

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



***Peronospora destructor* (plíseň česnekovitých)**

Bakalářská práce

Vendula Dostálová

Biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.

Olomouc 2023

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Boženy Sedlákové, Ph.D. a to pouze na základě citované literatury a vlastních výsledků.

V Olomouci dne 25. 7. 2023

.....
Vendula Dostálová

Poděkování

Ráda bych moc poděkovala mé vedoucí práce RNDr. Boženě Sedlákové, Ph.D. za návrh zajímavého tématu, za cenné rady a za pomoc při pokusech s očkováním plísně. Rovněž děkuji Mgr. Barboře Machalové za pomoc při pokusech. Velký dík patří i mé rodině a přátelům, kteří mě při zpracování této bakalářské práce podporovali.

Výsledky získané v praktické části této bakalářské práce byly řešeny v rámci projektů IGA UP PŘF 2022-001 a IGA UP PŘF 2023-002.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Vendula Dostálová

Název práce: *Peronospora destructor* (plíseň česnekovitých)

Typ práce: Bakalářská

Vedoucí práce: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2023

Počet stran: 56

Počet příloh: 8

Jazyk: Český

Abstrakt: Tato bakalářská práce se zabývá biotrofním patogenem *Peronospora destructor*, který napadá rostliny čeledi česnekovité (Alliaceae). *P. destructor* představuje velký problém pro hospodářsky významné rostliny jako je cibule kuchyňská (*Allium cepa*). Za vhodných klimatických podmínek totiž může způsobovat významné ztráty na úrodě. Literární část této práce pojednává o klasifikaci, taxonomii, evoluci a fylogenetických vztazích patogenu *P. destructor*. Dále jsou zde popsány ekologické nároky pro různá životní stadia patogenu, hostitelský okruh patogenu a jeho výskyt ve světě. Rovněž jsou zde zmíněny možnosti ochrany před patogenem *P. destructor* ve formě fungicidních přípravků, ale i jiné alternativní způsoby ochrany jako například užití esenciálních olejů. Také je zde zmíněna metodika kultivace biotrofních patogenů v laboratorních podmínkách. Praktická část se zabývá kultivací patogenu *P. destructor* ve třech různých podmínkách prostředí (režimech), v nichž byl patogen kultivován dvěma způsoby: na segmentech listů cibule kuchyňské uložených v Petriho miskách a na celých rostlinách cibule uložených v plastových boxech. První režim kultivace vycházel z metodiky pro kultivaci patogenu *P. destructor*. Druhý režim byl navržen podle metodiky pro kultivaci patogenu *Pseudoperonospora cubensis* a třetí podle metodiky kultivace patogenu *Bremia lactucae*. Ve všech třech režimech došlo k infekci a následné sporulaci patogenu jak na segmentech cibule, tak na celých rostlinách. Pouze na rostlinách z druhého režimu kultivace nebyla prokázána infekce a sporulace patogenu *P. destructor*.

Klíčová slova: cibule kuchyňská, *Allium cepa*, Peronosporaceae, biotrofní patogen, kultivace, očkování

Bibliographical identification

First name and surname of the author: Vendula Dostálová

Title of the thesis: *Peronospora destructor* (downy mildew of onion)

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Number of pages: 56

Number of appendices: 8

Language: Czech

Abstract: This bachelor's thesis deals with the biotrophic pathogen *Peronospora destructor*, which hosts are plants of the Alliaceae family. *P. destructor* represents a significant problem for economically important plants such as the onion (*Allium cepa*). Under suitable climatic conditions, it can cause substantial crop losses. The research part of this thesis discusses the classification, taxonomy, evolution, and phylogenetic relationships of the pathogen *P. destructor*. Furthermore, there are described the ecological requirements for different life stages of the pathogen, its host range, and its distribution worldwide. There are also mentioned control options for management of the pathogen, including the use of fungicides and alternative methods like using essential oils. The methods for cultivating biotrophic pathogens in laboratory conditions are also mentioned. The experimental part focuses on cultivating the *P. destructor* pathogen under three different environmental conditions (regimes). The pathogen was cultivated on onion leaf segments placed in Petri dishes and on whole onion plants stored in plastic boxes. The first cultivation regime followed the methodology for cultivating the *P. destructor* pathogen. The second regime was designed based on the methodology for cultivating the *Pseudoperonospora cubensis* pathogen, while the third followed the methodology for cultivating the *Bremia lactucae* pathogen. In all three regimes, infection and subsequent sporulation of the *P. destructor* pathogen occurred on both onion leaf segments and plants. However, only the plants in the second cultivation regime did not show evidence of infection and sporulation by the pathogen.

Keywords: common onion, *Allium cepa*, Peronosporaceae, biotrophic pathogen, cultivation, inoculation

Obsah

Seznam zkratk	1
Cíle práce.....	2
Úvod	3
LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	4
1. Klasifikace.....	4
1.1 Charakteristika oddělení Oomycota	4
1.2 Charakteristika čeledi Peronosporaceae	5
2. Taxonomie, fylogeneze a evoluce	7
2.1 Historie jména <i>Peronospora destructor</i>	7
2.2 Fylogenetické podskupiny downy mildews	7
2.3 Evoluce biotrofních patogenů čeledi Peronosporaceae	7
3. Charakteristika patogenu <i>Peronospora destructor</i>	10
3.1 Hostitelský okruh.....	10
3.2 Příznaky napadení.....	10
3.3 Životní cyklus a ekologické nároky.....	11
3.3.1 Infekce hostitele pomocí nepohlavních sporangií.....	11
3.3.2 Sporulace.....	12
3.3.3 Uvolnění a rozšíření sporangií	12
3.3.4 Pohlavní oospory	14
3.4 Výskyt.....	15
4. Ochrana před patogenem <i>Peronospora destructor</i>	17
4.1 Praktické předcházení infekce	17
4.2 Chemická ochrana	17
4.2.1 Typy a účinky fungicidů	17
4.2.2 Účinnost některých fungicidních přípravků.....	18
4.2.3 Integrovaný management patogenu <i>P. destructor</i>	19
4.3 Jiné formy ochrany	20
5. Kultivace biotrofních patogenů	22
PRAKTICKÁ ČÁST	23
6. Materiál a metodika.....	23

6.1 Rostlinný materiál a očkovaný (inokulovaný) izolát <i>P. destructor</i>	23
6.2 Očkování (inokulace) patogenu <i>P. destructor</i> na cibuli kuchyňskou.....	23
6.3 Kultivace patogenu <i>P. destructor</i> na cibuli kuchyňské	24
6.4 Odběr a uchování vzorků k mikroskopování a hodnocení příznaků nakažení cibule kuchyňské patogenem <i>P. destructor</i>	25
6.5 Příprava mikroskopických preparátů a mikroskopování	26
7. Výsledky.....	27
7.1 Vizuelní vyhodnocení příznaků nakažení.....	27
7.2 Mikroskopické vyhodnocení	28
8. Diskuze a závěr	32
LITERATURA	35
PŘÍLOHY	44

Seznam zkratek

DM	downy mildew/s
DPI	days past inoculation (dní po inokulaci)
D1, D2, D3	disky (segmenty) cibule kuchyňské kultivované v režimu 1, 2, 3
Pd	<i>Peronospora destructor</i>
R1, R2, R3	rostliny cibule kuchyňské kultivované v režimu 1, 2, 3

Cíle práce

V literární části této práce je mým cílem provést rešerši na téma *Peronospora destructor* (plíseň česnekovitých). Rešerše bude provedena na základě dostupných vědeckých článků a textů týkajících se konkrétně biotrofního patogenu *P. destructor*, ale i čeledi Peronosporaceae či oddělení Oomycota, do kterých *P. destructor* systematicky patří. V této práci se budu zabývat evolučními, taxonomickými či ekologickými aspekty. Rovněž se zaměřím na ochranu rostlin před plísní česnekovitých a jak předcházet napadení rostlin tímto patogenem.

V praktické části popíšu pokus, při kterém jsem očkovala sporangia patogenu *P. destructor* na listy cibule kuchyňské (*Allium cepa*) a následně jsem je uchovávala ve třech různých podmínkách prostředí. Zajímalo mě, zda v rozdílných podmínkách dojde k infekci a následné produkci nových sporangií (sporulaci) patogenu.

Úvod

Peronospora destructor česky označovaná jako plíseň česnekovitých (anglicky downy mildew of onion) je biotrofní patogen, který v roce 1841 poprvé popsal britský fytopatolog M. J. Berkeley (Wakefield a Moore, 1936). Jedná se o houbám podobný organismus, který parazituje v rostlinných pletivech rostlin z čeledi česnekovitých (Alliaceae), ze kterých získává potřebné živiny k vlastnímu růstu a tvorbě rozmnožovacích struktur. Životní cyklus této plísně je rozdělen na nepohlavní a pohlavní fázi. V nepohlavním stádiu se patogen rozmnožuje pomocí konidiosporangií (též jen sporangií) několikrát za sezónu (Dick, 2001). Na konci sezóny většinou tento patogen začne produkovat pohlavní oospory, díky kterým je tento organismus schopen přežít v klidové fázi do začátku další sezóny (Watanabe a Syobu, 2022). Na životní cyklus mají významný vliv klimatické podmínky prostředí. Patogen prosperuje v chladných a vlhkých podmínkách a při teplotách kolem 10 až 12 °C (Ankita et al., 2020). Když jsou patogenu zajištěny tyto podmínky, může způsobit významné hospodářské škody. Výskyt tohoto patogenu je zaznamenán na všech světadílech kromě Antarktidy (CABI, 2008). K ochraně před tímto patogenem se používá velké množství fungicidních přípravků. Problémem je to, že se většinou tyto přípravky nadměrně aplikují a výrazně tak znečišťují půdu a podzemní vodu. Proto bylo představeno několik předpovědních modelů (DOWNCAST, Jespersen a Sutton, 1987; ZWIPERO, Friedrich et al., 2003 a další), které na základě počasí predikují možnou infekci patogenu *P. destructor* a doporučují, kdy aplikovat fungicidní přípravky, aby nedocházelo k jejich plýtvání. V poslední době se výzkum zaměřuje na jiné formy („nechemické“) ochrany. Jako účinná ochrana se projevily některé esenciální oleje (Githaiga et al., 2018), antagonistické mikroorganismy (Shahin, 2017), kyselina arachidonová (Yarovoy et al., 2006) a další.

Tato bakalářská práce více rozvádí výše zmíněná témata a v praktické části je popsán pokus, při kterém jsem očkovala (inokulovala) sporangia patogenu *P. destructor* na listy cibule kuchyňské (*Allium cepa*). Očkovala jsem segmenty listů cibule a rovněž celé rostliny. Následně jsem je uchovávala ve třech různých podmínkách prostředí a sledovala projevy nakažení. Abych si ověřila, zda došlo k infekci a sporulaci patogenu, sledovala jsem vzorky z naočkovaných cibulí pod mikroskopem.

LITERÁRNÍ REŠERŠE

1. Klasifikace

Peronospora destructor patří do čeledi Peronosporaceae, která je řazena do řádu Peronosporales, podtřídy Peronosporomycetidae, třídy Oomycetes (syn. Peronosporomycetes) a oddělení Oomycota (syn. Peronosporomycota). Oomycota patří do říše Stramenopila (syn. Chromista), která je součástí superskupiny SAR (Stramenopila, Alveolata, Rhizaria). Oddělení Oomycota je největší a nejkompexnější skupinou z říše Stramenopila (Beakes et al., 2014).

P. destructor je součástí skupiny eukaryotických organismů, která se označuje jako houbám podobné organismy. V minulosti se pro tuto skupinu používal název Fungi Imperfecti (houby nedokonalé). Ačkoliv se u skupiny Oomycota vyvinuly podobné vlastnosti, jako mají pravé houby – třeba osmotrofní výživa nebo výskyt hyf, od pravých hub se liší několika zásadními vlastnostmi (Beakes a Thines, 2017). Jako příklad uvedu několik hlavních rozdílů. Zásobní látkou hub je glykogen. Oomycota využívají jako zásobní látku mykolaminaran (β -1,3-glukan). Oomycota rovněž postrádají acyklické alkoholy, které jsou u hub naopak hojné a též jsou organismy z oddělení Oomycota schopny syntetizovat některé lipidy, které se nevyskytují u pravých hub (Kalina a Váňa, 2005). Buněčná stěna organismů skupiny Oomycota sestává z gluknanů a malého množství hydroxyprolinu a celulózy (Borkar a Ajayasree, 2020), zatímco buněčná stěna u hub je složena z chitinu a minimálního množství celulózy. Buňky vegetativní stélky oddělení Oomycota jsou diploidní, kdežto buňky vegetativní stélky hub jsou haploidní nebo dikaryotické (Rossman a Palm, 2006).

Rod *Albugo* byl popsán v roce 1806, což ho činí prvním popsáným rodem z oddělení Oomycota. Třicet jedna let poté, tedy v roce 1837 byl popsán rod *Peronospora* (Thines et al., 2009a). Nejvíce druhů zastoupených ve třídě Oomycetes, kterých je asi 400, má právě rod *Peronospora* (Thines a Choi, 2016; Constantinescu, 1992).

1.1 Charakteristika oddělení Oomycota

Oomycota, Peronosporomycota, Oomycety, „plísně vaječné“ či řasovky jsou názvy, pod kterými můžeme najít v odborné literatuře informace o rozsáhlém oddělení, do kterého se řadí *P. destructor*. Název Oomycota tato skupina získala díky typu pohlavního rozmnožování – oogamii. Při sexuálním rozmnožování většiny zástupců splývají samičí oosféry a samčí pohlavní buňky. Samičí pohlavní orgány se nazývají oogonia (obsahují jednu nebo více oosfér) a samčí pohlavní orgány jsou antheridia (např. Beakes a Gay, 1977). Typickým znakem pro skupinu je tvorba nepohlavních biflagelátních (dvoubičíkatých) zoospor, avšak u mnoha zástupců se tyto spory vůbec nevyskytují (Borkar a Ajayasree, 2020). Do tohoto oddělení jsou

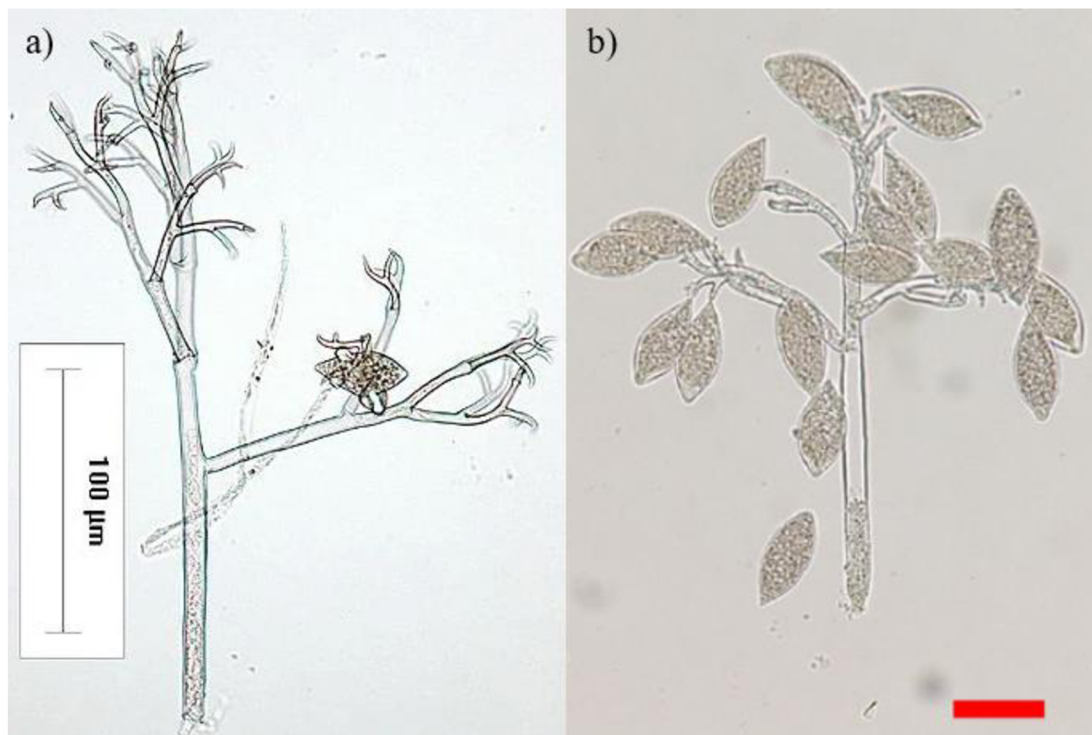
zařazeny organismy, které žijí saprofyticky nebo paraziticky (fakultativně i obligátně) a vyskytují se jak ve vodních prostředích, tak i na suchu (Kalina a Váňa, 2005).

Tato skupina je studována zejména kvůli tomu, jelikož do ní patří velké množství parazitů, kteří napadají jak rostlinné druhy, tak i zvířata. Tyto patogenní organismy významně ovlivňují přirozené ekosystémy, ale zejména zemědělské kultury, na kterých způsobují velké ekonomické ztráty (Beakes a Thines, 2017).

Vegetativní stélka obligátně parazitických patogenů je většinou drobná, jednobuněčná a žije uvnitř protoplastu hostitele (endobioticky; Kalina a Váňa, 2005). Stélka většinou tvoří větvené vláknité mycelium bez přehrádek (Beakes a Thines, 2017). Stélka buď prorůstá mezibuněčnými prostory hostitele, jde tedy o intercelulární typ stélky anebo roste přímo v buňce hostitele, což se označuje jako intracelulární stélka. Vzhledem ke vzniku pohlavních orgánů existují tři typy stélek: eukarpní, monocentrická a holokarpní. Když se pouze část vegetativní stélky přemění v pohlavní struktury, jedná se o stélku eukarpní. Stélka dávající vznik pouze jednomu sporangiu se nazývá monocentrická. Holokarpní stélka se celá promění v rozmnožovací strukturu. Parazitičtí zástupci na svých myceliích tvoří haustoria, pomocí kterých se ukotvují v buněčné stěně buněk hostitelského druhu (Kalina a Váňa, 2005).

1.2 Charakteristika čeledi Peronosporaceae

Tato čeleď zahrnuje zejména skupinu biotrofních parazitů nazývanou „downy mildews“, ale i druhy, které dříve patřily do čeledi Pythiaceae (Beakes a Thines, 2017). Pro čeleď Peronosporaceae jsou charakteristické následující znaky. Mycelium roste mezibuněčně a vytváří velká laločnatá haustoria. Rozmnožují se pomocí nepohlavních opadavých konidiosporangií (též jen sporangií, obrázek 1), která jsou následně roznášena větrem na další hostitelské rostliny. Sporangia rostou na konci větví konidioforů (sporangioforů). Sporangiofory jsou dichotomicky větvené a jsou umístěny na pedicelách (Dick, 2001). Způsob větvení sporangioforů je jeden z hlavních determinačních znaků skupiny DM (Borkar a Ajayasree, 2020). V současnosti se však upouští od určování patogenů pomocí tvaru sporangií a sporangioforů a spíše se hodnotí tvar haustorií, zbarvení sporangií a mikromorfologické znaky (Voglmayr et al., 2004; Thines, 2006; Thines et al., 2009a). Sporangiofory mají ukončený růst. To znamená, že po té, co dosáhnou určité délky (dospělosti), začnou se na koncích větví sporangioforů tvořit sporangia. Sporangia mají oválný tvar podobný tvaru citrónu (Borkar a Ajayasree, 2020). Ačkoliv je pro ostatní organismy z oddělení Oomycota typická tvorba zoospor, u rodu *Peronospora* se zoospor nevytvářejí (Kalina a Váňa, 2005).



Obrázek 1: Sporangiofory a sporangia patogenu *Peronospora destructor*. a) Autor: P. Varma, b) Měřítka: 50 µm. Převzato z Watanabe a Syobu (2022).

Mezi DM patří velmi diverzifikované organismy, které obligátně parazitují z valné většiny na vyšších dvouděložných rostlinách (Eudicota). Druhově nejbohatší jsou skupiny patogenů, které parazitují na čeledích hvězdnicovité (Asteraceae), brukvovité (Brassicaceae), hvozdíkovité (Caryophyllaceae), bobovité (Fabaceae), brutnákovité (Boraginaceae), hluchavkovité (Lamiaceae), makovité (Papaveraceae), pryskyřníkovité (Ranunculaceae) a růžovité (Rosaceae; Constantinescu, 1992). Právě kvůli svým nežádoucím vlivům na hospodářské plodiny, jsou tyto patogeny hojně studovány, v posledních letech hlavně v oblasti fylogeneze (Beakes a Thines, 2017).

2. Taxonomie, fylogeneze a evoluce

2.1 Historie jména *Peronospora destructor*

První popis patogenu *P. destructor* provedl britský fytopatolog Miles Joseph Berkeley v roce 1841. Stručně latinsky popsal nepohlavní konidie (sporangia), k popisu připojil ilustraci konidií a plíseň pojmenoval *Botrytis destructor* (Berkeley, 1841; Cook, 1932; Wakefield a Moore, 1936). V roce 1847 ve své práci rovněž popsal sporangia této plísně rakouský botanik a rostlinný fyziolog Franz Joseph Andreas Nicolaus Unger a pojmenoval ji *Peronospora Schleideni* (Wakefield a Moore, 1936). Berkeley následně v roce 1860 přejmenoval *Botrytis destructor* na *Peronospora destructor* Casp.. Není však jasné, proč k názvu připojil jméno německého botanika Johanna Xavera Casparyho. Caspary sice popsal oospory několika jiných druhů Peronospor, ale neexistuje důkaz, že by někdy popsal oospory právě druhu *Peronospora destructor* (Wakefield a Moore, 1936). Rostlinný fyziolog a mykolog Worthington George Smith v roce 1884 jako první popsal pohlavní oospory *P. destructor* a své poznatky doplnil i kresbou těchto oospor. Ve své práci však o *P. destructor* píše jako o *Peronospora Schleideniana* Ung. (Smith 1884; Wakefield a Moore, 1936). Ačkoliv plíseň česnekovitých od svého objevení obdržela několik různých vědeckých jmen, v současnosti se nejhojněji využívá jméno *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. ex Berk..

V České republice se pro patogen *P. destructor* používají jména: plíseň česnekovitých, plíseň cibulová či vřetenatka cibulová (Kůdela et al., 2012).

2.2 Fylogenetické podskupiny downy mildews

V angličtině se velmi často používá termín downy mildews, který odkazuje na zástupce čeledi Peronosporaceae, kteří jsou výlučně obligátní biotrofní parazité. Thines a Choi (2016) ve své práci představují tři monofyletické skupiny rodů, které patří do DM. Jsou to DM s barevnými konidiemi (*Peronospora* a *Pseudoperonospora*), DM s pyriformními haustorií (*Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Novotelnova*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna*, a *Protobremia*) a brukvovité DM (*Hyaloperonospora* a *Perofascia*). Mimo tyto tři hlavní skupiny do DM patří také rody parazitující na travinách (čeleď Poaceae), mezi kterými však dosud nejsou zcela jasné fylogenetické vztahy. V minulosti už tyto patogeny ze skupiny DM rovněž byly rozděleny do stejných podskupin s trochu odlišnými názvy (Göker et al., 2007).

2.3 Evoluce biotrofních patogenů čeledi Peronosporaceae

Dick (2002) předpokládal, že čeleď Peronosporaceae se vyvinula v období křídly. Avšak podle dostupných analýz to vypadá, že patogeny skupiny DM vznikly už v pozdní juře nebo dříve. Nicméně studium raných zástupců této skupiny je velmi složité, protože do dnešní doby

se zachovalo vzhledem ke svému životnímu stylu jen málo fosilních záznamů (Thines, 2014). Rovněž se však předpokládá, že patogeny ze skupin downy mildews a „white blisters“ jsou evolučně mnohem mladší než krytosemenné rostliny (Angiospermae; Taylor et al., 2006; Krings et al., 2011). Skupina „white blisters“ zahrnuje patogeny *Albugo candida* a jeho blízké příbuzné.

Zástupci čeledi Peronosporaceae a to zejména organismy ze skupiny DM jsou vysoce specializovaní parazité, kteří často napadají pouze jeden nebo jen několik druhů příbuzných rostlin. Tyto úzké vztahy parazita a hostitele se vědci snaží vysvětlit pomocí několika evolučních teorií. Thines (2014) tvrdí, že obligátní parazitismus v oddělení Oomycota nejspíše v průběhu evoluce vznikl dvakrát nezávisle na sobě. Poprvé ve skupině white blister patogenů a později ve skupině DM.

Dvě nejčastěji popisované teorie vysvětlující specializaci biotrofních patogenních plísni na konkrétní hostitele jsou teorie koevoluce patogenu a hostitele a teorie přeskočků („host jump“) na jiného hostitele. Teorie koevoluce popisuje dlouhodobý vztah mezi hostitelskou rostlinou a patogenem, jehož výsledkem je, že patogen není schopný existovat samostatně a ani na mrtvém pletivu svého hostitele ani na jiném druhu hostitelské rostliny. Patogenní plísni byly totiž v průběhu evoluce vyselektovány takové vlastnosti, že už je schopna žít jen v živých pletivech okruhu svých hostitelů, ze kterých získává životně důležité látky (Riethmüller et al., 2002; Voglmayr, 2003; Göker et al. 2004; Thines et al., 2009b; Ploch et al., 2010; Choi et al., 2011).

Občas se stává, že obligátní biotrofní parazit vázaný na jisté druhy hostitelů je v průběhu evoluce schopen později napadat širší okruh hostitelských rostlin. Tento jev si většinou vědci těžko vysvětlují. Jedno z vysvětlení mohu uvést na příkladu patogenu *Albugo candida*, u kterého se pravděpodobně vyvinuly mechanismy, které potlačují imunitní reakci rostlin a tím pádem je tento patogen schopen napadnout i jiné příbuzné druhy původní hostitelské rostliny. Dalším vysvětlením může být příklad evolučního vývoje patogenu *Pseudoperonospora cubensis*, u kterého pravděpodobně došlo k přeskočení na jinou hostitelskou skupinu a to nejpravděpodobněji z čeledi konopovité (Cannabaceae) na tykvovitě (Cucurbitaceae; Thines, 2014). Z dostupných fylogenetických dat vyplývá, že právě přeskok na jiného hostitele a rozšíření tak svého hostitelského okruhu je hnací silou evoluce ve skupině DM (Voglmayr, 2003; Voglmayr et al., 2004). *Peronospora destructor* vznikla přeskokem na novou hostitelskou skupinu a to čeleď česnekovitých (Alliaceae), původní hostitelské rostliny byly pravděpodobně z čeledi merlíkovitých (Chenopodiaceae; Thines a Choi, 2016).

Podle Thinese (2014, 2019) se v průběhu evolučního vývoje skupiny DM uplatňovaly a uplatňují obě základní evoluční teorie. Nejprve prý dochází ke koevoluci patogenu a hostitelské rostliny a následně vlivem přeskočků na jiného hostitele dochází k rozšíření patogenu na rostliny, které byly původně patogenem nedotčeny. Kdyby k přeskočení na jiného

hostitele nedocházelo, koevoluční vztah by jinak vyvíjel silný selekční tlak na striktnější specializaci obligátního biotrofního parazita na úzký okruh hostitelských rostlin nebo jen na jeden hostitelský druh, což by pravděpodobně vedlo k extinkci patogenu. I když získaná data nasvědčují tomu, že v průběhu evoluce opravdu dochází k přeskokům na jiné hostitele, dodnes není jasné, co přesně je spouštěčem tohoto procesu (Thines, 2014, 2019).

3. Charakteristika patogenu *Peronospora destructor*

3.1 Hostitelský okruh

P. destructor je obligátní biotrofní patogen, což znamená, že získává veškeré živiny z živé hostitelské rostliny a je tedy na rostlině zcela závislý (Thines a Choi, 2016). *P. destructor* parazituje na rostlinách z čeledi česnekovitých (Alliaceae). Konkrétně bylo potvrzeno, že patogen napadá následující hostitele: cibule kuchyňská (*Allium cepa*), cibule zimní (*Allium fistulosum*), cibule šalotka (*Allium ascalonicum*), česnek černý (*Allium nigrum*), pór zahradní (*Allium porrum*), česnek medvědí (*Allium ursinum*), česnek planý (*Allium oleraceum*), česnek kuchyňský (*Allium sativum*), pažitka pobřežní (*Allium schoenoprasum*; Yarwood, 1943), pažitka čínská (*Allium tuberosum*; Thines a Choi, 2016).

3.2 Příznaky napadení

Je známo, že *P. destructor* napadá všechna růstová stádia svého hostitele. Prvním příznakem napadení patogenem jsou kruhové či eliptické lehce propadlé léze bílé či nažloutlé barvy, které se vyskytují zejména na starších listech. Tyto léze se vždy vyskytují na jedné straně listů. Postupem času se na infikovaném pletivu začnou tvořit šedé masy (chomáčky) podobné prachu, což jsou shluky sporangioforů se sporangii (obrázek 2). Pokud však v tomto období prší a je velmi vlhké ovzduší, šedá hmota změní barvu na tmavě hnědou až fialovou. Listy napadené rostliny v průběhu infekce mění barvu ze sytě zelené na světle zelenou až žlutou barvu, což se označuje jako chloróza listů (Surviliene et al., 2008; Ankita et al., 2020). Často je také jedním z příznaků kromě chlorózy, také usychání a zkroucení koncových částí listů (Glawe, 2003; Ankita et al., 2020). S postupující infekcí dochází k polehávání nadzemních částí, hnědnutí celých listů až k úplné nekróze pletiva. Když se onemocnění rozšíří do celé hostitelské rostliny, postupně odumře nadzemní část rostliny, čímž se významně snižuje úroda a možnost skladování cibulí rostlin pěstovaných za účelem zisku (Van der Heyden et al., 2020a). Pokud patogen infikuje rostlinu v raném vývojovém stádiu, může dojít k systémové infekci rostliny, která se projevuje defoliací, zakrnělým vzrůstem a odumíráním pletiva (Ankita et al., 2020).



Obrázek 2: Příznaky napadení patogenem *Peronospora destructor* na listech cibule kuchyňské (*Allium cepa*). a) Autor: M. Sedlářová, b) Autor: J. Víchová

3.3 Životní cyklus a ekologické nároky

U *P. destructor* můžeme rozlišit dva typy infekce, primární a sekundární. Primární infekce je většinou způsobena inokulem z částí rostlin, které v půdě přezimovaly. Zdrojem inokula může být mycelium z nerozložených zbytků rostlin z předchozí sezóny, systémově nakažené cibule nebo semena (Borkar a Ajayasree, 2020) a pohlavní oospory přežívající v půdě (Watanabe a Syobu, 2022). Sporangia, která vzniknou na rostlinách s primární infekcí, se přenášejí větrem na další hostitele a způsobují tak sekundární infekci (Borkar a Ajayasree, 2020). Hlavním zdrojem sekundární infekce čili větrem přenášených sporangii jsou infikované planě rostoucí rostliny z čeledi Alliaceae a starší susední rostliny, které již byly před časem napadeny plísní *P. destructor* (Palti, 1989).

3.3.1 Infekce hostitele pomocí nepohlavních sporangii

Po té, co se sporangium *P. destructor* dostane na příslušného hostitele, začne za vhodných podmínek klíčit. Sporangium klíčí hyfou. Klíčící hyfa se za pomoci speciální buňky nazývané apresorium dostane přes průduch dovnitř listu, kde prorůstá mezibuněčným prostorem. Apresorium slouží k přichycení k rostlinným buňkám, ale rovněž umožňuje narušení kutikuly (Deising et al., 2000; Ryder et al., 2022). Patogen přijímá živiny pomocí haustorií zapuštěných do buněčných stěn hostitelských buněk (Borkar a Ajayasree, 2020). K tomu, aby došlo ke klíčení sporangia, je potřeba zajistit optimální podmínky. Podmínky potřebné k infekci, sporulaci a rozšiřování sporangii byly studovány zejména v 80. letech minulého století. *P. destructor* potřebuje k infikování hostitelské rostliny, aby její listy byly pokryté kapkami vody. Suché prostředí může zapříčinit vysušení sporangii, a ty již nadále nejsou schopné klíčit. Sporangia také většinou nepřežijí, když se střídá mokré a suché prostředí na povrchu listu (Hildebrand a Sutton, 1984a). Ve studii zabývající se patogeny *Phytophthora*

infestans a *Pseudoperonospora cubensis* bylo zjištěno, že střídání období vlhka a sucha způsobilo narušení membrán mitochondrií ve sporangiiích. Jelikož se jedná o příbuzné patogeny s podobným životním stylem, může u *P. destructor* docházet ke stejnému porušení (Cohen et al., 1974). Palti (1989) ve svém výzkumu zjistil, že optimální teplota ovzduší pro infekci je mezi 10–12 °C, avšak plíseň je schopna hostitele infikovat i při teplotách od 10 do 22 °C. Optimální teplotou pro klíčení sporangií a napadení hostitele se zabývali i další vědci (Cook, 1932; Hildebrand a Sutton, 1984b) a shodli se, že optimální teplota ovzduší je mezi 10–11 °C.

3.3.2 Sporulace

Když patogen *P. destructor* infikuje hostitele, následuje latentní fáze, při které hostitelská rostlina nevykazuje známky nakažení. Tato latentní fáze bývá různě dlouhá v závislosti na okolních podmínkách a hustotě inokula (počet sporangií/cm²). Latentní fáze může být dlouhá 5–7 dní (Borkar a Ajayasree, 2020). Latentní doba pravděpodobně představuje období, při kterém patogen potřebuje dosáhnout určitého stupně rozšíření své kolonizace na hostiteli, aby byl následně schopen sporulace. Sporulace je proces, při kterém se tvoří sporangia (Hildebrand a Sutton, 1984b). Sporangiofory, na kterých se následně tvoří sporangia, prorůstají průduchy na povrch listu (Yarwood, 1937). Sporangia se zpravidla tvoří v noci (ve tmě) za vysoké relativní vzdušné vlhkosti (vyšší než 95 %), avšak temné fázi musí předcházet fáze světelná (Palti, 1989). Rovněž je ke sporulaci potřeba, aby v nočním období byla teplota ovzduší v rozmezí mezi 4–24 °C (Hildebrand a Sutton, 1982). Yarwood (1937) také zjistil, že ke sporulaci nedojde, pokud je infikovaný hostitel vystaven nepřetržitému světlu nebo nepřetržité tmě. Toto naznačuje, že patogen *P. destructor* je závislý na střídání dne a noci. Když je hustota inokula vyšší (107 sporangií/cm²), sporulace dosahuje nejvyšších hodnot 9–11 dní po inokulaci. Naopak při nízkých hustotách inokula (1,2 sporangií/cm²) byla nejvyšší produkce sporangií v období 13–17 dní po inokulaci (Hildebrand a Sutton, 1984b).

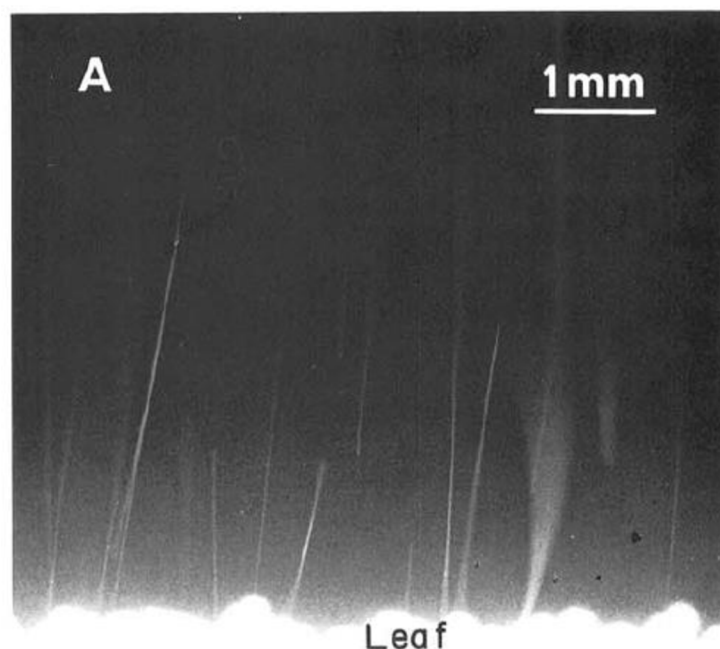
S vyšší hustotou inokula se zkracuje latentní období patogenu a zvyšuje se počet listů, na kterých dochází ke sporulaci. Míra sporulace se snižuje, když hostitelská rostlina vykazuje znaky chlorózy a vadnutí. Tento jev je nejspíše způsoben tím, že patogen již nemá dostatečný přísun živin, které získává z buněk rostliny na tvorbu sporangií. Vlivem teplého počasí patogen ztrácí schopnost sporulace a naopak při působení nižších teplot se prodlužuje období, při kterém dochází ke sporulaci (Hildebrand a Sutton, 1984b).

3.3.3 Uvolnění a rozšíření sporangií

Když jsou sporangia zralá, dochází k jejich uvolnění ze sporangioforu a přenosu větrem na další potenciální hostitele. Spouštěčem uvolnění sporangií je pravděpodobně změna relativní vlhkosti ovzduší. K výraznějšímu uvolňování dochází při snížení relativní vzdušné vlhkosti než

při jejím zvýšení. Z toho plyne, že vliv na uvolnění sporangií má právě vychýlení relativní vzdušné vlhkosti. K uvolňování sporangií nedochází při 100% vlhkosti ovzduší. V jedné studii bylo pozorováno, že při změně vlhkosti z 59 % na 39,5 % došlo k uvolnění nejvíce sporangií. Rovněž se zjistilo, že nikdy nedošlo k uvolnění všech sporangií na listu zároveň, ale že se uvolňovaly cyklicky, když docházelo k opakovaným vychýlením relativní vzdušné vlhkosti. Také bylo zjištěno, že na uvolňování sporangií má vliv infračervené záření. Infračervené záření spouští a dokonce i zvyšuje míru uvolňování sporangií ze sporangioforů. Dokonce došlo vlivem infračerveného záření k uvolnění sporangií, i když byly infikované listy vystaveny 100% relativní vzdušné vlhkosti. Také se zjistilo, že k uvolnění sporangií může docházet vlivem vibrace v podobě lehkého poklepání (Leach et al., 1982).

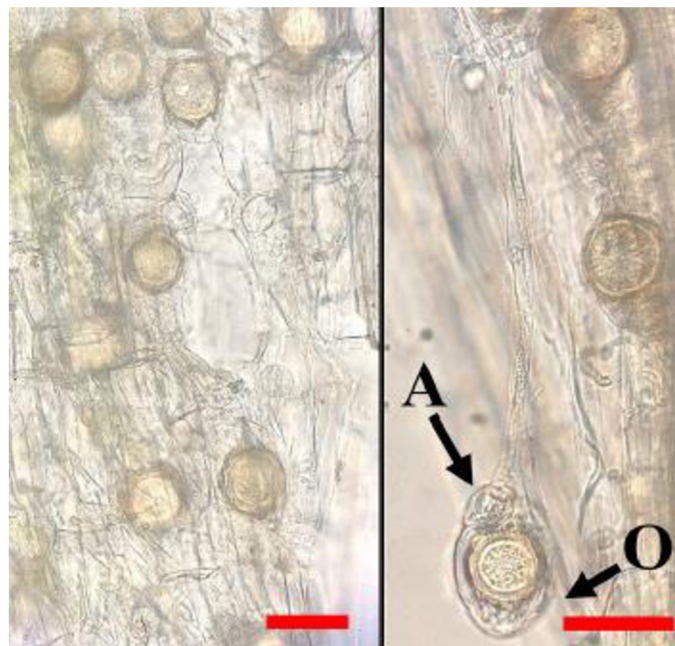
Další otázkou je, jak se vlastně sporangia ze sporangioforů uvolňují. V minulosti se předpokládalo, že uvolnění sporangií je způsobeno kroucením sporangioforů vlivem změny vlhkosti ovzduší. S tímto však nesouhlasí Leach (1982), který toto téma studoval a zjistil, že za vhodných podmínek se sporangia uvolní a jsou „vystřelena“ podobným směrem kolmo od listu do vzdálenosti až 10 mm a následně jsou unášena větrem (obrázek 3). Kdyby bylo uvolnění způsobeno zkroucením sporangioforů, sporangia by zřejmě letěla do všech stran. Také se zjistilo, že sporangia mají pozitivní elektrický náboj. To naznačuje, že uvolnění sporangií je zapříčiněno elektrostatickým mechanismem (Leach, 1982). Sporangia patogenů *Peronospora* sp. mohou být následně unášena větrem až na velmi velké vzdálenosti, ale předpokládá se, že většina sporangií je roznesena do blízkého okolí infikované rostliny (Aylor, 1986; Corredor-Moreno a Saunders, 2020).



Obrázek 3: Trajektorie spontánně uvolněných sporangií patogenu *Peronospora destructor*. Převzato z Leach (1982).

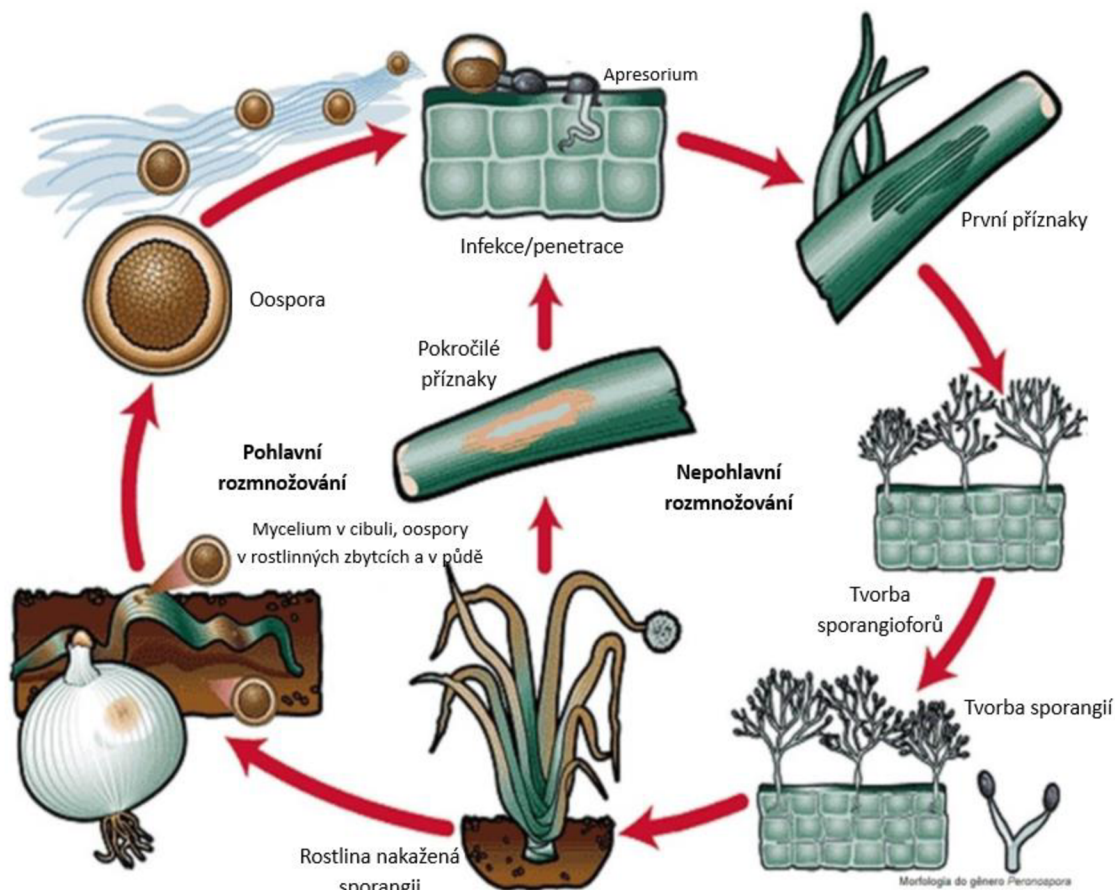
3.3.4 Pohlavní oospory

Na konci sezóny může začít patogen *P. destructor* tvořit pohlavní oospory, které následně slouží jako zdroj primární infekce v následujících sezónách. Oospory se tvoří uvnitř listů a kořenů infikované rostliny (Watanabe a Syobu, 2022). Vzniku pohlavních oospor předchází typ pohlavního rozmnožování zvaný oogametangiogamie, při kterém splývá samčí pohlavní orgán (antheridium) a samičí pohlavní orgán (oogonium, obrázek 4). Nejprve dochází k plazmogamii, která je následována karyogamií, jejímž výsledkem je vznik pohlavní oospory (Kalina a Váňa, 2005). Získaná data naznačují, že patogen *P. destructor* se rozmnožuje heterotalicky, což znamená, že ke kopulaci je potřeba dvou různých organismů odlišného pohlaví (Van der Heyden et al., 2022). Ke vzniku oospory je potřeba, aby byla okolní teplota alespoň 17 °C (Takahashi et al., 1958). Oospory potřebují dlouhou dobu zrání předtím, než jsou schopny klíčit, v některých případech až čtyři roky. Jsou rovněž velmi vytrvalé a nejspíše jsou schopny v půdě přežít až 25 let (Yarwood, 1943, McKay, 1957). Optimální teplota pro klíčení oospory je v rozmezí 20 až 30 °C. Oospory nejsou schopny klíčit při teplotách nižších než 12 °C a vyšších než 40 °C. Oospory jsou schopny klíčit ve vodě, v půdě a na listech hostitelské rostliny (Takahashi et al., 1958). Z oospory za vhodných podmínek klíčí sporangiofor nesoucí sporangia. Proces infekce pomocí oospor je dosud málo prozkoumaný a v současné době probíhá výzkum zabývající se touto problematikou (Watanabe a Syobu, 2022).



Obrázek 4: Pohlavní oospory patogenu *Peronospora destructor*. A – antheridium, O – oogonium.
Měřítko: 50 µm. Převzato z Watanabe a Syobu (2022).

Obecně se dá shrnout, že teploty mezi 10–12 °C jsou ideální pro většinu životního cyklu, snesitelné teploty jsou i mezi 14–18 °C, ale teploty vyšší než 22 °C způsobí zánik plísně (Ankita et al., 2020). Zjednodušené schéma životního cyklu *P. destructor* je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5: Životní cyklus patogenu *Peronospora destructor*. Převzato z Araújo a Alves (2016).
Upraveno.

3.4 Výskyt

P. destructor se hojně vyskytuje skoro ve všech regionech, kde se pěstuje cibule kuchyňská a další hospodářsky významné rostliny z čeledi Alliaceae. Nejzávažnější epidemie *P. destructor* propuká v regionech vyskytujících se zejména v mírném podnebném pásu a jsou příznačné chladnějším a vlhkým klimatem, ve kterém *P. destructor* prospívá. Poprvé o patogenu *P. destructor* reportoval v roce 1841 Miles Joseph Berkeley v Anglii (Berkeley, 1841). V Severní Americe – ve státě New York (USA) a v provincii Ontario (Kanada) byly zaznamenány sporadické výskyty epidemie *P. destructor* v 70. a 80. letech minulého století. Nejzávažnější epidemie v této oblasti propukly v letech 1977–1979 (Hildebrand a Sutton, 1982; Smith et al., 1985). První výskyt patogenu *P. destructor* v Georgii (USA) byl zaznamenán v roce 1999 (Langston a Summer, 2000). Následně v letech 2007 a 2012 v Georgii propukly závažné epidemie patogenu *P. destructor* (Parkunan et al., 2013). V provincii Québec (Kanada) v letech 1989 až 1993 pravidelně docházelo k významným epidemiím patogenu, avšak v následujících jedenácti letech bylo

zaznamenáno jen málo případů výskytu nákazy způsobené patogenem *P. destructor*. Od roku 2005 však opět pravidelně propuká epidemie patogenu *P. destructor* a dokonce se každým rokem příznaky napadení objevují dříve než v předchozí sezóně, což je pravděpodobně způsobeno klimatickou změnou (Van der Heyden et al., 2020b). Výčet všech zemí, ve kterých je doložen výskyt patogenu *P. destructor*, je zapsán v tabulce 1.

Tabulka 1: Státy světa, ze kterých je uváděn výskyt patogenu *Peronospora destructor* (CABI, 2008)

Austrálie a Oceánie	Austrálie (Nový Jižní Wales, Queensland, Tasmánie, Západní Austrálie, Victoria, Jižní Austrálie), Nový Zéland
Afrika	Egypt, Etiopie, Keňa, Libye, Mauricius, Maroko, Tanzánie, Uganda, Zimbabwe
Asie	Afghánistán, Čína, Hong Kong, Indie, Írán, Irák, Izrael, Japonsko, Jordánsko, Jižní Korea, Libanon, Mongolsko, Pákistán, Filipíny, Saudská Arábie, Taiwan, Thajsko, Turecko, Ázerbájdžán, Kyrgyzstán, Kazachstán, Uzbekistán, Rusko, Jemen
Evropa	Rakousko, Bulharsko, Normanské ostrovy, Česká republika, Slovensko, Dánsko, Finsko, Norsko, Švédsko, Francie, Německo, Řecko (Kréta, Kypr), Maďarsko, Irsko, Itálie, Malta, Polsko, Rumunsko, Španělsko, Švýcarsko, Velká Británie, Estonsko, Lotyšsko, Litva, Chorvatsko, Slovinsko, Makedonie, Bosna a Hercegovina, Černá Hora, Srbsko
Severní Amerika	Bermudské ostrovy, Kanada (Alberta, Britská Kolumbie, Manitoba, Nový Brunšvik, Nové Skotsko, Ontario, Québec, Saskatchewan, Ostrov prince Edvarda), Mexiko, Spojené Státy Americké, Kostarika, Kuba, Dominikánská republika, Guatemala, Honduras, Nikaragua, Panama, Portoriko, Salvador
Jižní Amerika	Trinidad a Tobago, Argentina, Bolívie, Brazílie (Rio Grande do Sul), Chile, Kolumbie, Guyana, Peru, Uruguay, Venezuela

4. Ochrana před patogenem *Peronospora destructor*

4.1 Praktické předcházení infekce

Existují různé praktiky, díky kterým lze zamezit vzniku infekcí způsobených patogenem *P. destructor*. Na konci každé sezóny po sběru úrody cibule kuchyňské či jiných hospodářsky významných rostlin z čeledi Alliaceae je potřebné zbavit se všech zbytků rostlin, které by potenciálně mohly sloužit jako zdroj nákazy v příštích sezónách. Na výsadbu by se měly používat jen zdravé cibule. Je nutné každý rok na jednom poli pěstovat jinou plodinu. Rostliny by se měly hnojit střídavě, přehnojené rostliny jsou totiž náchylnější k infekci patogenem *P. destructor* (Borkar a Ajayasree, 2020). Rovněž by se měly vytrhat a bezpečně zničit všechny planě rostoucí rostliny, které na poli rostly společně s hospodářskými rostlinami. Na výsadbu by se měla vybírat pole, na kterých se dlouho nadržuje rosa, například pole na jižních svazích. Rovněž by se cibule či semínka neměla sázet příliš blízko sebe, tím se dá předcházet zvýšené vlhkosti v porostu. Také se doporučuje rostliny nezalévat kropením shora (Paltí, 1989). Bylo zjištěno, že na polích, která se vyskytovala blízko řekám, potokům, rybníkům či jezerům byly příznaky onemocnění patogenem *P. destructor* daleko závažnější než na jiných polích (Develash a Sugha, 1997a). Proto bych doporučila pěstovat cibuli kuchyňskou a jiné česnekovité rostliny daleko od vodních ploch, řek a potoků. Také bylo zjištěno, že cibule, které byly vystaveny tepelnému působení (35–45 °C) po několik hodin a semínka, která byla vystavena slunečnímu záření po 12 dní, v následujícím růstu vykazovaly menší míru nákazy způsobené patogenem *P. destructor* (Vítanov a Angelov, 1974; Develash a Sugha, 1997b).

4.2 Chemická ochrana

V současnosti je chemická ochrana nedílnou součástí managementu patogenních hub a houbových organizmů. Pesticidy, které slouží k hubení (nežádoucích) hub a houbových organismů, se nazývají fungicidy (Prokinová, 2019). Patogen *P. destructor* může způsobovat až 74% ztráty z úrody cibule kuchyňské (Develash a Sugha, 1997a), proto není divu, že se fungicidy proti této plísni v zemědělství hojně používají.

4.2.1 Typy a účinky fungicidů

Fungicidy můžeme rozdělit na kontaktní a systémové. Kontaktní fungicidy jsou efektivní pouze předtím, než dojde k infekci patogenem. Zůstávají pouze na povrchu pokožky rostliny a zabraňují patogenu infikovat hostitelskou rostlinu. Naopak systémové fungicidy se dostávají dovnitř pletiv rostliny, kde se mohou šířit apoplastickou i symplastickou cestou, a jsou schopné zlikvidovat již probíhající infekci (Waard et al, 1993).

Různé skupiny fungicidů zneškodňují houbové patogeny několika různými mechanismy. Fenylamidy narušují syntézu nukleových kyselin. Zoxamid a tiofanát-metyl narušují proces mitózy a buněčného dělení. Pyrazoly, karboxamidy, analogy strobilurinu, pyridiny, oxazolidinony a další negativně ovlivňují buněčné dýchání. Pyrimidiny, pyridiny a fenylamidy zabírají syntézu aminokyselin a bílkovin. Pyrroly, karboxamidy, chinazoliny a chinoliny blokují transdukcii signálu (přenos informace mezi molekulami). Karbamáty narušují syntézu lipidů a biomembrán. Azoly a morfoliny inhibují syntézu sterolu v biomembránách. Morfoliny a amidy narušují syntézu glukanu (Prokinová, 2019).

4.2.2 Účinnost některých fungicidních přípravků

Účinností fungicidů s různým mechanismem účinku se zabývalo několik studií v několika různých zemích. Dostupné fungicidní přípravky se v různých zemích liší, ale aktivní látky v nich jsou většinou s podobným mechanismem účinku. Některé chemické látky mohou být kvůli zdravotním rizikům v některých státech povoleny k použití a ve státech jiných zakázány. V Evropské unii se trh s fungicidními přípravky řídí Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh.

V litevské studii vědci porovnávali účinnost fungicidních přípravků: Acrobat Plus (s účinnými látkami dimetomorf a mankozeb), Amistar 250 SC (azoxystrobin), Infinito SC 687.5 (fluopikolid, propamokarb, kyselina chlorovodíková), Penncozeb 75 DG (mankozeb) a Signum 33 WG (pyraklostrobin, boskalid). Všechny rostliny cibule kuchyňské ošetřené chemickou ochranou prokazatelně vykazovaly nižší míru nákazy způsobenou patogenem *P. destructor* na rozdíl od rostlin, na které nebyl aplikován žádný fungicidní přípravek. V průběhu tří let (2004, 2005, 2007) byly v ochraně před patogenem nejúčinnější fungicidní přípravky Signum 33 WG s průměrnou účinností 89,36 % a Infinito 687.5 SC s průměrnou účinností 87,99 %. V roce 2007 byl přípravek Infinito 687.5 SC účinný až na 91,69 % a v roce 2004 byla účinnost přípravku Signum 33 WG až 91,42 %. Nejméně účinný (74,38 %) byl fungicidní přípravek Penncozeb 75 DG s účinnou látkou mankozeb (Surviliene et al., 2008). Fungicid s obsahem účinné látky mankozeb se od ledna roku 2022 nesmí používat v zemích Evropské unie, jelikož byl klasifikován jako toxický pro reprodukci a zřejmě narušuje činnost endokrinního systému člověka a jiných organismů (Prováděcí nařízení komise EU 2020/2087).

V Brazílii testovali mezi lety 2017 a 2019 na polích s cibulí kuchyňskou účinnost fungicidů s těmito účinnými látkami: propineb (2100 g·ha⁻¹), metalaxyl-M (100 g·ha⁻¹) + mankozeb (1600 g·ha⁻¹), bentiavalicarb-isopropyl (56,25 ml·ha⁻¹) + chlorothalonil (562.5 ml·ha⁻¹), bentiavalicarb-isopropyl (30 ml·ha⁻¹) + fluazinam (75 ml·ha⁻¹), bentiavalicarb-isopropyl (40 ml·ha⁻¹) + fluazinam (100 ml·ha⁻¹). Nejlépe rostlinu ochránil před nákazou patogenem *P. destructor* fungicid obsahující propineb v obou sezónách. V roce 2017 byla úroda cibule o 99,8 % a v roce 2018 o 63 % vyšší v porovnání s kontrolním vzorkem cibulí, který

nebyl ošetřen žádným přípravkem. Dobře účinkovala i fungicidní směs bentiavalicarb-isopropyl + chlorothalonil, úroda byla vyšší oproti kontrolnímu vzorku o 40,3 % v roce 2017 a o 30,3 % v roce 2018 (Araújo a Resende, 2020).

V jiné studii v Etiopii porovnávali účinnost fungicidních přípravků Mancozeb 80 WP (Mancozeb) s aktivní látkou mankozeb a Ridomil Gold MZ 68WG (Ridomil) s fungicidními látkami mankozeb a metalaxyl-M. Studie probíhala od srpna roku 2018 do prosince roku 2019. Oba fungicidní přípravky významně snížily výskyt nákazy na rostlinách cibule kuchyňské způsobené patogenem *P. destructor*. V ochraně před patogenem si nejlépe vedl fungicidní přípravek Ridomil, když byl aplikován na porost cibule každých sedm dní, závažnost nákazy cibule poté byla jen 8,35 %. Při stejném opakování postřiku přípravkem Mancozeb byla závažnost nemoci 19,74 %. Když byl fungicidní přípravek aplikován každých 14 dní, rostliny ošetřené Ridomilem vykazovaly 14,20 % intenzity napadení a v případě Mancozebu to bylo 20,39 %. Při opakování aplikace každých 21 dní už byla závažnost nákazy 48,68 % v případě užití Ridomilu a 62,5 % v případě užití Mancozebu (Abdurezake a Asefa, 2022).

Nutno podotknout, že ačkoliv dva přípravky od různých výrobců obsahují stejnou fungicidní látku, účinnost těchto přípravků se může lišit. Konečná fungicidní směs totiž obsahuje kromě fungicidní účinné látky i jiné sloučeniny, které například pomáhají penetraci fungicidu nebo třeba zvyšují rezistenci hostitelské rostliny vůči patogenu. Konečná směs, která může obsahovat až 20 různých látek, má tajnou recepturu, kterou si každý výrobce fungicidních přípravků střeží (Prokinová, 2019).

V zemědělských monokulturách často dochází k nadbytečnému aplikování fungicidů a nedodržování zásad doporučených výrobcem fungicidního přípravku. Častá expozice vysokých dávek fungicidních přípravků se stejnou účinnou látkou vede k tomu, že houbové patogeny si vlivem selekčního tlaku vyvíjí rezistenci vůči těmto sloučeninám. Tento fakt vede k tomu, že je neustále potřeba vyvíjet nové fungicidní či jiné ochranné látky vůči těmto patogenům (Staub, 1991).

4.2.3 Integrovaný management patogenu *P. destructor*

Smyslem integrovaného managementu je využívat chemickou ochranu jen v opodstatněných situacích a rozhodně neplýtvat s pesticidy, jelikož ty mohou představovat riziko pro živé organismy. To znamená, že každý zemědělec by měl vždy hospodařit s ohledem na životní prostředí, na lidské zdraví a především i na zdravotní stav pěstované plodiny (Zákon č. 326/2004 Sb.).

V roce 1987 v Kanadě vznikl první model integrované ochrany cibule kuchyňské před patogenem *P. destructor*, který na základě klimatických podmínek doporučuje vhodné použití fungicidních přípravků. Tento model se nazývá DOWNCAST a vznikl z anglických slov downy

mildew a „forecast“ (předpověď). Podle tohoto modelu na základě aktuálních dat o teplotě, srážkách, relativní vlhkosti a o rose je jedinec schopný vyhodnotit riziko vzniku infekce parazita *P. destructor* na cibuli kuchyňské a posoudit, zda je vhodné použít chemickou ochranu či nikoliv (Jespersen a Sutton, 1987). Podobný model, který však již ke stanovení rizika infekce patogenu *P. destructor* využívá složité matematické rovnice, vznikl v roce 1996 v Itálii. Model se jmenuje ONIMIL a vznikl spojením anglického názvu pro plíseň česnekovitých „onion downy mildew“. Na základě teploty ovzduší a hodnoty relativní vzdušné vlhkosti je možné pomocí rovnic v tomto modelu předpovědět možnost vzniku infekce a případnou míru nakažení patogenem *P. destructor* (Battilani et al., 1996). Dalším předpovědním modelem je německý ZWIPERO, jehož jméno vzniklo spojením slov „Zwiebel“ a *Peronospora* (Zwiebel znamená v němčině cibule). Tento model je opět o něco složitější. Model počítá s teplotou, relativní vzdušnou vlhkostí, vlhkostí listů, se srážkami a také s časy východu a západu slunce. Rovněž je po vyhodnocení těchto proměnných doporučováno použití fungicidů, pokud jsou potřeba (Friedrich et al., 2003). Pro podmínky ve Velké Británii vznikl v roce 2004 model MILIONCAST (ze slov mildew on onion forecast). Tento model je nejspíše nejsložitější a slouží k predikci míry sporulace patogenu *P. destructor* v závislosti na teplotě vzduchu a relativní vzdušné vlhkosti (Gilles et al., 2004).

V některých dalších zemích se těmito předpovědními modely inspirovali a vytvořili vlastní upravenou verzi podle lokálních klimatických podmínek. Například de Visser upravil předpovědní model DOWNCAST pro nizozemské klima (de Visser, 1998).

4.3 Jiné formy ochrany

Ačkoliv jsou fungicidy vysoce účinné v ochraně proti houbovým patogenům, mnohdy představují zdravotní riziko nejen pro člověka, ale i pro jiné organismy. Rezidua pesticidů ve vodě a v půdě mívají neblahé účinky na životní prostředí (Mahmood et al., 2016) a způsobují degradaci půdy (Joko et al., 2017). Právě proto je žádoucí, aby se více apelovalo na vývoj zdravotně nezávadných látek, které by mohly nahradit nebezpečné pesticidy.

V posledních letech se zkoumají antimykotické účinky esenciálních olejů. Esenciální oleje ze štětkovce citronového (*Callistemon citrinus*), voňatky citronové (*Cymbopogon citratus*) a bazalky vytrvalé (*Ocimum gratissimum*) se ukázaly být úspěšné při ochraně rajčat (*Solanum lycopersicum*) před patogeny *Fusarium oxysporum* a *Phytophthora infestans*. Účinky esenciálních olejů byly srovnatelné s účinky fungicidů. Za úspěšnou ochranou před zmiňovanými patogeny stojí zejména tyto látky obsažené v esenciálních olejích: fenoly, flavonoidy, taniny (trísloviny) a kumariny (Dakole et al., 2016). Ve studii, která se zabývala antimykotickými účinky esenciálních olejů z máty peprné (*Mentha piperita*) a rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*) bylo prokázáno, že tyto oleje mají inhibiční účinek na patogen *P. destructor* (Githaiga et al., 2018).

Antagonistické mikroorganismy rovněž dokázaly potlačit infekci patogenu *P. destructor*. Tyto bakteriální a houbové mikroorganismy jsou schopny potlačit vývoj nákazy patogenu několika mechanismy: antibiόza, kompetice, parazitismus, indukce rezistence hostitelské rostliny či přímá predace patogenu. V jedné studii testovali účinky mikroorganismů *Trichoderma harzianum*, *Bacillus megaterium*, *Trichoderma album* a *Bacillus subtilis*. V polních podmínkách se prokázalo, že všechny tyto mikroorganismy výrazně potlačily infekci patogenu *P. destructor* v porovnání se vzorky cibule kuchyňské, na které nebyl aplikován žádný přípravek (Shahin, 2017).

Další látky, které mohou sloužit jako ochrana před biotrofními parazity jsou například nenasycené mastné kyseliny (např. kyselina arachidonová; Yarovoy et al., 2006), hydrogenuhličitan sodný, směs mono-, oligo- a polysacharidů extrahovaných z řas *Ascophyllum nodosum* či *Laminaria* sp. a další. Z těchto a dříve zmíněných látek a mikroorganismů se následně míchají různé směsi, které jsou pak dostupné na trhu jako ekologicky udržitelné přípravky pro ochranu rostlin čeledi Alliaceae před patogenem *P. destructor* (Kofot a Fischer, 2007).

Díky genovému inženýrství v současnosti existují i geneticky rezistentní kultivary cibule kuchyňské. Bylo totiž zjištěno, že planě rostoucí zástupce čeledi česnekovitých *Allium roylei* ve svém genomu nese geny pro rezistenci vůči patogenu *P. destructor*. Následně se za pomoci genové introgrese vyšlechtily rezistentní kultivary cibule kuchyňské (Scholten et al., 2007).

5. Kultivace biotrofních patogenů

V praktické části jsem kultivovala patogen *Peronospora destructor* na listech cibule kuchyňské (*Allium cepa*) ve třech různých podmínkách prostředí (režimech). První režim vycházel z metodiky pro kultivaci patogenu *P. destructor*. Následující dva režimy vycházely z metodiky pro kultivaci příbuzných patogenů *P. destructor*, a to plíseň dýňovitých (*Pseudoperonospora cubensis*) a plíseň salátová (*Bremia lactucae*). Patogen *P. cubensis* parazituje na rostlinách z čeledi tykvovitě (Cucurbitaceae; Lebeda a Widrlechner, 2003). *B. lactucae* je patogen, který napadá rostliny z čeledi hvězdnicovité (Asteraceae) a to zejména rod *Lactuca* (Crute a Dixon, 1981).

Režim 1 vycházel ze zjištěných poznatků ve studii, která se zabývala kultivací patogenu *P. destructor* na cibuli kuchyňské v laboratorních podmínkách (Abd-Elrazik a Lorbeer, 1980). V této studii se jako nejefektivnější způsob kultivace ukázal režim, při kterém se inokulované cibule přemísťovaly mezi různými podmínkami prostředí. Prvních 24 hodin byly inokulované (naočkované) cibule umístěny do vlhké komory („moist chamber“) při teplotě 14 °C a byly kultivovány ve tmě. Následně inokulované cibule odkryli a ponechali je tak čtyři dny. Po čtyřech dnech inokulované cibule přemístili do skleníku, ve kterém byla teplota 18 °C, tam se kultivovaly osm dní. Po osmi dnech inokulované cibule opět vrátili do komory s teplotou 14 °C a po dobu 24 hodin byly kultivovány ve tmě. V této studii byl také zjištěn příznivý efekt otření listů cibule bavlněným tamponem na infekci a sporulaci patogenu *P. destructor*. Když listy cibule otřeli bavlněným tamponem, patogen *P. destructor* následně vykazoval vyšší míru infekce i sporulace oproti kontrolním vzorkům, které nebyly otřeny. (Abd-Elrazik a Lorbeer, 1980).

Druhý režim vycházel z metodiky pro kultivaci patogenu *Pseudoperonospora cubensis*, který se kultivuje zejména na listech okurky seté (*Cucumis sativus*). Inokulované listy se kultivují ve fytotronu při denní teplotě 18 °C a noční teplotě 15 °C. Prvních 16–24 hodin jsou inokulované listy přikryté černou fólií a následujících 13 dní se kultivují odkryté s fotoperiodou trvající 12 hodin denně (Lebeda a Urban, 2010).

Třetí režim vycházel z metodiky pro kultivaci patogenu *Bremia lactucae* například na listech lociky seté (*Lactuca sativa*). Inokulované listy se kultivují ve dne při teplotě 15 °C a v noci při teplotě 10 °C. Prvních 12–24 hodin se vzorky nechají zakryté černou neprůsvitnou fólií. Poté jsou očkované listy kultivovány při denní fotoperiodě trvající 12 hodin. Inokulované listy se kultivují 13–14 dní od dne inokulace (Lebeda a Petrželová, 2010).

Výše zmíněné podmínky kultivace jsem upravila podle dostupných možností a zařízení na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci. Přesný popis režimů, podle kterých jsem kultivovala patogen *P. destructor*, je v praktické části v kapitole 6.3.

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktickou část jsem realizovala na Katedře botaniky Přírodovědecké fakulty univerzity Palackého v Olomouci pod dohledem vedoucí této práce RNDr. Boženy Sedlákové, Ph.D. V této části jsem očkovala sporangia biotrofního patogenu *Peronospora destructor* na povrch listů cibule kuchyňské (*Allium cepa*). Následně jsem naočkované segmenty a celé rostliny ponechala ve třech různých klimatických podmínkách. Zajímalo mě, zda v různých podmínkách dojde k infekci a následné sporulaci patogenu *P. destructor* a také, jak testované podmínky ovlivňují růst saprofytických organismů.

6. Materiál a metodika

6.1 Rostlinný materiál a očkovaný (inokulovaný) izolát *P. destructor*

Pro praktickou část jsem využila mladé rostliny cibule kuchyňské (*Allium cepa*) vypěstované ze sazečky. Sazečky jsem dne 28. 3. 2023 zasadila do plastových květináčů s profesionálním substrátem (Florcom[®]). Následně jsem nechala rostliny cibule růst po dobu 14 dnů ve fytotronu. Ve fytotronu byla stálá teplota 20 °C a vlhkost ovzduší 40 %. Ve fytotronu se 12 hodin svítilo a 12 hodin byla tma, což mělo simulovat střídání dne a noci.

Infikované listy cibule se sporangii patogenu *Peronospora destructor* (izolát Pd 3/21) byly posbírány na experimentálním poli s cibulí kuchyňskou Katedry kvality a bezpečnosti potravin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze v roce 2021. Tento izolát byl následně uchováván v mrazničce při teplotě -20 °C.

6.2 Očkování (inokulace) patogenu *P. destructor* na cibuli kuchyňskou

Dne 11. 4. 2023 jsem očkovala celé rostliny a segmenty listů cibule kuchyňské. Před očkováním jsem listy cibule otřela bavlněným tamponem, což mělo usnadnit infekci patogenu *P. destructor* (Abd-Elrazik a Lorbeer, 1980). Následně jsem si nachystala Petriho misky. Do každé Petriho misky jsem nejdříve vložila 4–5 vrstev buničiny a na ně jeden filtrační papír. Takto připravené Petriho misky jsem nechala stát 10 minut pod UV lampou za účelem zničení nežádoucích patogenů či mikrobů, které by se mohly vyskytovat na filtračním papíru nebo buničině vlivem skladovacích podmínek. Následně jsem buničinu a filtrační papír důkladně navlhčila destilovanou vodou. Do každé takto připravené Petriho misky jsem vložila čtyři nastříhané segmenty cibule a zakryla skleněným víkem. Segmenty v Petriho miskách budu později zmiňovat jako disky (D) a celé rostliny cibule jako rostliny (R).

Následně jsem připravila očkovací roztok. Do kádinky (obrázek 6) jsem nalila malé množství destilované vody a poté jsem v něm pomocí pinzety důkladně vymáchala segmenty

listů cibule, na kterých se vyskytovala sporangia izolátu Pd 3/21. Roztok jsem prohlédla pod mikroskopem při zvětšení 400× a ověřila si přítomnost sporangií. Následně jsem roztok nalila do skleněného rozprašovače s balónkem (obrázek 6). Roztok jsem nastříkala na celou horní plochu každého segmentu a na celou plochu každého listu rostlin cibule kuchyňské. Po nástřiku inokula jsem misky opět zakryla skleněným víkem a celé rostliny cibule jsem uložila do plastových boxů s průhledným víkem. Tento způsob uchování zajistil mikroklima, ve kterém se udržovala vysoká vzdušná vlhkost. Takto naočkované segmenty a rostliny cibule kuchyňské jsem nechala kultivovat ve fytotronech.



Obrázek 6: Skleněný rozprašovač a kádinka s roztokem, které jsem využila pro inokulaci patogenu *Peronospora destructor* na segmenty listů a rostliny cibule kuchyňské (*Allium cepa*).

6.3 Kultivace patogenu *P. destructor* na cibuli kuchyňské

Parazita *P. destructor* na cibuli kuchyňské jsem kultivovala ve fytotronech ve třech různých režimech v období od 11. 4. do 25. 4. 2023, které jsou shrnuty v tabulce 2.

Režim 1 – podle metodiky Abd-Elrazik a Lorbeer (1980)

Režim 1 je jediná varianta režimu, při které byly disky (segmenty cibule v Petriho miskách) a rostliny přemísťovány mezi dvěma fytotrony (3 a 4) s různými teplotními režimy. To znamená, že v průběhu 14 dní byly kultivovány v různých teplotách. Nejprve jsem disky a rostliny umístila do fytotronu 3. Ve fytotronu 3 byla denní teplota 15 °C a noční teplota 10 °C. Svítlo se po dobu 12 hodin a dalších 12 hodin byla pomocí tmy simulována noc. Vlhkost ovzduší ve fytotronu 3 byla asi 40 %. Prvních 24 hodin byly disky a rostliny přikryty černou neprůsvitnou folií, což mělo zlepšit klíčení sporangií. Následující čtyři dny se disky a rostliny

kultivovaly odkryté. Poté jsem rostliny a disky přemístila do fytotronu 4. Ve fytotronu 4 byla denní teplota 20 °C a noční teplota 17 °C. Fotoperioda byla stejná jako ve fytotronu 3, 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Vlhkost ovzduší byla také cca 40 %. Ve fytotronu 4 byly disky a rostliny umístěny po dobu 8 dní. Pak byly opět vráceny na 24 hodin do studenějšího fytotronu 3 a znovu byly přikryty černou folií, což mělo indukovat sporulaci.

Režim 2 – podle metodiky Lebedy a Urbana (2010)

V případě 2. varianty režimu kultivace byly disky a rostliny umístěny pouze ve fytotronu 4. Klimatické podmínky a fotoperioda byly stejné jako v předchozím režimu ve fytotronu 4. Prvních 24 hodin byly disky a rostliny rovněž zakryté černou neprůsvitnou folií a následujících 13 dní byly ponechány odkryté.

Režim 3 – podle metodiky Lebedy a Petrželové (2010)

Ve 3. variantě kultivace byly rostliny a disky umístěny po celou dobu ve fytotronu 3. Klimatické podmínky a fotoperioda ve fytotronu 3 byly stejné, jak jsem již zmiňovala výše. Opět byly disky a rostliny zakryté černou neprůsvitnou folií v průběhu prvních 24 hodin. Dalších 13 dní se kultivovaly odkryté.

Tabulka 2: Podmínky, ve kterých byl kultivován patogen *Peronospora destructor* po inokulaci na segmenty listů a celé rostliny cibule kuchyňské (*Allium cepa*)

Režim	Období	Podmínky	Metodika
1	11. 4. – 12. 4.	15 °C ve dne, 10 °C v noci, tma	Abd-Elrazik a Lorbeer, 1980 (<i>Peronospora destructor</i>)
	12. 4. – 16. 4.	15 °C ve dne, 10 °C v noci, fotoperioda 12 h	
	16. 4. – 24. 4.	20 °C ve dne, 17 °C v noci, fotoperioda 12 h	
	24. 4. – 25. 4.	15 °C ve dne, 10 °C v noci, tma	
2	11. 4. – 12. 4.	20 °C ve dne, 17 °C v noci, tma	Lebeda a Urban, 2010
	12. 4. – 25. 4.	20 °C ve dne, 17 °C v noci, fotoperioda 12 h	(<i>Pseudoperonospora cubensis</i>)
3	11. 4. – 12. 4.	15 °C ve dne, 10 °C v noci, tma	Lebeda a Petrželová, 2010
	12. 4. – 25. 4.	15 °C ve dne, 10 °C v noci, fotoperioda 12 h	(<i>Bremia lactucae</i>)

6.4 Odběr a uchování vzorků k mikroskopování a hodnocení příznaků nakažení cibule kuchyňské patogenem *P. destructor*

Z každého režimu byly pravidelně náhodně odebírány vzorky pro následující mikroskopické hodnocení. Vzorky byly odebírány 6 dní (6 DPI), 8 dní (8 DPI), 10 dní (10 DPI) a 14 dní po inokulaci (14 DPI). Ve stejné dny se pořizovaly fotografie, které zaznamenávaly průběh nákazy inokulované cibule. Rovněž byly do tabulky zapisovány příznaky nakažení cibule na základě vizuálního hodnocení. Vzorky se odebíraly ustříhnutím segmentů z rostlin a odebráním celých segmentů z disků. Následně byly vzorky vloženy do označených lahvíček s 99% kyselinou octovou za účelem rozkladu chlorofylu v pletivu cibule pro lepší viditelnost struktur houbových patogenů při mikroskopickém hodnocení. Po několika dnech byla kyselina

octová z lahviček vylita. Do lahviček se následně nalil 85% glycerol. Takto připravené vzorky byly uschovány ve tmě asi měsíc.

6.5 Příprava mikroskopických preparátů a mikroskopování

Na mikroskopické podložní sklo jsem nanesla vždy dva segmenty cibule, které byly uchovávané v glycerolu. Segmenty jsem barvila anilinovou modří, která zvýraznila struktury houbových patogenů vyskytujících se v pletivu cibule. Na segmenty jsem kápala trochu barviva a následně čekala 30 minut, než se vzorky obarví. Poté jsem je přikryla krycím sklem. Preparáty jsem pečlivě prohlížela při mikroskopickém zvětšení 400× a pořizovala jsem fotografie všech struktur, které nebyly přirozenou součástí rostlinného pletiva cibule. Celkem jsem pořídila 132 fotografií různých struktur, které jsme následně s vedoucí práce identifikovaly.

7. Výsledky

Očkovala jsem sporangia patogenu *P. destructor* na segmenty listů a na celé rostliny cibule kuchyňské a následně jsem je nechala kultivovat ve třech různých režimech. Po uplynutí 6, 8, 10 a 14 dní od inokulace se pořizovaly fotografické snímky inokulovaných disků a rostlin, které měly zachytit příznaky nakažení patogenem. V těchto dnech se také zapisovaly vizuální příznaky nakažení do protokolu. Rovněž se ve stejnou dobu odebíraly vzorky z každé varianty pro následné mikroskopické hodnocení. Při mikroskopickém pozorování jsem zaznamenávala výskyt struktur patogenu *P. destructor* – mycelium, sporangium, sporangiofor, oospora. Rovněž jsem zaznamenávala výskyt struktur saprofytických houbových organismů.

7.1 Vizuální vyhodnocení příznaků nakažení

Jak na discích ze všech režimů, tak i na celých rostlinách cibule z režimů 1 a 2 jsem po uplynulých 14 dnech kultivace patogenu pozorovala typické příznaky nakažení patogenem *P. destructor* – žloutnutí a usychání listů a šedý povlak na povrchu listů. Na rostlinách z režimu 3 jsem po celých 14 dní kultivace nepozorovala žádné příznaky. Pozorované příznaky na discích však byly jednoznačně intenzivnější oproti celým rostlinám. Rostliny ze všech režimů měly lehce polámané listy, domnívám se, že to však bylo z důvodu stísněných podmínek v plastových boxech, ve kterých byly rostliny v průběhu kultivace umístěny.

Šest dní po inokulaci patogenu *P. destructor* jsem na rostlinách a segmentech cibulí nepozorovala téměř žádné změny. Pouze na jedné rostlině kultivované v režimu 2 (R2) jsem si všimla, že jeden list začal od konce žloutnout.

Osm dní po inokulaci segmenty kultivované ve všech třech režimech už začaly od okrajů žloutnout. U rostlin z režimu 1 a 2 (R1 a R2) jsem po osmi dnech pozorovala žloutnutí od konce listu, rostliny z režimu 3 (R3) byly stále bez příznaků.

Deset dní po inokulaci jsem pozorovala žloutnutí segmentů ve všech režimech. Na některých segmentech se již vytvořil i šedavý povlak. Některé segmenty začaly od okrajů usychat. Žloutnutí listů jsem pozorovala u rostlin z režimu 1 a 2. Rostliny z režimu 3 byly stále bez známek nakažení.

Po čtrnácti dnech většina segmentů ze všech režimů vykazovala značnou míru degradace rostlinného pletiva. Mimo to jsem na segmentech pozorovala šedý povlak, žloutnutí a usychání okrajů. U R2 jsem pozorovala suché konce listů některých rostlin a žloutnutí od konce listů. U R1 jsem pozorovala několik žlutých konců listů. Rostliny z třetího režimu ani po čtrnácti dnech od inokulace nevykazovaly žádné příznaky.

Podrobněji jsou všechny příznaky zaznamenané v přílohách 1 a 2, ve kterých jsou reprezentativní fotografie ze všech variant režimů kultivace pořízených při kontrolních dnech.

7.2 Mikroskopické vyhodnocení

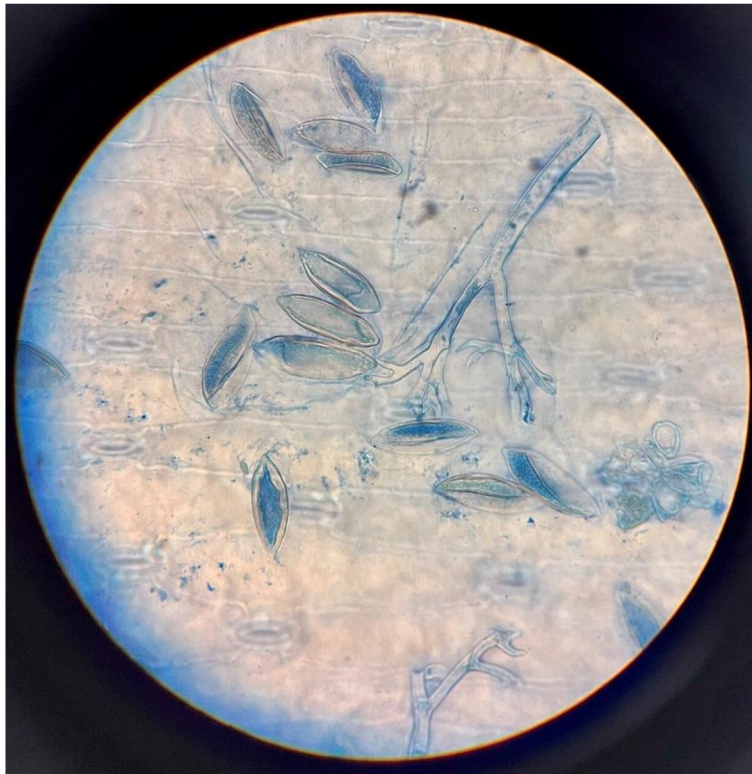
Po 10 a rovněž i 14 dnech od inokulace jsem pozorovala již nově vzniklá sporangia patogenu *P. destructor* ve vzorcích z disků odebraných ze všech tří režimů. Naopak co se týče vzorků odebraných z celých rostlin, po 10 dnech od inokulace jsem pozorovala nově vzniklá sporangia jen ve vzorcích z režimu 3 (R3). Po 14 dnech od inokulace jsem nově vzniklá sporangia pozorovala už i ve vzorcích z rostlin kultivovaných v režimu 1 a 3. V žádných vzorcích odebraných z rostlin z režimu 2 jsem nepozorovala nově vzniklá sporangia patogenu *P. destructor*.

Při mikroskopování vzorků odebraných 6 dní po inokulaci jsem pozorovala hlavně neklíčící sporangia patogenu *P. destructor*, která jsem na rostlinu původně očkovala. Rovněž jsem pozorovala již klíčící sporangia a mycelium *P. destructor*. Ve vzorku z disků kultivovaných v režimu 2 (D2) jsem pozorovala i mycelium saprofytického houbového organismu. Jediný vzorek, ve kterém jsem nepozorovala žádné struktury jiného původu než cibule, byl vzorek z rostlin z režimu 2 (R2).

Ve vzorcích odebraných 8 dní po inokulaci jsem pozorovala opět neklíčící i klíčící sporangia a mycelium *P. destructor* i mycelia saprofytické houby. Ve vzorcích z disků kultivovaných v režimu 1 (D1) a rostlin kultivovaných v režimu 3 (R3) už jsem pozorovala i nově vzniklé sporangiofory a ve vzorku z D1 i nově vzniklá sporangia *P. destructor*. Ve vzorku z D2 jsem pozorovala i mycelium a konidiofor s konidii saprofyty *Penicillium* sp. (příloha 5) a ve vzorku z R3 jsem pozorovala i mycelium a konidie saprofyty *Cladosporium* sp. (příloha 6).

Po deseti dnech od inokulace už jsem mimo jiné pozorovala ve všech vzorcích z disků nově vzniklá sporangia patogenu *P. destructor*. Ve vzorku z D2 jsem pozorovala hojný výskyt saprofytů *Fusarium* sp. (příloha 7), *Penicillium* sp. a *Cladosporium* sp.. Ve vzorcích z R1 a R2 jsem stále pozorovala původní neklíčící sporangia patogenu *P. destructor*. Ve vzorku z R3 už jsem mimo jiné pozorovala klíčící původní sporangia a mycelium i nově vzniklá sporangia patogenu *P. destructor*.

Ve všech vzorcích kromě R2 odebraných 14 dní po inokulaci jsem pozorovala nově vzniklá sporangia *P. destructor* (obrázek 7). Ve vzorcích z D3, R1 a R3 jsem pozorovala i nově vzniklé sporangiofory *P. destructor* (obrázek 7). Ve všech vzorcích jsem také pozorovala saprofytické houby. Ve vzorku z R2 jsem pravděpodobně pozorovala jiný druh z rodu *Peronospora* sp. (příloha 8). Ve vzorcích z D3 a R1 jsem pravděpodobně pozorovala i pohlavní oospory patogenu *P. destructor* (obrázek 8).



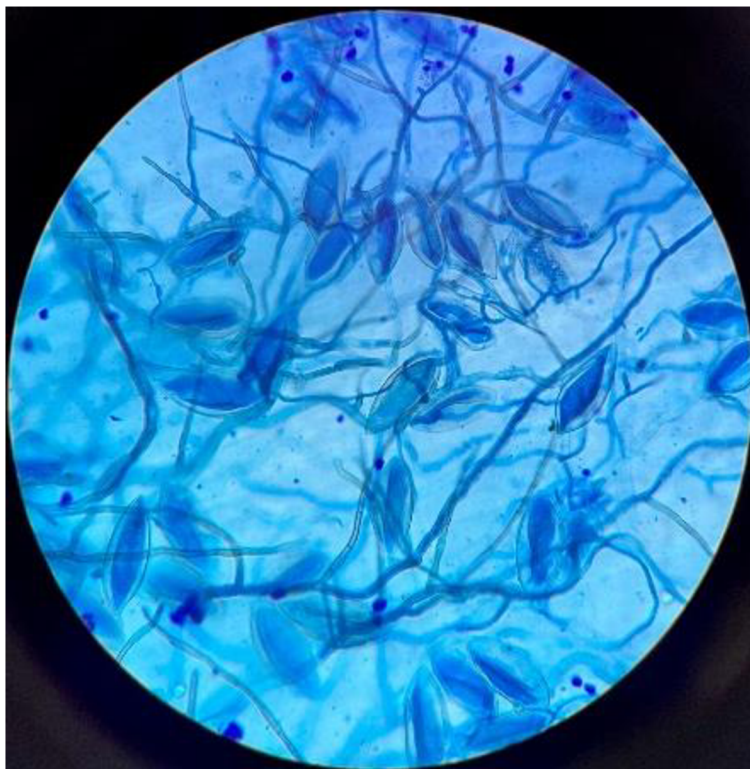
Obrázek 7: Nově vzniklý sporangiofor a nově vzniklá sporangia patogenu *Peronospora destructor* ze vzorku R1 14 DPI. Zvětšení 400×.



Obrázek 8: Pravděpodobně pohlavní oospory patogenu *Peronospora destructor* ze vzorku D3 14 DPI. Zvětšení 400×.

Pozoruhodné byly vzorky z R3, ve kterých jsem pokaždé pozorovala velké množství patogenních struktur. Zejména ve vzorcích R3 6 DPI a 8 DPI jsem pozorovala opravdu velké množství původních klíčících sporangií a mycelia *P. destructor* (obrázek 9).

Podrobné soupisy pozorovaných struktur patogenu *P. destructor* a saprofytických organismů ze všech vzorků jsou v přílohách 3 a 4. Celkem jsem pořídila 132 snímků mikroskopovaných struktur a v přílohách 3 a 4 jsou zaznamenané reprezentativní fotografie z každého vzorku.



Obrázek 9: Velké množství klíčících původních sporangií patogenu *Peronospora destructor* ze vzorku R3 8 DPI. Zvětšení 400×.

8. Diskuze a závěr

Literární část jsem zpracovávala na základě dostupných vědeckých článků z odborných časopisů a také jsem čerpala z několika rozsáhlých tištěných publikací. Rovněž jsem některé informace čerpala i z internetových zdrojů. Na základě nastudovaných článků jsem vytvořila kapitoly, které se týkaly klasifikace, taxonomie, fylogeneze i evoluce patogenního organismu *Peronospora destructor*. Následně jsem se zabývala hostitelským okruhem patogenu, příznaky napadených rostlin tímto patogenem či jeho výskytem ve světě. Velkou pozornost jsem věnovala životnímu cyklu patogenu i tomu, jaké má patogen ekologické nároky v různých stádiích životního cyklu. Jelikož tento patogen způsobuje značné ztráty na úrodě rostlin z čeledi česnekovitých (Develash a Sugha, 1997a), nemohla jsem vynechat ani kapitolu o ochraně před tímto patogenem. Popsala jsem účinky i účinnost různých fungicidních přípravků. Také jsem zmínila některé předpovědní modely pro výskyt infekce či sporulace patogenu *P. destructor*. Ty na základě klimatických podmínek doporučují aplikaci fungicidních přípravků a mají za cíl omezit spotřebu těchto přípravků (Jespersen a Sutton, 1987; Friedrich et al., 2003), jelikož fungicidy mají nepříznivé účinky na organismy a životní prostředí (Mahmood et al., 2016; Joko et al., 2017). Rovněž jsem zmínila i jiné formy ochrany před patogenem, například v podobě esenciálních olejů (Githaiga et al., 2018) či antagonistických mikroorganismů (Shahin, 2017). V poslední kapitole této části jsem se zabývala kultivací biotrofních patogenů v laboratorních podmínkách.

V praktické části jsem očkovala sporangia patogenu *P. destructor* na segmenty listů a na celé rostliny cibule kuchyňské (*Allium cepa*) a následně je uchovávala ve třech různých klimatických podmínkách. Zajímalo mě, zda dojde k infekci a následné sporulaci patogenu a také, jaké jiné patogenní organismy na cibuli porostou. Příznaky nakažení cibule jsem hodnotila 6, 8, 10 a 14 dní po inokulaci a vždy jsem odebírala vzorky cibule z každé varianty, abych je následně mohla zhodnotit pod mikroskopickým zvětšením 400×.

Kromě rostlin kultivovaných v režimu 3 jsem jinak u všech rostlin a disků v průběhu 14 dní pozorovala příznaky typické pro nakažení patogenem *P. destructor*. Žloutnutí listů, usychání konců listů nebo segmentů a šedý povlak na povrchu listů. Po 14 dnech byla většina segmentů ve značné fázi rozkladu, což mohlo být způsobeno jak patogenem Pd, tak i saprofytickými organismy, které jsem následně pozorovala v mikroskopu.

Kromě vzorků odebraných z rostlin z režimu 2 jsem ve všech ostatních vzorcích z různých režimů po 14 dnech (u některých i dříve) od inokulace patogenu *P. destructor* mikroskopicky pozorovala nově vzniklá sporangia. Ačkoliv byly disky a rostliny umístěny v různých režimech, ve kterých se teploty pohybovaly od 10 do 20 °C, patogen Pd byl v těchto podmínkách schopen infikovat listy cibule a následně sporulovat. Ve vzorku z R2 10 DPI jsem sice pozorovala původní neklíčící sporangia, ale v žádném jiném vzorku z kontrolních dní jsem nepozorovala, že by sporangia klíčila. To znamená, že pro patogen Pd zřejmě nebyly na těchto

rostlinách vhodné podmínky pro infekci. Jelikož jsem vzorky odebírala náhodně, mohlo však dojít k tomu, že jsem zrovna úseky listů, kde byly klíčící sporangia, mohla vynechat.

Velice zajímavé jsou výsledky mikroskopického vyhodnocení rostlin z režimu 3. Ačkoliv jsem po dobu celých 14 dní na rostlinách nepozorovala žádné příznaky nakažení, při mikroskopování odebraných vzorků z těchto rostlin jsem většinou pozorovala velké množství klíčících sporangií a mycelia patogenu Pd. Jinak si myslím, že příznaky ostatních segmentů a celých rostlin poměrně odpovídaly následnému mikroskopickému pozorování patogenů. Příznaky nakažení pozorované na segmentech listů však byly v porovnání s příznaky pozorovanými na celých rostlinách mnohem intenzivnější a to pravděpodobně kvůli intenzivnějšímu působení saprofytických organismů.

Ve vzorcích jsem při mikroskopování pozorovala množství saprofytických houbových organismů, jejichž růst bylo možné pozorovat i na filtračním papíře disků zejména po 10 a 14 dnech od inokulace. Tyto organismy mají na rozdíl od patogenu Pd přehrádkovaná mycelia a je pro ně typický rychlý růst. Konkrétní rody jsme společně s vedoucí této práce RNDr. Boženou Sedlákovou, Ph.D. určily podle konidioforů (sporangioforů) a konidií (sporangii). Pokud jsem ve vzorku pozorovala jen přehrádkované mycelium, označila jsem nález jako mycelium saprofytické houby. I když jsem Petriho misky s buničinou a filtračním papírem před inokulací sterilizovala pod UV světlem, stejně se na listech cibule tyto organismy rozrostly, což se stalo přirozeně, jelikož jsem nepracovala ve sterilních podmínkách. Sporangia těchto saprofytů se vyskytují volně v ovzduší a mohly se už vyskytovat na listech cibule ještě před inokulací sporangií Pd. V jednom vzorku (R2 14 DPI) jsem objevila sporangiofor patřící zřejmě jinému druhu z rodu *Peronospora* sp. (příloha 8), ten se tam mohl vyskytnout ze stejných důvodů jako saprofytické organismy.

Zajímavý byl i nález ve vzorcích z R1 a D3 14 DPI, ve kterých jsem pozorovala i struktury, které velice připomínaly oospory (obrázek 8), které jsou výsledkem pohlavního rozmnožování patogenu *P. destructor*. Oospory se většinou tvoří na konci sezóny, následuje klidové stadium a na začátku další sezóny slouží jako zdroj primární infekce (Watanabe a Syobu, 2022). Takahashi et al. (1958) uvádí, že ke vzniku oospor je potřeba alespoň 17 °C, což bylo dodrženo pouze v režimu 1.

Ve všech třech režimech podle různých metodik byla podle mikroskopického hodnocení prokázána infekce cibule kuchyňské a následná sporulace patogenu *Peronospora destructor*. Infekce a sporulace nebyla pozorována jen u vzorků z rostlin kultivovaných v režimu 2. Pro následující experimenty s patogenem *P. destructor* bych zřejmě doporučila zkrátit dobu kultivace na 10 dní, jelikož po 14 dnech od inokulace se ve vzorcích vyskytovalo už velké množství saprofytických organismů. Já sama bych v příštích pokusech pro kultivaci patogenu využila režim 1 a očkovala bych na segmenty listů cibule kuchyňské. V tomto režimu jsem totiž

pozorovala nově vzniklá sporangia už po 8 dnech kultivace a také jsem zde nepozorovala tak velké množství saprofytických organismů jako v jiných variantách.

LITERATURA

Abd-Elrazik, A. A. a Lorbeer, J. W. (1980) 'A procedure for isolation and maintenance of *Peronospora destructor* on onion', *Phytopathology*, 70(8), pp. 780–782.

Abdurezake, M. a Asefa, G. (2022) 'Evaluation of fungicides against downy mildew (*Peronospora destructor* Berk) of onion (*Allium cepa*) in Bale zone, south eastern Ethiopia', *Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research*, 9(4), pp. 161–168.

Ankita, Chandel, S., Sharma, R., a Meena, V. K. (2020) 'Epidemiological studies of downy mildew of onion', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(5), pp. 1–12.

Araújo, E. R. a Alves, D. P. (2016) 'Manejo do mildio da cebola: avanços e barreiras da pesquisa científica', *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 24, pp. 42–54.

Aylor, D. E. (1986) 'A framework for examining inter-regional aerial transport of fungal spores', *Agricultural and Forest Meteorology*, 38(4), pp. 263–288.

Battilani, P., Rossi, V., Racca, P. a Giosue, S. (1996) 'ONIMIL, a forecaster for primary infection of downy mildew of onion', *EPPO Bulletin*, 26, pp. 567–576.

Beakes, G. W. a Gay, J. L. (1977) 'Gametangial nuclear division and fertilization in *Saprolegnia furcata* as observed by light and electron microscopy' *Transactions of the British Mycological Society*, 69, pp. 459–471.

Beakes, G. W., Honda, D. a Thines, M. (2014) 'Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hyphochytriomycota, and Oomycota' In: McLaughlin, D., Spatafora, J. (eds) 'Systematics and Evolution, The Mycota', vol 7A, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 39–97, ISBN: 978-3-642-55317-2

Beakes, G. W. a Thines, M. (2017) 'Hyphochytriomycota and Oomycota' In: Archibald, J., Simpson, A. a Slamovits, C. (eds) 'Handbook of the Protists', Second Edition. Springer International Publishing, pp. 435–505, ISBN: 978-3-319-28147-6.

Berkeley, M. J. (1841) 'Notices of British fungi.' *The Annals and Magazine of Natural History; Zoology, Botany and Geology*, 6, pp. 430–439.

- Borkar, S. G. a Ajayasree, T. S. (2020) 'The plant mildews a colour handbook' New India Publishing Agency (NIPA), 414 pp, ISBN: 978-9389907018.
- Choi, Y.-J., Thines, M., Runge, F., Hong, S.-B., Telle, S. a Shin, H.-D. (2011) 'Evidence for high degrees of specialisation evolutionary diversity and morphological distinctiveness in the genus *Bremia*', *Fungal Biology*, 115, pp. 102–111.
- Cohen, Y., Perl, M., Rotem, J., Eyal, H. a Cohen, J. (1974) 'Ultrastructural and physiological changes in sporangia of *Pseudoperonospora cubensis* and *Phytophthora infestans* exposed to water stress', *Canadian Journal of Botany*, 52(3), pp. 447–450.
- Constantinescu, O. (1992) 'An Annotated List of *Peronospora* names' *Thunbergia* 15, pp. 1–110.
- Cook, H. T. (1932) 'Studies on the downy mildew of onions, and the causal organism *Peronospora destructor* (Berk.) Caspary: Memoir', *Cornell University Agricultural Experiment Station*, 143, 40 pp.
- Corredor-Moreno, P., a Saunders, D. G. (2020) 'Expecting the unexpected: factors influencing the emergence of fungal and oomycete plant pathogens', *New Phytologist*, 225(1), pp. 118–125.
- Crute, I. R. a Dixon, G. R. (1981) 'Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel', In: Spencer, D. M. (ed.) 'The Downy Mildews', Academic Press, pp. 421–460, ISBN: 978-0126568608.
- Dakole, D. C., Nguetack, J., Dongmo, L. J. B., Galani Yamdeu, J., Aza, U. R., Somda, I. A Amvam, Z. P. (2016) 'Antifungal potential of essential oils, aqueous and ethanol extracts of thirteen plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici* and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary as major tomato pathogens', *International Journal of Current Science*, 19(2), pp. 128–145.
- De Visser, C. L. M. (1998) 'Development of a downy mildew advisory model based on downcast', *European Journal of Plant Pathology*, 104(9), pp. 933–943.
- Deising, H. B., Werner, S. a Wernitz, M. (2000) 'The role of fungal appressoria in plant infection', *Microbes and Infection*, 2(13), pp. 1631–1641.
- Develash, R. K. a Sugha, S. K. (1997a) 'Incidence of onion downy mildew and its impact on yield', *Indian Phytopathology*, 50, pp. 127–130.

Develash, R. K. a Sugha, S. K. (1997b). 'Management of downy mildew (*Peronospora destructor*) of onion (*Allium cepa*)', *Crop Protection*, 16(1), pp. 63–67.

Dick, M. W. (2001) 'The Peronosporomycetes'. In: McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., Lemke, P. A. (eds) 'Systematics and Evolution, The Mycota', vol 7A. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 39–72, ISBN: 978-3-642-08193-4

Dick, M. W. (2002) 'Towards an understanding of the evolution of the downy mildews', *Advances in Downy Mildew Research*, 1, pp. 1–57.

Friedrich, S., Leinhos, G. M. E. a Löpmeier, F. J. (2003) 'Development of ZWIPERO, a model forecasting sporulation and infection periods of onion downy mildew based on meteorological data', *European Journal of Plant Pathology*, 109(1), pp. 35–45.

Gilles, T., Phelps, K., Clarkson, J. P. a Kennedy, R. (2004) 'Development of MILIONCAST, an improved model for predicting downy mildew sporulation on onions', *Plant disease*, 88(7), pp. 695–702.

Githaiga, B. M., Gathuru, E. M., Waithaka, P. N. a Omondi, G. O. (2018) 'Antifungal effects of essential oils from mint and rosemary on *Peronospora destructor* and *Candida albicans*', *Mediterranean Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), pp. 5–12.

Göker, M., Riethmüller, A., Voglmayr, H., Weiß, M. a Oberwinkler, F. (2004) 'Phylogeny of *Hyaloperonospora* based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences', *Mycological Progress*, 3, pp. 83–94.

Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A. a Oberwinkler, F. (2007) 'How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews.' *Fungal Genetics and Biology*, 44(2), pp. 105–122.

Hildebrand, P. D. a Sutton, J. C. (1982) 'Weather variables in relation to an epidemic of onion downy mildew', *Phytopathology*, 72, pp. 219–224.

Hildebrand, P. D. a Sutton, J. C. (1984a) 'Effects of weather variables on spore survival and infection of onion leaves by *Peronospora destructor*', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 6(2), pp. 119–126.

Hildebrand, P. D. a Sutton, J. C. (1984b) 'Relationships of temperature, moisture, and inoculum density to the infection cycle of *Peronospora destructor* ', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 6(2), pp. 127–134.

Jespersion, G. D. a Sutton, J. C. (1987) 'Evaluation of a forecaster for downy mildew of onion (*Allium cepa* L.) ', *Crop protection*, 6(2), pp. 95–103.

Kalina, T. a Váňa, J. (2005) 'Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii', 1. vydání, Praha: Karolinum., 608 pp, ISBN: 978-80-246-1036-8.

Kofoet, A. a Fischer, K. (2007) 'Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P. parasitica*, *Bremia lactucae* and *Pseudoperonospora cubensis*', *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114(2), pp. 54–61.

Krings, M., Taylor, T. N. a Dotzler, N. (2011) 'The fossil record of the Peronosporomycetes (Oomycota) ', *Mycologia*, 103, pp. 445–457.

Kůdela, V., Kocourek, F., Bárnet, M. et al. (2012) 'České názvy chorob a škůdců rostlin', 1. vydání, Praha: Profi Press s. r. o., 272 pp., ISBN: 978-80-905080-4-0.

Langston Jr, D. B. a Sumner, D. R. (2000) 'First report of downy mildew (caused by *Peronospora destructor*) of onion in Georgia', *Plant Disease*, 84(4), pp. 489–489.

Lebeda, A. a Widrlechner, M. P. (2003) 'A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes', *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(4), pp. 337–349.

Lebeda, A. a Petrželová, I. (2010). 'Screening for resistance to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) ' In: Spencer, M. a Lebeda, A. (eds) 'Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease', International Atomic Energy Agency, pp. 245–256.

Lebeda, A. a Urban, J. (2010). 'Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) ' In: Spencer, M. a Lebeda, A. (eds) 'Mass screening techniques for selecting crops resistant to disease', International Atomic Energy Agency, pp. 285–294.

Leach, C. M., Hildebrand, P. D. a Sutton, J. C. (1982) 'Sporangium discharge by *Peronospora destructor* – influence of humidity, red-infrared radiation and vibration', *Phytopathology*, 72(8), pp. 1052–1056.

Leach, C. M. (1982) 'Active sporangium discharge by *Peronospora destructor*', *Phytopathology*, 72(7), pp. 881–885.

Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A. a Hakeem, K. R. (2016) 'Effects of pesticides on environment'. In: Hakeem, K., Akhtar, M. a Abdullah, S. (eds) 'Plant, Soil and Microbes', Springer, Cham, pp. 253–269 ISBN: 978-3-319-27453-9

McKay, R. (1957) 'The longevity of the oospores of onion downy mildew *Peronospora destructor* (Berk.) Casp', *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society*, 27, pp. 295–307.

Palti, J. (1989) 'Epidemiology, prediction and control of onion downy mildew caused by *Peronospora destructor*', *Phytoparasitica* 17, pp. 31–48.

Parkunan, V., Gitaitis, R. D., Dutta, B., Langston, D. B. a Ji, P. (2013) 'An epidemic of downy mildew caused by *Peronospora destructor* on *Vidalia* sweet onions in Georgia in 2012', *Plant Health Progress*, 14(1)

Ploch, S., Choi, Y.-J., Rost, C., Shin, H.-D., Schilling, E. a Thines, M. (2010) 'Evolution of diversity in *Albugo* is driven by high host specificity and multiple speciation events on closely related Brassicaceae' *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, pp. 812–820.

Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiss, M. a Oberwinkler, F. (2002) 'Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences', *Mycologia*, 94(5), pp. 834–849.

Rossmann, A. a Palm, M. (2006) 'Why are *Phytophthora* and other Oomycota not true fungi?', *Journal of Biofuels*, 17, pp. 217–219.

Ryder, L. S., Cruz-Mireles, N., Molinari, C., Eisermann, I., Eseola, A. B. a Talbot, N. J. (2022) 'The appressorium at a glance', *Journal of Cell Science*, 135 (14): jcs259857.

Scholten, O. E., Van Heusden, A. W., Khrustaleva, L. I., Burger-Meijer, K., Mank, R. A. et al. (2007) 'The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion', *Euphytica*, 156, pp. 345–353.

Shahin, S. I. (2017) 'Effect of some biocides on development of the onion downy mildew disease, caused by *Peronospora destructor* (Berk.)', *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 27(1), pp. 71–77.

Smith, W. G. (1884) 'Diseases of field and garden crops: chiefly such as are caused by fungi', Macmillan and Company, 353 pp, ISBN: 978-1446002223.

Smith, R. W., Lorbeer, J. W. a Abd-Elrazik, A. A. (1985) 'Reappearance and control of onion downy mildew epidemics in New York', *Plant Disease*, 69(8), pp. 703–706.

Surviliene, E., Valiuskaite, A. a Raudonis, L. (2008) 'The effect of fungicides on the development of downy mildew of onions', *Zemdirbyste-Agriculture*, 95(3), pp. 171–179.

Takahashi, M., Tanaka, Y. a Oishi, C. (1958) 'Studies on the downy mildew of onion, formation and germination of oospore', *Japanese Journal of Phytopathology*, 23(3), pp. 117–120.

Taylor, T. N., Krings, M. a Keri, H. (2006) '*Hassella monospora* gen. et sp. nov., a microfungus from the 400 million year old Rhynie chert', *Mycological Research*, 110, pp. 628–632.

Thines, M. (2006) 'Evaluation of characters available from herbarium vouchers for the phylogeny of the downy mildew genera (Chromista, Peronosporales), with focus on scanning electron microscopy', *Mycotaxon*, 97, pp. 195–218.

Thines, M., Voglmayr, H. a Göker, M. (2009a) 'Taxonomy and Phylogeny of the Downy Mildews (Peronosporaceae)' In: Lamour, K. a Kamoun, S. 'Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools', Wiley-Blackwell, pp. 47–75.

Thines, M., Choi, Y.-J., Kemen, E., Ploch, S., Holub, E. B., Shin, H.-D. a Jones, J. D. (2009b) 'A new species of *Albugo* parasitic to *Arabidopsis thaliana* reveals new evolutionary patterns in white blister rusts (Albuginaceae)', *Persoonia*, 22, pp. 123–128.

Thines, M. (2014) 'Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes – a global overview' *European Journal of Plant Pathology*, 138, pp. 431–447.

Thines, M. a Choi, Y.-J. (2016) 'Evolution, diversity, and taxonomy of the Peronosporaceae, with focus on the genus *Peronospora*', *Phytopathology*, 106, pp. 6–18.

Thines, M. (2019), 'An evolutionary framework for host shifts – jumping ships for survival', *New Phytologist*, 224, pp. 605–617

Van der Heyden, H., Bilodeau, G. J., Carisse, O. a Charron, J.-B. (2020a) 'Monitoring of *Peronospora destructor* primary and secondary inoculum by Real-Time qPCR', *Plant Disease*, 104(12), pp. 3183–3191.

- Van der Heyden, H., Dutilleul, P., Duceppe, M. O., Bilodeau, G. J., Charron, J. B. a Carisse, O. (2022) 'Genotyping by sequencing suggests overwintering of *Peronospora destructor* in southwestern Québec, Canada', *Molecular Plant Pathology*, 23(3), pp. 339–354.
- Vitanov, M. a Angelov, D. (1974) 'Possibilities of the control of *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. by insulating onion bulbs', *Gradinarska i Lozarska Nauka*, 11(3), pp. 89–94.
- Voglmayr, H. (2003) 'Phylogenetic study of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences', *Mycological Research*, 107, pp. 1132–1142.
- Voglmayr, H., Riethmüller, A., Göker, M., Weiß, M., a Oberwinkler, F. (2004) 'Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildews with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data', *Mycological Research*, 108, pp. 1011–1024.
- Waard, M. A., Georgopoulos, S. G., Hollomon, D. W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N. N. a Schwinn, F. J. (1993) 'Chemical control of plant diseases: problems and prospects', *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), pp. 403–421.
- Wakefield, E. M. a Moore, W. C. (1936) 'Notes on certain changes in nomenclature in the second edition of the list of common names in British plant diseases', *Transactions of the British Mycological Society*, 20(2), pp. 97–109.
- Watanabe, S. a Syobu, S. I. (2022) 'Primary infection of onion downy mildew on onion seedlings caused by belowground *Peronospora destructor* inoculum containing germinable oospores', *Journal of Phytopathology*, 170(10), pp. 711–723.
- Yarovoy, G. I., Kovbasenko, K. P., Klokun, M. V. a Kovbasenko, V. M. (2006) 'Control of *Peronospora schleidenii* Unger of onion in Ukraine', *Vegetable Crops Research Bulletin*, 64, pp. 189–193.
- Yarwood, C. E. (1937) 'The relation of light to the diurnal cycle of sporulation of certain downy mildews', *Journal of Agricultural Research*, 54(5), pp. 365–373.
- Yarwood, C. E. (1943) 'Onion downy mildew', *Hilgardia*, 14(11), pp. 595–691.

Internetové zdroje

Araújo, E. R. a Resende, R. S. (2020) [online] 'Propineb efficiency in controlling downy mildew of onion under field conditions', *Australasian Plant Disease Notes*, 15(1), 34, [cit. 5. 7. 2023], dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00403-x>.

CAB International (2008) [online], CABI UK, 'Distribution Maps of Plant Diseases, *Peronospora destructor* [Distribution map]' [cit. 6. 7. 2023], dostupné z: <https://doi.org/10.1079/DMPD/20046500076>

Česko, Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. In: zakonyprolidi.cz [online]. © AION CS 2010–2023 [cit. 15. 7. 2023], dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-326>

EU, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS [online] [cit. 13. 7. 2023], dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>

EU, Prováděcí nařízení komise EU 2020/2087 ze dne 14. prosince 2020, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neobnovuje schválení účinné látky mankozeb a kterým se mění příloha prováděcího nařízení Komise (EU) č. 540/2011 [online] [cit. 13. 7. 2023], dostupné z: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2020/2087/oj

Glawe, D. A. (2003) [online] 'First Report of downy mildew of chives caused by *Peronospora destructor* in the Pacific Northwest', *Plant Health Progress*, 4(1) [cit. 4. 7. 2023], dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PHP-2003-0512-01-HN>

Joko, T., Anggoro, S., Sunoko, H. R. a Rachmawati, S. (2017) [online] 'Pesticides usage in the soil quality degradation potential in Wanasari Subdistrict, Brebes, Indonesia', *Applied and Environmental Soil Science*, 2017, Article ID 5896191, 7 pp., [cit. 15. 7. 2023], dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/5896191>

Prokinová, E. (2019) [online], [Agromanual.cz](http://agromanual.cz), 'Fungicidní účinné látky' [cit. 11. 7. 2023], dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/fungicidni-ucinne-latky>

Van der Heyden, H., Dutilleul, P., Charron, J. B., Bilodeau, G. J. a Carisse, O. (2020b) [online] 'Factors influencing the occurrence of onion downy mildew (*Peronospora destructor*) epidemics: Trends from 31 years of observational data', *Agronomy*, 10(5), 738, 16 pp, [cit. 11. 7. 2023], dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agronomy10050738>

PŘÍLOHY

Seznam příloh

Příloha 1: Fotografie segmentů cibule kuchyňské (disků) naočkovaných patogenem *P. destructor* kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných příznaků infekce na cibuli 6, 8, 10 a 14 dní po očkování.

Příloha 2: Fotografie rostlin cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných příznaků infekce na cibuli 6, 8, 10 a 14 dní po očkování.

Příloha 3: Reprezentativní fotografie z mikroskopického pozorování vzorků ze segmentů (disků) cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* a kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných struktur v každém vzorku. Mikroskopované vzorky byly odebrány 6, 8, 10 a 14 dní po očkování. Zvětšení 400×.

Příloha 4: Reprezentativní fotografie z mikroskopického pozorování vzorků z rostlin cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* a kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných struktur v každém vzorku. Mikroskopované vzorky byly odebrány 6, 8, 10 a 14 dní po očkování. Zvětšení 400×

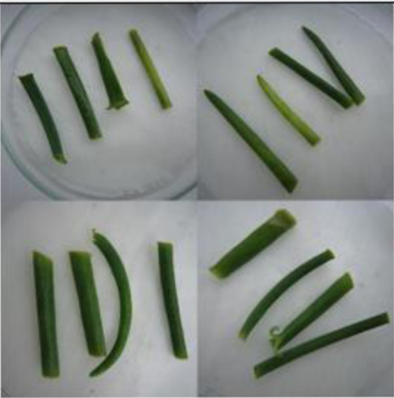


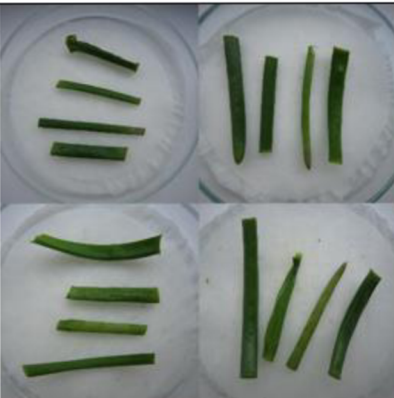



Příloha 5: Saprofytický organismus *Penicillium* sp. ze vzorku D2 8 DPI. Zvětšení 400×.

Příloha 6: Saprofytický organismus *Cladosporium* sp. ze vzorku D2 10 DPI. Zvětšení 400×.

Příloha 7: Saprofytický organismus *Fusarium* sp. ze vzorku D2 10 DPI. Zvětšení 400×.

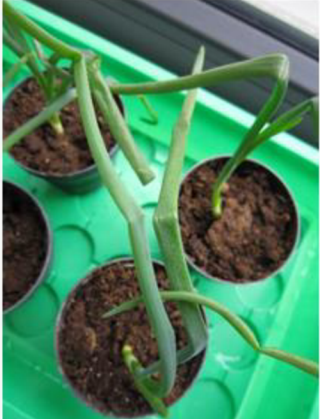







Příloha 8: Sporangiofor pravděpodobně jiného druhu z rodu *Peronospora* sp. ze vzorku R2 14 DPI. Zvětšení 400×.

Příloha 1: Fotografie segmentů cibule kuchyňské (disků) naočkováných patogenem *P. destructor* kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných příznaků infekce na cibuli 6, 8, 10 a 14 dní po očkování.

Disky (D)	6 DPI	8 DPI	10 DPI	14 DPI
D1	 <p>Bez příznaků nakažení</p>	 <p>Žloutnutí na okrajích některých segmentů</p>	 <p>Většina segmentů zežloutlá, na některých segmentech šedý povlak a usychají okraje</p>	 <p>Značná míra degradace rostlinného pletiva, většina segmentů zežloutlá, na některých segmentech šedý povlak a usychají okraje</p>
D2	 <p>Bez příznaků nakažení</p>	 <p>Mírné žloutnutí na okrajích některých segmentů</p>	 <p>Některé segmenty zežloutlé, na některých segmentech je šedý povlak a usychají okraje</p>	 <p>Některé segmenty značně degradované a zežloutlé, na některých segmentech je šedý povlak a usychají okraje</p>

D3	 <p data-bbox="367 603 656 635">Bez příznaků nakažení</p>	 <p data-bbox="743 603 1077 707">Žloutnutí na okrajích některých segmentů, jeden segment celý žlutý</p>	 <p data-bbox="1133 603 1496 715">Většina segmentů zežloutlá, na některých segmentech je šedý povlak a usychají okraje</p>	 <p data-bbox="1541 603 1881 762">Značná míra degradace rostlinného pletiva, většina segmentů zežloutlá, na některých segmentech je šedý povlak a usychají okraje</p>
----	--	---	---	--

Příloha 2: Fotografie rostlin cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných příznaků infekce na cibuli 6, 8, 10 a 14 dní po očkování.

Celé rostliny (R)	6 DPI	8 DPI	10 DPI	14 DPI
R1	 <p data-bbox="405 699 685 724">Bez příznaků nakažení</p>	 <p data-bbox="763 699 1043 756">U jedné rostliny žlutý konec listu</p>	 <p data-bbox="1122 708 1402 807">U jedné rostliny žlutý konec listu, jinak bez příznaků nakažení</p>	 <p data-bbox="1458 708 1783 734">Žluté konce některých listů</p>
R2	 <p data-bbox="405 1289 685 1383">Mírné žloutnutí konce jednoho listu, jinak bez příznaků nakažení</p>	 <p data-bbox="741 1283 1066 1383">Na dvou rostlinách žloutnutí konce listu, jinak bez příznaků nakažení</p>	 <p data-bbox="1122 1283 1402 1340">Žluté a suché konce některých listů</p>	 <p data-bbox="1458 1219 1783 1276">Žluté a suché konce některých listů</p>

R3



Bez příznaků nakažení



Bez příznaků nakažení





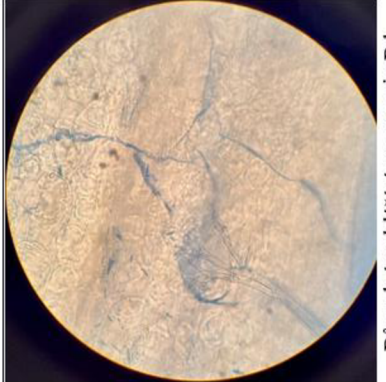
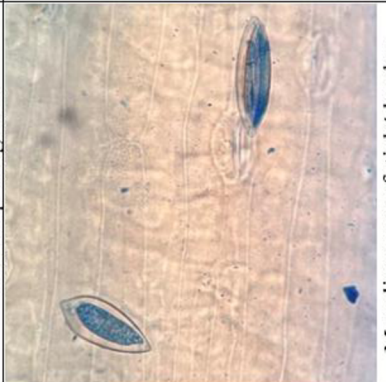
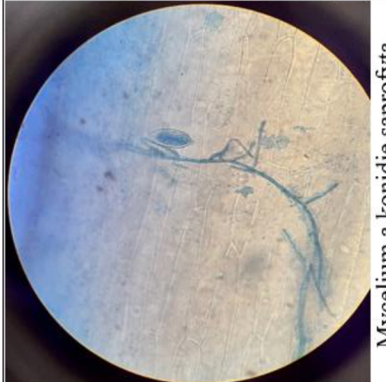



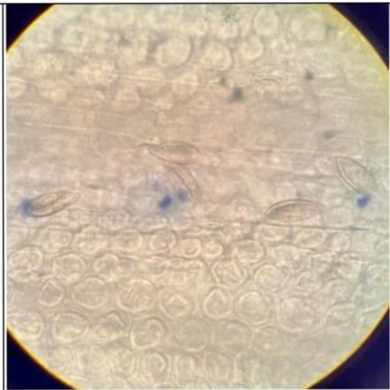
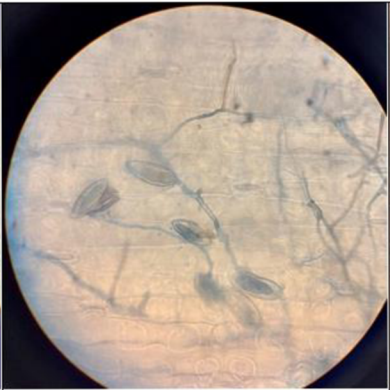
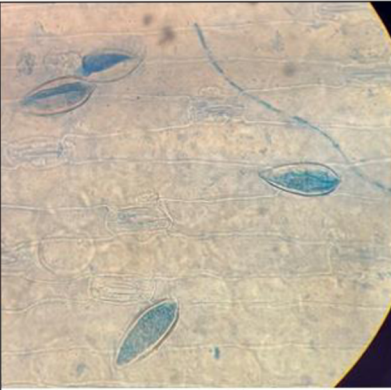
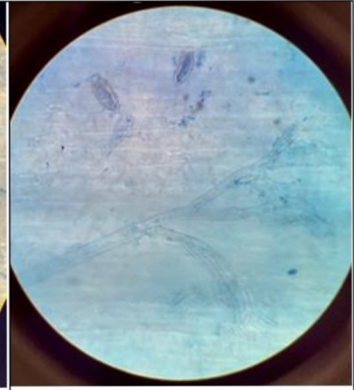
Bez příznaků nakažení



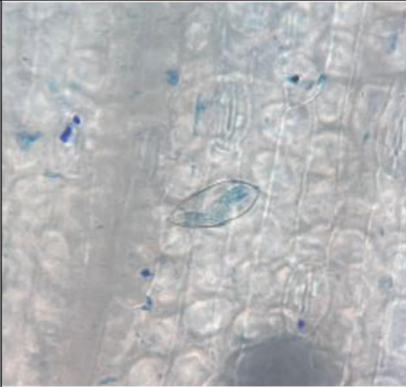
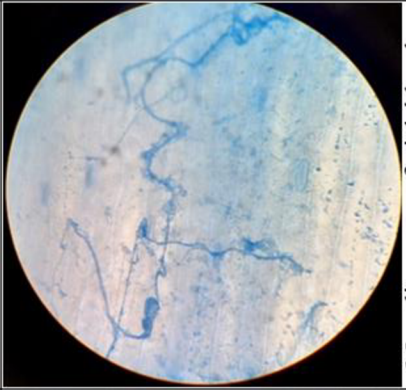
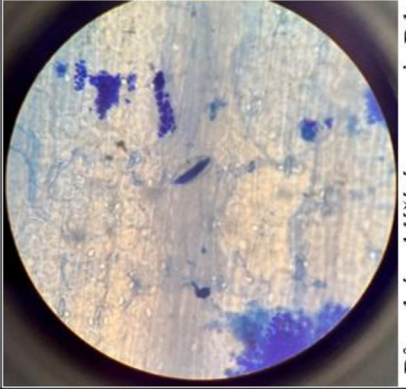
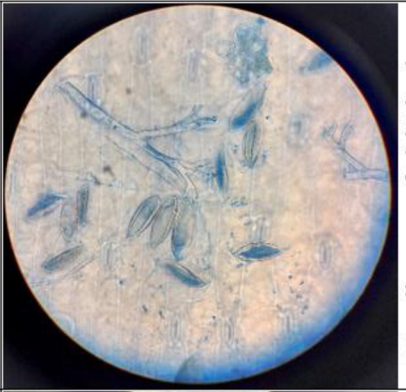
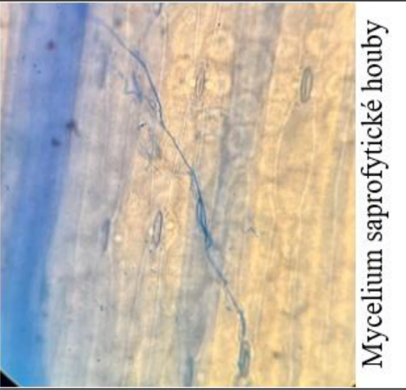


Bez příznaků nakažení

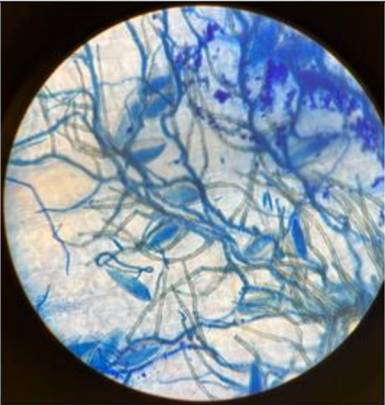
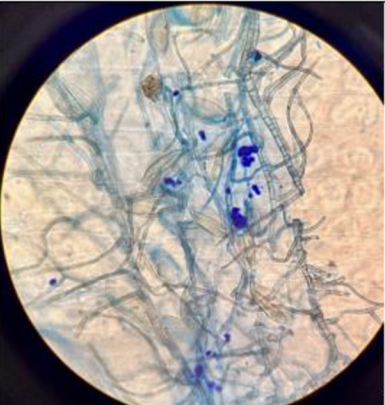

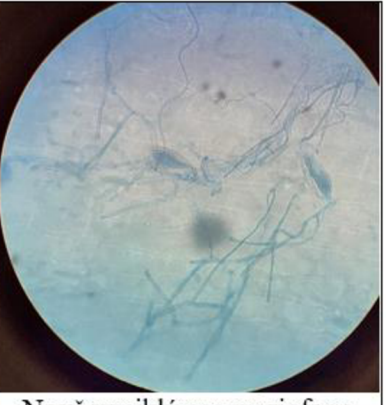
Příloha 3: Reprezentativní fotografie z mikroskopického pozorování vzorků ze segmentů (disků) cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* a kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných struktur v každém vzorku. Mikroskopované vzorky byly odebrány 6, 8, 10 a 14 dní po očkování. Zvětšení 400×.

Disky (D)	6 DPI	8 DPI	10 DPI	14 DPI
D1	 <p>Neklíčící sporangia Pd, která jsem očkovala (původní), původní klíčící sporangia Pd</p>	 <p>Původní neklíčící sporangia Pd, mycelium saprofytické houby, nově vzniklý sporangiofor a nově vzniklá sporangia Pd</p>	 <p>Nově vzniklý sporangiofor a nově vzniklá sporangia Pd, mycelium saprofytické houby</p>	 <p>Mycelium saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., konidiofor a konidie saprofyta <i>Penicillium</i> sp., nově vzniklá sporangia Pd</p>
D2	 <p>Původní neklíčící sporangia Pd, pravděpodobně původní sporangiofor Pd, klíčící původní sporangia a mycelium Pd, mycelium saprofytické houby</p>	 <p>Mycelium saprofytické houby, původní neklíčící sporangia Pd, mycelium a konidiofor s konidiemi saprofyta <i>Penicillium</i> sp.</p>	 <p>Mycelium a konidie saprofyta <i>Fusarium</i> sp., mycelium a nově vzniklá sporangia Pd, mycelium a konidiofor s konidiemi saprofyta <i>Penicillium</i> sp., mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp.</p>	 <p>Mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., nově vzniklá sporangia a mycelium Pd, mycelium saprofytické houby</p>

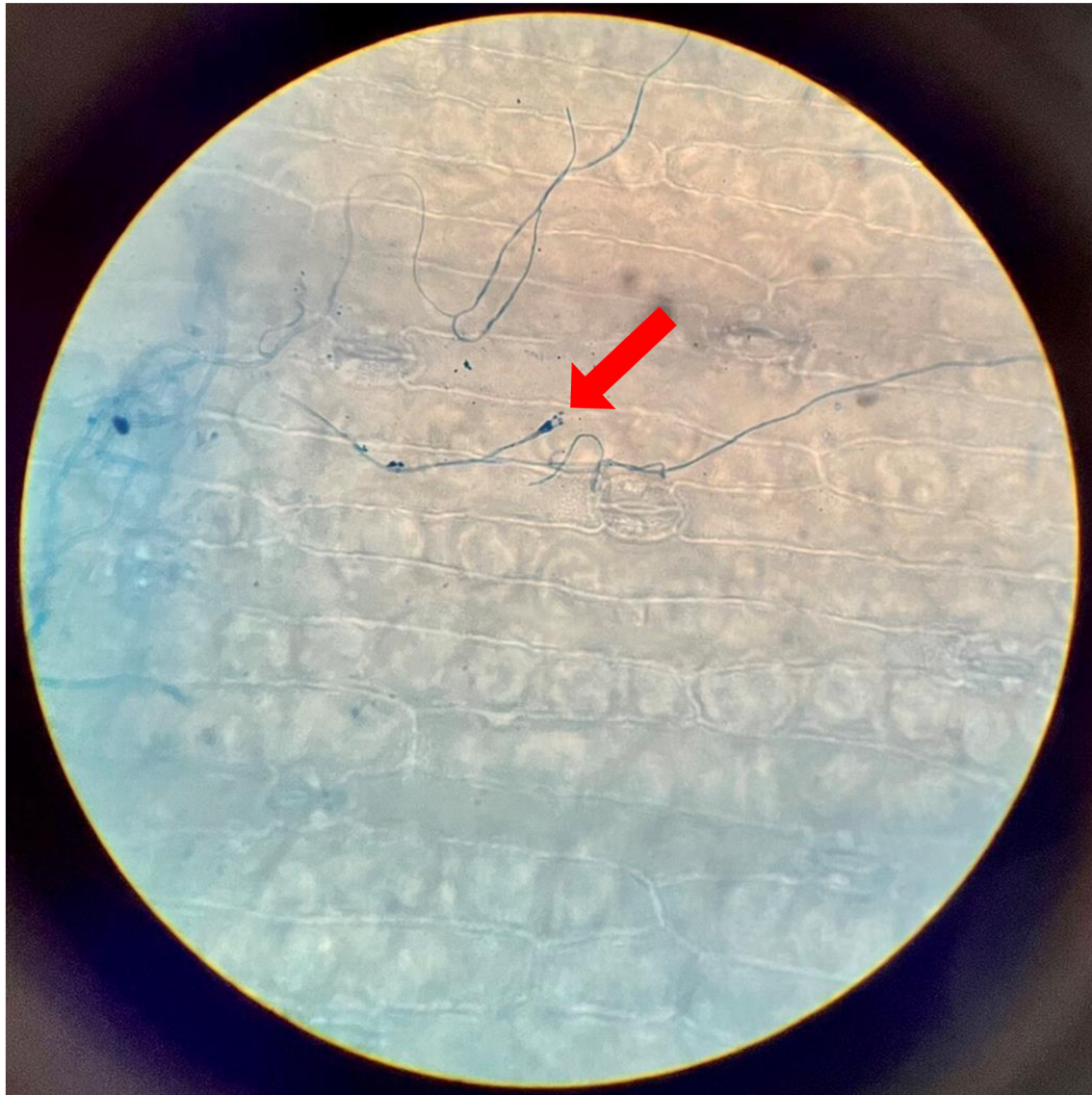
D3				
	<p>Neklíčící původní sporangia Pd, mycelium a konidiofor s konidii saprofyta <i>Penicillium</i> sp.</p>	<p>Klíčící původní sporangia Pd, mycelium saprofytické houby</p>	<p>Mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., nově vzniklá sporangia</p>	<p>Mycelium, nově vzniklé sporangiofory a nově vzniklá sporangia Pd, mycelium saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., pravděpodobně oospory Pd, mycelium a konidiofor s konidii saprofyta <i>Penicillium</i> sp.</p>

Příloha 4: Reprezentativní fotografie z mikroskopického pozorování vzorků z rostlin cibule kuchyňské naočkovaných patogenem *P. destructor* a kultivovaných ve třech režimech a popis pozorovaných struktur v každém vzorku. Mikroskopované vzorky byly odebrány 6, 8, 10 a 14 dní po očkování. Zvětšení 400×.

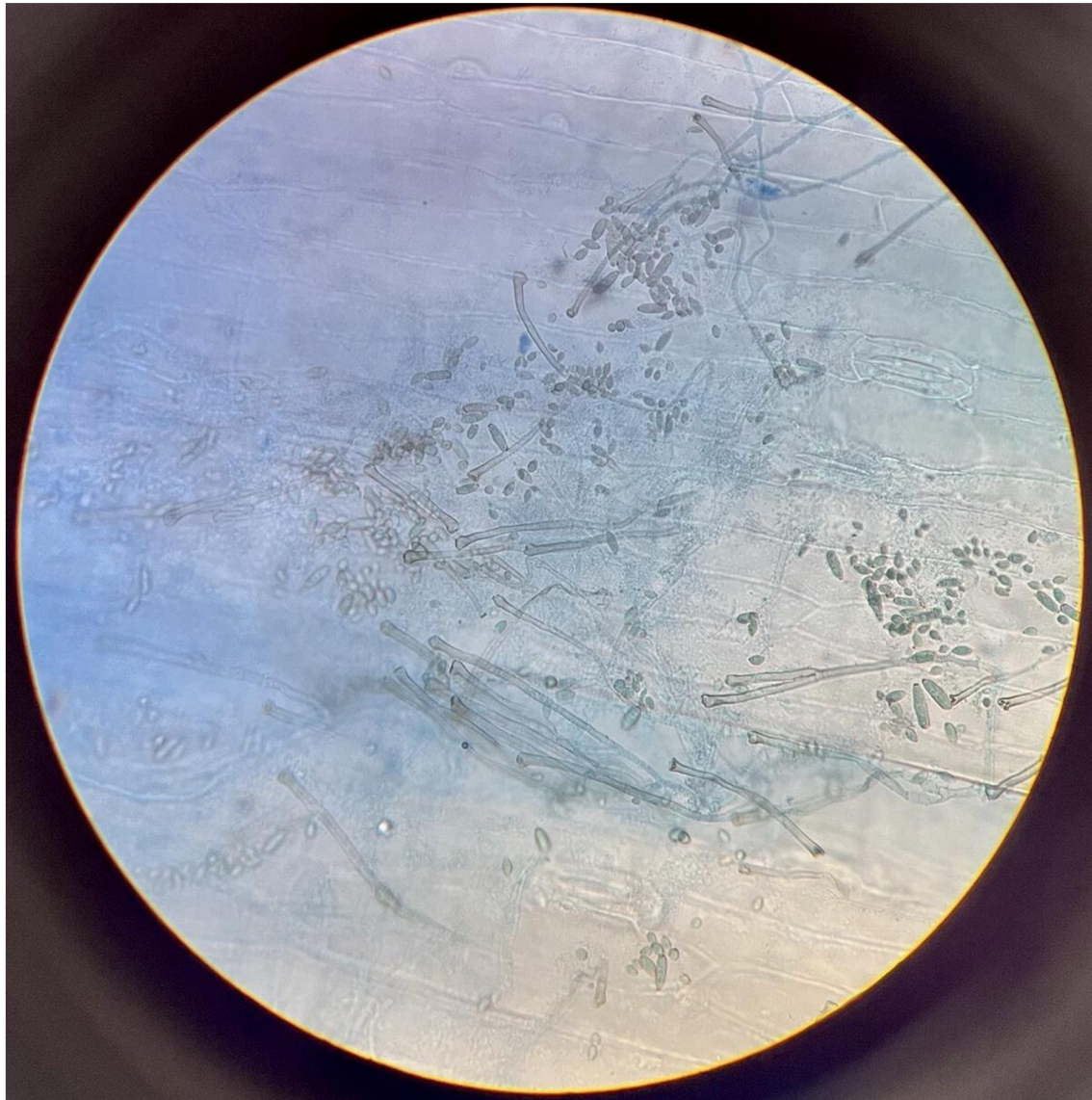
Celé rostliny (R)		8 DPI	10 DPI	14 DPI
R1	 <p>Původní neklíčící sporangia Pd</p>	 <p>Mycelium saprofytické houby</p>	 <p>Původní neklíčící sporangia Pd</p>	 <p>Mycelium saprofytické houby, nově vzniklé sporangiofor a nově vzniklá sporangia Pd, pravděpodobně oospory Pd</p>
R2	<p>Při mikroskopování v tomto vzorku nebylo nic nalezeno</p>	 <p>Mycelium saprofytické houby</p>	 <p>Pravděpodobně původní sporangia Pd, mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp.</p>	 <p>Mycelium saprofytické houby, sporangiofor pravděpodobně jiného druhu <i>Peronospora</i> sp., mycelium a konidiofor s konidiemi saprofyta <i>Penicillium</i> sp.</p>

R3	 <p data-bbox="315 603 698 861">Velké množství klíčících původních sporangií a mycelia Pd, pravděpodobně původní sporangiofor Pd</p>	 <p data-bbox="705 603 1088 861">Velké množství klíčících původních sporangií a mycelia Pd, mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., nově vzniklé sporangiofory Pd</p>	 <p data-bbox="1095 603 1478 861">Klíčící původní sporangia a mycelium Pd, nově vzniklá sporangia, mycelium a konidie saprofyta <i>Cladosporium</i> sp., mycelium saprofytické houby</p>	 <p data-bbox="1485 603 1868 861">Nově vzniklý sporangiofor a nově vzniklá sporangia Pd, mycelium saprofyta <i>Cladosporium</i> sp.</p>
----	---	---	---	--

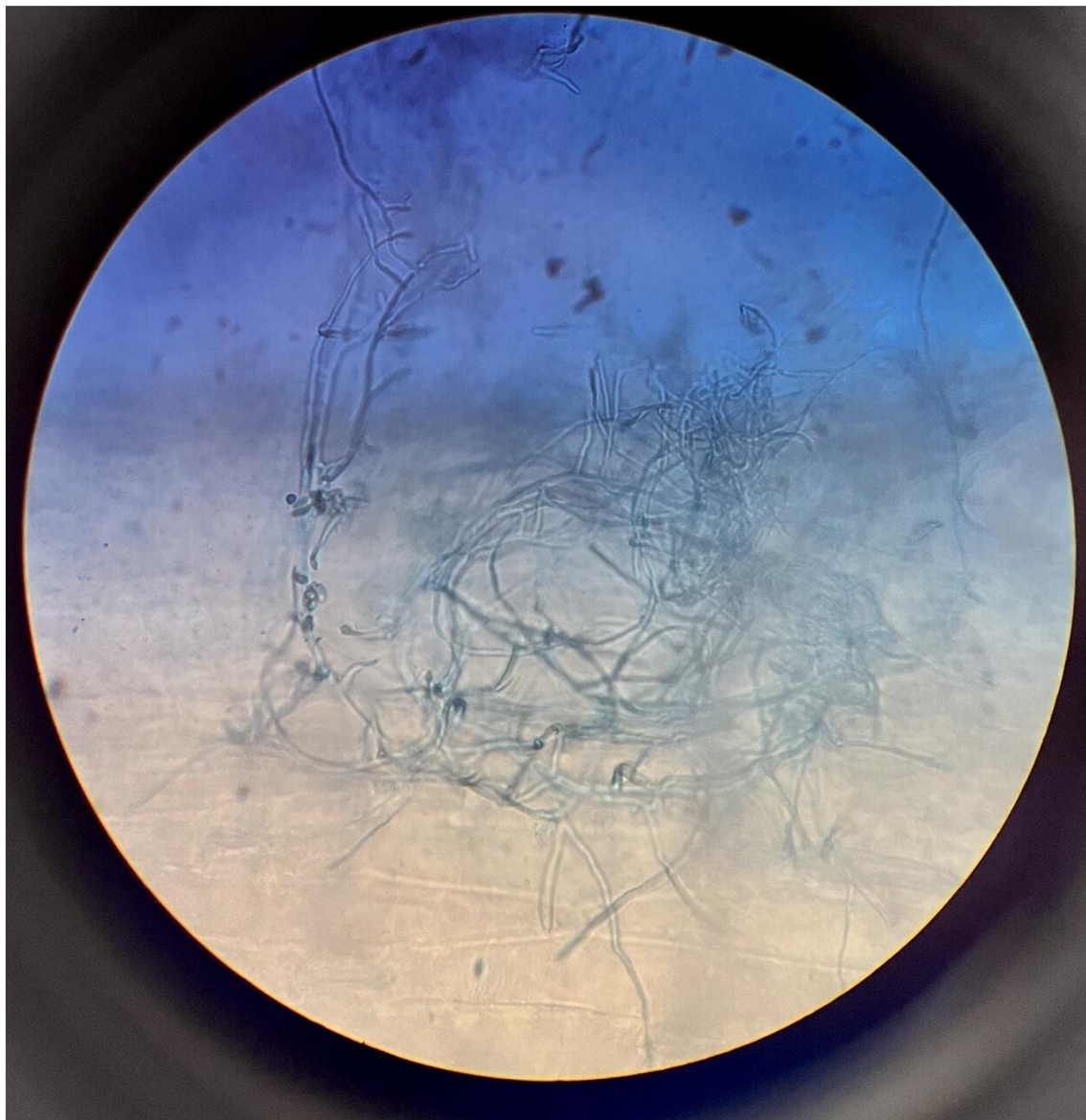
Příloha 5: Saprofytický organismus *Penicillium* sp. ze vzorku D2 8 DPI. Zvětšení 400×.



Příloha 6: Saprofytický organismus *Cladosporium* sp. ze vzorku D2 10 DPI. Zvětšení 400×.



Příloha 7: Saprofytický organismus *Fusarium* sp. ze vzorku D2 10 DPI. Zvětšení 400×.



Příloha 8: Sporangiofor pravděpodobně jiného druhu z rodu *Peronospora* sp. ze vzorku R2 14 DPI. Zvětšení 400×.

