

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Hana Křižňanská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Genetická diverzita a populačně genetická
struktura evropských populací *Plasmopara*
*halstedii***

Bakalářská práce

**Hana
Křižňanská**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Olomouc 2020

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

PŘEDKLÁDÁ:	ADRESA	OSOBNÍ ČÍSLO
KRIŽŇANSKÁ Hana	Hlavní třída 380/33, Havířov - Město	R16715

TÉMA ČESKY:

Genetická diverzita a populačně genetická struktura evropských populací *Plasmopara halstedii*

TÉMA ANGLICKY:

Genetic diversity and population genetic structure of European populations of *Plasmopara halstedii*

VEDOUcí PRÁCE:

RNDr. Miloslav Kítner, Ph.D. - BOT

ZÁSADY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1. Teoretická část - Shromáždění dostupných literárních zdrojů a vypracování literární rešerše na dané téma (molekulární markery používané pro populačně genetické studie obecně, problematika mikrosatelitních markerů, mikrosatelitní markery publikované u zástupců oomycet a především *P. halstedii*).
2. Praktická část - analýza cca 90ti vzorků *P. halstedii* z několika evropských států pomocí 7-10ti mikrosatelitních markerů (extrakce DNA, PCR reakce, detekce PCR produktů).
3. Vyhodnocení získaných dat a interpretace výsledků.

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY:

- Drábková Trojanová, Z., Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Lebeda, A. (2018). Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflower in the Czech Republic. - *Plant Pathology* 67: 136-144.
- Kalia et al. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Rivera, Y., Salgado-Salazar, C., Gulya, T. J., Crouch, J. A. (2016). Newly emerged populations of *Plasmopara halstedii* infecting rudbeckia exhibit unique 2 genotypic profiles and are distinct from sunflower-infecting strains. *Phytopathology* 106: 752-761
- Sharma, R., Xiaojuan, X., Cano, L. M., Evangelisti, E., Kemen, E., Judelson, H., Oome, S., Sambles, Ch., van den Hoogen, D. J., Kítner, M., Klein, J., Meijer, H. J. G., Spring, O., Win, J., Zipper, R., Bode, H. B., Govers, F., Kamoun, S., Schornack, S., Studholme, D. J., van den Ackerveken, G., Thines, M. (2015). Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. *BMC Genomics*, 16: 741-764.
- Selkoe et al. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Spring, O., Bachofer, M., Thines, M., Riethmüller, A., Göker, M., Oberwinkler, F. (2006). Intraspecific relationship of *Plasmopara halstedii* isolates differing in pathogenicity and geographic origin based on ITS sequence data. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 309-315.
- Spring, O., Zipper, R. (2018): New highly aggressive pathotype 354 of *Plasmopara halstedii* in German sunflower fields. *Plant Protection Science* 54: 83-86.
- Trojanová, Z., Sedlářová, M., Gulya, T.J., Lebeda, A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower - a review. *Plant Pathology* 66: 171-185.
- Zane et al. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16

Podpis vedoucího práce:

Miloslav Měk

Datum: *5.3.2018*

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, Dr.Sc. et Ph.D.

Podpis vedoucího pracoviště:

Měk

Datum: *14-03-2018*

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Hana Křižňanská

Název práce: Genetická diverzita a populačně genetická struktura evropských populací
Plasmopara halstedii

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Klíčová slova: genetická variabilita, mikrosatelity, obligátně biotrofní parazité rostlin,
Plasmopara halstedii

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Souhrn

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na polymorfní markery *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, a jejich využití pro genetickou analýzu variability evropských populací.

Teoretická část je zaměřena na charakteristiku třídy Oomycetes, čeledi Peronosporaceae, biologie, životního cyklu a hostitelského okruhu *Plasmopara halstedii*. Druhá polovina teoretické části je věnována mikrosatelitům, jejich klasifikaci a použití v populačně genetických studiích.

V rámci experimentální části byla provedena analýza 162 vzorků *Plasmopara halstedii* pomocí 40 mikrosatelitních markerů. Ze 40 markerů bylo označeno jako polymorfní 11 mikrosatelitních markerů. Tyto markery byly následně využity k populačně genetickým analýzám pěti metapopulací z České republiky, Německa, Francie, Ruska a Maďarska, a srovnávány se vzorky z dalších oblastí.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Hana Křižňanská

Title: Genetic diversity and population genetic structure of European populations of
Plasmopara halstedii

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of cell biology and genetics, PřF UP in Olomouc

Supervisor: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Key words: genetic variability, microsatellites, obligate biotrophic plant pathogens,
Plasmopara halstedii

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary

In this bachelor thesis I focus on polymorphic markers of *Plasmopara halstedii*, the cause of sunflower downy mildew, and their usage for genetic analysis of variability of its European populations.

The theoretical part characterises class Oomycetes, family Peronosporaceae, with focus on biology, life cycle and host range of *Plasmopara halstedii*. The second half of theoretical part is dedicated to microsatellites, their classification and usage in population genetic studies.

Within the experimental part of this thesis, 162 samples of *Plasmopara halstedii* were analyzed using 40 microsatellite markers. Out of the 40 markers, 11 microsatellite markers were identified as polymorphic. These markers were then used for genetic analysis of 5 metapopulation from the Czech Republic, Germany, France, Russia and Hungary, and were compared with samples from other areas.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod odborným vedením RNDr. Miloslava Kitnera, Ph.D. s použitím níže uvedených zdrojů.

V Olomouci dne

Tímto děkuji svému školiteli RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph.D. za poskytnuté materiály, jeho ochotu, čas, vstřícnost a trpělivost, kterou mi během práce na této bakalářské práci věnoval. Dále děkuji konzultantce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za její odborné připomínky a Mgr. Lucii Vaculné za ochotu a pomoc se statistickým zpracováním výsledků. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu.

Obsah

Obsah.....	v
Seznam symbolů a zkratek.....	vii
Seznam obrázků.....	ix
Seznam tabulek.....	x
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled.....	3
3.1 Charakteristika třídy Oomycetes.....	3
3.1.1 Čeleď Peronosporaceae.....	4
3.1.2 <i>Plasmopara halstedii</i> (Farlow) Berlese & de Toni.....	5
3.2 Mikrosatelity.....	9
3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů.....	10
3.2.2 Metody detekce alel mikrosatelitních markerů.....	11
3.2.3 Molekulární markery užívané v taxonomických a populačně genetických studiích <i>Pl. halstedii</i>	12
4 Materiál a metody.....	15
4.1 Biologický materiál.....	15
4.2 Použité chemikálie.....	19
4.3 Použité roztoky a jejich příprava.....	20
4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	21
4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	22
4.5.1 PCR reakce a detekce PCR produktů.....	23
4.5.2 Statistické hodnocení.....	29
5 Výsledky.....	31
5.1 Variabilita testovaných markerů.....	31
5.2 Variabilita metapopulací <i>Pl. halstedii</i>	32

5.3	Shlukovací analýzy.....	34
6	Diskuze	38
7	Závěr	42
8	Literatura.....	43

Seznam symbolů a zkratek

AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i> , polymorfismu délek amplifikovaných fragmentů
bp	<i>base pair</i> (pár bází)
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequences</i> , štěpené amplifikované polymorfní sekvence
CF	klonální frakce
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleosidtrifosfáty
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F _{ST}	Wrightův fixační index
GD	genotypová diverzita
H _E	<i>expected heterozygosity</i> , očekávaná heterozygotnost
H _O	<i>observed heterozygosity</i> , pozorovaná heterozygotnost
HW	Hardy-Weinbergovo ekvilibrium
M	<i>gene flow</i> , tok genů
Mbp	<i>mega base pair</i> (milion páru bází)
MLG	multilokusový genotyp
N _A	počet alel
N _E	počet efektivních alel
PA	počet privátních alel
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
PIC	<i>polymorphic information content</i> , polymorfní informační obsah
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i> , náhodně amplifikovaná polymorfní DNA

\bar{r}_d	index asociace
SNP	<i>single nucleotide polymorfism</i> , jednonukleotidový polymorfismus
STR	<i>short tandem repeats</i>
SSR	<i>simple sequence repeats</i>
rpm	otáčky za minutu (<i>revolutions per minute</i>)
T_a	teplota <i>annealingu</i>
UPGMA	<i>unweighted pair-group method using arithmetic averages</i>
VNTR	<i>variable number tandem repeats</i>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zjednodušený fylogenetický strom eukaryot ukazující vzdálený vztah oomycet a hub (Fungi). (Převzato z McGowan *et* Fitzpatrick, 2020).

Obrázek 2: Sporulace plísňe slunečnicové na spodní straně listu slunečnice roční (*Helianthus annuus*). (Převzato z: <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5498158>, 24. 3. 2020).

Obrázek 3: Průběh PCR reakce se značeným M13 primerem (upraveno podle Schuelke, 2000).

Obrázek 4: Mapa geografického původu testovaných vzorků *Plasmopara halstedii*. Barva odpovídá poskytovatelům vzorků (červená: dr. Bán; fialová: dr. Iwebor a dr. Antonova; modrá: prof. Spring; žlutá: doc. Sedlářová).

Obrázek 5: Elektroforetogram PCR produktů polymorfního mikrosatelitního markeru PH-072. Písmena A–L označují vzorky *Pl. halstedii*. Šipky označují polohu detekovaných alel. Počet alel: 3.

Obrázek 6: Index asociace (\bar{r}_d) vypočítaný z 9999 opakování pro (A) všechny analyzované vzorky a (B–F) pro metapopulace s počtem vzorků vyšším než pět.

Obrázek 7: Fylogenetický strom 162 vzorků *Pl. halstedii* vytvořený metodou UPGMA (Bruvova distance, 1000 replikací).

Obrázek 8: Populačně genetická struktura 162 vzorků *Pl. halstedii* vygenerovaná pomocí Bayesovského shlukování v programu Structure.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled počtu testovaných vzorků *Plasmopara halstedii*, s uvedením země původu a poskytovatele materiálu (MS, Michaela Sedlářová; OS, Otmar Spring; RB, Rita Bán; IA; Maria Iwebor a Tatiana S. Antonova).

Tabulka 2: Přehled mikrosatelitních markerů použitých v této bakalářské práci s uvedením základního motivu repetice a literárního zdroje.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi.

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce.

Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi se značeným M13 primerem.

Tabulka 6: Podmínky PCR reakce pro přípravu fluorescenčně značených produktů.

Tabulka 7: Charakteristiky polymorfních mikrosatelitních markerů.

Tabulka 8: Genetická a genotypová variabilita metapopulací *Pl. halstedii* (A) detekovaná pomocí 11 polymorfních mikrosatelitních markerů; a (B) porovnání variability vzorků z *H. annuus* a *H. x laetiflorus*.

Tabulka 9: Zjištěné hodnoty toku genů (M, gene flow, pod diagonálou) a statisticky významné rozdíly F_{ST} ($p = 0,001$) mezi vybranými metapopulacemi.

1 Úvod

V této bakalářské práci jsem se zabývala analýzou genetické variability a populačně genetické struktury izolátů plísně slunečnicové (*Plasmopara halstedii*) pocházejících z několika evropských států, doplněné o izoláty ze Severní a Jižní Ameriky. *Plasmopara halstedii* se řadí mezi zástupce třídy Oomycetes, čeledi Peronosporaceae a rodu *Plasmopara*. Je to obligátně biotrofní parazit, který má široký okruh hostitelů. Jedním z nejvíce postižených hostitelů je slunečnice roční (*Helianthus annuus*).

Pro tyto analýzy byly využity mikrosatelitní markery, tedy krátké tandemové repetice, dlouhé 1–6 bází, uplatňující se jako genetické markery hlavně při studiu struktury populací nebo analýzy paternity. Jejich výhodou je kodominance, vysoká míra polymorfismu a rozšíření v celém genomu. Byl prováděn výběr variabilních a dobře hodnotitelných markerů, a to pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), s následnou separací a detekcí PCR produktů pomocí polyakrylamidových gelů nebo kapilárního sekvenátoru. Získaná data byla hodnocena na několika úrovních - podle variability jednotlivých markerů; genetické variability metapopulací pocházejících z různých států; a rovněž konstrukcí grafických výstupů přibližující vzájemné vztahy mezi izoláty.

2 Cíle práce

1. Shromáždění dostupných literárních zdrojů a vypracování rešerše na dané téma.
2. Analýza 162 vzorků *Plasmopara halstedii* pocházejících z několika evropských států pomocí 40 mikrosatelitních markerů:
 - a) provést extrakci genomické DNA ze spor;
 - b) PCR reakce;
 - c) detekci PCR produktů pomocí elektroforetické separace.
3. Vyhodnocení získaných dat a interpretace výsledků.

3 Literární přehled

3.1 Charakteristika třídy Oomycetes

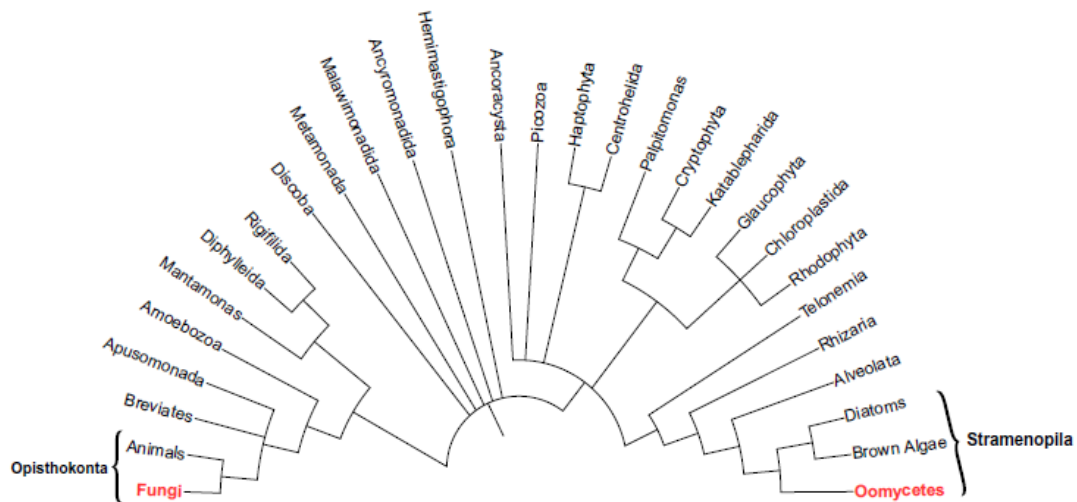
Třída Oomycetes zahrnuje houbám podobné heterotrofní organismy, spolu s rozsivkami a hnědými řasami řazené do infraříše Stramenopila (McGowan *et* Fitzpatrick, 2020), která je součástí eukaryotické superskupiny SAR (Adl *et al.*, 2018). Zástupci této třídy jsou saprofyté nebo parazité eukaryotních hostitelů obývajících jak moře, sladké vody, tak půdní ekosystémy, a jsou uváděni jako ekonomicky významné patogeny hospodářských rostlin (Lamour *et* Kamoun, 2009). Velmi rozmanité jsou z hlediska svého životního stylu, patogenity a okruhu hostitelů. Více než 60 % všech známých druhů oomycet představují patogeny rostlin (Thines *et* Kamoun, 2010). Mezi nejznámější zástupce patří plíseň bramborová (*Phytophthora infestans*), způsobující plíseň bramboru, rajčat a dalších zástupců čeledi Solanaceae, *Phytophthora sojae* nebo *Phytophthora cinnamoni*, která má velmi široký okruh hostitelů a může infikovat až 3000 hostitelských druhů (McGowan *et* Fitzpatrick, 2020). Své rostlinné hostitele nezabijí, ale působí velké škody (Spring *et al.*, 2018). Oomycety jsou významnými patogeny nejen rostlin, ale i mikroorganismů, hmyzu, korýšů, ryb a obratlovců (Kamoun, 2003). Vodní oomycety jsou na rozdíl od pevninských druhů méně prozkoumány (Derevnina *et al.*, 2016). Dříve byla onemocnění způsobená těmito organismy nazývána mykózy, v současnosti se používá označení oomycetózy. Buněčné stěny se skládají z polymerů β -1,3-glukanu a celulózy, obsahují ovšem málo chitinu, což je u hub podobným organismům nezvyklé (Kamoun, 2003). Přes podobnosti v morfologii a rozmnožování mají oomycety k houbám fylogeneticky velmi daleko, jak je zřejmé z Obrázku 1 (McGowan *et* Fitzpatrick, 2020).

Oomycety se pravděpodobně vyvinuly v mořském prostředí, podle současných poznatků se předpokládá, že přechod na souš proběhl v rámci této třídy nejméně čtyřikrát nezávisle po sobě (Thines *et* Kamoun, 2010). Parazitismus rostlin se v rámci oomycet vyvinul nezávisle nejméně třikrát. Stejně jako další fytopatogeny, i oomycety jsou schopny produkovat široké spektrum efektorových proteinů, kterými ovlivňují metabolické děje svých hostitelů (Thines *et* Kamoun, 2010).

Velikost genomu zástupců této třídy leží v rozmezí 33,9–295,3 Mbp (McGowan *et* Fitzpatrick, 2020). Zajímavým aspektem genomu oomycet je fakt, že druhy vykazují různé varianty ploidie a mohou existovat i jako triploidi nebo polyploidi (Derevnina *et al.*, 2016).

Patogenní oomycety způsobují závažné ekonomické ztráty a poškození ekosystémů (Derevnina *et al.*, 2016). Klíčem k úspěchu patogenních oomycet spočívá v jejich schopnosti přizpůsobit

se a zároveň překonat obranné mechanismy hostitele a přejít na nové hostitele. Jedním ze způsobů, který to umožňuje, je schopnost rozmnožovat se sexuálně a/nebo asexuálně čili klonálně (Thines, 2014). Porozumění evolučním mechanismům může pomoci v integrované ochraně proti oomycetózám (Sharma *et al.*, 2015).



Obrázek 1: Zjednodušený fylogenetický strom eukaryot ukazující vzdálený vztah oomycet a hub (Fungi). (Převzato z McGowan *et Fitzpatrick*, 2020).

3.1.1 Čeleď Peronosporaceae

Zástupci čeledi Peronosporaceae jsou parazitující patogenní organismy, označované v české literatuře jako *plísně* nebo *nepravá padlí* a v anglické literatuře pojmem *downy mildews*. V rámci této čeledi bylo popsáno více než 19 rodů a 700 druhů (Thines *et Choi*, 2016). V průběhu napadení hostitele (patogeneze) se u nich vytváří tzv. haustoria, jimiž pronikají buněčnou stěnou hostitelské buňky bez narušení její cytoplasmatické membrány. V takovém případě hostitelská buňka nehynie a může dále zásobovat patogena metabolity (Spring *et al.*, 2018). Biotrofie neboli vazba parazita na živá pletiva hostitele (Vleeshouwers *et Oliver*, 2014) se v rámci skupiny peronospor vyvíjela pozvolně, přes tzv. oportunní patogenismus a hemibiotrofii (Thines *et Kamoun*, 2010). Oportunní patogeny obvykle nepoškozují hostitele, ale mohou se stát patogenními při vystavení organismu stresu nebo během stárnutí (Brown *et al.*, 2012). Hemibiotrofie je kombinací počáteční a přechodné biotrofie následované nekrotrofií a saprotrofií (Horbach *et al.*, 2011). U některých zástupců čeledi Peronosporaceae se vyvinul vysoký stupeň specializace na hostitele, který vede k obligátní biotrofii se snižováním dopadu na fitness hostitele (Thines *et Kamoun*, 2010). Obligátní biotrofie

je způsob života, kdy není patogen schopen dokončit svůj životní cyklus bez hostitele, tj. bez svého hostitele nemůže být ani kultivován (Gascuel *et al.*, 2015).

3.1.2 *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni

Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. & de Toni (1888), česky nazývaná vřetenatka slunečnicová nebo také plíseň slunečnicová, je jedním ze 144 zástupců rodu *Plasmopara* (Index Fungorum, 2020). Jelikož je *Pl. halstedii* obligátní biotrofní parazit, nelze ji kultivovat bez žijícího hostitele (Sharma *et al.*, 2015). Hostitelem zástupců rodu *Plasmopara* jsou výhradně rostliny (Kamoun, 2003). *Pl. halstedii* je původcem onemocnění označované jako plíseň slunečnicová. *Plasmopara* je diploidní, homothalická a rozmnožuje se jak sexuálně, tak klonálně (Gascuel *et al.*, 2015). *Pl. halstedii* byla označena jako 16. nejvýznamnější zástupce oomycet, jak po ekonomické, tak vědecké stránce (Drábková Trojanová *et al.*, 2018). Velikost genomu *Pl. halstedii* odpovídá 75,3 Mbp (Sharma *et al.*, 2015).

Taxonomické zařazení *Plasmopara halstedii*

Synonyma názvu: *Peronospora halstedii* Farl., (1882) *Plasmopara helianthi* Novot., (1962)

Doména:	Eukaryota
Infraříše:	Stramenopila
Říše:	Chromista
Kmen:	Oomycota
Třída:	Oomycetes
Řád:	Peronosporales
Čeleď:	Peronosporaceae
Rod:	<i>Plasmopara</i>
Druh:	<i>Plasmopara halstedii</i>

3.1.2.1 Geografické rozšíření patogena

Plasmopara pochází ze Severní Ameriky, kde byla poprvé objevena botanikem Byronem D. Halstedem na rostlině *Eupatorium purpureum* v roce 1876. Později byla popsána Farlowem (Trojanová *et al.*, 2017). Okolo roku 1960 byla objevena v Rusku a západní Evropě, kam se pravděpodobně dostala infikovanými semeny (Gascuel *et al.*, 2015). Celosvětově bylo identifikováno více než 44 patotypů (Trojanová *et al.*, 2017). Tento patogen byl nalezen ve většině zemí světa, ve kterých se pěstuje slunečnice, jako jsou například: USA, Kanada, Francie, Španělsko, Německo, Ukrajina a Rusko (Gascuel *et al.*, 2015). Je ovšem rozšířen i v jižní Americe, Asii, Africe a Oceánii (Šindelková *et al.*, 2008).

3.1.2.2 Hostitelské rostliny

Plasmopara halstedii sensu lato má velmi široký okruh hostitelských rostlin. Jedná se především o zástupce řádu hvězdicotvarých (Asterales). Dodnes je známo alespoň 35 různých druhů rostlin čeledi Asteraceae, které *Pl. halstedii* napadá, především zástupce podčeledí Asteroideae a Chicorideae (Rivera *et al.*, 2016).

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) je jednoletá bylina, původem ze Severní Ameriky. Lodyha je jednoduchá, dlouhá 1–2,5 metrů se střídavými listy. Úbory jsou jednotlivé a koncové, otáčí se za sluncem. Je pěstována po celém světě hlavně pro své olejnaté nažky, ale i jako okrasný druh (Kirschner *et Šída*, 2004).

Slunečnice pozdní (*Helianthus x. laetiflorus* Pers) je robustní vytrvalá bylina. Tento druh vznikl křížením slunečnice tuhé (*Helianthus pauciflorus*) a slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus*). Hojně je pěstována v Severní Americe a v Evropě, často pro okrasu (Kirschner *et Šída*, 2004).

Kromě slunečnic je *Pl. halstedii* patogenem třapatky (*Rudbeckia*), pelyňku (*Artemisia*), nestařce (*Ageratum*), ambrosie (*Ambrosia*), zlatobýlu (*Solidago*), mužáku (*Silphium*), kozí brady (*Tragopogon*), sporýše (*Verbena*), sporýšovky (*Verbesina*), řepeně (*Xanthium*), hvězdnice (*Aster*), chrpy (*Centaurea*) a dalších rodů rostlin (Šindelková *et al.*, 2008).

3.1.2.3 Biologie a životní cyklus

Přestože je *Pl. halstedii* půdním patogenem, její biologie a potažmo i životní cyklus jsou kriticky závislé na vodě a hostitelské rostlině. Životní cyklus *Pl. halstedii* začíná tlustostěnnou

osporou, která vzniká sexuálním rozmnožováním a přezimovala v půdě (Šindelková *et al.*, 2008). Tato oospora má na povrchu tlustou buněčnou stěnu, díky které může přežít v půdě až deset let (Sedlářová *et al.*, 2010). Nejdůležitějšími faktory prostředí, které ovlivňují infekci a šíření *Pl. halstedii*, jsou teplota a vlhkost. Optimální teplota pro klíčení oospor je 14–16 °C (Šindelková *et al.*, 2008). Z oospory klíčí zoosporangium, ze kterého se do vody uvolňují dvojbičíkaté zoospory (Gascuel *et al.*, 2015). Za příznivých klimatických podmínek jsou v některých oblastech považovány infekce sporangii za důležitý faktor pro šíření choroby, obvykle jsou ale málo významné (Šindelková *et al.*, 2008). Zoospory ve vodě zůstávají pohyblivé několik hodin (Cabi, 2020). Zoospora v průběhu několika hodin klíčí a vstupuje do kořene napadené rostliny. Zoospory *Plasmopary* uvolněné ze zoosporangií odvozených od oospor napadnou kořeny slunečnice na začátku jara a tím dojde k primární infekce. V případě, že zoospory infikují mladé semenáčky slunečnice, dochází k vážným infekcím. Prvním způsobem vstupu zoospor do rostliny je přímý vstup do buňky kořene. Druhým způsobem je vstup skrze poranění, která se často nachází u báze kořenových vlásků. Hyfy *Pl. halstedii* prostupují skrz intercelulární prostor směrem ke vzrostnému vrcholu napadené rostliny (Gascuel *et al.*, 2015). Za vhodných podmínek (vysoká vzdušná vlhkost a středně vysoká teplota) nastává na napadených listech asexuální sporulace (Cabi, 2020). Vyrůstají zoosporangiofory se zoosporangii. Ta jsou rozšířena větrem na okolní rostliny, kde mohou uvolnit až 20 zoospor (Gascuel *et al.*, 2015). Takto dochází k sekundární infekci, která způsobuje na listech léze ohraničené žilnatinou (Sedlářová *et al.*, 2020).

Ve vzácných případech dochází k proniknutí spor skrz průduchy listů (Gascuel *et al.*, 2015). Koncem sezony dochází k sexuálnímu rozmnožování, při němž splývají samčí antheridium se samičím oogoniem. Výsledkem je tlustostěnná oospora. *Pl. halstedii* je druh homothalický, což znamená, že k sexuálnímu rozmnožování není třeba setkání dvou fyziologicky odlišných mycelií (Sedlářová *et al.*, 2010). Způsoby přenosu *Pl. halstedii* mohou být různé. Může být přenášena větrem nebo vodou, nejčastěji je však přenášena kontaminovanou půdou. Jelikož je počet napadených semen nízký, přenos semeny se objevuje velmi sporadicky a tato problematika je předmětem soustavné diskuse (Spring, 2019). Bylo zjištěno, že druhotná infekce prostřednictvím sporangií je schopná v průběhu sezóny vyvolat v rostlinách latentní (bezpříznakové) onemocnění a vytvořená semena mohou přenášet houbu v latentní formě (Šindelková *et al.*, 2008). K zamoření areálu dochází při opadu rostlinných zbytků a jejich následném zpracování do půdy (Spring, 2001).

3.1.2.4 Symptomy

Symptomy primární infekce závisí na množství inokula, stáří pletiva, podmínkách prostředí a na odrůdové reakci. Plíseň se objevuje po celou dobu vegetace (Šindelková *et al.*, 2008). Nejmarkantněji se příznaky projevují zmenšeným vzrůstem rostlin, změnou barvy listů a sporulací patogena na spodní straně listu (Gascuel *et al.*, 2015). Mezi další příznaky patří infekce kořenů, systémová infekce lodyhy, infekce květního úboru a listová infekce v podobě hranatých skvrn na listech. Napadení listu postupuje od báze listu směrem ke špičce (Šindelková *et al.*, 2008). Na spodní straně listu se za vlhka objevuje bělavý, později šedavý vyvýšený povlak sporangioforů s nepohlavními zoosporangii (Obrázek 2) (Sedlářová *et al.*, 2010). Během růstu slunečnice dochází k sekundární infekci. Ta je způsobena zoosporami, které jsou uvolněny ze zoosporangii sousedních nakažených rostlin. Symptomy sekundární infekce většinou nebývají tak závažné jako symptomy primární infekce (Gascuel *et al.*, 2015). Většina systémově infikovaných rostlin tvoří jen ojediněle životaschopná semena, anebo odumře ještě před dozráním semen (Šindelková *et al.*, 2008).



Obrázek 2: Sporulace plísně slunečnicové na spodní straně listu slunečnice roční (*Helianthus annuus*). (Převzato z: <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5498158>, 24. 3. 2020)

3.1.2.5 Detekce a identifikace *Plasmopara halstedii* v hostiteli

Pro detekci *Pl. halstedii* v hostiteli je úspěšně používána metoda ELISA, což je enzymová imunologická metoda sloužící k detekci antigenů, založená na vysoce specifické interakci antigenu s protilátkou. Používá se k detekci patogenu v potenciálně napadených pletivech

(Liese *et al.*, 1982). Světelná mikroskopie je využívána k orientačnímu vyšetření napadených rostlin. Posuzují se morfologické znaky infekčních struktur plísně, především monopodiálně větvené sporangiofory na koncích větví zúžené a zakončené většinou třemi sterigmaty (stopečkami), nesoucími vejčité až eliptické hyalinní sporangia (Šindelková *et al.*, 2008).

V ochraně slunečnice a především půdy před promořením *Pl. halstedii* se využívá komplex opatření - hybridní slunečnice s geny rezistence, výsev v optimálním termínu a mořené osivo, které díky přítomnosti fungicidu ochrání náchylnou rostlinu v kritických prvních fázích růstu (Drábková Trojanová *et al.*, 2018; Kazda *et al.*, 2018; Sedlářová *et al.*, 2020).

Předmětem soustavného (byť prozatím neúspěšného) vývoje je navržení PCR testů pro detekci jednotlivých ras patogenu (Šindelková *et al.*, 2008). Pro molekulární identifikace patogena jsou používány běžné barkodingové markery - např sekvenace ITS regionu (*Internal Transcribed Spacer*) - viz kapitola Molekulární markery užívané v taxonomických a populačně genetických studiích *Pl. halstedii*.

3.2 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující motivy o délce 1–6 bází, které byly nalezeny v genomech všech doposud zkoumaných prokaryotických i eukaryotických organizmů (Zane *et al.*, 2002). Vyskytují se také v genomu mitochondrií a chloroplastů. Pro mikrosatelity je charakteristický nízký stupeň opakování na lokusu (5–100) (Kalia *et al.*, 2011). Mikrosatelity se obvykle nachází v nekódujících oblastech genomu, kde může dojít k záměně, ztrátě nebo naopak ke zvětšení počtu nukleotidů, a následně k fixaci takové změny. Výskyt v kódujících oblastech genomu je méně častý (Zane *et al.*, 2002). V anglické literatuře se nejčastěji označují jako *simple sequence repeats* (SSR), méně často jako *variable number tandem repeats* (VNTR) nebo *short tandem repeats* (STR) (Selkoe *et al.*, 2006).

Mikrosatelity vykazují vysokou míru polymorfismu, jsou kodominantní a jsou rozšířeny po celém genomu (Bennet, 2000). DNA obklopující mikrosatelitní lokus se nazývá *flanking region* neboli ohraničující repetice. Tato oblast je na rozdíl od vlastního mikrosatelitu vysoce specifická pro konkrétní druh nebo skupinu blízké si příbuzných druhů, a jsou do ní cíleny primery, jejichž pomocí je možno daný lokus amplifikovat. S tím souvisí hlavní nevýhoda uváděná u mikrosatelitních markerů, tedy že jejich primery musí být izolovány *de novo* pro každý druh, což je náročné jak časově tak finančně (Dutech *et al.*, 2007). Vysoká specifita použitých primerů je nezbytná i při taxonomických studiích herbářových položek, kdy

je při extrakci DNA použita část infikovaného listu a extrahovaná DNA obsahuje jak DNA patogena, tak DNA hostitelské rostliny (Choi *et al.*, 2015). To potom komplikuje nebo znemožňuje využití markerů založených na univerzálních primerech (AFLP, RAPD) a upřednostňuje použití metod využívající specifické primery (Giresse *et al.* 2007, Delmotte *et al.*, 2008, Choi *et al.*, 2015), včetně mikrosatelitních markerů (Rouxell *et al.*, 2012).

Další nevýhodou mikrosatelitních markerů je přítomnost nulových alel. Nulové alely se nachází u většiny taxonů a jsou způsobeny mutací v sekvenci vázající primer, která zabraňuje amplifikaci postižené alely (Carlsson, 2008). Alelová homoplazie popisuje stav, kdy se dvě různé alely jeví jako identické, ale nepochází od společného předka (Estoup *et al.*, 2002).

Obecně jsou mikrosatelitní lokusy využívány pro svou vysokou míru variability pro analýzu paternity, konstrukci genových map, mapování genů a pro zjištění genetických a evolučních vztahů (Kalia *et al.*, 2011). V populačně genetických studiích je právě vysoký stupeň polymorfismu mikrosatelitů využíván ke sledování genetické struktury a diverzity populací patogenů (Salgado-Salazar *et al.*, 2015).

Mechanismus vzniku variability v mikrosatelitním lokusu umožňující detekovat rozdíly mezi jedinci je označován jako "*DNA slippage*" nebo "*slipped strand mispairing*". Dochází k němu v průběhu replikace DNA (Bennet, 2000). Komplex DNA polymerázy a nově syntetizovaného vlákna se může dočasně oddělit od templátového vlákna DNA. V úsecích vlákna, které obsahuje repetitivní sekvence, se DNA polymeráza znovu spojí s templátovým vláknem (Sehn, 2015). V důsledku nesprávného párování dojde ke skluzu mezi templátovým a nově vznikajícím vláknem. Vlákno nenasedne do správné pozice, a to se buď může prodloužit, anebo zkrátit právě o repetitivní sekvenci. Nespárovaná část DNA vlákna vytvoří smyčku neboli "*loop*". Pokud je smyčka vytvořena na nově syntetizovaném vlákně, dojde k přidání opakujícího se motivu repetitivní sekvence. Pokud smyčka vznikne na templátovém vlákně, je nucena se vystříhnout. Obvykle dojde k posunu o jednu nebo více jednotek repetice (Bennet, 2000).

3.2.1 Klasifikace mikrosatelitů

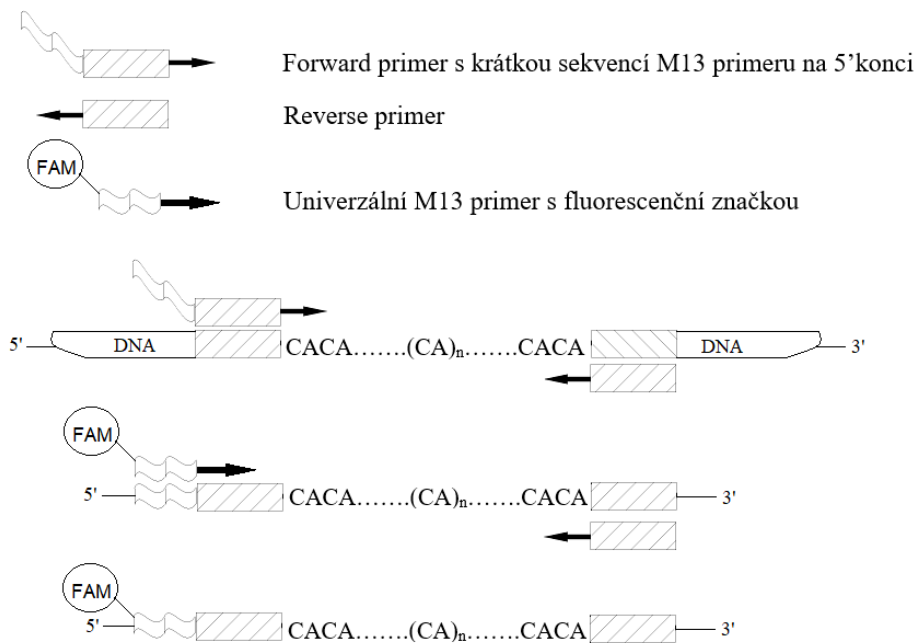
Mikrosatelity lze klasifikovat na základě typu opakující se sekvence, počtu nukleotidů a lokalizace v genomu (Kalia *et al.*, 2011). Na základě typu opakující se sekvence se dělí na dokonalé, nedokonalé, přerušené a složené (Oliviera *et al.*, 2006). Dokonalé mikrosatelity jsou tandemové sekvence jednoduchého motivu [např. (CA)_n], zatímco nedokonalé mikrosatelity jsou dokonalé sekvence přerušené neopakujícím se motivem [např. (AAC)_n ACT

(AAC)_m]. U složených mikrosatelitů se vyskytují dva základní motivy (Kalia *et al.*, 2011). Podle počtu nukleotidů v repetici lze rozdělit mikrosatelity na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexa- nukleotidy (Sharma *et al.*, 2007). Dinukleotidy, trinukleotidy a tetranukleotidy jsou nejčastěji využívané pro molekulární genetické studie (Selkoe *et al.*, 2006). Dle lokalizace mikrosatelitů v genomu je lze rozdělit na jaderné (nuSSR), chloroplastové (cpSSR) a mitochondriální (mtSSR) (Kalia *et al.*, 2011).

3.2.2 Metody detekce alel mikrosatelitních markerů

Při detekci mikrosatelitních alel hledáme rozdíly v délce fragmentů lišících se často pouze o 1–2 nukleotidy. Elektroforetická separace v agarozovém gelu je pro odlišení takových rozdílů nevhodná a v zásadě lze využít dvou postupů. Jednak se jedná o starší přístup, kdy se PCR produkty separují ve velkých polyakrylamidových sekvenačních gelech, a následně jsou detekovány ve formě šedých až hnědých pruhů vyredukováním stříbra. Druhým způsobem je separace pomocí kapilárního sekvenátoru, který detekuje fragmenty DNA označené fluorescenční značkou. Velkou výhodou tohoto přístupu je možnost kombinování PCR produktů značených různými fluorescenčními značkami, jejich současnou separaci a detekci během jednoho běhu sekvenátoru (kapilární elektroforézy). K tomuto účelu se k PCR reakci jeden z použitých primerů modifikuje fluorescenční značkou. Pokud je separace provedena na systémech fy. ABI (Applied Biosystems), je třeba primery modifikovat (podle filtru daného přístroje) jedním z fluorochromů např. řady FAM, VIC, NED, PET. U sekvenátoru GeXP firmy Beckman je třeba primery modifikovat jednou z tzv. Well Red Dyes (D2, D3, D4). Nevýhodou značení primerů fluochromy je jejich relativně vysoká pořizovací cena. V případech, kdy je například testována sada nových markerů a nelze vyloučit jejich (ne)funkčnost, se jako alternativní postup používá značení pomocí fluorescenčně značených M13 primerů (tzv. M13 značení) (Schuelke, 2000). Při tomto postupu jdou při přípravě PCR směsi kromě obvyklých reagensů použity tři druhy primerů: 1) neznačený reverzní primer; 2) neznačený forward primer prodloužený na 5' konci o tzv. M13 sekvenci o délce 21 nukleotidů, která odpovídá 3) univerzálnímu M13 primeru s fluorescenční značkou na 5' konci. Při přípravě PCR mixu se používá nízká (poloviční) koncentrace forward primeru oproti použité koncentraci reverse primeru. Zajímavý je rovněž průběh PCR reakce. V prvních 25ti cyklech je nastavena relativně vysoká annealingová teplota a během této fáze dojde k spotřebování neznačeného forward primeru. V následujících cyklech annealingová teplota klesne a na koncová místa (5' konec)

nově vzniklých PCR fragmentů (které již obsahují specifickou sekvenci pro navázání M13 primeru) dochází k navázání M13 primeru s fluorescenční značkou (Schuelke, 2000).



Obrázek 3: Průběh PCR reakce se značeným M13 primerem (upraveno podle Schuelke, 2000).

3.2.3 Molekulární markery užívané v taxonomických a populačně genetických studiích *Pl. halstedii*

Studie využívající molekulární markery u *Pl. halstedii* lze rozdělit do dvou hlavních skupin. Jednak to jsou práce zaměřené na taxonomii organismů a potom populačně genetické práce. Obě skupiny využívají primery specifické pro oomycety, které byly navrženy tak, aby nasedaly na DNA patogena.

Oblast jaderné DNA o délce 600–700 bp označovaná jako ITS (*internal transcribed spacer*) je představována dvěma mezerníky umístěnými mezi malou (SSU) a velkou (LSU) ribozomální podjednotkou jaderné ribozomální DNA, které jsou od sebe odděleny úsekem kódujícím 5,8S ribozomální podjednotku. Tento region se vyskytuje v genomu všech eukaryotních organismů, ve formě rozsáhlých repetitivních sekvencí v počtu až 200 kopií v jednom jádře a je používán pro molekulární identifikaci oomycet společně s *cox2* regionem jako tzv. „barkodovací“ (*barcode*) marker (Thines, 2007; Choi *et al.*, 2015). ITS region je používán v taxonomii plísní a blízkce příbuzných oomycet pro klasifikaci taxonů na úrovni čeledí až poddruhů (Choi *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 2000; Cooke *et al.*, 2002; Constantinescu *et al.*, 2002; Leclerc *et al.*, 2000; Voglmayr, 2003; Thines *et al.*, 2005; Thines, 2007). Jsou ale

i uváděny příklady buď příliš vysoké (Cooke *et al.*, 2000) nebo nízké úrovně detekované variability ITS sekvencí (Voglmayr, 2003). Proto byly v dalších studiích použity i další genomické segmenty (např. nrLSU - velká ribozomální podjednotka) pro zlepšení fylogenetického signálu (Göker *et al.*, 2004; Voglmayr *et al.*, 2004; Thines *et al.*, 2006). Zvláštností ITS regionu u *Pl. halstedii* je jeho délka, která je až trojnásobně delší (2587 bp) oproti hodnotám zjištěným u jiných zástupců čeledi Peronosporaceae (Thines, 2007). Je to způsobeno tandemově se opakujícími elementy v ITS-2 regionu (Thines *et al.*, 2005). Proto se pro molekulární identifikaci používá buď pouze část ITS regionu (tj. ITS-1) nebo jiný barkodingový marker *cox2*, což je mitochondriální gen cytochrom c oxidázy pro podjednotku 2 (Choi *et al.*, 2015).

Pro populačně genetické studie je variabilita detekovaná pomocí sekvenace ITS (nebo dalších regionů) nedostatečná a je nezbytné použití markerů umožňujících postižení rozdílů na úrovni populací nebo ještě lépe jedinců uvnitř populací. Pro tyto účely jsou jedním z nejrozsáhleji používaným typem molekulárních markerů používány mikrosatelity, zejména pro velký počet detekovaných alel na lokus a svůj kodominantní charakter (Carlsson, 2008). Při použití dostatečného počtu markerů od sebe lze odlišit jedince uvnitř populace (Weising *et al.*, 2005).

Mikrosatelitní markery navržené pro patogenní organismy z okruhu oomycet se objevují až v posledních cca 20ti letech, jsou publikovány zejména u hospodářsky významných patogenů jako například *Phytophthora infestans*, *Ph. ramorum*, *Ph. capsici* a *Ph. sojae* (Garnica *et al.* 2006; Montarry *et al.*, 2010; Parada-Rojas *et Quesada-Ocampo*, 2018; Stewart *et al.*, 2011), *Peronospora tabacina* (Trigiano *et al.*, 2012) nebo *Pseudoperonospora cubensis* a *Ps. humuli* (Wallace *et Quesada-Ocampo*, 2017). Všechny tyto studie využívají strategii vývoje mikrosatelitních markerů z dostupných celogenomových dat publikovaných přímo pro zájmový druh nebo pro druh blízké příbuzný.

U rodu *Plasmopara* jsou poměrně často využívány mikrosatelity pro studium plísně vinné révy (*Pl. viticola*) (Gobbin *et al.*, 2003; Delmotte *et al.*, 2006; Rouxel *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2019) a rovněž byly např. vyvinuty SSR markery pro druh *Pl. obducens* napadající zástupce r. *Impatiens* (Salgado-Salazar *et al.*, 2015). Studií využívajících mikrosatelitní markery pro *Pl. halstedii* je několik. Pět mikrosatelitních markerů pro *Pl. halstedii* bylo popsáno společně se sedmi CAPS markery na souboru 32 izolátů pocházejících ze dvou lokalit ve Francii (24 izolátů) a 8 izolátů z Ruska (Giresse *et al.*, 2007). Autorům se jejich použitím podařilo prokázat rozdíly mezi francouzskými populacemi a také odlišnost izolátů z Francie a Ruska. V roce 2015 byla publikována studie o genomu *Pl. halstedii* (Sharma *et al.*, 2015), ve které byla

mj. navržena i sada mikrosatelitních markerů, kterou ve své diplomové práci testovala Slobodianová (2016). Vybrala 27 polymorfních markerů, ze kterých jsem v mé bakalářské práci vycházela a selektovala nejvhodnější.

Další markery, se kterými jsem pracovala, jsou ze studie Rivera *et al.* (2016) zabývající se využitím mikrosatelitů pro popis populačně genetické struktury *Pl. halstedii*. Pomocí těchto markerů prokázali jasné rozdíly mezi izoláty ze dvou hostitelských rostlin - slunečnici roční (*H. annuus*) a třapatky zářivé (*Rudbeckia fulgida*). Zároveň spekulují, že pravděpodobně tyto dva genetické clustery (genetické linie) představují dva samostatné druhy. Vyslovili hypotézu o existenci dalších samostatných taxonů v rámci *Pl. halstedii*, které by mohly být v budoucnosti popsány i z dalších hostitelů.

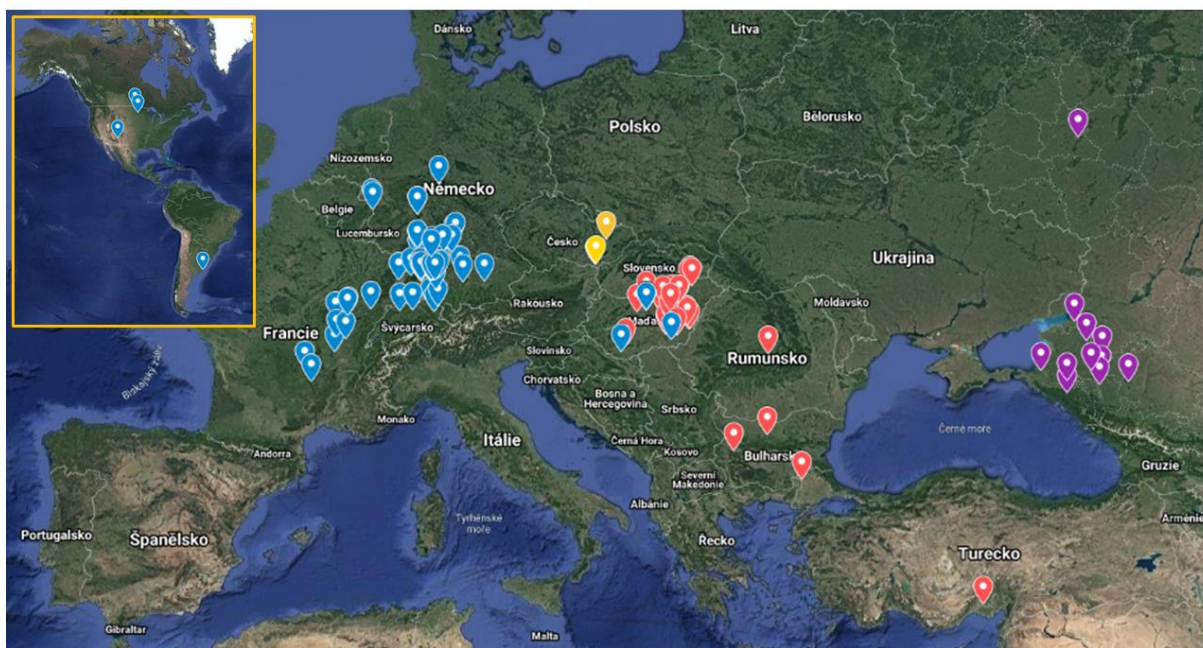
4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V této bakalářské práci jsem pracovala jednak s již vyizolovanou DNA *Plasmopara halstedii*, kterou mi poskytl vedoucí a konzultantka mé bakalářské práce a dále s DNA, kterou jsem vyizolovala ze spor odebraných z inokulovaných semenáčků slunečnice roční (*Helianthus annuus*). Velká část zpracovaných vzorků byla získána díky spolupráci ze zahraničními partnery - prof. Otmar Spring (Univerzita v Hohenheimu, Německo), dr. Rita Bán (Szent István Univerzita v Gödöllő, Maďarsko), vzorky z Ruska poskytly dr. Maria Iwebor a Tatiana S. Antonova (All Russia Research Institute of Oil Crops “V.S. Pustovoit”, Krasnodar, Rusko). Většina vzorků (158) byla odebrána ze slunečnice roční (*H. annuus*), pouze čtyři vzorky pocházely ze slunečnice pozdní (*H. x laetiflorus*). Seznam analyzovaných vzorků je uveden v Tabulce 1, mapa s označením lokalit původu vzorků je znázorněna na Obrázku 4.

Tabulka 1: Přehled počtu testovaných vzorků *Plasmopara halstedii*, s uvedením země původu a poskytovatele materiálu (MS, Michaela Sedlářová; OS, Otmar Spring; RB, Rita Bán; IA; Maria Iwebor a Tatiana S. Antonova).

Hostitel	Země původu vzorku	Počet vzorků	Zdroj
<i>H. annuus</i>	Česká republika	24	MS
<i>H. annuus</i>	Francie	9	OS
<i>H. annuus</i>	Německo	64	OS
<i>H. annuus</i>	Maďarsko	32	RB
<i>H. annuus</i>	Rusko	15	IA
<i>H. annuus</i>	Bulharsko	3	RB
<i>H. annuus</i>	Rumunsko	3	RB
<i>H. annuus</i>	Turecko	2	RB
<i>H. annuus</i>	Švýcarsko	2	OS
<i>H. annuus</i>	Slovensko	1	OS
<i>H. annuus</i>	Spojené státy	1	OS
<i>H. annuus</i>	Kanada	1	OS
<i>H. annuus</i>	Argentina	1	OS
<i>H. x laetiflorus</i>	Německo	4	OS



Obrázek 4: Mapa geografického původu testovaných vzorků *Plasmopara halstedii*. Barva odpovídá poskytovatelům vzorků (červená: dr. Bán; fialová: dr. Iwebor a dr. Antonova; modrá: prof. Spring; žlutá: doc. Sedlářová).

Pro vlastní analýzy byly použity markery publikované na základě analýzy celogenomových dat ve studiích Sharma *et al.* (2015) a Rivera *et al.* (2016). Z prvně uvedené studie jsem použila pouze 25 markerů, které ve své diplomové práci označila Slobodianová jako polymorfní po jejich testování na sadě izolátů *Pl. halstedii* (Slobodianová, 2016). Celkem tedy bylo v analýzách vybíráno ze 40 mikrosatelitních markerů. Jejich přehled je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled mikrosatelitních markerů použitých v této bakalářské práci s uvedením základního motivu repetice a literárního zdroje.

Označení markeru	Sekvence primeru 5'-3'	Motiv	Zdroj
PHmit-001	F: ACATTGTCCTATTTTAACACCGC R: AGGTTCAAATCCTTTTCTTCCGA	(AT) ₆	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-004	F: CCGCTATTTCCAAAGGCTGT R: ACAGTTCATAGCCAGGCGT	(AT) ₁₃	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-006	F: TGATACCTCGGCTACTCTTCG R: GACCAAGTTGCAACCGATGT	(CTAC) ₁₄	Sharma <i>et al.</i> , 2015

Tabulka 2: Pokračování 1.

Označení markeru	Sekvence primeru 5'-3'	Motiv	Zdroj
PH-020	F: TCAAGGCTAATCGACTCTTTGC R: ACGAAATGTGCATGGTGTGA	(TTTA) ₆	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-029	CAGACGGTTGGGTAGGGTTC AGAACGGCATTGTCTCTTCTT	(GAGAA) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-033	TGGTGGGGTGTGTAGTGT TATACGTGCACTGCCCTTCG	(TA) ₁₀	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-035	F: TGTGTGGATAGAGTGCAGCA R: GAACAACCTTCACGAGGTTCTGA	(AT) ₁₀	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-036	F: ACCGCACACTTTCATAATCCA R: TGCAAAACGAACAACATTGGAG	(GAGAT) ₁₁	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-038	F: AAAGTGTGTTGCTCCATCGG R: ACACTTGCAGGCGAATGTC	(TCTCT) ₁₃	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-042	F: ACCAGGAGCGTTACTTGAGA R: GGGCTTCGAACAGGATAGGT	(AT) ₈	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-051	F: GCTGCAGGAGGTGATCACT R: AGCGCTCCATCATCATTTGC	(GCTGTT) ₄	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-054	F: CGCTTCTTCTCGTGGACAAG R: GTATACTGCGGTGTGAGACG	(AGAAG) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-057	F: CTACGCGTTAGTGCCGATTC R: GTGGAGACTAACGCCTTTA	(TCTTC) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-070	F: TCGATCTGTACAGCGAGTCT R: CATTGATGTGGCACGGAGAA	(CTCTT) ₇	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-071	F: TCCGTGGCAGATTTACACCA R: AGTATCCGTGGGTGTAGCAG	(ACTGAC) ₄	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-072	F: CGCCGTGCTATCGTGTTATT R: AGTATCCGTGGGTGTAGCAG	(ACTGAC) ₄	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-078	F: GCACGTATTGACATTCCACCA R: TGGTCCGAATATTGCTTGCG	(TAAGC) ₈	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-082	F: CCAACTTACTGACTGACCG R: GTATGCATTCTCAGCGAGCG	(TACT) ₁₄	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-086	F: TGCTAGTAGGACTCGTGTAGC R: CCTATCTGGTGTGCGAAAAGA	(AGAGA) ₁₁	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-094	F: CCCAAGGCTAATTACTCTTCTGC R: TAACAGGGGTGTGTGTGTCA	(AT) ₈	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-099	F: GTTGCGGAAGTTGTGGTCAT R: TCCAGCACCTATAGTTGGCA	(TTG) ₁₁	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-104	F: TGTGTCAAATTGTGCCTGCA R: CCAGCTTTCGTTCATAGCCAC	(CTCTT) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015

Tabulka 2: Pokračování 2.

Označení markeru	Sekvence primeru 5'-3'	Motiv	Zdroj
PH-107	F: TAAGTGATGGCGTCTGGTGA R: TGTGAGAGTTGCCTTGGACA	(AGTG) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-108	F: TGAGGATGTAGCTGCTCCA R: CTTCACCCAGTCAGACAGCT	(ACATGA) ₁₁	Sharma <i>et al.</i> , 2015
PH-109	F: CGTCAAATGTAGAAGTACCGCA R: GTTTCACCGAGCATAGCGAC	(TTCTC) ₁₂	Sharma <i>et al.</i> , 2015
Ri-147	F: TCAAGACCGCCCATAGTCTC R: GGGTTCGTTGATCGGAGTTA	(TTC) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-250	F: AGGAACTTAACGACGAGCGA R: TGTTATCTTTCGAGCCGAGG	(GAT) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-282	F: GCAGTTGCACGACATCACTT R: AGCGAACTACGAGGAGGTCA	(GGT) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-354	F: CGTGGTACTCGCTCTGTTTG R: TGGATGCATTTCTGACCAAG	(CTACTGCTG) ₆	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-919	F: AACCGACATTTTAAGCGCAC R: TAGCACGGTCGGAACCTTACC	(GGAC) ₆	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-1213	F: GCCCACTGCCAATTAGAACA R: GACCCATGGTTCGACATTTT	(TCAATA) ₆	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-1338	F: TCGCTTGAATCACTCTCCCT R: CTCGACTGAAGTGGAGGAGC	(TTC) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-1813	F: TAGTGCCTGCCACTTCACAG R: GCATTTGTTGCATTTGTGCT	(CAA) ₉	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-1886	F: CCGATGACCATCTGTACGTG R: AGCGACAGGGAAATGAGAGA	(TGAG) ₆	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-2010	F: GGCTCCAAGAGTTCAGTTGC R: TCTGGGCTGATAATGAAGGG	(TCA) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-2118	F: CTCCATCGTAGCATTTCCGT R: AACATCTCTCCAACGCGACT	(TTC) ₇	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-3593	F: GCTTGGTGGAGATTGTTGGT R: TTGCTTCTTGGTGCTTTGTG	(ATG) ₅ ctgatgat(GAA) ₆	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-4367	F: GCCTCTAGCTCGACTTCGTC R: CATCGGGCAAAAATTCTTCT	(TCA) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-4499	F: TAGCACGGTCGGAACCTTACC R: AACCGACATTTTAAGCGCAC	(TCCG) ₅	Rivera <i>et al.</i> , 2016
Ri-5056	F: AGGGGCAAAAGTTTTTGGTT R: AGCTACAGCCAAAGACCGAA	(TGT) ₇	Rivera <i>et al.</i> , 2016

4.2 Použité chemikálie

3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)

40% roztok akrylamid - N, N' - methylenbisakrylamid (19:1) (Merck)

Cetyltrimethylamoniumbromid (Sigma)

Deionizovaná voda

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP mix)

Dusičnan stříbrný (Lachner)

Ethanol, 96% roztok (Sigma - Aldrich)

Formaldehyd (Lachner)

GoTaq[®] G2 DNA polymeráza 5 U/μl (Promega)

Chemikálie pro kapilární elektroforézu GenomeLab GeXP (Beckman Coulter):

1. DNA Size Standard Kit 600BP
2. GenomeLab Separation Buffer
3. Sample Loading Solution
4. Separation Gel - LPAI

Izopropanol (Lachner)

Kyselina boritá (Lachner)

Kyselina dusičná (Merck)

Kyselina octová 0,5% (Lachner)

Merkaptoethanol (Sigma)

Močovina (Lachema)

N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin (Merck)

Peroxodisíran amonný (Merck)

Primery - neznačené primery (Macrogen)

- sada tří univerzálních M13 primerů fluorescenčně značených fluorochromy Well Red Dyes (D2, D3, D4) (Sigma)

Rain Repellent, Clear Vue (Turtle Wax)

RNáza A, zásobní roztok 20 mg·ml⁻¹ (Sigma)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Sigma)

Uhlíčan sodný (Lachner)

4.3 Použité roztoky a jejich příprava

- Extrakční pufr CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid): 20 g CTAB + 100 ml TRIS 1M pH 8 + 40 ml EDTA 3,5M pH 8 + 81,8 g NaCl doplnit vodou na 1 l, přefiltrovat přes 0,2 filtr, těsně před použitím přidat 2 ml merkaptoethanolu.
- EDTA (NaEDTA·2 H₂O) 0,5M, pH 8: 37,22 g EDTA rozpustit v 200 ml H₂O, upravit pH pomocí NaOH, sterilizovat autoklávováním.
- Fix/stop roztok: 165 ml kyseliny octové doplnit deionizovanou vodou na 1 500 ml.
- roztok 8% kyseliny octové v 96% ethanolu: 100 ml 96% ethanolu, přidat 500 µl kyseliny octové.
- Roztok 10% peroxodisíranu amonného [(NH₄)₂S₂O₈]: 1 g (NH₄)₂S₂O₈ rozpustit v 10 ml deionizované vody, uchovávat v chladničce.
- 10x TBE (Tris-borát-EDTA) pufr: 108 g trishydroxymethylaminomethanu (Tris) + 55 g kyseliny borité H₃BO₃ + 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0, doplnit deionizovanou vodou na 1000 ml.
- 0,5x TBE pufr: 45 ml 10x TBE doplnit deionizovanou vodou na 900 ml.
- Roztok 1% kyseliny dusičné (HNO₃): 30 ml HNO₃ doplnit deionizovanou vodou na 2 000 ml.
- Roztok 0,1% dusičnanu stříbrného (AgNO₃): 2 g AgNO₃ rozpustit ve 2 l deionizované vody, před použitím přidat 3 ml formaldehydu.
- Vývojka (3% Na₂CO₃): 45 g Na₂CO₃ rozpustit v 1 l deionizované vody, doplnit na 1,5 l, vychladit v lednici, před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu a 300 µl 1% roztoku thiosíranu sodného Na₂S₂O₃.
- Zásobní roztok 6% akrylamidu: 420 g močoviny + 484 ml deionizované vody + 50 ml 10 x TBE + 150 ml zásobního 40% roztoku akrylamid - N, N' - methylenbisakrylamid (19:1), po rozpuštění všech složek zfiltrovat, uložit v temné lahvi ve 4 °C.
- Nanášecí denaturační pufr: 0,125 g bromfenolové modře + 0,125 g xylenové modře + 25 ml deionizované vody + 100 ml formamidu.

- Tris 1M, pH 8: 12,11 g Tris doplnit H₂O do 100 ml, upravit pH pomocí HCl, sterilizovat autoklávováním.

4.4 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga 5415 D (Eppendorf)
- Centrifuga 5804 R (Eppendorf)
- Digestoř (Merci)
- Elektroforetický zdroj MP 2000P (Major Science)
- Elektroforéza T – REX OWL S3S (Thermo Scientific)
- Homogenizátor FastPrep-24 (MP Biomedicals)
- Chladnička (Liebherr)
- Laboratorní váhy PM 2000 (Mettler)
- Kapilární elektroforéza GenomeLab GeXP (Beckman Coulter)
- Magnetická míchačka MS2 (IKA)
- Minicentrifuga MCF 2360 (LMS)
- Negatoskop ELLA NHG1R (Legros)
- PCR cyklér Mastercycler Pro S (Eppendorf)
- Pipety:
 - o sada pipet Eppendorf Ressearch (0,1–2,5 µl, 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl)
 - o 8-kanálová pipeta Eppendorf Ressearch Pro 10-100 µl (Eppendorf)
 - o 8-kanálová pipeta Finnpipette Novus 30-200 µl (Thermo)
- Sušárna HS62A (Chirana)
- Třepačka GFL 3017 (Merci)
- Termoblok MB 102 (Bioer)
- UV transiluminátor UVITEC (Cambridge)
- Vortex Minishaker MS2 (IKA)
- Výrobník ledu Icematic F 100 (Castel Mac)

4.5 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Extrakce genomické DNA ze spor metodou CTAB

Kromě vzorků poskytnutých ve formě roztoku purifikované DNA jsem u cca 30ti vzorků z České republiky, Turecka, Maďarska, Bulharska a Ruska provedla extrakci DNA ze sedimentů sporangií *Pl. halstedii*. Použila jsem tzv. CTAB protokol (Doyle *et* Doyle, 1987) modifikovaný pro materiální a přístrojové vybavení Laboratoře molekulárních markerů Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

Pracovala jsem podle následujícího postupu:

1. Sedimenty sporangií byly přeneseny do mikrozkušavek určených k homogenizaci společně s keramickou kuličkou. K sedimentu sporangií bylo napipetováno 100 μ l CTAB.
2. Zkušavky byly přeneseny do homogenizátoru FastPrep, kde následovala homogenizace po dobu 1 minuty. Poté bylo přidáno 650 μ l CTAB a znovu následovala homogenizace po dobu 1 minuty.
3. Mikrozkušavky s homogenizátem byly inkubovány v termobloku při 68 °C po dobu 1,5 hodiny. Po skončení bylo přidáno 600 μ l roztoku chloroform-isoamylalkohol. Suspenze byla promíchána překlopením mikrozkušavky, víčko bylo povoleno, aby unikl vzniklý plyn, a znovu uzavřeno. Mikrozkušavky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu pěti minut.
4. Následovala centrifugace při 10 000 rpm po dobu 12 minut.
5. V mikrozkušavkách vzniklo rozhraní mezi dvěma fázemi. Horní vodná fáze byla opatrně přepipetována do nové označené mikrozkušavky.
6. K odebrané vodné fázi bylo přidáno 600 μ l roztoku chloroform-isoamylalkoholu, směs byla promíchána, 1-2 minuty inkubována při laboratorní teplotě a znovu proběhla centrifugace za stejných podmínek jako v kroku č. 4.
7. Ke vzorkům bylo přidáno 600 μ l vychlazeného isopropanolu. Mikrozkušavky byly několikrát promíchány převrácením, a poté umístěny na 30 minut do mrazáku (-20 °C).
8. Následovala centrifugace po dobu 12 minut při 14 000 rpm. Supernatant byl slit do kádinky tak, aby se ze dna mikrozkušavky nevolnil pelet DNA přichycený na stěně mikrozkušavky. Zbytky roztoku byly osušeny papírovým ubrouskem.
9. K peletu DNA bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Směs byla promíchána a ponechána stát 5 minut. Následovala centrifugace po dobu 6 minut při 14 000 rpm.

10. Supernatant byl slit, a mikrozkušavky s DNA byly umístěny do vakuové odparky (35 °C, 20 minut).
11. K odparku DNA bylo přidáno 40 µl roztoku deionizované vody a 4 µl RNázy A.
12. Po rozpuštění odparky byly zkumavky inkubovány v termobloku při 37 °C po dobu 40 minut.
13. Koncentrace DNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop ND-1000.

4.5.1 PCR reakce a detekce PCR produktů

Během analýz jsem použila dva PCR protokoly navázané na dva různé způsoby detekce PCR produktů. V první fázi jsem pracovala s neznačenými primery a k separaci a detekci PCR produktů došlo v polyakrylamidovém gelu a následným barvením stříbrem. V této fázi jsem pracovala s podvýběrem 96ti vzorků (1 PCR deska) představovaných již vyizolovanou DNA z České republiky, Francie, Německa a Maďarska. Takto jsem rychle provedla vyhodnocení variability testovaných markerů a mohla rozhodnout o jejich použitelnosti v dalších analýzách. U markerů, kde byly nalezeny alely různé délky a zároveň byly jasně identifikovatelné, byl proveden výběr vzorků lišících se délkou alel. Soubor těchto 32ti vzorků byl doplněn o vzorky DNA vyizolované v průběhu mé bakalářské práce (23 vzorků z Ruska, Turecka, Bulharska, Rumunska) a o zbytek vzorků vyizolované DNA, které nebyly hodnoceny (44). Tato sada byla analyzována pomocí fluorescenčně značených markerů a po separaci na kapilární elektroforéze bylo možné určit délku jednotlivých alel u všech vzorků. Všechny PCR reakce, kde bylo rozhodnuto, že se výsledky daného markeru využijí do statistického hodnocení (tj. na záznamu byly přítomny jasně identifikovatelné alely lišící se svou délkou), byly provedeny opakovaně. U nejvíce variabilních markerů byly na kapilární elektroforéze ověřeny délky alel všech vzorků.

Pro PCR reakce s použitím neznačených markerů jsem použila následující postup:

1. Do krabice s ledem byly umístěny následující chemikálie: pufr, voda, dNTPs, směs přímého (F) a zpětného primeru (R) a polymeráza.
2. Mikrozkušavky s izolovanou DNA byly protřepány a krátce zcentrifugovány.
3. Do 1,5ml mikrozkušavky byla připravena PCR reakční směs pro 100 vzorků (tj. pro 1 PCR desku). Jednotlivé roztoky byly napipetovány. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi.

Složení PCR směsi	Objem pro 1 vzorek [μl]	Pipetovaný objem pro 100 vzorků (z toho 4x rezerva) [μl]
Deinizovaná voda	6,32	632
5x pufr	1,90	190
Roztok dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,15	15
Směs primerů F a R ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,38	38
G2 Go Taq polymeráza	0,05	5

4. Do předem popsané PCR desky uložené v chladítku bylo napipetováno 1,2 μl DNA zkoumaného vzorku naředěné na koncentraci $7 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.
5. Elektronickou pipetou bylo do každé jamky napipetováno 13,8 μl PCR mixu.
6. PCR deska byla uzavřena fólií a krátce zcentrifugována.
7. PCR deska se vzorky byla vložena do termocykléru a byl nastavený příslušný program PCR reakce. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 4. Po ukončení PCR reakce byla deska přenesena do ledu.

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce.

Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklů
95	2 min	1
95	1 min	33
T_a	1 min	
72	30 s	
72	5 min	1

Pozn. Annealingová teplota (T_a) byla pro jednotlivé testované markery nastavena podle hodnot uvedených v diplomové práci Slobodianové (2016) nebo článku Rivera *et al.*, (2016).

Při separaci a detekci neznačených PCR produktů jsem nejprve musela připravit polyakrylamidový gel (doba přípravy a tuhnutí cca 1 hod), výsledný gel jsem nechala předežhřát v elektroforetické aparatuře (cca 1 hod), nanasla vzorky, nechala proběhnout jejich separaci (cca 2,5-3 hod) a gel vyvolala (cca 1 hod). Detailní postup je uveden níže.

Příprava polyakrylamidového gelu

1. Sklo bez výřezu (velké sklo) bylo omyto jarem, dobře opláchnuto nejprve vodovodní a poté destilovanou vodou a usušeno papírovými ubrousky.
2. Sklo s výřezem (malé sklo) bylo omyto destilovanou vodou a usušeno papírovými ubrousky.
3. Dále bylo sklo ošetřeno přípravkem odpuzujícím vodu (Rain Repellent). Po 5 minutách bylo sklo ošetřeno 96% ethanolem a otřeno papírovým ubrouskem.
4. Velké sklo bylo přeneseno do digestoře na polystyrenové víko. Sklo bylo ošetřeno 3 μ l roztoku 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu a 1 ml směsi kyseliny octové a 96% ethanolu. Sklo bylo papírovým ubrouskem otřeno do sucha a ošetření bylo provedeno ještě jednou.
5. Sklo bylo v digestoři necháno schnout po dobu 5 minut.
6. Po uplynutí 5 minut bylo sklo ošetřeno ethanolem a otřeno do sucha papírovým ubrouskem. Ošetření bylo zopakováno celkem čtyřikrát.
7. Na delší hrany skla byly umístěny spacers, následně bylo přiloženo malé sklo ošetřenou stranou dolů a skla byla zafixována svorkami.
8. V odměrném válci bylo odměřeno 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, mikropipetou bylo přidáno 46,7 μ l N, N, N', N' – tetramethyldiaminu a 467 μ l 10% roztoku peroxodisíranu amonného.
9. Stříkačkou byl připravený roztok nanesen mezi skla. Po vyplnění prostoru mezi skly byl vsazen hřebínek jeho rovnou stranou asi 1 cm hluboko. Hřebínek byl připevněn svorkami.
10. Gel byl ponechán tuhnout nejméně 60 minut v digestoři.

Elektroforetická separace

11. Po ztuhnutí gelu byla skla přenesena nad umyvadlo, byl vyjmut hřebínek a byly omyty zbytky gelu na vnějších stranách skel. Stěrkou byla odstraněna přebytečná voda.
12. Skla byla upnuta do elektroforetické aparatury.
13. Katodový a anodový prostor byl naplněn 0,5x TBE pufrem. Pomocí injekční stříkačky byl pufrem vypláchnut prostor mezi oběma skly.
14. Elektroforetická aparatura byla uzavřena a začalo nahřívání gelu po dobu přibližně 45 minut.

15. Přibližně 10 minut před ukončením nahřívání byl nahřát termocyklér na 95 °C. Přibližně 5 minut před nanesením vzorků na gel byl smíchán 1 díl vzorku se 2 díly denaturačního pufru s formamidem. Vzorky byly přeneseny do termocykléru a byly denaturovány (3 minuty). Poté byly denaturované vzorky přeneseny do ledu.
16. Během denaturace byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, byla odpojena katoda a otevřen katodový prostor. Pomocí injekční stříkačky byl znovu pufr vypláchnut prostor mezi oběma skly.
17. Do mezery mezi skly byl zasunut hřebínek tak, aby byly jeho zoubky zanořené přibližně 1 mm hluboko do gelu.
18. Osmikanálovou mikropipetou bylo do jamek mezi zoubky hřebínku naneseno 2,5 µl denaturovaných vzorků. Po nanesení vzorků byl uzavřen katodový prostor a spuštěna elektroforetická separace při 2000 V.
19. Doba separace závisí na relativní molekulové hmotnosti rozdělovaných PCR produktů. Obvyklá doba separace byla 3 hodiny.
20. Během probíhající separace byl namíchan fix/stop roztok, roztok 1% HNO₃, roztok 0,1% AgNO₃ a vývojka, která byla uložena do lednice, aby se vychladila na teplotu nižší než 10 °C.
21. Po uplynutí doby separace vzorků byl vypnut zdroj stejnosměrného elektrického proudu, byly odpojeny obě elektrody. Na zadní straně byla na ventil připojena odvodní trubička pro katodový pufr.

Vizualizace PCR produktů

22. Skla s gelem byla vyjmuta a položena do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Opatrně byl vyjmut hřebínek i oba spacers. Skla od sebe byla odpáčena čepelí nože.
23. Velké sklo s gelem bylo uloženo do fotomisky gelem nahoru. Fotomiska byla umístěna na třepáčku v digestoři a gel byl zalit fix/stop roztokem. Doba působení fix/stop roztoku byla přibližně 20 minut.
24. Fix/stop byl poté slit do láhve a sklo s gelem bylo 3krát promyto ve fotomisce s přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.
25. Gel byl zalit 1% roztokem HNO₃. Doba působení roztoku byla přesně 5 minut. Roztok HNO₃ byl slit do láhve a sklo s gelem bylo 3krát promyto ve fotomisce s přibližně 1 až 1,5 l deionizované vody.

26. Sklo s gelem bylo umístěno do fotomisky na třepače a bylo zalito 0,1% roztokem AgNO₃, do kterého se těsně před použitím přidaly 3 ml formaldehydu. Doba působení roztoku byla přibližně 30 minut.
27. Po uplynutí této doby bylo sklo s gelem umístěno na 5 vteřin do fotomisky s deionizovanou vodou. Roztok AgNO₃ byl slit do láhve a byl uchován pro opětovné použití.
28. Do vychlazeného roztoku vývojky bylo těsně před použitím přidáno 2,25 ml formaldehydu a 300 µl Na₂S₂O₃. Sklo bylo přemístěno do fotomisky na třepače a zalito vývojkou.
29. Bylo sledováno vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených proužků PCR produktů. V momentu, kdy byly proužky dostatečně zřetelné, byl přidán fix/stop roztok uchovaný z kroku č. 23. Doba působení roztoku byla odhadnuta podle množství CO₂ uvolněného z roztoku.
30. Sklo s gelem bylo vyjmuta z fotomisky a přibližně na 2 minuty bylo ponořeno do fotomisky s deionizovanou vodou. Poté bylo sklo s gelem přeneseno do sušárny.
31. Sklo s usušeným gelem bylo popsáno fixem a vyhodnoceno na negatoskopu.

Při přípravě fluorescenčně značených produktů a jejich detekci byl použit následující postup:

1. Po rozmrazení jednotlivých komponent PCR směsi (Tabulka 5), jejich promíchání a krátkém stočení, byly do mikrozkuřavky o objemu 2 ml napipetovány jejich příslušné objemy uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5: Složení PCR reakční směsi se značeným M13 primerem.

Složení PCR směsi	Objem pro 1 vzorek [µl]	Pipetovaný objem pro 34 vzorků (z toho 2x rezerva) [µl]
Deionizovaná voda	9,33	317
5x pufr	3	102
Roztok dNTP (10 mmol·l ⁻¹)	0,25	8,4
Směs primerů F a R (10 µmol·l ⁻¹)	0,6	20,4
M13 primer (1 µmol·l ⁻¹)	0,6	20,4
GoTaq® G2 DNA polymeráza	0,08	2,75

2. Do předem popsané PCR desky uložené v chladítku bylo napipetováno 1,2 µl zkoumaných vzorků izolované DNA *Plasmopara halstedii* naředěné na koncentraci 7 ng·µl⁻¹.

3. Elektronickou pipetou bylo do každé jamky napipetováno 13,8 μ l připraveného PCR mixu.
4. Po krátké centrifugaci byla PCR deska vložena do PCR termocykléru a byl spuštěn program PCR reakce pro příslušný marker. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Podmínky PCR reakce pro přípravu fluorescenčně značených produktů.

Dílčí krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
1.	95	2 min	
2.	95	1 min	33x opakovat kroky 2 - 4
3.	T _a	1 min	
4.	72	30 s	
5.	95	1 min	opakovat kroky 2 – 4:
6.	52	1 min	- 19x pro D2
7.	72	30 s	- 25x pro D3 a D4
8.	72	5 min	

5. Opakovaně byly provedeny tři různé PCR reakce lišící se použitými primery tak, aby PCR produkty různých SSR lokusů byly značeny jinou fluorescenční značkou (D2, D3, D4).
6. Takto bylo možné provést tzv. poolování (smíchání, spojení) vzorků umožňující detekovat na kapilární elektroforéze během jednoho separačního cyklu PCR produkty značené různými fluorescenčními značkami. PCR produkty byly naředěny vodou v poměru 1:1. Poté byly PCR produkty odpovídající jednomu vzorku smíchány v poměru 5,5 μ l : 2,8 μ l : 1,4 μ l (produkty značené D2, D3 a D4 WellRed fluorochromy).
5. Do každé jamky bylo napipetováno 25 μ l směsi připravené smícháním 24,7 μ l SLS a 0,4 μ l délkového standardu DNA Size Standard Kit 600BP (objemy na jeden vzorek).
7. Vzorky pak stály 20 minut ve tmě. Po uplynutí této doby byla do každé jamky přidána kapka minerálního oleje.
8. Vzorky byly denaturovány v PCR termocykléru po dobu 5 minut při teplotě 95 °C a následně přeneseny do ledu.
9. Takto připravené vzorky byly vedoucím bakalářské práce separovány na kapilárním sekvenátoru GenomeLab GeXP.

4.5.2 Statistické hodnocení

Na elektroforetických sklech byly označeny alely podle své délky od nejkratší po nejdelší (tj. od nejrychleji migrujících bandů ve spodní části skla). Po stanovení přesné délky alel vybraných vzorků na kapilární elektroforéze bylo možno odvodit přesnou délku alel pro všechny vzorky. V programu Excell byla pro každý vzorek a lokus vytvořena tabulka s genotypy, ve formátu vhodném pro zpracování programem GenAlEx ver. 6.5 (Peakall *et al.* Smouse 2006). Z tohoto programu byla data vyexportována do programů Arlequin 3.5.2.2., Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), Cervus 3.0.3 (Marshall *et al.*, 1998) a R Studio (RStudio Team, 2020). Získaná data byla hodnocena na několika úrovních.

- A. Genetická variabilita jednotlivých markerů, hodnoceny všechny vzorky.
- B. Genetická a genotypová variabilita, tok genů, diferencovanost a typ rozmnožování v metapopulacích *Pl. halstedii*. Jako metapopulace byla označena skupina vzorků na základě jejich geografického původu na úrovni států. Hodnoceny byly pouze metapopulace s počtem vzorků vyšších než 5.
- C. Posouzení vzájemných vztahů mezi vzorky pomocí shlukovacích analýz, hodnoceny všechny vzorky.

Pro každý polymorfni marker byl odvozen rozsah délek alel a počet alel (N_A). V programu GenAlEx byly vypočteny hodnoty pozorované (H_O) a očekávané (H_E) heterozygotnosti, koeficient inbreedingu (F , fixační index), a bylo otestováno, zda jsou výsledky získané jednotlivými lokusy v Hardy-Weinbergově rovnováze (HW). Programem Cervus byly zjištěny hodnoty polymorfniho informačního obsahu (PIC).

Pro jednotlivé metapopulace byly v programu R Studio a balíčkem “poppr” version 2.8.4 stanoveny počty multilokusových genotypů (MLG) (tedy genotypů zjištěných analýzou většího počtu lokusů), genotypová diverzita (GD) a počet privátních alel (PA). Výpočty byly provedeny po aplikaci funkce “clonecorrect”, odstraňující duplicitní genotypy, které by mohly zkreslit výsledky analýzy. Podíl klonálních genotypů v populaci (CF, klonální frakce) byla dopočítána podle vzorce: $CF = [1 - (MLG/N)]$.

Párové hodnoty Wrightova fixačního indexu (F_{ST}) metapopulací byly vypočteny pomocí programu Arlequin 3.5.2.2. Při $F_{ST} = 0$ je zastoupení/frekvence alel ve dvou srovnávaných (meta)populacích shodné, tyto populace jsou identické. Při $F_{ST} = 1$ jsou frekvence alel v (meta)populacích zcela odlišné, populace nesdílí společné alely a jsou od sebe izolované.

Gene flow (M) mezi metapopulacemi byl vypočten z hodnot párových F_{ST} pomocí rovnice $M = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ (Wright, 1931).

Pro otestování převažujícího způsobu rozmnožování v metapopulacích *Pl. halstedii* byl v programu R Studio pomocí balíčku “poppr” vypočítán index asociace (\bar{r}_d), opět po korekci na klonální genotypy aplikováním funkce “clonecorrect”, s počtem opakování simulací nastaveným na hodnotu 9999. Tento test je vhodný k posouzení, zda jsou populace klonální (tj. očekává se výrazná vazebná nerovnováha kvůli vazbě mezi lokusy) nebo sexuální (neočekává se vazba mezi lokusy). Pokud se pozorovaná \bar{r}_d významně liší od hodnot získaných z náhodně získaných dat ($P < 0,05$), pak je nulová hypotéza odmítnuta a připouští se převaha klonální reprodukce v populacích. Naopak pokud se pozorovaná \bar{r}_d významně neliší od náhodně generovaných dat ($P \geq 0,05$), je přijata nulová hypotéza náhodného párování alel/jedinců v populacích.

Pro grafické znázornění vzájemných vztahů mezi vzorky byl vytvořen fylogenetický strom opět pomocí programu R Studio a balíčku “poppr” (metoda UPGMA - *unweighted pair-group method using arithmetic averages*, Bruvova distance, 1000 replikací) a diagram v programu Structure.

Programem Structure bylo simulováno rozdělení vzorků do optimálního počtu K genetických skupin (klastřů). Testovaná hodnota K , byla nastavena v rozmezí 1 až 20, počet opakování byl nastaven na 20. Hodnota *Length of Burnin Period* byla nastavena na 100 000, *Number of MCMC Rep* na hodnotu 1 000 000 a analýza běžela pod admixture modelem. Výsledky Structure analýz zpracoval vedoucí bakalářské práce v programech Structure Harvester version 0.6.94 (Evanno *et al.*, 2005), Clumpp 1.1.2. (Jakobsson *et Rosenberg*, 2007). Výsledné diagramy byly vytvořeny programem Distruct verze 1.1 (Rosenberg, 2004).

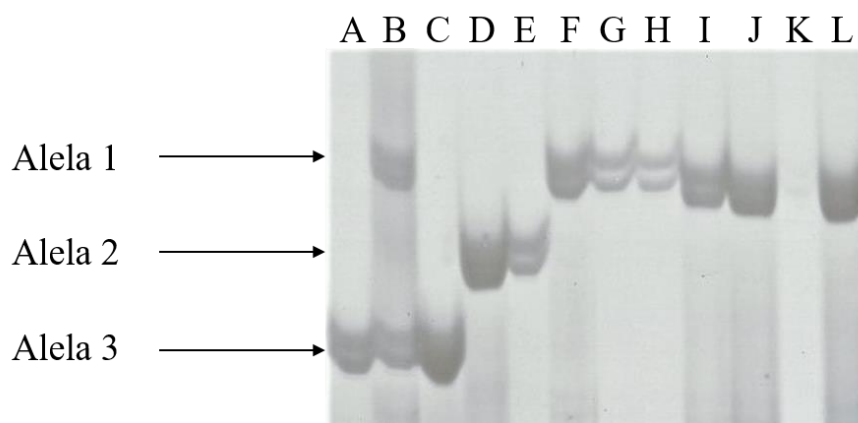
5 Výsledky

5.1 Variabilita testovaných markerů

V experimentální části této bakalářské práce bylo otestováno 40 mikrosatelitních markerů pro analýzu souboru izolátů *Plasmopara halstedii* ze dvou hostitelských rostlin - *H. annuus* a *H. x laetiflorus*. Po provedení PCR reakcí a elektroforetické separace byly vybrány markery, které poskytovaly variabilní a zároveň spolehlivě hodnotitelné záznamy (Obrázek 5). Během testování byly z celkového počtu 166 vyloučeny čtyři vzorky, které neposkytovaly stabilní PCR produkt.

Pro finální analýzy bylo vybráno 11 polymorfních markerů. Jejich seznam a výsledky hodnocených indexů variability jsou uvedeny v Tabulce 7. Počet alel detekovaných na jednom lokusu se pohyboval v rozmezí od 2 (PH-020) do 15 (PH-104). Hodnoty pozorované heterozygotnosti se pohybovaly v rozmezí od 0,06 (PH-078) do 0,105 (PH-104), a u všech markerů měly nižší než hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E). Nejvyšší hodnoty všech hodnocených indexů byly nalezeny u markeru PH-104 (Tabulka 7). U všech lokusů byly zjištěny signifikantní odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Při srovnání detekovaných profilů zjistíme, že u 10 markerů (kromě PH-020) byly výrazně odlišné čtyři vzorky z *H. x laetiflorus*, s 9 privátními alelami. Tyto vzorky byly vzájemně identické, kromě heterozygotní konstituce alel detekované na jednom lokusu u jednoho vzorku.



Obrázek 5: Elektroforetogram PCR produktů polymorfního mikrosatelitního markeru PH-072. Písmena A–L označují vzorky *Pl. halstedii*. Šipky označují polohu detekovaných alel. Počet alel: 3.

Tabulka 7: Charakteristiky polymorfních mikrosatelitních markerů.

Označení markeru	T _A [°C]	Rozsah délek alel (bp)	N _A	H _E	H _O	PIC	HW
PH-020	63,0	213–218	2	0,118	0,026	0,305	***
PH-035	60,0	146–232	6	0,095	0,010	0,293	***
PH-036	62,0	356–700	13	0,305	0,031	0,745	***
PH-042	63,0	221–227	4	0,114	0,032	0,404	***
PH-070	62,0	166–222	10	0,256	0,041	0,640	***
PH-071	64,0	183–220	6	0,236	0,096	0,512	***
PH-072	64,0	221–257	4	0,215	0,088	0,475	***
PH-078	63,0	251–291	5	0,139	0,006	0,461	***
PH-086	63,0	221–241	5	0,279	0,080	0,607	***
PH-104	62,0	273–479	15	0,312	0,105	0,666	***
Ri-1213	62,0	214–244	4	0,206	0,111	0,325	***
Průměrné hodnoty	62,5	287,4	6,72	0,207	0,057	0,494	***

Poznámky: T_A - annealingová teplota, N_A - počet alel, H_E - očekávaná heterozygotita, H_O - pozorovaná heterozygotita, PIC - polymorfní informační obsah, HW - Hardy-Weinbergovo ekvilibrium, *** = p < 0.001

5.2 Variabilita metapopulací *Pl. halstedii*

V této části je srovnávána genetická variabilita metapopulací *Pl. halstedii*, tedy skupin vzorků vytvořených podle jejich geografické polohy na úrovni států. Hodnoceny bylo pouze pět metapopulací, u nichž byl počet vzorků vyšší než 5. Pro svůj výrazně odlišný charakter byly čtyři vzorky z *H. x laetiflorus* vyloučeny z hodnocení metapopulace Německo.

Vypočtené hodnoty genetické a genotypové variability jsou uvedeny v Tabulce 8. Podobně jako u hodnocení variability markerů byly u všech metapopulací hodnoty pozorované heterozygotnosti nižší než hodnoty heterozygotnosti očekávané (průměrná hodnota H_O = 0,052, průměrná hodnota H_E = 0,336). Nejvyšší počet multilokusových genotypů (MLG = 30) byl nalezen u metapopulace Německo, nejnižší u metapopulace Francie (MLG = 8). Hodnoty genotypové variability (GD) se pohybovaly v rozmezí od 0,79 (Německo) do 0,96 (Maďarsko). Kromě metapopulace Francie byly hodnoty fixačního (inbredního) koeficientu vyšší než 0,80. Podíl klonálních genotypů představoval průměrně 0,27, přičemž nejvyšší hodnoty byly zjištěny

u metapopulací České republiky a Německa ($CF < 0,4$), u zbytku metapopulací pod hodnotu 0,2. Nejvyšší počet privátních alel byl nalezen u metapopulace Německo ($PA = 9$).

Tabulka 8: Genetická a genotypová variabilita metapopulací *Pl. halstedii* (A) detekovaná pomocí 11 polymorfních mikrosatelitních markerů; a (B) porovnání variability vzorků z *H. annuus* a *H. x laetiflorus*.

(A) Hostitel	Původ vzorku	N	N _E	H _O	H _E	F	MLG	GD	CF	PA
<i>H. annuus</i>	Česká republika	24	1,88	0,05	0,40	0,91	14	0,90	0,42	3
<i>H. annuus</i>	Francie	9	1,57	0,07	0,29	0,56	8	0,86	0,11	1
<i>H. annuus</i>	Maďarsko	32	1,91	0,08	0,44	0,80	26	0,96	0,19	3
<i>H. annuus</i>	Německo	64	1,32	0,04	0,21	0,81	30	0,79	0,53	9
<i>H. annuus</i>	Rusko	15	1,70	0,02	0,34	0,93	13	0,92	0,13	2
(B) Srovnání hodnot variability vzorků z různých hostitelských rostlin:										
<i>H. annuus</i>		158	2,33	0,05	0,52	0,91	95	0,95	0,60	57
<i>H. x laetiflorus</i>		4	1,36	0,34	0,19	-0,68	4	0,75	1	9

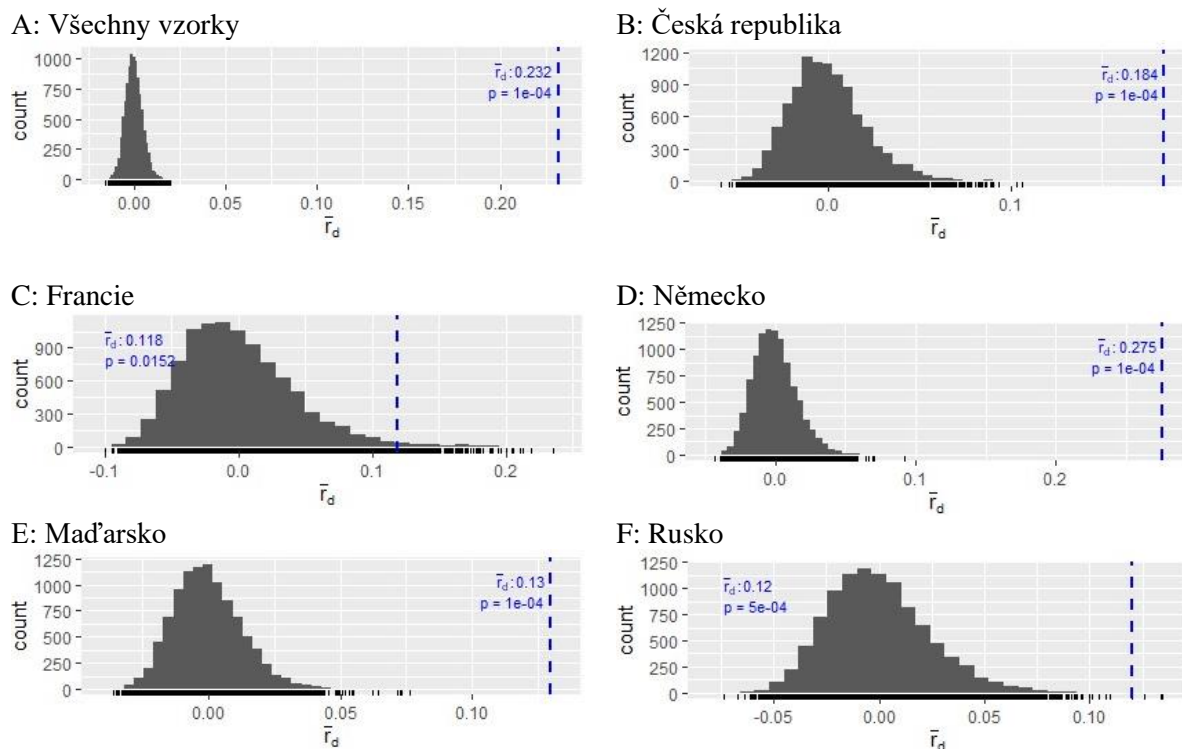
Poznámka: N - počet vzorků, N_E - počet efektivních alel, H_O - pozorovaná heterozygotita, H_E - očekávaná heterozygotita; F - fixační index; MLG - počet multilokusových genotypů, GD - genotypová diverzita, CF - klonální frakce, PA - počet privátních alel.

Při posouzení rozdílů mezi metapopulacemi pomocí párových hodnot Wrightova fixačního indexu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl pouze mezi metapopulacemi Německa a Francie (Tabulka 9). U těchto metapopulací byla rovněž zjištěna nejvyšší úroveň toku genů ($M = 6,04$), naopak výrazně nižší hodnoty ($M \leq 0,5$) mezi páry Maďarsko/Německo, Maďarsko/Francie a Maďarsko/Rusko (Tabulka 9).

Tabulka 9: Zjištěné hodnoty toku genů (M, gene flow, pod diagonálou) a statisticky významné rozdíly F_{ST} ($p = 0,001$) mezi vybranými metapopulacemi.

	Česká republika	Francie	Německo	Maďarsko	Rusko
Česká republika	-	+	+	+	+
Francie	1,73	-	-	+	+
Německo	0,99	6,04	-	+	+
Maďarsko	0,84	0,45	0,28	-	+
Rusko	0,79	1,35	0,74	0,53	-

Pro posouzení převažujícího způsobu rozmnožování metapopulací *Pl. halstedii* byla provedena analýza indexu asociace (\bar{r}_d). Analýza testuje nulovou hypotézu připouštějící převahu sexuálního rozmnožování v populacích. Zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,118–0,275 se statisticky významnou podporou odmítnutí nulové hypotézy, a to jak při testování jednotlivých populací, tak celého souboru vzorků (Obrázek 6). Nejnižší statistická podpora ($p = 0,0152$) byla zjištěna u metapopulace Francie.



Obrázek 6: Index asociace (\bar{r}_d) vypočítaný z 9999 opakování pro (A) všechny analyzované vzorky a (B–F) pro metapopulace s počtem vzorků vyšším než pět. Distribuce \bar{r}_d a hodnota pravděpodobnosti (p) zvýrazněná modrou přerušovanou čarou indikují odmítnutí nulové hypotézy o sexuální reprodukci metapopulací, což naznačuje klonální charakter *Pl. halstedii* v Evropě.

5.3 Shlukovací analýzy

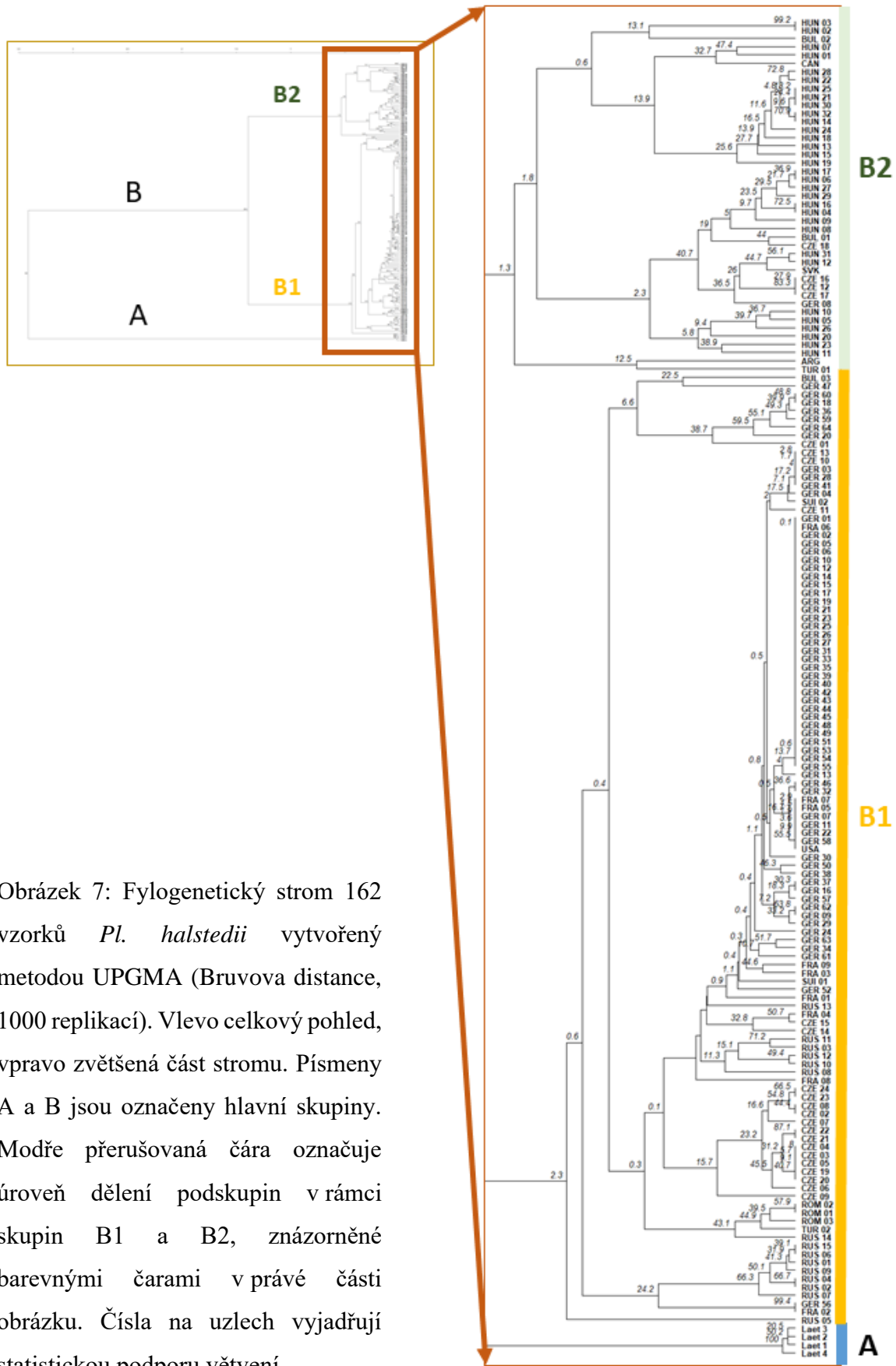
Pro posouzení stavu populačně genetické struktury a vzájemných vztahů mezi vzorky byly použity dva přístupy: tvorba fylogenetického stromu v programu R Studio a diagram vytvořený pomocí Bayesiánské analýzy v programu Structure.

Fylogenetický strom rozdělil vzorky do dvou hlavních skupin odpovídajících hostitelským rostlinám - *H. x laetiflorus* (skupina A) a vzorky pocházející z *H. annuus* (skupina B) (Obrázek 7). Toto oddělení mělo 100% statistickou podporu. Větvení v rámci skupiny B má vyšší podporu pouze rozdělení na podskupiny B1 a B2 (38,6%). Skupinu B1 tvoří všechny vzorky z Turecka, 4 vzorky z České republiky, 2 z Bulharska a po jednom vzorku ze Slovenska, Německa, Turecka, Kanady a Argentiny. Ve skupině B2 je umístěn zbytek vzorků, a ačkoliv další členění není statisticky významné, lze zde pozorovat další dělení vzorků podle geografické polohy (např. vzorky z České republiky, dva shluky vzorků z Ruska, dva shluky vzorků z Německa - viz. Obrázek 7).

Vyhodnocení výsledků Bayesovského modelování v programu Structure provedl vedoucí bakalářské práce. Jako optimální počet genetických skupin bylo zvoleno rozdělení pro $K = 6$, kdy je na Obrázku 8 zobrazena příslušnost daného vzorku do určité genetické skupiny pomocí různých barev:

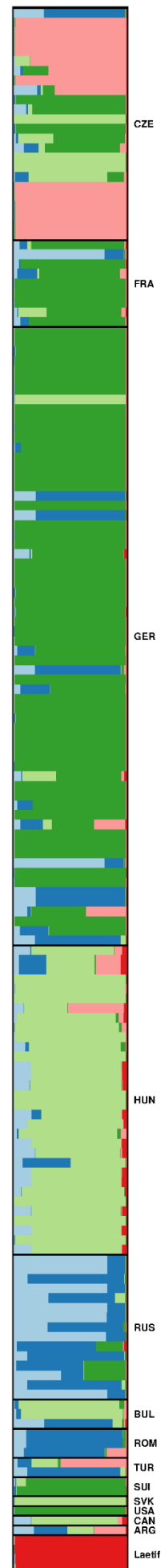
1. červená: vzorky pocházející z *H. x laetiflorus* (4 vzorky);
2. růžová: především vzorky z České republiky (13), podíl příměsi signálu nad 20% v profilech Maďarska (1), Turecka (1) a Německa (1);
3. tmavě zelená: převaha vzorků Německa (56), Francie (8), dále u vzorků České republiky (5), Švýcarska (2), a USA (1);
4. světle zelená: dominuje v profilech vzorků z Maďarska (32), dále u vzorků České republiky (4), Bulharska (2), Německa (1), Slovenska (1), Kanady (1),
5. světle modrá: především vzorky z Ruska (10), Německa (1) a Francie (1);
6. tmavě modrá: vzorky z Ruska (5), Německa (5), Rumunska (3), Turecka (1) a České republiky (1).

U vzorku z Argentiny je v profilu zastoupeno přibližně ve stejném poměru více signálů.



Obrázek 7: Fylogenetický strom 162 vzorků *Pl. halstedii* vytvořený metodou UPGMA (Bruvova distance, 1000 replikací). Vlevo celkový pohled, vpravo zvětšená část stromu. Písmena A a B jsou označeny hlavní skupiny. Modře přerušovaná čára označuje úroveň dělení podskupin v rámci skupin B1 a B2, znázorněné barevnými čarami v pravé části obrázku. Čísla na uzlech vyjadřují statistickou podporu větvení.

Obrázek 8: Populačně genetická struktura 162 vzorků *Pl. halstedii* vygenerovaná pomocí Bayesovského shlukování v programu Structure. Každý vzorek je zobrazen ve formě horizontálně orientovaného pruhu. Barva pruhu odpovídá pravděpodobnosti přiřazení daného vzorku do skupiny vzorků se stejným genetickým pozadím. Modelování proběhlo pod admixture modelem, který umožňuje zohlednit existenci příměsi informace z několika genetických skupin. Černé linky oddělují vzorky pocházející z různých států (CZE, Česká republika; FRA, Francie; GER, Německo; HUN, Maďarsko; RUS, Rusko; BUL, Bulharsko; ROM, Rumunsko; TUR, Turecko; SUI, Švýcarsko; SVK, Slovensko; CAN, Kanada; ARG, Argentina; Laetif, vzorky pocházející z *H. x laetiflorus*)



6 Diskuze

V rámci mé bakalářské práce jsem se zabývala genetickou variabilitou mikrosatelitních markerů v evropských populacích plísně slunečnice (*Plasmopara halstedii*), obligátně biotrofního parazita způsobujícího ekonomicky významné škody v porostech slunečnice roční. V následující části se pokusím okomentovat výsledky mé bakalářské práce se závěry autorů, kteří použili mikrosatelitní markery *Pl. halstedii* (Giresse *et al.*, 2007, Rivera *et al.*, 2016), a doplním o srovnání se studii provedenými u příbuzných druhů. Zaměřím se na srovnání úrovně variability použitých markerů, na možnost využití mikrosatelitních markerů pro detekci rozdílů mezi populacemi a pro odhad převažujícího způsobu rozmnožování.

Pomocí 11 polymorfních markerů jsem detekovala celkem 70 alel, přičemž počet alel detekovaných jedním markerem se pohyboval v rozmezí 3–15. Délky alel se u většiny markerů pohybovaly v rozmezí od 146 bp do 479 bp, s průměrnou délkou 287 bp. Výjimkou byly alely o délce 700 bp detekované pomocí markeru PH-036, které pocházely ze vzorků *Pl. halstedii* odebraných z *Helianthus x laetiflorus*. I ostatní alely detekované tímto markerem byly delší (356–412 bp) oproti celkovému průměru.

Tyto hodnoty odpovídají údajům v obou studiích prováděných v rámci rodu *Plasmopara*. Giresse *et al.* (2007) vyvinuli pět SSR markerů detekující max. 2 alely na lokus, přičemž délka alel se pohybovala v rozmezí 226–449 bp. Ve studii Rivera *et al.* (2016) bylo u *Pl. halstedii* pomocí 15 polymorfních markerů detekováno 4–12 alel na marker a délka alel se pohybovala v rozmezí 133–301 bp. Průměrné hodnoty dalších hodnocených indexů ($H_E = 0,207$; $H_O = 0,057$; $PIC = 0,494$) jsou nižší ve srovnání s údaji ve srovnávaných člancích.

U další oomycet např. ve studii Wallace *et Quesada-Ocampo* (2017) jsou popsány nové markery pro plíseň okurkovou (*Pseudoperonospora cubensis*) a chmelovou (*Ps. humuli*) na materiálu ze Severní Ameriky. Zde autoři pomocí 11 markerů detekovali celkem 89 alel. Jejich délka se pohybovala mezi 118–448 bp. Počet alel na marker se pohyboval v rozmezí 2–9 alel. To jsou nižší hodnoty než ty, které jsem zjistila ve své bakalářské práci, ačkoliv byly vypočítány z dat získaných pro dva blízce příbuzných druhy a jejich variabilita by mohla být tedy vyšší.

Počet detekovaných alel na lokusu je poměrně nízký. Obecně je vývoj mikrosatelitních markerů u hub považován za problematický a markery zpravidla vykazují nižší úroveň polymorfismu než je to u jiných organismů (Dutech *et al.*, 2007). Zdá se, že je to způsobeno, především nižším zastoupením mikrosatelitních lokusů v genomu hub a celkově i jejich krátkou délkou (počtem repetice daného motivu). V rámci oomycet Thines *et al.* (2020) provedli srovnání

mikrosatelitních lokusů v genomech 34 druhů oomycet. Zjistili, že u *Pl. halstedii* představoval podíl mikrosatelitních motivů o délce 2–6 nt pouze 0,03% genomu. Podíl těchto mikrosatelitních sekvencí se ve většině genomů oomycet pohyboval od 0,023% (*Albugo candida*) do 0,331% (*Pythium irregulare*). Vyšší podíl byl pozorován u sekvencí o délce 1–6 bp a to od 0,044% (*Pl. halstedii*) do 0,341% (*Pythium irregulare*). Vysoký podíl jednonukleotidových repetice u hub obecně popisuje i Lim *et al.* (2004), kdy analýzou 14 genomů hub zjistili, že více než 90 % mikrosatelitních lokusů má nízký počet repetice (tj. méně než 8) a většinu těchto lokusů tvoří mononukleotidové repetice. Tento typ motivů není ale zpravidla v populačně genetických studiích využíván.

Jedním z hlavních zjištění mé bakalářské práce je výrazná odlišnost vzorků z *H. x laetiflorus*, které se signifikantně vyčlenily na fylogenetickém stromě a tím potvrdily i výrazné odlišnosti pozorované v délce alel na elektroforetogramech. Pro odlišení blízkce příbuzných nebo kryptických druhů souvisejících s preferencí různých hostitelských druhů byly mikrosatelitní markery použity u oomycet například při popisu dvou genetických linií plísňe tykvovitých (*Ps. cubensis*) na planých a pěstovaných druzích tykvovitých (Wallace *et al.*, 2020). U jedné skupiny vzorků byla prokázána rekombinace a náhodné křížení, kdežto u druhé skupiny absence rekombinace a nenáhodné křížení, což autoři vysvětlují možnou existencí dvou kryptických druhů.

Odlišnost vzorků z různých hostitelských rostlin prokázala i studie Rivera *et al.* (2016), kde byly pomocí mikrosatelitních markerů rovněž odlišeny vzorky pocházející ze dvou hostitelských druhů (slunečnici roční a třapatky zářivé). V dalším výzkumu by zjištěné rozdíly mohly být potvrzeny i na základě sekvenčních dat.

Při porovnávání rozdílů mezi skupinami vzorků pocházejících z různých metapopulací, vytvořených uměle podle geografického původu, můžeme pozorovat nižší hodnoty pozorované heterozygotnosti (H_O) oproti heterozygotnosti očekávané (H_E) a vysoké hodnoty fixačního (inbredního) indexu (F) (Tabulka 8). Výsledky rovněž ukazují na převahu nenáhodného, klonálního rozmnožování ve studovaných metapopulacích indikované vyššími a statisticky významnými hodnotami indexu asociace I_A (Obrázek 6). Tyto výsledky odrážejí biologické vlastnosti patogena. Populace *Pl. halstedii* jsou považovány za relativně velké a tento patogen produkuje oospory, které mohou přežít dlouhodobě v půdě až deset let i v nepřítomnosti hostitelských rostlin. *Pl. halstedii* se rozmnožuje buď sexuální rekombinací [sefing, splývání gametangií (oogonia a antheridia) z homothalických hyf, tj. procesem vedoucím k tvorbě tlustostěnných oospor koncem sezóny] nebo klonálně asexuální tvorbou zoosporangii

(Delmotte *et al.*, 2008, Gascuel *et al.*, 2016). Vzácné případy rekombinace (vedoucí ke vzniku nových kombinací virulence, překonání rezistence hostitele a následně změnám ve frekvenci ras v populacích *Pl. halstedii*) probíhají parasexuálním procesem, tj. splýváním hyf geneticky odlišných mycelií infikujících stejný orgán hostitele (Spring *et al.*, 2006). Selfing je u oomycet uváděn jako způsob sexuálního rozmnožování homothalických druhů (tj. i *Pl. halstedii*) (Gascuel *et al.*, 2015), který vede ke snižování genetické diverzity v populacích. Klonální způsob rozmnožování tvorbou zoosporangií (během cca 10 dní) umožňuje rapidní šíření vybraných genotypů v populaci hostitele (Naegele *et al.*, 2016). Nízkou úroveň pozorované heterozygotnosti (0–0,143) a pravděpodobnou převahu rozmnožování splýváním homothalických hyf (selfing) detekovali v populacích *Pl. halstedii* z Francie a Ruska pomocí SSR a CAPS markerů (Giresse *et al.*, 2007). Klonalita populací ve Francii je popisována i na základě SNP markerů (Delmotte *et al.*, 2008).

Způsobem, jakým *Pl. halstedii* přežívá a jak se šíří v přírodě, je pravděpodobně ovlivněna i pozorovaná strukturovanost populací. Zdrojem infekce mohou být oospory přežívající v zemině a na osivu (Nishimura, 1922) nebo mycelium pod osemením nažek (Young *et al.*, 1927). Infikovaná zemina může být tedy zdrojem genotypů vyskytujících se na dané lokalitě opakovaně, které jsou adaptovány na lokální podmínky a pěstované odrůdy hostitele. Tyto genotypy pravděpodobně ovlivnily jemnou strukturovanost detekovanou pomocí Bayesovského klastrování, kdy se výrazněji odlišuje část vzorků z České republiky (růžový signál) od vzorků z Maďarska (světle zelená), Ruska (světle modrá) a tmavě zelený signál společný vzorkům Francie a Německa. Podobnost metapopulací z Německa a Francie prokazuje statisticky nevýznamná hodnota F_{ST} a nejvyšší hodnota toku genů. Zajímavým zjištěním je podobný charakter vzorků z Evropy a několika vzorků ze Severní a Jižní Ameriky. Zajímavá je také detekce zeleného signálu u části vzorků z České republiky, kdy světle zelený signál naznačuje podobnost se vzorky z Maďarska, kdežto tmavě zelený signál je sdílen se vzorky z Německa a Francie. Všechny vzorky se zeleným signálem pocházejí z pokusného pole v areálu PřF UP v Olomouci, kde byly během posledních cca 20ti let vysazeny slunečnice pro okrasné účely (doc. Sedlářová, ústní sdělení). Pravděpodobně zde bylo primárním zdrojem inokula *Pl. halstedii* infikované osivo. Naproti tomu vzorky z České republiky nesoucí růžový signál pocházejí ze zemědělských pěstebních ploch (Hustopeče u Brna, Podivín, Kroměříž) a zřejmě představují genotypy z oosporami zamořené půdy. Dlouhodobě přežívající inokulum patogena je adaptováno na určitou odrůdu hostitelských rostlin, a proto je doporučováno jako

opatření proti skryté (latentní) infekci na pozemku v roce následujícím po pěstování slunečnice hubit rostliny z výdrolu preemergentními herbicidy (Sedlářová *et al.*, 2020).

7 Závěr

V této bakalářské práci jsem se zabývala genetickou diverzitou a populačně genetickou strukturou evropských populací *Plasmopara halstedii*.

Celkem jsem testovala 40 mikrosatelitních markerů na sadě 162 vzorků *Plasmopara halstedii*. Část vzorků mi byla poskytnuta ve formě purifikované DNA, u části vzorků jsem provedla izolaci DNA ze spor. Pro amplifikaci mikrosatelitních markerů byla použita metoda PCR, alely byly separovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a byly detekovány barvením stříbrem. Na podsouboru vzorků jsem takto vybrala 11 polymorfních a zároveň nejlépe hodnotitelných markerů. S těmito markery byla provedena analýza všech 162 vzorků, stanovena přesná délka alel na kapilární elektroforéze a provedeno statistické vyhodnocení.

Z výsledků vyplývá, že populace *Pl. halstedii* v Evropě vykazují nízké hodnoty pozorované heterozygotnosti, vysoké hodnoty fixačního (inbredního) indexu, a převažuje v nich klonální rozmnožování. Vzorky *Pl. halstedii* odebrané z různých hostitelských rostlin pravděpodobně představují dva odlišné taxony. U vzorků pocházejících ze slunečnice roční se na fylogenetickém stromě výrazněji vyčlenily dvě genetické skupiny představované jednak skupinou s převahou vzorků z Maďarska, a skupinou vzorků z ostatních států. Jemnější strukturovanost byla detekována pomocí Bayesovského clusterování. Vzorky pocházející ze Severní a Jižní Ameriky se výrazněji neodlišovaly od vzorků z Evropy.

Výsledky mé bakalářské práce potvrzují vhodnost využití mikrosatelitních markerů pro studium kryptických druhů a pro popis populačně genetické struktury obligátně biotrofních patogenů kulturních rostlin.

8 Literatura

- Adl S. N., Bass D., Lane C. E., Lukeš J., Schoch C. L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M. W., Burki F., Cárdenas P., Čepička I., Chistyakova L., del Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A. A., Hoppenrath M., James T. Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D. J. G., Lara E., Le Gall L., Lynn D. H., Mann D. G., Massana R., Mitchell E. A. D., Morrow C. Park J. S., Pawlowski J. W., Powell M. J., Richter D. J., Rueckert S., Shadwick L., Shimano S., Spiegel F. W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. (2018): Revision to the classification, nomenclature, and diversity of eukyotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4–119.
- Bennet P. (2000): Demystified ... Microsatellites. *Molecular Pathology* 53: 177–183.
- Brown S. P., Cornforth D. M., Mideo N. (2012): Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology* 20: 336–342.
- Carlsson J. (2008): Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99: 616–623.
- Choi Y. J., Beakes G., Glockling S., Kruse J., Nam B., Nigrelli L., Ploch S., Shin H. D., Shivas R. G., Telle S., Voglmayr H., Thines M. (2015): Towards a universal barcode of oomycetes - a comparison of the cox 1 and cox 2 loci. *Molecular Ecology Resources* 15: 1275–1288.
- Choi Y. J., Hong S. B., Shin H. D. (2003): Diversity of the *Hyaloperonospora parasitica* complex from core brassicaceous hosts based on ITS rDNA sequences. *Mycological Research* 107: 1314–1322.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Wagels G., Brasier C. M. (2000): A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32.
- Cooke D. E. L., Duncan J. M. (1997): Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101: 667–677.

- Cooke D. E. L., Williams N. A., Williamson B., Duncan J. M. (2002): An ITS-based phylogenetic analysis of the relationships between *Peronospora* and *Phytophthora*. In: Spencer-Phillips P. T. N., Gisi U., Lebeda A. (eds.): *Advances in Downy Mildew Research*, pp. 161–165. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Constantinescu O., Fatehi J. (2002): *Peronospora*-like fungi (Chromista, Peronosporales) parasitic on Brassicaceae and related hosts. *Nova Hedwigia* 74: 291–338.
- Derevnina L., Petre B., Kellner R., Dagdas Y. F., Sarowar M. N., Giannakopoulou A., De la Concepcion J. C., Chaparro-Garcia A., Pennington H. G., van West P., Kamoun S. (2016): Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 371: 1709.
- Delmotte F., Chen W. J., Richard-Cervera S., Greif C., Papura D., Giresse X., Mondor-Genson G., Corio-Costet M. F. (2006): Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes*, 6: 379–381.
- Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., M'baya J., Vear F., Tourvielle J., Walser P., de Labrouhe D. T. (2008): Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 8: 534–540.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Drábková Trojanová Z., Sedlářová M., Pospíchalová R., Lebeda A. (2018): Pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* infecting sunflower in the Czech Republic. *Plant Pathology* 67: 136–144.
- Dutech C., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Barrès B., Carlier J., Tharreau D., Giraud T. (2007): Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44: 933–949.
- Estoup A., Jarne P., Cournet J. M. (2002): Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.

- Garnica D. P., Pinzón A. M., Quesada-Ocampo L. M., Bernal A. J., Barreto E., Grünwald N. J., Restrepo S. (2006): Survey and analysis of microsatellites from transcript sequences in *Phytophthora* species: frequency, distribution, and potential as markers for the genus. *BMC Genomics* 7: 245.
- Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M., Vear F., Pichoni M., Godiard L. (2015): The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology* 16: 109–122.
- Gascuel Q., Bordat A., Sallet E., Pouilly N., Carrere S., Roux F., Vincourt P., Godiard L. (2016): Effector polymorphisms of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii* and their use to identify pathotypes from field isolates. *PLOS ONE* 11(2): e0148513.
- Giresse X., de Labrouhe D. T., Richard-Cervera S., Delmotte F. (2007): Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Molecular Ecology Notes* 7: 1363–1365.
- Gobbin D., Pertot I., Gessler C. (2003): Identification of microsatellite markers for *Plasmopara viticola* and establishment of high throughput method for SSR analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109: 153–164.
- Göker M., Riethmüller A., Voglmayr H., Weiß M., Oberwinkler F. (2004): Phylogeny of *Hyaloperonospora* based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mycological Progress* 3: 83–176.
- Horbach R., Navarro-Quesada A. R., Knogge W., Deising H. B. (2011): When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168: 51–62.
- Jakobsson M., Rosenberg N. A. (2007): CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. (2011): Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334.
- Kamoun S. (2003): Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell* 2: 191–199.
- Kazda J., Říha J., Stejskalová M., Spitzer T. (2018): Ochrana slunečnice roční (*Helianthus annuus*) proti chorobám a živočišným škůdcům podle zásad IOR. Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha.

- Kirschner J., Šída O. (2004): *Helianthus* L. - slunečnice. In: Slavík B., Štěpánková J., Štěpánek J. (eds.): Květena České republiky 7, p. 322–331, Academia, Praha.
- Lamour K., Kamoun S. (2009): Oomycete genetics and genomics: diversity, interaction and research tools. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 1
- Leclerc M. C., Guillot J., Deville M. (2000): Taxonomic and phylogenetic analysis of Saprolegniaceae (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 369–377.
- Liese A. R., Gottlieb A. R., Sackston W. E. (1982): Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower. In: Proceedings of the 10th International Sunflower Conference, Surfers Paradise, Australia, pp. 173–175.
- Lim S., Notley-McRobb L., Lim M., Carter D. A. (2004): A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genetics and Biology* 41: 1025–1036.
- Marshall T. C., Slate J., Kruuk L. E. B., Pemberton J. M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639–655.
- McGowan J., Fitzpatrick D. A. (2020): Recent advances in oomycete genomics. *Advances in Genetics* 105: 175–228.
- Montarry J., Andrivon D., Glais I., Corbiere R., Mialdea G., Delmotte F. (2010): Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* 19: 1965–1977.
- Naegele R. P., Quesada-Ocampo L. M., Kurjan J. D., Saude C., Hausbeck M. K. (2016): Regional and temporal population structure of *Pseudoperonospora cubensis* in Michigan and Ontario. *Phytopathology* 106: 372–379.
- Nishimura M. (1922): Studies in *Plasmopara halstedii*. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japan* 11: 185–210.
- Oliviera E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R., Vieira M. L. C. (2006): Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.

- Parada-Rojas C. H., Quesada-Ocampo L. M. (2018): Analysis of microsatellites from transcriptome sequences of *Phytophthora capsici* and applications for population studies. *Scientific Reports* 8: 5194.
- Peakall R., Smouse P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rivera Y., Salgado-Salazar C., Gulya T. J., Crouch J. A. (2016): Newly emerged populations of *Plasmopara halstedii* infecting *Rudbeckia* exhibit unique genotypic profiles and are distinct from sunflower-infecting strains. *Phytopatology* 106: 752–761.
- Rosenberg A. (2004): DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138.
- Rouxel M., Papura D., Nogueira M., Machefer V., Dezette D., Richard-Cervera S., Carrere S., Mestre P., Delmotte F. (2012): Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6337–6340.
- Salgado-Salazar C., Rivera Y., Veltri D., Crouch J. A. (2015): Polymorphic SSR markers for *Plasmopara obducens* (Peronosporaceae), the newly emergent downy mildew pathogen of *Impatiens* (Balsaminaceae). *Applications in Plant Sciences* 3: apps.1500073.
- Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.
- Sedlářová M., Dobešová K., Lebeda A. (2020): Plíseň slunečnice v České republice. *Agromanuál* 15: 32–34.
- Sedlářová M., Stojaspal K., Lebeda A. (2010): Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České republice. *Rostlinolékař* 1: 17–20.
- Sehn J. K. (2015): Insertions and deletions. In: Kulkarni S., Pfeifer J. D. (eds.): *Clinical Genomics*, pp. 133, Elsevier, Amsterdam.
- Selkoe K. A., Toonen R. J. (2006): Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615–629.

- Sharma P. C., Grover A., Kahl G. (2007): Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* 25: 490–498.
- Sharma R., Xiaojuan X., Cano L. M., Evangelisti E., Kemen E., Judelson H., Oome S., Sambles C., van den Hoogen D. J., Kitner M., Klein J., Meijer H. J. G., Spring O., Win J., Zipper R., Bode H. B., Govers F., Kamoun S., Schornack S., Studholme D. J., Van den Ackerveken G., Thines M. (2015): Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. *BCM Genomics* 16: 741–764.
- Slobodianová L. (2016): Variabilita populací *Plasmopara halstedii* v ČR. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- Spring O. (2001): Nonsystematic infections of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108: 329–336.
- Spring O. (2019): Spreading and global pathogenic diversity of sunflower downy mildew - review. *Plant Protection Science* 55: 149–158.
- Spring O., Gomez-Zeldon J., Hadziabdic D., Trigiano R. N., Thines M., Lebeda A. (2018): Biological characteristics and assessment of virulence diversity in pathsystems of economically important biotrophic Oomycetes. *Critical Reviews in Plant Science* 37: 439–495.
- Spring O., Zipper R. (2006): Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* 110: 657–663.
- Stewart S. M., Wickramasinghe D., Dorrance A. E., Robertson A. E. (2011): Comparison of three microsatellite analysis methods for detecting genetic diversity in *Phytophthora sojae* (Stramenopila: Oomycete). *Biotechnology Letters* 33: 2217–2223.
- Taylor A. S., Knaus B. J., Grünwald N. J., Burgess T. (2019): Population genetic structure and cryptic species of *Plasmopara viticola* in Australia. *Phytopathology* 109: 1975–1983.
- Thines M. (2007): Characterisation and phylogeny of repeated elements giving rise to exceptional length of ITS2 in several downy mildew genera (Peronosporaceae). *Fungal Genetics and Biology* 44: 199–207.
- Thines M. (2014): Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes - a global overview. *European Journal of Plant Pathology*. 138: 431–447.

- Thines M., Choi Y. J. (2016): Evolution, diversity, and taxonomy of the Peronosporaceae, with focus on the genus *Peronospora*. *Phytopathology* 106: 6–18.
- Thines M., Göker M., Spring O., Oberwinkler F. (2006): A revision of *Bremia graminicola*. *Mycological Research* 110: 646–656.
- Thines M., Kamoun S. (2010): Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 427–433.
- Thines M., Komjáti H., Spring O. (2005): Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. *European Journal of Plant Pathology* 112: 395–398.
- Thines M., Sharma R., Rodenburg S. Y. A., Gogleva A., Judelson H. S., Xia X., van den Hoogen J., Kitner M., Klein J., Neilen M., de Ridder D., Seidl M. F., van den Ackerveken G., Govers F., Schornack S., Studholme D. J. (2020): The genome of *Peronospora belbahrii* reveals high heterozygosity, a low number of canonical effectors and TC-rich promoters. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 22: 742–753.
- Thines M., Spring O. (2005): A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). *Mycotaxon* 94: 443–458.
- Trigiano R. N., Wadl P. A., Dean D., Hadziabdic D., Scheffler B. E., Runge F., Telle S., Thines M., Ristaino J., Spring O. (2012): Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia* 104: 633–640.
- Trojanová Z., Sedlářová M., Gulya T. J., Lebeda A. (2017): Methodology of virulence screening and race characterization of *Plasmopara halstedii*, and resistance evaluation in sunflower - a review. *Plant Pathology* 66: 171–185.
- Vleeshouwers V. G., Oliver R. P. (2014): Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 196–206.
- Voglmayr H. (2003): Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycological Research* 107: 1132–1142.
- Voglmayr H., Riethmüller A., Göker M., Weiss M., Oberwinkler F. (2004): Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 108: 1011–1024.

- Wallace E. C., Quesada-Ocampo L. M. (2017): Analysis of microsatellites from the transcriptome of downy mildew pathogens and their application for characterization of *Pseudoperonospora* populations. *PeerJ* 5: e3266.
- Wallace E. C., D’Arcangelo K. N., Quesada-Ocampo L. M. (2020): Population analyses reveal two host-adapted clades of *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew, on commercial and wild cucurbits. *Phytopathology* (in press).
- Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. (2005): DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis group, Boca Raton, Florida.
- Wright S. (1931): Evolution in Mendelian population. *Genetics* 16: 97–159.
- Young P. A., Morris H. E. (1927): *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflowers. *American Journal of Botany* 14: 51–552.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1–16.

Internetové zdroje

Index Fungorum [online] [navštíveno 22.7.2020]

Dostupné z <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>

The Centre for Agriculture and Bioscience International (Cabi). [online] [navštíveno 24.3.2020]

Dostupné z <https://www.cabi.org/isc/datasheet/41911>

RStudio Team (2020): RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA

URL [online] [navštíveno 24.3.2020] Dostupné z <http://www.rstudio.com/>

Šindelková M., Brnický P., Svobodová I., Šamánek J. (2008): Plíseň slunečnice *Plasmopara halstedii*. Ministerstvo zemědělství a Státní rostlinolékařská péče, 8 pp. [online] [navštíveno 24.3.2020] Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/dokumenty-a-publikace/informacni-letaky/skodlive-organismy/plisen-slunecnice-plasmopara-halstedii.html>