2008) probíhá následně: Po fyzickém přenosu konidií, například otiskem nebo oklepáním infekčního materiálu na listy hostitelské rostliny, dojde během 1 – 2 hodin ke klíčení konidií. Vzniká primární klíčící vlákno, na jehož konci lze po 6 – 10 hodinách po inokulaci rozlišit apresorium. Kaskádou enzymatických pochodů a tlakem penetračního hrotu dochází k penetraci klíčícího vlákna přes epidermální buňky listu. Po 10 – 14 hodinách po inokulaci a úspěšné penetraci dochází k vytvoření haustoria a jeho vchlípení do hostitelské plazmatické membrány. Vlákna prorůstají pouze epidermální vrstvou listu, mezi mezofylové buňky spíše nezasahují, protože podle Zeyena *et al.* (2002) by došlo k negativnímu ovlivnění přísunu živin v důsledku oslabení fotosyntézy, probíhající právě ve vrstvě těchto buněk. Po vytvoření haustoria se na povrchu listu rozrůstají sekundární vlákna, podél kterých se mohou tvořit nová apresoria a po průniku epidermálními buňkami se mohou vytvářet sekundární haustoria. Asi sedm dní po inokulaci se vytvářejí konidiofory s konidiemi viditelné pouhým okem, čímž je zakončen proces asexuálního životního cyklu. Celý proces je ovlivněn teplotou, vlhkostí a intenzitou osvětlení prostředí.

Ke konci vegetačního období dochází k sexuální reprodukci, a to spojením samčího gametangia (antheridia) se samičím gametangiem (askogonem). Po splynutí cytoplazmy obou buněk a přechodu jádra z antheridia do askogonu vzniká dvoujaderná buňka a vytváří se chasmothecium. Ve zralém chasmotheciu se splynutím obou jader tvoří vřecko, přičemž mladé vřecko je jedinou diploidní

buňkou celého životního cyklu. Ve vřecku se meiotickým dělením tvoří askospory (Braun, 1995).

V případě sexuální reprodukce byl u *G. cichoracearum* zjištěn heterotalický způsob rozmnožování (Schnathorst, 1959a in Lebeda *et* Mieslerová, 2011), což znamená, že k úspěšnému vývoji pohlavní plodnice může dojít pouze spojením mezi dvěma partnery rozdílného párovacího typu (MAT, mating type). Schopnost párování je zajištěna jedním MAT lokusem nacházejícím se na chromozómu, přičemž tento MAT nabývá dvou forem (MAT1–1 a MAT1–2) (Turgeon *et* Yoder, 2000; Lee *et al.*, 2003). Tyto odlišné formy se nazývají idiomorfy a v jádře každého z partnerů se vyskytuje pouze jedna tato forma. Idiomorfy nesou rozdílné sekvence DNA a proteiny, které jsou kódovány geny příslušné idiomorfy, obsahují charakteristické konzervované znaky (Turgeon *et* Yoder, 2000).

3.1.5. Šíření patogena a vliv vnějších podmínek na jeho vývoj

Při šíření patogena na hostitelské organismy se nejvíce uplatňují konidie, a to hlavně při přenášení větrem. Schnathorst (1959c in Lebeda *et* Mieslerová, 2011) zaznamenal, že při vzdušné vlhkosti vyšší než 60 % RH (relative humidity) se 1 – 3 konidie mohou spojovat a vytvářet řetízky, přičemž pouze nejstarší konidie, nacházející se na konci řetízku, může infikovat hostitele. V teplých klimatických oblastech je patogen ve stadiu konidie schopen přežít i období vegetačního klidu.

Chasmothecia jsou schopná přežít jak nízké teploty v zimě, tak i teplé suché léto (Jarvis *et al.*, 2002). Rozšiřování pomocí askospor sice nenabývá takového rozsahu, jak je tomu u konidií, zato je úspěšnější (Mørk, 2011a). K prasknutí chasmothecia je potřeba přijetí jistého množství vody, ideálně při teplotě 15 – 22 °C, aby došlo k uvolnění askospor (Schnathorst, 1959c in Lebeda *et* Mieslerová, 2011).

Optimální teplota pro rozvoj *G. cichoracearum* na rostlinách *L. serriola* se pohybuje mezi 15 – 25 °C (Sogelová, 2007). Klíčivost konidií je významně ovlivňována vlhkostí prostředí, která by měla být v ideálním případě 95 – 98 % RH, ale může stačit i 50 – 75 % RH. Při 100 % RH je klíčení utlumováno a při dlouhodobém vystavení již vyvinutého mycelia této vlhkosti může dojít k zastavení růstu a rozvoje mycelia (Schnathorst, 1960a, 1965 in Lebeda *et* Mieslerová, 2011). Klíčivost konidií je dále ovlivněna jejich stářím, osvětlením a v neposlední řadě fyziologickým stavem listu.

3.1.6. Vztah rodu *Golovinomyces* s hostiteli v kontextu evoluce

Protože je proces vývoje a rozmnožování padlí zcela závislý na přítomnosti živého hostitelského organismu, je pro patogena nezbytně důležité překonat obranné strategie hostitele, efektivně využívat odebírané živiny, ale pouze do té míry, aby nedošlo k příliš nešetrnému poškození hostitelských buněk, které by vedlo k jejich odumření, a v neposlední řadě je pro něj důležité časově harmonizovat nároky vlastního životního cyklu s ohledem na životní cyklus hostitele (Aist *et* Bushell, 1991; Matsuda *et* Takamatsu, 2003).

Přirozeně tak dochází k vytvoření poměrně úzkého vztahu mezi patogenem a hostitelem, což je důvod, proč se lze u mnoha druhů z čeledi Erysiphaceae setkat se striktní specificitou k hostiteli, kdy jednotlivé druhy nebo rasy patogena mohou infikovat pouze určitý okruh hostitelských rostlin, někdy dokonce jen konkrétní druh (Schmitt, 1955). Dlouhodobý vztah patogena s hostitelem v průběhu evoluce by mohl být důvodem vzniku kospeciace mezi oběma organismy, i když prozatím není tento předpoklad jasně doložen. Znamenalo by to tedy, že fylogenetický vývoj čeledi Erysiphaceae by byl shodný s fylogenetickým vývojem hostitelských rostlin (Matsuda *et* Takamatsu, 2003).

Koevoluční vztahy rodu *Golovinomyces* a hostitelských organismů se pomocí molekulární analýzy pokusili objasnit Matsuda *et* Takamatsu (2003), kteří na základě studia oblastí interních transkribovaných spacerů (ITS) a sekvencí 28S rDNA doložili, že sice existuje blízký fylogenetický vztah mezi rodem *Golovinomyces* a rostlinami z čeledi *Asteraceae*, ale po sestavení a porovnání ITS a 28S rDNA stromů se ukázalo, že během evoluce patogen postupně osídlil i zástupce z jiných čeledí, jako jsou například *Lamiaceae*, *Ranunculaceae*, *Cucurbitaceae*, *Boraginaceae*, *Polemoniaceae* či *Solanaceae*. Z čeledi *Asteraceae* však pochází více než polovina hostitelských rostlin tohoto rodu patogena. Autoři předpokládají, že původní čeledí, na které rod *Golovinomyces* začal parazitovat, byla právě čeleď *Asteraceae*, a až poté došlo ke kolonizaci dalších čeledí (Matsuda *et* Takamatsu, 2003; Takamatsu *et* Matsuda, 2004).

3.1.7. Hostitelský okruh

Z hlediska nomenklatury je třeba upozornit na fakt, že *G. cichoracearum sensu lato* (v širším smyslu slova) je chápáno jako soubor zahrnující četné *formae speciales* i doposud nevyhrazené druhy, napadající široký okruh hostitelů z výše zmíněných čeledí. Rozdělení do těchto menších jednotek bylo provedeno v důsledku přezkoumání, vymezení a upřesnění hostitelského okruhu, fylogeneze hostitelů, morfologických znaků patogena a získání nových molekulárních dat (Braun *et* Cook, 2012). Podle výsledků molekulární analýzy (Matsuda *et* Takamatsu, 2003) je tedy vymezeno *G. cichoracearum sensu stricto* (v užším smyslu slova), jehož hostiteli jsou pouze rostliny z čeledi *Asteraceae*, konkrétně z tribu *Cichorioideae*.

Mezi druhy rodu *Golovinomyces* parazitující na čeledi *Asteraceae* dále patří: *G. artemisiae*, *G. caulicola*, *G. circumfusus*, *G. echinopsis*, *G. fraseriae*, *G. greeneanus*, *G. inulae*, *G. leuceriae*, *G. orontii*, *G. poonaensis*, *G. pseudosepultus*, *G. senecio* a *G. spadiceus* (Braun *et* Cook, 2012).

3.1.8. Geografická distribuce

Ačkoliv je za geografický původ čeledi *Asteraceae* považována jižní polokoule Země, konkrétně Jižní Amerika (Bremer, 1992), rod *Golovinomyces* pravděpodobně pochází z polokoule severní, a k jejich interakci tak došlo až po rozšíření *Asteraceae* do této oblasti (Takamatsu *et al.*, 2006).

G. cichoracearum je nejvíce rozšířeno zejména v oblastech mírného pásu (Braun, 1995), ale jeho výskyt byl zaznamenán celosvětově: v Africe (Mauricius, Maroko), na Kanárských ostrovech, v Severní i Jižní Americe (Kanada, USA, Bolívie, Chile, Salvador, Guatemala), v Asii (Čína, Irák, Írán, Izrael, Kazachstán, Kyrgyzstán, Libanon, Libye, Mongolsko, Rusko, Turkmenistán, Uzbekistán, Turecko a obecně státy východní Asie a Kavkazu), v celé Evropě a na Novém Zélandu (Braun *et* Cook, 2012).

3.1.9. Variabilita interakcí mezi *G. cichoracearum* a rodem *Lactuca*

Dřívější práce několika autorů (Lebeda, 1994; Matheron *et* Porchas, 2003a) dokládají, že většina odrůd kulturního salátu *L. sativa* je ke *G. cichoracearum* náchylná, neboť rezistenci vykazovaly pouze některé kultivary. A protože se prozatím jako nejúčinnější způsob ochrany rostlin před infekcí *G. cichoracearum* jeví preventivní opatření, tedy pěstování odolných odrůd salátu, je žádoucí věnovat

se hledání rezistentních genotypů, a to nejen mezi užitkovými, ale také mezi planými druhy rodu *Lactuca*. Tyto poznatky by byly významným přínosem pro šlechtitelské účely.

Problematicke interakcí mezi *G. cichoracearum* a zástupci z rodu *Lactuca* se již dlouhodobě věnuje Lebeda a jeho kolegové (Lebeda *et al.*, 2012a, 2012b, 2013, 2014), kteří metodou listových disků studují patogenní variabilitu izolátů *G. cichoracearum*, sbíraných především v oblasti Moravy a východních Čech. K těmto účelům byl na základě pozorování rozdílných reakcí vybraných genotypů rodu *Lactuca* vůči *G. cichoracearum* vymezen diferenční soubor 13 genotypů, který konkrétně sestává ze šesti kultivarů *L. sativa*, jednoho hybridu *L. sativa* × *L. serriola* a po dvou genotypoch kultivarů *L. serriola*, *L. saligna* a *L. virosa*. Prováděním inokulačních testů bylo zjištěno, že interakce mezi GC a rodem *Lactuca* jsou rasově specifické (Lebeda *et al.*, 2012b). Prozatím sice nebyl nalezen všeobecně odolný genotyp, ale významný podíl rezistentních reakcí byl zaznamenán u genotypů: *L. virosa* (LVIR/50), *L. saligna* (09-H58-1013), *L. sativa* cv. Colorado a *L. serriola* (PI 273617).

Také bylo pozorováno, že izolát *G. cichoracearum* pocházející z kulturního salátu vykazoval na kultivarech *L. sativa*, v rámci interakcí s rostlinami z diferenčního souboru, více virulentních reakcí než izoláty pocházející z *L. serriola*. Izoláty mohou být tedy různě virulentní (Česneková, 2008).

3.1.10. Vliv *G. cichoracearum* na hostitele na molekulární a buněčné úrovni

Haustorium, které po vchlípení specializované hyfy do hostitelské cytoplazmatické membrány proniká dovnitř do hostitelské buňky, zprostředkovává přenos sacharidů a aminokyselin do houbového mycelia (Hahn *et al.*, 1997; Voegelé *et al.*, 2001). Někteří autoři (Dodds *et al.*, 2004) předpokládají, že haustorium je zapojeno také v procesu přenosu efektorových proteinů do hostitelské buňky, jejichž účinkem dochází k potlačení rostlinné imunitní odpovědi vůči patogenu. Buňky s formujícím se haustoriem jsou také náchylnější při dalším napadení jinými houbovými patogeny (Fabro *et al.*, 2008).

Fabro *et al.* (2008) studovali změny v genové expresi infikovaných buněk rostliny *A. thaliana* s vyvíjejícím se haustoriem *G. cichoracearum* (podle dnešního pojetí tedy pravděpodobně *G. orontii*). Výsledky ukazují, že po infekci rostliny došlo

ke změně v expresi u 70 genů, z nichž 23 je spojováno se změnami metabolismu hostitele. Z těchto genů jsou některé spojovány s ovlivněním procesu výživy ve prospěch patogena, především při metabolismu sacharidů. Byla zaznamenána výrazná aktivace genů kódujících trehalóza-6-fosfát syntázu (Fabro *et al.*, 2008), což je enzym podílející se na biosyntéze disacharidu trehalózy (Avonce *et al.*, 2004), který je dále štěpen enzymem trehalázou za vzniku dvou molekul glukózy (Elbein *et al.*, 2003). Zvýšená exprese byla prokázána také u genu kódujícího glukóza-6-fosfát dehydrogenázu, enzymu katalyzujícího první reakci pentóza fosfátové dráhy (Wenderoth *et al.*, 1997). Naopak potlačení exprese bylo zaznamenáno u genu kódujícího enzym pro větvení škrobu (SBE, Starch Branching Enzyme), který katalyzuje syntézu amylopektinu, polysacharidu složeného z glukózových jednotek (Burton *et al.*, 1995). Z hlediska příjmu živin jsou tyto pochody pro patogena zřejmě důležité z důvodu lepší dostupnosti jednoduchých sacharidů (Fabro *et al.*, 2008).

Výsledky recentního výzkumu (Chen *et al.*, 2010) provedeného na rostlině *A. thaliana* popisují novou třídu transportérů glukózy, nazvanou SWEET, přičemž *G. cichoracearum* (respektive *G. orontii*) po napadení rostliny způsobuje expresi především genu SWEET12. V důsledku změny exprese tohoto genu je patogen pravděpodobně schopen ovlivňovat tok glukózy přes plazmatickou membránu hostitele za účelem vlastního zisku živin.

S pronikáním haustoria dovnitř hostitelské buňky také souvisí reorganizace jejích stavebních komponent (Koh *et al.*, 2005; Hückelhoven *et Panstruga*, 2011). S použitím GFP (Green Fluorescent Protein) markerů a následnou vizualizací pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie byly v epidermálních buňkách *A. thaliana* po napadení *G. cichoracearum* (respektive *G. orontii*) pozorovány změny v rozložení organel. Byl zaznamenán posun cytoplazmy směrem k místu penetrace, blízký kontakt jádra s haustoriálním komplexem či nahromadění endoplazmatického retikula, peroxizómů, mitochondrií, Golgiho tělísek a tonoplastu v místě komplexu. Tyto pochody slouží nejen k obranné reakci rostliny, jako je zesílení buněčné stěny v místě penetrace či vezikulární transport obranných látek, ale také k utváření struktur důležitých pro patogena, jako je například zralá a funkční membrána obklopující haustorium (Koh *et al.*, 2005).

3.1.11. Obranné strategie hostitele

Pokud je hostitelská rostlina náchylná a patogen je schopen úspěšně ji infikovat, neboli patogen je virulentní, jedná se o kompatibilní interakci. Jestliže je rostlina proti patogenu odolná (rezistentní), nedojde k úspěšné infekci, patogen je tedy avirulentní, a tento stav se označuje jako inkompatibilní interakce (Tao *et al.*, 2003).

Kromě strukturních obranných mechanismů rostlina využívá pochody probíhající na biochemické a molekulární úrovni, jejichž účinky hrají významnou roli ve vyhodnocování vztahu mezi hostitelem a patogenem. Tyto děje obvykle zahrnují sled dvou mechanismů obranných reakcí (Fabro *et Alvarez*, 2012). V první řadě je rostlina schopna detekovat molekulární struktury nacházející se na povrchu buněk patogena, takzvané PAMPs (Pathogen–Associated Molecular Patterns), a zahájit proces imunitní odezvy označované jako PTI (PAMP–Triggered Immunity) (Boller *et He*, 2009; Zipfel, 2009). Díky PTI dochází k potlačení napadení takovým patogenem, který není žádným způsobem schopen ji překonat. Patogen, který ale dokáže potlačit funkci určitých komponent PTI, je ve výsledku schopen vyvolat kompatibilní interakci (Fabro *et Alvarez*, 2012). Zmíněnými komponentami mohou být geny nebo proteiny, jejichž změnou zřejmě dochází k procesům vedoucím k preferenci rozvoje patogena, a které jsou proto označovány jako faktory kompatibility (Panstruga, 2003).

Napadení patogenem, který PTI úspěšně překonal, však může být regulováno, a to rozpoznáváním patogenních efektorových proteinů, takzvaných proteinů avirulence (Avr), pomocí proteinů resistance (R), což vede ke spuštění efektozem aktivované imunity (ETI, Effector–Triggered Immunity) (Nomura *et al.*, 2011; Fabro *et Alvarez*, 2012). Proteiny R a Avr jsou produkty příslušných *R* a *Avr* genů, jejichž vztah je antagonistický, a tento systém resistance je také označován jako vztah genu proti genu (gene–for–gene interaction) (Dodds *et al.*, 2006).

ETI je spojována s rasově specifickou rezistencí (Fabro *et Alvarez*, 2012), tedy rezistencí jen vůči určitému fenotypu patogena (Burdon *et al.*, 1996), a také s hypersenzitivní reakcí (HR), která se projevuje odumřením buněk pletiva v místě průniku patogena (Dorey *et al.*, 1997). HR je jednou z forem programované buněčné smrti (PCD, Programmed Cell Death), typické právě pro rostlinné buňky (Fukuda, 2000), protože byly pozorovány jisté strukturní odlišnosti během PCD u savčích

buněk, neboli apoptózy, a PCD v průběhu HR u rostlin (Mittler *et al.*, 1997). Účelem odumření buněk v místě penetrace je zabránit dalšímu rozvoji patogena do okolních oblastí zdravé tkáně (Liu *et al.*, 2005). Odumírání souvisí s působením zvyšující se hladiny mitochondriálních reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) na sloučeniny signalizující proces buněčné smrti, konkrétně na oxid dusnatý (NO) a kyselinu salicylovou (SA) (Amirsadeghi *et al.*, 2006), a zřejmě je tedy důsledkem negativního ovlivnění funkce mitochondriálního elektrontransportního řetězce přítomností patogena (Vanlerberghe *et al.*, 2002).

Jak ale ve své práci uvádí Fabro *et Alvarez* (2012), během interakcí *A. thaliana* s *G. cichoracearum* (respektive *G. orontii*) byly pozorovány jednak zcela náchylné či rezistentní rostliny, jednak ale i částečně rezistentní rostliny. Autoři se zaměřili na objasnění principu vzniku právě částečné rezistence. Rostliny s částečnou rezistencí umožnily klíčení konidií a rozvoj haustorií, ale poté už nedocházelo k tvorbě zralých konidioforů, což je tedy pro dokončení životního cyklu patogena v tomto hostiteli hlavním omezením. Rostliny však nevykazovaly zvýšenou aktivitu obranných odpovědí (PTI, ETI), a autoři na základě tohoto poznatku a na základě studia odlišností v genové expresi u náchylných a částečně rezistentních rostlin předpokládají, že částečná rezistence je zřejmě důsledkem změn týkajících se faktorů kompatibility, což vede k neschopnosti rostliny udržet kompatibilní vztah s patogenem v pozdějším stádiu infekce.

3.1.12. Fungicidní a biologická ochrana

K běžnému postupu v ochraně proti padlí patří chemická ochrana pomocí fungicidů. Fungicidy je možné aplikovat preventivně, před obdobím výskytu patogena, a poté ještě několikrát v průběhu sezóny (Keinath *et DuBose*, 2003). Jak uvádí Matheron *et Porchas* (1998), je důležité brát ohled na možnost vzniku tolerance patogena vůči některým složkám fungicidů a tomuto riziku předcházet nebo ho alespoň minimalizovat, a sice používáním směsí fungicidů a střídavou aplikací fungicidů z různých skupin, s různým mechanismem účinku. Proti padlí na salátu jsou používány fungicidy na bázi síry, jako je např. Kumulus DF (BASF, Kanada) (Ng *et al.*, 2005), Micro Sulf (Nufarm, USA) (Nufarm) či Microthiol Special (Matheron *et Porchas*, 1998). Dále jsou to QoI (Quinone outside inhibitors) fungicidy, jejichž účinnou složkou jsou především strobiluriny, mezi které patří například látka

kresoxim–methyl v přípravku Sovran (BASF, Kanada) (Ypema *et* Gold, 1999), azoxystrobin v přípravku Quadris (Matheron *et* Porchas, 1998), pyraklostrobin v přípravku Cabrio nebo kombinace pyraklostrobinu s boskalidem v přípravku Pristine (Matheron *et* Porchas, 2003b). Mezi fungicidy inhibující biosyntézu sterolů (SBI, sterol biosynthesis inhibitors) patří inhibitory demethylace (DMI, demethylation inhibitor), jakými jsou například látky penkonazol v přípravku Topas 100 EC či myklobutanil v přípravku Rally 40W (Matheron *et* Porchas, 2000).

Snahou je také hledat náhrady syntetických fungicidů mezi fungicidními látkami přírodní povahy. Na tuto problematiku se zaměřili Trdan *et al.* (2004), kteří sledovali účinky přípravků obsahujících síru, sójový lecitin a kyselinu salicylovou na *G. cichoracearum* vyskytující se na čekance (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi), přičemž nejvíce účinné byly přípravky se sírou, poté se sójovým lecitinem a nejméně s kyselinou salicylovou.

Aktuálním tématem v řešení ochrany proti padlí je také jeho biologická kontrola, která využívá antagonistického vztahu mezi *G. cichoracearum* a *Ampelomyces quisqualis* Ces. *A. quisqualis* je intracelulární hyperparazitický houbový organismus, který napadá zástupce čeledi Erysiphaceae, v důsledku čehož dochází k potlačení sexuálního i asexuálního rozmnožování, vývoje či k usmrcení padlí (Kiss *et* Nakasone, 1998; Kiss *et al.*, 2010). Konidie izolátu *A. quisqualis* se staly složkou pro vývoj komerčního biofungicidu, jakým je AQ10 (Schishkoff *et* McGrath, 2002; Park *et al.*, 2010).

V planých populacích *L. serriola* byl také zaznamenán současný výskyt *G. cichoracearum* a plísně salátové (*Bremia lactucae* Regel), přičemž frekvence koinfekce dosahovala asi 35 % (Lebeda *et al.*, 2008). Fungicidy používané na ochranu salátu měly většinou inhibiční účinky pouze na jednoho z patogenů, ale některé novější přípravky byly účinné proti oběma (Matheron *et* Porchas, 1998).

3.2. Metody studia variability padlí

3.2.1. Testy virulence

Charakteristiku fyziologických ras patogena, patotypů či specializovaných forem (*formae speciales*) patogena zaměřených na určité spektrum hostitelů, lze zjišťovat prováděním inokulačních testů na zvoleném diferenciacním souboru hostitelů, který zahrnuje různé kultivary či variety rostlin s danými geny rezistence (Manners, 1993). Sledováním reakcí souboru izolátů patogena na diferenciacním souboru, tedy sledováním fenotypového projevu infekce, určením stupně virulence podle kritérií vybrané stupnice (Mohamed *et al.*, 1995; Lebeda *et al.*, 2012b), jeho případným matematickým vyjádřením, například pomocí vzorce Townsenda a Heubergera (Townsend *et Heuberger*, 1943), a případným statistickým zhodnocením získaných dat, je možné pozorovat a hodnotit patogenní variabilitu studovaných izolátů.

Inokulační testy jsou označovány jako testy virulence a mohou být prováděny metodou listových disků, kdy je k testování použit pouze určitý počet stejně velkých výsečí listů rostlin, které jsou po inokulaci patogenem udržovány v kontrolovaných podmínkách. Metoda listových disků použitá ke studiu patogenní variability *G. cichoracearum* na souboru genotypů rodu *Lactuca* je podrobněji popsána v rámci praktické části této práce a její výsledky probrány v diskuzi.

Výhodou testů virulence je jejich technická nenáročnost a možnost reálného pozorování projevu infekce, rozvoje patogena a jeho vlivu na hostitele. Při hodnocení stupně virulence patogena lze také paralelně hodnotit odpovídající stupeň rezistence rostliny a naopak. Nevýhodou však je časová náročnost provádění experimentů, která je navíc limitována dostupností a životností izolátů, a dále potřeba zajištění optimálních podmínek pro rozvoj a uchování izolátů (Manners, 1993; Calonec *et al.*, 2013).

3.2.2. Determinace a studium idiomorf párovacího typu

Genetická variabilita je u hub nepřímo spojována s charakteristikou párovacího typu (MAT, mating type; v případě padlí konkrétně MAT1–1 odpovídající MAT+ a MAT1–2 odpovídající MAT–), jakožto znaku frekvence rekombinace probíhající v dané populaci (Kashyap *et al.*, 2015). Ačkoliv prozatím není zcela objasněno, zda existuje konkrétní souvislost mezi přítomností určité alely

daného MAT a geny kontrolujícími virulenci (Kashyap *et al.*, 2015), studium MAT lokusů může poskytnout informace důležité nejen k poznání sexuální reprodukce v rámci populací patogenů, ale i k lepšímu pochopení jejich evoluce, genetiky nebo epidemiologie (Brewer *et al.*, 2011). Například sekvenováním konzervovaných oblastí MAT genů byla odhalena patrná odlišnost v sekvenci aminokyselin mezi dvěma *formae speciales* jednoho druhu, konkrétně *Blumeria graminis* (DC.) Speer f. sp. *tritici* a *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Brewer *et al.*, 2011).

Určování MAT padlí (*Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun *et* Shishkoff) párováním spór izolátů s referenčními řetězi (řetězci se známým MAT) se při studiu virulence tohoto patogena věnoval už Bardin *et al.* (1997) a v recentní studii (Brewer *et al.*, 2011) byla navržena determinace MAT padlí pomocí markerů založených na amplifikaci konzervovaných oblastí dané idiomorfy MAT použitím multiplexové polymerázové řetězové reakce (multiplex PCR, multiplex Polymerase Chain Reaction). Při multiplex PCR je totiž možné amplifikovat více než jednu oblast genomu, s použitím více než jednoho páru primerů, v jedné reakci (Markoulatos *et al.*, 2002). Takto lze už po provedení jedné PCR reakce a následné elektroforetické separaci produktu v agarózovém gelu určit jednu z možných MAT idiomorf, jelikož dojde k amplifikaci buď sekvence MAT–1 nebo MAT–2.

Pro účely využití multiplex PCR k determinaci MAT byly navrženy degenerované primery, tedy primery s více možnými bázemi v určitém místě jejich sekvence, což zajišťuje amplifikaci úseků s jistou variabilitou v sekvenci nukleotidů či amplifikaci úseků s neznámou sekvencí (Kwok *et al.*, 1994), u padlí révového (*Erysiphe necator* Schwein.), padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun *et* Shishkoff), padlí šejřku (*Microsphaera syringae* (Schwein.) H. Magn., nyní *Erysiphe syringae* Schwein.) a padlí travního (*Blumeria graminis*), ale je možné aplikovat je i u jiných druhů padlí (Brewer *et al.*, 2011).

3.2.3. Využití DNA markerů

DNA markery představují úseky DNA, které u studovaných jedinců vykazují určitý stupeň variability (polymorfismu), jsou charakteristické určitým typem dědičnosti (recesivní, dominantní, kodominantní) a lze je detekovat a rozlišit od sebe. U hub je ke studiu genetické variability, potažmo k fylogenetickým analýzám,

nejčastěji používáno sekvenování specifických oblastí genomu, nejčastěji je to oblast kódující podjednotky ribozomální RNA (18S a 28S RNA) a takzvané interní transkribované spacery (ITS, Internal Transcribed Spacer).

Interní transkribované spacery, někdy překládáno také jako vnitřní přepisované mezerníky, jsou sekvence jaderné ribozomální DNA (nrDNA, nuclear ribosomal DNA), pomocí nichž jsou od sebe odděleny geny kódující 18S, 5.8S a 28S RNA nacházející se na lokusu nrDNA. Tyto geny jsou od sebe odděleny dvěma ITS, označovanými ITS1 a ITS2 (Fuertes Aguilar *et al.*, 1999).

Pro potřeby fylogenetické analýzy jsou ITS hojně využívány z několika důvodů. Jedním z nich je fakt, že nrDNA je v genomu zastoupena v mnoha kopiích, v tandemově uspořádaných repetících (Ganley *et Kobayashi*, 2007), a k jejich amplifikaci pro následnou analýzu proto stačí malé množství vzorku (Nilsson *et al.*, 2008). Jsou také umístěny mezi vysoce konzervovanými oblastmi genů, čehož je využíváno při navrhování specifických primerů pro jejich následnou amplifikaci (Henry *et al.*, 2000). Protože samotné ITS vykazují variabilitu ve své nukleotidové sekvenci, která je často druhově specifická, ITS rDNA region se stal standardním jaderným DNA barcodingovým markerem pro identifikaci organismů v říši hub (tzv. barcode of life, čárový kód života) (Schoch *et al.*, 2012). Problémem však zůstává, že některé taxonomické skupiny hub neprokazují dostatečnou variabilitu ITS mezi druhy navzájem, některé jsou naopak vysoce variabilní i mezi jedinci v rámci populace (Nilsson *et al.*, 2008). Také je potřeba upřesnit a ujasnit podmínky provádění této metody (Kovács *et al.*, 2011; Kiss, 2012).

3.2.3.1. RFLP markery

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) je kodominantní neutrální genetický marker, jehož podstatou jsou rozdíly v homologních sekvencích DNA zapříčiněné substitucí, přeskupením, inzercí nebo delecí nukleotidů v sekvenci rozpoznávané restrikční endonukleázou (Chang *et al.*, 1988). Dochází tak ke vzniku nebo ztrátě restrikčních míst, čehož je po štěpení daného úseku DNA restrikčními endonukleázami využíváno k detekci přítomnosti či nepřítomnosti různě dlouhých fragmentů DNA. Součástí analýzy RFLP je amplifikace určitého úseku DNA pomocí PCR s použitím univerzálních primerů, následné štěpení ampliconů restrikčním enzymem s rozpoznávacím místem dlouhým

4 bp (base pair), elektroforetická separace restričních fragmentů v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, přenos fragmentů z gelu na membránu (Southern blotting) a nakonec autoradiografická detekce fragmentů po jejich hybridizaci se značenou sondou (Williams *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1997).

Na základě RFLP nrDNA byl například studován fylogenetický vývoj rodu *Golovinomyces*, který byl následně podle variability hostitelského okruhu izolátů rozdělen do pěti skupin, které byly označeny podle příslušného tribu hostitele z čeledi *Asteraceae*, konkrétně tedy do skupiny: Cardueae (CAR), Astereae (AST), Heliantheae (HEL), Anthemideae (ANT) a Lactuceae (LAC) (Matsuda *et Takamatsu*, 2003). Podobná studie byla provedena Cunningtonem *et al.* (2010) na souboru *G. cichoracearum* pocházejícím z Austrálie, přičemž soubor byl v tomto případě rozdělen do šesti skupin, odpovídajících skupinám z předchozí studie (Matsuda *et Takamatsu*, 2003).

3.2.3.2. RAPD markery

Analýza polymorfismu náhodně amplifikované DNA (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) je založena na PCR amplifikaci úseků DNA s použitím jednoho nescifického oligonukleotidového primeru o délce 10 bp. Během PCR reakce se používá poměrně nízká annealingová teplota (nasedání primerů), zhruba v rozmezí 36 – 40 °C (Williams *et al.*, 1990). Díky krátké délce použitého primeru dochází k jeho vazbě na velký počet komplementárních míst, a k následné amplifikaci velkého počtu PCR produktů. Nukleotidová variabilita sekvencí mezi zkoumanými jedinci však může znemožnit připojení primeru v některých místech sekvence u konkrétních jedinců, tudíž u nich nedojde k amplifikaci jistých úseků (Rafalski *et al.*, 1994). Po elektroforetické separaci v agarózovém gelu a barvení ethidium bromidem (Williams *et al.*, 1990), případně po separaci v polyakrylamidovém gelu a barvení dusičnanem stříbrným (DeLaat *et al.*, 2005), je detekována přítomnost či nepřítomnost pruhů na gelu, a z celého spektra pruhů tak lze usuzovat na genetickou podobnost nebo různorodost jedinců.

Analýza RAPD je na rozdíl od RFLP méně náročná jak na praktické provedení, tak na vybavení laboratoře, a při jedné analýze umožňuje také detekovat více DNA polymorfismů než RFLP (Rafalski *et al.*, 1994). RAPD markery jsou však ve většině případů dominantní, tudíž nelze rozlišit, zda amplifikovaný úsek DNA

pochází z heterozygotního či homozygotního lokusu (Williams *et al.*, 1990). Nevýhodou RAPD je také nutnost zajištění striktních optimálních podmínek průběhu analýzy, což má za následek problematickou reprodukovatelnost metody a nejasnosti při porovnání výsledků získaných v různých laboratořích (Penner *et al.*, 1993). Řešením nedostatků RAPD však může být použití techniky SCAR (Sequence–Characterized Amplified Region) markerů, která je založena na sekvenaci polymorfního fragmentu získaného při RAPD, díky níž je navržen delší, specifický primer amplifikující daný úsek. Tato technika nevyžaduje tak striktní dodržování podmínek průběhu reakce jako RAPD a navíc jsou SCAR markery převážně kodominantní (Kethidi *et al.*, 2003).

Genetickou variabilitu izolátů *G. cichoracearum*, sbíraných na rostlinách čeledi *Cucurbitaceae* (konkrétně na okurkách a tykvích) a pocházejících ze dvou regionů na území Jordánska, provedl pomocí RAPD analýzy Sawalha (2011), který pozoroval nejen variabilitu mezi izoláty pocházejícími z odlišných regionů, ale také mezi izoláty sbíranými ve stejném regionu, ale na různých hostitelských rostlinách.

3.2.3.3. AFLP markery

Provedení techniky analýzy polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism), popsaná Vosem *et al.* (1995), zahrnuje štěpení genomické DNA pomocí dvou restričních endonukleáz, přičemž jedna endonukleáza rozpoznává kratší a druhá delší sekvenci DNA (například endonukleáza *MseI* rozpoznávající sekvenci 4 bp a *EcoRI* rozpoznávající 6 bp). Na konce získaných restričních fragmentů jsou připojeny dvouvláknové oligonukleotidové adaptory, což jsou krátké úseky DNA se známou sekvencí a konci komplementárními ke koncům restričních fragmentů. Fragmenty s adaptory slouží jako templátová DNA pro amplifikaci fragmentů s použitím primerů, jejichž 5' konec odpovídá sekvenci adaptoru a restričnímu místu fragmentu a na 3' konci jsou selektivní nukleotidy přesahující do sekvence daného fragmentu. Z celého množství restričních fragmentů tak jsou amplifikovány pouze ty s komplementární bází k danému selektivnímu nukleotidu a selektivita amplifikace pozitivně koreluje s počtem selektivních nukleotidů. Během AFLP se provádějí dvě po sobě následujících PCR reakce, kdy nejdříve je provedena preselektivní amplifikace, kdy se jako matrice použijí nalignované restriční fragmenty s adaptory,

a poté následuje amplifikace selektivní. Důvodem provádění preselektivní a selektivní amplifikace je fakt, že velké množství fragmentů DNA, které je získáno po restričním štěpení a které by bylo amplifikováno, by komplikovalo nebo znemožnilo správné vyhodnocení výsledků analýzy. Po amplifikaci následuje elektroforetická separace fragmentů v agarózovém (Mueller *et al.*, 1996) nebo polyakrylamidovém (Vos *et al.*, 1995) gelu, při použití fluorescenčně značených primerů je možné použít kapilární elektroforézu (Terefework *et al.*, 2001), ale fragmenty lze analyzovat i jejich přímým sekvenováním (Willems *et al.*, 2001).

Princip techniky AFLP je využitím restričních endonukleáz do jisté míry podobný RFLP (Vos *et al.*, 1995) a náhodným výběrem restričních fragmentů určených k amplifikaci zase technice RAPD (Mueller *et al.*, 1996). Technika AFLP je velmi přesná, dobře reprodukovatelná, snadno automatizovatelná a umožňuje detekci velkého množství markerů v jedné analýze. Její nevýhodou však je dominantní charakter AFLP markerů a homologie fragmentů stejné délky. Jedná se o to, že fragmenty jsou elektroforeticky separovány pouze na základě velikosti, takže stejně dlouhé fragmenty pocházející z různých oblastí genomu (které ale nemusí mít stejnou sekvenci), v gelu komigrují a jsou vyhodnoceny jako identické alely (Bussell *et al.*, 2005).

Možný původ padlí rajčete (*Oidium neolycopersici*) se porovnáním AFLP markerů *O. lycopersici* s AFLP dalších druhů padlí (parazitujících na rostlinách z čeledí: *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Begoniaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Plantaginaceae*, *Polygonaceae*, *Solanaceae*) pokusil studovat Huang (2001). Experimenty byly prováděny s izoláty *O. neolycopersici* pocházejícími z různých geografických oblastí (Kanada, Florida, ČR, Francie, Maďarsko). Izoláty ostatních druhů padlí pocházely také z různých geografických oblastí (Velká Británie, Nizozemsko, Maďarsko). Technika AFLP je pro svou citlivost doporučována především pro studium vnitrodruhové variability a studium blízce příbuzných taxonů. Z toho důvodu zřejmě nebylo možné odvodit příbuzenské vztahy mezi *O. neolycopersici* a ostatními druhy padlí. Na druhou stranu, mezi izoláty *O. neolycopersici* bylo na základě výsledků AFLP možné pozorovat malou variabilitu.

4. Materiál a metodika

4.1. Sběr a udržování izolátů *G. cichoracearum*

Sběry izolátů *G. cichoracearum* byly prováděny v červenci a srpnu roku 2013 a 2014 na území České republiky, převážně na Moravě a ve východních Čechách, a v roce 2014 také v Nizozemsku. Seznam jednotlivých lokalit s datem sběru je uveden v Tabulce 1 a 2. V každé populaci rostlin *L. serriola* či *L. sativa*, nacházející se na dané lokalitě, byl z jedné rostliny odebrán jeden napadený list, uložen do plastové krabičky na navlhčenou buničitou vatu, označen a poté byly konidie ze sporulujícího mycelia otiskem listu přeneseny na list zdravé 7 – 8 týdenní rostliny náchylného genotypu *L. serriola* (LSE/57/15). Takto inokulované rostliny byly překryty igelitovým krytem, aby nedocházelo k samovolnému přenosu konidií mezi různými izoláty, a umístěny do fytotronu s dvanáctihodinovou fotoperiodou při teplotě 20/18 °C (den/noc). Rozvoj izolátu a stav hostitelské rostliny byl průběžně kontrolován a podle potřeby byla po 2 – 3 týdnech prováděna inokulace daného izolátu na listy nových rostlin *L. serriola* (LSE/57/15).

Tabulka 1: Lokality sběru *G. cichoracearum* z *L. serriola* v roce 2013.

Číslo izolátu	Místo sběru	Datum sběru
3/13	Ostrožská Nová Ves	6. 8.
4/13	Veselí nad Moravou	6. 8.
5/13	Olšany u Prostějova	8. 8.
7/13	Žárovice	8. 8.
9/13	Křtiny	8. 8.
10/13	Ochoz u Brna	8. 8.
11/13	Ořechov	8. 8.
12/13	Silůvky	8. 8.
14/13	Moravský Krumlov – Polánka	8. 8.
18/13	Choceň – Běstovice	13. 8.
19/13	Žďár nad Orlicí	13. 8.
21/13	Ledce	13. 8.
22/13	Dobruška	13. 8.
23/13	Suchdol nad Odrou	22. 9.

Tabulka 2: Lokality sběru *G. cichoracearum* z *L. serriola/L. sativa** v roce 2014.

Číslo izolátu	Místo sběru	Datum sběru
25/14	Kojetín	12. 8.
30/14	Věrovany	12. 8.
31/14	Strážnice	12. 8.
32/14	Velké Bílovice	12. 8.
34/14	Horky	19. 8.
37/14	Ledce	19. 8.
38/14	Očelice	19. 8.
39/14	Konecchlumí	19. 8.
40/14	Dolní Bousov	20. 8.
42/14	Krchleby	20. 8.
50/14	Nizozemsko	27. 7.
164/14*	Nizozemsko	27. 7.

* Izolát pocházející z *L. sativa*

4.2. Rostlinný materiál

Pro oba testovací roky byl použit diferenciační soubor 13 genotypů rostlin rodu *Lactuca*, jejichž seznam je uveden v Tabulce 3. Semena genotypů rostlin, pocházející ze sbírky uchovávané na Oddělení fytopatologie Katedry botaniky PŘF UPOL, byla vyseta do plastových květináčů o průměru 7 cm naplněných vlhkým perlitem a umístěna do skleníku, kde teplota ve dne/noci dosahovala 25/20 °C a světelné podmínky odpovídaly okolnímu prostředí. V případě potřeby, zejména v pozdních podzimních dnech, bylo využito přisvěcování zářivkami na fotoperiodu 12 hod/12 hod (den/noc). Po 7 – 14 dnech, když semenáčky měly dostatečně vyvinuté dva děložní lístky, byly mladé rostliny přesazeny do plastových květináčů o stejném průměru, ale naplněných směsí zahradní zeminy a rašeliny (v poměru 1:1). Poté byly umístěny do skleníku a pěstovány při teplotě 25/20 °C a světelných podmínkách stejných jako při klíčení semen. K testování patogenní variability byly použity rostliny staré 8 – 10 týdnů.

Tabulka 3: Diferenciační soubor 13 genotypů rostlin rodu *Lactuca*.

Genotyp rodu *Lactuca*

L. serriola (LSE/57/15)
L. serriola (PI 273617)
L. sativa Hilde × *L. serriola*
L. sativa Capitan
L. sativa Colorado
L. sativa Argeles
L. sativa Sabine
L. sativa UCDM2
L. sativa Cobham Green
L. saligna (09-H58-1013)
L. saligna (09-H58-1010)
L. virosa (LVIR/50)
L. virosa (09-H58-998)

4.3. Inokulace a inkubace

Ze tří rostlin příslušného genotypu byl z každé odebrán list a z každého listu byly korkovrtem o průměru 12 mm vyříznuty tři disky, celkem tedy bylo použito devět disků z rostliny daného genotypu. Z listů rostlin náchylného genotypu *L. serriola* (LSE/57/15) byly stejným způsobem vyříznuty dva disky, sloužící jako kontrola zajištění vhodných podmínek inkubace. Všech jedenáct disků bylo spodní (abaxiální) stranou listu umístěno do Petriho misky o průměru 9 cm, vyložené navlhčenou buničitou vatou a filtračním papírem. Inokulace byla provedena otištěním konidií intenzivně sporulujícího mycelia daného izolátu *G. cichoracearum*, udržovaného na listech *L. serriola* (LSE/57/15), na svrchní (adaxiální) stranu každého z listových disků. Poté byly Petriho misky s inokulovanými listovými disky umístěny do fytotronu, kde probíhala inkubace při stejných teplotních i světelných podmínkách, v jakých byly udržovány izoláty *G. cichoracearum*. Každý izolát byl testován na všech genotypech rostlin z diferenciačního souboru.

4.4. Hodnocení stupně napadení a virulence

První hodnocení stupně napadení (ID, infection degree) listových disků bylo provedeno po 7 dnech od inokulace, druhé hodnocení po 14 dnech od inokulace (viz Obrázek 2 v příloze), přičemž ke zpracování výsledků byly použity údaje zjištěné při druhém hodnocení. Pro hodnocení ID byla použita čtyřbodová stupnice s hodnotami ID 0 – 3, kde: 0 = žádné symptomy napadení, 1 = ojedinělé léze padlí, 2 = vyvinuté mycelium na méně než 50 % povrchu disku, 3 = vyvinuté mycelium intenzivně sporulující na více než 50 % povrchu disku. Hodnota ID byla určována u každého disku makroskopickým pozorováním. Procentuální podíl maximálního stupně napadení (%maxID) byl vypočítán podle vzorce Townsenda a Heubergera (Townsend *et* Heuberger, 1943):

$$\%maxID = \frac{\sum(nv) \cdot 100}{xN}$$

kde: %maxID = podíl maximálního stupně napadení [%]

n = počet disků v konkrétním stupni napadení

v = hodnota stupně napadení

x = počet stupňů napadení

N = celkový počet hodnocených disků.

Na základě výsledku %maxID byl pro každý izolát na každém genotypu rostliny určen následující kategorie stupně virulence:

A (Avirulent) = avirulentní, %maxID ≤ 30 %

MV (Moderately Virulent) = středně virulentní, 30 % < %maxID ≤ 60 %

V (Virulent) = virulentní, 60 % < %maxID ≤ 100 %.

Pro reakci genotypů k izolátům byly podle %maxID určeny následující kategorie:

R (Resistant) = rezistentní, %maxID ≤ 30 %

MR (Moderately Resistant) = středně rezistentní, 30 % < %maxID ≤ 60 %

S (Susceptible) = náchylný, 60 % < %maxID ≤ 100 %.

5. Výsledky

Na diferenciačním souboru rostlin 13 genotypů rodu *Lactuca* byla v roce 2013 a 2014 metodou listových disků testována patogenní variabilita celkem 26 izolátů (14 izolátů v roce 2013, 12 izolátů v roce 2014) *G. cichoracearum* pocházejících ze sběrů prováděných na Moravě, ve východních Čechách a v roce 2014 také v Nizozemsku. V obou letech byla pozorována variabilita virulence izolátů k různým genotypům rodu *Lactuca*, respektive k jejich kultivarům, což odpovídá rasově specifické interakci v patosystému *Lactuca* – *G. cichoracearum*. Nejčastější kategorií stupně virulence byla v obou letech kategorie virulentní, poté středně virulentní a poté avirulentní, jak je uvedeno v Tabulce 4.

Většina interakcí byla zcela kompatibilních, odpovídajících stupni napadení kategorie virulentní (V), které v roce 2013 představovaly 73,3 % z celkem 161 interakcí, v roce 2014 potom 73,1 % ze 156 interakcí. Tato reakce byla nejčastěji zaznamenána na: *L. serriola* (LSE/57/15), *L. sativa* (Capitan, UCDM2 a Cobham Green), *L. saligna* (09-H58-1010) a *L. virosa* (09-H58-998).

Druhou nejčastější interakcí byla interakce částečně kompatibilní, odpovídající stupni napadení kategorie středně virulentní (MV), která v roce 2013 představovala 14,9 % interakcí, v roce 2014 pak 17,3 % interakcí a byla v největší míře pozorována na: *L. serriola* (PI 273617), *L. sativa* (Colorado a Sabine), *L. saligna* (09-H58-1013) a *L. virosa* (LVIR/50).

Nejméně častou byla interakce inkompatibilní, odpovídající stupni napadení kategorie avirulentní (A), která v roce 2013 představovala 11,8 % interakcí a v roce 2014 pouze 9,6 % interakcí. V největší míře byla tato reakce zaznamenána na stejných rostlinách jako v případě středně virulentní kategorie. Ani v jednom roce však při žádné interakci nebyla zaznamenána hodnota %maxID = 0.

Tabulka 4: Zastoupení kategorií stupňů virulence *G. cichoracearum* při interakcích s diferenciačním souborem v roce 2013 a 2014.

Rok testování	Počet izolátů	∑ interakcí	V [%]	MV [%]	A [%]
2013	14	161	73,3	14,9	11,8
2014	12	156	73,1	17,3	9,6

Legenda: V.....virulentní
MVčástečně virulentní
Aavirulentní

Výsledky interakcí *G. cichoracearum* s diferenciačním souborem 13 genotypů rodu *Lactuca* v roce 2013 a 2014, s příslušnou kategorií stupně virulence, jsou uvedeny v Tabulce 5 a 6. Ani v jednom roce nebyl nalezen izolát, který by vykazoval virulentní reakci současně na všech 13 genotypech. Každý izolát vždy poskytl alespoň jednu středně virulentní reakci, jak tomu bylo například u 6 nejvíce virulentních izolátů (5 v roce 2013 a 1 v roce 2014): 4/13, 9/13, 10/13, 14/13, 22/13 a 38/14. Bylo však zaznamenáno i 7 dalších vysoce virulentních izolátů (3 v roce 2013 a 4 v roce 2014), které vykazovaly 2 – 4 středně virulentní reakce a žádnou avirulentní reakci. Jako nejméně virulentních bylo zaznamenáno 7 izolátů (4 v roce 2013 a 3 v roce 2014): 3/13, 12/13, 18/13, 21/13, 37/14, 39/14, 40/14. U ostatních izolátů byla pozorována variabilita v zastoupení jednotlivých reakcí. Zastoupení kategorií stupňů virulence jednotlivých izolátů pocházejících z roku 2013 a 2014 je znázorněno v Grafu 1 a 2.

Tabulka 5: Výsledky interakcí izolátů *G. cichoracearum* se 13 genotypy rodu *Lactuca* v roce 2013.

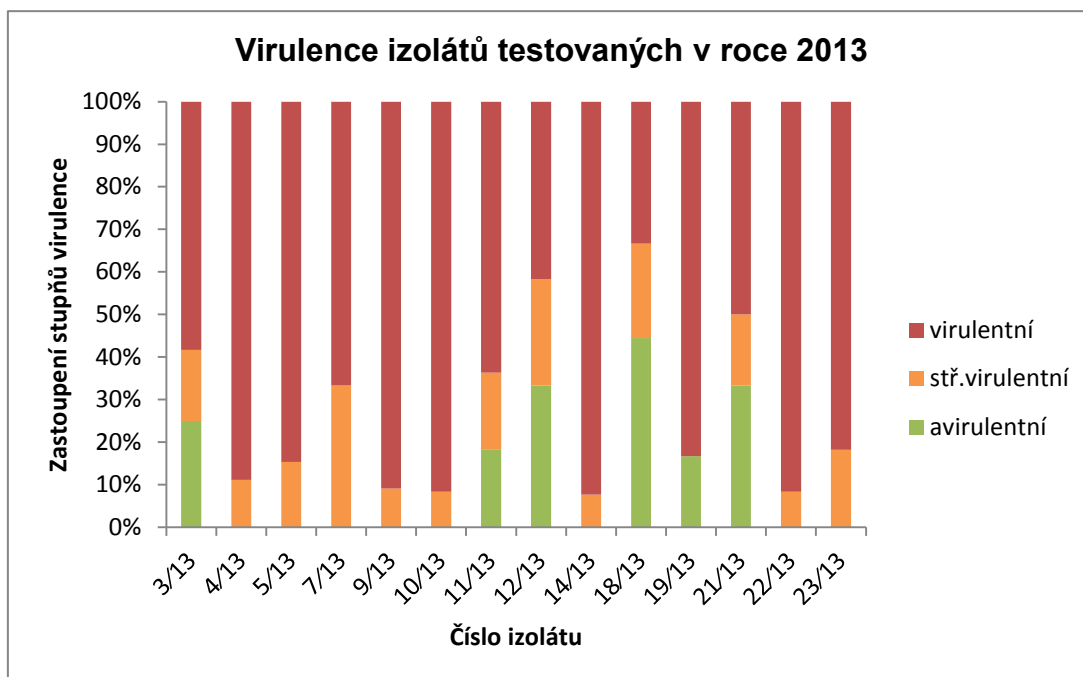
Genotyp rodu <i>Lactuca</i>	Izolát <i>G. cichoracearum</i> a kategorie stupně virulence													
	3/13	4/13	5/13	7/13	9/13	10/13	11/13	12/13	14/13	18/13	19/13	21/13	22/13	23/13
<i>L. serriola</i> (LSE/57/15)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>L. serriola</i> (PI 273617)	MV	V	V	MV	MV	V	A	A	V	A	A•	A	V	V
<i>L. sativa</i> Hilde × <i>L. serriola</i>	×	×	MV	×	×	×	×	×	MV	×	×	MV	×	×
<i>L. sativa</i> Capitan	V	V	V•	MV	V	V	V•	V•	V	×	V•	V•	MV	×
<i>L. sativa</i> Colorado	A	MV	V•	V	V	V	MV•	A	V	×	A	A•	V	MV
<i>L. sativa</i> Argeles	V	×	V	V	×	V	×	V	V	×	V	MV	V	V
<i>L. sativa</i> Sabine	MV	×	V	MV	V	V	MV	A	V	A	V	A	V	MV
<i>L. sativa</i> UCDM2	V	V	V	V	V	V	V	MV	V	V	V	×	V	V
<i>L. sativa</i> Cobham Green	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>L. saligna</i> (09-H58-1013)	A	V	V	MV	V	MV	A•	MV	V	A	V	A	V	V
<i>L. saligna</i> (09-H58-1010)	V	×	V	V	V	V	V	MV	V	MV	V	V	V	V
<i>L. virosa</i> (LVIR/50)	A	V	MV	V	V	V	V	A	V	A•	V	V	V	V•
<i>L. virosa</i> (09-H58-998)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	MV	V	V	V	V

Legenda: Aavirulentní
 MV.....částečně virulentní
 V.....virulentní
 ×.....nekróza (chybějící data)
 •.....hypersenzitivní reakce

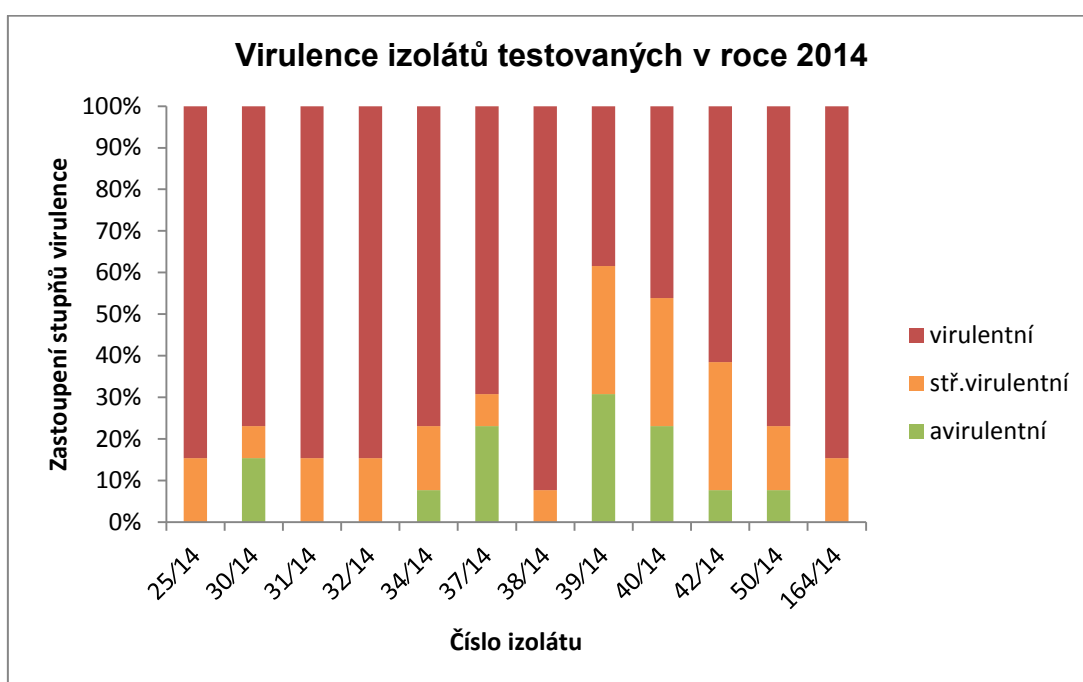
Tabulka 6: Výsledky interakcí izolátů *G. cichoracearum* se 13 genotypy rodu *Lactuca* v roce 2014.

Genotyp rodu <i>Lactuca</i>	Izolát <i>G. cichoracearum</i> a kategorie stupně virulence											
	25/14	30/14	31/14	32/14	34/14	37/14	38/14	39/14	40/14	42/14	50/14	164/14*
<i>L. serriola</i> (LSE/57/15)	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>L. serriola</i> (PI 273617)	MV	A	V	MV	V	MV	V	V	A	V	A	MV
<i>L. sativa</i> Hilde × <i>L. serriola</i>	V	V	V	V	V	V	V	V	A	V	V	V
<i>L. sativa</i> Capitan	MV	V	MV	V	V	V	V	V	MV	MV	V	V
<i>L. sativa</i> Colorado	V	V	MV	V	V	A•	V	MV	V	A	MV•	MV
<i>L. sativa</i> Argeles	V	V	V	V	V	V	V	V•	V	V	V	V
<i>L. sativa</i> Sabine	V	MV	V	V	A	V	MV	A	MV	MV	V	V
<i>L. sativa</i> UCDM2	V	V	V	V	V	V	V	MV	V	V	V	V
<i>L. sativa</i> Cobham Green	V	V	V	V	V	V	V	A	MV	V•	V	V
<i>L. saligna</i> (09-H58-1013)	V	V	V	MV	MV	A	V	A•	A	MV	V	V
<i>L. saligna</i> (09-H58-1010)	V	V	V	V	V	V	V	MV•	V•	V	V	V
<i>L. virosa</i> (LVIR/50)	V	A	V	V	MV•	A•	V•	A	V	MV	MV	V
<i>L. virosa</i> (09-H58-998)	V	V	V	V	V	V•	V	MV	MV	V	V	V

Legenda: Aavirulentní
 MV.....částečně virulentní
 V.....virulentní
 •.....hypersenzitivní reakce
 *.....izolát pocházející z *L. sativa*



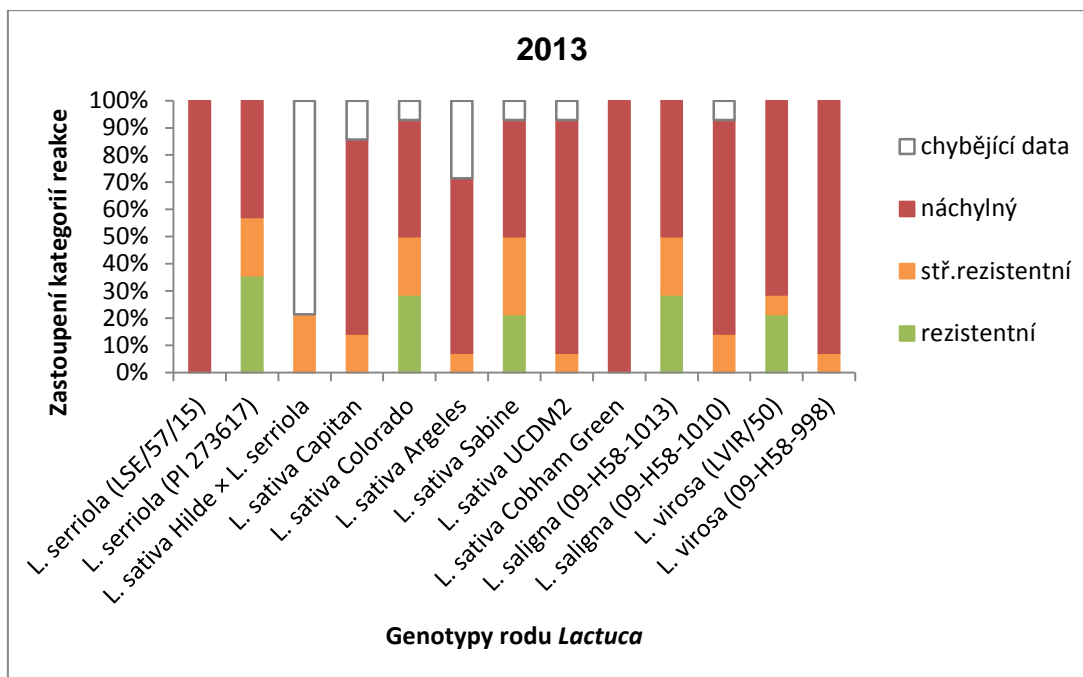
Graf 1: Zastoupení kategorií stupňů virulence u izolátů *G. cichoracearum* testovaných v roce 2013.



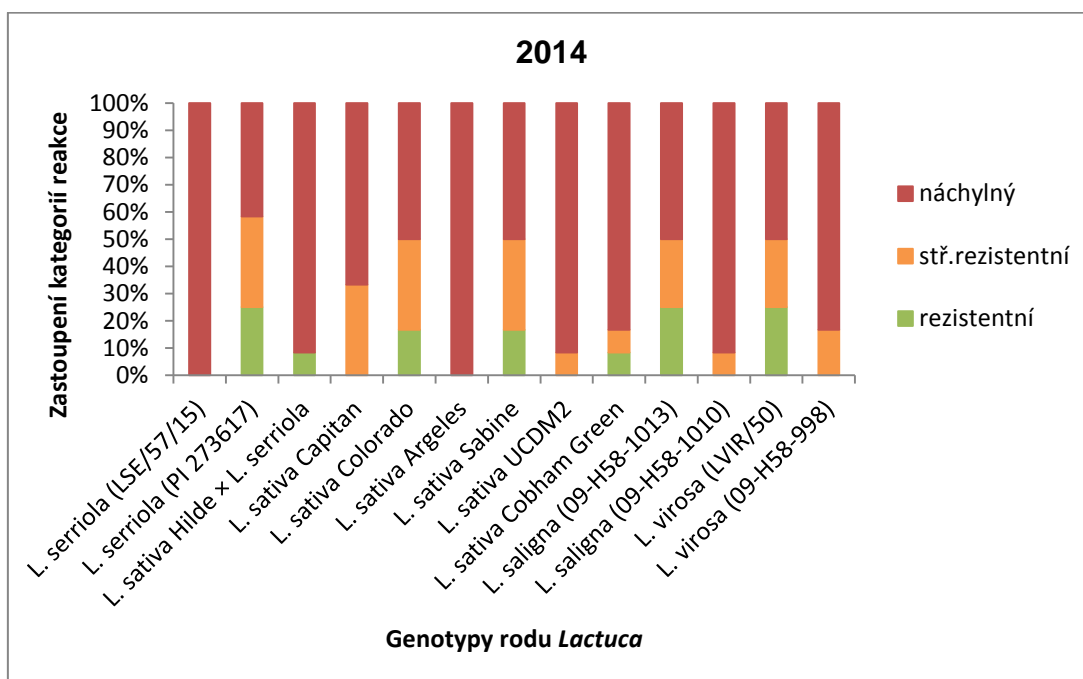
Graf 2: Zastoupení kategorií stupňů virulence u izolátů *G. cichoracearum* testovaných v roce 2014.

Mezi rostlinami daného genotypu, respektive kultivaru, nebyly mezi rokem 2013 a 2014 pozorovány významné rozdíly v zastoupení jednotlivých kategorií reakcí k izolátům, ve většině případů byl podíl rezistentní (R), středně rezistentní (MR) a náchylné (S) reakce u daných kultivarů podobný. Největší variabilita byla zaznamenána pouze u *L. sativa* (Cobham Green), který v roce 2013 poskytl pouze náchylné reakce, v roce 2014 bylo pozorováno i zastoupení středně rezistentní a rezistentní reakce. V roce 2013 se i přes opakování experimentu nepodařilo získat dostatečné množství výsledků interakcí mezi izoláty a genotypem *L. sativa* Hilde × *L. serriola*, protože po inokulaci docházelo k rychlé nekróze pletiva listových disků, což vedlo k rychlému útlumu rozvoje a následnému odumření izolátu ještě před závěrečným hodnocením. Nicméně v roce 2014 vykazoval tento genotyp vysokou náchylnost k infekci, kdy byla zaznamenána náchylná reakce v 11 případech ze 12 interakcí. Kvůli rychlé nekróze pletiva byl v roce 2013 získán nižší počet výsledků interakcí i u *L. sativa* (Argeles), ale v tomto případě byl získán dostatečný počet dat k porovnání výsledků interakcí, přičemž v obou letech byl genotyp vysoce náchylný.

Variabilita virulence izolátů *G. cichoracearum* na rostlinách stejného genotypu, ale odlišného kultivaru, byla zaznamenána u všech čtyř genotypů, v rámci *L. sativa* především mezi *L. sativa* (Sabine) vs. *L. sativa* (Argeles a UCDM2). Zastoupení jednotlivých kategorií reakce diferenciačního souboru k izolátům v roce 2013 a 2014 je znázorněno v Grafu 3 a 4.



Graf 3: Zastoupení kategorií reakce diferenčního souboru 13 genotypů rodu *Lactuca* ke 14 izolátům *G. cichoracearum* v roce 2013.



Graf 4: Zastoupení kategorií reakce diferenčního souboru 13 genotypů rodu *Lactuca* ke 12 izolátům *G. cichoracearum* v roce 2014.

6. Diskuze

V rámci praktické části předložené bakalářské práce byla v roce 2013 a 2014 sledována patogenní variabilita padlí čekankového (*G. cichoracearum*) na diferenční souboru genotypů rostlin rodu *Lactuca*. Důležitým předpokladem k provádění experimentů bylo sestavení diferenčního souboru, který by poskytoval variabilní reakce rostlin k izolátům patogena. Soubor byl sestavován postupně v průběhu čtyř let (2005 – 2008), přičemž v roce 2005 zahrnoval převážně genotypy *L. serriola*, v roce 2006 byl rozšířen o genotypy *L. sativa* a hybrida *L. sativa* × *L. serriola*, v roce 2007 ještě o genotypy *L. saligna* a *L. virosa* a v roce 2008 se jeho složení ustálilo na 13 genotypech rodu *Lactuca*, respektive jejich kultivarech (Lebeda *et al.*, 2012a), jejichž seznam je uveden v Tabulce 3.

Obecně byla většina izolátů *G. cichoracearum* v roce 2013 a 2014 virulentní a v obou letech bylo pozorováno podobné zastoupení virulentních, středně virulentních a avirulentních izolátů, přičemž v roce 2014 bylo celkové zastoupení virulentních a středně virulentních nepatrně vyšší. Ani v jednom roce však nebyl pozorován izolát, který by byl virulentní na všech 13 genotypech. Naproti tomu ve studiích zabývajících se variabilitou *G. cichoracearum*, sbíraného na přibližně stejném území, v přibližně stejném časovém rozmezí (hlavně v srpnu) a testovaného na stejném diferenčním souboru, Lebeda *et al.* (2012b) zaznamenali v letech 2008 – 2010 celkem tři izoláty, které byly virulentní ke všem genotypům ze souboru (jeden v roce 2008 a dva v roce 2010). Ve stejné studii byly také, narozdíl od výsledků zjištěných v této práci, zaznamenány poměrně zřetelné rozdíly v zastoupení kategorie virulence (V) u izolátů pocházejících ze sběrů z jednotlivých let, přičemž nejvíce byla tato kategorie pozorována v roce 2010 a nejméně v roce 2009. Zastoupení jednotlivých kategorií stupňů virulence z roku 2013 a 2014 je nejvíce podobné zastoupení kategorií z roku 2010. Virulence *G. cichoracearum* pocházejícího z podobného geografického území se tedy může v různých letech lišit a vykazovat odlišné zastoupení reakcí.

Většina izolátů z roku 2013 a 2014 pocházela z planých populací *L. serriola* z území Moravy a Čech, ale v roce 2014 byl testován jeden izolát (164/14) pocházející z kulturního salátu *L. sativa* a zároveň z odlišného území, konkrétně z Nizozemska. Virulence tohoto izolátu byla vysoká, a to ke všem genotypům z diferenčního souboru téměř stejně, ale srovnatelná s virulencí jiných izolátů,

pocházejících z *L. serriola* z České republiky (například s izolátem 25/14). Výsledky dříve provedeného testování (v roce 2006) variability izolátu *G. cichoracearum* pocházejícího z *L. sativa*, opět provedeného na diferenčním souboru genotypů rodu *Lactuca*, však odhalily, že tento izolát byl virulentnější na kultivarech genotypu *L. sativa*, než tomu bylo u izolátů z *L. serriola*, protože rostliny vykazovaly více náchylných reakcí (Mieslerová *et al.*, 2009). Z těchto výsledků vyplývá, že virulence *G. cichoracearum* k různým genotypům rodu *Lactuca* se tedy zřejmě může lišit i v závislosti na tom, z jakého genotypu hostitelské rostliny izolát pochází, ale k ověření tohoto předpokladu je potřeba provedení většího počtu interakcí diferenčního souboru s izoláty pocházejícími z *L. sativa*.

Výsledky testování patogenní variability *G. cichoracearum* v roce 2013 a 2014 vypovídající o rasové specifitě patogena, která byla potvrzena již v předchozích studiích (Česneková, 2008; Lebeda *et al.*, 2012b). Zastoupení příslušných reakcí rostlin z diferenčního souboru (rezistentní, středně rezistentní a náchylná) ke *G. cichoracearum* bylo v roce 2013 a 2014 u rostlin stejných kultivarů velmi podobné, až na reakce u genotypu *L. sativa* (Cobham Green), který byl při testování v roce 2013 vysoce náchylný ke všem izolátům, ale v roce 2014 poskytl i středně rezistentní a rezistentní reakci. Obecně se však jedná o značně náchylný kultivar, jelikož i v dřívějších experimentech (Česneková, 2008; Lebeda *et al.*, 2012b) u něho byly zaznamenány v naprosté většině případů náchylné reakce. Výsledky reakce genotypu *L. sativa* (Sabine) získané v předložené práci, kdy byly náchylné reakce pozorovány zhruba jen k polovině všech izolátů, se liší od reakcí z roku 2008 a 2010 (Lebeda *et al.*, 2012b), kdy byly zaznamenány převážně reakce náchylné. Patrné zastoupení rezistentních i středně rezistentních reakcí u *L. sativa* (Sabine) však v roce 2006 a 2007 zaznamenala také Česneková (2008), proto lze usuzovat na fakt, že *L. sativa* (Sabine) patří spíše ke středně rezistentním kultivarům, i když se nejedná o bezprostředně důležitý zdroj rezistence.

U genotypu *L. sativa* Hilde × *L. serriola*, u kterého se v roce 2013 nepodařilo z důvodu rychlé nekrózy listových disků získat dostatečné množství výsledků reakcí, lze podle výsledků této práce z roku 2014 a práce Česnekové z roku 2005 a 2006 (Česneková, 2008) obecně zhodnotit tento genotyp jako středně rezistentní, v práci Lebedy *et al.* (2012b) se však genotyp jevil spíše jako náchylný.

Porovnáním výsledků reakcí genotypů získaných v předložené práci s prací Česnekové (2008) a Lebedy (2012b) lze usuzovat, že *L. serriola* (LSE/57/15), *L. sativa* (Argeles, Capitan, UCDM2 a Cobham Green) jsou obecně vysoce náchylné a mezi středně rezistentní lze zařadit genotypy: *L. serriola* (PI 273617), *L. sativa* (Colorado a Sabine), *L. saligna* (09-H58-1013) a *L. virosa* (LVIR/50). Univerzálně rezistentní genotyp dosud nebyl pozorován v žádných experimentech.

Rezistenci salátu, získaného křížením náchylného genotypu *L. sativa* (Salinas) s náchylným genotypem *L. serriola* (UC96US23), ke *G. cichoracearum* hodnotili studiem lokusů kvantitavních znaků (QTL, Quantitative Trait Loci) ovlivňujících rezistenci Simko *et al.* (2014), kteří došli k závěru, že i náchylné genotypy salátu mohou obsahovat alely zodpovědné za rezistenci a rostlinou jsou využívány pouze v omezeném časovém období. Ve stejné studii byl k hodnocení rezistence salátu proveden také polní pokus s 80 kultivary salátu z šesti růstových typů ve sklizňové zralosti (máslový, křehký, římský, listový, olejový a stonkový), přičemž nejméně rezistentní byly saláty křehkého (crisphead) typu a nejvíce rezistentní saláty listového (leaf) a máslového (butterhead) typu.

Studium patogenní variability *G. cichoracearum* na zástupcích nejen z kulturních, ale také z planých populací rostlin rodu *Lactuca*, a pozorování reakcí rostlin k napadení patogenem, je důležitým předpokladem k nalezení odolných genotypů či kultivarů rostlin využitelných ve šlechtitelství a k následnému pěstování salátu odolného vůči padlí čekankovému (*G. cichoracearum*), což je prozatím nejefektivnější způsob ochrany rostlin před infekcí patogenem.

7. Závěr

V teoretické části předložené práce bylo popsáno padlí čekankové (*Golovinomyces cichoracearum*) a uvedeny metody používané ke studiu variability padlí.

Praktická část práce byla zaměřena na testování celkem 26 izolátů padlí (*G. cichoracearum*), pocházejících ze sběrů prováděných v roce 2013 a 2014 převážně na území Moravy a východních Čech, a testováním jejich patogenní variability na diferenčním souboru 13 genotypů rostlin rodu *Lactuca* metodou listových disků. Izoláty se svou virulencí lišily a byla pozorována rasová specifita izolátů k jednotlivým genotypům rodu *Lactuca*. Zastoupení kategorií stupňů virulence patogena i reakcí hostitelských rostlin se mezi oběma roky lišilo jen málo. Za oba roky nebyl pozorován izolát virulentní ke všem rostlinám z diferenčního souboru zároveň ani kultivar rostliny odolný zároveň ke všem izolátům, ale jako středně rezistentní se jevily genotypy: *L. serriola* (PI 273617), *L. sativa* (Colorado a Sabine), *L. saligna* (09-H58-1013) a *L. virosa* (LVIR/50).

Studium patogenní variability *G. cichoracearum* na rostlinách rodu *Lactuca* může přinést důležité poznatky o přítomnosti rezistentních genotypů či kultivarů salátu, které by bylo možné využít ve šlechtitelství a následně k doposud nejúčinnější obraně salátu proti infekci padlí, tedy k pěstování odolných odrůd salátu.

8. Použitá literatura

Aist J.R., Bushnell W.R. (1991): Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of resistance. In: Cole G.T., Hoch H.C. (Eds.): The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press, New York: 321–345.

Amirsadeghi S., Robson C.A., McDonald A.E., Vanlerberghe G.C. (2006): Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signalling molecules. *Plant and Cell Physiology* 47(11): 1509–1519.

Avonce N., Leyman B., Mascorro–Gallardo J.O., Van Dijck P., Thevelein J.M., Iturriaga G. (2004): The Arabidopsis trehalose–6–P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiology* 136(3): 3649–3659.

Bardin M., Nicot P.C., Normand P., Lemaire J.M. (1997): Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. *European Journal of Plant Pathology* 103: 545–554.

Boller T., He S.Y. (2009): Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324(5928): 742–744.

Braun U. (1987): A monograph of the Erysiphales (powdery mildews). Beihefte zur Nova Hedwigia 89:1–700.

Braun U. (1995): The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. Stuttgart, Germany, Gustav Fischer.

Braun U. (1999): Some critical notes on the classification and the generic concept of the Erysiphaceae. *Schlechtendalia* 3: 48–54.

Braun U., Takamatsu S. (2000): Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysiphaceae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences. *Schlechtendalia* 4:1–3.

Braun U., Cook R.T.A., Inman A.J., Shin H.D. (2002): The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: Bélanger R.R., Bushnell W. R., Dik A.J., Carver T.L.W. (Eds.): The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise. St. Paul, MN, USA: APS Press, 13–5.

Braun U., Cook R.T.A. (2012): Taxonomic Manual of the Erysiphales (Powdery Mildews). CBS Biodiversity Series No. 11: 1–707.

Bremer K. (1992): Ancestral areas: a cladistic reinterpretation of the center of origin concept. *Systematic Biology* 41(4): 436–445.

- Brewer M.T., Cadle–Davidson L., Cortesi P., Spanu P.D., Milgroom M.G. (2011): Identification and structure of the mating–type locus and development of PCR–based markers for mating type in powdery mildew fungi. *Fungal Genetics and Biology* 48(7): 704–713.
- Burton R.A., Bewley J.D., Smith A.M., Bhattacharyya M.K., Tatge H., Ring S., Bull V., Hamilton W.D.O., Martin C. (1995): Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *The Plant Journal* 7(1): 3–15.
- Burdon J.J., Wennström A., Elmqvist T., Kirby G.C. (1996): The role of race specific resistance in natural plant populations. *Oikos* 76(2): 411–416.
- Bussell J.D., Waycott M., Chappill J.A. (2005): Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7(1): 3–26.
- Calonnec A., Wiedemann–Merdinoglu S., Delière L., Cartolaro P., Schneider C., Delmotte F. (2013): The reliability of leaf bioassays for predicting disease resistance on fruit A case study on grapevine resistance to downy and powdery mildew. *Plant Pathology* 62(3): 533–544.
- Cavalier–Smith T. (1998): A revised six–kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical society* 73(3): 203–266.
- Cook R.T.A., Inman A.J., Billings C. (1997): Identification and classification of powdery mildew anamorphs using light and scanning electron microscopy and host range data. *Mycological Research* 101: 975–1002.
- Cunnington J.H., Lawrie A.C., Pascoe I.G. (2010): Genetic characterization of the *Golovinomyces cichoracearum* complex in Australia. *Plant Pathology* 59/1: 158–164.
- Česneková E. (2008): Variabilita interakcí mezi zástupci rodu *Lactuca* spp. a padlím čekankovým (*Golovinomyces cichoracearum*). Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- DeLaat D.M., Carvalho M.R., Lovato M.B., Acedo M.D., da Fonseca C.G. (2005): Applicability of RAPD markers on silver–stained polyacrylamide gels to ascertain genetic diversity in *Peripatus acacioi* (Peripatidae; Onychophora). *Genetics and Molecular Research* 4(4): 716–725.
- Dodds P.N., Lawrence G.J., Catanzariti A.-M., Ayliffe M.A., Ellis J.G. (2004): The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *The Plant Cell* 16: 755–768.
- Dodds P.N., Lawrence G.J., Catanzariti A.-M., Teh T., Wang C.-I. A., Ayliffe M.A., Kobe B., Ellis J.G. (2006): Direct protein interaction underlies gene–for–gene

specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103(23): 8888–8893.

Dorey S., Baillieul F., Pierrel M.–A., Saindrenan P., Fritig B., Kauffmann S. (1997): Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 10(5): 646–655.

Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., Carrol D. (2003): New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13(4): 17R–27R.

Fabro G., Di Rienzo J.A., Voigt C.A., Savchenko T., Dehesh K., Somerville S., Alvarez M.E. (2008): Genome–wide expression profiling *Arabidopsis* stage of *Golovinomyces cichoracearum* haustorium formation. *Plant Physiology* 146 (3): 1421–1439.

Fabro G., Alvarez M.E. (2012): Loss of compatibility might explain resistance of the *Arabidopsis thaliana* accession Te–0 to *Golovinomyces cichoracearum*. *BMC Plant Biology* 12: 143.

Filová D. (2012): Studium vývoje padlí (*Golovinomyces cichoracearum*) na vybraných zástupcích rodu *Lactuca*. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.

Filová D. (2014): Studium vývoje padlí (*Golovinomyces cichoracearum*) na vybraných zástupcích rodu *Lactuca* a čeledi Asteraceae. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.

Fuertes Aguilar J., Rosselló J.A., Nieto Feliner G. (1999): Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Molecular Ecology* 8(8): 1341–1346.

Fukuda H. (2000): Programmed cell death of trachery elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* 44(3): 245–253.

Ganley A.R., Kobayashi T. (2007): Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole–genome shotgun sequence data. *Genome Research* 17(2): 184–191.

Hahn M., Neef U., Struck C., Göttfert M., Mendgen K. (1997): A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 10(4): 438–445.

Henry T., Iwen P.C., Hinrichs S.H. (2000): Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* 38(4): 1510–1515.

Hibbet D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., Mclaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castelbury L.A., Crous P.W., Dai Y.-C., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Kõljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K.-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miądlikowska J., Miller A., Moncalvo J.-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüßler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.-J., Zhang N. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research* 111: 509–547.

Huang C.C. (2001): How do plant species defend themselves against *Oidium lycopersici*? Dissertation. Wageningen University, Netherlands.

Hückelhoven R., Panstruga R. (2011): Cell biology of the plant–powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 738–746.

Chang C., Bowman J.L., DeJohn A.W., Lander E.S., Meyerowitz E.M. (1988): Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 6856–6860.

Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Sommerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B. (2010): Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468(7323): 527–532.

Jarvis W.R., Gubler W.G., Grove G.G. (2002): Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems. In: Bélanger R., Dik A.J., Bushnell W.R., Carver T.L.W. (eds): *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. APS Press, USA, pp. 169–199.

Kashyap P.L., Rai S., Kumar S., Srivastava A.K., Anandaraj M., Sharma A.K. (2015): Mating type genes and genetic markers to decipher intraspecific variability among *Fusarium udum* isolates from pigeonpea. *Journal of Basic Microbiology*: Doi: 10.1002/jobm.201400483. [Epub ahead of print].

Keinath A.P., DuBose V.B. (2004): Evaluation of fungicides for prevention and management of powdery mildew on watermelon. *Crop Protection* 23: 35–42.

Kethidi D.R., Roden D.B., Ladd T.R., Krell P.J., Retnakaran A., Feng Q. (2003): Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 52(4): 193–204.

- Kiss L., Nakasone K.K. (1998): Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current Genetics* 33(5): 362–367.
- Kiss L., Pintye A., Zséli G., Jankovics T., Szentiványi O., Hafez Y.M., Cook R.T.A. (2010): Microcyclic conidiogenesis in powdery mildews and its association with intracellular parasitism by *Ampelomyces*. *European Journal of Plant Pathology* 126: 445–451.
- Kiss L. (2012): Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109(27): E1811.
- Koh S., André A., Edwards H., Ehrhardt D., Somerville S. (2005): *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections. *The Plant Journal* 44: 516–529.
- Kovács G.M., Jankovics T., Kiss L. (2011): Variation in the nrDNA ITS sequences of some powdery mildew species: do routine molecular identification procedures hide valuable information? *European Journal of Plant Pathology* 131: 135–141.
- Kwok S., Chang S.Y., Sninsky J.J., Wang A. (1994): A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications* 3(4): S39–S47.
- Lebeda A. (1994): Evaluation of wild *Lactuca* species for resistance of natural infection of powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 41: 55–7.
- Lebeda A., Petrželová I., Maryška Z. (2008): Structure and variation in the wild–plant pathosystem: *Lactuca serriola*–*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122: 127–46.
- Lebeda A., Mieslerová B. (2011): Taxonomy, distribution and biology of lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum sensu stricto*). *Plant Pathology* 60(3): 400–415.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petrželová I., Korbelová P. (2012a): Host specificity and virulence variation in populations of lettuce powdery mildew pathogen (*Golovinomyces cichoracearum* s. str.) from prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Mycological Progress* 12(3): 533–545.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petrželová I., Korbelová P., Česneková E. (2012b): Patterns of virulence variation in the interaction between *Lactuca* spp. and lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*). *Fungal Ecology* 5(6): 670–682.

Lebeda A., Mieslerová B., Petrželová I., Korbelová P. (2013): Occurrence of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) and powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*) in natural populations of prickly lettuce (*Lactuca serriola*). *Plant Protection Science* 49 SI: S24–S32.

Lebeda A., Křístková E., Kitner M., Mieslerová B., Jemelková M., Pink D.A.C. (2014): Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology* 138(3), SI: 597–640.

Lee J., Lee T., Lee Y.-W., Yun S.-H., Turgeon B.G. (2003): Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* 50: 145–152.

Liu W.-T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63(11): 4516–4522.

Liu Y., Schiff M., Czymmek K., Tallóczy Z., Levine D., Dinesh-Kumar S.P. (2005): Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121(4): 567–577.

Manners J.G. (1993): *Principles of Plant Pathology* (Second edition). Cambridge University Press, UK: 1–343.

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. (2002): Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16(1): 47–51.

Matheron M.E., Porchas M. (1998): Evaluation of new fungicides for management of downy and powdery mildew of lettuce in 1998. In: Oebker, N.F. (ed.): *Vegetable: A College of Agriculture Report for 1998*. Tucson, AZ, USA, College of Agriculture, University of Arizona: 90–93.

Matheron M.E., Porchas M. (2000): Evaluation of fungicide performance for control of powdery mildew on lettuce in 2000. In: Byrne, D.N., Baciewicz, P. (eds.): *Vegetable: A College of Agriculture Report for 2000*. Tucson, AZ, USA, College of Agriculture, University of Arizona. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10150/220020> [cit. 2015–3–16].

Matheron M.E., Porchas M. (2003a): Evaluation of lettuce cultivar susceptibility to powdery mildew in 2003. In: Byrne, D.N., Baciewicz, P. (eds.): *2003 Vegetable Report*. Tucson, AZ, USA, College of Agriculture & Life Sciences, University of Arizona: 112–113.

Matheron M.E., Porchas M. (2003b): Fungicide performance for control of powdery mildew on lettuce in 2003. In: Byrne, D.N., Baciewicz, P. (eds.): *Vegetable: A College*

of Agriculture Report for 2003. Tucson, AZ, USA, College of Agriculture, University of Arizona. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10150/214973> [cit. 2015–3–16].

Matsuda S., Takamatsu S. (2003): Evolution of host–parasite relationship of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphales) inferred from nuclear rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 314–27.

Micali C., Göllner K., Humphry M., Consonni C., Panstruga R. (2008): The powdery mildew disease of *Arabidopsis*: a paradigm for the interaction between plants and biotrophic fungi. *The Arabidopsis Book* 6: e0115.

Mieslerová B., Lebeda A., Česneková E. (2009): Study of interactions of *Lactuca* spp. (lettuce) and lettuce powdery mildew (*Golovinomyces cichoracearum*). In: Šafránková, I., Šefrová, H. (eds.): XVIII. Czech and Slovak Plant Protection Conference, Brno, 2–4 September 2009: 98.

Mittler R., Simon L., Lam E. (1997): Pathogen–induced programmed cell death in tobacco. *Journal of Cell Science* 110(11): 1333–1344.

Mohamed Y.F., Bardin M., Nicot P.C., Pitrat M. (1995): Causal agents of powdery mildew of cucurbits in Sudan. *Plant Disease* 79(6): 634–636.

Mørk E.K. (2011): Disease resistance in ornamental plants: Transformation of *Symphyotrichum novi-belgii* with powdery mildew resistance genes. PhD Thesis, Department of Food Science, Aarhus University, Denmark.

Mueller U.G., Lipari S.E., Milgroom M.G. (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus–growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology* 5: 119–122.

Ng P.J., Fleet G.H., Heard G.M. (2005): Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 101(2): 237–250.

Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., Larsson K.–H. (2008): Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4: 193–201.

Nomura K., Mecey C., Lee Y.–N., Imboden L.A., Chang J.H., He S.Y. (2011): Effector–triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity–associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 108(26): 10774–10779.

Nufarm [online]. [cit. 20153-10]. Dostupné z: <http://www.nufarm.com/USAg/MicroSulfr>.

- Panstruga R. (2003): Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6(4): 320–326.
- Park M.J., Choi Y.J., Hong S.B., Shin H.D. (2010): Genetic variability and mycohost association of *Ampelomyces quisqualis* isolates inferred from phylogenetic analyses of ITS rDNA and actin gene sequences. *Fungal Biology* 114(2–3): 235–247.
- Penner G.A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S.J., Fedak G. (1993): Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications* 2(4): 341–345.
- Rafalski A., Tingey S., Williams J.G.K. (1994): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant Molecular Biology Manual H4*: 1–8.
- Sawalha H. (2011): Incidence and genetic variability of *Erysiphe cichoracearum*, the causal agent of powdery mildew on squash and cucumber in Tubas and Jenin. *An–Najah University Journal for Research – Natural Sciences* 25(1): 105–121.
- Shishkoff N., McGrath M.T. (2002): AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. *Plant Disease* 86(8): 915–918.
- Schmitt J.A. (1955): The host specialization of *Erysiphe cichoracearum* from zinnia, phlox and cucurbits. *Mycologia* 47: 688–701.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109(16): 6241–6246.
- Simko I., Rauscher G., Sideman R.G., McCreight J.D., Hayes R.J. (2014): Evaluation and QTL mapping of resistance to powdery mildew in lettuce. *Plant Pathology* 63: 344–353.
- Sogelová I. (2007): Studium teplotních nároků padlí (hub řádu Erysiphales). Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta.
- Takamatsu S., Matsuda S. (2004): Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in Erysiphales. *Mycoscience* 45: 340–344.
- Takamatsu S., Matsuda S., Ninomi S., Havrylenko M. (2006): Molecular phylogeny supports a Northern Hemisphere origin of *Golovinomyces* (Ascomycota, Erysiphales). *Mycological Research* 110: 1093–101.
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.–S., Han B., Zhu T., Zou G., Katagiri F. (2003): Quantitative nature of *Arabidopsis* response during compatible

and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 15: 317–330.

Terefework Z., Kaijalainen S., Lindström K. (2001): AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. *Journal of Biotechnology* 91(2–3): 169–180.

Townsend G.R., Heuberger J.V. (1943): Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report* 27(17): 340–343.

Trdan S., Valič N., Jerman J., Ban D., Žnidarčič D. (2004): Efficacy of three natural chemicals to reduce damage of *Erysiphe cichoracearum* on chicory in two meteorologically different growing seasons. *Journal of Phytopathology* 152: 567–74.

Turgeon B.G., Yoder O.C. (2000): Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 31(1): 1–5.

Vanlerberghe G.C., Robson C.A., Yip J.Y. (2002): Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiology* 129(4): 1829–1842.

Voegelé R.T., Struck C., Hahn M., Mendgen K. (2001): The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98(14): 8133–8138.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.

Wang Z., Johnston P.R., Takamatsu S., Spatafora J.W., Hibbett D.S. (2006): Toward a phylogenetic classification of the Leotiomycetes based on rDNA data. *Mycologie* 98: 1067–1075.

Wenderoth I., Scheibe R., von Schaewen A. (1997): Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose–6–phosphate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 272(43): 26985–26990.

Willems A., Coopman R., Gillis M. (2001): Comparison of sequence analysis of 16S–23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA–DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(Pt2): 623–632.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18(22): 6531–6535.

Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87(12): 4576–4579.

Ypema H.L., Gold R.E. (1999): Kresoxim–methyl: modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83(1): 4–19.

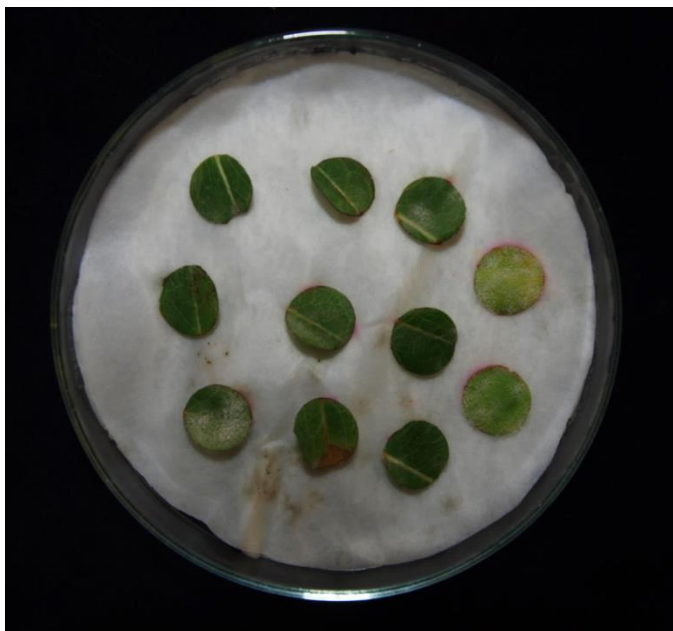
Zeyen R.J., Carver L.W., Lyngkjaer M.F. (2002): Epidermal cell papillae. In: Bélanger R., Dik A.J., Bushnell W.R., Carver T.L.W. (eds): *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. APS Press, USA, pp. 107–125.

Zipfel C. (2009): Early molecular events in PAMP–triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 414–420.

9. Příloha



Obrázek 1: Rozvoj mycelia *G. cichoracearum* na listech *L. serriola* (LSE/57/15) (fotografie: K. Michalcová, 2013).



Obrázek 2: Hodnocení stupně napadení *G. cichoracearum* na listových discích 14 dní po inokulaci (fotografie: K. Michalcová, 2013).