

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2011**

**Lenka Procházková**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Využití metody AFLP při studiu genetické  
variability sbírky izolátů *Pseudoperonospora*  
*cubensis***

**Bakalářská práce**

**Lenka Procházková**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2011**

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

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně podle pokynů vedoucího bakalářské práce a za použití uvedené literatury.

V Olomouci dne 27. 8. 2011

.....

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph. D., vedoucímu bakalářské práce, za čas a trpělivost věnovanou vedením mé bakalářské práce, za odborné vedení, poskytnutí odborné literatury a pomoc při vypracování této práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Boženě Sedlákové, Ph. D. za pečlivé pročtení celého textu a poskytnutí cenných připomínek a informací, které přispěly ke zvýšení kvality této práce.

Poděkování patří také paní Drahomíře Vondrákové za ochotu, kterou mi poskytla při konzultacích.

## SOUHRN

Plíseň okurková je považována za nejzávažnější onemocnění tykvovitých rostlin (*Cucurbitaceae*), které způsobuje významné hospodářské ztráty na celém světě (Thomas, 1996). Původcem této choroby je obligátní houbový parazit *Pseudoperonospora cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011), který vykazuje rozsáhlý okruh hostitelských rostlin (Lebeda a Urban, 2007; Palti a Cohen, 1980).

V posledních letech se hledají cesty jak identifikovat rozdíly jednotlivých kmenů *P. cubensis* s různými fytopatologickými charakteristikami (např. patotypy), a to i pomocí metod molekulární biologie. V rámci této bakalářské práce byla provedena pomocí metody AFLP detekce variability u souboru 30 izolátů *P. cubensis* pocházející z České republiky. U každého z testovaných izolátů byl znám jeho patotyp. Genetická analýza izolátů *P. cubensis* byla provedena pomocí zvolených 13 primerových kombinací. Celkem bylo získáno 387 detekovatelných bandů, na základě kterých byly programem TreeView a FreeTree sestaveny tři dendrogramy. Tyto dendrogramy oddělily izoláty z roku 2009 od ostatních izolátů. Nepodařilo se tedy rozčlenit dané izoláty podle odlišných geografických oblastí. Z těchto výsledků je také patrné, že neexistuje souvislost mezi shlukováním izolátů s podobnými fytopatologickými charakteristikami a jejich AFLP profily.

Výsledky této bakalářské práce ukazují na důležitost sledování změn v přírodních populacích *P. cubensis*, které mohou přispět ve šlechtění rezistentních odrůd tykvovitých plodin, popřípadě k výběru a vývoji fungicidů, které by zmírnily každoroční dopad devastujících epidemií.

## SUMMARY

Downy mildew is considered as the most serious disease of *Cucurbitaceae* plants which causes the considerable economic losses in the whole world (Thomas, 1996). The etiological agent of this disease is an obligate fungal parasite *Pseudoperonospora cubensis* (Lebeda and Cohen, 2011) which exhibits an extensive range of host plants (Lebeda and Urban, 2007; Palti and Cohen, 1980).

In recent years are searching for ways to identify the differences in individual strains of *P. cubensis* with different phytopathological characteristics (e.g. the pathotypes) also by using of methods of molecular biology. A detection of the variability was performed within this bachelor thesis by using of method AFLP at the collection of 30 isolates of *P. cubensis* originated from Czech Republic with its known pathotype characteristics. The genetic analysis of isolates of *P. cubensis* was performed by using of 13 selected primer combinations. In total 387 AFLP bands were detected and on their basis three dendrograms we constructed using of the TreeView and FreeTree programs. The dendrograms separated the isolates from the 2009 year from the rest of analysed samples. However, segregation of isolates according to different geographical areas has not been confirmed. It is also clear from these results that a clear linkage between the clustering of the isolates with the similar phytopathological characteristics and their AFLP profiles has not been proved.

The results of this bachelor thesis demonstrate the importance of change monitoring in natural populations of *P. cubensis* that can help in breeding of resistant varieties of crops Cucurbitacea or to the selection and the development of fungicides which would reduce the devastating impact of annual epidemics of this pathogen.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ REŠERŠE.....</b>	<b>11</b>
3.1	Taxonomie <i>P. cubensis</i> .....	11
3.2	Parazitizmus <i>P. cubensis</i> .....	12
3.3	Životní a infekční cyklus <i>P. cubensis</i> .....	12
3.4	Faktory ovlivňující infekční proces <i>P. cubensis</i> .....	15
3.5	Symptomy napadení <i>P. cubensis</i> .....	16
3.6	Hostitelský okruh <i>P. cubensis</i> a charakteristika čeledi <i>Cucurbitaceae</i> a některých jejích významných rodů a druhů .....	17
3.7	Geografické rozšíření <i>P. cubensis</i> .....	19
3.8	Specifičnost interakce <i>Cucurbitaceae</i> – <i>P. cubensis</i> .....	20
3.8.1	Patogenní variabilita .....	20
3.8.2	Zdroje odolnosti a šlechtění na rezistenci .....	22
3.8.3	<i>Cucumis sativus</i> .....	22
3.8.4	<i>Cucumis melo</i> .....	23
3.8.5	<i>Cucurbita</i> spp.....	23
3.9	Genetické aspekty interakcí <i>Cucurbitaceae</i> - <i>P. cubensis</i> .....	23
3.10	Interakce na buněčné a molekulární úrovni .....	24
3.10.1	Molekulární metody používané při studiu <i>P. cubensis</i> .....	24
3.10.2	AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) .....	25
3.10.3	Metody izolace DNA u zástupců rodu <i>Pseudoperonospora</i> .....	27
3.10.3.1	Fylogenetické stromy .....	28

<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>30</b>
4.1	Použité chemikálie.....	30
4.2	Použité přístroje.....	31
4.3	Použité roztoky.....	32
4.4	Kultivace <i>P. cubensis</i> .....	33
4.5	Příprava inokula, inokulace a inkubace.....	34
4.6	Metodika zisku spor plísně okurkové ( <i>P. cubensis</i> ) k dalšímu využití.....	36
4.7	Izolace DNA.....	36
4.8	AFLP protokol.....	37
4.8.1	Restrikce a ligace DNA.....	37
4.8.2	Preselektivní amplifikace.....	39
4.8.3	Selektivní amplifikace.....	40
4.9	Separace a detekce AFLP fragmentů.....	41
4.10	Analýza dat.....	43
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>58</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>60</b>



# 1 ÚVOD

Plíseň okurková je považována za nejzávažnější onemocnění tykvovitých rostlin, které způsobuje významné hospodářské ztráty v Evropě, USA, Číně a Izraeli (Thomas, 1996). Původcem této choroby je obligátní houbový parazit *Pseudoperonospora cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011). Tento patogen vykazuje rozsáhlou geografickou distribuci a je rozšířen na všech kontinentech severní i jižní polokoule, kde jsou pěstovány tykvovité rostliny. Vyskytuje se především v subtropických a tropických oblastech a to jak na polních, tak i na krytých porostech (Lebeda, 1990). Nejčastěji se tento patogen vyskytuje na rodu *Cucumis*, přičemž rod *Cucumis* se v současnosti vyskytuje ve více než 70 zemích světa a na *C. melo* ve více než 50 zemích světa (Lebeda, 1990). Má rovněž i široký hostitelský okruh, kdy kromě pěstovaných druhů čeledi *Cucurbitaceae* napadá *P. cubensis* i různé polokulturní, plevelné a planě rostoucí rody a druhy čeledi *Cucurbitaceae* (Lebeda a kol., 2006; Lebeda a Urban, 2007; Palti a Cohen, 1980).

U *P. cubensis* byly popsány fyziologické rasy a patotypy. Ty jsou pomocí systému kompatibilita/inkompatibilita stanovovány krátce po infekci (Lebeda a kol., 2008). V posledních letech se hledají různé cesty, jak jednoduše identifikovat rozdíly jednotlivých kmenů *P. cubensis* s různými fytopatologickými charakteristikami (např. patotypy), a to i pomocí metod molekulární biologie. V práci realizované na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci (Sarris a kol., 2009) se jako nevhodné ukázalo použití sekvenování ITS oblastí, zatímco pomocí metody AFLP byly zjištěny rozdíly mezi izoláty pocházejícími z různých geografických oblastí. Nebyly však jednoznačně prokázány souvislosti mezi AFLP profily a fytopatologickými charakteristikami izolátů *P. cubensis*.

Hlavním úkolem této práce bylo právě ověření využití metody AFLP pro odlišení izolátů *P. cubensis*, které vykazují různé fytopatologické charakteristiky. Pro tyto účely bylo vybráno 30 izolátů ze sbírkové kolekce *P. cubensis* udržované na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci, které pocházely z různých sběrových let z území České republiky a byly u nich detekovány různé patotypové profily. Byly použity tyto základní postupy: izolace DNA ze spor *P. cubensis*, aplikace metody AFLP (restrikce, ligace, PCR amplifikace), polyakrylamidová elektroforéza a statistické zpracování získaných dat.

## 2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

- 1) Vypracování literární rešerše na téma detekce patogenní variability sbírky izolátů *Pseudoperonospora cubensis* pomocí molekulárních metod.
- 2) Kultivace vybraných izolátů patogenu *P. cubensis* (PC), které jsou udržovány ve sbírce mikroorganismů Katedry botaniky PřF UP. Získ spor pro izolaci DNA, optimalizace metodiky izolace DNA ze získaných spor PC.
- 3) Optimalizace metody AFLP pro studovaný organismus (výběr vhodných primerových kombinací, optimalizace PCR).
- 4) Provedení AFLP analýzy vybraných izolátů PC, statistické vyhodnocení získaných dat a srovnání výsledků s dostupnými fytopatologickými údaji o studovaných izolátech *P. cubensis*.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Taxonomie *P. cubensis*

*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. a Curt) Rostov. byla poprvé popsána Berkelym v roce 1868 na rostlinném materiálu pocházejícím z Kuby. Proto je její druhové jméno *cubensis* (Lebeda a kol., 2006). Původcem této plísně je *Pseudoperonospora cubensis*, která bývá označována i jinými názvy jako *Peronospora cubensis*, *Plasmopara cubensis*, *Peronoplasmopara cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011). Na živém materiálu však byla *P. cubensis* poprvé pozorována Roztovzewem v roce 1903 v botanické zahradě v Moskvě (Skalický, 1961).

*Pseudoperonospora cubensis* patří do říše Chromista, pododdělení Peronosporomycotina, třídy Peronosporomycetes a řádu Peronosporales. Třída Peronosporomycetes zahrnuje v současnosti asi 900 druhů, 75 rodů a 19 čeledí. *Pseudoperonospora cubensis* je součástí čeledi Peronosporaceae a řádu Peronosporales. Tato čeleď dále zahrnuje rody *Pseudoperonospora*, *Bremia*, *Peronospora*, *Hyloperonospora* a *Plasmopara*. Jednotlivé rody jsou charakterizovány zejména tvarem a způsobem větvení jejich sporangioforů (Lebeda, 2006). Rod *Pseudoperonospora* je tvořen pěti druhy: *P. cubensis*, *P. humuli*, *P. cannabina*, *P. celtidis* a *P. urticae*. Kromě těchto zmiňovaných existují i zprávy o existenci šestého druhu *P. cassiae* (Savory a kol., 2011). Na základě molekulárně-fylogenetických studií ITS oblastí rDNA *P. cubensis* a *P. humuli* se ukázalo, že rod *Pseudoperonospora* je vyhraněnou taxonomickou jednotkou, avšak tyto studie také naznačily, že oba druhy jsou si dosti podobné, s tím, že *P. humuli* bylo navrženo jako synonymum *P. cubensis* (Choi a kol., 2005). Tyto studie rovněž potvrdily, že v rámci *P. cubensis* existuje malá vnitrodruhová variabilita (Choi a kol., 2005), což je však v rozporu s údaji o patogenní variabilitě *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011).

### 3.2 Parazitizmus *P. cubensis*

*P. cubensis* je obligátní biotrofní parazitická houba vyšších rostlin a v napadených listech hostitele tvoří nepřehrádkované mycelium s haustorií (Lebeda a Swinn, 1994; Sarris a kol., 2009). Svému hostiteli se zcela přizpůsobí a to do té míry, že může existovat a rozmnožovat se jedině na živé rostlině nebo v jejích živých pletivech. Rostlinný parazitizmus se u ní vyvíjí nezávisle na nutriční strategii (Sarris a kol., 2009). Se zánikem hostitele umírá i tato plíseň (Lebeda a Cohen, 2011). Jako ostatní oomycota ani *P. cubensis* neprodukuje toxiny (Švábová a Lebeda, 2005), jen omezeně uvolňuje enzymy degradující buněčnou stěnu (Lebeda a kol., 2001). Na počátku stádia svého vývoje podporuje růst a zvyšování počtu organel v buňkách hostitele (Lebeda a Swinn, 1994). Primární nekrotická reakce infikovaného pletiva je typická pro rezistentní hostitele, která zabrání procesu infekce. Protože je *P. cubensis* biotrofní parazit, není možné ji kultivovat na umělých živných substrátech (Lebeda a kol., 2006). Je u ní příznačná vysoká hostitelská specificita (Klán, 1989).

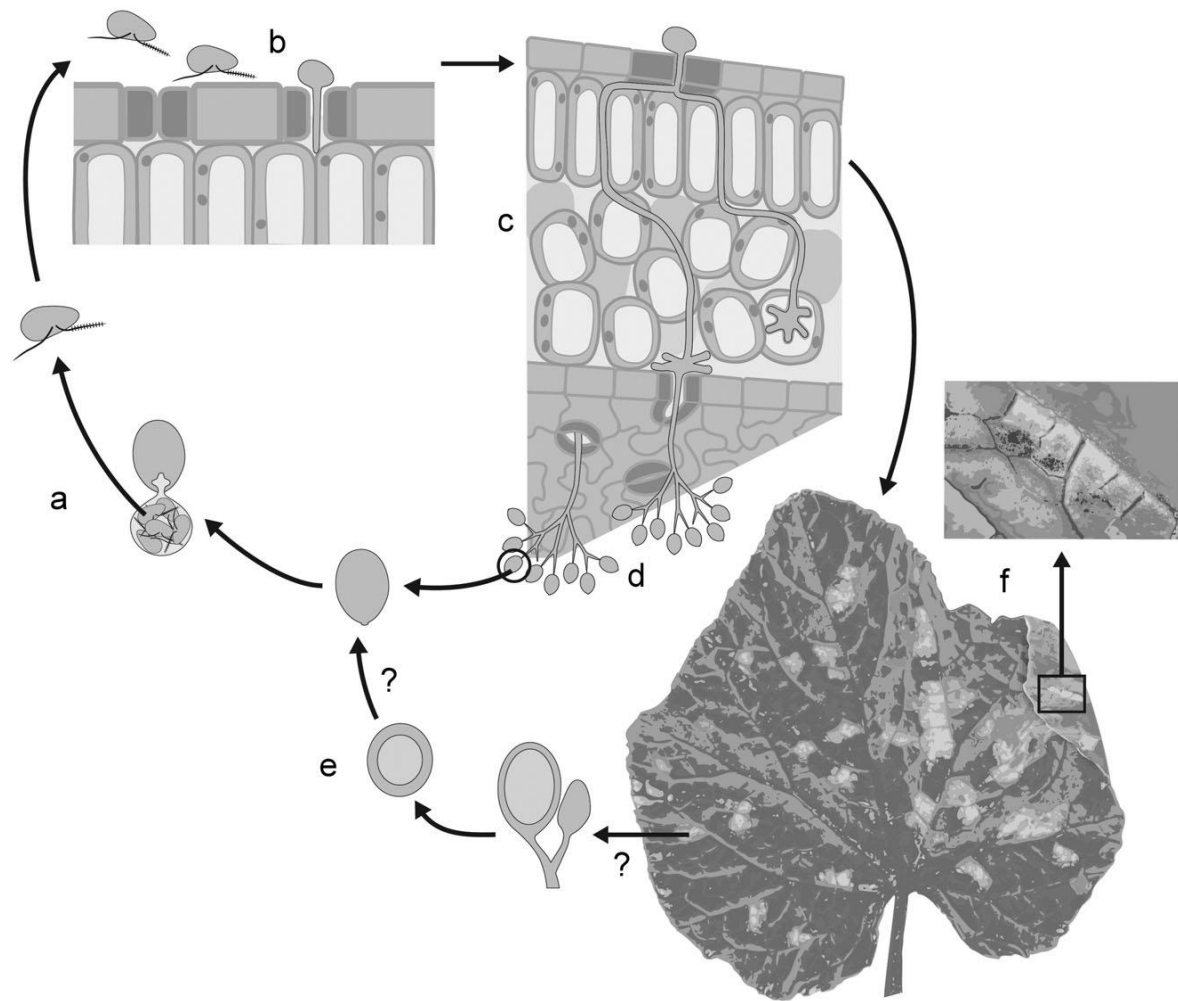
### 3.3 Životní a infekční cyklus *P. cubensis*

Infekční cyklus *P. cubensis* se výrazně neliší od ostatních patogenů čeledi Peronosporaceae a zahrnuje nepohlavní fázi životního cyklu charakteristickou tvorbou nepohlavních spor (zoosporangií, konidiosporangií). Tyto sporangia jsou vejčitého až eliptického tvaru a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 15-25 x 20-35  $\mu\text{m}$  a jsou šedé až černo-fialové barvy (Rod, 1988; Skalický, 1961). K rychlému dozrávání, uvolňování a šíření sporangií dochází při snížené vlhkosti (5-28%) a zvýšené teplotě. Proces je zahájen ráno, kdy vlhkost klesá a teplota stoupá, a trvá až do pozdních odpoledních hodin (Lebeda, 2006). Sporangia, která jsou rozšiřována později, mají větší šanci zůstat životaschopná a infekční do západu slunce, kdy se hromadí rosa (Lebeda a Cohen, 2011). Sporangia jsou snadno oddělitelná od svých sporangioforů, na nichž vyrostly a jsou rozšiřována pasivně nejčastěji pomocí větru (anemochorií) ale mohou být šířeny i vodou (hydrochorií) směrem k průduchům (Lebeda, 2006). Anemochorie je považována za primární a nejúčinnější způsob rozptylu, kterým jsou spory přenášeny větrem na vzdálenosti až několika stovek kilometrů. Vzhledem k takové vzdálenosti se spory *P. cubensis* mohou dostat do oblastí, kde není tento patogen schopen běžně

přezimovat. Hydrochorie je sekundárním mechanismem rozšiřování spor na krátké vzdálenosti (Lebeda a Cohen, 2011). *P. cubensis* může také pro své vyklíčení využít gutačních kapek na listech (Lebeda a Cohen, 2011). Pro styk s rostlinou je důležitý kontakt sporangií s vodou kvůli diferenciaci zoospor (Klán, 1989). Zoospory jsou dvoubičíkaté o velikosti 8-12  $\mu\text{m}$  a v jednom sporangiu jich může být 5-15 (Lebeda, 1990). Tvorba zoospor je však závislá na podmínkách prostředí (Kalina a Váňa, 2005). Jakmile se zoospory dostanou do blízkosti průduchu, jejich pohyb ustává, ztrácejí bičíky, encystují a z cyst začínají klíčit. Utvoří se apresorium, ze kterého vyroste penetrační hyfa, která proniká do vnitřního pletiva listu (Sedlářová a Lebeda, 2002). Poté nastává kolonizace patogenu, která za vhodných podmínek prostředí (vlhkost 90%) a přítomnosti vnímavého hostitele pokračuje poměrně rychle a stává se nezávislou na přítomnosti vody (Lebeda a Cohen, 2011). Do 5-7 dnů vyrostou z průduchů sporangiofory (Lebeda a Cohen, 2011). Tyto sporangiofory se objevují ve skupinách po jednom až po šesti (Savory a kol., 2011). Mají ukončený růst a větví se v závislosti na daném rodu. Na koncích větví se tvoří stejně stará sporangia (Urban a Kalina, 1980). Počáteční stádia infekce (od uvolnění zoospor po vytvoření první hyfy) probíhají ve všech hostitelích, jak vnímavých tak rezistentních. U rezistentního hostitele se růst zastaví po vzniku prvního haustoria. Tvorba haustorií nebyla pozorována na nehostitelských rostlinách (Lebeda a Cohen, 2011). Mycelium, sporangium a zoospory se nevyskytují v semenech nebo plodech. Nemohou přežít v rostlinných zbytcích ani v půdě, a proto není znám mechanismus přezimování tohoto patogenu v Evropě (Lebeda a Cohen, 2011). Předpokládá se, že *P. cubensis* přezimuje v jižních oblastech Severní Ameriky a rozšiřuje se každoročně ve vegetačním období pomocí větru do severních oblastí Ameriky. Také sporangia pocházející z jihovýchodní Evropy jsou přenášeny větrem do střední Evropy (Savory a kol., 2011). V teplých mírných až subtropických oblastech, kde se v zimním období teplota pohybuje nad bodem mrazu, *P. cubensis* přezimuje formou aktivního mycelia v pletivech hostitele (Runge a Thines, 2009).

Pohlavní fáze *P. cubensis* se vyskytuje velmi vzácně a dosud nebyla prokázána ve všech zemích, kde se *P. cubensis* vyskytuje (Lebeda a Cohen, 2011). Probíhá přes tvorbu oospor na konci vegetačního období, tedy v době, kdy začínají odumírat infikovaná pletiva hostitelských rostlin (Lebeda, 2006). Výskyt oospor v rámci Evropy

byl zaznamenán pouze v Rakousku, Izraeli, Indii, Íránu a Číně. V České republice a USA se doposud nepodařilo oospory nalézt.



(a) vzduchem rozptýlená, šedofialová sporangia přistanou na povrchu listu a klíčí ve vlhkém prostředí za tvorby zoospor, (b) zoospory encystují v průduchu a poté pronikají na povrch listu, (c) hyfy kolonizují mezofylovou vrstvu, zakládají kyjovitě větvená haustoria uvnitř rostlinných buněk, (d) přes den dojde ke sporulaci a až šest sporangioforů vyrůstá z každého průduchu. Sporangia jsou vytlačena ze sporangioforů změnami hydrostatického tlaku a jsou sebrána proudem větru, který je nese je k dalšímu hostiteli. (e) chlorotické léze ohraničené listovou žilnatinou jsou typickým znakem infekce *P. cubensis*, (f) úloha pohlavní fáze *P. cubensis* není známa.

**Obrázek 1:** Životní cyklus *Pseudoperonospora cubensis* (upraveno podle Savory a kol., 2011)

### 3.4 Faktory ovlivňující infekční proces *P. cubensis*

Uvolňování spor *P. cubensis* je závislé na teplotě, přičemž jako optimální rozpětí se uvádí 9-30 °C, pokud je teplota vyšší, spory encystují, naopak při nízkých teplotách spory přežívají pomocí tlustostěnných oospor. Optimální teplota pro klíčení cyst je 25 °C (Cohen, 1981). Teplota ovlivňuje i tvorbu haustorií a vezikul a pro tuto fázi je důležité střídání teplot mezi dnem a nocí. Nejvhodnější je v počátcích infekce zachovat poměr 25–30 °C denně a 20 °C v noci (Lebeda, 1990; Lebeda a Cohen, 2011). Nižší teploty zpožďují celkový rozvoj symptomů, zatímco vyšší teploty posilují rozvoj symptomů infekce. Vyšší teploty také urychlují růst lézí. Následně je ukončen rozvoj patogenu. Při vysoké teplotě (nad 45 °C) a obrovské vzdušné vlhkosti (> 90%), která může nastat ve sklenících, patogen uhynie (Lebeda a Cohen, 2011). Změna teploty má značný vliv na morfologii sporangioforů *P. cubensis* (Savory a kol., 2011).

Důležitá je i koncentrace inokula, kdy při jeho vysokých koncentracích (cca 1 000 sporangií/cm<sup>2</sup> na listu) se mohou symptomy objevit dříve, a to už za 3-4 dny. Naopak při nízkých koncentracích (cca 10 sporangií/cm<sup>2</sup> na listu), dojde k zpoždění infekce a symptomy jsou patrné teprve po 7 a více dnech (Lebeda a Cohen, 2011).

Vlhkost prostředí je významná pro tvorbu sporangií. Vlhkost bývá často spojována s orosením listů (Lebeda, 2006). Pokud by došlo na krátkou dobu (10-15 minut) k vyschnutí povrchu sporangioforu při klíčení, mělo by to za následek narušení integrity vnitřní mitochondriální membrány sporangia, předčasný vznik zoospor a ukončení celého procesu infekce. Optimální doba orosení listů pro úspěšnou infekci *P. cubensis* je 6 hodin, jel-li delší, nemá to již vliv na intenzitu napadení (Cohen, 1977).

Rovněž kvalita, intenzita a spektrální složení světla má zásadní vliv na produkci sporangií. Dostatek světla podporuje rozvoj hyf a haustorií, což vede k tvorbě větších lézí, naopak nízká intenzita světla způsobuje redukci počtu a velikosti lézí (Lebeda a Cohen, 2011). K největší produkci spor dochází právě za tmy během 6 hodin, vytváří se sporangia a dochází k přeměně nahromaděných asimilátů na sloučeniny (Lebeda, 2006). Pokud jsou rostliny vystaveny přílišnému osvětlení, dochází k akumulaci asimilátů, a tím dochází ke zvýšení fotosyntézy. Experimentálně bylo zjištěno, že modré světlo inhibuje sporulaci. Podobné účinky mají i zelené a červené světlo, avšak v menší míře. Inhibiční účinek světla je silně závislý na teplotě, s vyšší teplotou stoupá (Lebeda a Cohen, 2011).

Stáří rostliny může mít také vliv na projev infekce *P. cubensis*. I když všechna vývojová stadia hostitelské rostliny mohou být *P. cubensis* napadena, u mladých rostlin se objevují symptomy mnohem dříve a také se rychleji šíří, nežli u starších rostlin (Lebeda, 2006; Lebeda a Cohen, 2011).

### 3.5 Symptomy napadení *P. cubensis*

Na rozdíl od jiných Peronosporaceae, *P. cubensis* nezpůsobuje systémové infekce u rostlin, napadá především listovou čepel a výjimečně může dojít k tvorbě sporangioforů na stoncích, listových čepelích a úponcích (Lebeda, 2006; Lebeda a Cohen, 2011). U různých druhů tykvovitých se příznaky napadení *P. cubensis* výrazně liší. U některých druhů tykvovitých rostlin (např. na okurkách, na r. *Luffa*) *P. cubensis* způsobuje nepravidelné olejové žluté skvrny (léze) ohraničené listovou žilnatinou, zatímco u jiných tykvovitých (např. na r. *Cucurbita*) nejsou tyto léze omezené žilnatinou a jsou více kruhové a pravidelné.

Inkubační doba, tj. doba od penetrace po objevení prvních příznaků infekce, se pohybuje u *P. cubensis* od 4-12 dnů a je závislá na řadě faktorů, a to zejména klimatických podmínkách, množství inokula a reakci hostitelské rostliny (Cohen, 1977, Lebeda a Wiedrlechner, 2003). Během inkubace roste mycelium *P. cubensis* v mezibuněčných prostorech a dochází k vývoji haustoria uvnitř mezofylových buněk (Lebeda a Cohen, 2011).

Období infekce začíná s objevením prvních symptomů napadení tímto patogenem, které v našich klimatických podmínkách zpravidla nastává ve druhé polovině července nebo začátkem srpna, a končí na konci vegetačního období (ve druhé polovině srpna a začátkem září), kdy je většina napadených porostů zničena plísní (Lebeda a Cohen, 2011).

Světle zelené, hranaté skvrnky na listových čepelích jsou prvotním příznakem napadení *P. cubensis*, avšak dochází k rychlému žloutnutí těchto skvrn. Velikost primárních lézí se pohybuje od 3 do 10 mm. Postupně tyto léze splývají a tvoří větší léze. V pozdějších fázích se na spodní straně listů objevuje šedý povlak sporangioforů se sporangii. Skvrny se zvětšují a šíří. Napadené pletivo rychle zasychá a později i celý



list. Při extrémně silné infekci listy nekrotizují a může dojít až k úhynu celé rostliny (Lebeda, 2006; Lebeda a Cohen, 2011).

### **3.6 Hostitelský okruh *P. cubensis* a charakteristika čeledi *Cucurbitaceae* a některých jejích významných rodů a druhů**

*P. cubensis* napadá nejen pěstované druhy tykvovitých zelenin, ale lze ji najít také na polokulturních a plevelných rodech, družích z čeledi *Cucurbitaceae* (Čača a kol., 1990; Lebeda a Winderlechner, 2003). Čeleď *Cucurbitaceae* je poměrně rozsáhlá a velmi heterogenní a v současné době zahrnuje přibližně 118 rodů s 825 druhy (Lebeda, 1998). *P. cubensis* napadá kolem 60 druhů této čeledi (Lebeda, 2006).

Nejvýznamnějším rodem této čeledi je rod *Cucumis* obsahující více než 30 planě rostoucích druhů. Tyto druhy se vyskytují v suchých a polosuchých oblastech Afriky. Výjimkou jsou dva běžně pěstované druhy, *Cucumis sativus* (okurka setá) a *Cucumis melo* (meloun cukrový), které jsou typické pro Indii (Lebeda a Cohen, 2011). Ve skutečnosti *P. cubensis* ale napadá všechny druhy rodu *Cucumis* (Lebeda, 1992). *Cucumis sativus* je geneticky homogenní druh, a proto vykazuje nízkou variabilitu v interakcích s *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011).

Mezi časté hostitele *P. cubensis* patří rovněž i zástupci rodu *Cucurbita*. Tento rod je velice variabilní. Je reprezentována asi 20 druhy vyznačující se poměrně širokou genetickou variabilitou. Všechny druhy pocházejí ze Střední Ameriky (Lebeda, 1998), ale pouze tři z těchto druhů (*C. maxima* – tykev obrovská, *C. moschata* – tykev muškátová a *C. pepo* – tykev obecná) jsou přirozenými hostiteli *P. cubensis* (Lebeda a Winderlechner, 2003).

Mezi další hostitelské rostliny *P. cubensis* patří zástupci rodu *Citrullus*, *Lagenaria*, *Benincasa* a *Luffa* (Lebeda a Cohen, 2011). Rod *Citrullus* zahrnuje čtyři druhy, a to *Citrullus colocynthis*, *C. ecirrhosus*, *C. lanatus* a *C. naudinianus*. Rod *Lagenaria* pochází z Afriky a je tvořen šesti druhy. Rod *Benincasa* je tvořen jediným druhem *B. hispida* (tykev vosková), který pochází z jihovýchodní Číny (Lebeda a Cohen, 2011). Tento druh byl popsán jako přirozený hostitel *P. cubensis* (Lebeda a Winderlechner, 2003).

Všechny tyto výše jmenované druhy čeledi *Cucurbitaceae* jsou přechodnými hostiteli *P. cubensis*. Jediný zástupce z *Cucurbitaceae*, který by mohl být potenciálně trvalým hostitelem *P. cubensis*, je *Bryonia dioica* (posel dvoudomý). Tento druh se vyskytuje v jižní a střední Evropě, ale může se objevit i v severní Evropě. Je schopen přežít zimu, čímž nelze vyloučit, že patogen není schopen na této rostlině přezimovat. Několika pokusy byl úspěšně proveden přenos infekce z *B. dioica* na *C. sativus*. Na rozdíl od *C. sativus*, *B. dioica* vykazovala symptomy, které nebyly viditelné pouze na listové žilnatině (Runge a Thines, 2009).

V České republice (ČR) je pěstován relativně omezený sortiment tykvovitých zelenin, především se jedná o tyto druhy: *Cucumis sativus*, *C. melo*, *Cucurbita maxima*, *C. pepo*, *Citrullus lanatus*, okrajově pak i o některé další druhy např. *Cucurbita moschata*, *C. foetidissima*, *C. ficifolia* nebo *Lagenaria siceraria*. Přirozeným hostitelem *P. cubensis* v ČR je pouze *Cucumis sativus*, na němž jsou každoročně zaznamenány značné hospodářské škody. Výjimečně byla v některých letech v ČR pozorována přirozená infekce i na jiných hostitelích a to na *C. melo* (v roce 1984, 2003), *Citrullus lanatus* (1984, 2010), *Cucurbita moschata* (2009, 2010, Pavelková a kol., 2011), *Cucurbita pepo* a *C. maxima* (na obou druzích poprvé v roce 2010) (Lebeda a kol., 2006). Plané druhy tykvovitých nejsou pravděpodobně v ČR hostiteli *P. cubensis* (Lebeda a Urban, 2004). Fakt, že na území ČR je infikován především druh *C. sativus* by mohl ukazovat na určitou fyziologickou specializaci české populace *P. cubensis*, avšak na základě zjištění přirozené infekce porostů *Cucurbita maxima*, *C. pepo*, *C. moschata*, *C. ficifolia* a *Citrullus lanatus* v minulém roce lze usuzovat, že okruh přirozených hostitelů *P. cubensis* v ČR by se mohl rozšířit o nové hostitele (Lebeda a kol., 2006; Lebeda, osobní sdělení).

### 3.7 Geografické rozšíření *P. cubensis*

*P. cubensis* je rozšířena celosvětově (Lebeda a Winderlechner, 2003). Zejména pak v subtropích a tropech, kde roční srážky převyšují 300-350 mm. Šíří se však i do oblastí, kde pro ni nejsou ideální podmínky, např. do Skandinávie. To jak se *P. cubensis* šíří, ukazuje na její schopnost adaptace na úplně odlišné ekologické podmínky v těchto nových oblastech (Lebeda, 2006). V současné době se *P. cubensis* vyskytuje na *C. sativus* ve více než 30 zemích světa a na *C. melo* ve více než 50 zemích. Rozšíření na rodu *Cucurbita* je poměrně vzácné, bylo zaznamenáno přibližně ve 40 zemích, především ve Střední Americe a v oblasti Karibských ostrovů. Výskyt patogenu na rodu *Citrullus* je dokumentován z 25 zemí světa (Lebeda a Cohen, 2011).

*P. cubensis* je ve střední Evropě známa již od počátku 20. století. K obrovskému rozšíření tohoto patogenu došlo až ve 2. polovině 80. let 20. století. Do této doby nebyl dokumentován žádný záznam o patogenním a destruktivním efektu *P. cubensis*. Většina publikovaných informací o hostitelské specializaci pocházela z Asie a USA (Lebeda a Gadasová, 2002). Výskyt patogenu se ve střední Evropě začal rapidně zvyšovat od roku 1984 (Lebeda, 1998). Za přelomový lze označit rok 1985, kdy nastala epidemie plísňe tykvovitých a byla zasažena téměř celá Evropa a důsledky této epidemie byly ničivé a ztráty výnosů dosahovaly až 90 % (Lebeda a kol., 2006). V Československu se objevila první epidemie o rok dříve, ale škody, které tato plíseň napáchala, nebyly tak velké (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a kol., 2006). Od roku 1984, se epidemie *P. cubensis* objevují v České republice každoročně (Lebeda a Hübschová, 2010) a jsou způsobovány každoročním transportem inokula pomocí proudícího vzduchu z jižní a jihovýchodní Evropy do severních oblastí, a to do Švédska a Finska (Lebeda a Urban, 2007; Sarris a kol., 2009). V letech 1986-1988 nastala další epidemie, která svou silou odpovídala epidemii z roku 1985. Díky lepší ochraně rostlin však byly ztráty mnohem menší. Další závažná epidemie se objevila v roce 1989, ztráty se pohybovaly kolem 80 % (Lebeda a Cohen, 2011). V současnosti se *P. cubensis* vyskytuje na celém území České republiky každoročně, ale už nezpůsobuje tak rozsáhlé škody jako v minulosti (Lebeda, 2006).

### 3.8 Specifičnost interakce *Cucurbitaceae* – *P. cubensis*

Pro zástupce čeledi Peronosporaceae je typický obligátně biotrofní parazitismus, který je spojen s výraznou hostitelskou specializací. Jednotlivé druhy se od sebe liší rozdílným stupněm hostitelské specifity (Lebeda a Schwinn, 1994). V tomto ohledu je *P. cubensis* oligofágní systematický patogen, který napadá pouze omezený počet druhů a rodů Cucurbitacea (Lebeda, 1999). Specifičnost vztahů mezi hostitelem a patogenem je determinována charakterem hostitele i patogenu (Lebeda, 1984). *P. cubensis* je se zástupci rodu Cucurbitacea ve vztahu inkompatibility či inkompability. Na tomto vztahu se podílí jednak vnitrodruhová variabilita hostitele a také variabilita v patogenních vlastnostech *P. cubensis* (Lebeda, 1988). Projev kompatibility/inkompatibility je velmi patrný (Lebeda a Winderlechner, 2003).

#### 3.8.1 Patogenní variabilita

*P. cubensis* vykazuje velice rozsáhlou vnitrodruhovou variabilitu stejně jako je tomu i u jiných zástupců peronosporálních hub (Lebeda a Winderlechner, 2003). První zmínka o variabilitě této plísně pochází z Japonska z roku 1940 (Lebeda a kol. 2006). Tato variabilita je zřejmá při interakcích s hostitelskými rody, druhy a nižšími taxonomickými či genetickými jednotkami. Konkrétně u *P. cubensis* existují fyziologické rasy a patotypy, popřípadě i speciální formy (Lebeda a Cohen, 2011).

Patotypy představují fyziologické formy, které se od sebe liší hostitelskou specifitou na úrovni rodů, druhů nebo poddruhů různých *Cucurbitaceae*, nelze je však rozlišit podle morfologických znaků (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a kol., 2006). K určení patotypů *P. cubensis* slouží diferenciacní soubory tykvovitých rostlin (Lebeda a Winderlechner, 2003). Thomas a kol. (1987) sestavili první soubor pro identifikaci patotypů. Pro tento účel použili soubor 6 různých diferenciacních genotypů z rodu *Cucumis*, *Cucurbita* a *Citrullus*. 8 izolátů *P. cubensis*, které byly použity pro daný experiment pocházely z různých zemí: z USA, Izraele a Japonska. Byly vybrány na základě výsledků inokulace na 26 rostlinných genotypech reprezentujících 7 rodů (Lebeda a Cohen, 2011). Nejvíce virulentní izoláty pocházely z USA (Lebeda, 1998). Použitím tohoto souboru bylo zjištěno, že v rámci všech izolátů existuje 5 odlišných patotypů (Lebeda a Winderlechner, 2003). Tyto patotypy byly popsány v závislosti na

zvyšujícím se počtu hostitelů, na kterých se objevila virulentní reakce (Lebeda a Cohen, 2011). Cohen a kol. (2003) determinovali šestý patotyp původem z Izraele na základě jeho patogenity pro širší okruh hostitelů (Savory a kol., 2011). V roce 2002, Lebeda a Gadasová použili k charakterizaci *P. cubensis* diferenční soubor složený celkem z 12 taxonů z 5 rodů *Cucurbitaceae*. Soubor byl vytvořen na základě dříve získaných výsledků. Hostitelské izoláty ukázaly obrovskou variabilitu na obou stranách patosystému. *Cucumis sativus* cv. Marketer ukázal velmi citlivé reakce na všech použitých izolátech. Jejich výsledky podporují dřívější experimentální důkazy, že kultivary *C. sativus* jsou vysoce citlivé k *P. cubensis*. Dále, že *C. melo*, *C. pepo*, *C. maxima* a *L. siceraria* mohou být považovány za vnímavé k *P. cubensis*. Všechny 12 taxonů vykazovalo rozdílnou reakci se souborem izolátů. Tento soubor byl rozdělen do 13 skupin podle jejich reakčnosti, tj. 13 patotypů (Lebeda a Gadasová, 2002). V současnosti je k detekci patotypů *P. cubensis* využíván zdokonalený diferenční soubor (Lebeda a Winderlechner, 2003), který vychází ze souboru předchozího. Navrhovaný soubor zahrnuje 12 taxonů z 6 rodů (*Benincasa*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria* a *Luffa*). Zástupci tohoto souboru jsou dobře definováni na úrovni druhů, poddruhů a genotypů. Tento soubor umožňuje charakterizovat patotypy pomocí 12 patogenních faktorů a jejich kombinací. S tímto souborem byl navrhnut nový způsob popisu patotypů. Systém popsání a označení vychází z numerického tetradového kódu a je zpracován na základě binárního hodnocení kompatibility a inkompatibiliti (+/-) určitého izolátu na diferenčním souboru. Pro každý izolát je vytvořen numerický tetradový kód. Tento číselný kód dával jasný obrázek o patogenitě zkoumaných izolátů (Lebeda a Cohen, 2011; Lebeda a kol., 2006).

V literatuře se často uvádí, že u plísně *P. cubensis* existují nejen patotypy, ale také fyziologické rasy (Lebeda a Urban, 2007). Tyto rasy představují podrobnější diferenciaci v rámci druhu (Lebeda a Cohen, 2011). Rasa je definována jako biotyp uvnitř druhu, který se liší od jiných takových biotypů fyziologickými znaky, mimo jiné i virulencí (Lebeda a kol., 2006). Rasy se liší fyziologickou specializací izolátů (populací) patogenu a různou virulencí na odrůdách (genotypech, liniích) téhož hostitelského druhu, případně druhů blízké příbuzných (Lebeda a kol., 2006). Palti (1974) uvedl, že odlišné reakce různých druhů rostlin na patogena jsou způsobeny právě existencí fyziologických ras (Nischit a kol., 2002). Z odborné literatury je známá řada

příkladů, které přímo či nepřímo ukazují na existenci ras u *P. cubensis*. Např. výzkum z roku 1932 prováděný v USA ve státě Massachusetts prokázal rezistenci pěstovaných i planých odrůd okurek k *P. cubensis*, odrůd, které byly v Americe jinak považovány za náchylné k *P. cubensis* (Cohen, 1981). Dalším příkladem je náhlé selhání rezistentních kultivarů Palmetto v Jižní Karolíně (Cohen, 1981; Lebeda a Cohen, 2010). Existence fyziologických ras byla prokázána u *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo* i jiných *Cucurbita* spp. Současné znalosti o rasách *P. cubensis* se vztahují na izoláty pocházejících z *Cucumis sativus* a *Cucumis melo* (Lebeda a Cohen, 2010).

### **3.8.2 Zdroje odolnosti a šlechtění na rezistenci**

Mezi základní podmínky úspěšného šlechtění na rezistenci patří dobrá znalost zdrojů odolnosti a vhodné metody testování odolnosti. Nejvíce poznatků bylo nashromážděno právě pro *C. sativus* a *C. melo* (Lebeda, 1990, 1999). Velmi málo je naopak známo o rezistenci u rodů *Citrullus*, *Benincasa*, *Luffa* a *Lagenaria* (Lebeda, 1990; Lebeda a Widrlechner, 2004).

### **3.8.3 *Cucumis sativus***

Šlechtění okurek pro dosažení rezistence vůči *P. cubensis* započalo v Puerto Rico v roce 1930. Několik rezistentních rostlin vůči tomuto patogenu bylo objeveno také v Číně a Indii (Lebeda a Cohen, 2011). Tyto genotypy sloužily hlavně v USA jako základ ke šlechtění okurek na rezistenci vůči *P. cubensis* (Lebeda, 1990). Rezistence těchto rostlin postrádala charakter úplné inkompability (Lebeda a kol., 2006). Rezistentní kultivary vyvinuté v 1969 zůstaly dostatečně odolné proti této plísni, takže nemusely být používány fungicidy. Tento stav trval až do roku 2004 (Lebeda a Cohen, 2011). U řady dalších vyšlechtěných odrůd došlo v krátké době k překonání rezistence. Doposud neexistuje žádný genotyp, který by vykazoval jednoznačnou inkompabilitu ke stávajícím patotypům patogenu (Lebeda a kol., 2006).

### 3.8.4 *Cucumis melo*

V rámci všech tykvovitých je problematika šlechtění na rezistenci prozkoumaná nejvíce právě u druhu *C. melo*. První výzkum byl realizován v roce 1930 v USA, kde byly popsány čtyři odrůdy s vysokým stupněm rezistence k *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011). V současné době je stále nejvýznamnějším zdrojem rezistence *C. melo* var. *reticulatus* PI 124111, popřípadě PI 124112 (Cohen, 1981; Lebeda a kol., 2006). Odrůdy odvozené z těchto zdrojů se vyznačují rezistencí, při které se tvoří jen nepatrné léze. U *C. melo* jsou také známy odrůdy se zřetelnou polní rezistencí, např. v Izraeli (Cohen, 1981). Doposud však neexistují kultivary, které by byly rezistentní proti všem známým patotypům *P. cubensis* (Lebeda a Cohen, 2011).

### 3.8.5 *Cucurbita* spp.

O rezistenci tykví k *P. cubensis* neexistoval dlouhou dobu dostatek údajů. V 90. letech 20. století začal v Československu výzkum rezistence u cuket a patizonů, který u cuket prokázal existenci neúplné rezistence. V současnosti je známo mnoho genotypů, které mají vysoký stupeň odolnosti vůči *P. cubensis* (Lebeda a kol., 2006).

## 3.9 Genetické aspekty interakcí *Cucurbitaceae* - *P. cubensis*

Pro poznání genetického vztahu hostitele a patogenu jsou nezbytně důležité studie genetiky rezistence hostitele a schopnosti patogenu vyvolat infekci. U zástupců Peronosporaceae je poznání tohoto vztahu doposud omezené. Rezistence rostlin vůči patogenům má mendelistickou dědičnost (Lebeda a Schwinn, 1994). Schopnost patogenu napadat hostitele je podmíněna určitou genetickou informací. Existuje systém „gen proti genu“ (Lebeda, 1984), podle kterého se determinuje rasově/patotypová specifita v interakcích hostitel-patogen. Podle této teorie každý hostitelský genotyp obsahuje jeden či více genů rezistence, které interagují s geny avirulence u patogenu (Lebeda a Schwinn, 1994). Základní poznatky o rezistenci vůči *P. cubensis* jsou k dispozici pouze pro některé hostitele (např. *C. sativus* a *C. melo*) (Lebeda a Winderlechner, 2004)

Také poznatky o genetice patogenní variability *P. cubensis* jsou velmi omezené. V tomto ohledu je nejvíce prozkoumaným patogenem *Bremia lactucae* (Lebeda

a Schwinn, 1994). Thomas a kol. (1987) uvedli, že genetická variabilita *P. cubensis* může být dána vysoce infekčním diploidním vegetativním stádiem, protože dvojitá sada genů umožňuje širší spektrum odpovědí *P. cubensis* na selekční tlaky, a tím zvyšuje schopnost patogenu adaptovat se na hostitele.

### **3.10 Interakce na buněčné a molekulární úrovni**

O interakcích kompatibility/inkompatibility mezi hostitelem a patogenem se rozhoduje krátce po penetraci, tzn. procesu rozpoznání (Lebeda a Schwinn, 1994). Toto rozpoznání probíhá na úrovni buněčných stěn a membrán, a spočívá v detekci jedinečných strukturálních znaků patogenu specifickými molekulami hostitelské rostliny. Pokud jsou detekovány „cizí“ struktury, dojde k zastavení růstu patogenu. Není-li patogen rozpoznán jako „cizí“, dojde k vytvoření kompatibilního stavu, a patogen začne kolonizovat pletivo a reprodukovat se v něm (Lebeda, 1989).

Rezistentní odrůdy reagují na napadení hypersenzitivní reakcí, která vede nekrotizaci buněk. Rezistence některých rostlin je spojována s akumulací fenolů, kalózy a ligninu. Tyto látky brání růstu mycelia patogenu. Proces rezistence je také v některých případech závislý na teplotě. Při vyšších teplotách se rezistence projeví, naopak při nižších teplotách jsou projevy rezistence omezené (Lebeda a kol., 2006; Ballas a kol., 1993).

#### **3.10.1 Molekulární metody používané při studiu *P. cubensis***

Dosavadní molekulárně genetické studie zástupců rodu *Pseudoperonospora* především řeší taxonomické a fylogenetické otázky jednotlivých druhů rodu *Pseudoperonospora* s použitím sekvenace tzv. ITS regionu a ribozomálních podjednotek (Choi a kol., 2003; Cooke a kol., 2002; Riethmüller a kol., 2002; Thines, 2007; Voglmayr, 2008). Metoda sekvenace této oblasti DNA se pro svůj konzervativní charakter ukazuje jako nevhodná pro studium genetické variability na vnitrodruhové úrovni (Jankovics a kol., 2008; Sarris a kol., 2009). V současné době se vyvíjí nové polymorfní markery a variabilní úseky DNA (Giresse a kol., 2010) pro postižení genetické variability na intraspecifické úrovni a popř. korelace výsledků genetických analýz jednotlivých izolátů s jejich patotypy.



Doposud pouze jediná práce, která použila techniku AFLP pro studium intraspecifické genetické variability izolátů *P. cubensis*, byla publikovaná v roce 2009 (Sarris a kol., 2009). Pomocí AFLP se podařilo prokázat intraspecifickou variabilitu a genetickou izolaci izolátů *P. cubensis*, které pocházely z různých geografických oblastí. Důvodem malého počtu publikovaných prací jsou především technické potíže spojené se získáváním dostatečného množství kvalitní DNA z *P. cubensis*. Tento problém je zřejmý i u dalších obligátních biotrofních parazitů, jejichž kultivace je závislá na hostiteli (Jankovics a kol., 2008). Metoda AFLP byla rovněž s úspěchem použita při studiích vnitrodruhové variability dalších zástupců oomycet: např. *Erysiphe necator* (Núñez a kol., 2006), *Peronosclerospora sorghi* (Perumal a kol., 2006), *Phytophthora capsisci* (Lamour a Hausbeck, 2001), *Phytophthora infestans* (Perez a kol., 2001), *Phytophthora citricola* (Bhat a Browne, 2007), *Phytophthora cactorum* (Bhat a kol., 2006), *Phytophthora sojae*, *Phytophthora vignae* (May a kol., 2003), *Podosphaera leucotricha* (Urbanietz a Dunemann, 2005) a *Oidium neolycopersici* (Jankovics a kol., 2008).

### 3.10.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

V posledních deseti letech byly vyvinuty různé metody pro identifikaci a genotypizaci prokaryotických a eukaryotických organismů na úrovni DNA. AFLP analýza patří mezi molekulárně-biologické metody používané při detekci polymorfismu na úrovni DNA. Princip metody lze popsat ve čtyřech krocích.

Prvním krokem je tzv. restrikce, během které dochází k naštípání genomické DNA pomocí restrikčních enzymů (*EcoRI* a *MseI*). Vznikají tři typy DNA fragmentů (*Eco-Eco*, *Eco-Mse*, *Mse-Mse*) s tzv. lepivými konci (Meudt a Clarke, 2007). Konce takto vzniklých fragmentů DNA se ve druhém kroku, ligaci, zacelují navázáním krátkých, synteticky připravených fragmentů DNA – tzv. adaptorů. Adaptor spolu s restrikčním místem poskytuje univerzální vazebné místo pro PCR v následujících fázích AFLP (Weising a kol., 2005).

Ve třetím kroku dochází k amplifikaci fragmentů DNA s navázanými adaptory pomocí klasické PCR reakce s dvojicí primerů, které jsou komplementární k sekvenci adaptorů. Každý z těchto primerů navíc obsahuje na 3' konci nukleotid zasahující dovnitř amplifikovaných fragmentů DNA. Díky tomu dojde jednak k selekci fragmentů,

kteře vznikly současným štěpením enzymů *EcoRI* a *MseI* a také k výrazné redukci fragmentů přítomných v ligační směsi (Savelkoul a kol., 1999). Počet fragmentů získaných preselektivní amplifikací je příliš velký pro spolehlivou separaci a detekci těchto fragmentů. Proto je nutné tento počet dále redukovat.

V posledním čtvrtém kroku jsou použity proto PCR primery, které obsahují další (1-3) selektivní nukleotidy (např. *Eco*+ATA a *Mse*+CAC) redukující počet amplifikovaných fragmentů. Počet a typ selektivních nukleotidů se zvolí na základě testování různých primerových kombinací tak, aby byl po separaci získán informativní a spolehlivě detekovatelný profil. Změnami kombinací primerů v posledním kroku AFLP dochází opakovaně k vygenerování a detekci 20-100 vysoce polymorfních markerů z celého genomu jedince. Provádí se několik PCR reakcí s použitím různých primerových kombinací vedoucí k zisku 200-400 bandů. Pro detekci amplifikovaných fragmentů se v současnosti používá separace fluorescenčně značených AFLP fragmentů na sekvenátoru nebo finančně a přístrojově nenáročná radiografická detekce nebo detekce barvením stříbrem (Vos a kol., 1995).

Poslední zmíněný typ detekce byl použit i v této bakalářské práci. Výhodou je především relativně nízká cena a nízká náročnost na přístrojové vybavení. V následných krocích je možno vyřezat vybrané AFLP fragmenty z gelu, provést jejich eluci, reamplifikovat, osekvenovat a popřípadě převést do jiného typu markeru (Wang a Roberts, 2006; Xiao a kol., 2007).

Obecně je AFLP považována za metodu vysoce citlivou, reprodučibilní a nevyžaduje dlouhý čas na přípravu (Bensch a Akesson, 2005). Metoda je používána pro různé účely, od populačně-biologických a fylogenetických studií, dále identifikací odrůd, kultivarů a hybridů, po studie zabývající se expresí genů (Cooke a Lees, 2004; Meudt a Clarke, 2007). Na rozdíl od jiných metod (např. mikrosatelity) není nutná znalost DNA sekvence studovaného organismu. Z toho důvodu často AFLP nachází uplatnění v aplikacích, kdy není dostupná informace o sekvenci DNA nebo tradiční metody jako sekvenace nejsou dostatečně variabilní (Ovesná a Hodek, 2007).

Nevýhodou této metody je její dominantní charakter a anonymní povaha fragmentů, ale i tzv. homoplasie fragmentů. Tento termín označuje fragmenty stejné délky, které pochází z různých lokusů genomu, ale při separaci komigrují. Při následném hodnocení jsou pak považovány jako identické (Caballero a kol., 2008, Paris a kol., 2010).

Fragmenty se stejnou elektroforetickou mobilitou mohou být částmi kopií genů, pseudogenů, transpozomů a především repetitivních částí genomu. Nemalý vliv sehrává také osoba, která AFLP profily vyhodnocuje – pak hovoříme o tzv. „technické homoplasii“ (Paris a kol., 2010). Negativní ovlivnění výsledků detekcí fragmentů, které vykazují homoplasii, lze snadno předejít redukcí počtu fragmentů při jedné selektivní amplifikaci (Caballero a kol., 2008).

### 3.10.3 Metody izolace DNA u zástupců rodu *Pseudoperonospora*

Pro úspěšný průběh metody AFLP je potřebná relativně čistá DNA. V dosud publikovaných molekulárně genetických metodách, které se zaměřovaly na rod *Pseudoperonospora*, byly použity hlavně dva způsoby extrakce DNA, a to CTAB metoda a metoda izolace pomocí komerčních kitů (Telle a Thines 2008; Sarris a kol., 2009).

Metoda CTAB využívá schopnosti cetyltrimetylamoniombromidu (CTAB) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný a naopak při nízké koncentraci solí vytváří sraženinu. CTAB také působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB a DNA je možné oddělit a získat čistou DNA (Cuřínová, 2008). Pomocí této metody byla v Laboratoři molekulárních markerů KB PřF UP získána DNA, kterou bylo nutné pro úspěšný průběh AFLP ještě dále purifikovat (Sarris a kol., 2009).

Jedním z úkolů řešených v této bakalářské práci bylo odzkoušet vhodný kit pro izolaci DNA z houbových patogenů. Na základě publikované práce Telle a Thines (2008), ve které bylo srovnáváno několik různých protokolů extrakce DNA pro následnou amplifikaci genu *cox2* (mitochondriální cytochrom oxidáza II) zástupců biotrofních patogenních hub (Oomycota), byl použit komerční kit „innuPREP Plant DNA Kit“ firmy Analytik Jena AG. Obecným principem extrakce DNA pomocí těchto izolačních kitů je centrifugace rozmrazeného vzorku, jeho homogenizace a následné přidávání chemikálií spolu s promýváním pro konečnou eluci DNA (viz. 4.7 Izolace DNA, str. 36). Kontrola integrity (neporušenosti) DNA a hrubý odhad množství se provádí pomocí agarosové elektroforézy. Spektrofotometrie potom umožňuje přesnější odhad kvality a čistoty DNA.

DNA v roztoku absorbuje UV (ultrafialové) světlo v rozmezí 210 až 500 nm s absorpčním maximem při 260 nm. Protože DNA, RNA a nukleotidy mají stejné absorpční maximum, tj. 260 nm, nemůže být v roztoku DNA stanovena koncentrace RNA a nukleotidových kontaminantů. Proto je RNA během extrakce odstraňována enzymaticky, stejně tak i oligonukleotidy a nukleotidy získané během hydrolýzy RNA. Pokud se neodstraní, může dojít ke špatnému vyhodnocení koncentrace DNA (Hodek a Ovesná, 2007).

Obecný průběh měření koncentrace DNA je následující: Změří se absorbance roztoku, tzv. slepého vzorku, který byl použit k ředění DNA (sterilní voda, TE pufr) při vlnových délkách 260 a 280 nm. Přístroj automaticky vypočítá poměr  $A_{260}/A_{280}$  a koncentraci DNA. Čistota izolované DNA  $A_{260}/A_{280}$  je vyhovující, pokud se hodnota pohybuje v rozmezí 1,8-2,0. Pokud jsou hodnoty pod 1,8, je DNA kontaminována proteiny. Naopak hodnoty větší než 2,1 indikují kontaminaci chloroformem nebo jinými organickými sloučeninami (např. fenol). Pro úspěšný průběh AFLP analýzy je třeba určité počáteční množství DNA, které by se mělo pohybovat v rozmezí 0,25-0,5  $\mu\text{g}$  DNA (Hodek a Ovesná, 2007).

### 3.10.3.1 Fylogenetické stromy

Fylogenetické stromy (*fylogramy*) jsou grafickým vyjádřením intenzity vzájemných závislostí měřených proměnných. Běžně se používají pro popis genetických vztahů mezi populacemi. Pokud je jako vstupní formát dat pro konstrukci stromu použita matice genetických vzdáleností, označují se termínem *dendrogramy*. Jejich konstrukce vychází z teorie *analýzy shluků* (cluster analysis-CLU), tedy souboru metod zabývajících se podobností vícerozměrných objektů. Při konstrukci fylogenetických stromů se nejprve použije vhodný koeficient pro vytvoření matice genetických vzdáleností jednotlivých proměnných. Pomocí této matice dojde v dalším kroku ke shlukování proměnných pomocí vhodné shlukovací metoda. Existují dvě nejčastější metody pro konstrukci stromů, UPGMA a Neighbor-joining (NJ). UPGMA stromy předpokládají stejnou rychlost evoluce u všech populací, zatímco algoritmus NJ nepředpokládá stejnou evoluční rychlost a umožňuje změnu délky větví stromu. Protože NJ stromy mají více parametrů, měly by být schopny přesněji předpovědět genetickou

vzdálenost populací. UPGMA a Neighbor-joining stromy jsou konstruovány pomocí počítačových programů – např. FreeTree a FAMD (Pavlíček a kol., 1999; Schlüter a Harris, 2006). Vzhledem k množství technik, které lze k sestavení dendrogramů použít, existuje míra věrohodnosti daného postupu – tzv. kophenetický korelační koeficient (označovaný jako  $C$  nebo  $R^2$ ). Čím více se tato hodnota blíží 1, tím více konstrukce dendrogramů odpovídá reálným vztahům mezi proměnnými (Meloun a Militký, 2002). Pro provedení výpočtů se opět používá vhodný počítačový program (např. TreeFit-Kalinowski, 2009). Další metodou pro ověření správnosti konstrukce evolučních stromů je tzv. bootstrapová analýza (Felsenstein, 1985). Vysoké hodnoty bootstrapové analýzy (nad 50) spolu s vysokou hodnotou  $R^2$  jsou vhodnými ukazateli pro konstrukci fylogenetického stromu, respektive pro výběr kombinace „genetický koeficient“ – „shlukovací metoda“. Je vhodné ověřit několik různých variant pro konstrukci stromů, a pak si zvolit tu, která je nejvhodnější pro požadovaný účel (Kalinowski, 2009).

Pro interpretaci daného evolučního stromu je výsledky vhodné také analyzovat další nezávislou metodou, jako je např. PCoA (Principal Coordinate analysis, analýza základních koordinát). Tato metoda je jednou z moderních multivariačních statistických metod analýzy dat. Jedná se o velice užitečný matematický nástroj k snižování počtu výchozích proměnných sloučením na menší počet tzv. latentních proměnných (v ideálním případě na 2, ve většině případů na 3 a více proměnné) a následnou snadnou vizualizaci získaných dat ve formě dvourozměrných (2D) nebo trojrozměrných (3D) diagramů. Nové latentní proměnné (PC – principal components) mají různou míru důležitosti, vyjádřenou pomocí procentuálního podílu celkové variance (popř. kumulativního podílu). Proměnná PC1 popisuje největší podíl rozptylu získaných dat (Meloun a Militký, 2002; Šec a kol., 2007)

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Použité chemikálie

- Agaróza (Serva)
- Akrylamid (Merck)
- Akrylamid-BIS směs (Merck)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Deionizovaná voda
- Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP) (Promega)
- Dusičnan stříbrný (Lachner)
- Eco *RI* (20,000 U/ml (Biolabs)
- Etanol 96% roztok (Sigma – Aldrich)
- Ethidium bromid (Sigma)
- Ethylendiamintetraacetát disodný (Na<sub>2</sub>-EDTA) (Sigma)
- Formaldehyd (Lachner)
- GoTaq polymeráza (5U/μl) (Promega)
- Hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromid (CTAB) (Sigma)
- InnuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena AG, Jena)
- Kyselina dusičná (Merck)
- Kyselina octová 0,5% (Lachner)
- Mse *I* (10,000 U/ml (Biolabs)
- N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin (Merck)
- Peroxodisíran amonný (Merck)
- Rain-X Repellent (Turtle Wax)
- Silan 3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Serva)
- Thiosíran sodný (Lachema)
- T4 ligáza (1 000 CEU/μl) (Fermentas)
- Uhličitan sodný (Lachner)
- Xylenová modř (Applichem)

## 4.2 Použité přístroje

- Digestoř (Merci)
- Elektroforéza T-REX Thermo OWL S3S (Rochester)
- Flowbox PV-100 (Telstar)
- Chladnička (Liebherr)
- Mikropipeta 0,5 – 10  $\mu$ l (Eppendorf)
- Mikropipeta 0,1 – 2,5  $\mu$ l (Eppendorf)
- Mikropipeta 1 – 10  $\mu$ l (Finnpipette)
- Mikropipeta 1 – 10  $\mu$ l (Swiss)
- Mikropipeta 10 – 100  $\mu$ l (Eppendorf)
- Mikropipeta 100 – 1 000  $\mu$ l (Eppendorf)
- Minicentrifuga MCF 2360 (LMS)
- Mrazící pult Premium NoFrost (Liebherr)
- Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Negatoskop ELLA NHQ1R (Legros)
- Osmikanálová pipeta HTL (1-10  $\mu$ l) (Eppendorf)
- Spectrophotometr NanoDrop Technologies (Delauvere)
- Sušárna HS62A (Chirana)
- Termocycler TC-XP (Bioer)
- Třepačka GFL 3017 (Merci)
- Váhy PM 2000 (Mettler)
- Výrobník ledu Icematic F 100 Compact (Castel Mac)

### **4.3 Použité roztoky**

#### **Dusičnan stříbrný $\text{AgNO}_3$ – 0,1% roztok**

- 2 g  $\text{AgNO}_3$
- doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  do 2000 ml
- před použitím přidat 3 ml formaldehydu

#### **EDTA 0,5 mol/l, pH 8**

- 9,305 ml EDTA rozpustit ve 40 ml deionizované vody
- upravit pH pomocí NaOH na pH 8
- doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

#### **Fix/stop roztok**

- 165 ml 98% kyseliny octové
- doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  do 1500 ml

#### **Kyseliny dusičná $\text{HNO}_3$ – 1% roztok**

- 18 ml 65%  $\text{HNO}_3$
- objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  do 1200 ml

#### **Nanášecí denaturační pufr pro elektroforézu**

- 0,125 g bromfenolové modře
- 0,125 g xylenové modře
- 25 ml deionizované vody
- 100 ml formamidu

#### **Peroxodisíran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ – 10% roztok**

- 1 g peroxodisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- rozpustit v 10 ml deionizované  $\text{H}_2\text{O}$
- uchovávat v mikrozkuvkách po 400  $\mu\text{l}$  v  $-20\text{ }^\circ\text{C}$



### **Polyakrylamidový 6% gel**

- 70 ml zásobního roztoku akrylamidu
- 467  $\mu$ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- 46,7  $\mu$ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu

### **TBE pufr – 10 x zásobní roztok**

- 108 g Tris
- 55 g kyseliny borité  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- rozpustit v 900 ml deionizované vody
- 40 ml roztoku  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,5 mol/l, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

### **Vývojka (před požitím vychladit)**

- 45 g uhličitanu sodného  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- objem doplnit deionizovanou  $\text{H}_2\text{O}$  na 1500 ml
- uložit ve 4 °C
- před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu a 300  $\mu$ l 1% roztoku thiosíranu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

## **4.4 Kultivace *P. cubensis***

Vzhledem k biotrofnímu charakteru *P. cubensis*, je důležité kultivovat tohoto patogena na živém rostlinném materiálu. Z tohoto důvodu byly izoláty *P. cubensis* kultivovány na listových segmentech citlivé odrůdy *Cucumis sativus* cv. Marketer 430. Tyto listové segmenty byly odebírány ze sazenic této odrůdy, které byly 6-8 týdnů staré (ve stádiu 3-6. pravého listu) (Lebeda a Widrlechner, 2003) a byly pěstovány ve skleníku za optimálních podmínek (25 °C den/15 °C noc, denní závlhka, hnojení 1x za týden, chemicky neošetřeny). Po 7-9 dnech bylo provedeno přeočkování izolátů na čerstvé listy této náchylné odrůdy okurky seté. Infikované listy byly uloženy abaxiální stranou dolů do Petriho misek vyplněných navlhčenou buničitou vatou a filtračním papírem.

## 4.5 Příprava inokula, inokulace a inkubace

K inokulaci byly použity izoláty uchované v zamrazeném stavu (-80°C). Tyto izoláty byly přeočkovány na čerstvé listy *C. sativus* cv. Marketer 430, na kterých byly následně kultivovány a množeny. K přípravě inokula byly použity listové segmenty po 7–9 dnech inkubace. Infikované pletivo bylo sterilizovanými nůžkami rozstříháno na menší segmenty a poté přeneseno do kádinky s 2 ml destilované vody, k tomu, aby došlo k uvolnění spor ze suspenze, byla použita třepačka GFL 3017 (25 s). Připravené inokulum bylo pomocí skleněného rozprašovače přeneseno na povrch listových segmentů v Petriho miskách. Tyto misky byly vyloženy buničitou vatou, filtračním papírem a zvlhčeny destilovanou vodou. Po inokulaci byly misky přeneseny do fytotronu, kde se teplota pohybovala přes den v rozmezí 18–25 °C a přes noc 15 °C. Prvních 20 hodin byly Petriho misky zakryty černou neprůhlednou fólií, aby byly zajištěny optimální podmínky pro rozvoj infekce patogenu.

**Tabulka 1:** Seznam izolátů *P. cubensis* použitých pro izolaci DNA s uvedením odběrové lokality (kraj, okres) a označením patotypu

<b>Izolát</b>	<b>Kraj</b>	<b>Okres</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Patotyp</b>
4/95	Jihomoravský	BV/JM	Velké Bílovice	1/2/10
1/98	Olomoucký	OL/OL	Olomouc, GB VÚRV Ruzyně	3/10/10
9/01	Pardubický	UO/PA	Holovousy	11/3/11
11/01	Středočeský	MB/SČ	Žehrov	11/14/12
26/01	Olomoucký	PR/OL	Kojetín	3/14/14
28/01	Zlínský	KM/ZL	Kotojedy	11/7/14
35/01	Zlínský	UH/ZL	Nedakonice	15/2/0
41/01	Jihomoravský	HO/JM	Mistřín - Svatobořice	11/14/14
57/01	Jihomoravský	ZN/JM	před Tasovicemi	15/10/12
71/01	Královeshradecký	RK/KH	Rokytnice	11/11/10
72/01	Praha	AB/A	Praha - Ruzyně	15/10/14
10/02/1	Jihomoravský	BO/JM	Modřice	15/14/14
84/02	Pardubický	SY/PA	Borušov	15/10/14
101/02	Královeshradecký	TU/KH	Dvůr Králové - Žireč	15/10/6
104/02	Moravskoslezský	NJ/MS	Kojetín	7/14/11
44/03	Zlínský	KM	Kotojedy	15/15/15
54/03	Zlínský	UH/ZL	Ostrožská Nová Ves	12/15/14
85/03	Středočeský	NB/SČ	Lysá nad Labem	15/14/11
4/04	Olomoucký	OL/OL	Věrovany - Nenakonice	15/2/11
43/06	Královeshradecký	RK/KH	Čermná nad Orlicí	5/14/11
1/2/09	Jihomoravský	BO	Lednice	7/6/10
6/09	Olomoucký	OL	Olomouc - Nedvězí	15/14/11
13/09	Jihomoravský	BK	Lipovec	15/14/10
18/09	Jihomoravský	BO	Silůvky	15/2/10
35/09	Jihomoravský	HO	Ratiškovice	7/10/10
36/09	Jihomoravský	HO	Strážnice	5/6/10
40/09	Zlínský	UH	Uherský Ostroh	15/10/14
42/09	Zlínský	ZL	Napajedla	15/2/2
44/09	Zlínský	KM	Trávník	15/14/14
46/09	Zlínský	KM	Postoupky	15/14/15

## 4.6 Metodika zisku spor plísně okurkové (*P. cubensis*) k dalšímu využití

Asi týden po inokulaci (7-9 dnů) došlo k vytvoření makroskopicky pozorovatelných sporangioforů a spor v dostatečném množství pro extrakci DNA *P. cubensis*. Do plastové zkumavky o objemu 25 ml bylo přidáno 5 ml destilované vody, do které byl přenesen list napadený patogenem. K uvolnění spor došlo při míchání roztoku na třepačce IKA při 800 otáček/sec, doba míchání byla 20-25 sekund. Takto připravená suspenze spor *P. cubensis* volně sedimentovala po dobu 20 minut v ledničce. Po uplynutí této doby se přebytečné množství vody odsálo pomocí pipety na výsledný objem suspenze 1 ml, který byl přenesen do sterilních 1,5 ml Eppendorfek. Takto připravené vzorky byly uskladněny při teplotě -20 °C (popř. -80 °C) před provedením vlastní extrakce DNA.

## 4.7 Izolace DNA

Pro izolaci DNA byl zvolen izolační kit InnuPREP Plant DNA Kit firmy Analytik Jena AG dle následujícího postupu:

Po rozmrazení zamražených spor z předchozího kroku byla provedena jejich centrifugace (10.000 g, 3 minuty) a supernatant byl odstraněn. K precipitátu byly přidány tři sterilní skleněné kuličky a byla provedena homogenizace pomocí mixeru Retsch Speed Mill (3 minuty, 30 kmitů za sekundu). K výslednému homogenizátu bylo přidáno 400 µl lyzačního pufru SLS a 25 µl proteinázy (Proteinase K). Po důkladném zvortexování byly vzorky přeneseny na 30 minut na vyhřívaný termoblok s třepačkou (50°C, 400 otáček za minutu). Poté byl lyzát přefiltrován přenesením na „pre-filter“, který byl umístěn ve 2,0 ml zkumavce (Receiver Tube) a centrifugován při 10.000 g po dobu 1 minuty. V dalším kroku byla ze vzorku odstraněna RNA přidávkem 5 µl RNAsy do přefiltrovaného roztoku a provedla se inkubace po dobu pěti minut při pokojové teplotě. Následně byl filtr odstraněn po přidávku 200 µl tzv. Binding Solution SBS do lyzovaného vzorku. Tento roztok vytváří optimální podmínky pro navázání DNA z lyzátu na membránu v kolonce (Spin Filtr). Po promíchání obou roztoků opakovaným nasáváním pipetou byl vzorek přenesen na Spin Filter umístěný v nové 2,0 ml zkumavce. Po centrifugaci (10.000 g, 2 min.) byl filtr promýván 500 µl promývacího

roztoku HS a znovu centrifugován (10.000 g, 1 min.). Při druhém promývání bylo nanášeno 750  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku MS, následně byla provedena další centrifugace (10.000 g, 1 min). Po přenesení Spin filtru na novou zkumavku byly odstraněny zbytky promývacích roztoků centrifugací po dobu dvou minut (12.000 g). Eluce přečištěné DNA byla zahájena přidáním 200  $\mu\text{l}$  předehřáté sterilní destilované vody (50 °C) na Spin filtru umístěném na sterilní 1,5 ml zkumavce Eppendorf. Po jednodominutové inkubaci při pokojové teplotě byl vzorek zcentrifugován (8.000 g, 1 min.). Závěrečným krokem bylo změřit koncentraci DNA na přístroji Nanodrop, naředit vzorky na koncentraci 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  a uskladnit je při -20 °C.

## 4.8 AFLP protokol

### 4.8.1 Restrikce a ligace DNA

Prvním krokem je příprava a napipetování restrikčního mixu k DNA a inkubace na termobloku při 37 °C po dobu 2,5 hodiny. Před uplynutím této doby se provádí příprava ligačního mixu, který se poté přidá ke vzorkům po restrikci a následuje tříhodinová inkubace na termobloku při 37 °C.

#### Postup restrikce a ligace:

- rozmražení vzorků DNA (koncentrace 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) přenesením do ledničky
- příprava restrikčního mixu pro daný počet vzorků, zvýšený o objemy pro dva vzorky (kvůli ztrátám při pipetování) – viz. Tabulka č. 2
- promíchání restrikčního mixu a rozpipetování po 15  $\mu\text{l}$  do PCR stripů
- přidání 5  $\mu\text{l}$  DNA
- výsledný objem restrikční směsi je 20  $\mu\text{l}$
- promíchání a krátká centrifugace na stolní centrifuze
- přemístění stripů do termocyklu, inkubace 2,5 hodin při 37 °C
- příprava ligačního mixu (asi 20 minut před ukončením restrikce) podle protokolu – viz. Tabulka č. 3
- promíchání ligačního mixu
- po ukončení restrikční reakce přidání ligačního mixu po 5  $\mu\text{l}$  do PCR stripu z předchozího kroku
- inkubace na termocyklu po dobu 3 hodin při 37 °C

- po proběhnutí reakce se ověří úspěšnost restrikce/ligace na 1,5 % agarosovém gelu v TBE pufru (0,5 TBE)
- nanáší se 5  $\mu$ l směsi po ligaci spolu s 2  $\mu$ l nanášecího pufru a jako kontrola se používá 3  $\mu$ l 100 bp ladderu
- za pozitivní výsledek se považuje detekce „smýru“ amplifikovaných bandů

**Tabulka 2:** Protokol přípravy restrikčního mixu (uvedené objemy platí pro přípravu jednoho vzorku)

Restrikce		
sterilní ddH <sub>2</sub> O	12,790 $\mu$ l	} 15 $\mu$ l (objem roztoku pro pipetování)
pufr dodaný s EcoRI	2,000 $\mu$ l	
MseI	0,125 $\mu$ l	
EcoRI	0,063 $\mu$ l	
DNA	5,000 $\mu$ l	

**Tabulka 3:** Protokol přípravy ligačního mixu (uvedené objemy platí pro přípravu jednoho vzorku)

Ligace		
sterilní ddH <sub>2</sub> O	3,0 $\mu$ l	} 5 $\mu$ l (objem roztoku pro pipetování)
pufr dodaný s ligázou	0,5 $\mu$ l	
EcoRI adaptor	0,5 $\mu$ l	
MseI adaptor	0,5 $\mu$ l	
ligáza	0,5 $\mu$ l	

#### 4.8.2 Preselektivní amplifikace

Jako matrice pro PCR se používá neředěný produkt restrikce a ligace (Adaptor/Ligation Solution). Protokol přípravy PCR mixu a podmínky amplifikační reakce jsou uvedeny v následujících tabulkách.

**Tabulka 4:** Protokol přípravy mastermixu pro preselektivní amplifikaci (uvedené objemy platí pro přípravu jednoho vzorku)

Preselektivní amplifikace		
sterilní ddH <sub>2</sub> O	11,85 µl	} 18 µl (objem roztoku pro pipetování)
pufr dodaný s polymerázou (5x)	4,50 µl	
dNTP (orig)	0,50 µl	
EcoA*primer	0,50 µl	
MseI*primer	0,50 µl	
goTaq Polymerasa (5 U/µl)	0,15 µl	
Adaptor/Ligation Solution	2,00 µl	

Připravená směs (Tabulka č. 4) se promíchá a rozpipetuje po 18 µl do PCR stripů, přidá se 2 µl produktu restrikce/ligace. Po krátkém promíchání a krátké centrifugaci na stolní centrifuze se PCR stripy přemístí do cykleru a spustí se program pro preselektivní amplifikaci.

**Tabulka 5:** Podmínky preselektivní amplifikace

94 °C / 3 min	
---	
94 °C / 30 sek	← 20 x
56 °C / 1 min	
72 °C / 1 min 45 sek	
---	
72 °C / 5 min	
4 °C neomezeně	

Směs po preselektivní amplifikaci se 7 x naředí (5 µl ligační směsi + 35 µl sterilní ddH<sub>2</sub>O). Takto zředěný roztok se používá jako matrice pro všechny selektivní PCR amplifikace. Zbytek nenaředěného vzorku se uchovává při – 80 °C jako záloha.

### 4.8.3 Selektivní amplifikace

Jako matrice se pro selektivní amplifikaci používá 7x naředěný produkt preselektivní amplifikace. Protokol přípravy PCR mixu a podmínky amplifikační reakce jsou uvedeny v následujících tabulkách.

**Tabulka 6:** Protokol přípravy mastermixu pro selektivní amplifikaci (uvedené objemy platí pro přípravu jednoho vzorku)

Selektivní amplifikace		
Sterilní ddH <sub>2</sub> O	3,74 µl	} 8 µl (objem roztoku pro pipetování)
Buffer (5x)	2,00 µl	
dNTP (orig)	0,20 µl	
EcoA*** primer	1,00 µl	
MseI *** primer	1,00 µl	
goTaq	0,06 µl	
preamplifikát (7x zředěný)	2 µl	

Připravená směs (Tabulka č. 6) se promíchá a rozpipetuje po 8 µl do PCR stripů, přidá se 2 µl naředěného preamplifikátu. Po krátkém promíchání a krátké centrifugaci na stolní centrifuze se PCR stripy přemístí do cykleru a spustí se program pro selektivní amplifikaci.

**Tabulka 7:** Podmínky selektivní amplifikace

94 °C / 3 min 30 sek	
---	
94 °C / 30 sek	← 16 x
60,1 °C / 30 sek	
72 °C / 1 min	
---	
94 °C / 30 sek	
56 °C / 30 sek	
72 °C / 1 min	
4 °C neomezeně	



## 4.9 Separace a detekce AFLP fragmentů

Separace AFLP produktů proběhla na přístroji Thermo OWL S3S. Pro detekci separovaných AFLP fragmentů byl použit upravený protokol Bassam a kol. (1991) používaný v Laboratoři molekulárních markerů PřF UP v Olomouci. Celý postup lze popsat v následujících krocích:

Prvním krokem bylo řádné očištění malého skla, nejprve vodovodní H<sub>2</sub>O, poté ddH<sub>2</sub>O a ošetření ethanolem, kterým se sklo otřelo do sucha. Neopomenutelné bylo přetřít sklo přípravkem na odpuzování vody (Rain Repellent).

Velké sklo, na němž byl přilepený gel, se nejprve muselo omýt kartáčem za použití saponátu. Důležité bylo umýt obě strany, na opláchnutí se použila vodovodní voda posléze ddH<sub>2</sub>O. Sklo bylo otřeno do sucha.

Poté se přeneslo do digestoře na polystyrenové víko. Následovalo ošetření silanem. Tento roztok se aplikoval na sklo dvakrát. Sklo se vytřelo do sucha a nechalo 5 minut stát. Po uplynutí času se sklo otřelo čtyřikrát ethanolem. Na jeho hrany se položily spacery, přiklopilo se malým sklem a zafixovalo svorkami.

Roztok 6% akrylamidu se natáhl do stříkačky a plnil se jím prostor mezi skly. Po naplnění celé plochy se vsunul hřebínek a skla se zafixovala dalšími svorkami.

Po hodině se skla omyla kartáčem. Vytáhl se hřebínek a sklo se upnulo do přístroje. Pufir 0,5xTBE se nalil nad sklo. Stříkačkou se vypláchnul prostor, kde bývají umístěny vzorky, poté se dočistil ještě hřebínkem. Nastavení 75 W, max. proud a napětí (2200 V, 120 mA) na 40 minut.

10 minut předem se nahřál temocykler na 96 °C. 5 minut před nanesením na gel se smíchalo 5 μl denaturačního pufru s formamidem s 10 μl vzorku. Vzorky byly přeneseny na vytemperovaný blok na 3 minuty. Poté se ihned přenesly na chladítka. Během denaturace se zatím vypnul zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojila se katoda, otevřel se katodový prostor a znovu se dobře vyčistila mezera pro hřebínek proudem pufru z injekční stříkačky, aby se odstranily zbytky polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do této mezery mezi skly se vsunul hřebínek asi 1 mm hluboko do gelu.

Nanášení vzorků se provedlo osmikanálovou pipetou po 2,8 μl/jamka do mezer mezi zoubky hřebínku. Aparatura se připojila ke zdroji napětí. Na zdroji stejnosměrného

elektrického proudu byla nastavena hodnota 60 W. Čas separace byl sledován pomocí barviv v nanášecím pufru, bromfenolové modři a xylenové modři.

Během elektroforetického dělení vzorků se připravil FIX/STOP roztok, 1% HNO<sub>3</sub>, 0,1% AgNO<sub>3</sub> a VÝVOJKA (viz. 4.3 Použité roztoky, str. 32).

Po uplynutí doby elektroforetického dělení vzorků se vypnul zdroj stejnosměrného elektrického proudu, odpojily se obě elektrody a na zadní straně se připojil ventil odvodní trubičky, pomocí které odtekl pufr z katodové části do sběrného prostoru. Gel se skly se vyjmul a položil do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Vytáhl se hřebínek i oba spacery a skla se od sebe oddělila čepelí nože.

Menší sklo se dalo stranou a velké sklo s gelem se otočilo gelem nahoru a uložilo se do připravené fotomisky. Tato fotomiska byla uložena na třepačce a zalita FIX/STOP roztokem. Doba působení FIX/STOP roztoku byla 20 minut. FIX/STOP roztok se poté slil do baňky a sklo se promylo třikrát v destilované vodě.

Po tomto kroku se gel promyl přesně 5 minut v 1% roztoku HNO<sub>3</sub>, opět se gel třikrát promyl v destilované vodě.

Sklo s gelem se umístilo na třepačku do 0,1% roztoku AgNO<sub>3</sub>, do kterého se těsně před použitím přidaly 3 ml formaldehydu. Doba působení byla 30 minut.

Poté se připravily dvě fotomisky, jedna fotomiska s destilovanou vodou a druhá s vychlazeným 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, do kterého se přidal formaldehyd a 1% roztok Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Fotomiska s gelem v AgNO<sub>3</sub> se sejmula z třepačky a roztok se slil zpět do zásobní láhve. Sklo s gelem se vyjmul a na 5 vteřin ponořilo do misky s destilovanou vodou a přemístilo se do fotomisky s vývojkou na třepačce, kde se pak sledovalo vyvíjení hnědočerných stříbrem obarvených PCR produktů.

Vyvíjení zbarvení se zastavilo FIX/STOP roztokem. Roztok se nechal působit asi 2 minuty, než se odpařil CO<sub>2</sub>.

Sklo s gelem se ponořilo asi na dvě minuty do destilované vody, a pak se přeneslo na 1 hodinu do sušárny, kde se gel při 60°C vysušil. Po vysušení se sklo popsalo fixem a bylo připravené k vyhodnocení na negatoskopu.

#### 4.10 Analýza dat

Po vyhotovení skel následovalo vizuální hodnocení jednotlivých primerových kombinací. U dvou izolátů byly vyhotoveny duplikáty pro ověření reproducibility amplifikace. AFLP fragmenty byly vyhodnoceny na negatoskopu, hodnotila se buď přítomnost nebo absence bandů u všech použitých primerových kombinací. Výsledky byly převedeny v programu MS Excell do elektronické formy jako binární matice (1 = přítomnost, 0 = nepřítomnost bandu). Tato matice byla použita pro další statistické vyhodnocení dat. Pomocí programu FreeTree byly získány matice genetických vzdáleností pomocí 13 koeficientů obsažených v tomto programu (Nei and Li/Dice, Jaccard, Sokal and Sneath/Anderbeg, Sokal and Sneath, Ochiai, Kulczynski, Nei's standard distance, Nei's minimal distance, Latter Fst, Reynolds, Rogers, Prevosti, Nei Da). Pomocí programu TreeFit (Kalinowski, 2009) byla vybrána kombinace shlukovací metody a použitého koeficientu, která vykazovala nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu ( $R^2$ ). Dále byly vytvořeny dva fylogenetické stromy s kombinací nejčastěji používaných v literatuře (tj. UPGMA-Jaccardův koeficient a NJ-Nei and Li/Dice). Dendrogramy byly vizualizovány v programu TreeView (Page, 1996) a pro ověření správnosti daného dendrogramu byla provedena tzv. „bootstrap“ analýza (software FreeTree, 1000 replikací). Jako další metoda pro porovnání výsledků byla použita PCoA analýza, provedená v programu FAMD (Schlüter a Harris, 2006).

## 5 VÝSLEDKY

Cílem experimentální části práce bylo provedení sběru spor *P. cubensis*, získání dostatečného množství kvalitní DNA pro provedení metody AFLP a posouzení korelace výsledků AFLP a fytopatologických dat. Tedy zda existuje souvislost mezi AFLP profily jednotlivých izolátů a jejich patotypy. Byla provedena cílená infekce listů *C. sativus* plísní *P. cubensis*. Spory byly získány 7-9 dnů po inokulaci. Koncentrace suspenze spor z infikovaných listů byla dostačující pro provedení experimentu.

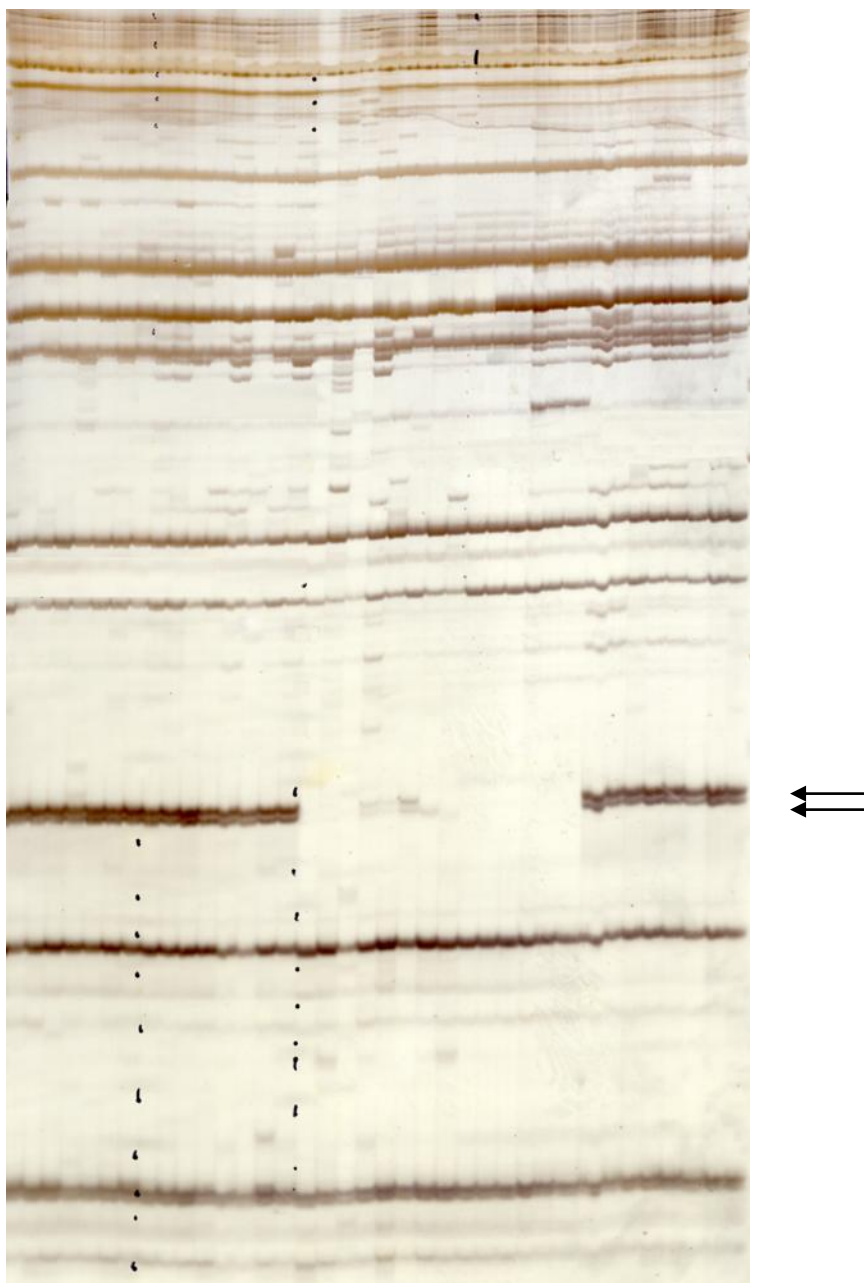
Po izolaci DNA ze spor byl proveden výběru vhodných AFLP primerových kombinací podle protokolů používaných v Laboratoři molekulárních markerů Katedry botaniky PřF UP. Získané elektroforetické záznamy byly dobře hodnotitelné a proto další optimalizace AFLP protokolu nebyly nutné (jako např. změna počtu cyklů PCR). Pomocí 13 primerových kombinací (Tabulka č. 8) byla analyzována kolekce 30 izolátů *P. cubensis* (Tabulka č. 1). Celkem bylo získáno 387 detekovatelných bandů, z nichž 217 bylo polymorfních, což představuje 56,1%. Celkový počet bandů a hodnoty polymorfizmu pro každou primerovou kombinaci jsou uvedeny v Tabulce č. 8.

**Tabulka 8:** Použité kombinace primerů a počty detekovaných AFLP fragmentů

Označení kombinace	Primerová kombinace	loc.	loc_P	PLP
1.2	E – AGC, M – CTG	30	15	50.0%
1.6	E – AGC, M – CAA	32	28	56.3%
1.8	E – AGC, M – CTT	20	15	75.0%
2.2	E – AGG, M – CTG	31	21	67.7%
2.6	E – AGG, M – CAA	36	17	47.2%
2.9	E – AGG, M – CGA	47	25	53.2%
5.2	E – ACG, M – CTG	24	6	25.0%
5.6	E – ACG, M – CAA	17	7	41.2%
5.9	E – ACG, M – CGA	31	21	67.7%
9.2	E – ACC, M – CTG	46	29	63.0%
9.6	E – ACC, M – CAA	20	10	50.0%
1.9	E – AGC, M – CGA	23	2	8.7%
1.1	E – AGC, M – CAG	30	21	70.0%
<b>Celkem</b>		<b>387</b>	<b>217</b>	<b>51.9%</b>

(loc. = celkový počet bandů, loc\_P = počet polymorfních bandů, PLP = polymorfismus (podíl polymorfních lokusů, 95% krit.)

Polymorfních bandů bylo u každé primerové kombinace různý počet, od 2 do 47 polymorfních bandů. Nejvyšší hodnotu polymorfismu vykazovala primerová kombinace 1.8 (75%), dále kombinace 1.1 (70%) a kombinace 2.2 spolu s kombinací 5.9 (67,7%). Nejnižší hodnota polymorfismu byla zjištěna u kombinace 1.9 (8,7%).



**Obrázek 1:** Příklad elektroforetické separace AFLP fragmentů na polyakrylamidovém gelu (zobrazena pouze část gelu, použitá primerová kombinace 1.63). Šípkami jsou označeny fragmenty nepřítomné u skupiny izolátů z roku 2009.

Pomocí programu TreeFit bylo zjištěno, že variabilitu studovaného souboru nejlépe vysvětluje fylogenetický strom konstruovaný metodou Neighbor-joining s použitím koeficientu Nei Da. Hodnoty výsledků kophenetických korelačních koeficientů jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

**Tabulka 9:** Hodnoty kophenetických korelačních koeficientů  $R^2$  zjištěných pomocí programu TreeFit

Koeficient	Metoda	
	NJ	UPGMA
Nei and Li/Dice	<b>0,732</b>	0,198
Jaccard	0,747	<b>0,190</b>
Sokal and Sneath/Anderbeg	0,751	0,180
Sokal and Sneath	0,782	0,255
Ochiai	0,743	0,201
Kulczynski	0,744	0,216
Nei's standard distance	0,735	0,626
Nei's minimal distance	0,803	0,611
Latter Fst	0,480	0,217
Reynolds	0,462	0,209
Rogers	0,814	0,622
Prevosti	0,803	0,611
Nei Da	<b>0,875</b>	0,800

Kromě doporučeného dendrogramu (Neighbor-Joining-Nei Da koeficient) byly vytvořeny další dva dendrogramy, podle metod nejčastěji uváděných v literatuře: metoda Neighbor-joining - Nei and Li/Dice koeficient) a metoda UPGMA - Jaccardův koeficient podobnosti).

Konstrukce dendrogramu pomocí koeficientu Nei Da a metodou Neighbor-joining (Obrázek 2) byla doporučena programem TreeFit, jako varianta s nejvyšší hodnotou kophenetického korelačního koeficientu ( $R^2 = 0,875$ ). Dendrogram byl označen jako *Dendrogram č. 1* a rozdělil analyzované položky na dvě hlavní větve. Jednak se vyčlenily izoláty odebrané v letech 1995-2006 (větev „A“) a dále skupina izolátů, které byly odebrány v roce 2009 (označena jako větev „B“). Rozdělení na tyto dvě hlavní větve bylo podpořeno 100% hodnotou bootstrapové analýzy. Další dělení izolátů v rámci jednotlivých větví (A+B) se statisticky významnými hodnotami bootstrapové

analýzy nebylo podpořeno. Z dendrogramu je rovněž patrné, že existuje určitá variabilita mezi studovanými izoláty, které se dále shlukují do dalších podskupin. U těchto podskupin ale nelze nalézt souvislost mezi přítomností izolátů v daném shluku a rokem jejich sběru a/nebo jejich patotypovým profilem. Pro srovnání s dalšími dendrogramy byla skupina „A“ dále rozdělena do tří podskupin označených „A1-A3“. Shluková analýza jasně prokázala (Obrázek 5), že izoláty z roku 2009 jsou odlišné od zbytku analyzovaných vzorků. Pro srovnání byly zkonstruovány ještě dva dendrogramy s odlišnou kombinací metody a koeficientu (Obrázek 3, Obrázek 4), které jsou nejčastěji užívané v odborné literatuře.

*Dendrogram č. 2* sestavený pomocí metody Neighbor-Joining a koeficientu Nei and Li/Dice (obr. 3) měl rovněž poměrně vysokou hodnotu kophenetického korelačního koeficientu ( $R^2 = 0,732$ ) a je rozdělen do čtyř hlavních větví, které byly označeny písmeny A-D. Shluk izolátů označených jako „A1“ je opět reprezentována izoláty sesbíraných v roce 2009 a jedním izolátem 43/06 z roku 2006. Větev „A2“ je zastoupená izoláty 85/03, 10/02/1 a 101/02, které u předchozího *Dendrogramu č. 1* vytváří shluk „A2“. Všechny tři izoláty této větve mají identickou první část patotypového kódu s vysokým stupněm sporulace na genotypch *Cucumis* sp.. Podobně jako na předchozím dendrogramu nebylo možné u dalších větví stromu (B, C) najít pravidelnou souvislost mezi pozicí izolátů v jednotlivých větvích stromu a jejich patotypovým profilem a místem odběru. Výjimkou bylo již zmíněné oddělení větve „A1“ tvořené především izoláty z roku 2009 od ostatních analyzovaných. Samostatná větev „D“ představuje izolát 84/02. Ačkoliv oddělení této větve od ostatních je podpořeno ze 100% bootstrapovou analýzou, patotypový triplet izolátu 15-10-14 je identický s izoláty, které jsou součástí shluků „A1“ (40/09) a „C“ (72/01).

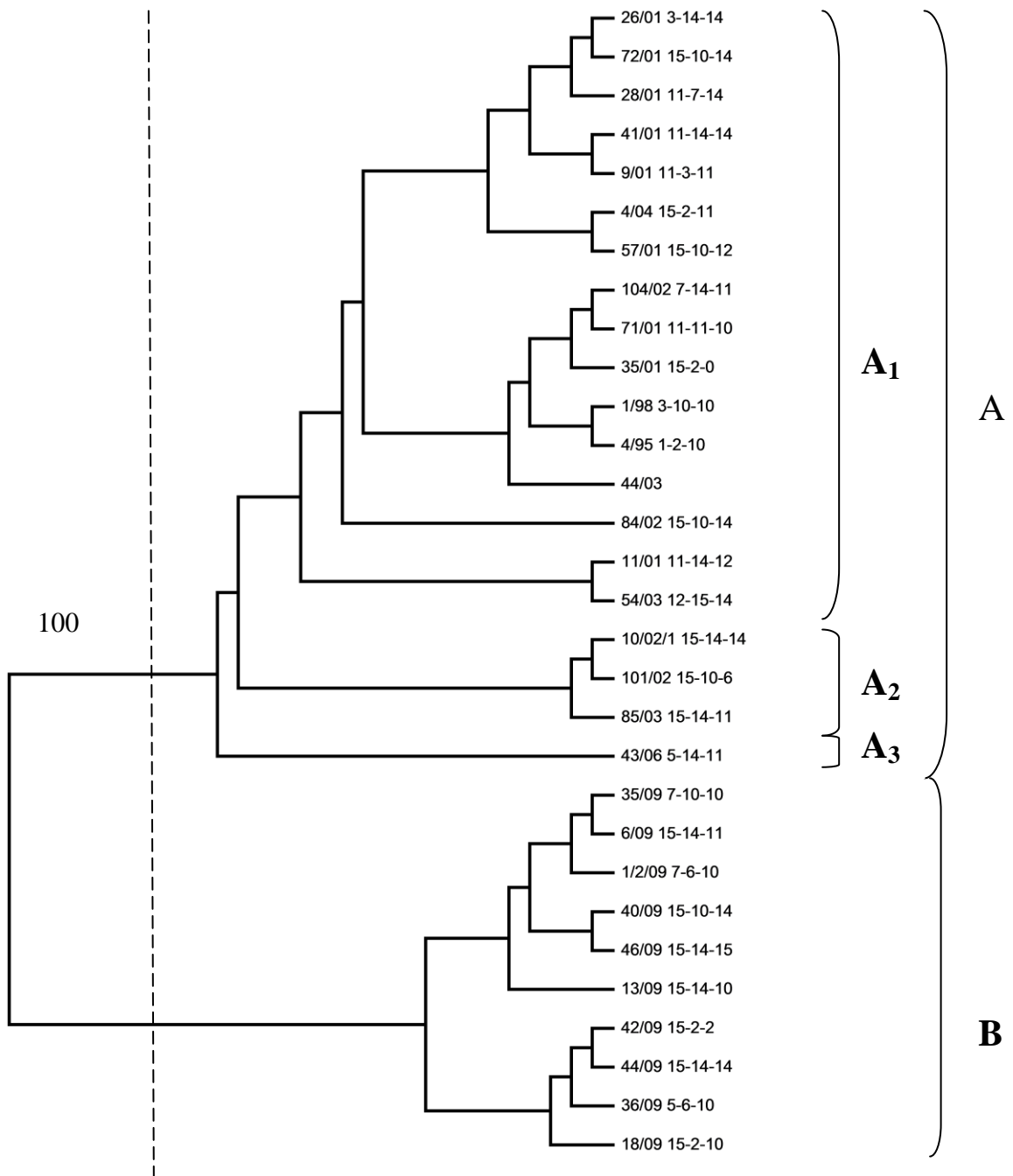
Poslední *Dendrogram č. 3* byl vytvořen metodou UPGMA s použitím Jaccardova koeficientu (Obrázek 4). Tento způsob konstrukce dendrogramu je nejčastěji používaný v odborné literatuře, ale podle výstupu programu TreeFit byla hodnota kophenetického korelačního koeficientu velice nízká ( $R^2 = 0,190$ ). Dendrogram byl rozdělen na tři základní větve (A, B, C), přičemž toto členění bylo podpořeno signifikantními hodnotami bootstrapové analýzy. Větev „A“ vyčlenila izoláty odebrané v letech 1995-2004. Další dělení této větve do podskupin A1-A4 není podpořeno statisticky významnými hodnotami bootstrapové analýzy. Podskupina A3 je představovaná izoláty odebranými

v roce 2001 a tyto izoláty mají společný znak v poslední hodnotě tripletového kódu svých patotypů (tj. 14). Obecně však nelze najít v členění hlavní větve (A) hlubší souvislosti s patotypovým profilem a místem odběru izolátů, které vytváří jednotlivé podskupiny.

Oddělení větví „B“ a „C“ od hlavní větve „A“ je podpořeno vysokými hodnotami bootstrapové analýzy. Ve shluku izolátů větve „B“ je přítomen izolát 43/06, podobně jako na dendrogramech č. 1 a č. 2. Izolát 13/09 představuje samostatnou větev „C“.

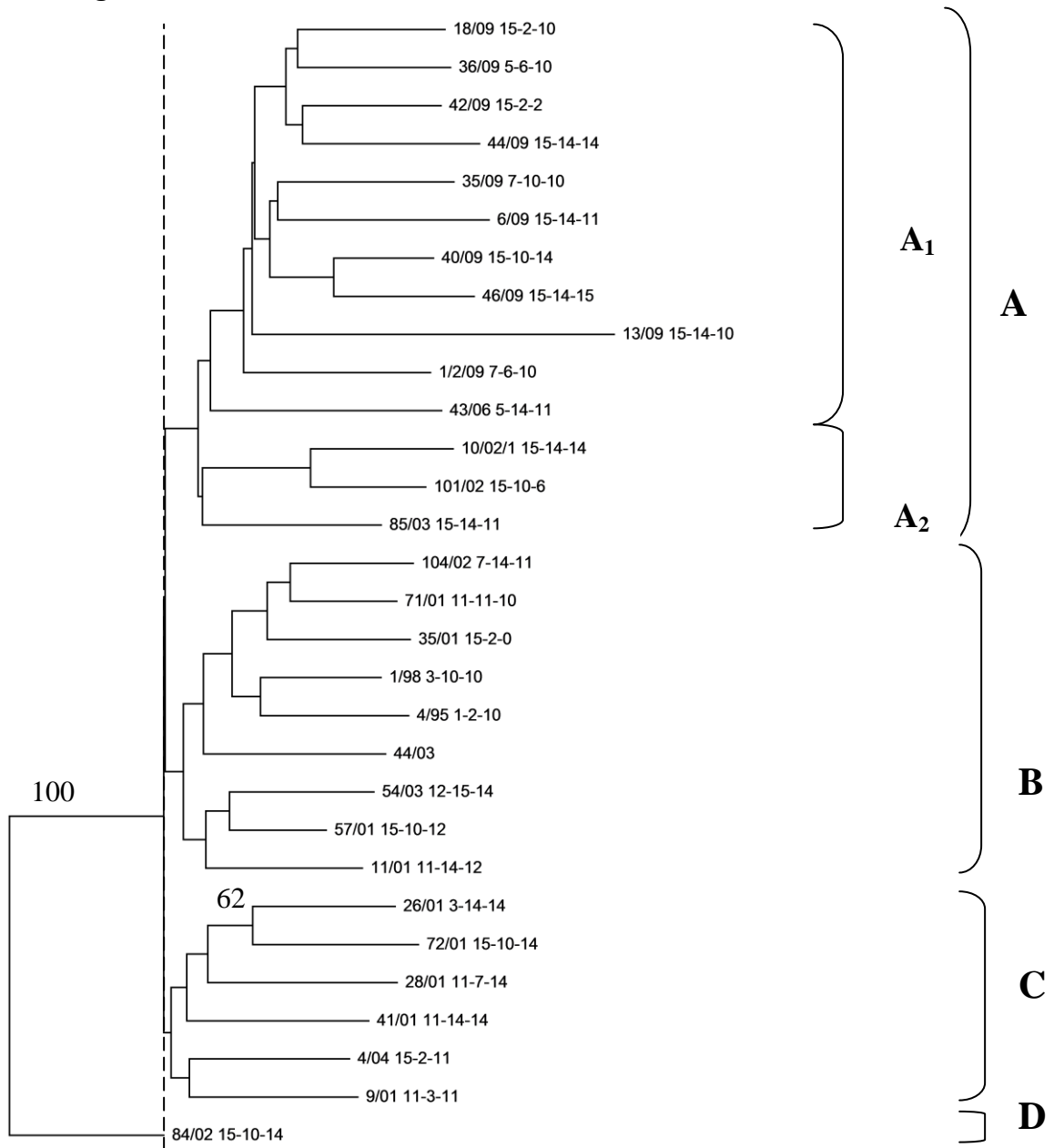


*Dendrogram č. 1*



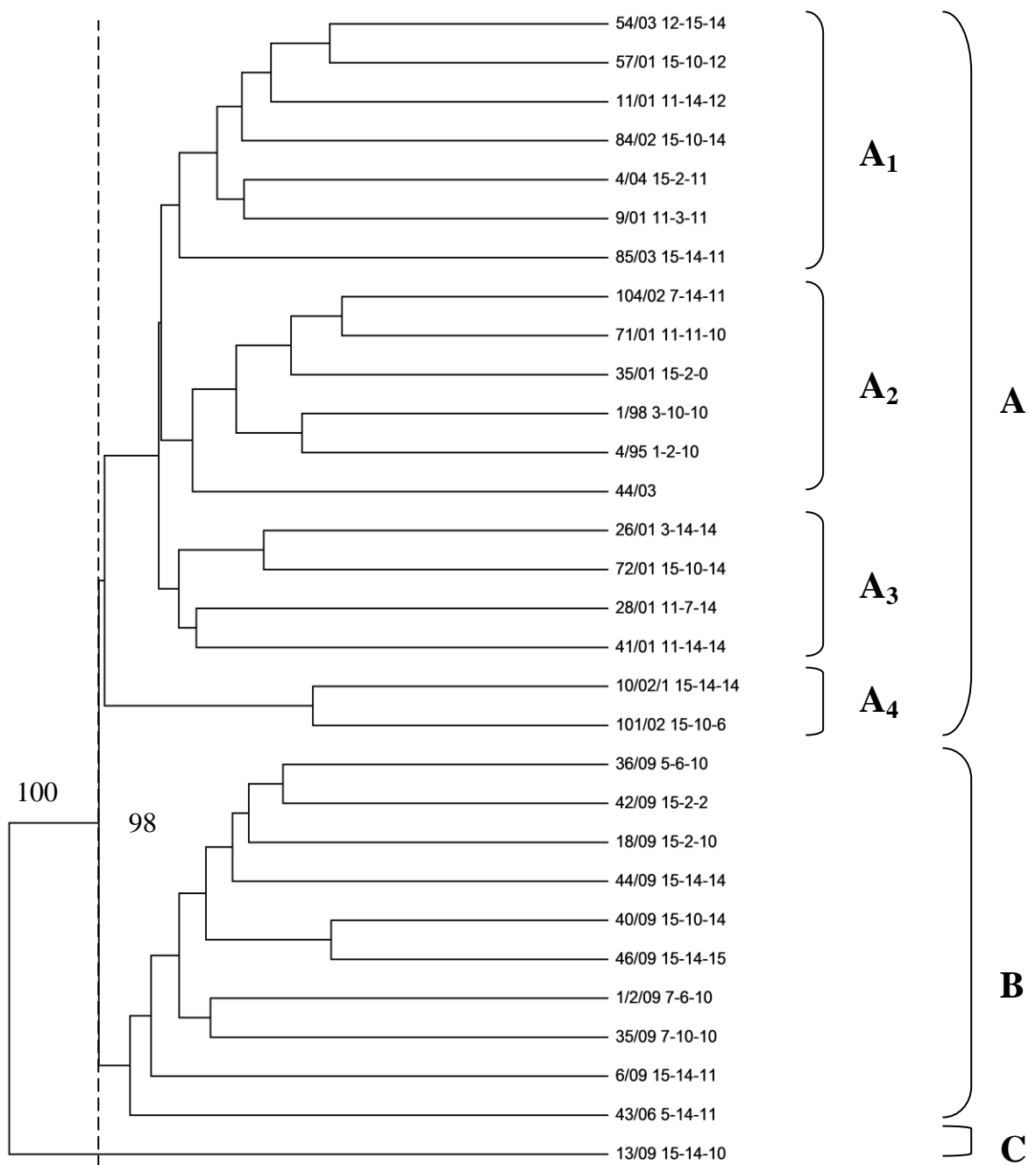
**Obrázek 2:** Dendrogram izolátů *P. cubensis* sestavený na základě 387 AFLP fragmentů (metoda Neighbor-joining, koeficient Nei Da, s uvedením signifikantních výsledků bootstrapové analýzy (1000 replikací)

**Dendrogram č. 2**



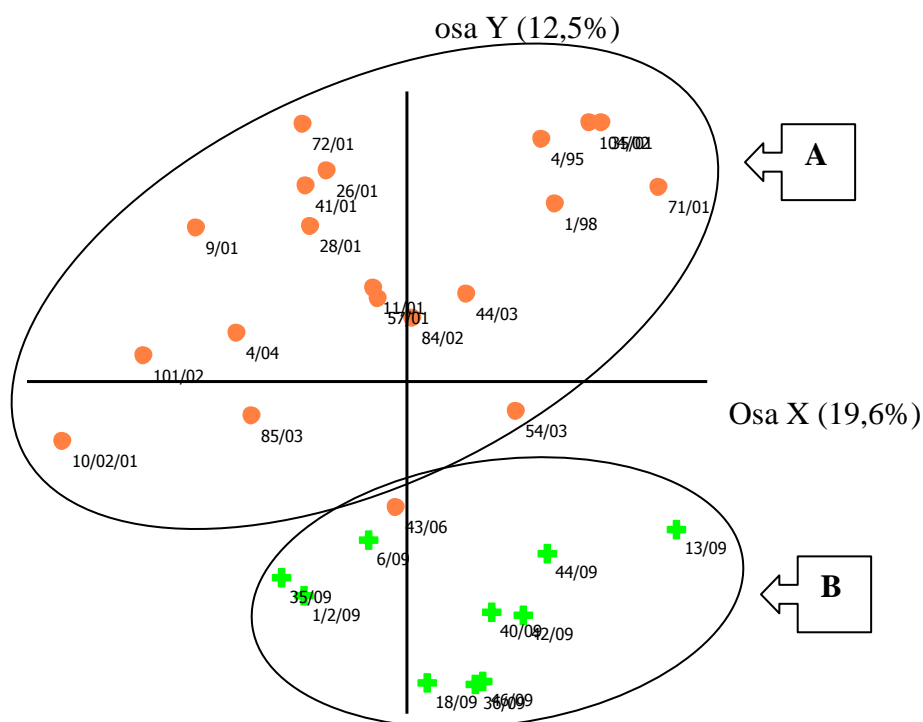
**Obrázek 3:** Dendrogram izolátů *P. cubensis* sestavený na základě 387 AFLP fragmentů (metoda Neighbor-Joining, koeficient Nei and Li/Dice, s uvedením signifikatních výsledků bootstrapové analýzy (1 000 replikací))

**Dendrogram č. 3**



**Obrázek 4:** Dendrogram izolátů *P. cubensis* sestavený na základě 387 AFLP fragmentů (metoda UPGMA, koeficient Jaccard, s uvedením signifikantních výsledků bootstrapové analýzy (1 000 replikací))

## PCoA diagram



**Obrázek 5:** Výsledky analýzy PCoA (Principal Coordinate Analysis) – 2D diagram. Pomocí tří prvních os je vysvětleno 32,1% celkové variability studovaného souboru

Jako další metoda pro vyhodnocení získaných AFLP dat byla použita PCoA analýza, která podobně jako u předešlých dendrogramů rozdělila analyzovaný soubor na dva hlavní shluky vzorků. Skupinu „A“ představují izoláty z let 1995-2004 a izoláty z roku 2009 vytvářející skupinu „B“. Do této skupiny lze začlenit i vzorek 43/06, který se shlukoval se vzorky z roku 2009 i na předchozích dendrogramech.

## 6 DISKUZE

*Pseudoperonospora cubensis* je jednou z nejvýznamnějších patogenních hub napadající tykvovité rostliny a může způsobovat velké ztráty ve výnosech zemědělských podniků, které v některých zemích světa mohou dosahovat až 80 % z celkových výnosů (Lebeda a Cohen, 2011; Sarris a kol., 2009). Tento patogen je rozšířen po celém světě a byl zjištěn ve více než 70 zemích se semi-aridním až tropickým klimatem. Navíc *P. cubensis* má široký hostitelský okruh, infikuje přibližně 20 různých druhů tykvovitých rostlin (Lebeda a Urban, 2007; Palti a Cohen, 1980). Patogenní variabilita přírodních populací *P. cubensis* byla detailně studována na území České republiky (Lebeda a kol., 2006) a USA (Colluci, 2008). Na základě těchto studií lze říct, že populace tohoto patogenu v České republice je vysoce variabilní (detekováno velké množství různých patotypů) a je odlišná svými patotypovými profily od populací jinde ve světě (Lebeda a kol., 2010). Zároveň byl u české populace patogenu zaznamenán posun ve směru detekce vyšší patogenity, což bylo rovněž pozorováno v Izraeli a USA (Lebeda a Cohen, 2011).

V posledních letech se hledají cesty jak jednoduše identifikovat rozdíly jednotlivých kmenů *P. cubensis* s různými fytopatologickými charakteristikami (např. patotypy), a to nejen *in vitro* testy, ale i pomocí metod molekulární biologie. V práci Sarris a kol. (2009), realizované částečně na Katedře botaniky PřF UP v Olomouci, byla studována genetická variabilita izolátů z geograficky odlehlých oblastí světa. Bylo analyzováno celkem 30 izolátů pocházejících z Řecka (Kréta) a Evropy (České republiky, Francie a Nizozemí) pomocí sekvenace ITS oblasti a metody AFLP. Výsledky sekvenace ITS se ukázaly jako nevhodné pro detailnější popis struktury populací *P. cubensis* – sekvence ITS1 všech izolátů byly identické a oblast ITS2 rDNA seskupily izoláty z Rakouska, Čech a Kréty společně s izoláty *P. humuli*. Naopak výsledky AFLP oddělily izoláty z Kréty od izolátů z Evropy, došlo tedy k rozdělení izolátů podle jejich geografické polohy. Nebyly ale jednoznačně prokázány souvislosti mezi AFLP profily a fytopatologickými charakteristikami izolátů *P. cubensis*.

Jedním z úkolů této práce bylo právě ověření tohoto zjištění na rozšířené kolekci izolátů *P. cubensis* o izoláty z dalších sběrových let.

V letošním roce byla publikována práce popisující rozšíření okruhu hostitelských rostlin *P. cubensis* také o druh *Cucurbita moschata* (Pavelková a kol., 2011)

a v loňském roce nově zaznamenané výskyty *P. cubensis* na druzích *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. ficifolia* (poprvé v ČR) a na *Citrullus lanatus* a *Cucurbita moschata* (na obou druzích byla v minulosti v ČR vzácně pozorována infekce *P. cubensis*) (Lebeda a Sedláková, osobní sdělení). Všechny tyto skutečnosti by mohly ukazovat na probíhající změny v genomu patogenu. Výskyt *P. cubensis* na *C. moschata* byl opakovaně pozorován v letech 2009, 2010 a právě část izolátů odebraných v roce 2009 byla analyzována v této bakalářské práci. Jedná se o vzorky, které se na dendrogramech a PCoA diagramu vyčleňují jako oddělená skupina izolátů a jejich odlišnost od izolátů pocházejících z předchozích let je tedy potvrzena i na genetické úrovni. Izolát 88/2009 popsáný v práci Pavelkové a kol. (2011) získaný z infikovaných porostů *C. moschata* na lokalitě Nový Jičín-Kojetín (severní Morava), který byl prvním zjištěným výskytem tohoto patogenu na tomto hostiteli v ČR bohužel nebyl do analýz zařazen. Avšak na základě výsledků publikovaných v práci Pavelkové a kol. (2011) a podle informací, které byly poskytnuty konzultantem této bakalářské práce prof. Lebedou, v populaci patogenu v roce 2009 stejně jako i v roce 2008 (Lebeda a kol., 2010) převažovaly vysoce virulentní kmeny, avšak analyzované vzorky z roku 2009 vykazují výrazně odlišné fytopatologické vlastnosti než izolát 88/2009, u kterého byl detekován patotyp 4/15/0, dosud v ČR nepopsaný. Zajímavým zjištěním je i podobnost izolátu 43/06 (lokalita Čermná nad Orlicí, Královéhradecký kraj), který se na většině diagramů shlučuje se vzorky z roku 2009 a je jim svým genetickým AFLP profilem velice podobný.

Vincelli a Tisserat (2008) popisují obecně použití metody AFLP v aplikované patologii pro účely identifikace druhů patogenů (např. rody *Pythium* a *Fusarium*; Abdel a kol., 2003; Summerell a kol., 2003; Garzón a kol., 2005; Sumiková a kol., 2010) a dále pro studie genetické variability přírodních populací patogenů (např. u rodů *Phytophthora*, *Ophiosphaerella*, *Pseudoperonospora*; Bowers a kol., 2007; Iriarte a kol., 2004; Sarris a kol., 2009). Toto bylo například využito při určení geografického původu patogenů, které byly spojeny s výskytem nových chorob (Tooley a kol., 2002). Z většiny publikovaných studií genetické variability rostlinných patogenů prováděných pomocí metody AFLP vyplývá využitelnost této metody pro odlišení testovaných izolátů podle jejich geografického původu. Příkladem může být již několikrát zmiňovaná práce Sarris a kol. (2009) provedená na *P. cubensis*, ve které byly pomocí

AFLP odlišeny izoláty z Evropy a Kréty. Dále lze uvést studii genetické a patogenní variability izolátů *Phytophthora cactorum* (Bhat a kol., 2006), kdy byly pomocí AFLP detekovány signifikantní rozdíly v geografickém původu izolátů a druhem hostitelské rostliny.

Naopak existuje několik prací, ve kterých metoda AFLP nerozdělila analyzované vzorky podle žádného ze studovaných kritérií. Příkladem je studie patogenu *Puccinia melanocephala* v severozápadní Argentině (Pocovi a kol., 2010). Cílem autorů bylo objasnit, zda genetická variabilita koreluje s variabilitou izolátů pocházejících z různých hostitelských rostlin nebo zeměpisným rozšířením choroby. Celkem pracovali s 538 AFLP markery, které byly vygenerovány pomocí 20 primerových kombinací. Shluková analýza (metoda UPGMA, Jaccardův koeficient) a PCoA analýza ale neseskupila izoláty ani podle jejich geografického původu ani podle hostitelské rostliny (Pocovi a kol., 2010).

Podobně ve studii realizované ve Finsku na rodu *Peronospora sparsa* bylo analyzováno 36 izolátů pomocí 226 AFLP markerů, přičemž 223 z nich bylo polymorfních. Klastrovací analýza UPGMA neseskupila izoláty ani podle geografického původu ani podle hostitele, ze kterého izoláty pocházely (Lindqvist – Kreuze a kol., 2002).

Na předchozích příkladech je také zřejmé, že nejčastěji používanou metodou pro konstrukci fylogenetických stromů u fytopatogenních organismů obecně je metoda UPGMA, a to v kombinaci s Jaccardovým indexem podobnosti. Oproti metodě Neighbor-Joining je to metoda výpočetně jednodušší a poskytuje zpravidla graficky „lépe“ vypadající stromy.

V této bakalářské práci byly výsledky zpracovány pomocí několika variant výběru metody pro tvorbu dendrogramů a koeficientů pro výpočet genetických vzdáleností mezi prvky analyzovaného souboru. Pomocníkem při rozhodování měl být program TreeFit, který jako optimální doporučil použití metody NJ a koeficientu NeiDa. Výsledný strom se 100% spolehlivostí oddělil izoláty z roku 2009 od ostatních. Při prostudování manuálu k použitému programu pro vytvoření matice genetických vzdáleností (FreeTree) bylo ale zjištěno, že koeficient NeiDa není vhodný pro analýzu binárních dat. Rovněž v manuálu k programu TreeFit je uvedeno, že při rozhodování o výběru vhodné konstrukční metody dendrogramu má hodnota  $R^2$  nabývat hodnot

blízkých k 1 (nebo alespoň nad hodnotu 0,9), což pro žádnou kombinaci nebylo zjištěno ( $R^2 = 0,875$  pro kombinaci NJ-NeiDa). Proto byly provedeny konstrukce dalších dvou fylogenetických stromů podle nejčastěji užívaných postupů (NJ-Nei and Li/Dice; UPGMA-Jaccard). Podobně jako ve variantě NJ-NeiDa byly u těchto konstrukčních metod vzorky rozděleny na skupinu izolátů z roku 2009 (společně s izolátem 43/06) a izoláty z let předchozích. Pokud vezmeme v úvahu prakticky stejné výsledky další nezávislé metody PCoA, dále hodnoty bootstrapové analýzy jednotlivých stromů a rovněž i vizuálně identifikovatelné rozdíly mezi izoláty na AFLP gelech, pak jako optimální postup konstrukce fylogenetického stromu lze navrhnout použití Jaccardova koeficientu podobnosti metody UPGMA.

Výsledky této bakalářské práce tedy ukazují, že pomocí metody AFLP lze detekovat pravděpodobně rozsáhlejší změny genomu fytopatogenních hub. Dále lze vyvodit závěr o nevhodnosti použití metody pro detekci odlišností mezi izoláty na relativně malé geografické škále, ale především o nevhodnosti při hledání přímé souvislosti mezi AFLP profilem daného izolátu (nebo skupiny podobných izolátů) a jeho fytopatologickou charakteristikou založenou na patotypovém kódu. O aktuálnosti této otázky svědčí v současnosti publikované práce, jako například práce Turgay a kol. (2010), ve které nebylo možné pomocí 9874 AFLP fragmentů nalézt souvislost mezi větvením UPGMA dendrogramu a patotypovými profily společně se shlukujících izolátů *Cercospora beticola*. K podobným závěrům dospěli Bouajila a kol. (2007) při analýze 122 izolátů *Rhynchosporium secalis* pomocí AFLP a mikrosatelitních dat.

Organismus, který byl objektem této bakalářské práce - *Pseudoperonospora cubensis* – je považován za velice nebezpečný patogen decimující porosty významných plodin z čeledi *Cucurbitaceae*. Tento patogen se dostává do různých geografických oblastí, lehce se jim přizpůsobuje a může docházet ke vzniku nových agresivních genotypů napadajících nové druhy rostlin. Důležitost monitoringu, identifikace a charakterizace změn v přírodních populacích *P. cubensis* je tedy zřejmá. Výsledky podobných studií rovněž mohou přispět při šlechtění rezistentních odrůd tykvovitých plodin, popřípadě k výběru a vývoji fungicidů, které by zmírnily každoroční dopad devastujících epidemií tohoto patogena.



## 7 ZÁVĚR

V rámci mé bakalářské práce byla provedena pomocí metody AFLP detekce variability u souboru 30 izolátů *P. cubensis*, které pocházely z České republiky (ČR) a které byly vybrány ze sbírkové kolekce izolátů tohoto patogenu uchovávané na KB PřF UP v Olomouci. U každého z testovaných izolátů byla známa jeho fytopatologická charakteristika, resp. jeho patotyp, označený tetradovým numerickým kódem na základě jeho reakce na diferenční soubor tykvovitých (Lebeda a Winderlechner, 2003).

V této bakalářské práci byla detailně popsána metoda získání spor *P. cubensis* pro izolaci DNA, která je dále používána při molekulárních analýzách tohoto patogenu a dále i detailní popis metodiky AFLP analýzy, která je v současnosti používána v laboratoři molekulárních markerů Katedry botaniky PřF UP v Olomouci.

Genetická analýza izolátů *P. cubensis* byla provedena pomocí metody AFLP za použití zvolených 13 primerových kombinací. Celkem bylo získáno 387 detekovatelných bandů, z nichž 217 bylo polymorfních. Pro porovnání AFLP dat a fytopatologických charakteristik analyzovaných vzorků byla provedena shluková analýza a výsledky byly vizualizovány ve formě dendrogramů a PCoA diagramu. Ze získaných výsledků vyplynulo, že nebyla nalezena souvislost mezi shlukováním izolátů s podobnými fytopatologickými charakteristikami a jejich AFLP profily. Pouze bylo prokázáno oddělení izolátů z roku 2009 od izolátů z předchozích let, což by mohlo souviset se změnami v okruhu hostitelských rostlin pozorovanými v posledních letech.

Výsledky této bakalářské práce ukazují na důležitost sledování změn v přírodních populacích *P. cubensis* a které mohou přispět ve šlechtění rezistentních odrůd tykvovitých plodin, popřípadě k výběru a vývoji fungicidů, které by zmírnily každoroční dopad devastujících epidemií tohoto patogenu.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**A** - absorbance

**AFLP** - délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism)

**AgNO<sub>3</sub>** – dusičnan stříbrný

**CH<sub>3</sub>COOH** – kyselina octová

**C** – kóphenetický korelační koeficient

**CLU** – analýza shluků, cluster analysis

**CTAB** - cetyltrimethylamoniumbromid, chemický vzorec C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NBr

**Cox 2** – mitochondriální cytochrom oxidáza II

**DNA** - deoxyribonukleová kyselina

**dNTP** – deoxynukleotidy, stavební kameny DNA

**EcoRI** – restrikční enzym, rozpoznává 6bp (G|AATTC) dlouhou sekvenci DNA a molekulu DNA štěpí v daném místě

**EDTA** - kyselina ethylendiamintetraoctová, chemický vzorec [CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>

**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** – kyselina boritá

**HNO<sub>3</sub>** – kyselina dusičná

**H<sub>2</sub>O** – voda

**ITS** - vnitřní transkribovatelný spacer (Internal Transcribed Spacer)

**MseI** – restrikční enzym, rozpoznává 4bp (T|TAA) dlouhou sekvenci DNA a molekulu štěpí v daném místě

**Na<sub>2</sub>EDTA** - ethylendiamintetraacetát disodný

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – uhličitan sodný

**NaOH** – hydroxid sodný

**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** – thiosíran sodný

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>** – peroxodisíran amonný

**NJ** – metoda Neighbor-Joining

**PC** – *Pseudoperonospora cubensis*

**PCoA** - analýza základních koordinát (Principal Coordinate analysis)

**PCR** – polymerásová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

**RFLP** – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)

**RNA** – ribonukleová kyselina

**Taq polymeráza** – DNA dependentní DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermophilus aquaticus*

**TEMED** – N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin, chemický vzorec,

$(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

**TRIS** – tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, chemický vzorec  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}$

**UV** – ultrafialové záření

## POUŽITÁ LITERATURA

- Adel-Satar, M. A., Khalil, M. S., Mohamed, I. N., Abd-Elsalam, K. A. a Verreet, J. A. (2003): Molecular phylogeny of *Fusarium* species by AFLP fingerprint. *African Journal of Biotechnology* 2: 51 – 55.
- Anonymous (2009): National online statistics. US Department of Agriculture National Agricultural Statistics Service. Available at <http://www.nass.usda.gov/>.
- Bensch, S. a Akesson, M. (2005): Ten years of AFLP in ecology and evolution: Why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899 - 2914.
- Bhat, R. G. a Browne, G. T. (2007): Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California. *Plant Disease* 91: 1556 - 1563.
- Bhat, R. G., Colowit, P. M., Tai, T. H., Aradhya, M. K. a Browne, G. T. (2006): Genetic and pathogenic variation in *Phytophthora cactorum* affecting fruit and nut crops in California. *Plant Disease* 90: 161 - 169.
- Bouajila, A., Abang, M. A., Haouas, S., Udupa, S., Rezgui, S., Baum, M., Yahyaoui, A. (2007): Genetic diversity of *Rhynchosporium secalis* in Tunisia as revealed by pathotype, AFLP, and microsatellite analyses. *Mycopathologia* 163: 281 – 294.
- Cohen, Y. (1981): Downy mildew of cucurbits. In: Spencer, D. M. (ed.): The Downy Mildews. Academic Press, London, pp. 341 – 354.
- Cohen, Y., Meron, I., Mor, N., Zuriel, S. (2003): A new pathotype of *Pseudoperonospora cubensis* causing downy mildew in cucurbits in Israel. *Phytoparasitica* 31: 458 – 466.

- Cook, R. J. a Reeves, J. C. (1998): Kultivar identification general discussion and review of new methods. In: Kelly, A. F. a Georgie, R. T. (eds.): *Encyclopedia of Seed Production of World Crops*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Cooke, D. E. L. a Lees, A. K. (2004): Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* 53: 692 – 704.
- Creste, S., Tulmann Neto, A. a Figueira, A. (2001): Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, V: 19(4): 299 - 306.
- Cuřínová, P. (2008): Využití techniky AFLP fingerprintingu ve šlechtění řepky. Studijní program: N4101. Zemědělské inženýrství. Studijní obor: Rostlinné biotechnologie. Diplomová práce, České Budějovice, 40 pp.
- Čača, Z. a kol. (1990): Ochrana polních a zahradních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, pp. 48 - 49.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 – 791.
- Hübschová, J. a Lebeda, A. (2010): Fungicide effectiveness on Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. *Acta Horticulturae* 871: 458 - 464.
- Huys, G., Coopman, R., Jansen, P. a Kersters, K. (1996): High resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 572 - 580.
- Choi, Y. J., Denchev, C. M. a Shin, H. D. (2008): Morphological and molecular analyses support the existence of host – specific *Peronospora* species infecting *Chenopodium*. *Mycopathologia* 165: 155 – 164.

- Choi, Y. J., Hong, S. B. a Shin, H. D. (2003): Diversity of the *Hyaloperonospora parasitica* complex from core brassicaceous hosts based on ITS rDNA sequences. *Mycological Research* 107: 1314 – 1322.
- Iriarte, F. B., Wetzel, H. C., Fry, J. D., Martin, D. L. a Tisserat, N. A. (2004): Genetic diversity and aggressiveness of *Ophiosphaerella korrae*, a cause of spring dead spot of bermudagrass. *Plant Disease* 88: 1341 - 1346.
- Jankovics, T., Bai, Y., Kovács G. M., Bardin, M., Nicot, P. C., Toyoda, H., Matsuda, Y., Niks, R. E. a Kiss, L. (2008): *Oidium neolycopersici*: Intraspecific variability inferred from amplified fragment length polymorphism analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. *Phytopathology* 98: 529 - 540.
- Kalina, T. a Váňa, J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum, Praha, pp. 129 - 130.
- Kalinowski, S. T. (2009): How well do evolutionary trees describe genetic relationships among populations? *Heredity* 102: 506 – 513.
- Kůdela, V. (1989): Parazitismus a patogenismus. In: Kůdela, V. a kol. (eds.): Obecná fytopatologie, Academia, Praha, pp. 69 - 81.
- Lamour, K. H. a Hausbeck, M. K. (2001): Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. *Phytopathology* 91: 973 - 980.
- Lebeda, A. (1984): A contribution to the general theory of host-parasite specificity. *Phytopatologie Z.* 110: 226 – 234.
- Lebeda, A. (1988): Molekulární determinanty specifčnosti interakce rostlin a mikroorganismů. *Biologické listy* 53: 178 – 200.

- Lebeda, A. (1989): Patogenismus. In: Kůdela, V. (ed.): *Obecná fytopatologie*, Academia, Praha, pp. 77 – 82.
- Lebeda, A. (1990): Biologie a ekologie plísňě okurkové. In: Lebeda, A. a kol. (eds.): *Plíseň okurková (Cucurbit downy mildew)*. Československá vědecká společnost pro mykologii při ČSAV, Praha, pp. 13 – 45.
- Lebeda, A. (1992): Screening of wild *Cucumis* species against downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) isolates from Cucumbers. *Phytoparasitica* 20: 203 – 210.
- Lebeda, A. (1998): *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucumis* spp. and *Cucurbita* spp. – resistance breeding aspects. *Acta Horticulturae* 492: 363 - 370.
- Lebeda, A. a Cohen, Y. (2011): Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) - biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology* 129: 157 - 192.
- Lebeda, A. a Gadasová, V. (2002): Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and some other European countries. *Acta Horticulturae* 588: 137 - 141.
- Lebeda, A. a Hübschová, J. (2010): Distribution and harmfulness of *Pseudoperonospora cubensis* on Cucurbits in the Czech Republic in 2005 – 2007. *Acta Horticulturae* 871: 251 - 258.
- Lebeda, A., Hübschová, J., Urban, J. (2010): Temporal population dynamics of *Pseudoperonospora cubensis*. In: Thies, J. A., Kousik, S., Levi, A. (eds.): *Cucurbitaceae 2010 Proceedings*, pp. 240 - 243. American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, USA.

- Lebeda, A., Křístková, E., Sedláková, B., McCreight, J. D. a Coffey, M. D. (2008): New concept for determination and denomination of pathotypes and races of cucurbit powdery mildew. In: Pitrat, M. (ed.): *Cucurbitaceae* 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Cucurbitaceae*, INRA, Avignon, France, May 21 – 24, 2008, pp. 125 - 134.
- Lebeda, A. a Schwinn, F. J. (1994): The downy mildews – an overview of recent research progress. *Journal of Plant Diseases and Protection* 101: 225 – 254.
- Lebeda, A., Štěpánková, J. a Urban, J. (2006): Plíseň okurky (*Pseudoperonospora cubensis*) – taxonomie, biologie, ekologie, interakce hostitel-patogen a možnosti ochrany. In: Lebeda, A., Mazáková, J. a Táborský (eds.): *Protozoa a Chromista, Taxonomie, biologie a hospodářský význam*. Česká fytopatologická společnost, Praha, pp. 47 - 73.
- Lebeda, A. a Urban, J. (2004): Distribution, harmfulness and pathogenic variability of Cucurbit Downy mildew in the Czech Republic. *Acta fytotechnica et zootechnica* 7, 170 – 173.
- Lebeda, A. a Urban, J. (2007): Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. *Acta Horticulturae* 731: 327 - 336.
- Lebeda, A., Urban, J. (2010): Screening for resistance to cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). In: Spencer, M. M., Lebeda, A. (eds.): *Mass Screening Techniques for Selecting Crops Resistant to Disease*. International Atomic Energy Agency, 285 - 294.
- Lebeda, A. a Widrlechner, M. P. (2003): A set of *Cucurbitaceae* taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection* V (110): 337 – 349.



- Lindqvist – Kreuze, H., Koponen, H. a Valkonen, J. P. T. (2002): Variability of *Peronospora sparsa* (syn. *P. rubi*) in Finland as measured by AFLP. *European Journal of Plant Pathology* 108: 327 – 335.
- Lixiang, M., Senyan, S., Jiayan C., Fang, J., Zhujun, Z a Hongbin, L. (2007): Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Molecular Biology Reports* 36: 479 - 486.
- Meloun, M. a Militký, J. (2002): Kompendium statistického zpracování dat. Academia, Praha.
- May, K. J., Drenth, A. a Irwin, J. A. G. (2003): Interspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. *Australasian Plant Pathology* 32: 353 – 359.
- Meudth, M. a Clarke, A. C. (2007): Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12: 106 - 117.
- Mueller, U. G., Lipari, S. E. a Milgroom, M. M. (1996): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of fungi cultured by the fungus-growing and *Cyphomyrmex minutu*. *Molecular Ecology* 5: 119 - 122.
- Na, W., Yajun, M., Cuiyun, Y., Guanghui, D. a Zhezhi, W. (2008): rDNA-ITS sequence analysis of pathogens of cucumber downy mildew and cucumber powdery mildew. *Frontiers of Agriculture in China* 2: 317 - 320.
- Núñez, Y., Gallego, J., Ponz, F. a Raposo, R. (2006): Analysis of population structure of *Erysiphe necator* using AFLP markers. *Plant Pathology* 55: 650 - 656.
- Page, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357 - 358.

- Palti, J. a Cohen, Y. (1980): Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): the fungus and its hosts, distribution, epidemiology, and control. *Phytoparasitica* 8: 109 – 147.
- Pavelková, J., Lebeda, A. a Sedláková, B. (2011): First report of *Pseudoperonospora cubensis* on *Cucurbita moschata* in the Czech Republic. *Plant Disease* V 95(7): 878 - 879.
- Pavlíček, B. A., Hrda, S. a Flegr, J. (1999): FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness, Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45: 97 - 99.
- Perez, W. G., Gamboa, S., Falcon, Y. V., Coca, M., Raymundo, R. M. a Nelson, R. J. (2001): Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 91: 956 - 965.
- Perumal, R., Isakeit, T., Menz, M., Katile, S. a Magill, C. W. (2006): Characterization and genetic distance analysis of isolates of *Peronosclerospora sorghi* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research* 110: 471 – 478.
- Pocovi, M. I., Rech, G. E., Collavino, N. G., Caruso, G. B., Ríos, R. a Mariotti, J. A. (2010): Molecular diversity of *Puccinia melanocephala* populations. *Journal of Phytopathology* 158: 769 – 775.
- Rod, J. (1988): Plíseň okurková. *Zahradnické aktuality* 60: pp. 1 – 3.
- Runge, F., Choi, Y. J. a Thines, M. (2011): Phylogenetic investigations in the genus *Pseudoperonospora* reveal overlooked species and cryptic diversity in the *P. cubensis* species cluster. *European Journal of Plant Pathology* V (129): 135 - 146.

- Runge, F. a Thines, M. (2009): A potential perennial host for *Pseudoperonospora cubensis* in temperate regions. *European Journal of Plant Pathology* 123 (4): 483 – 486.
- Sarris, P. F., Abdelhalim, M., Kitner, M., Skandalis, N., Panopoulos, N. J., Doulis, A. G. a Lebeda, A. (2009): Molecular polymorphisms between populations of *Pseudoperonospora cubensis* from Greece and the Czech Republic and the phytopathological and phylogenetic implications. *Plant Pathology* 58: 933 - 943.
- Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W, Schouls, L. a Lenstzra, J. A. (1999): Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3083 - 3091.
- Savory, E. A., Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L. M., Varbanova, M., Hausbeck, M. K. a Day, B. (2009): The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular Plant Pathology* 12: 217 - 226.
- Shetty, N. V., Wehner, T. C., Thomas, C. E., Doruchowski, R. W. a Shetty, V. K. P. (2002): Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe, and North America. *Scientia Horticulturae* 94: 231 - 239.
- Schlüter, P. M. a Harris, S. A. (2006): Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology* 6: 569 - 572.
- Skalický, V. (1961): Plíseň okurková – *Peronoplasmopara cubensis*, In: Benada, J. a Špaček, J. (eds.): *Zemědělská fytopatologie*. Díl III. Choroby zeleniny. Praha, pp. 390 – 393.

- Sumíková, T., Remešová, J., Leišová, L., Kučera, L., Chrpová, J. a Šíp, V. (2010): AFLP genotyping improves the level of discrimination between the *Fusarium* species responsible for head Blight in Wheat. *Cereal Research Communications* 38: 533 - 540.
- Šec, K., Skácel, F., Malec, L. a Takáč, V. (2007): Studium faktorů ovlivňujících vznik a zánik troposférického ozonu. *Chemické Listy* 101: 1051 – 1057.
- Thomas, C. E. (1996): Downy mildew. In: Zitter, T. A. (ed.): Compendium of Cucurbit Diseases, Cornell University Press, pp. 25 – 27.
- Turgay, E. B., Bakir, M., Özeren, P., Katircioglu, Y. Z., Maden, S. (2010): Detection of pathotypes and genetic diversity of *Cercospora beticola*. *Plant Pathology Journal* 26: 306 – 312.
- Vincelli, P. a Tisserat, N. (2008): Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease* 92: 660 - 669.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. a Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407 - 4414.
- Wang, C. a Roberts, P. (2006): Development of AFLP and derived CAPS markers for root-knot nematode resistance in cotton. *Euphytica* 152: 185 - 196.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. a Kahl, G. (2005): DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications, Taylor & Francis Group, 444 pp.
- Xu, D. H. a Ban, T. (2004): Conversion of AFLP markers associated with FHB resistance in wheat into STS markers with an extensit - AFLP method. *Genome* 47: 660 – 665.