

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie potravinových a přírodních zdrojů



Metodika stanovení virulence izolátů *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary k významným major genům rezistence v návaznosti na jejich následné využití ve šlechtění bramboru

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Petr Sedlák a kol.

2016

Metodika stanovení virulence izolátů *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary k významným major genům rezistence v návaznosti na jejich následné využití ve šlechtění bramboru

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autorský kolektiv:

Ing. Petr Sedlák, Ph.D. (30 %)

Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl (10 %)

Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D. (10%)

Katedra genetiky a šlechtění, Česká zemědělská univerzita

Ing. Jana Mazáková, Ph.D. (20 %)

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc. (10 %)

Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita

Ing. Ervín Hausvater, CSc. (10 %)

Ing. Petr Doležal, Ph.D. (10 %)

Oddělení ochrany, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.

Foto: Petr Sedlák

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe ČR NAZV QJ1210305 „Integrovaná ochrana proti plísní bramboru v nových agroenvironmentálních podmínkách s využitím prognózy výskytu choroby a na základě nových poznatků o změnách v populacích patogenu a procesech rozkladu hlíz“.

Oponentní posudky vypracovali:

Ing. Václav Čermák

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení zkoušek užitné hodnoty, Referát brambor

Doc. Ing. Jaroslav Salava, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. UKZUZ 004073/2017 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení výsledků ukončených programů“.

eISBN: 978-80-213-2728-3

Obsah	
Anotace	3
Annotation	3
1. Úvod	4
2. Cíl metodiky	7
3. Vlastní popis metodiky	8
3.1 Odvození monosporových izolátů <i>Phytophthora infestans</i>	8
3.2 Kultivace diferenciační sady klonů	9
3.3 Podmínky inokulace a inkubace	10
3.4 Hodnocení interakce mezi izolátem a diferenciačními klony	12
3.5 Konkrétní šlechtitelské využití popsaných postupů	16
4. Srovnání novosti postupů	17
5. Popis uplatnění metodiky	17
6. Ekonomické aspekty	17
7. Seznam související použité literatury	18
8. Seznam publikací, které předcházely metodice	21
9. Příloha – kopie osvědčení k metodice	23

Anotace

Předložená publikace je metodickým návodem na hodnocení struktury populace původce plísně bramboru *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary z hlediska výskytu fyziologických ras. Tyto rasy vykazují geneticky podmíněné rozdíly ve virulenci k existujícím genům rezistence bramboru. Geny byly introdukovány z různých genetických zdrojů rodu *Solanum*, a jsou potenciálně využitelné ve šlechtění a ochraně bramboru. Právě geneticky podmíněná odolnost bramboru k plísni se ukazuje být z dlouhodobého hlediska velmi významnou součástí integrované produkce brambor, ale naráží na některé zásadní problémy. Patogen je velmi agresivní a plastický, a proto základem pěstebních technologií pro produkci kvalitních brambor je intenzivní fungicidní ochrana vycházející z komplikované prognózy vývoje patogenu. Major geny hypersenzitivní rezistence naproti tomu mají značný potenciál zachytit primární infekční tlak a oddálit tak rozvoj choroby. K účelnému výběru vhodných genů pro šlechtění či využití konkrétních odrůd s určitým typem odolnosti je třeba znát aktuální poměry ve výskytu virulentních ras, což se ukazuje být záležitostí časově i místně proměnlivou. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné dlouhodobé sledování struktury a vývoje populace. Publikace je určena pro šlechtitele, pro orgány státní správy na úseku rostlinolékařské kontroly, podnikatelské subjekty v oblasti zemědělského poradenství, pěstitele, výzkumné organizace a školy se zaměřením na ochranu rostlin a šlechtění.

Annotation

The publication in your hand is a methodical guide suitable for identification of physiological races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary causing potato late blight. These races express genetically determined differences in virulence to important potato late blight resistance genes that are derived from different genetic resources in genus *Solanum*. They are potentially usable in potato breeding and protection. The natural, genetically determined resistance of potato to late blight is an important part of sustainable potato production. Considering aggressiveness and plasticity of the pathogen, the extensive use of fungicide sprays and prognosis system of pathogen development are required for potato protection and production of high quality tubers. Mentioned major genes of potato late blight resistance are able to slow down the progression of the disease. However, in the systems using genes of hypersensitivity, it is necessary to know current ratios of virulent races, because their occurrence is highly variable in time and space. The knowledge is accessible only by long-time study of status and development of pathogen populations. The publication is suitable for breeders, Central institute for Supervising and Testing in Agriculture, consultants in agronomy, farmers and research institutes and schools active in a branch of plant protection and breeding.

1. Úvod

Phytophthora infestans je dlouhodobě jedním z nejškodlivějších patogenů, na jehož regulaci jsou každoročně celosvětově vynakládány prostředky v hodnotě několika bilionů EUR. Z hlediska epidemiologie a ochrany je stěžejním okamžikem pěstitelské sezóny zachycení primárních infekcí, a klíčová jsou tedy zejména preventivní ochranná opatření, jejichž správnému načasování napomáhají systémy monitoringu a signalizace výskytu patogenů. Systémy signalizace berou v potaz průběh počasí (teplota a vlhkost) a hlášení prvních výskytů. I přes značnou sofistikovanost jsou modely relativně jednoduše koncipovány, jelikož nezohledňují genetickou strukturu populace patogenu.

Nedílnou součástí ochrany plodin vůči škodlivým organismům je vedle agrotechnických opatření také výběr odrůdy. Dostupnost odolných odrůd je potom věcí šlechtění, které má více či méně za cíl výběr a registraci odrůd s vyšší odolností vůči původci choroby. Rezistenci mohou řídit geny velkého nebo malého účinku a z tohoto hlediska rezistenci dělíme na major geny podmíněnou vertikální hypersenzitivitu a minor geny řízenou horizontální rezistenci. Komplex genetických bloků se potom projevuje polní odolností, kterou lze chápat jako schopnost genotypu odolávat tlaku patogenu v daných podmínkách vnějšího prostředí. Potřeba šlechtění na odolnost spojená s intenzivním vyhledáváním genetických zdrojů rezistence a introdukce genů do genofundu bramboru je spojena s velkou epidemií v Irsku v polovině 19. století. Tato historická událost v důsledku vedla k zásadní proměně genofundu bramboru, neboť se začaly pěstitelsky a šlechtitelsky využívat odolnější klony kulturních i nekulturních druhů rodu *Solanum*. Jako zdroj vertikální rezistence se významně prosadil druh *Solanum demissum*, z jehož genofundu bylo do genofundu bramboru translokováno systémy zpětných křížení 11 důležitých lokusů považovaných dlouhou dobu za samostatné geny rezistence (Black, 1951). Pozdější výzkumy na přelomu tisíciletí využívající mapovací techniky a analýzy sekvencí DNA prokázaly existenci vícero nezávislých genů v předemných lokusech. Přehled uvádí tabulka 1. Dalším druhem, který se výrazně podílel na posílení odolnosti bramboru vůči *P. infestans*, byl andský „předek“ bramboru *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* jakožto zdroj genů horizontální rezistence vykazujících nerovnoměrný aditivní účinek. Výraznější kandidátní geny (QTL - Quantitative Trait Loci) tohoto polygenního systému byly později mapovány na různých chromozómech. Již v 90. letech 20. století bylo v souvislosti s rozvojem mapovacích technik zmapováno více než 20 různých QTL horizontální rezistence, které se vyskytují na 9 chromozómech z celkových 12 chromozómů základní haploidní sady bramboru (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Oberhagemann *et al.*, 1999). Již z této informace je zřejmé, že problematika horizontální rezistence je značně komplikovaná a záměrné šlechtění na balanci tohoto kvantitativního bloku nerealizovatelné bez pomnutí ostatních z pěstitelského hlediska velmi podstatných vlastností, zatímco kvalitativně založená hypersenzitivita je podstatně jednodušším a šlechtitelsky lépe uchopitelným řešením.

Zásadní rozdíl mezi hypersenzitivní rezistencí a horizontální polygenní rezistencí pak spočívá také v míře účinnosti genů potlačujících rozvoj infekce. Hlavním znakem hypersenzitivity je efektivní působení na počátku infekce, kdy je zastaveno prorůstání mycelia patogenu a tím jeho šíření již v samotném zárodku, kdy klíčící spory interagují na molekulární úrovni s hostitelskou buňkou a sebezničující buněčná reakce (autolýza) zastaví další vývoj epidemie již v samotném zárodku. Polygenně řízená rezistence se projevuje oslabováním růstu patogenu, tzn. patogen je zde v aktivní roli, a je typická pro pozdnější vývoj epidemie, kdy se již na infekcích uplatňují rasy virulentní k major genům. Mechanismy vertikální rezistence u bramboru vyhovují Florově teorii gen proti genu (Flor, 1955; Flor, 1971), kdy každému aktivnímu genu rezistence v populaci hostitele odpovídá recesivní

gen virulence v populaci patogenu (virulentní faktor), který umožní patogenu daný gen rezistence překonat. Po molekulární stránce je rezistence výsledkem interakce přijatého chemického signálu vlastního patogenu (elicitor) a funkčního receptoru na straně hostitelské buňky. K recepci signálu slouží proteinové domény receptorů typu LRR-NBS, které bývají zakotveny v plazmatické membráně a své na leucin bohaté domény (LRR) vystavují na vnější straně membrány, zatímco NBS domény v momentě přijetí pozitivního signálu iniciují kinázovou reakci na straně vnitřní (Cannon *et al.*, 2002). Vlastní buněčná odezva různých domén řízených různými geny v interakci s různými signály z vnějšku bývá odlišná, čehož se využívá pro identifikaci jemných rozdílů mezi fyziologickými rasami, většinou však končí buněčnou autolýzou (Lam *et al.*, 1999). Virulentní faktor pak vzniká mutací, která mění charakter elicitoru. V důsledku je patogen ve vztahu ke genu ve výhodě a stává se pro hostitele v prvním rozpoznání „neviditelným“. Molekulární výzkum genetické povahy virulence na straně patogenu probíhal souběžně s mapováním a klonováním genů rezistence a odkazy na tuto problematiku lze nalézt v níže citované literatuře. Je však již dlouhodobě zřejmé, že systém se evolučně dynamicky vyvíjí v kontaktních místech partnerů na evolučním principu tzv. červené královny (Zrzavý *et al.*, 2006). Z uvedeného je patrné, že šlechtitelské využívání jednotlivých genů nebo jejich určitých kombinací nemusí vést z dlouhodobého hlediska k žádané úrovni odolnosti. Totiž v okamžiku, kdy interaguje odrůda charakteristická daným genem rezistence s populací patogenu virulentní k tomuto genu, dochází k preferenci reprodukce této virulentní rasy na úkor ostatních ras v populaci. Obecně se tedy dá říci, a výzkum v posledních letech potvrzuje, že vůči všem dosud charakterizovaným major genům rezistence existují virulentní faktory, které se ovšem vyskytují s různou populační frekvencí v různých oblastech. Globalizace obchodu s množitelským materiálem odrůd vede k rychlému rozptýlení a proměnlivosti zastoupení virulentních ras, nelze tedy spolehlivě stanovit mapu dlouhodobého výskytu těchto ras. Globálně však platí, a též výsledky našeho výzkumu potvrzují, že virulentní faktory genů *R8* a *R9* jsou stále málo rozšířeny. Snad za to může fakt, že se s těmito geny nikdy příliš šlechtitelsky nepočítalo (Huang *et al.*, 2005), zřejmě po zkušenostech s rychlým překonáním genů *R1* – *R4* a *R10*. Jako řešení konfliktu vysoké efektivity, ale současné krátkodobosti je pyramidizace genů (šlechtitelská akumulace) do jednoho genotypu, což jasně dokladuje příklad odrůdy Sárpo Mira, jejíž genotyp akumuluje 5 různých samostatně efektivních major genů (Rietman *et al.*, 2012).

Současné práce týkající se interakce patogen - hostitel u systému brambor - *P. infestans* jsou zaměřené na dvě oblasti. První oblastí je populačně genetické studium *P. infestans*, které se zaměřuje hlavně na výskyt ras virulentních k *R* genům ze *S. demissum*, mapování a charakterizace genů virulence, výskyt pohlavních typů a rezistence k fungicidním látkám. Druhou zájmovou oblastí je soustavné mapování *R* genů, jejich molekulární charakterizace na základě klonování a snaha o přesnou lokalizaci na chromozómech. Výsledky této oblasti částečně shrnuje tabulka 1, která odkazuje i na klíčové práce spojené s lokalizací jednotlivých genů. Oba výzkumné proudy jsou postavené na existenci diferenciačních sad klonů bramboru, do nichž byly inkorporovány jednotlivě geny *S. demissum*. V Evropě se používají dvě sady vytvořené v polovině 20. století a udržované na dvou nezávislých pracovištích. Tradiční diferenciační sada dle Black (1951) - tzv. Skotská diferenciační sada *R1* až *R11* - a od ní odvozená paralelní sada dle Mastenbroek (1952) - tzv. Holandská diferenciační sada *MaR1* - *MaR11*. Sady se do značné míry překrývají, neboť sdílejí klony *R5* - *R11*. Naopak klony nesoucí geny *R1* - *R4* byly autory vytvořeny nezávisle, což se projevilo v molekulárním výzkumu a mapování *R* genů. Hlavní rozdíl spočívá v klonu nesoucí gen *R4*. Zatímco skotská sada obsahuje gen *R4* ve spojení *R1* - *R2* - *R3* a *R4*, *MaR4* klon je očištěn od ostatních genů. Van der Poppel *et al.* (2009) porovnávali obě alelické varianty z hlediska interakce s avirulentními faktory a zjistili

podstatné rozdíly. Lokus zatím nebyl ani jednoznačně zmapován, o jeho lokalizaci jsou pouze částečné informace (Verzaux, 2010). Proto je třeba k *R4* genu zatím přistupovat s jistou rezervou, jelikož se zřejmě stalo, že v souvislosti s očistěním od genů *R1*, *R2* a *R3* mohlo dojít i k segregaci translokace nesoucí lokus *R4*. Byla-li v původní translokaci *R4* celá genová rodina R genů, mohlo se stát, že *MaR4* již některé geny nesdílí s Blackovou variantou. Lze připustit domněnku, že *R4* přítomný ve skotské sadě dosud nebyl přesně zmapován i z toho důvodu, že klon obsahuje další geny rezistence, což znesnadňuje tvorbu mapovací populace. Závěrem k tomuto genu je třeba dodat, že ať gen byl nebo nebyl a bude či nebude zmapován, je zřejmé, že gen/y v lokusu *R4* jsou již dlouhou dobu překonány virulentními rasami a to jak v laboratorních tak polních podmínkách. Obdobně mapovací studie prokázaly u skotské diferenciacní sady v *R3* lokusu dva geny *R3a* a *R3b*. Ze šlechtitelského hlediska je zajímavé, že k lokusu *R3* na chromozómu XI jsou alelické geny *R10* a *R11*. Toto zásadně znesnadňuje pyramidizaci těchto čtyř genů. Další komplikací se zdá být kvantitativní efekt genu *R10*. Bradshaw *et al.* (2006) mu připisuje přibližně 56% podíl na celkové variabilitě v mapovací populaci ve vztahu k rezistenci k *P. infestans*. Jedná se tedy spíše o velmi silný QTL řídící kvantitativní odolnost. Jo *et al.* (2015) zmapovali lokus *R9* genu na chromozómu IX. Identifikovali v lokusu alelu *R9a* hypersenzitivní rezistence a další QTL rezistence k *P. infestans*. Takže i zde je vidět, že translokace ze *S. demissum* mohou ve skutečnosti obsahovat více genů ve shlcích a dalším křížením v souvislosti s mapováním se tyto translokace redukují a ochuzují. Velmi zajímavou odrůdou, které je v posledních pěti letech věnována značná pozornost z hlediska silné polní rezistence je odrůda Sárpo Mira. Její genový komplex odolnosti k *P. infestans* obsahuje geny *R3a*, *R3b*, *R4*, *Rpi-Smira1* a *Rpi-Smira2* což představuje 5 aktivních genů přičemž *Smira2* je efektivní pouze v polních podmínkách (Rietman *et al.*, 2012). Také Tomczyńska *et al.* (2014) lokalizovali genový komplex odrůdy Sárpo Mira na chromozómu XI blízko lokusu *R3*, což podporuje předchozí informaci. Jo (2013) však lokalizoval gen *Rpi-Smira2* do lokusu *R8* což si s předchozí informací protiřečí. Obdobně protichůdné jsou informace z výzkumu genu *R8* zmapovaného týmem Jo *et al.* (2011). Další výzkum různých genetických homologních lokusů týmem Vossen *et al.* (2016) přisuzuje odrůdě Sárpo Mira také lokus *R8*, ovšem předchozí výzkum a ani naše vlastní pozorování toto tvrzení nepodporují.

Populační dynamika původce plísně je velmi složitá a nejistá vzhledem k tomu, že obchod s komoditou je globální a patogen se přenáší hlízy. Navíc se do hry vkládá možnost vzniku trvalých výtrusů - oospor - při současném výskytu obou pohlavních typů. S touto možností reprodukce se také otevírá možnost tvorby rekombinovaných genotypů a urychlení vzniku komplexních ras, které akumulují virulentní faktory překonávající postupně všechny geny rezistence. Právě výzkum virulence izolátů v pěstitelsky významných oblastech by měl být základem pro posouzení možností šlechtitelského využití major genů či volbu strategie volby odrůd se specifickou rezistencí. Studiu virulence je věnována širší pozornost od 90. let minulého století související s vývojem monitoringu a signalizace v ochraně rostlin. Andrivon (1994) studoval americké a evropské populace v dlouhodobé perspektivě. Flier *et al.* (2007) publikoval soubornou populační studii izolátů *P. infestans* původem ze 4 evropských zemí a celkově je v posledních letech na populační variabilitu zaměřeno mnoho dalších prací mapujících lokální populace. Pro příklad lze zmínit studie v západní Evropě (Pilet *et al.*, 2005; Savazzini *et al.*, 2015) nebo Pobaltí (Aav *et al.*, 2015; Runno-Paurson *et al.*, 2012). Naše vlastní pilotní výsledky a zkušenosti, které byly také do jisté míry motivací k iniciaci průzkumu a dlouhodobému sledování stavu virulence, a následně vedly k ověřování a zformování této metodiky, byly prezentovány v pracích Škodáčková *et al.* (2009), kdy byly testovány a selektovány klony *Solanum bulbocastanum* na rezistenci k *P. infestans* a Sedláková *et al.* (2009) věnované testování různých genetických zdrojů rodu *Solanum* pro tvorbu somatických hybridů. V obou případech byly

použity komplexní izoláty *P. infestans* překonávající většinu genů rezistence Blackovy diferenciační kolekce získané z institutu SASA s cílem vybrat laboratorně odolné genotypy pro následující šlechtitelskou a badatelskou práci.

Tabulka 1: Přehled zmapovaných genů kvalitativní (hypersenzitivní) rezistence bramboru k *P. infestans*

Lokus	Donor	Lokalizace	Autor
R1	<i>S. demissum</i>	Chromozóm V	Leonard-Schippers <i>et al.</i> (1992)
R2	<i>S. demissum</i>	Chromozóm IV	Li <i>et al.</i> (1998)
R3a	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	El-Kharbotly <i>et al.</i> (1994), Huang <i>et al.</i> (2005)
R3b			
R4	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	Verzaux (2010)
R5	<i>S. demissum</i>	Chromozóm VIII	Huang <i>et al.</i> (2005)
R6	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	El-Kharbotly <i>et al.</i> (1996)
R7	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	El-Kharbotly <i>et al.</i> (1996)
R8	<i>S. demissum</i>	Chromozóm IX	Jo <i>et al.</i> (2011)
R9a	<i>S. demissum</i>	Chromozóm IX	Jo <i>et al.</i> (2015)
R10	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	Bradshaw <i>et al.</i> (2006)
R11	<i>S. demissum</i>	Chromozóm XI	Bradshaw <i>et al.</i> (2006)
<i>Rpi-blb 1</i>	<i>S. bulbocastanum</i>	Chromozóm VIII	Song <i>et al.</i> (2003)
<i>Rpi-Smira1</i>	Sárpo Mira	Chromozóm XI	Tomczyńska <i>et al.</i> (2014)
<i>Rpi-Smira2</i>	Sárpo Mira	Chromozóm IX	Jo (2013)

2. Cíl metodiky

Metody v oblasti šlechtění, monitoringu patogenů a ochrany rostlin se dlouhodobě vyvíjejí v souvislosti s neustálými změnami v ekologických vztazích mezi pěstovanými rostlinami a jejich patogeny, a také v souvislosti s neustálými technologickými změnami, které ve snaze zlepšit technologii produkce tyto ekologické vztahy posilují či oslabují. Jedním z cílů této publikace je zaplnit informační mezeru v oblasti ochrany proti plísni bramboru, která vznikla jako důsledek sníženého zájmu o major geny rezistence u bramboru v souvislosti s jejich rychlým překonáním. Naopak se v poslední době ukazuje, že o tuto problematiku ve světě zájem stále přetrvává. Hlavním cílem této metodiky je proto jednak přinést aktuální informace o stavu vědeckého výzkumu a praktického využívání geneticky podmíněné rezistence bramboru k *P. infestans* a také vlastní, časem prověřený a snadno realizovatelný návrh metodiky detekce virulentních ras patogenu *P. infestans* uskutečnitelný v běžných laboratorních podmínkách. Poznatky z realizace metodiky, které dlouhodobé sledování virulence v populaci patogenu přinese, mohou napomoci šlechtitelům k cílenějšímu výběru genů rezistence do místních šlechtitelských programů, k charakterizaci virulence izolátů používaných v testování šlechtitelského materiálu a realizaci laboratorních testů rezistence.

3. Vlastní popis metody

Následující část metodiky je všeobecně použitelným návodem pro získání čisté kultury *P. infestans*, kterou je dále možné charakterizovat a následně využít v laboratorním testování. Vlastní šlechtitelské adaptace metodiky přináší podkapitola 3.5.

3.1. Odvození monosporových izolátů *Phytophthora infestans*

Vlastní odběr vzorků listů vykazujících symptomy rozhoduje o úspěšném odvození životaschopné kultury. Optimální stav patogenu v porostu ovlivňuje teplota a vlhkost. Při déletrvajících vysokých teplotách a nízké vlhkosti skvrny na listech zasychají a snižuje se vitalita mycelia. Za optimální podmínky pro izolaci lze považovat okamžik, kdy na okrajích lézí vyrůstají sporangiofory. Pro rozpoznání této fáze není třeba žádné speciální vybavení. Celý list rostliny odebereme a umístíme do popsaného polyetylenového sáčku. Zaznamenáváme lokalitu a odrůdu, je-li v okamžiku odběru známa. Pro zpomalení metabolických a rozkladných procesů ve vzorku umístíme sáček do příručního chladicího boxu. Teplota v rozpětí 5-15 °C bezpečně zajistí stabilitu vzorků po dobu 24 hodin, která je dostatečná pro následné zpracování vzorku v laboratoři.

Listy vykazující léze jsou v laboratoři umístěny do vlhké komůrky (skleněná Petriho miska o průměru 100 mm s navlhčeným filtračním papírem) a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 16-18 °C, což podpoří sporulaci patogenu. Listy jsou do vlhké komůrky umístěny rubovou stranou navrch. Ze sporulujícího mycelia jsou injekční jehlou se zachyceným kouskem mycelia sterilně pod binolupou při zvětšení 30× odebrána jednotlivá zoosporangia a ta jsou přenesena na žitný agar A (Caten et Jinks, 1968). Pro izolaci a kultivaci je optimální využít jednorázové polystyrenové Petriho misky o průměru 60 mm nebo 90 mm. Petriho misku je třeba uzavřít, optimálně parafinovou fólií (Parafilm M). Parafilm zabraňuje vstupu mikroorganismů především na těle roztočů, které by mohly kontaminovat čisté izoláty *P. infestans*, fixuje misku a optimalizuje další kontrolu a manipulaci. Vzorky inkubujeme v termostatu ve tmě při teplotě 16-18 °C. Přeočkování je prováděno vyřezáváním bločku agarů s rostoucí kolonií patogenu nebo její částí na nový agar (Obrázek 1). Termín prvního přeočkování je přizpůsoben stavu kolonie, další přeočkování jsou podle potřeby, obvykle 1× měsíčně.

Obrázek 1: Čistá kultura izolátu *P. infestans* v Petriho misce na žitném agaru A



3.2. Kultivace diferenční sady klonů

3.2.1. Doporučená diferenční sada pro dlouhodobé sledování virulence v podmínkách ČR

Základem úspěšné identifikace přítomnosti všech virulentních faktorů v populaci *P. infestans* je práce s diferenční sadou genů rezistence. Základem námi doporučené sady je Skotská kolekce diferenčních klonů. Sada je tvořena 11 klony obsahujícími jednotlivě geny rezistence *R1-R11* odvozené ze *S. demissum* a kontrolní genotyp *R0* bez jakéhokoliv známého genu rezistence. Genotypy sady jsou dostupné ve spolupráci se SASA (Science and Advice for Scottish Agriculture) v Edinburgu. Rovněž jsou k dispozici v genové bance ČR pod označením BDRrr (*R0*)-BDR11. Genotyp *R5* je oficiálně k dispozici v databázi GRIN-Global ve spolupráci s genovou bankou při USDA (United States Department of Agriculture) ve Wisconsinu. Na základě vlastního uvážení a perspektivy ve šlechtění a výzkumu popsané v literárním přehledu doporučujeme do diferenční sady *R*-genů zařadit odrůdu Sárpo Mira a nositele genu *Rpi-blb1*. Tím je například námi osvědčený somatický hybrid REG46E vytvořený elektrofúzí protoplastů diploidního klonu bramboru DH165 a rezistentního klonu PIS 60 *S. bulbocastanum*. Somatický hybrid vznikl na pracovišti Katedry genetiky a šlechtění v rámci disertační práce v letech 2006-2007 (Sedláková, 2010). Podrobnosti ke klonům jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled klonů diferenční sady využívané v rámci řešeného projektu

Klon	GRIN Czech/Global ID	Původ	Gen rezistence
BDR1 ^a	07S0200399	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R1</i>
BDR2 ^a	07S0200400	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R2</i>
BDR3 ^a	07S0200401	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R3a</i>
BDR1.2.3.4 ^a	07S0200408	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R1,2,3a,4</i>
LB DIFF - R5 ^b	PI 303146	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R5</i>
BDR6 ^a	07S0200402	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R6</i>
BDR7 ^a	07S0200403	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R7</i>
BDR8 ^a	07S0200404	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R8</i>
BDR9 ^a	07S0200405	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R9</i>
BDR10 ^a	07S0200406	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R10</i>
BDR11 ^a	07S0200407	SASA Edinburgh (Black's differentials)	<i>R11</i>
BDRrr ^a	07S0200398	SASA Edinburgh (Black's differentials)	-
REG46 ^a F	07S0200439	KGŠ FAPPZ ČZU v Praze	<i>Rpi-blb1</i>
Sárpo Mira ^a	07S0102213	Genová banka ČR při VÚB s. r. o.	<i>R3a, R3b, R4, Rpi-Smira 1 a 2</i>

a) klony dostupné v databázi Genové banky VÚRV [, v.v.i., Praha - Ruzyně](https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx)

(<https://grinczech.vurv.cz/gringlobal/search.aspx>)

b) klon dostupný v databázi americké genové banky USDA ve Wisconsinu (<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>)

3.2.2. *In vitro* udržování diferenční sady a převod *ex vitro*

Pro vlastní udržování sbírky je výhodné udržovat rostliny *in vitro* nebo kultivaci v technickém izolátu z hlíz bez přístupu vektorů viróz. Pro udržování klonů v hlízách je nutné standardní skladování hlíz, výhodou *in vitro* kultivace je naopak možnost regulace růstu a vývoje a relativně rychlá příprava

potřebného množství rostlin v relativně krátkém čase. *In vitro* kultivace v rámci ověřování metod byla prováděna dle následující metodiky s tím, že každá kultura byla vedena v minimálně dvojnásobném opakování jako prevence ztráty v důsledku rizika kontaminací. Čtyři pupeny byly sterilním způsobem umístěny ve flowboxu (Gelaire) do 150 ml skleněné kultivační nádoby na autoklávem sterilizované standardní MS médium (Duchefa) s přísadou sacharózy (3%) a agaru (0,7%) při pH 5,7. Objem média byl 30 ml na 1 sklenici, což odpovídá vrstvě kultivační půdy o výšce 1 cm. Kultivační nádoba byla uzavřena PE víčkem B-Cap (Sigma-Aldrich). Označené kultury byly kultivovány ve vlhčené kultivační skříni MLR-351H (Sanyo) při fotoperiodě 16 hod den a 8 hodin noc. Teplota v režimu den byla 23 °C a v režimu noc 18 °C. Relativní vlhkost byla nastavena na 50 % jako prevence nadměrného odparu kultivačního média během kultivace. Hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů (PPF) byla nastavena na 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, přičemž intenzita osvětlení byla 14500 lx. Za těchto podmínek bylo nutné pasážovat kultury po 4-6 týdnech. Pro převod *ex vitro* rostliny dosahovaly optimální kondice během 14-20 dní. V této době nodální řízků již vytvořily 2-3 pravé listy a 2-3 kořeny v délce do 3 cm a rostliny tak byly připraveny pro převod do *ex vitro*. Do uzavíratelných PE kontejnerů (250 ml) byl ve vrstvě 2-3 cm přidán perlit navlhčený běžnou pitnou vodou. Do perlitu byly nesterilně zasazeny rostliny očištěné od kultivačního média a kontejnery byly uzavřeny s ponecháním drobných průduchů pro výměnu vzduchu. Rostliny byly takto při vyšší vlhkosti při laboratorní teplotě a běžném osvětlení (ne na přímém slunci) kultivovány po dobu 5 dnů aby zakořenily a následně byly přeneseny do skleníku. Zde byly při běžných provozních podmínkách otuženy v průběhu dalších 4 dnů. Následně byly přesazeny do výsevního substrátu a po dalších 10 dnech do běžného zahradnického substrátu v 1L kontejnerech. Rostliny byly pěstovány a pravidelně přihnojovány po dobu 4 - 6 týdnů. Optimální růst pro získání dostatečné listové plochy byl zaznamenáván do konce srpna. V pozdějších výsadbách již rostliny trpěly nedostatkem světla pro růst a vývoj a bylo nutné přisvětlení. Od konce září byly rostliny i při přisvětlení pro účely testování prakticky nepoužitelné.

3.3 Podmínky inokulace a inkubace

3.3.1. Příprava listů

Testování virulence bylo optimalizováno na minimální nároky na prostor a manipulaci. Předkládaná metoda testování virulence využívá 60 mm polystyrenových Petriho misek opatřených rovnoměrně vodou navlhčeným filtračním papírem. Na otestování jednoho izolátu *P. infestans* ve dvou opakováních je třeba připravit dvě sady Petriho misek po 13 kusech. Dvě opakování byla shledána dostatečně spolehlivá pro charakterizaci virulence plně vitálního izolátu *P. infestans*. Misky před odběrem listů označíme odpovídajícím číslem klonu, např. R1, R2, SM...apod. Z hlediska časové harmonizace pracovního týdne a návaznosti operací v rámci experimentů, je ideální odběr listů situovat do ranních hodin (do 10 hodin) v pondělí a ve čtvrtek. V připravených Petriho miskách navlhčíme filtrační papír, přebytečnou vodu slijeme. Z testovacích rostlin odebíráme potřebný počet neporušených a dobře vyvinutých bočních listů, nejlépe ze středních pater rostliny a vkládáme je do Petriho misky rubovou stranou navrch a misku uzavřeme. Koncové lístky obvykle nevyhovují svými rozměry velikosti Petriho misky. Listy uchováme na světlém místě (nikoliv na přímém slunci) při běžné laboratorní teplotě a následně zajistíme inokulaci tentýž den.

3.3.2 Příprava inokulační suspenze

Přípravě inokulační suspenze je třeba věnovat náležitou pozornost. Petriho misky s kulturou *P. infestans* by měly být porostlé rovnoměrně myceliem a kultura by měla produkovat zoosporangia.

Množství zoosporangií může ovlivňovat například stáří kultury. Ve stáří 4-5 týdnů naprostá většina izolátů produkuje dostatečné množství zoosporangií. Příliš mladá kultura obvykle poskytuje málo sporangií, což obvykle výrazně negativně ovlivní výsledek hodnocení. Podobně i přestárlé kultury, které sice obsahují zoosporangia (často bez zoospor), nemusejí být v optimální kondici. Pro inokulaci celé diferenciační sady ve dvou opakováních je třeba 1,1 ml inokulační suspenze. Vlastní příprava suspenze spočívá v seškrábnutí mycelia ocelovou kličkou z povrchu kultivačního média a přenesení do sterilizovaného „rozpuštědla“ v běžné 2ml PP zkumavce. Začínáme s malým množstvím rozpuštědla (0,7 ml) a následně ředíme na požadovanou koncentraci a objem. Opakovanou rotací kličky ve zkumavce vytřepeme sporangia a mycelium vyjmeme. Mycelium na sebe váže hodně tekutiny (klidně i celou polovinu objemu), proto stlačením mycelia o stěnu zkumavky vrátíme absorbovanou tekutinu zpět, aniž by došlo ke ztrátě sporangií. Optimálním rozpuštědlem je autoklávem ošetřená pitná voda. K přípravě inokula byl také testován fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl), nicméně v případě odparu inokulační suspenze, ke kterému nutně během experimentů částečně dochází, dochází k narušení infekce a zkreslení výsledků hodnocení. McKee (1964) také doporučuje přidavek 1% extraktu z hlíz bramboru pro prodloužení životaschopnosti zoospor. Toto se při vývoji metody zdálo být praktické vzhledem k tomu, že jsme používali čistou vodu. Nicméně porovnání nevykázalo žádný rozdíl v celkovém projevu izolátu. Způsob odběru mycelia totiž vede k tomu, že se s ním do vody dostává i část kultivačního média a jeho vyluhováním se dostanou do vody i potřebné živiny.

Inokulační suspenzi připravujeme vždy čerstvou. Z hlediska organizace času ji směřujeme buď před odběr listů, nebo až po odběru. Pokud je suspenze připravována před vlastním odběrem, je vhodné ji ponechat v chladničce 2-3 hodiny při 5-10 °C. Tento zásah podporuje uvolňování zoospor. Zadina a Jermoljev (1976) uvádějí, že uvolněné zoospory při vyšší teplotě okolo 15 °C ztrácejí migrační schopnost během 3 hodin. Proto je nutné provést inokulaci co nejrychleji a bezprostředně přenést inokulované listy do inkubátoru. V případě přípravy suspenze po odběru listů inokulujeme bezprostředně a preferujeme tak infekční potenciál zoosporangií (Colon *et al.*, 2004). V rámci optimalizací byly testovány oba typy přípravy a poskytovaly naprosto srovnatelné výsledky vzhledem k interakci izolátu s diferenciační sadou.

3.3.3. Ředění inokulační suspenze

Jedním z faktorů, který je velmi významný pro spolehlivost hodnocení, je koncentrace inokula. Různí autoři zmiňují různá ředění inokulační suspenze. Již pozorování rychle sedimentujícího zákalu inokulační suspenze ve zkumavce indikuje přítomnost zoosporangií. Cest jak stanovit množství je několik. Testovali jsme využití hematocytometru, což představuje měření přesné, ale v situaci, kdy není k dispozici, je možné koncentraci v běžně vybavené laboratoři stanovit následujícím způsobem. Z promíchané suspenze odebereme 3 kapky o objemu 2 μ l a umístíme je na podložní sklíčko. Nezakrýváme krycím sklíčkem. V každé kapce spočítáme počet zoosporangií při malém zvětšení mikroskopu (100-200 \times). Počty zprůměrujeme a vyjádříme v koncentraci na 1 ml (aritm. průměr \times 500). Optimální koncentrace suspenze uváděné různými autory se velmi různí. Lapwood (1961) používal 5-7 tis. sporangií v 1 ml, zatímco Colon *et al.* (2004) uvádějí 15 tis. v 1 ml. Z našich pozorování vyplývá, že problémem nikdy není vyšší koncentrace sporangií, naopak nižší koncentrace sporangií může vést k zásadnímu ovlivnění výsledků. Nejednoznačností v hodnocení bylo vždy dosaženo v situacích, kdy bylo množství sporangií nižší než 5 tis./ml. Zcela spolehlivé je naopak využití suspenze, kde je koncentrace standardizována na 10-12 tis. sporangií/ml (20-22 sporangií v testovací 2 μ l kapce).

3.3.4. Inokulace listů a podmínky inkubace

Připravenou inokulační směs nanášíme mechanickou pipetou na rubovou stranu listů. Před inokulací si připravíme dvě sady Petriho misek s diferenciacními listy a na víčku je označíme kódem izolátu. Inokulační směs je nezbytné neustálým promícháváním pipetou udržovat homogenní, jelikož sporangia velmi rychle sedimentují. Na rubovou stranu listu nanášíme vždy dvě 20 μ l kapky suspenze podle hlavní žilky jak je patrné z obrázků v tabulce 4 a 5. Petriho misky uzavřeme a vrstvíme po 5-6 na manipulační rošt, ták nebo velkoformátové fotografické misky. Přeneseme do inkubátoru a 24 hodin inkubujeme při běžné fotoperiodě, teplotě 18 °C a vysoké vzdušné vlhkosti (min. 75 %), která zamezuje nadměrnému odparu vody z Petriho misek vlivem klimatizace. Jako inkubátor jsme použili vlhčící kultivační box MLR-351H (Sanyo). Po 24 hodinách je třeba listy obrátit lícem navrch, a to i v případě, že dosud nejsou pozorovány na listech žádné symptomy. Přesto již po 24 hodinách se mohou některé symptomy vzácně vyskytovat, jak je uvedeno v následujících pasážích věnovaných přehledu symptomů v klíčových fázích inkubace. Další inkubace probíhá v běžných podmínkách laboratoře z hlediska osvětlení i teploty. Inkubované listy by neměly být vystaveny přímému slunečnímu záření a teplota by neměla dlouhodobě překročit 23 °C. Tím se urychluje autolýza a bakteriální rozklad pletiv. Misky umístěné na povrchu také nadměrně vysychají. I z tohoto důvodu je optimální pokus alespoň jednou denně zkontrolovat a případně doplnit opatrně vodu do misek, kde evidentně vyschl filtrační papír. Hodnocení symptomů se provádí od 3. do 5. dne.

3.4. Hodnocení interakce mezi izolátem a diferenciacními klony

3.4.1. Očekávaný postup infekce a příznaky v průběhu inkubace

Od třetího do pátého dne inkubace se projevují příznaky interakcí mezi izolátem a listem bramboru. Závěrem hodnocení je rozhodnutí o tom zda je izolát virulentní či avirulentní vůči danému genu rezistence. Toto rozhodnutí lze spolehlivě učinit pouze v případě evidentně postupující infekce. Již po 48 hodinách inkubace lze obvykle pozorovat příznaky, které signalizují, že infekce probíhá jak má. V případě absence jakýchkoliv níže uvedených příznaků infekce v čase inkubace nelze rozhodnutí o virulenci či avirulenci spolehlivě vydat. Obrazový přehled očekávaných příznaků je uvedený na konci textové části této kapitoly.

V případě normálně postupující infekce jsou v místě inokulace i při pohledu prostým okem patrné vodnaté až černohnědé tečky (mikronekrózy) o velikosti do 0,5 mm. Tyto nekrózy během třetího dne mohou dle intenzity infekce přetrvávat, nebo se slévat do lokálních suchých či vodnatých nekróz. Vodnatými nekrózami obvykle reaguje klon R9. U interakcí vyúsťujících v hypersenzitivitu dochází k tvorbě tečkových až pavučinkových mikronekróz (typický znak avirulentní interakce s geny *R6* a *R8*) a další postup infekce se zastavuje. V dalších dnech se pak výsledný obraz dále nemění. Velikost nekróz na listu pak odpovídá maximálně 5 % celkové listové plochy. Mezi klony lze v rozsahu nekróz pozorovat určitou variabilitu. Klony REG46E a R9 se obvykle prezentují větším rozsahem nekróz (až 50 % listové plochy), přesto lze na závěr výsledný charakter izolátu hodnotit jako avirulentní. U interakcí s virulentními izoláty nejsou tmavé nekrózy zpočátku patrné, pouze se objevují vodnaté mikronekrózy, které se s postupem infekce šíří na větší plochu listu a podle stáří mohou postupně plošně nebo nitkovitě nekrotizovat.

Vlastním momentem rozhodujícím o virulenci či avirulenci je schopnost patogenu vytvářet zoosporangiofory v místech mimo inokulační zóny, ať již na vnější či na vnitřní straně listů. Zadina a Jermoljev (1976) uvádějí, že se u náchylných klonů sporangiofory musejí objevovat v hojném množství na rozhraní zdravých a zasažených pletiv. V případě jednotlivého výskytu sporangioforů v místě inokulační zóny jde o saprofytismus, který se nedá chápat jako projev náchylnosti. S celkovým hodnocením lze souhlasit, nicméně je nutné uvést, že ke druhé situaci za podmínek popsaných výše obvykle nedochází (nebylo pozorováno). V případě postupující infekce byla vždy sporulace buď intenzivní, nebo nulová.

3.4.2. Doporučený postup hodnocení a zaznamenávání pozorování

Pro hodnocení interakce izolátu s genem rezistence v průběhu a na konci inkubace je třeba mít k dispozici stereoskopický mikroskop (stolní binokulární lupu), optimálně s velkým zorným polem a jemným zaostřováním. Pro hodnocení je optimální dvacetinásobné zvětšení, které dává dobrý přehled o situaci na listu při celkově vyhovující hloubce ostrosti a velikosti zorného pole. Větší zvětšení není nutné, spíše naopak činí pozorování náročnější na manipulaci s materiálem. Hodnocení je třeba zaznamenávat, k čemuž lze použít návrh formuláře uvedený v tabulce 3.

Tabulka 3: Vzor formuláře s ukázkou záznamu možného vývoje experimentu

Č. j.	Izolát	R0	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	SM	REG
1 ^a	xxx	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/0	+/+	+/0	+/0	+/0	+/+	+/0	+/0
2 ^b	yyy	+/+	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/0	+/+	+/0	+/0	+/+	+/+	+/0	+/0
3 ^c	zzz	-/-	-/-	-/-	-/-	+/0	-/-	+/0	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-

Pozn. **a)** očekávaný, úplný a konečný záznam nevyžadující revizi, **b)** očekávaný avšak neúplný záznam, který vyžaduje revizi interakce izolátu se dvěma klony (R1 a R4), **c)** neočekávaný výsledek, který naznačuje chybu v průběhu experimentu, kdy je třeba revidovat celou variantu.

Znaménka plus a minus v různých barevných provedeních představují hodnocení probíhající infekce v průběhu třetího dne inkubace (červený záznam před lomítkem) a projev sporulace (černý záznam za lomítkem). Virulenci izolátu představuje záznam +/+, který znamená pozitivní průběh infekce doprovázený sporulací v obou opakováních. Avirulenci izolátu představuje záznam +/0, jelikož přes primárně postupující infekci došlo k zastavení vývoje a nepřítomnosti sporulujícího mycelia v obou opakováních. První řádek v tabulce představuje situaci, kdy je hodnocení úplné bez nutnosti některé interakce revidovat. Standardní záznam virulence izolátu identifikující jej ke konkrétní virulentní rase je R1.2.3.4.5.7.11. Ve druhém řádku jsou dvě políčka označená zeleně. Zde je indikován problém, kdy u dvou interakcí nebyl zaznamenán primární vývoj infekce ani v jednom opakování. V tomto případě je nezbytné realizovat pro oba předmětné geny rezistence opakování s novou inokulační suspenzí jako dodatečné hodnocení. Třetí řádek představuje situaci, kdy přesto, že podmínky inokulace a inkubace popsané výše byly dodrženy, se infekce nevyvíjí standardně a celá varianta vyžaduje revizi. Tato situace nastává až u 10 % hodnocených izolátů a zdroj chyby není zcela jasný. V případě zopakování s novým izolátem mohou nastat dvě situace. Buď je dosaženo nápravy a jednalo se o

poruchu klíčivosti zoospor a sporangií v konkrétní kultuře izolátu (chyba misky), nebo je dosaženo stejně nejasného výsledku a chyba je na straně izolátu patogenu jako takového (chyba kultury). Andrivon *et al.* (2011) popisují výrazné změny virulence u dlouhodobě udržovaných izolátů *P. infestans* rozesílaných pro účely kruhových testů laboratoří, které způsobovaly značnou varianci výsledků hodnocení jednoho izolátu různými pracovišti na stejné diferenciační sadě. Domníváme se, že se jedná o podobný fenomén, který má danou genetickou povahu již na počátku při izolaci patogenu, kdy izolát prosperuje v umělé kultuře a postupně ztrácí své parazitické schopnosti v důsledku akumulace mutací a selekce. Při opakovaném neúspěšném hodnocení potom nelze izolát spolehlivě charakterizovat a je třeba jej z testovaného souboru pro tuto chvíli vyloučit s nulovým záznamem. Řešením může být zpětná kultivace na přirozeném nerezistentním hostiteli a následný převod do *in vitro* podmínek, čímž se obnoví schopnost parazitického způsobu života.

Tabulka 4: Přehled symptomů po 48 hodinách od inokulace



Bezpříznakovost v inokulační zóně. Tato situace může být spojena s neinfekčností inokulační suspenze, případně zpomaleným působením patogenu. V takovém případě se dostaví některé z výše popsaných symptomů následující den. Často se vyskytuje u klonů R10 a R11.

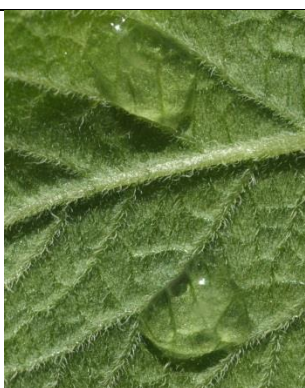


Chloróza v inokulační zóně. Je typickým symptomem pro klon R6 a R8. Na obrázku lze pozorovat též mikronekrózy jako reakci na působení zoospor v případě avirulentního izolátu.

Mikronekrózy v inokulační zóně. Mikronekrózy jsou reakcí pletiv na klíčící zoospory či sporangia. V případě avirulentního izolátu přetrvávají a jejich okolí postupně nekrotizuje, u virulentního izolátu mikronekrózy expandují, slévají se a vytvářejí vodnatou lézi. Jedná se o žádaný projev indikující postupující infekci.



Tabulka 5: Přehled symptomů na konci pětidenního cyklu hodnocení



Bezpříznakovost v inokulační zóně. Je důsledkem nefunkční inokulační suspenze. Může vzácně postihnout jednotlivé listy ale spíše celý diferenciační set. Nastává také v případě, že je inokulační suspenze chudá na zoosporangia. Z tohoto důvodu doporučujeme slabě infekční suspenzi z testu vyloučit a testovat ji až v dalším týdnu. Na klonu R0 je nežádoucí a indikuje nějakou chybu vyžadující revizi.



Mikronekrózy v inokulační zóně. V inokulační zóně se vyskytují mikronekrózy, postiženo je tedy maximálně 1% listové plochy. Často je doprovázeno chlorózou. Absence rozsáhlých nekrotických oblastí indikuje zastavení dalšího šíření patogenu. Výskyt vodnatosti nemusí znamenat další šíření v případě, že nedochází ke sporulaci v následujících dvou dnech.



Absence sporangioforů na listu. V případě normálně probíhající infekce, kdy se vyskytnou lokální nekrózy v inokulační zóně či plošné nekrózy v jejich nejbližším sousedství, tento stav hodnotíme jako absenci virulentního faktoru. Běžně se vyskytuje u somatického hybridu nesoucího *Rpi-blb1* gen. U jiných klonů není typický a obvykle dojde ke sporulaci v následujících dnech.



Sporangiofory hojně prorůstají na povrchu listů. Tato situace vypovídá o přítomnosti virulentního faktoru překonávajícího daný gen rezistence. Izolát označíme příslušným číslem genu rezistence, který byl překonán. Tento typ příznaku je vždy očekávaný na genotypu R0.

3.5. Konkrétní šlechtitelské využití popsaných postupů

Návod v kapitolách 3.1. až 3.4. lze beze změny využít pro izolaci a charakterizaci místních izolátů *P. infestans* a dlouhodobému monitorování vývoje v populaci patogenu. Výsledky sledování virulence v letech 2011 – 2016 ukazují poměrně vysokou stabilitu výskytu ras virulentních k většině genů rezistence ze *Solanum demissum*. Z hodnocení však také vyplývá, že geny R8, R9 a *Rpi-blb1* v této době nejsou naprostou většinou izolátů překonávány a vysokou úroveň odolnosti zakládají i v polních pokusech. To dává naději na šlechtitelské využití klonů z diferenciacní sady pro vývoj odrůd s vyšším stupněm rezistence založené právě na těchto genech. Zdrojem rezistence na bázi genů odvozených ze *S. bulbocastanum* jsou například odrůda Bionica a Toluca. Materiál REG46E jakožto somatický hybrid vykazuje bohužel nízkou reprodukční vitalitu (sterilitu) a je tedy dosud velmi vzdálen kulturnímu ideotypu.

Další úrovní využití, kterou metodika nabízí, je příprava izolátů pro provokační laboratorní test rezistence. Ten vyžaduje izolát patogenu prověřený na zastoupení virulentních faktorů, kterými je testována připravenost genotypu křížence v novošlechtění. Komplexnější izoláty jsou vhodné, zejména spojují-li běžně se vyskytující virulentní faktory. Izoláty pro budoucí využití v laboratorním testování rezistence je třeba dlouhodobě udržovat a množit ve větším měřítku tak, aby byly v případě potřeby dostupné v požadovaném množství.

Další způsob využití výše popsané metody je založení a hodnocení laboratorního testu rezistence genotypů v novošlechtění. Ten lze aplikovat již v rané fázi šlechtění buď jako hlavní selekční kritérium nebo doplňující selekční kritérium. Test jako hlavní kritérium umožňuje navýšení vstupního počtu kombinací novošlechtění a zvýšení přísnosti selekce. I při navýšení množství semenáčů tak nemusí být v zásadě mimořádně navyšována četnost potomstev v následných generacích nad běžnou hranici. Jako doplňující kritérium, test spíše zpřesňuje a konkretizuje informaci o způsobu založení odolnosti v pozdější fázi selekce v souvislosti s tvorbou popisu odrůdy. V této souvislosti předpokládáme značnou efektivitu zejména při šlechtitelském využití výše zmíněných major genů rezistence. Vlastní založení pokusu odpovídá základním metodickým požadavkům v kapitole 3.3. a 3.4., kdy je vhodné všechny genotypy testovat co nejkomplexnějším izolátem patogenu, případně několika izoláty kombinujícími maximum virulentních faktorů. Aby bylo vyhověno požadavku na opakování, a tedy spolehlivost testů, je možno použít Petriho misek s větším průměrem a umístit do nich 2 – 3 listy testovaného

genotypu. Kultivační podmínky, a principy hodnocení jsou shodné; rezistentní genotyp zamezuje rozvoji patogenu a sporulaci

4. Srovnání novosti postupů

Vlastní testování virulence má dlouhou tradici sahající až do padesátých let dvacátého století. Metody se v hrubých rysech výrazně nemění, ale mění se technické podmínky a dalším prostorem pro inovace jsou nově introdukované geny hypersenzitivní rezistence. Metodika v námi předkládané podobě je originální a vychází z optimalizačních prací realizovaných v rámci projektu MZe ČR číslo QJ1210305 „Integrovaná ochrana proti plísni bramboru v nových agroenvironmentálních podmínkách s využitím prognózy výskytu choroby a na základě nových poznatků o změnách v populacích patogenu a procesech rozkladu hlíz“. Metodika je koncipována tak, aby byla technicky co nejjednodušší a přitom poskytovala spolehlivé a opakovatelné výsledky a současně prověřila virulenci vůči základním genům hypersenzitivní rezistence, které jsou a mohou být v současné době a budoucně šlechtitelsky uplatňovány. Spojujeme tedy ekonomickou nenáročnost a maximální informativnost. Inovativní je v tomto ohledu rozšíření kolekce pro místní testování o gen introdukovaný ze *S. bulbocastanum*, a také o odrůdu Sárpo Mira, která přináší další nové šlechtitelsky zajímavé geny. Jako technický základ pro vlastní práci a vývojový proces byly využity metodiky podle Zadina a Jermoljev (1976), kteří měli k dispozici 6 genů rezistence a další geny v té době byly pouze spekulativní (R7 a R8) a prakticky nejnovější Eucablight technický protokol podle Colon *et al.* (2004). Protokol je určený pro testování v rámci sítě Eucablight a kromě základní skotské diferenační kolekce R0 – R11 zařazuje osm Eucablight standardů. Jedná se však pouze o stručný návod pro již zkušené pracovníky. Také počítá se značným množstvím listového materiálu a opakování pro testy virulence. Námi předkládaná metoda výrazně redukuje množství rostlinného materiálu k testování virulence *P. infestans*, při zachování vysoké opakovatelnosti a spolehlivosti a přináší současně aktuální poznatky v oblasti s cílem přiblížit možnosti využití uvedených postupů širší veřejnosti.

5. Popis uplatnění metodiky

Díky publikaci metodiky se otevírá možnost jejího přímého využití v praxi. Primárními uživateli této metodiky jsou šlechtitelé bramboru, pro které představuje významný zdroj vstupních informací v procesu šlechtění a nástroj rané fáze selekce. Využitelná je též orgány správy v oblasti ochrany rostlin (ÚKZÚZ), instituce zaměřené na poradenství v ochraně rostlin a na zemědělský výzkum. Publikace však má širší potenciál neboť jej lze využít i jako vzdělávací materiál pro posluchače kurzů a vzdělávacích programů v oblasti šlechtění a ochrany rostlin. Propagace metodiky bude podpořena prostřednictvím vzdělávacích programů ČZU zaměřených na šlechtění a ochranu rostlin.

6. Ekonomické aspekty

Vlastní zavedení metodiky do praxe nepředstavuje investiční náklady, za předpokladu, že je možné zajistit inkubaci izolátů *P. infestans* v požadovaných podmínkách. Vlastní materiálové náklady na realizaci experimentů nepřesahují 10 tis. Kč ročně při dodržení všech postupů. Zavedení metodiky přispěje ke zvýšení efektivity šlechtění na rezistenci ve smyslu navýšení počtu testovaných genotypů při zachování stávajících nákladů, neboť laboratorní test rezistence vyloučí neperspektivní genotypy před jejich zařazením do polních testů. Důležitým aspektem je i to, že metodika v této podobě přináší ucelený soubor informací a postupů, a šlechtitel uspoří náklady na vývoj vlastní metodiky, což představuje nároky na finance, práci i čas.

7. Seznam související použité literatury

Aav, A., Skrabule, I., Bimsteine, G., Kaart, T., Williams, I.H., Runno-Paurson, E. 2015. The structure of mating type, metalaxyl resistance and virulence of *Phytophthora infestans* isolates collected from Latvia. *Zemdirbyste*. 102 (2): 335-324.

Andrивon, D. 1994. Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. *Canadian Journal of Botany*. 72 (11): 1681-1687.

Andrивon, D., Avendaño-Córcoles, J., Cameron, A. M., Carnegie, S. F., Cooke, L. R., Corbiere, R., Detourné, D., Dowley, L. J., Evans, D., Forisekova, K., Griffin, D. G., Hannukkala, A., Lees, A. K., Lebecka, R., Niepold, F., Polgar, Z., Shaw, D. S., Thompson, J., Trognitz, B., van Raaij, H. M. G., Zimnoch-Guzowska, E. 2011. Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories. *Plant Pathology*. 60: 556-565.

Black, W. 1951. Inheritance of resistance to blight (*Phytophthora infestans*) in potatoes: inter-relationships of genes and strains. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 64: 312-352.

Bradshaw, J. E., Bryan, G. J., Lees, A. K., McLean, K., Solomon-Blackburn, R. M. 2006. Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) R-gene differentials of black. *Theoretical and Applied Genetics*. 112 (4): 744-51.

Caten, C. E., Jinks J. L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany*. 46: 329-348.

Colon, L., Nielsen, B. J., Darsow, U. 2004. Eucablight protocol – Detached leaf test for foliage blight resistance. Version 1.2. Dostupné z: http://www.eucablight.org/Lib/Eucablight/Protocol/DetachedLeaf_V12.pdf. Revidováno 31. 10. 2016.

El-Kharbotly, A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D. J., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W. J., Salamini, F., Gebhardt, C. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Molecular and General Genetics*. 242: 749-754.

El-Kharbotly, A., Palomino-Sánchez, C., Salamini, F., Jacobsen, E., Gebhardt, C. 1996. R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*. 92 (7): 880-884.

Flier, W. G., Kroon, L. P. N. M., Hermansen, A., van Raaij, H. M. G., Speiser, B., Tamm, L., Fuchs, J. G., Lambion, J., Razzaghian, J., Andrивon, D., Wilcockson, S., Leifert, C., 2007. Genetic structure and pathogenicity of populations of *Phytophthora infestans* from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom. *Plant Pathology*. 56 (4): 562-572.

Flor, H. H. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*. 45: 680-685.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 275-296.

Huang, S., Van der Vossen, E. A. G., Kuang, H., Vleeshouwers, V. G., Zhang, N., Borm, T. J. A., Van Eck, H. J., Baker, B., Jacobsen, E., Visser, R. G. F. 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. *The Plant Journal*. 42: 251-261.

Jo, K. R. 2013. Unveiling and deploying durability of late blight resistance in potato from natural stacking to cisgenic stacking. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Jo, K. R., Arens, M., Kim, T. Y., Jongsma, M. A., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Vossen, J. H. 2011. Mapping of the *S. demissum* late blight resistance gene *R8* to a new locus on chromosome IX. *Theoretical and Applied Genetics*. 123 (8): 1331-1340.

Jo, K. R., Visser, R. G., Jacobsen, E., Vossen, J. H. 2015. Characterisation of the late blight resistance in potato differential MaR9 reveals a qualitative resistance gene, R9a, residing in a cluster of Tm-2 (2) homologs on chromosome IX. *Theoretical and Applied Genetics*. 128 (5): 931-41.

Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F., Gebhardt, Ch. 1992. The R1 gene conferring race specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Molecular and General Genetics*. 233: 278-83.

Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S. J., Salamini, F., Gebhardt, Ch. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plants species. *Genetics*. 137: 67-77.

Lapwood, D. H. 1961. Laboratory assesment of the susceptibility of potato halm to bligh (*Phytophthora infestans*). *European Potato Journal*. 4: 117-126.

Lam, E., Pontier, D., Del Pozo, O. 1999. Die and let live - programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2 (6): 502-507.

Li, X., Van Eck, H. J., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Huigen, D. J., Stam, P., Jacobsen, E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theoretical and Applied Genetics*. 96: 1121-1128.

Mastenbroek, C. 1952. Investigations into the inheritance of the immunity from *Phytophthora infestans* de B. of *Solanum demissum* Lindl. *Euphytica*. 1952 (1): 187-198.

McKee, R. K. 1964. Observations on infections by *Phytophthora infestans*. *Transaction of the British Mycological Society*. 47 (3): 365-374.

Oberhagemann, P., Chatot-Balandras, C., Schäfer-Pregl, R., Wegener, D., Palomino, C., Salamini, F., Bonnel, E., Gebhardt, Ch. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Molecular breeding*. 5: 399-415.

Rietman, H., Bijsterbosch, G., Cano, L. M., Lee, H. R., Vossen J. H., Jacobsen, E., Visser, R. G., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. 2012. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Molecular Plant and Microbe Interaction*. 25 (7): 910-919.

Runno-Paurson, E., Hannukkala, A., Williams, I., Koppel, M., Mand, M. 2012. The structure of mating type, virulence, metalaxyl resistance of *Phytophthora infestans* in a long-term phenotypic study in distinct location in Eastern Estonia. *Journal of Plant Disease and Protection*. 119 (2): 45-52.

Pilet, F., Pelle, R., Ellisseche, D., Andrivon, D. 2005. Efficacy of the R2 resistance gene as a component for the durable management of potato late blight in France. *Plant Pathology*. 54 (6): 723-732.

Savazzini, F., Galletti, S. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of Italian *Phytophthora infestans* isolates. *Phytopathologia Mediterranea*. 54 (3): 524-530.

Škodáček, Z., Sedlák, P. 2009. The study of resistance of selected clones of *Solanum bulbocastanum* against *Phytophthora infestans*. 9th Scientific and technical seminar on seed and seedlings. 132-137.

Sedláková, V. 2010. Tvorba a molekulární detekce somatických hybridů bramboru s vyšší odolností k plísni bramboru. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Česká republika.

Sedláková, V., Sedlák, P., Vejl, P., Domkářová, J., Horáčková, J., Škodáček, Z. 2009. Characterisation of selected diploid genetic resources of genus *Solanum* intended for somatic hybridization with potato dihaploids. *Agriculture*. 55 (1): 17-25.

Song, J., Bradeen, J. M., Naes, K. S., Raascg, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin – Phillips, S., Buell, C. R., Helgesson, J. P., Jiang, J. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 100 (16): 9128-9133.

Tomczyńska, I., Stefańczyk, E., Chmielarz, M., Karasiewicz, B., Kamiński, P., Jones, J. D., Lees A. K., Sliwka, J. 2014. A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*. 127 (3): 647-657.

Van der Poppel, P. M., Huigen, D. J., Govers, F. 2009. Differential recognition of *Phytophthora infestans* races in potato R4 breeding lines. *Phytopathology*. 99 (10): 1150-1155.

Verzaux, E. 2010. Resistance and susceptibility to late blight in *Solanum*: gene mapping cloning and stacking. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

Vossen, J. H., van Arkel, G., Bergervoet, M., Jo, K. R., Jacobsen, E., Visser, R. G. 2016. The *Solanum demissum* R8 late blight resistance gene is an Sw-5 homologue that has been deployed worldwide in late blight resistant varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 129 (9): 1785-1796.

Zadina, J., Jermoljev, E. 1976. Šlechtění bramboru. Academia, Praha. 359 s.

Zrzavý, J., Storch, D., Mihulka, S. 2006. Jak se dělá evoluce: od sobeckého genu k rozmanitosti života. Paseka. Praha. 296 s. ISBN 80-7185-578-2.

8. Seznam publikací, které předcházely metodice

Mazáková, J., Táborský, V., Zouhar, M., Ryšánek, P., Hausvater, E., Doležal, P. 2006. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic. *Plant Protection Science*. 42: 41-48.

Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Táborský, V., Hausvater, E., Doležal, P. 2010. Mating type distribution of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic in 2007 and 2008. *Plant Protection Science*. 46 (3): 89-97.

Sedláková, V. 2010. Tvorba a molekulární detekce somatických hybridů bramboru s vyšší odolností k plísni bramboru. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Česká republika.

Sedláková, V., Sedlák, P., Vejl, P., Domkářová, J., Horáčková, J., Škodáček, Z. 2009. Characterisation of selected diploid genetic resources of genus *Solanum* intended for somatic hybridization with potato dihaploids. *Agriculture*. 55 (1): 17-25.

Škodáček, Z., Sedlák, P. 2009. The study of resistance of selected clones of *Solanum bulbocastanum* against *Phytophthora infestans*. 9th Scientific and technical seminar on seed and seedlings. 10th February 2009. Czech University of Life Sciences Prague. 132-137.



Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Hroznová 2, 656 06 Brno

v y d á v á O S V Ě D Ě Č E N Í

(UKZUZ 004073/2017)

o uznání certifikované metodiky

v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumných organizací a hodnocení výsledků ukoučených programů (platné pro léta 2013 až 2016)“

Název metodiky: **METODIKA STANOVENÍ VIRULENCE IZOLÁTŮ
Phytophthora infestans (MONT.) DE BARY K VÝZNAMNÝM
MAJORGENŮM REZISTENCE V NÁVAZNOSTI NA JEJICH
NÁSLEDNÉ VYUŽITÍ VE ŠLECHTĚNÍ BRAMBORU**

Autoři: **Ing. Petr Sedlák, Ph.D.; Doc. Dr. Ing. Pavel Vejl;
Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.; Ing. Jana Mazáková, Ph.D.;
Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.; Ing. Ervín Hausvater, CSc.;
Ing. Petr Doležal, Ph.D.**

Název organizace: **ČZU v Praze; Výzkumný ústav bramborářský Havl. Brod, s.r.o.**

Místo vydání metodiky: **ČZU v Praze, Katedra genetiky
Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchdol**

Rok vydání metodiky: **2016**

ISBN: **978-80-213-2728-3**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe ČR NAZV QJ1210305 „Integrovaná ochrana proti plísni bramboru v nových agroenvironmentálních podmínkách s využitím prognózy výskytu choroby a na základě nových poznatků o změnách v populacích patogenu a procesech rozkladu hlíz“.

Projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“ ANO/NE*. V případě, že projekt využívá „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví a rybolovu“, je výsledek typu N_{met} zdarma k dispozici všem zájemcům na webové stránce <http://metodiky.agrobiologie.cz>

Brno 13. ledna 2017

Razítko odborného orgánu státní správy:

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy: Ing. Daniel Jurečka

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ředitel

Podpis zástupce odborného útvaru státní správy:

Souhlas Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

Datum a podpis ředitele/ředitelky odboru:

Razítko