

COST LD11021

**Rozšíření, populační struktura a patogenicita cizího invazního organismu
Phytophthora cactorum v ČR**

2011 – 2012

Závěrečná zpráva o řešení projektu

VÚKOZ, v.v.i.
MENDELU

Karel Černý
Matěj Pánek
Michal Tomšovský
Libor Jankovský
Petr Sedlák
Marcela Mrázková

Dílčí etapa E001: Získání izolátů *Phytophthora cactorum* a potvrzení jejich druhové příslušnosti.

Doba řešení: 2011

Dílčí etapa se sestává ze čtyř dílčích cílů:

- 1. Izolace kmenů *P. cactorum* z hostitelských rostlin v různých prostředích.**
- 2. Získání srovnávacích kmenů ze zahraničí.**
- 3. Oživení kmenů ze sbírky VÚKOZ.**
- 4. Morfologické potvrzení identity. ITS analýza.**

Dílčí cíl 1. Izolace kmenů *P. cactorum* z hostitelských rostlin v různých prostředích

Postup prací:

V rámci dílčího cíle byly odebírány vzorky vodivých pletiv, výhonů, kořenů i celých rostlin se symptomy napadení, které mohly být způsobeny parazitickými oomycetami (nekrózy pletiv, chlorotizace olistění, prosychání, vadnutí, chřadnutí, aj.). Vzorky nadzemních pletiv byly v laboratoři očištěny, lokalizována poškození a přechody zdravých a nekrotizovaných pletiv. Z okrajů nekróz byly odebírány segmenty pletiv (cca 3 × 3 × 3 mm), které byly povrchově dezinfikovány a umístěny na agarové plotny se selektivním PARPNH agarem, eliminujícím rozvoj saprofytické mykoflóry. Plotny byly inkubovány v termostatu při 20°C ve tmě cca 1 týden. Narostlé kolonie oomycetů byly odočkovány, čištěny na CA (mrkvový agar) médiu a izoláty uloženy do sbírky na šikmých agarech (OA) a uloženy do sbírky, kde jsou uchovávány ve tmě při cca 12 °C. Vzorky kořenů a rhizosféry byly propláchnuty a cca 0,5 l vzorku vloženo do plastové misky a přelito dionizovanou vodou na jejíž hladinu byly položeny povrchově očištěné zdravé listy rododendronu jako návnada; vzorky byly inkubovány na světle při cca 20 °C. Nekrotizovaná pletiva listů (listy byly infikovány zoosporami uvolněnými ze zoosporangií narostlých na myceliu ve vzorku) byla odebrána a bylo s nimi nakládáno stejným postupem, jak je uvedeno výše.

Výsledky:

Bylo odebráno celkem přes 350 vzorků okrasných a lesních dřevin a ovocných plodin z celého území ČR. Vzorky byly odebírány v nejrůznějších typech stanovišť a porostů – od soukromých zahrad, zahradnictví a supermarketů, přes okrasné a lesní školky, parky až po lesní a břehové porosty. Z odebraných vzorků bylo získáno více než 180 izolátů oomycetů. Vzorky byly odebrány z více než 30 taxonů dřevin (+ cca 10 kultivarů v rámci rodu *Rhododendron*). Z 12 taxonů autochtonních lesních dřevin bylo izolováno cca 100 izolátů. Zbylých cca 50 izolátů bylo získáno z cca 20 taxonů převážně okrasných listnatých dřevin. Do souboru bylo zařazeno i několik izolátů získaných z dalších pracovišť. Podrobný přehled pozitivních izolací byl uveden v dílčí zprávě za rok 2011. Tab. 1 přináší přehled pozitivních izolací oomycetů.

Celkem bylo získáno 35 izolátů *P. cactorum* a *P. hedraiaandra*, z toho 17 (49%) ze zahradnictví, 2 izoláty ze soukromých zahrad, 7 izolátů pochází z městské zeleně (stromořadí) a 2 z parku, 4 izoláty jsou z ovocných sadů a 1 z lesní školky. Z více či méně přirozených stanovišť méně antropicky ovlivněných byl získán pouze 1 izolát *P. hedraiaandra* z břehového porostu, přestože byly vzorky běžně odebírány z břehových i lesních porostů. Z výsledků je patrné (přehled izolací *P. cactorum* je v tabulce 3), že *P. cactorum* zatím v ČR obsazuje výrazně obecně více invazibilní společenstva a stanoviště – všechny izoláty pochází

z antropicky výrazně zatížených či zcela umělých systémů. Z toho lze usoudit, že *P. cactorum* je spíše v časně fázi invaze v ČR a že většinu dřívějších údajů o výskytu v ČR na lesních dřevinách (školky, lesní výsadby) je pravděpodobně možné připsat na účet velmi podobnému druhu *P. plurivora*, který se v lesních i břehových porostech v ČR běžně vyskytuje. Tomu může odpovídat poměrně nízká molekulární variabilita českých izolátů *P. cactorum* (viz molekulární část studie). Co se týče hostitelského spektra *P. cactorum*, tak pouze 7 z 32 izolátů (22%) bylo získáno z autochtonních hostitelů, což demonstruje fakt, že *P. cactorum* na území ČR spíše obsazuje stanoviště s vysokým podílem nepůvodních hostitelů, ale navíc je *P. cactorum* schopná bez problémů parazitovat i na autochtonních hostitelích v přirozených ekosystémech.

Tab. 1. Přehled pozitivních izolací provedených v rámci projektu.

izolát	lokality	hostitel	pletiva/symptom	izoloval
P 433.11	Záhořany u Jílového	Rhododendron sp.	kořeny	Mrazkova
P 434.11	Černíny u Kutné Hory	Fragaria x magna	kořeny	Filipova
P 435.11	Praha	Juniperus horizontalis	kořeny	Mrazkova
P 437.11	Roztoky	Fraxinus excelsior	kořeny	Panek
P 438.11	Roztoky	Fraxinus excelsior	kořeny	Panek
P 440.11	Černíny	Tilia cordata	kořeny	Cerny
P 441.11	Černíny	Tilia cordata	kořeny	Cerny
P 442.11	Černíny, Zavadilka	Tilia cordata	kořeny	Cerny
P 443.11	Kroměříž	Aesculus hippocastanum	kořeny	Mrazkova
P 444.11	Kroměříž	Populus termula	kořeny	Mrazkova
P 445.11	Kroměříž	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 446.11	Kroměříž	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 447.11	Otrokovice	Quercus robur	kořeny	Mrazkova
P 448.11	Čestlice	Pieris japonica	kořeny	Mrazkova
P 449.11	Smržice u Prostějova	Rhododendron sp.	výhony	Mrazkova
P 450.11	Smržice u Prostějova	Rhododendron sp.	výhony	Mrazkova
P 451.11	Černíny, Zavadilka	Tilia cordata	kořeny	Cerny
P 452.11	Černé Údolí	Acer pseudoplatanus	nekróza krčku	Cerny
P 453.11	Náměšť nad Oslavou	Syringa sp.	kořeny	Safrankova
P 454.11	Kukleny	Tilia sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 455.11	Plzeň	Pieris sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 456.11	Plzeň	Lavandula angustifolia	kořeny	Panek, Filipova
P 457.11	Plzeň	Hebe sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 458.11	Ústí nad Labem	Viburnum sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 459.11	Strážky	Calluna sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 460.11	Kukleny	Prunus sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 461.11	Hořany	Prunus sp.	kořeny	Panek, Filipova
P 462.11	Bystřice pod Hostýnem	Vaccinium sp.	kořeny	Mrazkova
P 463.11	Bystřice pod Hostýnem	Vaccinium sp.	stonek	Mrazkova
P 464.11	Bystřice pod Hostýnem	Calluna sp.	výhon	Mrazkova
P 465.11	Martinice	Rhododendron sp.	stonek	Mrazkova
P 466.11	Praha, Roztyly	Fragaria x magna	list	Mrazkova
P 467.11	Olomouc	Rhododendron sp.	list	Mrazkova
P 468.11	Přerov	Rhododendron ponticum Goldflimmer	list	Mrazkova
P 469.11	Přerov	Fraxinus excelsior	kořeny	Mrazkova
P 470.11	Albrechtický u Odry	Salix sp.	kořeny	Mrazkova
P 471.11	Přerov	Fraxinus excelsior	kořeny	Mrazkova
P 472.11	Henčlov	Rhododendron sp.	kořeny	Mrazkova
P 473.11	Vražné	Alnus sp.	kořeny	Mrazkova

P 474.11	České Budějovice	<i>Acer pseudoplatanus</i>	nekróza krčku	Cerny
P 475.11	České Budějovice	<i>Acer pseudoplatanus</i>	nekróza krčku	Cerny
P 476.11	Olomouc	<i>Fragaria x magna</i>	kořeny	Mrazkova
P 477.11	Olomouc	<i>Rhododendron sp.</i>	listy	Mrazkova
P 478.11	Týn nad Bečvou	<i>Populus tremula</i>	kořeny	Mrazkova
P 479.11	Olomouc	<i>Alnus glutinosa</i>	kořeny	Mrazkova
P 480.11	Olomouc	<i>Fraxinus excelsior</i>	kořeny	Mrazkova
P 481.11	Dubany	<i>Alnus glutinosa</i>	kořeny	Mrazkova
P 482.11	Dubany	<i>Alnus glutinosa</i>	kořeny	Mrazkova
P 483.11	Dubany	<i>Populus tremula</i>	kořeny	Mrazkova
P 484.11	Střeň	<i>Alnus glutinosa</i>	kořeny	Mrazkova
P 485.11	Hynkov	<i>Populus tremula</i>	kořeny	Mrazkova
P 486.11	Krásné Pole	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Havrdova
P 487.11	Krásné Pole	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Havrdova
P 488.11	Krásné Pole	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Havrdova
P 489.11	Tábor	<i>Pieris japonica Bonfire</i>	výhony	Cerny
P 490.11	České Budějovice	<i>Rhododendron sp.</i>	kořeny	Cerny
P 491.11	České Budějovice	<i>Tilia cordata</i>	kořeny	Cerny
P 492.11	Klatovy	<i>Tilia cordata</i>	kořeny	Cerny
P 493.11	Blatná	<i>Quercus rubra</i>	kořeny	Cerny
P 494.11	Třeboň	<i>Rhododendron sp.</i>	dieback	Cerny
P 495.11	Krásné Pole	<i>Abies sp</i>	kořeny	Havrdova
P 496.11	Přerov nad Labem	<i>Tilia cordata</i>	kořeny	Havrdova
P 497.11	Přerov nad Labem	<i>Tilia cordata</i>	kořeny	Havrdova
P 498.11	Přerov nad Labem	<i>Quercus robur</i>	kořeny	Havrdova
P 499.11	Přerov nad Labem	<i>Ligustrum vulgare</i>	kořeny	Havrdova
P 500.11	Česká Lípa	<i>Oleander sp.</i>	kořeny	Havrdova
P 501.11	Lipová	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Havrdova
P 505.11	Kroměříž	<i>Quercus sp.</i>	kořeny	Mrazkova
P 506.11	Přerov u Struhance	<i>Alnus glutinosa</i>	kořeny	Mrazkova
P 507.11	Čáslav	<i>Rhododendron sp.</i>	listy	Filipova
P 508.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Quercus robur</i>	kořeny	Panek
P 509.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Quercus robur</i>	kořeny	Panek
P 510.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Quercus robur</i>	kořeny	Panek
P 511.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Populus sp.</i>	kořeny	Panek
P 512.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Populus sp.</i>	kořeny	Panek
P 513.11	Křivé jezero, Pálava	<i>Fraxinus excelsior</i>	kořeny	Panek
P 514.11	Lotouš	<i>Berberis sp.</i>	kořeny	Panek
P 515.11	Tábor	<i>Gaultheria procumbens</i>	kořeny	Cerny
P 516.11	Tábor	<i>Calluna vulgaris</i>	kořeny	Cerny
P 517.11	Brandýs nad Labem	<i>Quercus sp.</i>	kořeny	Mrazkova
P 518.11	Brandýs nad Labem	<i>Quercus sp.</i>	kořeny	Mrazkova
P 519.11	Brandýs nad Labem	<i>Quercus sp.</i>	kořeny	Mrazkova
P 520.11	Brandýs nad Labem	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Mrazkova
P 521.11	Brandýs nad Labem	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Mrazkova
P 522.11	Brandýs nad Labem	<i>Fagus sylvatica</i>	kořeny	Mrazkova
P 523.11	Brandýs nad Labem	<i>Picea excelsa</i>	kořeny	Mrazkova
P 524.11	Přerov nad Labem	<i>Betula pendula</i>	kořeny	Mrazkova
P 525.11	Přerov nad Labem	<i>Rhododendro hybridum</i>	kořeny	Mrazkova
P 526.11	Přerov nad Labem	<i>Rhododendro hybridum</i>	kořeny	Mrazkova
P 527.11	Přerov nad Labem	<i>Rhododendro hybridum</i>	kořeny	Mrazkova
P 528.11	Přerov nad Labem	<i>Rhododendron Percy Wiseman</i>	kořeny	Mrazkova

P 529.11	Přerov nad Labem	Rhododendron Gomer Waterer	listy	Mrazkova
P 530.11	Přerov nad Labem	Rhododendron Madame Masson	listy	Mrazkova
P 531.11	Přerov nad Labem	Rhododendron caucasicum Cheer	listy	Mrazkova
P 532.11	Přerov nad Labem	Rhododendron caucasicum Cheer	listy	Mrazkova
P 533.11	Přerov nad Labem	Rhododendron yakushimanum Burretta	listy a výhony	Mrazkova
P 534.11	Přerov nad Labem	Rhododendron Madame Masson	výhony	Mrazkova
P 535.11	Přerov nad Labem	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 536.11	Přerov nad Labem	Alnus glutinosa	kořeny	Mrazkova
P 537.11	Přerov nad Labem	Betula sp.	kořeny	Mrazkova
P 538.11	Žíželice	Salix sp.	kořeny	Mrazkova
P 539.11	Žíželice	Salix sp.	kořeny	Mrazkova
P 540.11	Žíželice	Rhododendron sp.	kořeny	Mrazkova
P 541.11	Žíželice	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 542.11	Žíželice	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 543.11	Kvasice	Fraxinus excelsior	kořeny	Mrazkova
P 544.11	Kvasice	Quercus robur	kořeny	Mrazkova
P 545.11	Kvasice	Quercus robur	kořeny	Mrazkova
P 546.11	Kvasice	Tilia cordata	kořeny	Mrazkova
P 547.11	Tlumačov	Salix sp.	kořeny	Mrazkova
P 548.11	Tlumačov	Populus tremula	kořeny	Mrazkova
P 549.11	Martinice	Rhododendron sp.	list	Mrazkova
P 550.11	Praha, Pražský hrad	Buxus sempervirens	kořeny	Cerny
P 551.11	Praha, Pražský hrad	Buxus sempervirens	kořeny	Cerny
P 552.11	Lednice	Quercus robur	kořeny	Cerny
P 553.11	Lednice	Quercus robur	kořeny	Cerny
P 554.11	Lednice	Quercus robur	kořeny	Cerny
P 555.11	Tábor	Hebe sp.	kořeny	Cerny
P 556.11	Třeboň	Fagus sylvatica	kořeny	Cerny
P 557.11	Telč	Acer pseudoplatanus	kořeny	Cerny
P 558.12	Lhotky	Fagus sylvatica	kořeny	Cerny
P 559.12	Lhotky	Pinus strobus	kořeny	Cerny
P 560.12	Lhotky	Abies koreana	kořeny	Cerny
P 561.12	Frýdlant	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 562.12	Frýdlant	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 563.12	Frýdlant	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 564.12	Děčín	Acer platanoides	kořeny	Havrdova
P 565.12	Děčín	Acer platanoides	kořeny	Havrdova
P 566.12	Děčín	Quercus rubra	kořeny	Havrdova
P 567.12	Mladá Boleslav	Quercus robur	kořeny	Havrdova
P 568.12	Mladá Boleslav	Quercus robur	kořeny	Havrdova
P 569.12	Mladá Boleslav	Tilia cordata	kořeny	Havrdova
P 570.12	Broumov	Acer pseudoplatanus	kořeny	Havrdova
P 571.12	Broumov	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 572.12	České Lípa	Platanus hispanica	kořeny	Havrdova
P 573.12	Kostelec nad Orlicí	Acer pseudoplatanus	kořeny	Havrdova
P 574.12	Častolovice	Tilia cordata	kořeny	Havrdova
P 575.12	Častolovice	Tilia cordata	kořeny	Havrdova
P 576.12	Čermná nad Orlicí	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 577.12	Čermná nad Orlicí	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 578.12	Čermná nad Orlicí	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 579.12	Kohoutov	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 580.12	Kohoutov	Fagus sylvatica	kořeny	Panek

P 581.12	Kohoutov	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 582.12	Liblín	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 583.12	Liblín	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 584.12	Chrasta	Quercus robur	kořeny	Panek
P 585.12	Mýto	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 586.12	Mýto	Fagus sylvatica	kořeny	Panek
P 587.12	Broumov	Fagus sylvatica	kořeny	Havrdova
P 588.12	Poděbrady	Pieris sp.	kořeny	Havrdova
P 589.12	Mladá Boleslav	Cotoneaster microphyllus	kořeny	Havrdova
P 590.12	Česká Lípa	Cotoneaster microphyllus	kořeny	Havrdova
P 591.12	Libverda	Rhododendron sp.	kořeny	Havrdova

Dílčí cíl 2. Získání srovnávacích kmenů ze zahraničí

Pro srovnání genetické variability izolátů z České republiky s materiálem ze zahraničí a pro budoucí studii genetické variability druhu v celoevropském rozsahu byly navázány kontakty se zahraničními pracovišti. V rámci projektu COST byly provedeny výpůjčky a výměny kmenů se zahraničními pracovišti integrovanými v COST Action FP0801. Do současné doby bylo získáno 50 kmenů získaných z partnerských pracovišť z Belgie, Bulharska, Finska, Maďarska, Nizozemska a Švýcarska (Tab. 2). V jedné je získání izolátů ze Španělska.

Tab. 2. Přehled izolátů získaných ze zahraničních pracovišť.

Číslo	Předpokládaný druh	Hostitel	Původ
PD95/5111	P. cactorum x P. hedraiandra	Idesia	Nizozemí
PD20017401	P. cactorum x P. hedraiandra	Penstemon	Nizozemí
PD20025453-1	P. cactorum x P. hedraiandra	Rhododendron	Nizozemí
PD20018446-2	P. cactorum x P. hedraiandra	Rhododendron	Nizozemí
PD2002685	P. cactorum x P. hedraiandra	Rhododendron	Nizozemí
PD 07/03486667	P. cactorum x P. nicotianae	Mespilus japonica	Nizozemí
PD 07/034866598	P. cactorum x P. nicotianae	Mespilus japonica	Nizozemí
PD 97/10235	P. cactorum x P. nicotianae	Cyclamen	Nizozemí
PD 94/1166	P. cactorum x P. nicotianae	Spathiphyllum	Nizozemí
PD 93/1339	P. cactorum x P. nicotianae	Spathiphyllum	Nizozemí
PD 97/8771	P. cactorum x P. nicotianae	Lavandula	Nizozemí
M/05/0001	P. cactorum	půda	Belgie
D/05/1076	P. cactorum	Prunus laurocerasus	Belgie
M/05/0011	P. cactorum	Malus silvestris	Bulharsko
M/06/0001	P. cactorum	Fragaria x ananasa	Bulharsko
M/07/0003	P. cactorum	Viola sp.	Belgie
PI36	P. cactorum	Rhododendron	Švýcarsko
PI38	P. cactorum	Rhododendron	Švýcarsko
PI50	P. cactorum	Rhododendron	Švýcarsko
PI75	P. cactorum	Rhododendron	Švýcarsko

P/05/021	<i>P. cactorum</i> x <i>P. hedraiandra</i>	Rhododendron	Belgie
P/05/025	<i>P. cactorum</i> x <i>P. hedraiandra</i>	Rhododendron	Belgie
P163	<i>P. cactorum</i>	Manilkara zapota	Maďarsko
P259	<i>P. cactorum</i>	půda	Maďarsko
M5618	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5620	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5624	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5625	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5630	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5631	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5632	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5637	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5641	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5652	<i>P. cactorum</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5654	<i>P. cactorum</i> x <i>P. hedraiandra</i>	lesní školka	Švýcarsko
M5658	<i>P. cactorum</i> x <i>P. hedraiandra</i>	lesní školka	Švýcarsko
M6280	<i>P. cactorum</i>	půda	Švýcarsko
PI100	<i>P. cactorum</i> x <i>P. hedraiandra</i>	lesní školka	Švýcarsko
F 407	<i>P. cactorum</i>	Rhododendron	Finsko
F 414	<i>P. cactorum</i>	rybníční voda	Finsko
F 415	<i>P. cactorum</i>	<i>Betula pendula</i>	Finsko
F 416	<i>P. cactorum</i>	<i>Betula pendula</i>	Finsko
F 417	<i>P. cactorum</i>	<i>Betula pendula</i>	Finsko
F 420	<i>P. cactorum</i>	<i>Betula pendula</i>	Finsko
F 421	<i>P. cactorum</i>	rybníční voda	Finsko
F 440	<i>P. cactorum</i>	Rhododendron	Finsko
F 451	<i>P. cactorum</i>	<i>Sorbus</i>	Finsko
Ph4	<i>P. cactorum</i>	chybí údaj	Finsko
Ph 8	<i>P. cactorum</i>	chybí údaj	Finsko
Ph 20	<i>P. cactorum</i>	chybí údaj	Finsko

Dílčí cíl 3. Oživení kmenů ze sbírky VÚKOZ

Postup prací:

Během roku 2011 byly vybrány ze sbírky VÚKOZ v.v.i. izoláty označené jako *P. cactorum* uložené v letech 2007 – 2010. Izoláty byly oživeny na standardním V8-džus agarovém médiu (V8A) a pokud bylo potřeba, byly v sérii přeočkování na mrkvovém agarovém médiu (CA) přečištěny.

Výsledky:

Celkem bylo identifikováno a úspěšně oživeno a vyčištěno 27 izolátů získaných z 16 různých hostitelů vč. *Fagus sylvatica*, *Acer pseudoplatanus* a *Tilia cordata* a byly postoupeny ke zpracování v rámci dílčího cíle č. 4 (některé z nich byly ovšem jako duplikace vyřazeny –

viz zpráva za rok 2011). Ke kmenům předaným do dalších analýz pak bylo přidáno dalších 11 kmenů izolovaných během let 2011 a 2012.

Dílčí cíl 4. Morfologické potvrzení identity. ITS analýza.

Postup prací:

Determinace izolátů získaných v rámci dílčích cílů 1 a 3 byla ověřována na základě morfologických a kultivačních znaků a analýzy sekvencí ITS regionu.

Morfologická determinace byla provedena s použitím mikroskopu BH-2 při zvětšení 1600×; morfologické znaky pohlavních orgánů byly sledovány a měřeny na cca 10 dní staré kultuře na V8A a CA agarových plotnách inkubovaných ve tmě v termostatu při 20 °C. Tvorba zoosporangií byla podpořena několikadenní kultivací segmentu CA agaru vyřízlého z okraje rostoucí kolonie inkubovaného ve filtrované rybníční vodě na denním světle při 20 °C. Dále byly zjišťovány znaky v kultuře – zejména charakter a rychlost růstu kolonie na V8A agarovém médiu. Jako základní determinační znaky byly použity následující: homothalismus, paragynní antheridia, velikost oogonií a oospor, tvar (subglobózní až ovoidní) a velikost zoosporangií, tvar a velikost papil, větvení zoosporangioforů, opadavost zoosporangií, produkce zoosporangií na pevném médiu, stelátní charakter kolonie.

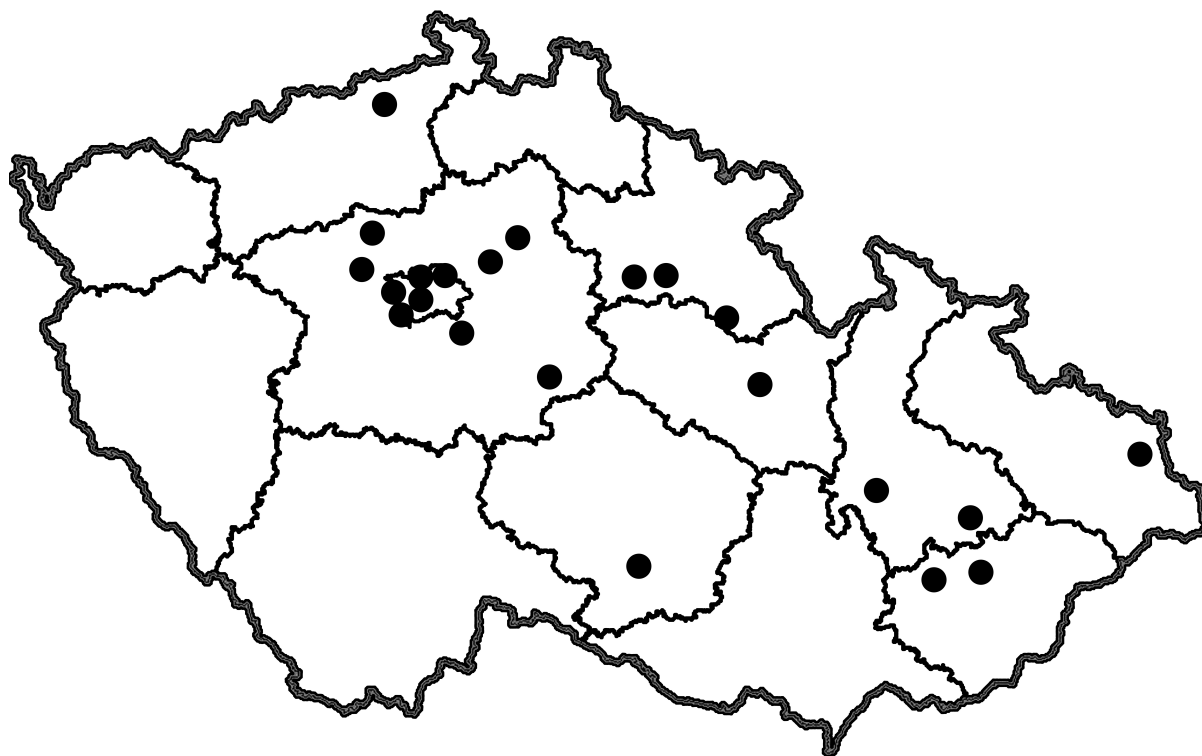
V roce 2011 bylo vyizolováno celkem 8 nových kmenů *P. cactorum* případně jejich hybridů (*Phytophthora X pelgrandis*, *P. X serendipita*) z území České republiky, v roce 2012 byly vyizolovány 3 kmeny u nichž je předpokládána příslušnost k tomuto druhu. Sekvenací ITS oblasti ribozomální DNA byla potvrzena příslušnost k druhu (případně k hybridům) u celkem 28 kmenů, přičemž 8 kmenů je nutno ještě molekulárně ověřit (bude dokončeno do března 2013). Dále byly ve sbírce VÚKOZ identifikovány tři izoláty blízké příbuzného druhu *P. hedraiaandra*. Podrobný přehled kmenů je uveden v Tab. 3, lokalizace v obr. 1.

Tab. 3. Přehled českých izolátů *P. cactorum* a *P. hedraiaandra* s ověřenou determinací.

č.	izolát	lokality	hostitel	choroba	izolace	izoloval	stanoviště	ITS
<i>P. cactorum</i>								
1	P 066.07	Kladno	Populus alba	nekróza kůry	2007	Černý	městská zeleň	+
2	P 067.07	Praha, Královská obora	Fagus sylvatica	nekróza kůry	2007	Černý	park	+
3	P 078.07	Praha, Královská obora	Fagus sylvatica	nekróza kůry	2007	Černý	park	+
4	P 082.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron catawbiense Grandiflorum	nekróza krčku	2006	Mrázková	zahradnictví	
5	P 100.07	Praha, Chodovec	Aesculus hippocastanum	nekróza kůry	2007	Černý	Městská zeleň	+
6	P 109.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron Malwine	nekróza kůry	2007	Mrázková	zahradnictví	+
7	P 111.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron Fuelhorn	skvrnitost listů	2007	Mrázková	zahradnictví	+
8	P 112.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron Biwatella	skvrnitost listů	2007	Mrázková	zahradnictví	+
9	P 113.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron Lee's Dark Purple	skvrnitost listů	2007	Mrázková	zahradnictví	+
10	P 116.07	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron hybridum V. Heckel	nekróza krčku	2007	Mrázková	zahradnictví	+
11	P 125.07	Průhonice	Rhododendron Bas de	nekróza krčku	2007	Mrázková	zahradnictví	+

		(Praha-západ)	Bruin					
12	P 216.08	Praha, Barrandov	Rhododendron Cunningham White	skvrnitost listů	2008	Mrázková	soukromá zahrada	+
13	P 251.08	Průhonice (Praha-západ)	Rhododendron sp.	skvrnitost listů	2008	Mrázková	zahradnictví	+
14	P 272.09	Havířov (Karviná)	Aesculus hippocastanum	nekróza kůry	2009	Černý	městská zeleň	+
15	P 275.09	Litomyšl (Svitavy)	Rhododendron sp.	nekróza krčku	2009	Mrázková	zahradnictví	+
16	P 277.09	Praha, Vyšehrad	Populus balsamifera	hniloba kořenů	2009	Černý	městská zeleň	+
17	P 282.09	Milovice (Nymburk)	Tilia cordata	hniloba kořenů	2009	Mrázková	městská zeleň	+
18	P 291.09	Praha, Libeň	Tilia cordata	hniloba kořenů	2009	Černý	městská zeleň	+
19	P 293.09	Praha, Libeň	Acer pseudoplatanus	hniloba kořenů	2009	Černý	městská zeleň	+
20	P 300.09	Markvartice (Třebíč)	Rhododendron Nicolas	dieback	2009	Černý	zahradnictví	+
21	P 434.11	Černýn (Kutná Hora)	Fragaria × magna	hniloba krčku	2011	Filipová	soukromá zahrada	+
22	P449.11	Smržice (Prostějov)	Rhododendron sp.	dieback	2011	Mrázková	zahradnictví	+
23	P 458.11	Ústí nad Labem	Viburnum sp.	hniloba kořenů	2011	Pánek/Filipová	zahradnictví	+
24	P 460.11	Kukleny (Hradec Králové)	Prunus sp.	hniloba kořenů	2011	Pánek/Filipová	zahradnictví	+
25	P 505.11	Kroměříž	Quercus robur	hniloba kořenů	2011	Mrázková	městská zeleň	+
26	P 530.12	Přerov nad Labem	Rhododendron "Madame Masson"	dieback	2011	Mrázková	zahradnictví	+
27	P 531.12	Přerov nad Labem	Rhododendron caucasicum group "Cheer"	dieback	2011	Mrázková	zahradnictví	+
28	P 549.11	Martinice	Rhododendron sp.	dieback	2011	Mrázková	zahradnictví	+
29	P 602.12	Radíkovice	Malus (Jonagold)	hniloba kořenů	2012	Mrázková	sad	
30	P 603.12	Slaný	Cydonia oblonga	hniloba kořenů	2012	Mrázková	sad	
31	P 604.12	Slaný	Malus (Melba)	hniloba kořenů	2012	Mrázková	sad	
32	P 605.12	Slaný	Malus (Heliodor)	hniloba kořenů	2012	Mrázková	sad	
<i>P. hedraiaandra</i>								
1	P 426.10	Týn nad Bečvou (Přerov)	Tilia cordata	hniloba kořenů	2010	Mrázková	břehový porost	+
2	P 450.11	Smržice u Prostějova	Rhododendron sp.	dieback	2011	Mrázková	zahradnictví	+
3	P 578.12	Čermná nad Orlicí (Ústí nad Orlicí)	Fagus sylvatica	hniloba kořenů	2011	Havrdová	lesní školka	+

Obr. 1. Mapa potvrzeného výskytu *P. cactorum*



V roce 2012 byla řešena dílčí etapa E002: Identifikovat vnitrodruhovou strukturu *P. cactorum* a substrátovou specifitu jednotlivých linií

Dílčí etapa se sestává ze tří dílčích cílů:

1. Provedení extrakce DNA, PCR reakce a elektroforézy
2. Konstrukce dendrogramu na základě rozdílů v RAMS markerech.
3. Provedení infekčních testů a jejich vyhodnocení

Dílčí cíl 1. Provedení extrakce DNA, PCR reakce a elektroforézy

Dílčí cíl 2. Konstrukce dendrogramu na základě rozdílů v RAMS markerech

Postup prací:

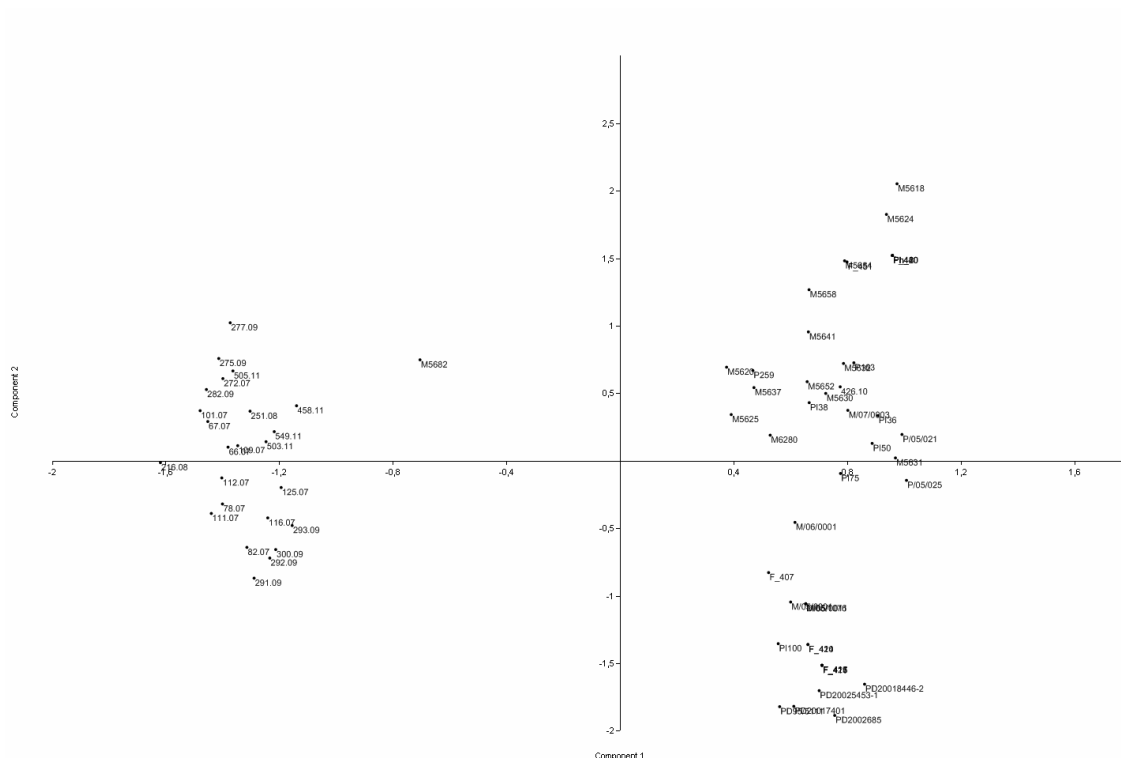
Pro populační studii je k dispozici v současné době 28 kmenů z České republiky (zahrnuje nové kmeny vyizolované během trvání projektu + starší kmeny ze sbírky kultur VÚKOZ v.v.i.) a 50 kmenů získaných z partnerských pracovišť ze zahraničí. Pro zjištění vzájemné příbuznosti kmenů *P. cactorum* byla jako první použita PCR metoda RAMS (Random amplified microsatellites) za použití tří degenerovaných primerů (CCA,CGA,GT).

Výsledky:

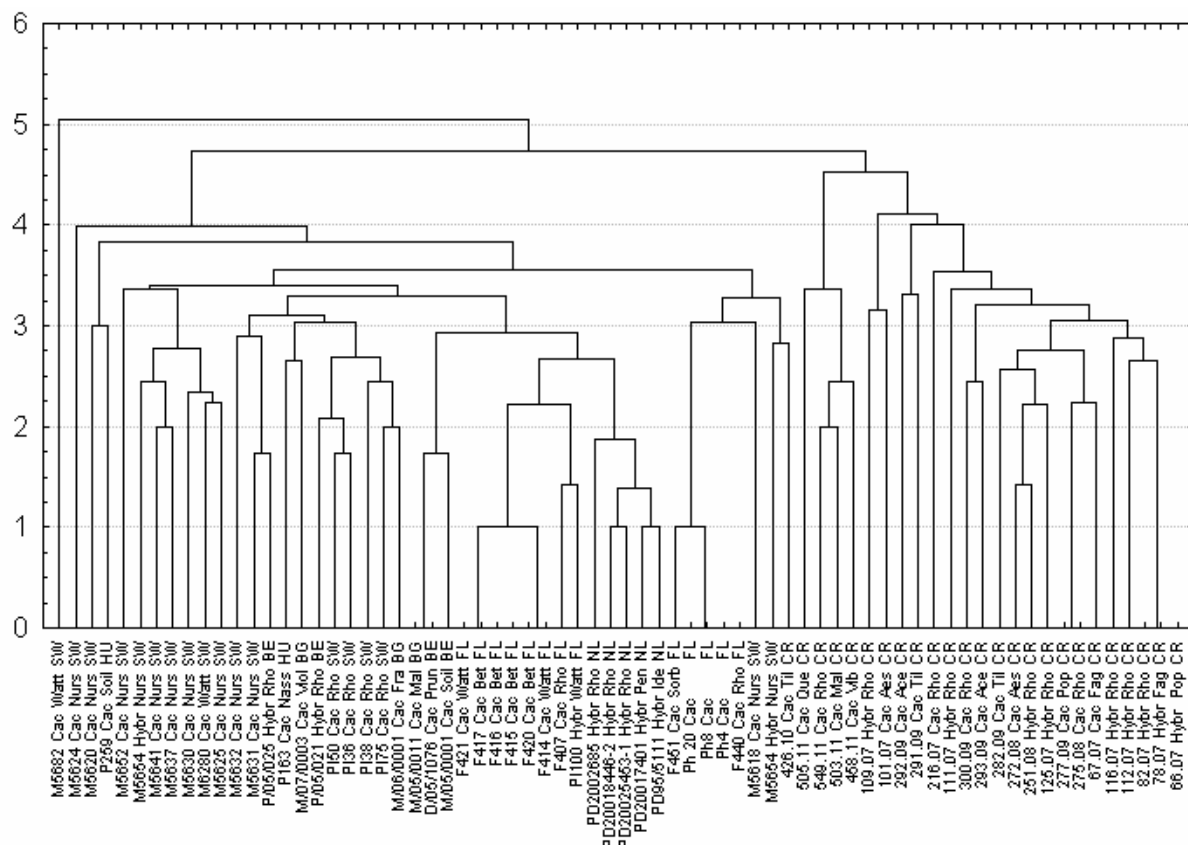
Vyhodnocení proběhlo v programu Statistica 7.0. Výsledky PCA analýzy (Analýza hlavních komponent) vzájemné příbuznosti českých a zahraničních kmenů prokázaly genetickou odlišnost české populace od zahraničních izolátů, i když tyto izoláty pocházely

z různých evropských zemí (Belgie, Bulharsko, Finsko, Maďarsko, Nizozemsko, Švýcarsko) – Obr.2. Obdobné výsledky vyplývají i ze shlukové analýzy (UPGMA- unweighted pair group method with arithmetic averages) – Obr.3.

Obr.2. PCA diagram znázorňující rozdělení kmenů *P. cactorum* na základě metody RAMS (kombinace tří prumerů). Izoláty z České republiky převládají na levé straně hlavní osy.



Obr. 2. Dendrogram shlukové analýzy (UPGMA) znázorňující rozdělení kmenů *P. cactorum* na základě metody RAMS (kombinace tří prumerů). Izoláty z České republiky převládají na pravé straně hlavní osy.



Tyto výsledky lze interpretovat třemi závěry:

- 1) Populace se liší z důvodu odlišného původu – jedná se o potomstvo různých kolonizačních vln.
- 2) Variabilita může být způsobena hybridním původem – u *P. cactorum* se předpokládá častá hybridizace s příbuznými druhy *P. hedraiaandra* (*P. X serendipita*) a *P. nicotianae* (*P. X pelgrandis*).
- 3) U patogena je vyvinuta určitá vazba na hostitele - geneticky odlišné populace kolonizují různé hostitele.

Hypotéza č. 3) nebyla potvrzena, shluková analýza nepotvrdila shlukování kmenů podle druhů hostitelů.

K ověření výsledků byla později zvolena metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Během druhé poloviny roku 2012 došlo k optimalizaci metodiky – výběru dostatečně polymorfních primerových kombinací (MseI-CC/EcoRI-AG; MseI-CA/EcoRI-AC; MseI-CA/EcoRI-AT). V současné době (prosinec 2012) probíhá rozsáhlé testování kmenů pomocí optimalizované metody. Výsledky budou známy v únoru–březnu 2013.

Morfologické vlastnosti kultury byly měřeny na 11 mikroznacích, které jsou běžně sledovány u kultur rodu *Phytophthora*. U každého kmene byl každý znak měřen 20x. Bohužel, mezi zvolenými mikroznaky byla zjištěna značná korelace, a tak pro další analýzu bylo použito jen 5 znaků: délka sporangia, délka pedicelu sporangia, průměr oospory, tloušťka stěny oospory a délka antheridia. Morfologická variabilita těchto znaků a jejich vztah ke genetické variabilitě budou předmětem další analýzy (bude dokončeno v závislosti na dokončení AFLP analýzy, únor–březen 2013). Měření rychlosti růstu při různých teplotách

(tzv. kardinální body) odhalilo velké rozdíly mezi *P. cactorum* (optimum 22°C) a *P. X pelgrandis* (optimum 30°C).

Dílčí cíl 3. Provedení infekčních testů a jejich vyhodnocení

Postup prací:

Na základě předběžných výsledků molekulárních testů bylo vybráno 10 izolátů z různých hostitelů (tab. 3). Tyto izoláty byly naočkovány na mrkvové médium (CA), přečištěny a segmenty agaru s hyfami z růstového okraje kolonie byly inokulovány povrchově dezinfikované listy rododendronu. Inokulované listy byly inkubovány 1 týden ve vlhkých komůrkách při cca 20 °C a standardním světelném režimu. Po vytvoření nekrotických pletiv byly odebrány vzorky nekrotizovaných pletiv a kmeny byly reisolovány (použité médium PARPNH) a vyčištěny. Poté byly kmeny naočkovány na CA plotny a připraveny k infekčnímu pokusu. Pletiva pokusných hostitelských dřevin – segmenty větví (délka 13 cm, průměr cca 1,5–3 cm) druhů *Fagus sylvatica*, *Populus nigra*, *Acer pseudoplatanus*, *Aesculus hippocastanum*, *Quercus robur* a zdravé listy *Rhododendron* sp., *Viburnum rhytidophyllum* byla očištěna a povrchově dezinfikována. Segmenty větví byly inokulovány do poranění (prům. 0,6 cm) odpovídajícím segmentem odebraným z agarové plotny z růstového okraje kolonie myceliem dovnitř poranění. Jako kontrola sloužily segmenty ošetřené stejným způsobem, pouze inokulované sterilním segmentem agaru. Segmenty byly inkubovány 6 týdnů svisle v termostatu při 20°C. Spodní konce segmentů byly ponořeny cca 1 cm vysoko v deionizované vodě (byla dolévána dle potřeby). Pokus byl úplně znáhodněn. Listy rododendronu a kaliny byly inokulovány (segmentem z agarové plotny o velikosti 1×1 cm) v 1 cm dlouhém příčném poranění, které bylo provedeno sterilním skalpelem na horní straně čepele listu v jejím nejširším místě. Jako kontroly sloužily listy ošetřené stejným způsobem, pouze inokulované sterilním segmentem agaru. Listy byly inkubovány při běžném světelném režimu 1 týden při 20°C. Pokus byl úplně znáhodněn. Po inkubaci byly segmenty a listy zamrazeny při -20 °C. Segmenty větví byly postupně odebírány z mrazáku, byla sloupnuta jejich borka, překreslen rozsah nekrotických pletiv na papír, oskenován a plochy změřeny v programu ImageJ. Vyhodnocení proběhlo v programu Statistica 7.0. Vyhodnocení inokulovaných listů rododendronu a kaliny proběhne z časových důvodů v zimě 2012/13.

Tab.3. Seznam izolátů použitých v infekčním testu.

č. izolátu	lokalita	hostitel	poškození	stanoviště
P 066.07	Kladno	Populus alba	nektróza krčku	městská zeleň
P 078.07	Praha	Fagus sylvatica	nektróza krčku	park
P 109.07	Průhonice	Rhododendron Malwine	nektróza krčku	školka
P 116.07	Průhonice	Rhododendron hybridum	hniloba kořenů a krčku	školka
P 272.09	Havířov	Aesculus hippocastanum	nektróza krčku	městská zeleň
P 277.09	Praha	Populus balsamifera	hniloba kořenů	městská zeleň
P 292.09	Praha	Acer pseudoplatanus	hniloba kořenů	městská zeleň
P 293.09	Praha	Acer pseudoplatanus	hniloba kořenů	městská zeleň
P 458.11	Ústí n. L.	Viburnum sp.	hniloba kořenů	zahradnické centrum
P 505.11	Kroměříž	Quercus sp.	hniloba kořenů	park

Výsledky:

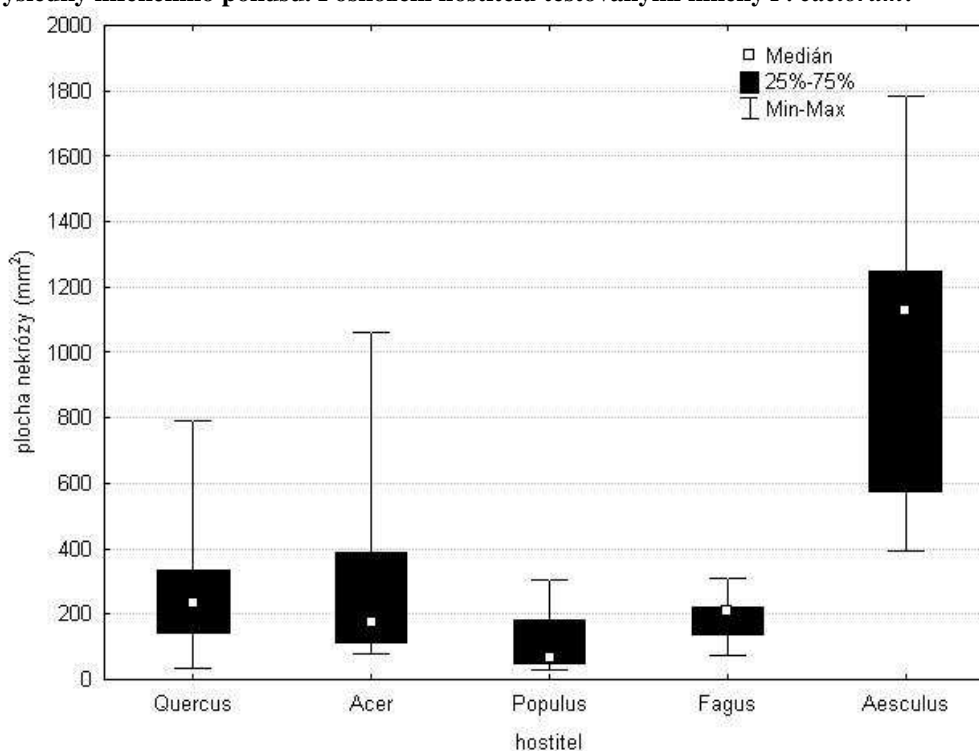
Citlivost hostitelských dřevin.

Předběžné výsledky infekčního pokusu jsou shrnuty v tabulce 4. Výsledky testu ukázaly průkaznou rozdílnost v citlivosti jednotlivých hostitelů vůči *P. cactorum* – rozdíly v ploše nektróz byly až řádové. Nejvíce odolné dřeviny byly topol černý a buk lesní, dále dub letní, javor klen, jako nejvíce citlivý byl zjištěn jírovec maďal. Průměrná velikost nektróz u jírovce maďalu byla 1016,17 mm² a výsledky Kruskal-Wallisova testu ukázaly průkazně vyšší citlivost tohoto taxonu vůči *P. cactorum* ($p < 0,01$) oproti všem ostatním testovaným dřevinám. Citlivost čtyř autochtonních taxonů dřevin se ukázala být rovněž rozdílná – jako nejvíce odolný byl identifikován topol černý a jako nejméně odolný javor klen (průměrná plocha nektróz se pohybovala mezi 114,94 až 320,47 mm²), statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny vzhledem k poměrně velké variabilitě dat (obr. 3).

Tab. 4. Výsledky infekčního pokusu. Průměrná velikost nektróz způsobených testovanými kmeny *P. cactorum* na hostitelích.

izolát	Hostitel/plocha nektrózy (mm ²)				
	<i>Quercus</i>	<i>Acer</i>	<i>Populus</i>	<i>Fagus</i>	<i>Aesculus</i>
P 066.07	334,31	310,22	81,37	202,01	693,47
P 078.07	789,93	113,04	181,63	312,09	1140,07
P 109.07	208,32	663,84	274,27	221,75	577,31
P 116.07	310,27	80,33	302,51	222,85	542,06
P 272.09	182,75	1063,35	65,21	216,50	1236,88
P 277.09	139,47	124,78	38,20	75,06	1115,92
P 292.09	144,26	141,78	63,37	138,68	1250,36
P 293.09	262,67	209,47	28,47	207,60	1428,67
P 458.11	362,36	389,90	47,14	212,52	1786,12
P 505.11	33,36	107,99	67,19	105,25	390,81
průměr	276,77	320,47	114,94	191,43	1016,17

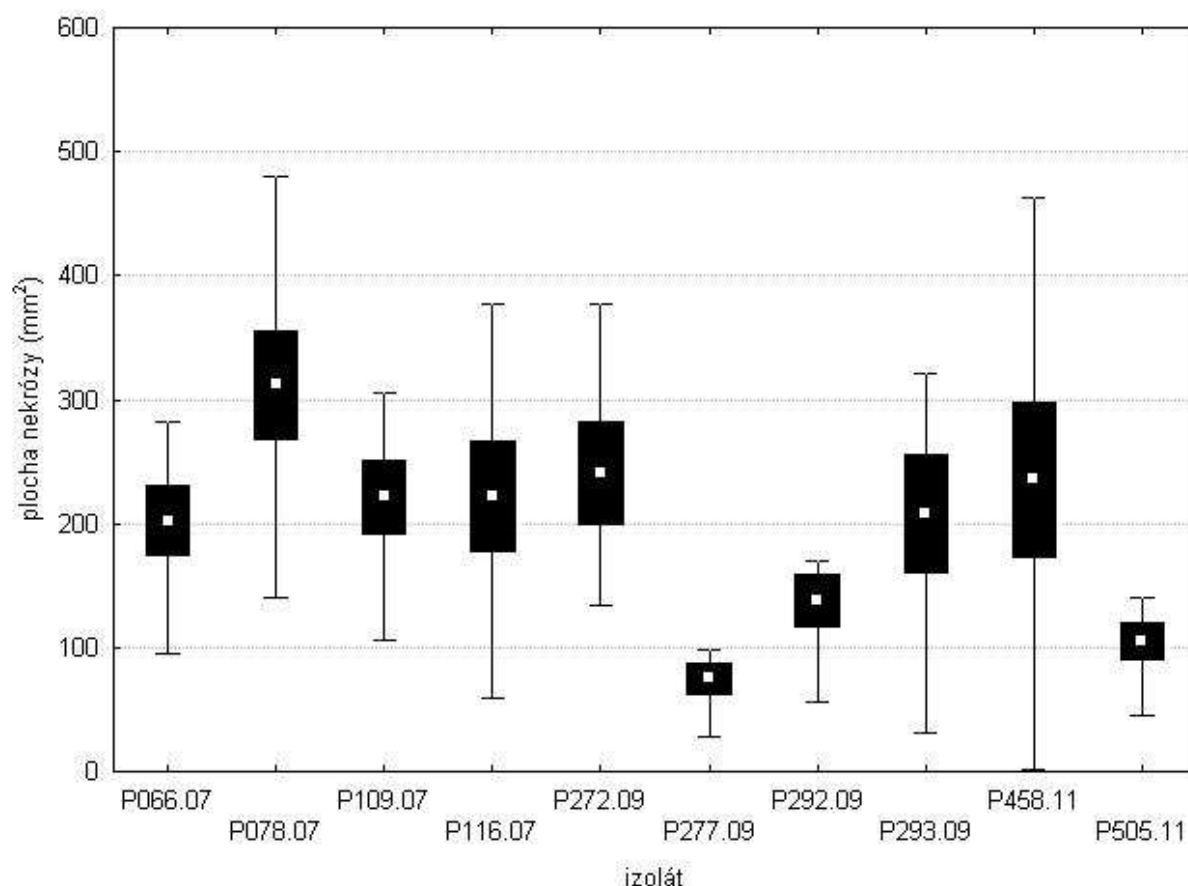
Obr. 3. Výsledky infekčního pokusu. Poškození hostitelů testovanými kmeny *P. cactorum*.



Dále byly zjištěny značné rozdíly v patogenitě testovaných izolátů. Bylo ale zjištěno, že variabilita v patogenitě testovaného souboru izolátů není výrazně host-specifická a poškození způsobené jednotlivými izoláty na různých hostitelích má relativně podobný průběh – tj. lze identifikovat spíše obecně více patogenní a méně patogenní izoláty. Toto schéma patogenity je na hranici průkaznosti ($p=0,08$). Jako nejvíce patogenní byl identifikován kmen P078.07 z buku lesního a naopak jako nejméně patogenní kmen P505.11 z dubu letního.

Významnou hladinu substrátové specifity bylo možné vysledovat pouze ojediněle v případě izolátu P078.07 z buku. Izolát způsobil výrazně větší poškození na buku než izoláty z ostatních dřevin, přičemž rozdíly oproti některým jiným izolátům (P277.09, P458.11 a P505.11) byly statisticky průkazné ($p<0,01$; obr. 4). Prozatím nebyly zjištěny významné rozdíly v patogenitě izolátů z okrasných dřevin a dřevin lesních.

Obr. 4. Rozsah poškození buku testovanými izoláty *P. cactorum*. (V grafu zobrazen průměr, chyba průměru a rozsah neodlehých hodnot.)



Zjištěné výsledky infekčního testu lze shrnout a interpretovat následovně. V rámci české populace *P. cactorum* existuje variabilita v patogenitě jednotlivých izolátů. Patogenita izolátů není host-specifická – lze identifikovat spíše obecně více patogenní a méně patogenní izoláty v rámci testovaného spektra hostitelů. Substrátová specifita české populace se jeví jako poměrně nízká.

Lze tedy předpokládat, že *P. cactorum* je pravděpodobně ve střední Evropě cizí a její původní hostitelské spektrum je odlišné od spektra testovaného. Míra adaptace (hostitelská specifita) na různé místní hostitele je pravděpodobně nízká. Na základě výsledků infekčních testů lze spíše předpokládat příbuznost většiny testovaných izolátů. Proces ustavování populace druhu v ČR pravděpodobně stále probíhá.

Jednotlivé kmeny *P. cactorum* mohou v ČR pravděpodobně bez problémů parazitovat a přežívat na širokém spektru hostitelů.

Výstupy projektu:

Vzhledem k širokému spektru izolátů získaných v rámci projektu, byly dosud publikovány nebo přijaty dva výstupy:

Mrázková M., Černý K., Tomšovský M., Strnadová V., Gregorová B., Holub V., Pánek M., Havrdová L. & Hejná M. (2013, přijato): *Phytophthora multivora* is established in natural stands in the Czech Republic and involved in oak decline. Plant Protection Science.

Předpokládá se publikování dalších výstupů zaměřených na

1. Populační struktura *P. cactorum* a jejích hybridů (*Phytophthora X pelgrandis*, *P. X serendipita*) v ČR a v Evropě (IF)
2. Výskyt *P. hedraiaandra* v ČR (SCOPUS)
3. Výskyt *P. cinnamomi* na *Sarracenia* spp. pěstovaných v umělých kulturách (SCOPUS).

Karel Černý a kol., prosinec 2012