

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky



## **Výskyt a variabilita plísně slunečnicové v ČR**

**Bakalářská práce**

**Klára Dobešová**

**Studijní obor:** Biologie-geologie a ochrana životního prostředí  
se zaměřením na vzdělávání

**Forma studia:** Prezenční

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

Olomouc 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D. Veškerou literaturu a další zdroje, které jsem v práci použila, řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne.....

.....

### **Poděkování**

Děkuji Doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za odborné vedení a ochotu při konzultacích. Mgr. Romaně Pospíchalové děkuji za předání praktických zkušeností a pomoci při práci v laboratoři, dalším pracovníkům fytopatologické laboratoře Katedry botaniky PřF UP v Olomouci Mgr. Pavle Šikové a paní Věře Zoubkové za pomoc při pěstování rostlin a práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji také svým rodičům a kamarádům za podporu během celého studia.

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

**Jméno a příjmení autora:** Klára Dobešová

**Název práce:** Výskyt a variabilita plísně slunečnicové v ČR

**Typ práce:** Bakalářská práce

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

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

**Rok obhajoby práce:** 2018

### **Abstrakt:**

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením fyziologických ras *Plasmopara halstedii* u izolátů ze slunečnice roční (*Helianthus annuus*) pomocí „soil drench inoculation“ (SDI) a testováním jejich citlivosti k fungicidu metalaxylu na discích z děložních listů. Izoláty pocházely z území České republiky z let 2015-2017. Na lokalitě Olomouc-Holice, odkud byly izoláty získány ve všech třech letech, se v populaci *P. halstedii* vyskytovaly: v roce 2015 rasy 750 60 (710 60) a 754 71, v r. 2016 rasy 700 60, 710 60 a 750 60, v r. 2017 rasa 710 60. Z lokality ÚKZUZ v Lednici byly vzorky *P. halstedii* získány jen v roce 2016 a určeny jako rasy 714 71 a 754 71. Z lokality ZÚ v Kroměříži byly izoláty získány v r. 2017; jednalo se o rasu 714 71 (v jednom případě pravděpodobně směs se 704 71). V r. 2017 byly izoláty získány z nové lokality v Hustopečích u Brna; 15 vzorků z výdrolu slunečnice ze třech částí kukuřičného pole bylo testováno a zaznamenány byly rasy 704 71 a 714 71.

Při hodnocení listových disků se prokázalo, že ani jeden z izolátů nebyl rezistentní vůči metalaxylu, který je tak v ČR stále účinným fungicidem proti plísni slunečnice.

**Klíčová slova:** plíseň slunečnicová, *Plasmopara halstedii*, rasa, *Helianthus annuus*,  
diferenční linie, zoospora, fungicidy

**Počet stran:** 35

**Počet příloh:** 3

**Jazyk:** český

## **BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION**

**Author's first name and surname:** Klára Dobešová

**Title:** Occurrence and variability of sunflower downy mildew in the Czech Republic

**Type of thesis:** Bachelor thesis

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

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

**The year of defence:** 2018

### **Abstract:**

This bachelor thesis deals with determination of *Plasmopara halstedii* physiological races in isolates from sunflower (*Helianthus annuus*) using a “soil drench inoculation” (SDI), and testing of their susceptibility to metalaxyl on cotyledon discs. Isolates originated at the Czech Republic from 2015-2017. In Olomouc-Holice, where isolates were obtained in all three years, the population of *P. halstedii* was composed of: the races 750 60 (710 60) and 754 71 in 2015; races 700 60, 710 60 and 750 60 in 2016; race 710 60 in 2017. From the site of ÚKZUZ in Lednice, samples of *P. halstedii* were obtained only in 2016 and designated as races 714 71 and 754 71. From the locality of ZU in Kroměříž, isolates were obtained in 2017; it was a race 714 71 (in one case probably in a mixture with 704 71). In 2017 the isolates were obtained from a new locality in Hustopeče near Brno; 15 isolates of downy mildew from sunflower originating from three parts of the maize field were tested and the recorded races were 704 71 and 714 71.

In leaf disc tests, none of *P. halstedii* isolates proved to be resistant to metalaxyl, which remains an effective fungicide against the sunflower downy mildew in the Czech Republic.

**Keywords:** sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, race, *Helianthus annuus*, set of differential lines, zoospore, fungicide

**Number of pages:** 35

**Number of appendices:** 3

**Language:** Czech

## Obsah

1 Charakteristika <i>P. halstedii</i> .....	9
1.1 Hostitelský okruh <i>P. halstedii</i> .....	9
1.2 Historie výskytu <i>P. halstedii</i> .....	10
1.3 Nomenklatura a taxonomie <i>P. halstedii</i> .....	10
1.4 Morfologie <i>P. halstedii</i> .....	12
1.5 Životní cyklus plísňe slunečnicové .....	13
1.6 Symptomy plísňe slunečnicové .....	15
1.7 Rezistence vůči <i>P. halstedii</i> .....	16
1.8 Rozšíření a patogenní variabilita <i>P. halstedii</i> .....	17
1.8.1 Rozšíření ve světě .....	17
1.8.2 Výskyt v České republice .....	18
2 Materiál a metody .....	20
2.1 Rostlinný materiál .....	20
2.2 Izoláty <i>P. halstedii</i> .....	20
2.3 Udržování a množení izolátů <i>P. halstedii</i> .....	21
2.4 Metoda inokulace semenáčků (SDI) .....	24
2.5 Test rezistence izolátů vůči metalaxylu.....	26
3 Výsledky .....	29
3.1 Určení ras izolátů <i>P. halstedii</i> metodou inokulace semenáčků (SDI).....	29
3.1.1 Rasy <i>P. halstedii</i> z roku 2015 .....	29
3.1.2 Rasy <i>P. halstedii</i> z roku 2016 .....	29
3.1.3 Rasy <i>P. halstedii</i> z roku 2017 .....	30
3.2 Reakce <i>P. halstedii</i> k metalaxylu .....	32
4 Diskuse.....	33
5 Souhrn .....	36
6 Literatura .....	37
7 Seznam obrázků .....	41
8 Seznam tabulek .....	42
9 Seznam příloh.....	43

## **Cíle práce**

Primárním cílem bakalářské práce bylo nejprve zpracovat literární rešerši zabývající se vnitrodruhovou variabilitou *Plasmopara halstedii* popsanou na fenotypové úrovni fyziologických ras. Dále shrnout metody, které se využívají k určení ras a testování vnitrodruhové variability plísně slunečnicové a nakonec v rámci diskuze zhodnotit své výsledky, porovnat rasy určené pomocí rozšířeného diferenciačního souboru s dostupnými aktuálními daty ze sousedních evropských zemí a vyvodit příslušné závěry. Posledním úkolem bylo vypracování didaktické části- zařazení tématu „plíseň slunečnice“ do výuky biologie na SŠ.

### **Praktické cíle práce:**

- 1) přemnožit linie diferenciačního souboru slunečnice a osivo použít k determinaci ras izolátů *P. halstedii* z let 2015, 2016 a 2017 ze sbírky Katedry botaniky PřF UP v Olomouci a to metodou inokulace semenáčků (SDI)
- 2) aktivně se zapojit do monitorování, sběru a testování izolátů *P. halstedii* na území ČR
- 3) otestovat vybrané izoláty na rezistenci vůči fungicidu metalaxylu

## Úvod

Vřetenatka slunečnicová, odborně *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni (1988), způsobuje plíseň slunečnic a je považována za jednu z nejničivějších onemocnění zemědělské plodiny *Helianthus annuus* L. (slunečnice roční) po celém světě (Viranyi *et al.*, 2015). Její výskyt je v současnosti rozšířen ve všech zemích světa, které slunečnici pěstují, včetně České republiky, kde může způsobit značné ekonomické ztráty.

Díky intenzivnímu pěstování slunečnice v monokulturách dochází v populaci plísně ke změnám. Počet zaznamenaných ras *P. halstedii* je v současnosti kolem 46 (Drábková Trojanová, 2018; Spring a Zipper, 2018). Používání fungicidů, např. metalaxylu, vedlo k selekci rezistentních kmenů (Viranyi *et al.*, 2015). Určení ras izolátů se provádí metodou inokulace semenáčků (SDI) (Trojanová *et al.*, 2017). Pro účinnou kontrolu plísně je nutné monitorovat spektrum ras v populacích a citlivost k fungicidům.



## 1 Charakteristika *P. halstedii*

*Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni (1888) je obligátní biotrofní patogen třídy Oomycete (Gascuel *et al.*, 2015). Spadá do řádu Peronosporales, kam také patří významní obligátních biotrofové, jako je *Plasmopara viticola* na vinné révě a *Bremia lactucae* na salátu. Plíseň slunečnicová může mít veliký ekonomický dopad na výnos plodiny, a proto jsou v kultivarech slunečnice přítomné geny rezistence Pl, aby je ochránily před onemocněním (Gascuel *et al.*, 2015), nebo jsou semena ošetřena fungicidy, jako je azoxystrobin a fenamidon (Harverson *et al.*, 2002)

Vzhledem k tomu, že patogen vykazuje vysokou patogenní variabilitu, je obtížné plodinu dané plísni ubránit. Oospory přežívají v půdě až dekádu let a je velmi těžké chorobu vymýtit (Virányi a Spring, 2011). Primárním infekce *P. halstedii* je přes kořeny mladých rostlinek, což vede k systémové infekci, která v případě silného napadení končí odumřením celé rostliny, nebo způsobí zakrslost rostlin s minimálním výnosem semen (Gulya, 2004).

### 1.1 Hostitelský okruh *P. halstedii*

Významnými hostiteli jsou plané i kultivované druhy r. *Helianthus*, včetně slunečnice (EPPO, 2014). Prvním hostitelem, na kterém byla popsána *Plasmopara halstedii* byl *Eupatorium purpureum* (sadeč červený). Na světě se vyskytuje přes 100 druhů rostlin čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité), které jsou možným hostitelem tohoto patogenu. Vedle zástupců rodu *Helianthus* patří mezi hostitele i např. rody *Ambrosia* (ambrosie), *Artemisia* (pelyněk), *Bidens* (dvouzubec), *Centaurea* (chrpa), *Cineraria* (cinerarie), *Coreopsis* (krásnoočko), *Dimorphotheca* (dimorphotecie), *Erigeron* (turan), *Eupatorium* (sadeč), *Rudbeckia* (třapatka), *Solidago* (zlatobýl) a *Xanthium* (řepeň) (Virányi, 2002).

Podrobnější studie *P. halstedii* jako patogenu byly prováděny např. na rodu *Xanthium strumarium* (Virányi, 1984), *Ambrosia artemisiifolia* (Walcz *et al.*, 2000), nebo *Helianthus annuus* včetně jeho planě rostoucích zástupců *H. agrophyllus*, *H. debilis*, *H. petiolaris* (Spring *et al.*, 2003). Nejvýznamnějším hospodářským hostitelem je ovšem slunečnice roční (*Helianthus annuus*). *P. halstedii* je považována za hlavní onemocnění slunečnic ve všech zemích, které ji pěstují (Sackton, 1981).

## 1.2 Historie výskytu *P. halstedii*

*P. halstedii*, která způsobuje plíseň slunečnicovou, byla poprvé objevena v USA v roce 1888 (Leppik, 1962). Kde byla také poprvé popsána a to v Indianě (Nishimura, 1922) a v Minnesotě (Young a Morris, 1927), na počátku dvacátých let. Později byla *P. halstedii* nalezena po celém Severní Americe, protože patří k jednomu z největších pěstovatelům slunečnice roční. V Jižní Americe byla *P. halstedii* poprvé zaznamenána v Argentině v roce 1959 (Sackston, 1981). V této zemi však nejsou klimatické podmínky příliš příznivé pro vývoj a růst tohoto patogenu. Ze Severoamerického kontinentu byla plíseň slunečnicová rozšířena dále do světa (Roeckel-Drevet *et al.*, 2003).

První výskyt onemocnění v Evropě byl zaznamenán v Rusku v 60. letech (Delmotte *et al.*, 2008). Později se rozšířila z Ruska na Balkánský poloostrov (Bulharsko, Řecko a Turecko) a následně i do mnoha dalších evropských zemí (např. Maďarsko, Itálie, Francie, Španělsko, Německo a Československo) (Virányi, 2002). Pravděpodobně byl patogen později rozšířen v rostlinném materiálu na jiné kontinenty, s výjimkou Austrálie a Antarktidy (Gulya, 2007). Intenzivní zemědělství v kombinaci s vhodným počasím vedly ve druhé polovině 20. století k lokální epidemii onemocnění v celé Evropě (Sedlářová *et al.*, 2013). Od roku 1977 se šíří natolik, že je považována za významnou chorobu evropského zemědělství. Dosud bylo celosvětově identifikováno čtyřicet šest ras *P. halstedii* (Gascuel *et al.*, 2015). Velmi málo vědeckých publikací se týká výskytu *P. halstedii* v Asii. Co se týče Afriky, byly výrazné ekonomické ztráty na úrodě slunečnic především v Jihoafrické republice kolem roku 1992 (Viljoen *et al.*, 1997) a v Maroku (Achbani *et al.*, 1998), které nyní používají semena ošetřená fungicidem (Roeckel-Drevet *et al.*, 2003).

## 1.3 Nomenklatura a taxonomie *P. halstedii*

Vřetenatka slunečnicová, která způsobuje plíseň na kultivarech slunečnic, je ve světové literatuře známa pod dvěma vědeckými názvy: zaprvé *Plasmopara halstedii*, používaná ve většině částí světa (Leppik, 1966), která napadá kultivované slunečnice, další roční a trvalé druhy *Helianthus*, stejně jako řadu dalších kompozitů; zadruhé *Plasmopara helianthi*, jméno zavedené Novotel'novou (1966) v Rusku, odkazuje na houbu specializovanou pouze na rod *Helianthus*. Avšak Novotel'nova (1966) rozlišovala druhy a formy této houby na základě drobných morfologických znaků a použila lokální populace plísně pro inokulační experimenty. A proto tento koncept klasifikace

Novotel'novy neplatí pro jiné oblasti, než je oblast Krasnodar (Sackston, 1981) v Rusku (Virányi, 1984, EPPO, 2014).

Botanik Farlow (1883) poprvé popsal a pojmenoval patogen plísně slunečnicové jako *Peronospora halstedii*. Dá se říct, že nejprve odkázal na patogen Halsted, který našel vzorek na *Eupatorium purpureum* poblíž Bussey Instituce v roce 1876. Schröter (1886) oddělil rod *Plasmopara* od *Peronospora* kvůli odlišnému klíčení zoospor. Berlese a de Toni (1888) pak převedl taxon do nového rodu pod název *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni. Ve svém popisu obsahovala řada hostitelů sedm rodů, včetně čtyř trvalých druhů *Helianthus*, ale opět žádné ročníky. Na základě jemných morfologických rozdílů, popsal Wilson (1907) rod *Rhysotheca*, do kterého byla *Plasmopara halstedii* řazena, ale nový rod nikdy nezískal veřejné přijetí (Virányi a Spring, 2011). V následujících letech byly v Severní Americe hojně testovány vzorky plísní na rostlinách z rodu *Asteraceae* a byly klasifikovány jako *Plasmopara halstedii* a to díky své morfologické podobnosti sporangioforů a sporangií, i když variabilita ve velikosti a tvaru byla velká (Stevens, 1913).

Ve východní Evropě, kde se ve 20. století plíseň slunečnicová stala vážnou hrozbou, byla provedena podrobná studie patogenního inokula, za účelem objasnit hostitelské spektrum plísně slunečnicové (Novotel'nova, 1966). Terénní experimenty nikdy nevykazovaly onemocnění na jiných hostitelských rostlinách než *H. annuus*. Tyhle výsledky povzbudily společnost Novotel'nova k reklasifikaci druhu a určily stálý název *Plasmopara halstedii* (Virányi a Spring, 2011).

Molekulární, genetické nástroje zásadně ovlivnily naše chápání fylogeneze oomycete a změnily klasifikaci na všech taxonomických úrovních (Spring a Thines, 2004). *Plasmopara* podle Schrötera (1886) byla uznávaná jako polyfylétická jednotka. Široký výzkum založený na molekulárních a genetických datech plísní na čeledi *Asteraceae* stále chybí, kvůli technickým problémům při získávání spolehlivých informací o sekvenci DNA ze starých vysušených herbářových materiálů (Virányi a Spring, 2011).

Rasy *Plasmopara halstedii* jsou definovány mezinárodním systémem nomenklatury založeným na diferenčním souboru slunečnicových inbredních linií (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). V osmdesátých letech došlo ke změnám ve virulenci *P. halstedii*, které vedly k zavedení nového systému nomenklatury založeného na reakci devíti slunečnicových diferenčních linek, uspořádaných do 3 tripletů s různými Pl geny rezistence a výsledkem byl rasový třímístný identifikační kód

(Sedlářová *et al.*, 2016). Podle výsledků z celého světa se triplet skládá z čísel mezi 100 až 777 (Spring a Zipper, 2018). Současný identifikační kód se skládá z patnácti diferenciálních linií slunečnic, seskládaných po pěti tripletech a proto je rasa *P. halstedii* označena pětimístným kódem (Gascuel *et al.*, 2015).

Mezinárodní systém nomenklatury se začíná velmi rychle používat, což by mělo umožnit zjistit přítomnost stejných ras na různých kontinentech a definovat konkrétní vzorek v každé zemi (Roedel-Drevet *et al.*, 2003). Za posledních 20 let se objevují nové rasy, čímž se zvýšila virulence *P. halstedii* (Ahmed *et al.*, 2012) a několik genů rezistence Pl použitých v slunečnicových hybridech se stalo neúčinnými (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

#### **1.4 Morfologie *P. halstedii***

*P. halstedii* je organismus, u kterého je známé jak pohlavní tak nepohlavní rozmnožování. Samčí pohlavní orgán se nazývá anteridium, je kyjovitého tvaru o velikosti 12-30  $\mu\text{m}$ , tvoří se na vzdálenějších anteridiálních větvích hyf a jsou hormonálně přitahovány k oogoniu. Oogonia jsou samičí pohlavní buňky kulovitého či oválného tvaru o průměru 30–40  $\mu\text{m}$ , obsahují jednu nebo více oosfér (EPPO, 2014). Po kontaktu anteridia s oogoniem se dostávají samčí jádra kopulačními kanálky z anteridia do oogonia. Rozmnožováním je tedy typická oogametangiogamie. Splynutím těchto dvou útvarů vznikají zygoty a později kulovité tlustostěnné oospory, které po odumření mycelia přezimují v půdě a na jaře jsou připraveny klíčit (Nishimura, 1922a). Oplozená oosféra se mění v tlustostěnnou oosporu (zygotu) (Váňa, 1998). Oospory jsou kulovité a mají průměr 15 -30  $\mu\text{m}$ . Barva oospor bývá žlutohnědá, mají zvrásněnou stěnu a po vyklíčení mohou vytvářet sporangia. Oospory se tvoří ve všech vegetativních orgánech hostitelských rostlin, především však v kořenech a listech pod epidermis (Hall, 1989).

Nepohlavní rozmnožování probíhá za pomoci zoospor. Bezbarvá, průhledná zoosporangia eliptického tvaru s délkou 18–30  $\mu\text{m}$  a šířkou 14–20  $\mu\text{m}$  viz. Obr. 1. jsou nesena keříčkovitě, monopodiálně větvenými sporangiofory, které prorůstají u nakažené rostliny z průduchů ven (EPPO, 2013). Zoosporangia produkují až 20 oválných dvoubičíkatých zoospor s průměrem 14–30  $\mu\text{m}$  (Hall, 1989), které slouží k infekci hostitele. Velikost zoosporangia je variabilní, stejně jako počet zoospor uvolněných jedním sporangiem (Novotelnova, 1966). Vegetativní část stélky, v podobě nepřehrádkovaného mycelia, intercelulárně prorůstá pletiva infikované hostitelské

rostliny. Stélka je tvořena intercelulárními hyfami o průměru 6–20  $\mu\text{m}$  (Šedivý *et al.*, 1977) vrůstají do buněk hostitele, kde vytváří malá zaoblená haustoria, které slouží k čerpání živin (Bouterige *et al.*, 2003). Při vhodných podmínkách vyrůstají z mycelia stromečkovitě větvené sporangiofory, které na povrchu orgánů, zejména listů hostitelských rostlin, vytváří bílé povlaky plísně. (EPPO, 2013).



**Obrázek 1** Sporangiofor se zoosporami. Bruce Watt, University of Maine, Bugwood.org, (2013)

### 1.5 Životní cyklus plísně slunečnicové

U Oomycet existují dva typy sexuální reprodukce: první homothalismus, ve kterém jsou pohlavní reprodukční buňky (oogonia a antheridia) produkovány stejným organismem a může dojít k samoinfekci; a druhý heterothalismus, ve kterém sexuální reprodukční buňky jsou produkovány dvěma různými organismy. *Plasmopara halstedii* je diploidní a bylo prokázáno, že se dokáže reprodukovat sexuálně i asexuálně (Spring a Zipper, 2006). Homothalická sexuální reprodukce byla prokázána po inokulaci slunečnicové rostlinky samostatnými zoosporami (Spring, 2001). To je důležité pro epidemiologii, že jediná zoospora v půdě může infikovat celé pole. Během sexuální fáze produkuje *P. halstedii* přezimující oospory, po dobu slunečnicové vegetační sezóny od jara do konce léta vytváří bezpohlavní generace, které jsou také důležité při šíření nemoci (Viranyi *et al.*, 2015).

Ačkoli spory *P. halstedii* můžou být rozptýleny větrem, vodou a půdou, je to převážně půdní patogen (Ioos *et al.*, 2007). V terénu jsou kořenové infekce mladých

slunečnicových rostlin zodpovědný za silný dopad na nízkou výnosnost (Virányi *et al.*, 2015). Patogen je obligátně biotrofní Oomyceta, která se rozmnožuje asexuálně pomocí pohyblivých zoospor, které se uvolňují ze sporangii a nebo sexuálně přes půdní oospory (Virányi a Gulya, 1995). Díky tlusté buněčné stěně zůstávají pohlavně vzniklé oospory životaschopné v půdě až 10 let, což může být celosvětovou hrozbou pro zemědělce (Sedlářová *et al.*, 2008).

Virányi & Oros (1990) představili životní cyklus *P. halstedii*. Počínaje jednou oospou, která je v půdním prostředí rozšiřována tekoucí vodou, později pak klíčí a vede ke vzniku jediného zoosporangia (Novotel'nova, 1966), následuje diferenciaci a uvolňování dvoubičíkatých zoospor. Zoospory *Plasmopara halstedii* se uvolňují buď z oospor sporangia (na jaře) nebo mohou být infikovány asexuálními sporangii mladé slunečnice (od jara do léta) (Virányi *et al.*, 2015). V přítomnosti volné vody se zoospory pohybují velmi rychle, a pokud je k dispozici hostitelské pletivo (kořen, kořenové vlasy, stonky nebo méně často listy) usadí se na místě infekce (Virányi, 1988a). Pronikají kořeny v zóně kořenového vlášení (Sedlářová *et al.*, 2008). Jakmile zoospora pronikne do pletiva kořene, dojde k ultrastrukturálním změnám, včetně ztráty bičíku (Virányi *et al.*, 2015). Infekce postupuje vzhůru, hypokotylem a stonkem prorůstá mezibuněčnými prostory, kde vytváří mycelium s haustorií a za vhodných podmínek dochází k systémové infekci (Sedlářová *et al.*, 2008). Systémové mycelium může být přítomné ve všech rostlinných pletivech kromě meristémů (Novotel'nova, 1966).

Za vlhka se objevuje sporulace jako masivní povlak sporangioforů s nepohlavními zoosporangii na svrchní i spodní straně děložních i pravých listů, případně i na stoncích. Zoosporangia jsou větrem roznášena na listy dalších rostlin, na kterých se za vlhka uvolňují zoospory, které po encystaci penetrují do hostitelského pletiva. Cénoctické vláknité mycelium opět prorůstá mezibuněčnými prostory, haustorií čerpá živiny z okolních buněk a na kolonizovaných listech produkuje za vlhka další zoosporangia (Bouterige *et al.*, 2003). Tento nepohlavní proces trvá za optimálních podmínek 1–2 týdny a v porostu náchylné plodiny může vést k epidemii. Koncem vegetačního období dochází v infikovaných pletivech k pohlavnímu procesu, při kterém splývá samčí anteridium se samičím oogoniem, což následně vede k tvorbě tlustostěnných zoospor (Sedlářová *et al.*, 2008). Infekce větrem způsobuje sekundární, obvykle lokalizovanou, infekci nadzemních částí rostliny, nebo dokonce i osiva, pokud semeno produkované infikovanými rostlinami nese mycelium a nebo oospory patogenu (EPPO, 2014). Ukázalo se, že sekundární latentní infekce sporangii vyvolává u rostlin infekci bez

příznaků onemocnění během sezóny, ale produkuje semena, která by mohla nést infekci v latentní podobě (Sackston, 1981).

Přenos semeny je pozorován zřídka, počet napadených semen je totiž velmi nízký a vede k infekci nepatrného procenta rostlin. S opadem rostlinných zbytků a jejich zapracováním do půdy pak dochází k jejímu zamoření (Sedlářová *et al*, 2008). Infekce při zranění vede k šíření zoosporangií a ke vzniku sekundární infekce. Tento typ infekce je zodpovědný za pozdní napadení sousedních rostlin a přispívá k šíření patogenů (Viranyi *et al.*, 2015).

Vlhkost a teplota jsou nejdůležitějšími environmentálními faktory ovlivňujícími infekci a její šíření. Zoospory pocházející buď z pohlavního, nebo asexuální sporulace vyžadují volnou vodu k udržení životaschopnosti a k pohybu (EPPO, 2014). Rostlinný věk a hostitelské pletivo jsou také významným faktorem (Sackston, 1981). Z praktického hlediska lze konstatovat, že čím dříve se infekce vyskytne v sezóně, tím závažnější bude onemocnění v rostlině (EPPO, 2014).

## 1.6 Symptomy plísně slunečnicové

*Plasmopara halstedii* může vyvolat různé příznaky v závislosti na věku pletiva, hustotě inokula a podmínkách prostředí (vlhkosti a teplotě). Symptomy jsou výsledkem dvou odlišných fází a to systémové nebo lokální infekce, avšak mnohem typičtější je systémová infekce (EPPO, 2014). Lokální infekce začíná primárně na listech a zřídka vytváří stejné symptomy jako systémová infekce, která může během své nejagresivnější fáze zničit až 50% úrody (Wehtje a Zimmer, 1978). Plíseň se objevuje po celou dobu vegetačního období, od fáze dvou listů až do kvetení (EPPO, 2014).

Slunečnice napadené systémovou infekcí jsou zakrslé, růst lodyh je potlačen, internodia jsou krátká. Lodyhy i řapíky listů jsou často ztloustlé a čepele deformované. Listy vykazují charakteristickou zelenou a chlorotickou mozaiku podél hlavních žil přes lamelu viz. Obr. 2. Za vlhkých podmínek se na dolním povrchu listu, který odpovídá chlorotickým plochám, objevuje bílý povlak plísně, který se skládá ze sporangioforů a sporangií plísně viz Obr. 3. Mladé listy se často stanou zcela chlorotické a sporangia se vyskytují na obou stranách listu, až zcela ztuhnou. Kořenový systém infikovaných slunečnic je nedostatečně rozvinutý, s významným poklesem tvorby sekundárních kořenů a s tmavě hnědým vzhledem na jejich povrchu (EPPO, 2014). Tato forma

infekce je obvykle způsobená oosporami v půdě. Ovlivňuje semenáčky v počáteční fázi klíčení, a proto je často *P. halstedii* charakterizována jako půdní patogen (Spring, 2009).



**Obrázek 2** Chlorotická mozaika na listu slunečnice



**Obrázek 3** Bílý povlak sporulace na listu slunečnice

Jiné, méně časté příznaky spojené se systémovou infekcí zahrnují tlumení růstu semenáčků, narušení květenství, zkroucené listy a bazální žluč (Sackston, 1981). Kromě toho může být systémová infekce plísni lokalizována v nižší části stonku (Ljubich a Gulya, 1988). Za vlhkých podmínek je infekce charakterizována bílými sporulacemi na kotyledonu a stonku (EPPO, 2014).

### **1.7 Rezistence vůči *P. halstedii***

Jsou dva druhy odolnosti proti plísni, poskytované Pl geny, existuje typ I. a je charakteristický nepřítomností příznaků na výhoncích a absencí infekce nad základnou hypokotylu. Typ II je charakterizován slabými sporulačními příznaky omezenými na kotyledonu a nepřítomností příznaků v horní části rostliny přičemž patogen nikdy nedosahuje pravých listů (Mouzeyar *et al.*, 1994). Rezistentní slunečnicové genotypy jsou buď typu I, nebo typu II a závisí na jejich Pl genu rezistence. Tato metoda byla použita k ochraně plodín před *P. halstedii*, s výjimkou PlArg (Viranyi *et al.*, 2015).

Testování prováděné v roce 2009 na slunečnicích potvrdilo existenci specifického pletiva v hypokotylech, které omezuje šíření patogenu při růstu rostliny (Spring, 2009).



## 1.8 Rozšíření a patogenní variabilita *P. halstedii*

### 1.8.1 Rozšíření ve světě

Na počátku sedmdesátých let byly izolovány polní izoláty *P. halstedii* v Severní Dakotě (USA) a přilehlých oblastech. Bylo zjištěno, že Kanada se liší ve virulenci od Severní Ameriky, ale podobá se vzorkům vyskytujících se v Evropě (Zimmer, 1974). Evropské izoláty byly označeny jako rasa 1, "evropská rasa" (kód 100) a rasa 2 ze Severní Ameriky jako "Red River" (kód 300) popsána v oblasti červeného údolí řek středozápadních států Severní Dakoty a Minnesoty, USA (Zimmer, 1974). Údaje o patogenních rasách publikoval Gulya *et al.*, (1991a) (Viranyi a Gulya, 1995).

Později Gulya a Urs (1985) objevili rasu 4 (730) v Minnesotě a Ljubich *et al.* (1988) popsal rasu 5 (770) ze skleníkových experimentů ve Fargo, Severní Dakotě. Následně byly v Severní Americe, Argentině, Bulharsku, Maďarsku a Francii nalezeny nové rasy se složitějším výskytem (6 a 7, odpovídajících 310 a 330) (Gulya *et al.*, 1991a). Distribuce a patogenní variabilita *P. halstedii* je neustále sledována ve větších oblastech, kde se slunečnice pěstuje (Trojanová *et al.*, 2018). Nedávný objev plísně na Novém Zélandu u *Arctotis* spp. (Hall, 1989) naznačuje, že může být také přítomen v Austrálii na jiných hostitelích (Gulya *et al.*, 1991).

Do roku 2007 bylo z Evropy hlášeno 18 ras (Virányi *et al.* 2015) a 20 ras z Ameriky (Gulya, 2007). V roce 2007 dosáhl globální počet ras *P. halstedii* na číslo 36 (Gulya, 2007), z nichž 24 bylo hlášeno v Severní Americe, 20 v Evropě, 10 v Africe a 5 druh ras v Jižní Americe a Asii. V následujících letech byly v Evropě nalezeny nové rasy 721 a 731, které byly objeveny v Bulharsku v letech 2007/8 (Shindrova, 2010). Vedle těchto výsledků byla ve Francii hlášena nová rasa 774 (Gascuel *et al.*, 2015). Výskyt *P. halstedii* a změny v její populaci až do roku 2007 se jeví jako minimální v Argentině, Rusku a Španělsku (Virányi *et al.*, 2015). Nicméně je jasné, že nedostatek nových ras *P. halstedii* v těchto zemích je způsoben nízkou dynamikou populace *P. halstedii* nebo méně intenzivním sledováním (Trojanová *et al.*, 2018).

Populace *Plasmopara halstedii* byly důkladně testovány a klasifikovány, hlavně ve Francii (Ahmed *et al.*, 2012) a Německu (Rozynek a Spring, 2000), kde se zařadily do hlavních ras. Ve Francii, bylo definováno 17 referenčních ras, podle jejich profilu virulence při testování infekce na hostitelích nesoucí různé Pl geny rezistence. (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Čtrnáct těchto ras bylo rozděleno do tří odlišných skupin. Skupina 1: 100, 300, 304; skupina 2: 307, 700, 703, 707, 730; a skupina 3: 314,

334, 704, 710, 714, 717 (Viranyi *et al.*, 2015). V současné době existuje cca. 20 genů rezistence proti plísni (P11-P117, P121 a P1Arg) byly popsány z kultivarů (Gascuel *et al.* 2015) i divokých druhů slunečnic (Qi *et al.*, 2015). Jejich využití v boji proti plísním urychluje mikroevoluci Oomycet a vznik nových ras (Sedlářová *et al.*, 2016).

Během posledních 7 let se toto číslo zvýšilo na celkem 24 ras v Evropě a 36 v Americe (Sedlářová *et al.* 2016). Intenzivní průzkum zaznamenal téměř 45 ras identifikovaných po celém světě v období 2007-2013 dvakrát více než před rokem 2007 (Spring a Zipper, 2018). V poslední době byly identifikovány nové rasy 705 a 715, pocházející z České republiky (Sedlářová *et al.*, 2016). Srovnání virulence v Evropě a Americe mezi obdobími před a po roce 2007 prokázalo neustálé zvyšování rozmanitosti *P. halstedii* (Spring a Zipper, 2018).

### 1.8.2 Výskyt v České republice

Na území bývalého Československa (jižní Morava, okresy Brno-venkov a Zlín, jižní Slovensko, okresy Bratislava a Nitra) byla *P. halstedii* poprvé popsána v polovině 50. let 20. století (Bojňanským 1956, 1957). V rámci České republiky byla infekce *P. halstedii* opětovně zaznamenána v roce 1999 a to na provokačním pozemku MZLU v Brně (Veverka a Křížková, 2006). Od r. 2002 je plíseň slunečnice řazená mezi karanténní choroby a slunečnici je možné pěstovat pouze z certifikovaného osiva (Sedlářová *et al.*, 2016). V současné době je považován výskyt *P. halstedii* na území České republiky spíše za vzácný (Kokeš a Müller, 2004).

Většina napadených slunečnic byla lokalizována na jižní Moravě (východní část České republiky) a ve východní a centrální část Čech. Všechny tyto oblasti v České republice jsou většinou nížinná území s pokročilým zemědělstvím a poměrně teplým klimatem, což jsou vhodné podmínky pro pěstování slunečnice. Během šestiletého období (2007-2012) byla přítomnost primární infekce *P. halstedii* potvrzena na sedmi lokalitách (Olomouc-Holice, Brno-Chrlice, Lednice, Podivín, Kroměříž, Čáslav a Lednice). Rostliny, u kterých byly hlášeny sekundární symptomy infekce, pocházely každý rok z Olomouce a z Brna-Chrlice a z Lednice až v roce 2010. Opakovaný výskyt systémových infekcí a produkce patogenů byla potvrzena ve čtyřech lokalitách: Olomouc-Holice, Brno-Chrlice, Lednice a Podivín. V Brně-Chrlice byla absence *P. halstedii* zaznamenána v letech 2009 a 2012, pravděpodobně kvůli posunu experimentálních polí použitých pro testování slunečnic a tak opustili zdroj patogenního inokula v půdě. Pouze dvě lokality, zahrada v Lednici a malé pole s těžkou a

podmáčenou půdou v Podivíně, lze považovat za přirozený výskyt *P. halstedii*. Shrnutí v šesti letech, frekvence *P. halstedii* byla nejvyšší v experimentálních polích (87%) a velmi málo na polích pro zemědělské účely (4%) a v soukromých zahradách (1%). (Sedlářová *et al.*, 2013).

Podrobný výzkum patogenní variability *P. halstedii* byl zahájen v roce 2007, přímo na Katedře botaniky univerzity Palackého v Olomouci. Byly testovány izoláty *P. halstedii* pocházejících z osmi různých lokalit v České republice shromážděných v letech 2007-14. Jednalo se o lokality z Čáslavi, z oblasti Střední Moravy (Kroměříž, Olomouc - Holice), Jižní Moravy (Brno - Chrlice, Lednice, Lednice - MU, Podivín). (Trojanová *et al.*, 2018). Patogenní variabilita populace *P. halstedii* se od sedmdesátých let významně změnila (Zimmer, 1974). V České republice byly až do roku 2010 odhaleny pouze tři rasy (730 a 770 na 710). Nejvýraznější změna nastala v roce 2011 s detekcí rasy 704 a 714. V roce 2012 se 710 stala převládající rasou, zatímco v roce 2014 bylo přítomno nejméně šest ras tj. 700, 704, 710, 714, 730 a 770 (Sedlářová *et al.*, 2013). Rasa 700 byla nejvíce dominantní v české populaci *P. halstedii*, přičemž rasa 710 byla druhá nejčastější. Rasy 704 a 714 byly nalezeny během tří sezón, zatímco jiné rasy byly zaznamenány pouze v jedné vegetační sezóně (rasa 730 v roce 2010 a nové rasy 705 a 715 v roce 2014) (Trojanová *et al.*, 2018).

V červnu 2014, během terénní expedice na jihovýchodě České Republiky, byla zaznamenána infekce *Plasmopara halstedii* na podmáčeném poli u města Podivín na jižní Moravě. Vzorky z června 2014 byly pojmenovány podle nomenklatury založené na profilu virulence daného izolátu o 15 vybraných liniích slunečnice dle jejich vzoru odolnosti / náchylnosti (Gascuel *et al.*, 2015). Patotesty opakovaně prokázaly přítomnost rasy 705 71 ve třech izolátech a rasu 715 71 ve dvou izolovaných exemplářích. Jedná se o první záznam rasy 705 a 715 v České republice, Evropě i celosvětově. U všech testovaných izolátů nebyla odhalena rezistence vůči metalaxylu. (Sedlářová *et al.*, 2016). Rostoucí složitost patogenity *P. halstedii*, vykazovaná schopností infikovat vyšší počet diferenciálních genotypů je alarmující. Rasy *P. halstedii* 704, 705, 714 a 715 jasně prokázaly, že jsou všechny schopné překonání genu rezistence Pl6 (Trojanová *et al.*, 2018).

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Rostlinný materiál

Udržování a přemnožování izolátů *P. halstedii* bylo prováděno metodou „whole seedling inoculation“ (WSI) na kultivaru slunečnice roční *Helianthus annuus* cv. Peredovik, který je náchylný k *P. halstedii*, protože postrádá geny rezistence. Osivo slunečnic diferenačního souboru, které bylo použito při testování, se získalo vlastním přesevem originálního osiva v létě 2015, 2016 a 2017. Vyprodukované osivo bylo 3 měsíce sušeno, následně vyčištěno a 2 měsíce skladováno v -20 °C. Po té byla ošetřená semena uchována v papírových sáčkách v chladícím zařízení se stálou teplotou 4 °C bez přístupu světla.

### 2.2 Izoláty *P. halstedii*

Pro práci byly použity izoláty z roku 2015, 2016 a 2017, uvedené v Tabulce 1, které pocházely ze sběrů na území České Republiky (Olomouc- Holice, Kroměříž, Hustopeče, Lednice viz Obr. 4). Sběry byly provedeny pracovníky Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením doc. RNDr. Michaely Sedlářové, Ph.D. Originální vzorky byly dlouhodobě uchovávány v -80 °C a během testování byly dle potřeby množeny a uchovávány při -20 °C.



**Obrázek 4** Provokační pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici, kde byly získány izoláty *P. halstedii* v r. 2016

**Tabulka 1** Sběry izolátů z roku 2015, 2016 a 2017

LOKALITA	ROK SBĚRU	ČÍSLO IZOLÁTU
OLOMOUC	2015	1509
		1510
		1511
LEDNICE	2016	1601
		1602 (bez sporulace)
		1603
		1604 (bez sporulace)
		1605
		1606
OLOMOUC	2016	1607
		1608
		1609 (bez sporulace)
		1610 (bez sporulace)
		1611
		1612
		1613
		1614
HUSTOPEČE (vlevo)	2017	1701
		1702
		1703
HUSTOPEČE (vpravo z.)	2017	1704
		1705
		1706
		1707 (bez sporulace)
		1708
		1709
HUSTOPEČE (vpravo k.)	2017	1710
		1711
		1712
		1713
		1714
		1715
OLOMOUC	2017	1716
		1717 (bez sporulace)
KROMĚŘIŽ	2017	1718
		1719 (bez sporulace)
		1720
		1721

### 2.3 Udržování a množení izolátů *P. halstedii*

Veškerá práce s izoláty *P. halstedii* byla prováděna dle upraveného postupu dr. Gulyi (Gulya, 1991). Semena náchylných kultivarů slunečnice, která byla používána jak pro inokulaci semenáčků, tak pro produkci listových disků, byla vždy vložena do kádinky a

dezinfikována 10 % roztokem Sava s několika kapkami detergentu (např. Jar na nádobí) pro zvýšení sočivosti viz. Obr. 5. Dezinfekce ponořením probíhala minimálně 15 minut, aby se při klíčení a dalším pěstováním zamezilo kontaminaci nežádoucími organismy. Poté byla semena zbavena zbytků dezinfekčního roztoku pomocí proudu čisté vody, minimálně po dobu 1 minuty. Takto ošetřená semena byla umístěna do Petriho misky na filtrační papír, na který byla aplikována destilovaná voda, a to tak aby byla semena alespoň z poloviny ponořená. Po uplynutí tří hodin bez přístupu světla byla přebytečná voda z misek odstraněna a semena byla na misce upravena tak, aby se nedotýkala viz. Obr. 6. Klíčení probíhalo opět ve tmě, na vlhkém filtračním papíru v uzavřené Petriho misce při pokojové teplotě po dobu 2–4 dnů dle potřeby.



**Obrázek 5** Pomůcky pro přípravu osiva před klíčením

Pro další práci byla používána naklíčená semena, která měla kořínek 0,5–1,5 cm dlouhý a nebyla napadená nežádoucími mikroorganismy a zároveň nesměla být nijak poškozená nebo deformovaná viz. Obr. 7. Naklíčená semena byla zbavena osemení a byla použita buď při inokulaci, nebo pro další pěstování a produkci listových disků. Naklíčené neinfikované semenáčky byly rovnoměrně vysázeny do květináče naplněným do  $\frac{3}{4}$  perlitem. Většina rostlin dosáhla optimální velikosti pro přípravu listových disků mezi 12. a 15. dnem po nasazení.



**Obrázek 6** Nenaklíčené osivo



**Obrázek 7** Naklíčené osivo

Inokulum bylo připravováno buď z čerstvých zoosporangií narostlých na děložních lístcích infikovaných rostlin nebo ze zamražených zoosporangií uchovávaných na děložních lístcích v alobalových sáčcích v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Část nasporulovaných děložních lístků bylo v plastové zkumavce ponořeno do 1–5 ml destilované vody (objem vody odpovídal množství materiálu a intenzitě sporulace). Uvolnění zoosporangií do destilované vody se provádělo šetrným protřepáním za pomoci třepačky. Poté byly ze suspenze pomocí sterilní pinzety odstraněny zbytky rostliny a pod mikroskopem byla zkontrolována koncentrace a kvalita inokula. Pro práci byla používána koncentrace 10 000 životaschopných zoosporangií v 1 ml.

Do připraveného inokula byly vloženy předem naklíčené semenáčky, šetrně zbavené osemení tak, aby byly zcela ponořené do inokula. Inokulace probíhala po dobu 3 hodin, zcela ve tmě při teplotě  $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Během inokulace se pomocí mikroskopu kontrolovala přítomnost živých zoospor. Po inokulaci byly semenáčky inokulované jednotlivými izoláty vysázeny do oddělených květináčů naplněných zvlhčeným perlitem a označeny štítkem. Inokulované rostlinky byly pěstovány v kultivační skříně při teplotě  $19/18\text{ }^{\circ}\text{C}$  s fotoperiodou 12/12 hodin (den/noc) cca 9-13 dní do doby, než se objevila první bílá sporulace na děložních listech. Tyto lístky mohly být dále použity k přípravě inokula pro experimenty, nebo mohla být znovu přemnožena či zamražena v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro další využití.

## 2.4 Metoda inokulace semenáčků (SDI)

Rasy izolátů byly určovány tzv. patotesty, pomocí metody Gulya (1998) zvané „soil drench inoculation“ (SDI). Na patotesty bylo používáno 15 základních genotypů slunečnice (GB, RHA–265, RHA–274; PMI–3, PM–17, 803–1; HAR–4, QHP–2, HA–335; Y7Q, PSC8, XA; PSS2RM, VAQ, RHA–419) a 1 kontrolní linie (cv. Giganteus/Peredovik). Semenáčky jednotlivých diferenciacních linií pro patotest byly připravovány podle postupu popsaného v kapitole 3.1. Na táč, který byl do 2/3 naplněný zvlhčeným perlitem, bylo vždy vysázeno v řadách 10 naklíčených semenáčků, od každé diferenciacní linie.

Inokulum, tj. suspenze zoosporangií *P. halstedii* v destilované vodě, bylo vždy připravováno z čerstvého materiálu požadovaného izolátu podle postupu popsaného v kapitole 3.3. Následně byla spočítána koncentrace inokula, pomocí Bürkerovy počítací komůrky za použití vzorce:

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

kde X = počet zoosporangií v 1 ml a Y = průměrný počet zoosporangií v 10 počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky. Díky tomu se vypočítá množství tekutiny, která obsahuje asi 10 000 životaschopných zoosporangií podle vzorce:

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

kde Z = objem inokula s 10000 zoosporangii a X = počet zoosporangií v 1 ml. Pokud se vypočítaný objem pohyboval v rozmezí mezi 20–40 µl bylo možné dané inokulum ihned použít k inokulaci patotestu. Pokud se vypočítaný objem neodpovídal danému rozmezí, bylo nutno přidat další zoosporangia nebo naopak naředit inokulum destilovanou vodou a znovu stanovit koncentraci.

Automatickou pipetou bylo přímo na každý semenáček patotestu nanášena požadovaná dávka inokula. Pro zamezení možných odchylek v množství zoosporangií na každou rostlinku bylo nutno dodržovat homogenitu inokula (protřepáno před odebráním další dávky) a aby dávka byla aplikována na každé semeno pouze jednou.

Po provedené inokulaci všech semen patotestu byla pokryta cca 1 cm vrstvou zvlhčeného perlitu. Poté byl táč s rostlinami přenesen do fytotronu a prvních 12–16 hodin byl kultivován pod tmavou fólií při teplotě 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc. Následující den byla fólie odstraněna a rostliny byly pěstovány ve stejných podmínkách a podle potřeby zalévány po dobu 13 dní. Třináctý den byly rostlinky pomocí



rozprašovače navlhčeny destilovanou vodou a ták byl umístěn do neprůhledné bedny s víkem. Bedna musela být dostatečně velká z důvodů, aby se zamezilo možnému kontaktu se stěnou bedny. Tímto byly vytvořeny vhodné podmínky pro sporulaci patogenu (100% vzdušná vlhkost a tma). Bedna s patotesty byla ponechána ve fytotronu při 21/17 °C, 12/12 hodin den/noc a 14. den po inokulaci (16–24 hodinách) bylo provedeno hodnocení viz. Obr. 9. Vyhodnocení patotestu a určení rasy izolátu probíhalo ve třech krocích.

Nejdříve byla pomocí semikvantitativní stupnice vyhodnocena míra napadení každé rostliny v protestu zvlášť. Podle procentuálního napadení plochy rostlinného těla bílou sporulací se k rostlině přiřadil jeden ze čtyř stupňů napadení viz. Obr. 8.



**Obrázek 8:** Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *P. halstedii*. A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).



**Obrázek 9** Patotest připravený na vyhodnocení a určení rasy *P. halstedii*

Druhým krokem bylo stanovení míry napadení pro každou diferenační linii (10 rostlin). Aby byl patotest vyhodnocen jako prokazatelný bylo nutné, aby míra napadení kontrolní linie (cv. Giganteus/Peredovik) byla víc než 70%. Pokud je procentuální napadení menší není patotest neprůkazný a musí se opakovat. Dále byly hodnoceny jednotlivé diferenační linie, procentuálně se vyhodnotila jejich míra napadení a tím se určilo, zda je daná diferenační linie k testovanému izolátu *P. halstedii* náchylná nebo rezistentní. Pokud bylo napadení vyšší než 50 %, byla diferenační linie vyhodnocena jako náchylná.

K poslední části hodnocení patřilo stanovení pětimístného kódu podle pravidel tripletového kódovacího systému, která určil a specifikoval výslednou rasu testovaného izolátu.

## 2.5 Test rezistence izolátů vůči metalaxylu

Odolnost izolátů *P. halstedii* vůči fungicidu metalaxyl byla testována metodou listových disků (LDI). Rostliny pro přípravu listových disků byly pěstovány způsobem popsáním v kapitole 3.3. Z vypěstovaných slunečnic byly sterilní pinzetou a nůžkami odebrány a použity pouze děložní lístky a ty byly na podložce žiletkou rozřezány na jednotlivé listové disky čtvercového tvaru o délce strany 6 mm. Následně byly vloženy do

destilované vody, aby se zamezilo vysychání pletiva. Těsně před použitím byly listové disky opatrně vyjmuty z destilované vody a jemně osušeny buničinou po obou stranách. Při špatné inokulaci se listový disk předem poškodily pinzetou, aby se inokulum dostalo přímo do pletiva.

Samotný test probíhal ve dvou plastových kultivačních destičkách s 24 komůrkami. Do 12 komůrek v horní polovině první kultivační destičky bylo napipetováno 900 µl destilované vody, zatímco do 12 komůrek v dolní polovině druhé kultivační destičky bylo napipetováno 900 µl roztoku metalaxylu (N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-D-alanine methyl ester, analytical standard, Fluka) o koncentraci 10 mg/l. Do každé komůrky v destičce byl následně šetrně pinzetou vložen na svou svrchní stranu jeden předem osušený listový disk.

Každý listový disk byl inokulován do středu disku tak, aby kapka inokula nesklouzla do okolní tekutiny. Inokulum bylo připraveno stejným způsobem, jaký byl popsán v kapitole 3.3. Rozdíl byl v tom, že koncentrace inokula byla upravena na 10 000 zoosporangií v 10–15 µl tekutiny. V levé horní jamce A1 s destilovanou vodou a v levé spodní jamce D1 druhé destičky s metalaxylem byla nepipetována ještě jedna dávka inokula, aby se dala následně hodnotit klíčivost zoosporangií.

Destičky s inokulovanými disky byly inkubovány 12–16 hodin bez přístupu světla při 18–19°C. Druhý den po odkrytí byla pozorována klíčivost zoosporangií pod inverzním mikroskopem v jamkách A1 a D1. V příslušné jamce bylo při 100násobném zvětšení nalezeno místo se zoosporangii a v zorném poli byla spočítána zvlášť neživotaschopná zoosporangia a životaschopná. Ty neživotaschopná zoosporangia byla tmavá, díky jejich obsahu uvnitř, protože neuvolnila žádné zoospory. Životaschopná zoosporangia byla světlá, protože byla prázdná a své zoospory již uvolnila. Klíčivost zoosporangií v destilované vodě a v roztoku metalaxylu byla spočítána podle rovnice:

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

kde C = klíčivost zoosporangií, A = počet neživotaschopných zoosporangií, B = počet prázdných schránek.

Test na rezistenci izolátu *P. halstedii* vůči metalaxylu byl považován za průkazný, pokud klíčivost zoosporangií dosáhla v obou jamkách minimálně 90 %. Po zjištění klíčivosti byly vzorky dále kultivovány při 19/18°C, 12/12 hodin, den/noc.

Čtrnáctý den po inokulaci bylo provedeno hodnocení testu. Každý listový disk na destičce byl prohlédnut pod binokulární lupou a do protokolu byl zaznamenán stupeň napadení.

Test byl označen jako průkazný, pokud se sporangiofory *P. halstedii* objevily alespoň na 75 % listových disků v destilované vodě. Jako rezistentní k metalaxylu byl označen izolát, který měl napadeno minimálně 75 % listových disků umístěných v komůrkách s metalaxylem.

### 3 Výsledky

#### 3.1 Určení ras izolátů *P. halstedii* metodou inokulace semenáčků (SDI)

Metodou SDI bylo na diferenčním souboru slunečnice testováno celkem 31 izolátů z různých lokalit z let 2015-2017. Určená rasa byla vždy označena unikátním pětimístným číselným kódem, který odpovídá fenotypu reakcí pěti tripletů diferenčních linií slunečnice. Výsledky určení ras jsou uvedeny dále podle jednotlivých let v tabulkách 2-4.

##### 3.1.1 Rasy *P. halstedii* z roku 2015

V roce 2015 byly testovány pouze tři izoláty pocházející z pozemku Katedry botaniky PřF UP z Olomouce–Holice. Určení rasy u izolátu 1510 bylo obtížné, protože se zřejmě jednalo o směs dvou ras (750 60 a 710 60). U izolátu 1511 byl potvrzen fenotyp virulence, který odpovídal rase 754 71. Konkrétní hodnocení a výsledky jsou zaznamenány v tabulce 2.

Tabulka 2 Rasy *P. halstedii* z roku 2015

ROK	LOKALITA	ČÍSLO ISOLÁTU	DATUM HODNOCENÍ	DATUM HODNOCENÍ	VÝSLEDNÁ RASA
			RASA	RASA	
2015	OLOMOUC	1509	21.7.2015		750 60
			750 60		
		1510	21.7.2015	28.4.2016	750 60/ 710 60
			750 60	710 60	
		1511	24.8.2015	21.9.2015	754 71
			754 71	754 71	

##### 3.1.2 Rasy *P. halstedii* z roku 2016

Rok 2016 byl díky průběhu počasí příznivější pro výskyt plísně, izoláty pocházely ze tří lokalit, tj. z experimentálního pole v Olomouci–Holici (6 izolátů) a provokačního pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici (4 izoláty). U vzorků z Olomouce byly zaznamenány rasy 700 60, 740 60 a 750 60. Izoláty z Lednice byly určeny jako rasy 714 71 a 754 71, nebo u izolátu 1606 jako jejich směs (Tab. 3).

**Tabulka 3** Rasy *P. halstedii* z roku 2016

ROK	LOKALITA	ČÍSLO ISOLÁTU	DATUM HODNOCENÍ	DATUM HODNOCENÍ	VÝSLEDNÁ RASA
			RASA	RASA	
2016	LEDNICE	1601	21.9.2016	5.10.2016	714 71
			714 71	714 71	
		1603	25.10.2016		754 71
			754 71		
		1605	7.12.2016	21.12.2016	714 71
			714 71	714 71	
		1606	4.10.2016	19.10.2016	754 71/ 714 71
			754 71	714 71	
	OLOMOUC	1607	8.8.2016	23.8.2016	750 60
			750 60	750 60	
		1608	13.12.2016	27.12.2016	700 60
			700 60	700 60	
		1611	27.7.2016	21.9.2016	750 60
			750 60	750 60	
1612	27.7.2016	21.9.2016	750 60		
	750 60	750 60			
1613	10.8.2016	24.8.2016	750 60		
	750 60	750 60			
1614	8.8.2016	23.8.2016	740 60		
	740 60	740 60			

### 3.1.3 Rasy *P. halstedii* z roku 2017

Nejpříznivější pro růst plísně slunečnice, a tak i nejzajímavější z hlediska testování, byl rok 2017. Z celkového počtu 18 vzorků byly studovány izoláty *P. halstedii* z lokalit Olomouc- Holice (1 izolát), Kroměříž (3 izoláty) a Hustopeče (vzorky odebrány ze tří různých polí, označené jako: Hustopeče - vlevo (3 izoláty), Hustopeče- vpravo, začátek (5 izolátů) a Hustopeče vpravo, konec (6 izolátů)). Výsledky všech izolátů z roku 2017 jsou uvedeny v tabulce 4. Vzorky z Kroměříže byly určeny jako rasa 71471, u izolátu 1720 ve směsi s rasou 70471. Izolát z Olomouce byl vyhodnocen jako rasa 71060. Na lokalitách z Hustopeče se vyskytovaly rasy 70471 a 70471, v izolátu 1710 ve směsi.

**Tabulka 4** Rasy *P. halstedii* z roku 2017 (Hustopeče, Olomouc, Kroměříž)

ROK	LOKALITA	ČÍSLO ISOLÁTU	DATUM HODNOCENÍ	DATUM HODNOCENÍ	VÝSLEDNÁ RASA
			RASA	RASA	
2017	HUSTOPEČE (VLEVO)	1701	12.7.2017	8.8.2017	714 71
			714 71	714 71	
		1702	22.8.2017	6.9.2017	714 71
			714 71	714 71	
		1703	19.7.2017	3.8.2017	714 71
			714 71	714 71	
	HUSTOPEČE (VPRAVO, ZAČÁTEK)	1704	24.8.2017	8.9.2017	714 71
			714 71	714 71	
		1705	24.8.2017	8.9.2017	714 71
			714 71	714 71	
		1706	24.8.2017	8.9.2017	714 71
			714 71	714 71	
	1708	5.9.2017	5.12.2017	704 71	
		704 71	704 71		
	1709	4.10.2017	2.11.2017	714 71	
		714 71	714 71		
	HUSTOPEČE (VPRAVO, KONEC)	1710	5.9.2017	4.10.2017	714 71/ 704 71
			704 71	714 71	
		1711	5.9.2017	4.10.2017	704 71
			704 71	704 71	
		1712	8.11.2017	23.11.2017	704 71
704 71			704 71		
1713	11.10.2017	8.11.2017	704 71		
	704 71	704 71			
1714	12.10.2017	9.11.2017	704 71		
	704 71	704 71			
1715	12.10.2017	9.11.2017	704 71		
	704 71	704 71			
2017	OLOMOUC	1716	16.11.2017	29.11.2017	710 60
			710 60	710 60	
	KROMĚŘÍŽ	1718	6.12.2017	22.12.2017	714 71
			714 71	714 71	
		1720	12.10.2017	9.11.2017	704 71/ 714 71
			714 71	704 71	
		1721	21.12.2017	3.1.2018	714 71
714 71	714 71				

### 3.2 Reakce *P. halstedii* k metalaxylu

Zjištění případné rezistence vůči metalaxylu jsem provedla metodou listových disků (LDI). Testování bylo uskutečněno pouze u izolátů z roku 2017. Nejprve se hodnotila klíčivost zoosporangií u kontrolního vzorku s destilovanou vodou, pak u vzorku s metalaxylem. Hodnocení bylo provedeno den po provedení testu. Po dalších čtrnácti dnech se hodnotilo procentuální napadení listových disků v destilované vodě (Obr. 10) i v metalaxylu (Obr. 11). U všech izolátů se potvrdila citlivost k metalaxylu (žádný listový disk nevykazoval růst a sporulaci plísně), čímž se potvrdila účinnost tohoto fungicidu vůči *P. halstedii*.



**Obrázek 10** Sporulace listových disků s destilovanou vodou



**Obrázek 11:** Nenapadené listové disky v metalaxylu



## 4 Diskuse

Stanovení rasy *Plasmopara halstedii* pomocí souboru diferenciačních linií slunečnice je časově náročný proces vyžadující jistou zkušenost, který je potřeba několikrát opakovat. Aktuálně používaná inokulace přikápnutím inokula o známé koncentraci zoospor k semenáčkům (SDI) je vhodnější, než dříve používaná metoda WSI, kdy je celý semenáček namočen do inokula na cca 3-4h a po té zasazen. WSI se dnes používá pouze při přemnožování izolátů ze zamraženého materiálu. Tahle metoda je vhodnější, protože čas inokulace je delší a zamražené zoospory mají čas na regeneraci.

Interpretace výsledků patotestů a hodnocení intenzity sporulace patogenů může být subjektivní. Gulya *et al.* (1991a) nekvantifikoval rozdíl mezi rezistencí a náchylnou reakcí inokulovaných rostlin, ale „hojné sporulace na děložních lístcích“ považoval za náchylnou reakci. Naopak Tourvieille de Labrouhe *et al.* (2000) sporulaci pouze na děložních lístcích neuznával a jako náchylnou reakci označil až sporulaci na pravých listech. Podle současné praxe lze intenzitu sporulace kvantifikovat podle semikvantitativní stupnice (Trojanová *et al.*, 2017), kterou jsem použila i já ve svém testování.

Dokonce i při použití této klasifikační stupnice se některé izoláty těžko kategorizují a výsledek může být někde mezi odolností a náchylností. V tomhle případě se doporučuje celý postup patotestu opakovat. Nejpresnější metoda pro určení rasy izolátu je fenotypizace virulence a v ideálním případě použití monozoosporických izolátů. Nicméně, kvůli náročnosti izolace zoospor a následného přemnožování monozoosporických izolátů, nelze tuto metodu aplikovat při častém opakování patotestů (Trojanová *et al.*, 2017).

Pro určení rasy *P. halstedii* se používá diferenciační soubor, složený z linií slunečnice, které na inokulaci patogenem reagují různě, a tím nám diferencují jednotlivé rasy. Systém označení ras unikátním tříčíselným kódem byl navržen v roce 1991 a založen na použití devíti inbredních linií (Gulya, 1995). Rasám, které byly určeny před rokem 1995, byl také přiřazen příslušný třímístný kód (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000, Gulya, 2007).

Diferenciační soubory byly neustále pozměňovány a vylepšovány. Tím, že variabilita globálních populací *P. halstedii* neustále roste, se potvrdila nedostatečnost souboru a několik výzkumných pracovníků navrhlo rozšíření souboru diferenciačních linií, aby vytvořili nové určovací rozdíly ve variabilitě (Trojanová *et al.*, 2017).

Rozšíření kódu na pětimístné číslo bylo navrženo, s tím, že se doporučuje používat 15 diferencíálů pro vyhodnocení rasy *P. halstedii* a to GB, RHA-265, RHA-274, PMI 3, PM-17, 803-1, HAR-4, QHP-2, HA-335, Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, VAQ a RHA-419 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012).

Vzorek 1510 z Olomouce byl testován jak v srpnu 2015, tak z přemnoženého izolátu z dlouhodobě zamraženého materiálu v dubnu 2016. Čerstvý izolát testovaný v srpnu 2015 byl vyhodnocen jako rasa 750 60, zatím co testovaný materiál z roku 2016 vyšel jako rasa 710 60. Obě výsledné rasy jsou možné, protože ze záznamů z minulých let, např. 2014, víme že se v Olomouci- Holici vyskytovala rasa 710 60 a naopak v roce 2015 bylo více vzorků určených jako rasa 750 60. Ideální by bylo test znovu opakovat nebo provést monozoosporickou izolaci.

Rok 2016 byl problematický hlavně ve druhém tripletu diferenciačního souboru a to téměř u všech vzorků, ať už se jednalo o izoláty z Olomouce- Holice či z Lednice. Markantní problém s určením druhého tripletu je znatelný hlavně u vzorků pocházejících z Olomouce- Holice. Jako výsledné rasy byly určeny 750 60, 700 60 a 740 60. Pokud porovnáme izoláty se vzorky z roku 2014 vidíme, že rozdíl je opět jen ve druhém tripletu. Starší vzorky z roku 2012 zaznamenaly rasu 700, ale ne rasu 750 a 740. Vzorky z Lednice se opět liší pouze ve druhém tripletu a to v rasách 714 71 a 754 71. Konkrétně izolát číslo 1606 byl při prvním hodnocení (4. 10. 2016) vyhodnocen jako rasa 754 71, při druhém hodnocení (19. 10. 2016) byla výsledná rasa 714 71. V takovýchto situacích se provádí další hodnocení, tentokrát jen daného tripletu. V našem případě se jednalo o druhý triplet. Při dalším hodnocení, jsem došla k závěru, že se pravděpodobně jednalo o směs ras. Zoospory vyrůstající ve sporangiih totiž nemusí být vždy z genetického hlediska homogenní a mohou se lišit v patogenní variabilitě (Spring a Zipper, 2006). Pro získání geneticky homogenního materiálu u *P. halstedii* se využívají monozoosporické izoláty (MZSI), díky kterým se získá pouze jedna zoospora ze sporangia a je jednodušší získat co nejpřesnější výsledky o rase daného izolátu. Monozoosporické izoláty se získávají kapilární metodou pod mikroskopem. Úspěšnost odchyty jedné zoospory je velmi nízká a je za potřebí precizně a rychle pracovat, protože kapky se zoosporami rychle vysychají (Doudová, 2013). Proto se tato metoda používá pouze tehdy, kde je výsledek metody SDI nejasný. Pokud chceme porovnat izoláty 2016 se staršími vzorky, k dispozici máme pouze rok 2012, kdy máme potvrzený výskyt rasy 714 (Bartůšek, 2013) ne však 754. V roce 2014 nebyly vzorky z Lednice hodnoceny.

Způsobů jak dojde k tomu, že se v jednom sporangiu mohou nacházet geneticky odlišné zoospory je několik. Ať už pomocí větru, kdy se zoospora z jedné rostliny uchytí na druhé rostlině, kde se zároveň mohou nacházet zoospory jiného patotypu a dojde k jejich smíchání. A nebo kontaminací vodou v půdě, protože jak již víme, spory jsou uchovávány v půdě a jsou transportovány vodou, takže se v půdě mohou setkat spory s odlišnou genetickou informací a infikují rostlinu obě dvě a tím se na rostlině objeví obě rasy. Tento problém pravděpodobně nastal i v roce 2017 v Hustopečích. Vzorky byly odebrány ze tří lokalit v Hustopečích. V Hustopečích (vlevo) se jasně prokázala rasa 714 71, v Hustopečích (vpravo, konec a začátek) se určily rasy 704 71 a 714 71. Na styku těchto dvou polí došlo pravděpodobně k mísení dvou ras, což dokazuje izolát 1710, který svým prvním patotestem (5. 9. 2017) byl vyhodnocen jako rasa 704 71 a při druhém hodnocení (4. 10. 2017) jako rasa 714 71. Při kontrole byla potvrzena patogenní variabilita. Pokud se podíváme na vzorky z Kroměříže z téhož roku, zjistíme, že situace je velmi obdobná, a že izolát číslo 1720 také prokazuje patogenní variabilitu. Jediný vzorek z Olomouce- Holice vykazuje rasu 710 60, která byla prokázána i v roce 2015, 2014 i 2012. Pokud bychom tedy chtěli jasně prokázat, o jaké rasy se jedná, je zapotřebí detailnější studie, ideálně monozoosporických izolátů.

V porovnání s ostatními státy Evropy, kde je patogenní variabilita velmi vysoká, jako např. ve Francii, Španělsku, Maďarsku je naopak v České republice variabilita spíše nižší a rozšířena lokálně. Vzhledem k poloze našeho státu ve středu Evropy, je velká pravděpodobnost, že se rasy mohou křížit a proto zde vzniká vysoká variabilita. Bohužel *P. halstedii* se u nás intenzivně studovala až v posledních několika letech a proto vyžaduje tento patogen na našem území další pozornost, abychom dosáhli komplexnějších výsledků.

Při hodnocení testů citlivosti *P. halstedii* vůči metalaxylu nebyl doposud zaznamenán izolát *P. halstedii* rezistentní vůči tomuto fungicidu. Varující však může být situace např. ve Španělsku (Molinero–Ruiz *et al.*, 2003) nebo Německu (Spring *et al.*, 2006), kde se s rezistencí vůči metalaxylu potýkají již řadu let. S tímto problémem by se v budoucnu mohla potýkat i Česká republika.

## 5 Souhrn

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala určováním ras u izolátů *Plasmopara halstedii*, pocházejících z České republiky metodou SDI. Byly testovány vzorky z roku 2015, 2016 a 2017. Výslednou rasu u izolátu z roku 2015 bylo velmi obtížné určit, protože se pravděpodobně jednalo o směsi ras. V roce 2016 byly na určitých lokalitách objeveny nové rasy, které se v dřívější době na místě nevyskytovaly, jako např. rasy z Olomouce 750 60 a 740 60 nebo z Lednice rasa 754 71. Izoláty z Olomouce v roce 2017 byly určeny jako rasa 710 60 a tato rasa byla potvrzena i u vzorků z minulých let. Na ostatních lokalitách v roce 2017 byly zaznamenány rasy 714 71, 704 71 nebo jejich směsi. Do své práce jsem také zahrnula testy k fungicidu metalaxylu, provedené metodou inokulace listových disků (LDI); ve kterých žádný z izolátů *P. halstedii* nebyl zjištěn jako rezistentní.

## 6 Literatura

- Ahmed, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Delmotte, F. (2012): Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 847–855.
- Achbani, E. H., Douira, A., Tourvieille de Labrouhe, D. (1998): Le tournesol au Maroc: les maladies cryptogamiques persistent. *Phytoma* **508**, 22–24.
- Bartůšek, T. (2013): *Patogenní variabilita Plasmopara halstedii a rezistence vůči metalaxylu v České republice*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- Bojňanský V. (1956): Peronospora slunečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. & de Toni) v ČSR. *Polnohospodárstvo* **3**, 397–401.
- Bouterige, S., Tronchin, G., Lesourd, M., Marot-Leblond, A., Molinéro, V., Bouchra, J. P., Robert, R. (2003): Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology* **93**(8), 1023–1030.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 534–540.
- Dickinson, C. H., Crute, I. R. (1974): The influence of seedling age and development on the infection of lettuce by *Bremia lactucae*. *Annals of Applied Biology* **76**, 49–61.
- Doudová, T. (2013): *Techniky kultivace a izolace plísně slunečnicové*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta, Česká republika.
- Drábková Trojanová, Z., Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Lebeda, A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflowers in the Czech Republic. *Plant Pathology* **67**(1), 136–144. DOI: 10.1111/ppa.12722
- EPPO (2014) PM 7/85 (2) *Plasmopara halstedii*. Bull. OEPP/EPPO Bull. **44**, 350–359. Wiley Online Library: <https://doi.org/10.1111/epp.12160> (24. 4. 2018)
- Forestry images: <https://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=11133> (24. 4. 2018)
- Gulya, T. J., Sackston, W. E., Viranyi, F., Masirevic, S., Rashid, K. Y., (1991a): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *Journal of Phytopathology* **132**, 303–11
- Gulya, T. J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda, A., Spencer-Phillips, P.T.N. (eds) *Advances in Downy Mildew Research*, vol. 3, Palacky University in Olomouc and JOLA, v.o.s., Kostelec na Hané (Czech Republic), 121–134.
- Gulya T.J. (2004): A Seedling Bioassay to Detect the Presence of *Plasmopara halstedii* in Soil. In: Spencer-Phillips P., Jeger M. (eds): *Advances in Downy Mildew Research*, vol. 2, Developments in Plant Pathology, vol 16. Springer, Dordrecht, 233–240.
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M. C., Vear, F., Pichon, M., & Godiard, L. (2015): The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology* **16**(2), 109–122.
- Gascuel, Q., Bordat, A., Sallet, E., Pouilly, N., Carrere, S., Roux, F., Godiard, L. (2016): Effector polymorphisms of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* and their use to identify pathotypes from field isolates. *PLoS ONE* **11**(2), 1–19.

- Hall, G. (1989): *Plasmopara halstedii*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 979. CAB International, Wallingford, UK.
- Harveson, R. M., Markell, S. G., Block, C. C., Gulya, T. J. (2002): Compendium of sunflower diseases and pests. In: *Conference proceedings*. Vol. 2 (Harveson, R. M.; Markell, S. G.; Block, C. C.; Gulya, T. J., eds.), Brighton, UK, 575- 580.
- Ioos, R., Laugustin, L., Rose, S., Tourvieille, J., & Tourvieille de Labrouhe, D. (2007): Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathology* **56**, 209–218.
- Kokeš P., Müller J. (2004): Checklist of downy mildews, rusts and smuts of Moravia and Silesia. *Czech Mycology* **56**: 121–148.
- Lebeda A. (1986): Specificity of interactions between wild *Lactuca* species and *Bremia lactucae* isolates from *Lactuca serriola*. *Journal of Phytopathology* **117**, 54–64.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Gulya, T., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K., Viranyi, F. (2000): New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference*. Toulouse, France: International Sunflower Association, I 61–6.
- Leppik, E. E. (1966): Origin and specialization of *Plasmopara halstedii* complex on Compositae. *FAO Plant Protection Bulletin* **14**, 72-76.
- Ljubich, A.; Gulya, T. J. (1988): Cotyledon-limited systemic downy mildew infection. *Proceedings of 1988 Sunflower Research Workshop*, Bismarck, USA, National Sunflower Association, 9.
- Molinero–Ruiz, M. L., Melero–Vara, J. M., Gulya, T. J., Dominguez, J. (2003): First report to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. *Plant Disease* **87**(6), 749–749.
- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (1994): Effect of host–race combination on resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *Journal of Phytopathology* **141**: 249–258.
- Nishimura, M. (1922): Studies in *Plasmopara halstedii*. *J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ* **11**, 185–216.
- Novotel'nova, N.S. (1966) *Downy mildew of sunflower*, In: Nauka, Moscow, Russia, 150.
- Qi, L. L., Long, Y. M., Jan, C. C., Ma, G. J., Gulya, T. J. (2015): P117 is a novel gene independent of known downy mildew resistance genes in the cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Theoretical and Applied Genetics* **128**, 757–767.
- Roeckel-Drevet, P., Tourvieille, J., Gulya, T. J., Charmet, G., Nicolas, P., & Labrouhe, D. T. de. (2003): Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from different continents. *Canadian journal of Microbiology* **49**(8), 492-502.
- Rozynek, B., Spring, O. (2000): Pathotypes of sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia* **23**(32), 27–34.
- Sackston, W. E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: Spencer, D. M. (ed.), *The Downy Mildews*, Academic Press, New York, 545–575.
- Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic- short communication. *Plant Protection Science* **52**(3), 182-187.
- Sedlářová, M., Stojaspal, K., Lebeda, A. (2008): Biologie, rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii* v České republice. In: Nováková, A. (ed.): *Proceedings of MICROMYCO 2008*. 2.-3.9.2008, ISB BC AS CR, v.v.i., České Budějovice, 82-86.

- Sedlářová, M., Trojanová, Z., & Lebeda, A. (2013): Distribution and Harmfulness of *Plasmopara halstedii* on Sunflower in the Czech Republic **49**(1), 1-10.
- Shindrova, P. (2010): Investigation on the race composition of downy mildew (*Plasmopara halstedii* Farl. Berl. et de Toni) in Bulgaria during 2007–2008. *Helia* **33**(52), 19–24.
- Spring, O. (2001): Nonsystemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* **108**, 329–336.
- Spring, O., Voglmayr, H., Riethuller, A., Oberwinkler, F. (2003): Characterization of a *Plasmopara* isolate from *Helianthus × laetiflorus* based on cross infection, morphological, fatty acids and molecular phylogenetic data. *Mycological Progress* **2**(3), 163–170.
- Spring, O., & Thines, T. (2004): On the necessity of new characters for classification and systematics of biotrophic Peronosporomycetes. *Planta* **219**, 910–914.
- Spring, O., Zipper, R., Heller–Dohmen, M. (2006): First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* **113**, 224.
- Spring, O. (2009): Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii* – An underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecology*, **2**(2), 75-80.
- Spring O., Zipper R. (2018): New highly aggressive pathotype 354 of *Plasmopara halstedii* in German sunflower fields. *Plant Protect. Sci.* **54**, 83–86.
- Stevens, F. L. (1913): The fungi which cause plant disease. New York: Macmillan. 91–92.
- Šedivý, J., Chod, J., Kodys, F., Kůdela, V., Sychrová, E., Šebesta, J. (1977): Klíč k určování chorob a škůdců polních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 485.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P., Vear, F. (2012): Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proc. 18th Int. Sunflower Conf., Mar delPlata, Argentina, 2–1.
- Váňa J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 164.
- Veverka K., Křížková-Kudlíková I. (2006): Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: *XVIIth Czech and Slovak Conference on Plant Protection (Book of Abstracts)*. Czech Agricultural University, Prague: 287–288.
- Viljoen, A., Van Wik, P. S., Nopwell, D. C., Gulya, T. J. (1997): Occurrence of downy mildew on sunflower in South Africa. *Plant Dis.* **81**, 111.
- Virányi, F. (1984): Recent research on the downy mildew of sunflower in Hungary. *Helia* **7**, 35-38.
- Virányi, F. (1988a) *Plasmopara halstedii*. In: *European handbook of plant diseases* (Ed. By Smith, I.M.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliot, R.A.; Archer, S.A.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 228-230.
- Virányi, F., Gulya, T.J. (1995): Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* from Hungary. *Plant Pathology* **44**, 619–624.
- Virányi F. (2002): The sunflower-*Plasmopara halstedii* pathosystem: natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Philips P.T.N, Gisi U., Lebeda A. (eds): *Advances in Downy Mildew Research*. Vol. 1. Kluwer Academic Publisher, London, 167–172.

- Virányi, F., & Spring, O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology* **129**(2), 207-220.
- Virányi, F., Gulya, T. J., & Tourvieille, D. L. (2015): Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew) populations from different continents. *Helia* **38**(63), 149-162.
- Walcz, I., Bogár, K., Virányi, F. (2000): Study on an *Ambrosia* isolate of *Plasmopara halstedii*. *Helia* **23**, 19–24.
- Young, P. A., Morris, H. E. (1927): *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflower. *Am. J. Bot.* **14**: 551–552.
- Zimmer, D. E. (1974): Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology* **64**, 1465–1467.



## 7 Seznam obrázků

- Obrázek 1** Sporangiofor se zoosporami. Foto: Bruce Watt, University of Maine, Bugwood.org, (2013).....13
- Obrázek 2** Chlorotická mozaika na listu slunečnice, Foto: Klára Dobešová .....16
- Obrázek 3** Bílý povlak sporulace na listu slunečnice, Foto: Klára Dobešová.....16
- Obrázek 4** Provokační pole Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) v Lednici, Foto: Klára Dobešová.....20
- Obrázek 5** Pomůcky pro přípravu osiva, Foto: Klára Dobešová.....22
- Obrázek 6** Nenaklíčené osivo, Foto: Klára Dobešová.....23
- Obrázek 7** Naklíčené osivo, Foto: Klára Dobešová .....23
- Obrázek 8** Semikvantitativní stupnice napadení rostlin *P. halstedii*. A – žádná sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3), Foto: Klára Dobešová .....25
- Obrázek 9** Patotest připravený na vyhodnocení a určení rasy *P. halstedii*, Foto: Klára Dobešová.....26
- Obrázek 10** Sporulace listových disků s destilovanou vodou, Foto: Klára Dobešová.....32
- Obrázek 11** Nenapadené listové disky v metalaxylu, Foto: Klára Dobešová.....32
- Obrázek P1** Životní cyklus plísně slunečnic. DocPlayer:<http://docplayer.cz/19087574-System-organismu-imperium-archea-rise-archaebacteria-imperium-prokarya-rise-bacteria.html> (30. 4. 2018)
- Obrázek P2** Rostliny slunečnice roční na poli – v popředí systémově napadené plísni slunečnicovou (zakrslé rostliny s nahloučenými a deformovanými listy). Foto: M. Sedlářová
- Obrázek P3** Lokální napadení plísni slunečnicovou (chlorotické skvrny na svrchní straně a bílé povlaky sporangioforů na spodní straně listu). Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org, (2013)

## **8 Seznam tabulek**

<b>Tabulka 1</b>	Sběry izolátů <i>P. halstedii</i> z roku 2015, 2016 a 2017.....	21
<b>Tabulka 2</b>	Rasy <i>P. halstedii</i> . z roku 2015.....	29
<b>Tabulka 3</b>	Rasy <i>P. halstedii</i> z roku 2016.....	30
<b>Tabulka 4</b>	Rasy <i>P. halstedii</i> z roku 2017.....	31

## **9 Seznam příloh**

- Příloha 1** Didaktická část – zařazení tématu „plíseň slunečnice“ do výuky biologie na SŠ
- Příloha 2** Pracovní list 1: čeled': hvězdnicovité- druh: slunečnice roční, Pomůcka pro učitele k pracovnímu listu 1
- Příloha 3** Pracovní list 2: Mikroskopování řasovek- plíseň slunečnicová (*Plasmopara halstedii*)

## Příloha 1

### Didaktická část – zařazení tématu „plíseň slunečnice“ do výuky biologie na SŠ

Vřetenatka slunečnicová, odborně *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. a De Toni (1988) je obligátní biotrofní patogen, třídy Oomycete (viz. vysvětlivky). Je původcem plísně slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), která se vyskytuje po celém světě, včetně České republiky. Hostitelem tohoto patogenu je kromě slunečnice dalších přes 100 druhů rostlin z čeledi hvězdnicovité (Asteraceae).

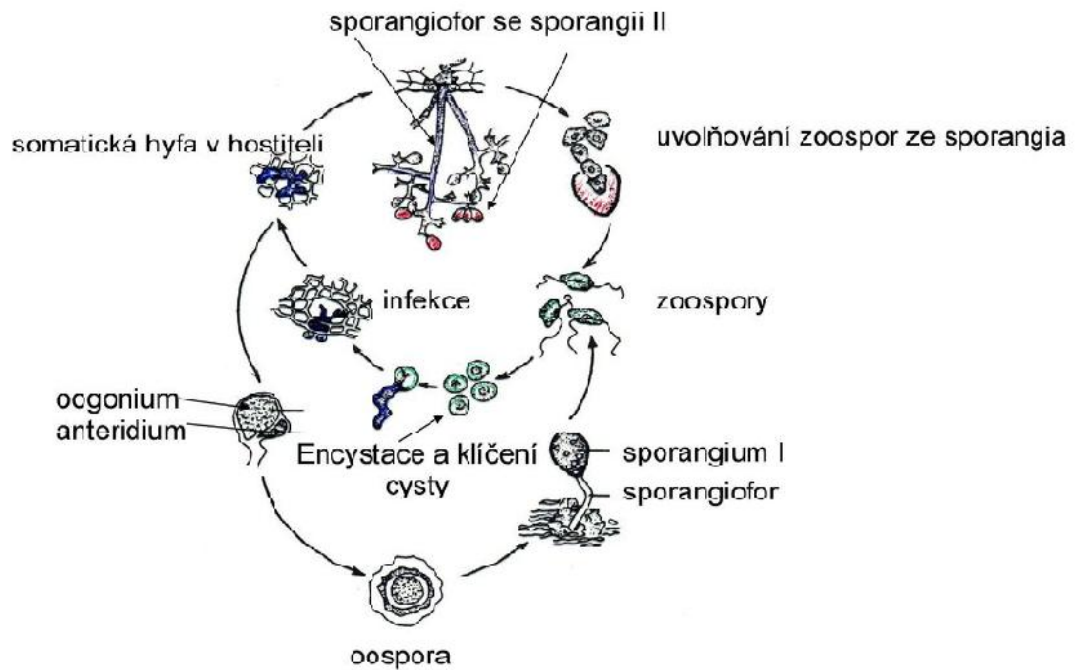
#### Rozmnožování:

Vřetenatka slunečnicová se může rozmnožovat nepohlavně pomocí pohyblivých zoospor, které se uvolňují ze zoosporangií a nebo pohlavně přes půdní oospory

- A) Nepohlavní rozmnožování: z průduchů nakažené rostliny prorůstají sporangiofory, které nesou zoosporangia a ty produkují dvoubičíkaté zoospory, které slouží k infekci hostitele.
- B) Pohlavní rozmnožování: Samčí pohlavní orgán se nazývá anteridium. Oogonia jsou samičí pohlavní buňky kulovitého či oválného tvaru a obsahují jednu nebo více oosfér. Splynutím těchto dvou útvarů vznikají zygoty a později kulovité tlustostěnné oospory.

#### Rozšiřování

Sporangia *P. halstedii* můžou být rozšiřovány větrem, vodou či půdou. Životní cyklus houby začíná oosporou, většinou uvolněnou do půdy z infikovaných pletiv, kde koncem sezony vznikla. Na jaře klíčí jediným zoosporangiem, ze kterého se uvolňují dvoubičíkaté zoospory. V přítomnosti volné vody se zoospory pohybují velmi rychle a vyhledávají hostitelská pletiva. Zoospora pronikne většinou do semenáčků přes kořen a infekce se postupně šíří směrem vzhůru do stonku a listů. V mezibuněčných prostorech vytváří mycelium s haustorií, které slouží k čerpání živin. Za příhodných podmínek vyrůstají z mycelia sporangiofory stromečkovitého charakteru, které často tvoří bílé povlaky na povrchu napadených hostitelských orgánů, zejména listů. Na sporangioforech jsou umístěna zoosporangia, které produkují zoospory a pomocí nichž může dojít k napadení další rostliny.



**Obrázek P1.** Životní cyklus plísně slunečnic

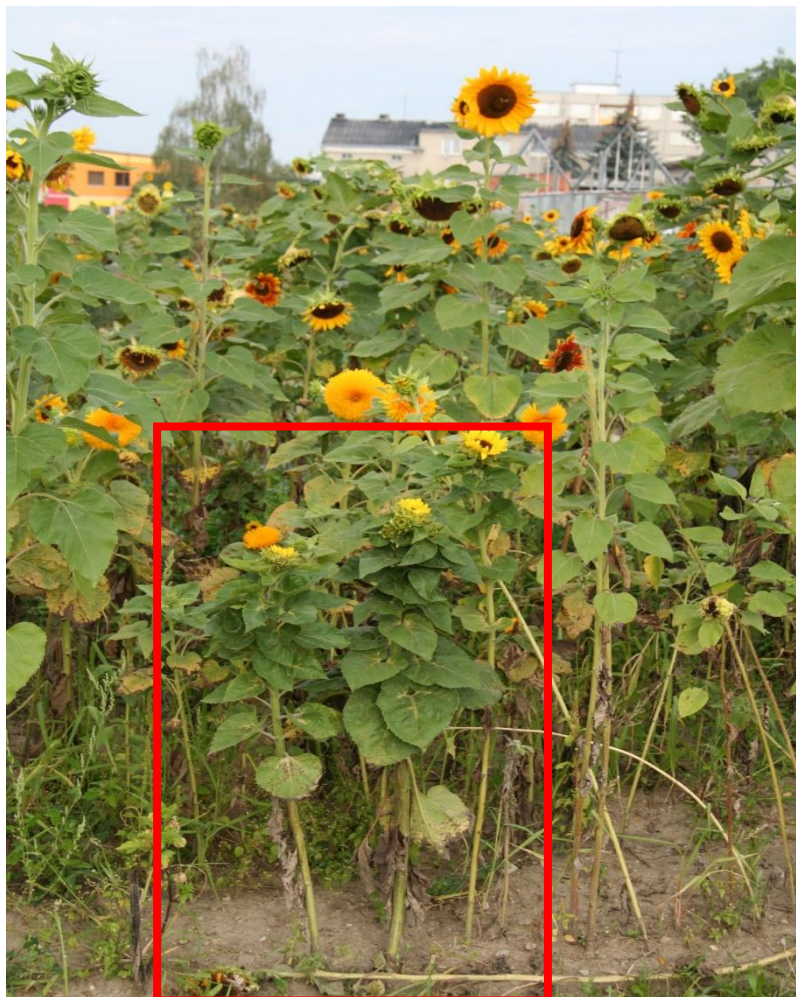
### Symptomy onemocnění

Příznaky (= symptomy) jsou výsledkem:

- A) systémové infekce: onemocnění vzniká z kontaminované půdy, ze které klíčí mladé rostlinky. Výsledkem jsou zakrslé rostliny.
- B) lokální infekce: během vegetační sezony jsou za pomoci větru přenášeny sporangia, která způsobují skvrny na listech.

### Vysvětlivky:

- Oomycete (Řasovky)- samostatná třída, patří mezi Eukaryotické organismy. Dříve byl řazen mezi houby.
- Obligátní- povinný, jediný možný.
- Biotrofní organismus- organické látky získává z živých buněk hostitele, kterého však nezabíjí



**Obrázek P2.** Rostliny slunečnice roční na poli – v popředí systémově napadené plísní slunečnicovou (zakrslé rostliny s nahloučenými a deformovanými listy).



**Obrázek P3.** Lokální napadení plísní slunečnicovou (chlorotické skvrny na svrchní straně a bílé povlaky sporangioforů na spodní straně listu).

## **Příloha 2**

### **Pracovní list 1**

**Název: čeleď: hvězdnicovité- druh: slunečnice roční**

**Úkol 1. Vypiš základní charakteristické znaky slunečnice roční (minimálně 5).**

**Úkol 2. Vyber rostliny, které patří do čeledi hvězdnicovité (zvýrazni).**

Chřpa	pampeliška	blatouch
Jestřábník	divizna	starček
jetel	kosatec	pelyněk
bodlák	čekanka	heřmánek
kamzičník	dymnivka	hvozdík
kopretina	koniklec	podběl
len	lopuch	pomněnka
řebříček	kopřiva	slunečnice

**Úkol 3. Uved' hospodářské využití slunečnice roční.**

## Pomůcka pro učitele k pracovnímu listu 1

Název: čeleď: hvězdnicovité- druh: slunečnice roční

Úkol 1. Vypiš základní charakteristické znaky slunečnice roční (minimálně 5).

- Květenství: úbor
- Květy trubkovité a jazykovité
- Zákrovní listeny
- Nažka
- Listy bez palistů
- Řapíkaté listy
- Pilovité okraje listů

Úkol 2. Vyber rostliny, které patří do čeledi hvězdnicovité (zvýrazni).

chrpa	pampeliška	<b>blatouch</b>
jestřábek	<b>divizna</b>	starček
<b>jetel</b>	<b>kosatec</b>	pelyněk
bodlák	čekanka	heřmáněk
kamzičník	<b>dymnivka</b>	<b>hvozdík</b>
kopretina	<b>koniklec</b>	podběl
<b>len</b>	lopuch	<b>pomněnka</b>
řebříček	<b>kopřiva</b>	slunečnice



### **Úkol 3. Napiš hospodářské využití slunečnice roční.**

Potravinářský průmysl- olej, pečivo, med

Léčitelství- čaje

Kosmetika- mýdla, šampony, krémy

Zemědělství- krmivo, silážování

Floristika- dekorace

Malířství- temperové barvy

## **Příloha 3**

### **Pracovní list 2**

**Název:** Mikroskopování řasovek - plíseň slunečnicová (*Plasmopara halstedii*)

**Materiál:** slunečnice roční (*Helianthus annuus*) s infekcí plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*)

**Pomůcky:** Pinzeta, světelný mikroskop (zvětšení 200-400x), podložní a krycí sklíčko, destilovaná voda

#### **Postup:**

- Pomocí pinzety seškrábneme sporulaci z lístku *H. annuus* na podložní sklíčko.
- Vzorek zakápneme kapkou destilované vody.
- Opatrně vzorek přikryjeme krycím sklíčkem.
- Pod mikroskopem pozorujeme sporangiofory se zoospory a zakreslíme.

**Nákres a popis mikroskopického preparátu:**

**Závěr:**