

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2016

Bc. Lucie Slobodianová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Variabilita populací *Plasmopara halstedii* v ČR

Diplomová práce

Bc. Lucie Slobodianová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

Olomouc 2016

Práce byla podpořena interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci IGA_PrF_2016_001.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala zcela samostatně v průběhu magisterského studia s použitím níže uvedených zdrojů literatury.

V Olomouci, dne

.....

Bc. Lucie Slobodianová

Poděkování:

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. z Katedry botaniky PřF UP za nesmírně milé vedení, poskytnutí informací a literatury a za její čas strávený při zpracování této závěrečné práce. Ráda bych také poděkovala RNDr. Miloslavovi Kitnerovi, Ph.D. za jeho přátelské, ale zároveň velmi odborné vedení diplomové práce, za užitečné rady a cenné připomínky, konzultace a ochotu při poskytnutí potřebných materiálů. Mé poděkování patří také Mgr. Lucii Marečkové za praktické rady při testování mikrosatelitových markerů a Mgr. Romaně Pospíchalové za pomoc při identifikaci ras izolátů *P. halstedii*.

Největší díky patří mojí skvělé rodině, která mě po celou dobu podporovala a umožnila mi absolvovat magisterské studium. Také moc děkuji svému příteli, který byl po celou dobu mou velkou oporou a byl mi vždy na blízku.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Lucie Slobodianová
Název práce:	Variabilita populací <i>Plasmopara halstedii</i> v ČR
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci, Česká republika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Michaela Sedlářová, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016

Abstrakt:

V diplomové práci jsem se věnovala charakterizaci patogenu *Plasmopara halstedii*, který je původcem plísně slunečnicové. Tato karanténní choroba se vyskytuje po celém světě a každoročně působí značné ekonomické ztráty ve výnosu slunečnice. V experimentální části diplomové práce byly metodou DSI („drench seedling inoculation“) identifikovány rasy u 13 izolátů *P. halstedii* pocházejících z území České republiky. V roce 2014 byly v populacích *P. halstedii* na našem území odhaleny rasy 70471, 71471, 71060 a dvě nové, doposud nezaznamenané, rasy 70571 a 71571. V další části práce jsem se zabývala výběrem polymorfních mikrosatelitových markerů pro studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*. Na podsouboru sedmi izolátů *P. halstedii* bylo testováno 112 publikovaných markerů, přičemž u 27 z nich došlo k detekci polymorfních PCR produktů, s počtem 2-4 alel na marker.

Klíčová slova:	diferenční soubor, <i>Helianthus annuus</i> , mikrosatelitové markery (SSRs), plíseň slunečnicová, rasa, variabilita
Počet stran:	75
Počet příloh:	4
Jazyk:	Český

Bibliographic identification

Author's first name, surname: Bc. Lucie Slobodianová

Title: Variability of *Plasmopara halstedii* populations in the Czech Republic

Type of thesis: Master

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic

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

Consultant: RNDr. Miloslav Kitner, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract:

My thesis focused on characterization of oomycete pathogen *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. This quarantine disease is widespread and causes annual significant losses of sunflower yield. The experimental work included identification of *P. halstedii* races by a drench seedling inoculation (DSI) in the set of 13 isolates originating from the Czech Republic. In 2014 races 70471, 71060, 71471 complemented by two new virulence combinations 70571 and 71571 were identified in the Czech populations of *P. halstedii*. In the last part, I performed selection of polymorphic microsatellite (SSR) markers with potential use in studies of *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii* pathosystem. Altogether 112 markers have been tested on the subset of seven *P. halstedii* isolates. As a result 27 polymorphic SSR marker were detected, for which the number of alleles ranged from 2 to 4.

Keywords: differential set, *Helianthus annuus*, microsatellite markers (SSRs), race, sunflower downy mildew, variability

Number of pages: 75

Number of appendices: 4

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	10
3. Literární přehled.....	11
3.1. Obecná charakteristika a hostitelský okruh <i>Plasmopara halstedii</i>	11
3.2. Nomenklatura a taxonomie <i>P. halstedii</i>	11
3.3. Morfologie <i>P. halstedii</i>	12
3.4. Biologie a životní cyklus patogenu	13
3.5. Symptomy napadení <i>P. halstedii</i>	14
3.6. Rozšíření a patogenita <i>P. halstedii</i>	14
3.6.1. Rozšíření <i>P. halstedii</i> v ČR.....	16
3.7. Studium patogenní variability <i>P. halstedii</i>	17
3.8. Šíření <i>P. halstedii</i> a ochrana slunečnice.....	18
4. Mikrosatelity jako vhodné markery pro studium variability populací organismů	20
4.1. Mikrosatelity (SSRs, STRs).....	20
4.1.1. Rozdělení mikrosatelitů	23
4.1.2. Využití mikrosatelitových markerů	23
4.1.3. Způsoby vývoje mikrosatelitových markerů.....	25
5. Materiál a metody	27
5.1. Stanovení ras u izolátů <i>Plasmopara halstedii</i> z ČR.....	27
5.1.1. Původ izolátů <i>P. halstedii</i>	27
5.1.2. Rostlinný materiál	27
5.1.3. Příprava rostlinného materiálu	27
5.1.4. Subkultivace izolátů <i>P. halstedii</i>	28
5.1.5. Identifikace ras <i>P. halstedii</i>	29
5.2. Studium mikrosatelitových markerů u <i>P. halstedii</i>	33
5.2.1. Materiál pro optimalizaci a selekci mikrosatelitových markerů <i>P. halstedii</i>	33
5.2.2. Izolace DNA	33
5.2.3. PCR amplifikace mikrosatelitových markerů	35
5.2.4. Zpracování PCR produktů	44

6.	Výsledky	47
6.1.	Rasy <i>P. halstedii</i> v ČR v roce 2014	47
6.2.	Výskyt ras v populacích <i>P. halstedii</i> v ČR v letech 2009-2014.....	47
6.3.	Výsledky testování mikrosatelitových markerů <i>P. halstedii</i>	50
7.	Diskuze.....	55
8.	Závěr	59
9.	Literatura	60
10.	Přílohy	69
10.1.	Seznam použitých zkratk.....	69
10.2.	Použité chemikálie	71
10.3.	Přístroje a laboratorní vybavení	73
10.4.	Použité roztoky.....	74

1. Úvod

Plasmopara halstedii je biotrofní parazit, který způsobuje plíseňovitost slunečnice (Sedlářová *et al.*, 2010). Tato choroba byla prokázána v lokalitách pěstování slunečnice po celém světě a působí značné ekonomické škody (Šindelková *et al.*, 2008; Virányi, 2002). Integrovaná ochrana spočívá v pěstování rezistentních genotypů slunečnice (Spurný, 2005), rotaci plodin, dodržování přísných agrotechnických a fyto karanténních postupů a aplikaci fungicidů (Kudlíková *et Veverka*, 1999; Sedlářová *et al.*, 2010). Tato opatření vyvíjejí na populace *P. halstedii* selekční tlak, což vede k rozšíření nových izolátů schopných překonávat geny rezistence u dosud odolných genotypů slunečnic (Molinero-Ruiz *et al.*, 2003). Proto je důležité monitorovat populace *P. halstedii* a studovat jejich patogenní variabilitu klasickými fytopatologickými metodami, ale i vyvíjet nové molekulární metody.

2. Cíle práce

Tato diplomová práce měla následující cíle:

- 1/ zpracovat literární rešerši o problematice plísně slunečnice, shrnout poznatky o *Plasmopara halstedii* a problematice mikrosatelitových markerů využívaných při studiu genetické variability fytopatogenních hub;
- 2/ charakterizovat rasy u izolátů *P. halstedii* pocházející ze sběrů infikované slunečnice na území ČR v roce 2014;
- 3/ experimentálně provést výběr polymorfních mikrosatelitových markerů využitelných pro studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*:
 - provést extrakci genomické DNA ze zoosporangií 39 izolátů *P. halstedii*;
 - pomocí gradientové PCR ověřit funkčnost mikrosatelitových markerů navržených pro *P. halstedii* ve studii Sharma *et al.* (2015);
 - na podsouboru sedmi izolátů *P. halstedii* původem z České republiky a Maďarska provést selekci polymorfních markerů.

3. Literární přehled

3.1. Obecná charakteristika a hostitelský okruh *Plasmopara halstedii*

Vřetenatka slunečnicová, odborně nazývaná *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et De Toni (1888), je původcem karanténní choroby tzv. plísně slunečnicové (také plísnovitosti slunečnice; v angličtině *sunflower downy mildew*). *P. halstedii* je biotrofní parazit, který napadá rostliny z čeledi *Asteraceae* – hvězdicovité, kam patří např. rody *Ageratum* (nestařec), *Ambrosia* (ambrozie), *Artemisia* (pelyněk), *Bidens* (dvouzubec), *Coreopsis* (krásnoočko), *Helianthus* (slunečnice), *Solidago* (zlatobýl), *Vernonia* (vernonie), *Xanthium* (řepeň). Jejím nejvýznamnějším hostitelem je slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.). Tlustostěnné oospory, které vznikají na konci vegetační sezóny v napadených rostlinných pletivech, zamořují půdu a jsou schopné v ní přežít po dobu několika let (Spring, 2001). Při primární infekci z půdy *P. halstedii* vyvolává systémovou infekci rostlin, která končí buď úhynem klíčících rostlin, nebo zakrslým růstem rostliny (Sedlářová *et al.*, 2010). Během infekce se mění sekundární metabolismus napadené rostliny, což vede k redukcí výnosu olejnatých semen (Gascuel *et al.*, 2015; Sackston, 1981). Tento biotrofní parazit původně pochází ze Severní Ameriky, kde má také největší rozmanitost ras (Gulya, 2007). Plíseň slunečnicová je rozšířena po celém světě (kromě Austrálie a Nového Zélandu) a působí značné ekonomické ztráty ve všech lokalitách, kde se slunečnice pěstuje (Šindelková *et al.*, 2008; Virányi, 2002).

3.2. Nomenklatura a taxonomie *P. halstedii*

Studovaný druh byl poprvé popsán W. S. Halstedem v roce 1876 v Severní Americe a v roce 1882 W. G. Farlowem pojmenován jako *Peronospora halstedii* Farl. (Sedlářová *et al.*, 2010). V roce 1888 byl tento patogen přeřazen do rodu *Plasmopara* a označen jako *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et De Toni. Tento název byl vědeckou komunitou přijat a používá se i přes časté diskuse dodnes. V českém jazyce je *P. halstedii* označována jako vřetenatka slunečnicová, popř. plíseň slunečnicová (Lebeda *et al.*, 2006).

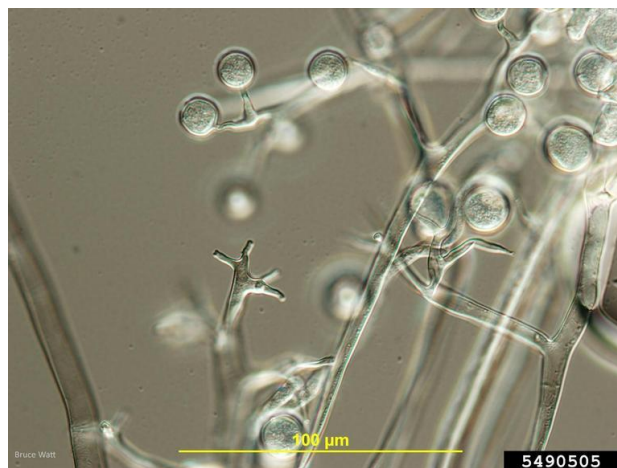
Systematické zařazení *P. halstedii* bylo v minulosti nejednoznačné a problematické. Také taxonomické postavení a vzájemné evoluční vztahy oomycet s příbuznými organismy jsou dodnes poměrně složité (Hudspeth *et al.*, 2003). Carl Linné začlenil v pol. 18. století

zástupce řádu Peronosporales do říše Plantae, Haeckel je v roce 1878 přeřadil do říše Protista a Wittaker je v roce 1969 přemístil do říše Fungi (Lebeda *et al.*, 2006). Toto zařazení se pevně vžilo, proto se i v současné literatuře stále objevuje označení peronospor jako tzv. „pravých plísní“ (Dick, 2001). Nakonec Cavalier-Smith (1998) navrhl zařadit oomycety do říše Chromista. Jeho klasifikace je uznávaná dodnes (Lebeda *et al.*, 2006), i když paralelně někteří autoři upřednostňují taxonomické řazení eukaryot dle Adla *et al.* (2005), kde jsou oomycety součástí říše Chromalveolata.

Podle molekulárních dat a dalších společných znaků spadá v současnosti *P. halstedii* do čel. Peronosporaceae, ř. Peronosporales, odd. Peronosporomycota, říše Chromista (Cavalier-Smith, 1998), syn. Stramenopila či Straminipili (Dick, 2001). Mezi další zástupce čel. Peronosporaceae patří i další ekonomicky významné fytopatogenní rody, např. *Peronospora*, *Pseudoperonospora* nebo *Bremia* (Dick, 2001). Morfologicky lze jednotlivé rody rozlišit podle tvaru a způsobu větvení sporangioforů (Sedlár *et al.*, 2009). Rod *Plasmopara* pojímá celkem 109 druhů a společně s rodem *Peronospora* patří mezi největší a nejrozšířenější zástupce oomycet (Lebeda *et al.*, 2006).

3.3. Morfologie *P. halstedii*

P. halstedii se vyznačuje hyalinním, coenocytickým, nepřehrádkovaným myceliem, které intercelulárně prorůstá mezibuněčnými prostory infikované hostitelské rostliny (Šedivý *et al.*, 1977). Za optimálních podmínek vyrůstají z mycelia štíhlé a monopodiálně rozvětvené sporangiofory (Kalina *et Váňa*, 2005), které vytváří typické bílé povlaky na povrchu napadených hostitelských orgánů, především listů. Na jejich koncích se nachází sporangia vejčitého, popř. elipsoidního tvaru (Obrázek č. 1) (EPPO, 2016). Velikost sporangií je variabilní, stejně jako počet dvoubičíkatých pohyblivých zoospor uvolňovaných z jediného sporangia, které slouží k vlastní infekci hostitele (Stojaspal, 2009). Hyfy nepravidelného tvaru vytvářejí oválná haustoria, které pronikají do buněk hostitele a slouží k absorpci živin (EPPO, 2016). Vřetenatka slunečnicová je řazena mezi homothalické organismy, což znamená, že k pohlavnímu procesu není nutný kontakt dvou fyziologicky rozdílných mycelií, jako je tomu u heterothalických druhů. Samičí oogonia a samčí anteridia, která jsou produkována ze stejného mycelia, na konci vegetačního období splývají, přičemž dochází ke vzniku silnostěnných, vytrvalých oospor (Spring, 2001).



Obrázek č. 1: Oválná zoosporangia, která vznikají na specializovaných hyfách (sporangiioforech). (Převzato z: < www.ipmimages.org >, 9. 1. 2016).

3.4. Biologie a životní cyklus patogenu

Japonský vědec Makoto Nishimuru v roce 1922 popsal biologii *P. halstedii* na rostlinách slunečnice se systémovou infekcí (Sedlářová *et al.*, 2010). *P. halstedii* je obligátní biotrof, tj. vyžaduje pro své přežití a rozmnožování živá pletiva hostitele, bez kterého není schopné další existence a rozmnožování (Sackston, 1981). Jedině pohlavně vzniklé oospory, sloužící k přečkání nepříznivých podmínek mimo vegetační sezónu, jsou schopny díky tlusté buněčné stěně samostatně přežívat v půdě nebo v rostlinných zbytcích až 10 let, což je problémem pro pěstitele slunečnic (Bouterige *et al.*, 2003).

Hostitelské rostliny jsou za příznivých vlhkostních a teplotních podmínek napadány po celou dobu vegetace, tj. od začátku růstu děložních listů až do doby kvetení. Celkem existují tři typy infekce, a to primární, sekundární a latentní. *P. halstedii* se nejčastěji šíří půdou, kde oospory způsobují primární infekci semenáčků v zóně kořenového vlášení. Sekundární infekce je zprostředkována zoosporangii, která jsou následně přenášena na nové hostitelské rostliny v porostu prouděním vzduchu (větrem). Je diskutována i možnost přenosu osivem, tj. nažkami dozrávajících v plodenstvích slabě nakažených rostlin (Orellana, 1970). Mycelium prorůstá úborem slunečnic v blízkosti cévních svazků květů a ve vznikajících nažkách je schopné přečkávat pod osemením. Latentní infekce probíhá bez výrazných symptomů, dochází pouze k mírnému snížení hmotnosti semen, což nemá vážný ekonomický dopad, ale je hrozbou z hlediska epidemiologického (Spring, 2001).

3.5. Symptomy napadení *P. halstedii*

Napadení hospodářských plodin *P. halstedii* se projevuje celou škálou makroskopických i mikroskopických příznaků. V případě primární infekce je typická systémová kolonizace hostitelské rostliny provázená chlorotizací a deformacemi listů, na jejichž spodní straně vyrůstají sporangiofory ve formě bílých povlaků. Pokud je infekce velmi silná, způsobí padání klíčnicích rostlin. Rostliny se slabší infekcí jsou zakrslé v důsledku změny metabolismu auxinů, méně kvetou a výnos semen je snížen až o 50 % (Spring, 2001; Wehtje *et* Zimmer, 1978). Sekundární infekce jsou většinou pouze lokální, omezené na malé plochy pletiva v podobě ohraničených chlorotických skvrn a sporulace na listech. Infekce latentní je většinou bez výrazných příznaků, přičemž klíčení rostlin z infikovaného osiva je provázeno omezenou sporulací na děložních lístcích, hypokotylu nebo kořenových vláscích. *P. halstedii* je však schopna pohlavního rozmnožování a může nepozorovaně znečistit půdu vznikajícími oosporami (Spring, 2001).

3.6. Rozšíření a patogenita *P. halstedii*

Plasmopara halstedii je rozšířena celosvětově v oblastech, kde je slunečnice hojně pěstována. Tento patogen byl objeven na rostlině *Eupatorium purpureum* L. (sadeč červený) v Severní Americe, odkud pochází také jeho nejvýznamnější hostitelská plodina slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.). Z tohoto primárního centra infekce postupovala *P. halstedii* přes severní Mexiko a jižní oblast USA, následně se patogen šířil přes Jižní Ameriku až do evropských zemí. Jako sekundární centrum nákazy je označován region dnešní jižní Ukrajiny severně od Černého moře, odkud byla plíseň zavlečena do dalších evropských států, poté se vrátila zpátky do Severní Ameriky, aby nakonec osídlila Afriku a Asii. Hlavní příčinou tohoto masivního rozšíření vřetenatky slunečnicové bylo pěstování samotné slunečnice, kvůli které obsadil patogen prakticky celou zeměkouli (Virányi, 2002).

Existence ras u *P. halstedii* byla poprvé popsána až začátkem 70. let 20. století (Orellana, 1970; Zimmer, 1974). Rasa 1 (tj. evropská rasa, podle současné nomenklatury označena jako 100) a rasa 2 (tj. americká rasa *Red River Valley*, podle současné nomenklatury označena jako 300) byly označeny podle pořadí objevení, reps. podle místa svého původu. Jednotlivé rasy se vzájemně odlišovaly svou schopností infikovat linie slunečnice nesoucí gen rezistence *Pl₁*. Ten zaručoval odolnost k evropské rase 100. Na počátku 80. let byly v centru Severní Ameriky postupně popisovány další nové rasy s různou virulencí, od 90. let byly

prokázány nové rasy i v Evropě. V roce 1993 byla tato peronospora objevena taktéž v jižní Africe. Vědecká komunita se shoduje, že je *P. halstedii* šířena mezi jednotlivými světadíly prostřednictvím rostlinného materiálu, převážně díky transportu osiva (Gulya, 2007; Viljoen *et al.*, 1997). Nálezy plísně slunečnicové byly potvrzeny prakticky ve všech zemích, kde je slunečnice pěstována jako zemědělská plodina. Austrálie a Nový Zéland zůstávají jedinou oblastí, kde dosud prokázána nebyla (Constantinescu *et Thines*, 2010).

V roce 1977 byla plíseň slunečnice označena za nebezpečnou chorobu a následně zařazena mezi karanténní onemocnění (Delmotte *et al.*, 2008). Epidemie hrozí za vhodných klimatických podmínek v oblastech s rozsáhlými plochami monokultur slunečnice, např. v USA, Francii, Španělsku či Maďarsku. V těchto zemích byla zaznamenána nejvyšší patogenní variabilita plísně slunečnicové, což do určité míry souvisí s intenzivním výzkumem tohoto patogenu. V oblastech, kde jsou pro plíseň slunečnice suboptimální podmínky, se vyskytují spíše jiné mykózy, např. *Sclerotinia sclerotiorum*, stříbřitost stonku (původcem je *Macrophomina phaseolina*) nebo rzivost (původcem je *Puccinia helianthi*) (Kudlíková *et Veverka*, 1999). Přehled rozšíření plísnovitosti slunečnice v jednotlivých zemích je uveden v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Výskyt *P. halstedii* ve světě. (Převzato z: EPPO, 2016).

Kontinent	Stát
Severní Amerika	Kanada, USA
Střední Amerika	Dominikánská republika
Jižní Amerika	Argentina, Brazílie, Chile, Paraguay, Uruguay
Afrika	Egypt, Etiopie, Keňa, Maroko, Zimbabwe, Uganda
Asie	Ázerbájdžán, Čína, Gruzie, Indie, Irák, Irán, Izrael, Japonsko, Kazachstán, Pákistán, Rusko, Turecko
Evropa	Albánie, Bulharsko, Česká republika, Egypt, Estonsko, Francie, Itálie, Maďarsko, Moldavsko, Německo, Polsko, Rakousko, Rumunsko, Rusko, Slovensko, Španělsko, Švýcarsko, Turecko, Ukrajina
Austrálie a Oceánie	Austrálie – zjištěn výskyt pouze na <i>Arctotheca calendula</i> (oruňka měsíčkovitá)

3.6.1. Rozšíření *P. halstedii* v ČR

Na území ČR byla infekce *P. halstedii* poprvé identifikována v 50. letech 20. století na lokalitách jižní Moravy v tehdejší Československu (Bojňanský, 1956; 1957). Další studie pochází až z roku 1999, kdy byl její výskyt sledován na provokačním pozemku MZLU v Brně (Veverka *et* Křížková–Kudlíková, 2006). Od roku 1992 je plíseň slunečnice zařazena v EU mezi významné karanténní choroby (Delmotte *et al.*, 2008). Schválená ochranná opatření bránící jejímu šíření zahrnují rostlinolékařské pasy či pěstování slunečnice z certifikovaného osiva. Infekce *P. halstedii* je na území ČR pokládána spíše za vzácnou (Kokeš *et* Müller, 2004), i když ji někteří biologové stále považují za velmi nebezpečnou a varují před jejím potenciálním rozšířením (Hýsek, 2006). První podrobná studie o výskytu a rasách plísně slunečnicové na našem území byla zahájena v r. 2007 na Katedře botaniky PřF UP (Sedlářová *et al.*, 2010, 2016). V rámci České republiky bylo monitorováno 128 lokalit (Obrázek č. 2), přičemž přítomnost *P. halstedii* byla prokázána pouze na 7 lokalitách (Lednice, Ledce, Čáslav, Olomouc-Holice, Kroměříž, Podivín a Brno-Chrlice), z toho na 4 z nich byl patogen zaznamenán opakovaně a to především na experimentálních pozemcích (odrůdové zkušební ÚKZUZ a PřF UP).



Obrázek č. 2: Výskyt *P. halstedii* v ČR v letech 2007-2012. (Převzato z: Sedlářová *et al.*, 2013).

3.7. Studium patogenní variability *P. halstedii*

Označování ras *P. halstedii* bylo dlouho nejednotné (viz kapitola 3.6). V roce 1998 mezinárodní komise schválila používání oficiálního diferenčního souboru devíti genotypů slunečnice a označení ras *P. halstedii* trojčíselným kódem na základě fenotypu reakce rostlin na inokulaci (Gulya, 2007). V populaci *P. halstedii* však dochází k neustálému vývoji patogenity, proto bylo francouzskými vědci z INRA navrženo rozšíření současného diferenčního souboru o další dva triplety (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Nové označování ras *P. halstedii* pomocí pětičíselného kódu se již ve vědecké komunitě vžívá (Gascuel *et al.*, 2015; Sedlářová *et al.*, 2016), i když dosud není oficiální. Doporučení používání rozšířeného diferenčního souboru (Tabulka č. 2) se předpokládá po projednání mezinárodní komisí na konferenci v Turecku v červnu 2016.

Tabulka č. 2: Diferenční soubor linií slunečnice s uvedenými geny rezistence a stupněm virulence (upraveno podle Gascuel *et al.*, 2015).

Sada tripletů	Označení diferenční linie	Hodnota virulence	Diferenční linie slunečnice	Geny rezistence
1.	D1	1	HA-304	-
	D2	2	RHA-265	<i>Pl</i> ₁
	D3	4	RHA-274	<i>Pl</i> ₂ / <i>Pl</i> ₂₁
2.	D4	1	PMI-3	<i>Pl</i> _{PMI3}
	D5	2	PM-17	<i>Pl</i> ₅
	D6	4	803-1	<i>Pl</i> ₅ +
3.	D7	1	HA-R4	<i>Pl</i> ₁₅ ¹ / <i>Pl</i> ₁₆ ²
	D8	2	QHP-2	?
	D9	4	HA-335	<i>Pl</i> ₆
4.	D10	1	Y7Q	<i>Pl</i> ₆ –
	D11	2	PSC8	<i>Pl</i> ₂
	D12	4	XA	<i>Pl</i> ₄
5.	D13	1	PSS2RM	<i>Pl</i> ₆ / <i>Pl</i> ₂₁
	D14	2	VAQ	<i>Pl</i> ₅
	D15	4	RHA-419	<i>Pl</i> _{arg}

Každá jednotlivá rasa *P. halstedii* nese určitou kombinací genů virulence, díky kterým je schopna infikovat určité genotypy slunečnice, které nemají odpovídající geny rezistence (Gulya *et al.*, 1991). Náhylné rostliny plíseň napadá a způsobí symptomy onemocnění, naopak rezistentní rostliny zůstávají zdravé i přes kultivaci v podmínkách příznivých

pro patogena. Na základě fenotypu reakce jednotlivých linií slunečnice po inokulaci jedním izolátem *P. halstedii* potom rozeznáváme rasu testovaného izolátu, která je označena třímístným/pětimístným kódem (Bartůšek, 2013; Gulya, 2007).

Do roku 2007 bylo identifikováno 13 ras *P. halstedii* v Evropě a 20 ras v Americe (Gulya, 2007). Dramatický vývoj fyziologických ras *P. halstedii* dokazuje fakt, že k roku 2013 bylo zaznamenáno celkem 24 ras *P. halstedii* v Evropě a 40 ras v Americe (Virányi *et al.*, 2015). V letech 2007–2013 bylo zjištěno minimum změn či výskyt nových ras v Argentině, Rusku a Španělsku. V ostatních zemích se spektrum zaznamenaných ras měnilo, přičemž nejvyšší patogenní rozmanitost *P. halstedii* byla zaznamenána v USA (nárůst o 21 ras), v Kanadě (nárůst o 18 ras) a ve Francii (nárůst o 13 ras) (Virányi *et al.*, 2015).

Zatímco dříve převládaly rasy 100 a 300, po roce 1988 se v populaci patogena zvýšil výskyt více patogenních ras, s dominancí ras 700 a 730 (EPPO, 2016). Po celém světě byly zaznamenány rasy 100, 300, 330, 700, 703, 710, 730 a 770 (Gulya, 2007). K roku 2013 byl v Kanadě detekován převládající výskyt ras 320, 700, 720, 730 a 732. Rasy 120, 321 a 331 identifikované pouze v Kanadě jsou považovány za unikátní a nebyly prozatím zaznamenány v žádné jiné zemi (Rashid, 2014). Kvůli rostoucí globalizaci lze očekávat šíření nových ras patogenu na větší vzdálenosti, což přispívá k neustálému vývoji virulence v populacích *P. halstedii* (EPPO, 2016).

3.8. Šíření *P. halstedii* a ochrana slunečnice

Oospory *P. halstedii* se nejčastěji šíří kontaminovanou půdou, podpovrchovou vodou, vzdušným prouděním či nástroji při obdělávání pozemků. Prostřednictvím osiva se mycelium může šířit i na větší vzdálenosti (EPPO, 2016).

K hlavním opatřením integrované ochrany slunečnice patří pěstování rezistentních genotypů z certifikovaného osiva (Spurný, 2005), rotace plodin, dodržování agrotechnických a fytokaranténních postupů (Kudlíková *et Veverka*, 1999; Sedlářová *et al.*, 2010) či používání fungicidů. Ty se využívají k moření osiva, protože chemická ochrana v porostu napadeném *P. halstedii* není účinná. Pozemek zamořený oosporami *P. halstedii* není vhodný pro pěstování slunečnice po dobu min. 10 let a napadené rostliny, které jsou zdrojem inokula, je třeba zlikvidovat (Kudlíková *et Veverka*, 1999). Pěstování genotypů slunečnice nesoucích *Pl* geny vyvolává vznik nových ras *P. halstedii*, schopných rezistenci překonat. Proto jsou studovány QTL („quantitative trait loci“) (Vincourt *et al.*, 2012) a geny rezistence příbuzných

planých rostlin *H. annuus*, *H. praecox*, *H. tuberosus* a *H. argophyllus* (Mulpuri *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2016). Taktéž chemická prevence se stává méně účinnou, protože dochází ke zkracování doby působení aplikovaných látek či vzniku rezistence. Použité chemické směsi se stávají selekčním faktorem a přispívají k mikroevoluci v populacích patogenu (Molinero-Ruiz *et al.*, 2003).

Ochrana proti *P. halstedii* byla založena na aplikaci fungicidů na bázi metalaxylu (Albourie *et al.*, 1998), který je používán kontinuálně od roku 1980 (Iliescu, 1980. Melero-Vara *et al.*, 1982). O deset let později se na trhu objevil nový účinný fungicid mefenoxam (Shetty, 1998). Nicméně, od roku 1995 se objevují izoláty tolerantní k metalaxylu a mefenoxamu v EU i USA. Z tohoto důvodu jsou v současné době testovány nové chemické sloučeniny jako je strobilurin či azoxystrobin používané pro moření osiva (García-Ruiz *et al.*, 2012; Molinero-Ruiz *et al.*, 2005; Spring *et al.*, 2006).

4. Mikrosatelity jako vhodné markery pro studium variability populací organismů

4.1. Mikrosatelity (SSRs, STRs)

Mikrosatelity (mikrosatelitové markery), někdy označované jako repetice jednoduchých sekvencí („simple sequence repeats“, SSRs) nebo krátké tandemové repetice („short tandem repeats“, STRs) (Oliveira *et al.*, 2006) jsou úseky DNA, které jsou typické svými krátkými, tandemově se opakujícími sekvencemi nukleotidů. Délka jednotky repetice se pohybuje od dvou až šesti párů bází (Watson *et al.*, 2008; Zima *et al.*, 2004). Mikrosatelity se nacházejí náhodně v kódujících i nekódujících oblastech genomu prokaryot i u eukaryot. Nejčastější výskyt je však v nekódujících oblastech a v intronech (Ellegren, 2004). Vysvětlením, proč se v kódujících oblastech nachází méně mikrosatelitů, je pravděpodobně selekční tlak proti mutacím porušujícím čtecí rámec („open reading frame“, ORF), tedy mutace vedoucí k porušení správné funkce proteinu (Metzgar *et al.*, 2000). Krátké mikrosatelitové repetice se podílí na organizaci chromatinu, regulaci DNA rekombinace, replikace, transkripce, translace, buněčného cyklu apod. Mikrosatelity ležící v intronech mohou mít vliv na genovou expresi (Wang *et al.*, 2014).

Charakteristickým rysem mikrosatelitů je jejich variabilita v délce a uspořádání sekvencí mikrosatelitového lokusu, vedoucí k rozdílnému počtu kopií základního motivu. Tyto změny pravděpodobně nejčastěji vznikají „klouzáním“ DNA polymerázy během replikace (tzv. „replication slippage“) či inzercí/delecí delších částí uvnitř mikrosatelitového lokusu (Schlötterer, 2000; Zima *et al.*, 2004).

Mezi výhody mikrosatelitových markerů patří jejich kodominantní charakter (tzn., jsme schopni rozlišit heterozygotní jedince od homozygotních), vysoká reprodukovatelnost a variabilita. Výhodou je i poměrně jednoduchý způsob laboratorního provedení jejich analýz pomocí polymerázové řetězové reakce („polymerase chain reaction“, PCR), následné separace a detekce vzniklých PCR produktů na polyakrylamidových gelech nebo kapilárním sekvenátoru (Christiakov *et al.*, 2006; Weising *et al.*, 2005).

Mikrosatelitové markery byly vyvinuty pro různé druhy organismů, ale pro překvapivě málo zástupců houbových organismů (Zane *et al.*, 2002). Důvodů se uvádí několik, především relativně malý počet populačních genetiků, kteří se této skupině eukaryot věnují, a dále preference markerů využívajících anonymní primery, jako např. RAPD, AFLP a ISSR markery (Dutech *et al.*, 2007). Výhodou těchto metod je relativně rychlý zisk informací o genetické struktuře populací. Pomocí relativně velkého počtu markerů jsou schopny od sebe odlišit jedince uvnitř populací, což vyvažuje jejich hlavní nevýhodu, tj. dominantní charakter, založený na hodnocení přítomnosti nebo nepřítomnosti daného markeru (Weising *et al.*, 2005). Schopnost neselektivně amplifikovat prakticky jakoukoliv DNA ale představuje zásadní problém při studiu fytopatogenních hub a houbám podobných organismů. Naopak selektivita mikrosatelitových primerů představuje zásadní výhodu pro jejich studium. SSR primery jsou vyvíjeny specificky pro konkrétní organismus a při PCR reakci preferenčně nasedají pouze na DNA organismu, pro který byly vyvinuty (Dutech *et al.*, 2007). Pravděpodobnost nasedání na DNA jiného organismu, např. hostitele, se snižuje s fylogenetickou vzdáleností mezi organismy. Při studiu obligátních biotrofních parazitů je problematické izolovat DNA bez kontaminace, např. DNA hostitelského organismu nebo DNA hyperparazitů. Použití výše zmíněných metod, využívajících při PCR reakci univerzální primery, pak může vést k nesprávným výsledkům a závěrům (Dutech *et al.*, 2007; Kiss, 1998).

Největším problémem použití SSR markerů je vývoj specifických funkčních markerů pro každý nově studovaný organismus. Mezi další nevýhody SSR markerů patří i detekce komplexního patternu na gelu, alelová homoplazie či vznik tzv. „stutter“ bandů. Jako problematická se jeví i přítomnost tzv. nulových alel, které se nacházejí v různé míře u všech druhů organismů a způsobují zkreslení výsledků PCR amplifikace (Carlsson, 2008). Za nulovou alelu je považována taková alela, u které nedochází k PCR amplifikaci. Výskyt nulových alel je způsoben inzercí/delecí nebo bodovými mutacemi v sekvenci templátové DNA, na kterou nasedá primer. Nukleotidové změny v těchto sekvencích neumožňují komplementární navázání primeru, čímž je narušena PCR amplifikace daného lokusu (Dakin *et al.*, 2004). Výskyt nulových alel může být způsoben také preferenční amplifikací alel o kratší délce (Chapuis *et al.*, 2007), které nejsou detekovány. Tím dochází ke zkreslení výsledků, protože takové vzorky mohou být vyhodnoceny jako jedinci s homozygotní konstitucí alel, a tím může dojít ke snížení celkové genetické diverzity populace (Carlsson, 2008). Dalším problémem je vznik „stutter“ bandů neboli „stínových bandů“, které se

vyskytují v blízkosti hlavního PCR produktu/bandu. Důvodem je sklouznutí DNA polymerázy během amplifikace nového řetězce. Stutter bandy dosahují většinou kratší délky než hlavní produkt (Daniels *et al.*, 1998; Goldstein *et Schlötter*, 2003). Při elektroforetické separaci PCR produktů v gelu je možné také detekovat alelovou homoplazii, která spočívá v tvorbě alel o stejné velikosti (počet bp), ale odlišného místa původu v genomu (Goldstein *et Schlötter*, 2003).

Jak bylo uvedeno výše, u hub a oomycet bylo zatím publikováno relativně málo populačně genetických studií využívající polymorfní mikrosatelitové markery. Důvodem je jednak fakt, že nejvíce studovanou skupinou hub jsou houby patogenní, jejichž populace jsou obecně málo variabilní z důvodu častého efektu hrdla láhve („bottle-neck effect“). Ten je způsobený introdukcí patogena (Engelbrecht *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2004) a/nebo hostitele (Tobler *et al.*, 2003; Choi *et Thines*, 2015) na nové území, popřípadě souvisí s životním cyklem (převaha asexuálního rozmnožování či kolaps populací na konci vegetační sezóny, tzv. „selective sweeps“, při kterém dochází k rychlému šíření genotypů nesoucích nové faktory virulence) (Dutech *et al.*, 2007).

Dalším důvodem nižší variability detekované SSR markery u hub a houbám podobných organismů jsou některé vlastnosti jejich genomu, především menší velikost ve srovnání s ostatními eukaryoty. Genom oomycet dosahuje velikost např. 32,7 Mb u *Albugo laibachii* (Kemen *et al.*, 2011), 75,3 Mb u *Plasmopara halstedii* (Sharma *et al.*, 2015) nebo 228,5 Mb u *Phytophthora infestans* (Haas *et al.*, 2009). S velikostí genomu souvisí i zastoupení repetitivních sekvencí. Wang *et al.* (2014) uvádí poměrně vysokou hustotu genů, přičemž u hub se většina repetitivních sekvencí nachází v nekódujících nebo v intergenetických oblastech DNA. Mikrosatelity jsou u této skupiny organismů zastoupeny v menší míře, převažují u nich jiné repetitivní motivy s nižším počtem kopií základní repetice než u vyšších organismů (Dutech *et al.*, 2007). Ve studii Lim *et al.* (2004) bylo při analýze 14 genomů hub zjištěno, že 90 % SSR lokusů má nízký počet repetice (tj. pod 8) a že většinu z nich představují mononukleotidové repetice. Tyto motivy ale nejsou zpravidla v populačně genetických studiích užívány. Poměrně malé zastoupení SSR v genomu, krátká délka repetice, menší podíl využitelných motivů a celkově malé genomy tedy představují hlavní důvody pro nalezení využitelných SSR markerů pro populačně genetické studie u hub (Dutech *et al.*, 2007).

4.1.1. Rozdělení mikrosatelitů

Kromě délky základní jednotky repeticce lze mikrosatelitové lokusy rozdělit také podle jejich struktury a to na dokonalé, nedokonalé, přerušované a složené (Oliveira *et al.*, 2006; Weising *et al.*, 2005).

A) Dokonalé mikrosatelity se vyznačují svou celistvou repeticí, tzn., že jejich struktura není přerušena. Jsou složeny pouze z jednoho opakujícího se motivu [např. TATATATATATATA = (TA)₈].

B) Nedokonalé mikrosatelity obsahují většinou jednu vloženou bázi, která naruší po sobě opakující se jednotky repeticce [např. TATATATACTATATA = (TA)₄C(TA)₄].

C) Typické pro přerušované mikrosatelity je vložení krátké sekvence, která nebyla součástí původního opakujícího se motivu. Přerušované mikrosatelity mohou mít například toto uspořádání TATATACGTGTATATATATA = (TA)₃CTG(TA)₅.

D) Složené mikrosatelity vznikají složením dvou odlišných typů repetitivních jednotek, které na sebe těsně navazují [např. TATATATATAGTGTGTGTGT = (TA)₅(GT)₅].

Mohou se také vyskytovat různé varianty mikrosatelitů, které kombinují více typů zároveň, např. složený mikrosatelit může být dokonalý i nedokonalý, jeho součástí může být přerušující sekvence, apod. (Oliveira *et al.*, 2006; Weising *et al.*, 2005).

4.1.2. Využití mikrosatelitových markerů

Mikrosatelity patří mezi nejvíce využívané molekulární markery, které se vyznačují širokým spektrem aplikací v různých typech genetických studií. Hlavním důvodem jejich hojného používání je vysoká variabilita, dědičnost podle Mendelových zákonů a jednoduchá detekce s využitím PCR (Oliveira *et al.*, 2006). Mikrosatelity našly své uplatnění také v genomice, kde se používají při tvorbě genetických rekombinačních map, v asociačních studiích zaměřených na hledání genů spojených s chorobami nebo při pozičním klonování s cílem mapování kvantitativních znaků. Mikrosatelitové markery se v populační genetice využívají pro studium genetické diverzity, popisu struktury a dynamiky populací a ke studiu genového toku. Velmi často jsou také aplikovány pro zjišťování příbuznosti mezi jedinci v populaci, významné jsou při identifikaci jedinců, při určování paternity, analýze

rozmnožovacích systémech, např. rozlišení sexuálního a asexuálního rozmnožování u rostlin a hub. Mohou být použity pro identifikaci vzájemných fylogenetických vztahů či při forenzních analýzách (Ellegren, 2004; Luo *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2006; Zima *et al.*, 2004).

Mikrosatelitové markery byly použity pro studium genetické diverzity následujících fytopatogenních hub: *Anisogramma anomala* (Cai *et al.*, 2013), *Ascochyta rabiei* (Bayraktar *et al.*, 2007), *Fusarium solani* a *F. virguliforme* (Wang *et al.*, 2016), *Macrophomina phaseolina* (Jana *et al.*, 2005), *Sclerotinia subarctica* a *S. sclerotiorum* (Winton *et al.*, 2007). Z fytopatogenních oomycet byly dosud pomocí mikrosatelitů analyzovány druhy: *Peronosclerospora maydis* (Lukman *et al.*, 2013), *Peronospora tabacina* (Trigiano *et al.*, 2012), *Phytophthora alni* (Ioos *et al.*, 2007), *P. andina*, *P. capsici*, *P. cinnamoni*, *P. cryptogea* (del Castillo-Múnera *et al.*, 2013), *P. infestans* (Knapová *et al.*, 2002; Lees *et al.*, 2006), *P. nicotianae* (Biasi *et al.*, 2015), *P. sojae* (Stewart *et al.*, 2011), *P. ramorum* (Prospero *et al.*, 2004), *Plasmopara viticola* (Rouxel *et al.*, 2012) a *Pseudoperonospora cubensis* (Kanetis *et al.*, 2009).

Využití mikrosatelitových markerů v populační genetice obligátně biotrofních oomycet je v současnosti ve své počáteční fázi. Pro *P. halstedii* byla v loňském roce publikována sada mikrosatelitových markerů (Sharma *et al.*, 2015), predikovaných jako součást celkové analýzy genomu *P. halstedii* bez ověření funkčnosti a využitelnosti markerů pro studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*. Tyto markery jsou předmětem analýz provedených v experimentální části této diplomové práce.

Při finalizaci této diplomové práce byla zveřejněna práce Rivera *et al.* (2016) zabývající se využitím polymorfních mikrosatelitových markerů navržených na genomu *P. halstedii* osekvenovaném jinou vědeckou skupinou než u SSR markerů Sharma *et al.* (2015). Autoři navrhli celkem 38 primerových párů, které testovali na sadě 14 vzorků *P. halstedii* pocházející ze dvou různých hostitelských rostlin, *Helianthus annuus* a *Rudbeckia fulgida* cv. Goldsturm (Rivera *et al.*, 2016).

4.1.3. Způsoby vývoje mikrosatelitových markerů

Pro využití a studium mikrosatelitových markerů je důležitá znalost sekvence komplementárního páru primerů, které specificky nasedají do oblastí ohraničujících mikrosatelitový lokus, který je následně amplifikován pomocí PCR reakce (Dawson *et al.*, 2010). U těch druhů organismů, u kterých stále nejsou známy primery pro mikrosatelitové repetice, se provádí designování *de novo*. Principem je izolace a naštěpení DNA pomocí restričních endonukleáz nebo mechanická fragmentace ultrazvukem. V dalším kroku jsou fragmenty přeneseny do vektoru nebo ligovány s příslušným adaptorem. Následně jsou plazmidové vektory s vloženou sekvencí transformovány do bakterií, jejichž dělením dochází ke vzniku rekombinantních klonů. Dalším způsobem může být hybridizace sondy s naštěpenou DNA umístěnou na nylonové membráně. Fragmenty o specifické délce, jejichž součástí jsou mikrosatelitové lokusy, jsou poté klonovány do bakteriálních buněk. Mikrosatelitové lokusy jsou detekovány sekvenováním, podle míst ohraničující repetitivní sekvence jsou navrženy primery (Zane *et al.*, 2002), ověřuje se jejich funkčnost a provádí selekce polymorfních markerů. Tento způsob vývoje nových SSR markerů je poměrně složitý, časově náročný a je spojen s velkými finančními náklady. Proto se na *de novo* izolaci mikrosatelitů zaměřují spíše specializované výzkumné pracoviště nebo komerční laboratoře (Dawson *et al.*, 2010). Dalším způsobem získu mikrosatelitových markerů je tzv. cross-species amplifikace, kdy se provádí testování PCR amplifikace mezi blízkými příbuznými druhy organismů (Primmer *et al.*, 2005). Její úspěšnost souvisí s evoluční příbuzností studovaných druhů, přičemž rostoucí fylogenetická vzdálenost mezi jednotlivými druhy snižuje úspěšnost PCR amplifikace polymorfních mikrosatelitových lokusů (Primmer *et al.*, 1996).

Dalším způsobem, kterým lze navrhovat mikrosatelitové markery jsou sekvenační metody nové generace – NGS („next-generation sequencing“), které se v současnosti poměrně rychle vyvíjí. Nízké náklady na sekvenování, získání velkého množství dat a možnost identifikace nových mikrosatelitových markerů, jsou hlavními výhodami NGS. Do nedávné doby nejčastěji používanou metodou bylo 454 sekvenování fy. Roche, které je postupně nahrazováno sekvenačními platformami Illumina fy. ABI. Její výhodou v porovnání se 454 sekvenováním je vyšší přesnost a také kapacita, nevýhodou je však kratší průměrná délka čtení (momentálně se uvádí schopnost osekvenovat úseky o délce 250 bp) (Cai *et al.* 2013). V obou případech dochází k paralelnímu generování velkého množství krátkých sekvencí,

kteře jsou následně počítačově zpracovávány. Dochází k překryvu těchto krátkých dílčích sekvencí a jejich skládání do větších úseků, tzv. „scaffoldů“ nebo „kontigů“ (Sharma *et al.*, 2015). Výsledný genom je při publikování deponován ve veřejně přístupných nukleotidových databázích (např. „National center for biotechnology information“, NCBI). Pro identifikaci repetitivních lokusů jsou užívány různé počítačové programy, např. Phobos (Mayer, 2006-2010), Msatcommander (Faircloth, 2008), které lokalizují pozici SSR lokusu v genomu (tj. v konkrétním scaffoldu). Pro nalezené kandidátní lokusy jsou poté navrhovány páry primerů, zpravidla pomocí softwaru Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012). Specifičnost navrhovaných primerů se poté ověřuje experimentálně nebo *in silico*, tj. počítačovou simulací polymerázové řetězové reakce (Luo *et al.*, 2015).

5. Materiál a metody

5.1. Stanovení ras u izolátů *Plasmopara halstedii* z ČR

5.1.1. Původ izolátů *P. halstedii*

Vzorky 16 izolátů studované v této diplomové práci pocházely z roku 2014 z lokalit České republiky s nejčastějším výskytem *P. halstedii*. Izoláty 1401-1411 (lokalita Podivín) a 1412-1416 (lokalita Olomouc-Holice) byly přemnoženy z původního inokula uchovaného v -80 °C, pro experimentální práci pak byly podle potřeby dále přemnožovány a uskladněny k dalšímu testování v mrazáku při -20 °C.

5.1.2. Rostlinný materiál

Pro přemnožení izolátů *P. halstedii* byly použity náchylné genotypy slunečnice roční, *Helianthus annuus* cv. Giganteus a cv. Peredovik. Oba tyto kultivary postrádají geny rezistence vůči *P. halstedii*. Diferenciační soubor 15 genotypů slunečnice používaný pro určení ras *P. halstedii* je podrobně uveden v Tabulce č. 4. Osivo jednotlivých linií bylo přepěstováno v létě v roce 2015 pracovníky Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci. Nažky byly přečištěny a uloženy do mrazáku, kde byly v teplotě -20 °C uchovány po dobu nejméně dvou měsíců. Následně byla část osiva používaná na testy přenesena do lednice a skladována při teplotě 4 °C.

5.1.3. Příprava rostlinného materiálu

Na základě postupu, který původně sestavil Gulya (1991) a následně ve své práci poupravil Stojaspal (2009), byly v experimentálních podmínkách pěstovány rostliny určené pro udržování a množení izolátů *P. halstedii*.

Pro dezinfekci semen slunečnice cv. Peredovik byl použit 10% roztok Sava společně s 1-2 kapkami detergentu (např. jar na nádobí) pro zkvalitnění jejich smáčivosti. Semena byla povrchově dezinfikována po dobu 15 min a následně proplachována proudem čisté vody 1-5 min, dokud nebyly odstraněny veškeré zbytky dezinfekčního roztoku. Ošetřená semena slunečnice byla rozložena na dno Petriho misky s filtračním papírem, převrstvena

destilovanou vodou a dále kultivována bez přístupu světla při pokojové teplotě po dobu 3 h. Poté byla nežádoucí voda vylita a semena byla uspořádána na misce tak, aby nebyla vzájemně v kontaktu. Klíčení osiva probíhalo v uzavřené Petriho misce ve tmě při pokojové teplotě cca 2-4 dny.

Pro inokulaci patogenem byly vybrány semenáčky, které nevykazovaly známky kontaminace a nebyly deformované ani atypicky zabarvené. Zdravé semenáčky s cca 1,5 cm dlouhým kořenem s dostatečně vyvinutým vlášením byly umístěny do plastových květináčů s navlhčeným perlitem (Agroperlit, Nový Jičín, Česká republika) a kultivovány ve fytotronu či skleníku při teplotě 20/15 °C (den/noc) s fotoperiodou 12/12 h po dobu jednoho týdne.

5.1.4. Subkultivace izolátů *P. halstedii*

Inokulum, které sloužilo jako zdroj zoosporangií k naočkování naklíčených semen, bylo připravováno podle Gulyi (1996). Přípravu inokula lze provést dvěma způsoby: 1/ použití čerstvých zoosporangií, které byly získány z infikovaných semenáčků slunečnice cv. Peredovik, 2/ použití zmražených zoosporangií, které byly uchovávány na povrchu děložních lístků slunečnice cv. Peredovik, zabaleny v alobalu a uskladněny v -20 °C.

Několik infekčních děložních lístků, nesoucích na svém povrchu zoosporangia *P. halstedii*, byly přeneseny do plastové zkumavky. Na základně intenzity sporulace a množství rostlinného materiálu bylo přidáno 1-5 ml destilované vody a pro vyplavení a uvolnění zoosporangií byl použit vortex (2-5x po dobu 3 s, při 1500 rpm). Pletiva byla odstraněna a získaná suspenze byla zkontrolována pod mikroskopem a upravena tak, aby koncentrace viabilních (životaschopných) zoosporangií byla 10000 v 1 ml.

Naklíčené semenáčky zbavené osemení byly přeneseny do čerstvé suspenze a kultivovány ve tmě po dobu 3 h při teplotě 19 °C (přítomnost životaschopných zoosporangií byla průběžně mikroskopicky ověřována). Celé inokulované semenáčky (metoda WSI, Gulya *et al.*, 1991) byly přeneseny do navlhčeného perlitu a následně kultivovány při teplotě 19/18 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Zhruba 11. den po inokulaci byly rostliny v každém květináči ovlhčeny destilovanou vodou a zvláště zabaleny do mikrotenového sáčku, aby byla zajištěna 100% vlhkost potřebná k růstu sporangioforů a zoosporangií. Proces sporulace trval 16-24 h (nejlépe do druhého dne) bez přístupu světla při teplotě 18-19 °C. Bílý povlak zoosporangií, který se následně objevil na povrchu děložních lístků, byl použit k: 1/ přípravě

čerstvého inokula pro další experimenty, 2/ k opětovnému přemnožení izolátu *P. halstedii*, 3/ zamražen a uchován pro další práci v -20 °C.

5.1.5. Identifikace ras *P. halstedii*

Pro patotesty, tj. studium fenotypu reakce souboru hostitelských rostlin na infekci daným izolátem, byl vybrán rozšířený diferenciacní soubor 15 genotypů slunečnice: GB, RHA-265, RHA-274, PMI-3, PM-17, 803-1, HAR-4, QHP-2, HA-335, Y7Q, PSC8, XA, PSS2RM, RHA-419, VAQ. Jako kontrolní náchylné linie byly použity kultivary Giganteus a Peredovik.

Semenáčky slunečnice byly připraveny stejným způsobem, jak bylo uvedeno v kapitole 5.1.3. Naklíčené semenáčky zbavené osemení byly vysázeny po 10 v jedné řadě do vlhkého perlitu tak, aby děložní listy vyčnívaly a kořínek směřoval dolů. Na každý semenáček zvlášť bylo pipetováno adekvátní množství čerstvého inokula, jehož koncentrace byla vypočítána pomocí Bürkerovy počítací komůrky podle uvedeného vzorce:

$$X = \frac{1000}{0,04} \cdot Y$$

kde X = množství zoosporangií v 1 ml, Y = průměrný počet zoosporangií v 10 počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky. Objem použité suspenze obsahující při dané koncentraci cca 10000 viabilních zoosporangií byl stanoven na základě vzorce:

$$Z = \frac{10000}{X} \cdot 1000$$

kde Z = množství suspenze obsahující 10000 životaschopných zoosporangií, X = počet zoosporangií v 1 ml. Objem suspenze vhodný pro inokulaci jednoho semenáčku by se měl pohybovat v rozmezí 15-30 µl. Jestliže byl objem inokula mimo stanovenou hranici, bylo potřeba inokulum koncentrovat doplněním dalších zoosporangií nebo jej naředit destilovanou vodou a stejným principem opět přepočítat koncentraci zoosporangií.

Každý semenáček zvlášť byl infikován vypočítaným objemem inokula (metodou „drench seedling inoculation“, DSI). Aby suspenze zůstala homogenní, bylo potřeba ji neustále promíchávat, protože zoosporangia rychle sedimentují na dně. V dalším kroku byla

na inokulované semenáčky nanese tenká vrstva zvlhčeného perlitu. Rostliny byly prvních 12-16 h umístěny ve tmě a později kultivovány při teplotě 21/17 °C, 12/12 h (den/noc) s pravidelnou zálivkou. Třináctý den růstu byly navozeny příznivé podmínky pro sporulaci *P. halstedii*, tzn. 100% vzdušná vlhkost, tma, 17 °C. Hodnocení patotestu a určení rasy izolátů, bylo provedeno 14. a 21. den po inokulaci (Obrázek č. 3).

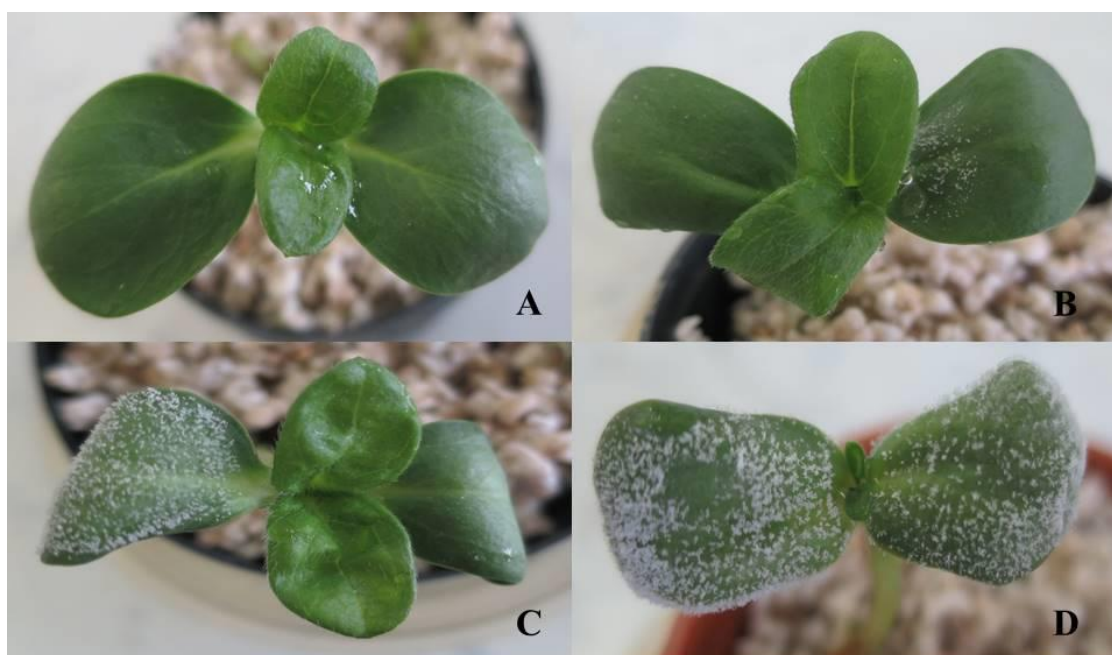


Obrázek č. 3: Táč s rozšířeným diferenačním souborem 15 genotypů slunečnic po 14. denní kultivaci a 24 h zatmění při 100% vzdušné vlhkosti.

Podle semikvantitativní stupnice byla u každé rostliny zvolena intenzita napadení (Obrázek č. 4). Na základě toho, kolik procent plochy rostlinného pletiva jeví známky sporulace, byl rostlině přiřazen jeden ze čtyř stupňů napadení, tj. 0, 1, 2 nebo 3 (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Semikvantitativní stupnice intenzity napadení slunečnice *P. halstedii*.

Stupeň napadení	Míra sporulace na povrchu děložních lístků v %
0	0 %
1	do 25 %
2	nad 25 % a do 50 %
3	nad 50 %



Obrázek č. 4: Semikvantitativní stupnice intenzity napadení slunečnice *P. halstedii*.

A – pletivo bez sporulace (stupeň napadení 0), B – sporulace do 25 % (stupeň napadení 1), C – sporulace do 50 % (stupeň napadení 2), D – sporulace nad 50 % (stupeň napadení 3).

Na základě vyjádřené intenzity sporulace a stupně napadení bylo možné rozlišit, které diferenciační linie jsou rezistentní a které naopak náchylné. Aby mohl být patotest označen za průkazný, bylo nutné, aby byla kontrolní linie *Helianthus annuus* cv. Giganteus/cv. Peredovik infikována *P. halstedii* minimálně ze 70 %. Jestliže byla míra sporulace větší nebo rovna 50 %, pak byla tato diferenciační linie považována za náchylnou, jestliže byly známky napadení menší než 30 %, byla linie vyhodnocena jako rezistentní. Pokud se intenzita napadení vyskytovala mezi 30 – 50 %, byly takto infekční rostliny využity jako hlavní zdroj zoosporangií pro nové testování ras jednotlivých izolátů. Když byl izolát dále přemnožen a míra sporulace se u dané diferenciační linie zvýšila, byl původní izolát označen za směs několika ras, ve které se testovaná rasa nachází v nižší frekvenci. V závěru experimentu byla na základě pravidel kódovacího systému u každého izolátu *P. halstedii* identifikována jeho rasa (Tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Diferenciační soubor genotypů slunečnice a příklad určení ras *P. halstedii*.

Číslo rostliny	Stupeň napadení															
	2	1	3	-	1	-	-	0	0	-	0	1	0	0	0	3
1	2	1	3	-	1	-	-	0	0	-	0	1	0	0	0	3
2	3	0	3	-	0	-	1	0	0	-	3	0	0	0	0	3
3	3	3	0	3	1	0	2	0	0	-	3	0	0	0	0	3
4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3
5	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	3
6	3	3	3	3	1	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
7	3	2	3	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
8	3	3	3	3	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	3
9	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3
10	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	3
Diferenciační linie	GB	RHA-265	RHA-274	PMI-3	PM-17	803-1	HAR-4	QHP-2	HA-335	Y7Q	PSC8	XA	PSS2RM	VAQ	RHA-419	GIGA
Reakce	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	s	s	R	R	R	R
Přidělená hodnota	1	2	4	1	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	/
Součet hodnot	7			1			0			6			0			/

R = „resistant“ = rezistentní reakce

s = „susceptible“ = náchylná reakce

5.2. Studium mikrosatelitových markerů u *P. halstedii*

5.2.1. Materiál pro optimalizaci a selekci mikrosatelitových markerů *P. halstedii*

V této části práce byla testována funkčnost mikrosatelitových markerů navržených pro *P. halstedii* ve studii Sharma *et al.* (2015) a provedení výběru polymorfních mikrosatelitových markerů využitelných pro studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*. Výchozím materiálem pro extrakci genomické DNA *P. halstedii* byly použity izoláty patogena odebrané z různých lokalit z České republiky z let 2013-15 a z Maďarska z roku 2015. Postup inokulace a kultivace patogena je identický s popisem uvedeným v kapitole 5.1.4. Pro odběr materiálu na extrakci DNA byly použity semenáčky slunečnice po 14. dnech kultivace. Děložní lístky slunečnice se sporulací daného izolátu *P. halstedii* byly opláchnuty destilovanou vodou a lehce vortexovány v Eppendorf zkumavkách. Uvolněná zoosporangia byla po sedimentaci zahuštěna odpipetováním supernatantu. Tímto způsobem byl připraven výchozí materiál pro izolaci genomické DNA ze zoosporangií 39 izolátů *P. halstedii* různého geografického původu (viz Tabulka č. 9 v části 6.2.).

5.2.2. Izolace DNA

Izolace DNA *P. halstedii* byla provedena metodou CTAB (Doyle *et* Doyle, 1987) upravenou pro materiálové a technické vybavení Laboratoře molekulárních markerů Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci (dále LMM).

1. Rozmrazené zoosporangia v Eppendorf zkumavkách byla pomocí pipety přenesena do speciálních zkumavek pro homogenizaci. Následovala mechanická homogenizace (1 min) a poté krátká centrifugace.
2. K získanému homogenizátu bylo přidáno 700 μ l extrakčního pufru CTAB s merkaptoethanolem, který byl do pufru přidán těsně před jeho použitím. Složení extrakčního pufru je uvedeno v kapitole 10.4.
3. Následovala opět homogenizace (1 min) a krátká centrifugace.
4. Všechny vzorky byly přemístěny na 1,5 h do inkubátoru vyhřátého na 68 °C.

5. Poté bylo přidáno 700 μl roztoku chloroformu a isoamylalkoholu (24:1). Suspenze byla důkladně promíchána, víčko bylo jemně povoleno pro uvolnění vzniklého plynu, zátky uzavřeno a zkumavka byla ponechána stát při pokojové teplotě po dobu 5 min.
6. Suspenze byla centrifugována po dobu 12 min při 11000 rpm (nechlazená centrifuga).
7. Vzniklý supernatant byl pečlivě a opatrně odpipetován do nové 1,5 ml Eppendorf zkumavky, na kterou bylo předem napsáno datum extrakce a označení vzorku. Malý objem čirého supernatantu bylo možné ponechat nad tmavším peletem, aby nedošlo ke smísení obou fází.
8. Ke vzorkům bylo přidáno 60 μl vychlazeného octanu sodného ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; pH 5,2; $4 \text{ }^\circ\text{C}$) a poté připipetováno 500 μl vychlazeného isopropanolu ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Suspenze byla 1-2x překlopena a ponechána stát 20-30 min v mrazáku při teplotě $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
9. Po této době byly vzorky centrifugovány (12 min, 11000 rpm, nechlazená centrifuga). Vzniklý supernatant byl opatrně slit do předem připravené kádinky umístěné v digestoři tak, aby na dně zkumavky zůstalo přichycené malé množství mléčně bílého peletu DNA. Zbytek roztoku byl odstraněn opatrným překlopením zkumavky na filtrační papír.
10. K peletu, obsahující DNA, bylo přidáno 500 μl vychlazeného 70% ethanolu, suspenze byla protřepána a ponechána stát při pokojové teplotě po dobu 5 min.
11. Následovala centrifugace (3 min, 11000 rpm, nechlazená centrifuga). Poté byl supernatant slit, pomocí pipety byl odsán roztok kolem peletu a zkumavka s DNA byla ponechána volně schnout, přičemž bylo možné sledovat, jak pelet zprůhlednil.
12. Zkumavka byla naplněna 60 μl dH_2O , ve které se DNA dokonale rozpustila. Následně bylo přidáno 10 μl RNasy A ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Získaný roztok byl inkubován po dobu 30 min v termobloku s třepačkou ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 600 rpm). Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla stanovena pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA); kvalita a integrita vyizolované DNA byla ověřena pomocí 1% agarózového TBE gelu. DNA byla naředěna na koncentraci $7 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a před dalšími analýzami byla uchovávána v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C .

5.2.3. PCR amplifikace mikrosatelitových markerů

Mikrosatelitové markery testované v této diplomové práci byly navrženy a publikovány jako jeden z výstupů analýzy genomu *P. halstedii* ve studii Sharma *et al.* (2015). Pro ověření funkčnosti navržených primerů jsem využila metodu gradientové PCR, při které jsem optimalizovala protokol používaný pro analýzu SSR markerů v LMM Katedry botaniky PřF UP v Olomouci. Podstatou optimalizace bylo stanovení tzv. annealingové teploty, při které dochází k optimálnímu nasedání primerů na templátovou DNA v průběhu PCR reakce. Nutným laboratorním vybavením je termocyklér, který dokáže ve druhé fázi PCR reakce vytvořit na bloku gradient teplot (tzv. gradientový termocyklér), přičemž na levé straně termobloku je teplota nejnižší, na opačné straně teplota nejvyšší. V mém případě jsem testovala rozsah teplot 50-68°C. Na standardním bloku je rozmístěno 96 jamek v osmi řadách po 12ti jamkách. Při jedné analýze (PCR reakci) lze tedy pro nastavený rozsah teplot testovat zároveň maximálně osm různých markerů. Postupovala jsem tak, že jsem pro daný marker připravila PCR mix (viz Tabulka č. 6), do kterého jsem přidala adekvátní objem DNA z izolátu 1410 a po promíchání rozpipetovala do PCR desky do jedné horizontální řady.

Tabulka č. 5.: Mikrosatelitové markery testované na DNA *P. halstedii* (upraveno podle Sharma *et al.*, 2015).

Tabulka obsahuje tyto informace: označení primeru, sekvenci primeru F („forward“) a R („reverse“) ve směru 5' – 3', teplotu tání primeru (T_m , °C), očekávanou velikost PCR produktů (bp) a jednotku repetice s počtem kopií.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T_m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repetice
Mitochondriální				
PHmit-01-F	ACATTGTCCTATTTTAACACCGC	57.6	213	(AT) ⁶
PHmit-01-R	AGGTTCAAATCCTTTTCTCCGA	58.2		
PHmit-02-F	TGAGAGTTGTATGCATGAAAGTG	57.1	141	(AT) ⁷
PHmit-02-R	CCGTGAAAAGGCAATGTCCT	58.7		
PHmit-03-F	ACTGACCTTGACGTCCCAC	60.0	245	(AC) ⁷
PHmit-03-R	GTGCGAGACCGATAGCAAAC	60.0		
Jaderné				
PH-001-F	TCATCCAAAGCCACCTCCAT	59.0	186	(AGTG) ¹⁴
PH-001-R	TCACTCGCTCATTTTCATCGA	57.0		
PH-002-F	TCCTCTCCTTCTGTGGCAAG	59.0	243	(CTT) ¹⁰
PH-002-R	TTGCTATGACCGACCCATT	59.0		
PH-003-F	CGAAGTAAGCACATGTCGTTT	57.2	212	(AT) ¹⁴
PH-003-R	GTCAGTGACCTAAAGTACGCT	57.4		
PH-004-F	CCGCTATTTCCAAAGGCTGT	58.5	207	(AT) ¹³
PH-004-R	ACAGTTCATAGCCAGGCGT	59.0		
PH-005-F	CTCTGACCGAATTGCTTCCG	59.0	162	(AGAGA) ¹¹
PH-005-R	AATGGCCTAAGGAGTCGAGG	58.8		
PH-006-F	TGATACCTCGGCTACTCTCG	58.7	235	(CTAC) ¹⁴
PH-006-R	GACCAAGTTGCAACCGATGT	59.0		
PH-007-F	CGAAGAGATGGGTGGGTCAA	59.3	201	(GAGT) ¹²
PH-007-R	CGCCGGAACCTAGACAGTAT	58.9		
PH-008-F	CTTCAAGCCGATCCCTGTG	58.9	159	(AGT) ⁴
PH-008-R	TATAGATCGACGCCAAGCCG	59.7		
PH-009-F	ACAGTAGAGCGACACCAGAC	59.1	201	(AG) ⁶
PH-009-R	CCGCTGAACAACAAAGTCGA	59.0		
PH-010-F	TAGTAAATGGAGCTGGCCCG	59.5	211	(GAGAA) ¹¹
PH-010-R	GCGGTCTACTGGGGAAATGA	59.4		
PH-011-F	CTTAAGAAAGCCACGTCGACT	58.3	367	(AT) ⁹
PH-011-R	AGTACCTCTGGAAGCGTCAA	58.3		
PH-012-F	GCACCGTTTCACATTATCAGG	57.5	220	(CAGTGT) ⁴
PH-012-R	GTCATCCACCCATGTTGCC	59.3		
PH-013-F	GCCACGTCGACTTATAATAGGTC	58.7	250	(AT) ⁷
PH-013-R	AGCTGGAAGTACACCTGCC	60.1		

Tabulka č. 5: Pokračování 1.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T _m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repetice
PH-014-F	ACCCCGTTTATACCGATGAGA	58.3	251	(TA) ⁸
PH-014-R	TGTGTGAATCTCAACCCGGT	59.2		
PH-015-F	CCTTGAACATTTGATACAGCTGT	57.3	246	(AGTT) ¹²
PH-015-R	CATGCCCATCTGATGTGACC	58.6		
PH-016-F	CGACGATCTTCAAGGTGCTG	59.0	158	(AT) ⁹
PH-016-R	CTTCAGCGCCTCAGAGTTTC	58.9		
PH-017-F	TTCGTGAAGGAGGAAAAGCC	58.1	228	(TTCTT) ¹²
PH-017-R	CGACTACTTTACGCACGGTG	59.0		
PH-018-F	CCGCATAGTTGACAGCTAGC	58.8	235	(TTAGC) ¹¹
PH-018-R	CGAGTGTCTTGCCGCTAAA	58.8		
PH-019-F	CCTGTGACCCGAGTGATCTT	59.1	225	(TCTCT) ¹¹
PH-019-R	CACTTGGCAGCACTTGAGT	58.4		
PH-020-F	TCAAGGCTAATCGACTCTTTGC	58.7	198	(TTTA) ⁶
PH-020-R	ACGAAATGTGCATGGTGTGA	58.4		
PH-021-F	TGTGACACCTAGTTCCTTGATCT	58.8	234	(TCTTC) ¹¹
PH-021-R	TGTCTTATGCTTAGCTTCCTCG	57.9		
PH-022-F	CTCCAAATGCACTTACGCCT	58.5	249	(CTCTT) ¹¹
PH-022-R	TCGAGTTGACTGCAGAAGGT	58.9		
PH-023-F	TCCCGCAAAACACAATCTCT	57.7	202	(TTCTC) ⁹
PH-023-R	GAGCCCACTGACAATGCAAA	59.0		
PH-024-F	TTCGTGAAGGAGGAAAAGCC	58.1	228	(CTTCT) ¹¹
PH-024-R	CGACTACTTTACGCACGGTG	59.0		
PH-025-F	TTACCCATAGTCGCGGAGAG	58.6	227	(CTTCT) ¹¹
PH-025-R	CCACTTACAGGTATGGCGGA	59.1		
PH-026-F	TAGTCTGGTACCGATCGTGC	58.9	250	(TCTTC) ¹³
PH-026-R	GACTCATTGGCGGTGGTAC	58.9		
PH-027-F	TCCATGTGCATCCGTCTTCT	59.1	236	(AT) ¹³
PH-027-R	CACATTAGCCGGCTTCTCAC	59.0		
PH-028-F	TGAAGATACGAAGAGATGAGTGG	57.4	250	(TGAG) ¹⁴
PH-028-R	TGCCTTGGACATCTCTCACT	59.0		
PH-029-F	CAGACGGTTGGGTAGGGTTC	60.0	224	(GAGAA) ¹²
PH-029-R	AGAACGGCATTGTCTCTTCTT	57.6		
PH-030-F	GTGCTAGTCTGTTTGGGTGC	59.1	231	(TCAC) ¹⁴
PH-030-R	CACCTTTCAACTGAGCCACA	58.3		
PH-031-F	TTTAAGTCCTGCATGCCCTG	58.1	183	(GAGAA) ¹²
PH-031-R	AGTGACCTAACTTACGCTTCCT	58.8		
PH-032-F	CGGAGAGCGTTGACTATTAAGC	59.2	250	(ATAC) ¹⁴
PH-032-R	GCTCGCAGGGGATAACTAGA	58.6		
PH-033-F	TGGTGGGGTGTGTAGTGTTT	59.0	199	(TA) ¹⁰
PH-033-R	TATACGTGCACTGCCCTTCG	60.1		

Tabulka č. 5: Pokračování 2.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T _m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repeticce
PH-034-F	GCAGAAACGTTGGGATCGAA	58.8	237	(TTCTG) ¹¹
PH-034-R	CTTTTCCC GCGAGAGATGAC	58.7		
PH-035-F	TGTGTGGATAGAGTGCAGCA	59.0	184	(AT) ¹⁰
PH-035-R	GAACAACCTCACGAGGTTCTGA	58.5		
PH-036-F	ACCGCACACTTTCATAATCCA	57.9	220	(GAGAT) ¹¹
PH-036-R	TGCAAAACGAACAACATTGGAG	58.5		
PH-037-F	GAATCCGTGGTTACAGACGC	59.0	241	(TA) ¹⁰
PH-037-R	CGAGTGC GCTGTACTTTGTT	59.1		
PH-038-F	AAAGTGTGTTGCTCCATCGG	58.7	239	(TCTCT) ¹³
PH-038-R	ACACTTGCAGGCGAATGTC	58.5		
PH-039-F	GGTAGCCAGTACTTATGCATGT	57.9	246	(AATA) ¹⁴
PH-039-R	CGTGGTACTCTCGGTTGTCT	59.1		
PH-040-F	GGGTGTCGAAAAGTGTGAGT	58.0	182	(AT) ⁷
PH-040-R	GGAACGCATGTGTAGCTAGC	59.0		
PH-041-F	CTCGAACTTGTGGAGCTGC	59.4	173	(AT) ⁷
PH-041-R	CGACTGCCATCAACTCCAAC	59.2		
PH-042-F	ACCAGGAGCGTTACTTGAGA	58.3	206	(AT) ⁸
PH-042-R	GGGCTTCGAACAGGATAGGT	59.1		
PH-043-F	GCGCTTAGAGGAGGCGTAAT	59.9	206	(GAAGA) ¹¹
PH-043-R	GTCCTCCAACGTTGAAGTG	59.1		
PH-044-F	CATCCGTCTTAAGGCTTCGC	59.0	195	(AT) ⁷
PH-044-R	ATGACCTGAAGCATCTCGG	59.5		
PH-045-F	TGCAGAAATCGGTGGACTACT	59.1	226	(TTCTC) ¹¹
PH-045-R	TGGCCCAAGGTGTACAAATG	58.3		
PH-046-F	GCAGTCCGTCGAGTTTGAAA	58.7	233	(TTCTC) ¹¹
PH-046-R	TATTCAGCCCCGTACCGTTT	59.1		
PH-047-F	TTCCGAGCTGTCAAAGTCCT	58.9	195	(TTCTC) ¹¹
PH-047-R	CCTCCACTTCACAAGGAGCT	59.3		
PH-048-F	GCAGCTAATCTACACTGGCC	58.4	204	(CTCTA) ¹¹
PH-048-R	GGAAACGGACATGGGGTTTG	59.4		
PH-049-F	GACCATTGGCTGAGCTCAAG	58.9	214	(TTCTC) ¹¹
PH-049-R	CGAGCCATCCTTTTAACCGG	58.9		
PH-050-F	GCCGACAGTGAAAGAGAGGA	59.4	249	(ACTC) ⁴
PH-050-R	GGTTAAGGGCAGTGAGGGAT	59.0		
PH-051-F	GCTGCAGGAGGTGATCACT	59.4	239	(GCTGTT) ⁴
PH-051-R	AGCGCTCCATCATCATTTGC	59.3		
PH-052-F	AAGAGGAATCTGTGCTGGCA	59.3	226	(AAGAG) ¹¹
PH-052-R	GAAGTGCCGGAGTAAACCAC	58.8		

Tabulka č. 5: Pokračování 3.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T _m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repeticce
PH-053-F	GCTGCGTCAATCTCATTCGT	59.0	213	(AT) ¹²
PH-053-R	TTTGTGTTTGCCTCCAGA	58.9		
PH-054-F	CGCTTCTCTCGTGGACAAG	55.0	220	(AGAAG) ¹²
PH-054-R	GTATACTGCGGTGTGAGACG	55.0		
PH-055-F	GCATCGAGGGATTGTGCAAT	58.9	239	(TTTA) ¹³
PH-055-R	CCTCACCATCCGCAAAGAAG	58.9		
PH-056-F	GAGAATGCTGGTGTCTCAACA	58.2	222	(AGAGA) ¹¹
PH-056-R	TGGACTCAAGCAAGCTGTAAG	58.2		
PH-057-F	CTACGCGTTAGTGCCGATTC	59.1	224	(TCTTC) ¹²
PH-057-R	GTGGAGCACTAACGCCTTA	57.9		
PH-058-F	TGCACAAGGAAACAAGCCG	60.0	273	(AGT) ⁴
PH-058-R	TGACGTGGCGTAACCTCC	60.0		
PH-059-F	GCGTGTCGTGCTTACCTC	59.9	185	(CTT) ⁴
PH-059-R	GCCGAATGTCAACGGCTTC	60.5		
PH-060-F	CTTGCTTGGGACGTGCTTC	59.9	332	(AAG) ⁴
PH-060-R	CACCGTCACGTCCTCTAGAA	59.8		
PH-061-F	ATTAAGCTGGACAATGCCCG	58.6	231	(AAAAG) ⁵
PH-061-R	AAAGTGTGAGATCGGTTGCG	58.8		
PH-062-F	ACCTCAGCTTTACCTACGTTTC	58.0	178	(AC) ⁶
PH-062-R	TCGATGTACACACGTAGCGA	58.9		
PH-063-F	TGAGGAATCATCTGGTTGGCT	59.0	242	(AAAT) ⁴
PH-063-R	CCCAAGGCTAATTACTCTTCCG	58.5		
PH-064-F	GTCACTCTTGCATGCGTACC	59.2	191	(AGGCT) ⁴
PH-064-R	ACGGAACAGTACTACGCCAA	59.0		
PH-065-F	TGGTCGTGGGGTCAACAATA	58.9	224	(CTTT) ⁴
PH-065-R	CGCCACTCATTCCGAAAGTT	58.8		
PH-066-F	ACGTTGAGTCAAAACCTGGC	58.9	243	(CTTT) ⁶ (GTTT) ⁶
PH-066-R	TCTGTAGAGCGCCCAATCAG	59.5		
PH-067-F	GGTTAAGGGCAGTGAGGGAT	59.0	387	(GAGT) ⁹
PH-067-R	TGCCTTGGACATCTCTTCCA	58.6		
PH-068-F	CGCCACTACATTAAGCCAGT	57.9	250	(TTCTC) ¹²
PH-068-R	CGCTTCGTCATCTGTAGTGC	59.0		
PH-069-F	TGGCCTTTTGATTGCAGACC	59.0	244	(AT) ¹³
PH-069-R	ATCTTCCCATCCGGTCGTAC	58.9		
PH-070-F	TCGATCTGTACAGCGAGTCT	57.9	151	(CTCTT) ⁷
PH-070-R	CATTGATGTGGCACGGAGAA	58.5		
PH-071-F	TCCGTGGCAGATTTACACCA	59.3	172	(ACTGAC) ⁴
PH-071-R	AGTATCCGTGGGTGTAGCAG	58.8		

Tabulka č. 5: Pokračování 4.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T _m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repeticce
PH-072-F	CGCCGTGCTATCGTGTTATT	58.7	211	(ACTGAC) ⁴
PH-072-R	AGTATCCGTGGGTGTAGCAG	58.8		
PH-073-F	CAAACGCCTGATTCGAGCTT	59.2	216	(TTCTC) ¹²
PH-073-R	TCATACCATGCCCACTGA	58.7		
PH-074-F	TGAGACGATGGGTGCTTGG	60.4	392	(TTAT) ⁴
PH-074-R	TCGTGGGTTATAGCCTGCC	59.9		
PH-075-F	CCATGATTGCACCCGTGCAC	59.1	170	(GCTT) ⁴
PH-075-R	CCACACCACACCTAACCAAC	58.6		
PH-076-F	CCTCACCGTTTTAGTCCA	59.6	241	(GT) ⁴
PH-076-R	GCAAAGCCGCCTAATTCTAAGT	59.3		
PH-077-F	CCCAAGCTCCTCCATAGCC	60.3	192	(CTCCAA) ⁴
PH-077-R	AGGCTGCTCAGACATTCGG	60.5		
PH-078-F	GCACGTATTGACATTCCACCA	58.9	246	(TAAGC) ⁸
PH-078-R	TGGTCCGAATATGCTTGCG	58.9		
PH-079-F	CTCCAACGTTTGACTGATACA	57.4	198	(GAGAA) ¹¹
PH-079-R	GTACAGGTAGTGCTCGGTCC	59.5		
PH-080-F	TCCGAAAGTGGGGCCTTTC	59.9	259	(GAAGA) ¹¹
PH-080-R	TCTTGGGAGCCGTGAAGAT	58.3		
PH-081-F	CGATACCCTGGTCATAGCGA	58.7	213	(AGCTCG) ⁴
PH-081-R	CGCTTGCTTCGTGGTTTGA	59.0		
PH-082-F	CCAACCTACTGACTGACCG	57.1	188	(TACT) ¹⁴
PH-082-R	GTATGCATTCTCAGCGAGCG	59.4		
PH-083-F	CTGTCGTGTAGCTCGGTAGT	58.9	202	(AGT) ⁶
PH-083-R	AGCTTTCCTGGAGTCTCACC	59.0		
PH-084-F	CGTAACAACCGGGCGAATAG	59.0	206	(GAAGA) ¹¹
PH-084-R	TTCCAGGTCCAAAGATCGCT	59.0		
PH-085-F	GTCGTAGTATCCTCAACCCGA	58.7	259	(AGAGA) ¹²
PH-085-R	GAGTCAACTGGGATTCTTCGT	57.6		
PH-086-F	TGCTAGTAGGACTCGGTAGC	58.7	220	(AGAGA) ¹¹
PH-086-R	CCTATCTGGTGTTGCGAAAAGA	58.6		
PH-087-F	CCTTCGTTCTATTCTAAAAA	58.9	265	(CTATAT) ⁹
PH-087-R	TTCTCGCATCTCACCACCAA	59.3		
PH-088-F	GGCCAACAGAGATTTGCCTT	58.7	202	(CACT) ⁶
PH-088-R	CAAGTTTCTTCGGTGCGTCA	59.0		
PH-089-F	CTTGGTGAAATGGCTGGGC	60.1	233	(CT) ²²
PH-089-R	TTTCCAATGGCGTCAAGCG	60.1		
PH-090-F	GACGAATCGGAACGCCAAG	60.0	165	(AC) ⁶
PH-090-R	GTACGGACGCGTTGATTCCG	60.0		

Tabulka č. 5: Pokračování 5.

Označení primeru	Sekvence primeru (5'-3')	T _m [°C]	Délka PCR produktu (bp)	Jednotka repeticce
PH-091-F	TATCATCGTTGCGCTTCTGC	59.0	163	(TCA) ⁷
PH-091-R	GGTGAAGATGAGGGTGACGA	59.1		
PH-092-F	CCGGGCTACAGTTGCATTAG	58.7	157	(GGCTA) ⁵
PH-092-R	TTTGTGTTGCAGGGGTCAAG	58.8		
PH-093-F	TGAAAATGATCAACAGCAGCCT	58.8	248	(CACGAA) ⁶
PH-093-R	CTTCGTTCTGCTCATGACCA	57.9		
PH-094-F	CCCAAGGCTAATTACTCTTCTGC	59.1	220	(AT) ⁸
PH-094-R	TAACAGGGGTGTGTGTGTCA	58.7		
PH-095-F	AGAGTTGATGTCCTTGGCGA	59.0	241	(AT) ⁸
PH-095-R	GTTTGGCGCAGAAAAGCTTC	58.8		
PH-096-F	TTGCTCATCTGATCCAGCCA	59.0	217	(AGCTCTGT) ⁷
PH-096-R	ACGATCGGATTATCAGCCTCT	58.4		
PH-097-F	CGTCCCCTTTTGTAAACCCG	59.1	228	(CTCTT) ¹¹
PH-097-R	AAGTGGCTGGCAAGTTCAAG	58.9		
PH-098-F	CGGATAACAAATAGATGCGGGG	59.2	239	(AT) ¹⁶
PH-098-R	GAACACAGGAGGCAATGGTG	59.1		
PH-099-F	GTTGCGGAAGTTGTGGTCAT	59.0	238	(TTG) ¹¹
PH-099-R	TCCAGCACCTATAGTTGGCA	58.4		
PH-100-F	TCGAATGAGTGAAGATACGAAGA	57.1	248	(GTGA) ¹¹
PH-100-R	TGCCTTGGACATCTCTTCACT	59.0		
PH-101-F	GATTTGAAGTACGCGGTGCT	58.9	219	(AGAAG) ¹⁰
PH-101-R	AGTAGGAATTGGGGCGATGG	59.5		
PH-102-F	CCGTAATTGTGTAAGGCCCG	58.9	218	(GTATG) ¹¹
PH-102-R	GCGAGCTCATAGTCTGGTCT	58.9		
PH-103-F	CGAATAGAGGCTGGCTTTGT	57.9	241	(AAGAG) ¹¹
PH-103-R	TCGTTTCGTAGGGCATCGTA	58.9		
PH-104-F	TGTGTCAAATTGTGCCTGCA	58.8	227	(CTCTT) ¹²
PH-104-R	CCAGCTTTCGTATAGCCAC	59.0		
PH-105-F	TAGCTTCTCGTCACGCTCG	59.5	233	(AT) ¹⁰
PH-105-R	GTCAACGAAAAGCTCTCCGG	59.2		
PH-106-F	GCCGTGCCATTTCTGCATAT	59.3	234	(GA) ¹²
PH-106-R	CAAGTCACGACCAAGCAACA	59.0		
PH-107-F	TAAGTGATGGCGTCTGGTGA	58.7	238	(AGTG) ¹²
PH-107-R	TGTGAGAGTTGCCTTGACACA	59.1		
PH-108-F	TGAGGATGTAGCTGCTCCA	57.6	220	(ACATGA) ¹¹
PH-108-R	CTTCACCCAGTCAGACAGCT	59.3		
PH-109-F	CGTCAAATGTAGAAGTACCGCA	58.7	249	(TTCTC) ¹²
PH-109-R	GTTTCACCGAGCATAGCGAC	59.3		

Tabulka č. 6: Složení PCR reakční směsi a objemy použitých roztoků.

Složky PCR směsi	Pipetovaný objem [μl]		
	1 vzorek	7 (+1 vzorek rezerva)	12 (+1,5 vzorku rezerva)
Deionizovaná voda	14,42	115	195
10x Kapa <i>Taq</i> pufr s Mg^{2+}	2	16	27
Roztok dNTPs [$10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$]	0,4	3,2	5,4
Směs F a R primeru [$10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]	1,6	12,8	21,6
Kapa <i>Taq</i> DNA polymeráza [$5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	0,08	0,64	1,08
DNA [$7 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	1,5	12	20

Při přípravě PCR mixu jsem postupovala následovně. Všechny chemikálie (kromě DNA polymerázy) bylo nutné vždy před použitím důkladně protřepat na vortexu a poté zcentrifugovat. Následně byly pipetovány přesné objemy jednotlivých složek PCR mixu do 1,5ml mikrozskumavek. Vzniklá směs byla promíchána na vortexu a centrifugována v minicentrifuze. Výsledný PCR mix byl rozpipetován po 10 μl do 96-jamkové desky (nebo do PCR stripů). PCR deska byla následně vložena do termocykléru, ve kterém probíhala polymerázová řetězová reakce na základě teplotního a časového profilu uvedeného v Tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Teplotní a časový profil PCR reakce.

3 min	95 °C	} 33x
20 s	95 °C	
20 s	50 - 68 °C	
30 s	72 °C	
3 min	72°C	
Bez omezení	8 °C	

Po ukončení PCR reakce byla provedena separace vzniklé PCR směsi na 1% agarózovém TBE gelu s přidaným fluorescenčním barvivem Gel RedTM Nucleid Acid (Biotium). Podmínky elektroforézy byly: napětí 250 V, proud 210 mA, výkon 100 W, čas 45 min. Amplifikované PCR produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (program UVITEC) a dokumentačního zařízení (Kodak Edas 290). Pokud byl detekován PCR produkt ve formě jednoho bandu, byl daný marker označen za funkční a na základě záznamu z UV transiluminátoru jsem poté určila nejvyšší annealingovou teplotu (tj. jamku s nejvyšší teplotou, při které byl ještě detekován intenzivní PCR produkt/band). Marker (respektive navržené primery) byl označen za nefunkční, pokud ani při opakování PCR reakce nebyl detekován produkt.

U markerů, které poskytly PCR produkt, bylo v další fázi práce provedeno testování na podsouboru sedmi vybraných izolátů *P. halstedii* (Tabulka č. 10). Cílem bylo identifikovat variabilní markery (tj. detekce min. 2 alel pro daný marker) poskytující hodnotitelný záznam, ideálně ve formě jednoho až dvou bandů, které by mohly být využity pro navazující populačně genetické studie *P. halstedii*. Postupovala jsem tak, že u funkčních markerů byla provedena opět PCR amplifikace s použitím annealingové teploty odvozené pro daný marker. Příprava PCR mixu probíhala podobně jako při gradientové PCR, pouze byly použity objemy pro sedm vzorků. PCR mix byl připraven bez genomické DNA a až po rozpipetování výsledného mixu do PCR stripu byla přidána templátová DNA sedmi různých izolátů *P. halstedii*. Pro PCR reakci byl použit stejný teplotní a časový profil jako v Tabulce č. 7.

5.2.4. Zpracování PCR produktů

PCR produkty byly separovány na vyhřívané sekvenační elektroforetické komoře T – REX, OWL S3S, přičemž šířka gelu odpovídala tloušťce použitých spacerů (0,4 mm). Složení použitých roztoků je uvedeno v kapitole 10.4 a vlastní laboratorní postup byl následující:

1. Obě skla byla nejprve omyta deionizovanou vodou. Velké sklo, na kterém bude později přilepený, obarvený a usušený gel, bylo potřeba důkladně umýt houbičkou se saponátem (jar na nádobí) a opláchnout vodovodní a poté destilovanou vodou. Sklo bylo osušeno papírovými ručníky a přeneseno do digestoře.
2. Menší sklo s výřezem bylo omyto deionizovanou vodou a poté ošetřeno 100% ethanolem a vytřeno do sucha. Na plochu skla, která bude v kontaktu s gelem, byl aplikován přípravek na odpuzování vody Rain Repelent. Roztok byl rozetřen rovnoměrně po celém skle a ponechám volně schnout po dobu 5 min v digestoři. Po uplynutí této doby byla ošetřená plocha skla opláchnuta vodovodní a poté destilovanou vodou a vytřena do sucha papírovými ručníky.
3. Na plochu velkého skla bylo 2x po sobě nanášeno po 3 μ l 3-methakryloxypropyl-trimethoxysilanu do 1 ml roztoku 0,5% kyseliny octové v 96% ethanolu a rozetřeno po celé ploše skla papírovými ubrousky do sucha. Po 5 min byla plocha skla 4 x po sobě ošetřena 100% ethanolem a vytřena papírovými ručníky.
4. Na okraje delších hran většího skla byly přiloženy dva spacers (tloušťka 0,4 mm), které tak vytvořili prostor pro nalití gelu. Obě skla byla svými ošetřenými plochami přiklopena k sobě a fixována 6 svorkami.
5. Následně byl připraven 6% polyakrylamidový gel a to smícháním 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu (AA), 467 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a 46,7 μ l N, N, N', N' - tetramethylethylendiaminu (TEMED). Do prostoru mezi obě skla zajištěná svorkami byla pomocí stříkačky aplikována směs AA. Po naplnění celé plochy byl mezi skla vložen svou rovnou stranou hřebínek do hloubky cca 1 cm od horního okraje. Pozice hřebínku byla fixována klipsy. Polymerizace gelu probíhala po dobu 60 min.
6. Po ztuhnutí gelu byla skla omyta vodovodní a poté deionizovanou vodou, hřebínek byl odstraněn a okolí nalévacího prostoru bylo vyčištěno houbičkou a zbaveno nežádoucího, přebytečného gelu. Skla byla poté stěrkou či papírovými ubrousky

zbavena přebytečné vody a upnuta do elektroforetické komory tak, aby menší sklo s výřezem bylo v těsném kontaktu s vyhřívanou plochou. Skla byla v aparatuře zafixována, větší sklo se nacházelo na vnější straně. Příslušné části aparatury byly naplněny 0,5x TBE pufrem a po zaplavení výřezu skla byly šetrně odstraněny zbytky gelu. Proudem pufru ze stříkačky byl vypláchnut prostor, do kterého je před nanesením vzorků umístěn hřebínek.

7. V dalším kroku byla elektroforetická komora připojena ke zdroji stejnosměrného proudu za těchto podmínek: maximální elektrický proud 100 mA, napětí 2000 V a výkon 75 W. Skla byla zahřívána 30-50 min (nejlépe 45 min).
8. Po uplynutí této doby bylo okolí nalévacího prostoru vypláchnuto pomocí stříkačky proudem 0,5x TBE pufru a znovu zbaveno tak zbytků polyakrylamidu a rozpuštěné močoviny. Do mezery mezi skly byl zasunut hřebínek tak, aby byly jeho zoubky zanořené přibližně 1 mm pod okraj gelu.
9. Asi 5 min před nanesením PCR produktů na gel byl smíchán 1 díl vzorku s 1/2 dílem denaturačního pufru obsahující formamid. Následně byly vzorky přeneseny do předem vytemperovaného termocykléru na 96 °C a denaturovány 3 min. Po uplynutí stanovené doby byly vzorky vloženy do nádoby s ledovou tříští, aby došlo k zabránění renaturace vzorků.
10. Vzorky byly posléze nanášeny po 5 µl osmikanálovou mikropipetou do mezer mezi zoubky hřebínku. Po napipetování všech vzorků byl uzavřen katodový prostor a aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Podmínky pro elektroforetickou separaci byly: maximální elektrický proud 177 mA, napětí 2000 V a výkon 90,5 W. Separace vzorků trvala 2 h.
11. Během dělení vzorků byl namíchán roztok fix/stop, roztok 1% kyseliny dusičné (HNO₃) a vývojka, která byla přenesena do lednice, aby se vychladila na teplotu nižší než 10 °C.
12. Po doběhnutí elektroforézy byl vypnut zdroj napětí, odpojeny obě elektrody a na zadní straně komory připojena na ventil trubička, kterou byl vypuštěn pufr do sběrné nádoby. Skla byla vyjmuta z aparatury a položena do vodorovné polohy menším sklem nahoru. Z mezery mezi skly byl opatrně vytáhnout hřebínek a oba spacery a čepelí nože byla od sebe odpáčena obě skla. Větší sklo s přilepeným gelem bylo umístěno do misky na třepačku a zalito fix/stop roztokem. Doba působení tohoto roztoku na gel byla přibližně 20 min (podle vymytí xylenové modře z gelu).

13. Po uplynutí této doby byl fix/stop roztok slit zpět do baňky pro další použití a sklo s gelem bylo promýváno 3x po 2 min přibližně 1-1,5 l deionizované vody. Poté bylo sklo s gelem vráceno zpět na třepačku a promýváno roztokem 1% HNO₃ přesně 5 min. Poté byl roztok slit do zásobní baňky a sklo s gelem důkladně omyto 3x po 2 min deionizovanou vodou.
14. Sklo s gelem bylo přeneseno do další misky, umístěno na třepačku a zalito 0,1% roztokem dusičnanu stříbrného (AgNO₃), do kterého bylo krátce před použitím přidáno 3 ml formaldehydu. Doba působení AgNO₃ na gel byla 30 min.
15. Na konci této doby byl roztok AgNO₃ slit zpět do baňky, sklo s gelem bylo přeneseno do misky s 1-2 l deionizované vody, ve které byl gel ponořen pouze na 5 s a poté rychle přemístěn do misky obsahující vývojku. Do vývojky bylo těsně před její aplikací přidáno 2,25 ml formaldehydu a 300 µl thiosíranu sodného (Na₂S₂O₃).
16. Po chvilce bylo možné detekovat vyvíjení hnědočerných, stříbrem obarvených, proužků/bandů PCR produktů. Jakmile byly bandy dostatečně zřetelné a pozadí gelu ještě nebylo příliš tmavé, bylo vyvíjení barvení zastaveno nalitím fix/stop roztoku, který bych zachován z kroku 12 a 13. Fix/stop roztok působil na gel cca 2 min (taktéž bylo možné se orientovat podle unikání bublinek oxidu uhličitého, CO₂).
17. Sklo s obarveným gelem bylo přemístěno do misky s deionizovanou vodou, promyto a uloženo do sušárny, ve které se gel sušil 60 min. Nakonec bylo sklo s gelem vyhodnoceno pomocí negatoskopu a pro archivaci převedeno do digitální podoby naskenováním.

6. Výsledky

6.1. Rasy *P. halstedii* v ČR v roce 2014

Na diferenčním souboru genotypů slunečnice (viz Tabulka č. 4) byla testována virulence celkem 16 izolátů *P. halstedii* z ČR z roku 2014. U izolátů 1414 a 1415 byla zaznamenána nedostatečná životnost sporangií. U izolátu 1408 se nepodařilo určit rasu, přes několik opakování výsledky testů nebyly jednoznačné. U 13 izolátů byly stanoveny rasy:

- 70471 (2 vzorky z Podivína)
- **70571 (3 vzorky z Podivína)**
- 71060 (2 vzorky z Podivína, 3 vzorky z Olomouce-Holice)
- 71471 (1 vzorek z Podivína)
- **71571 (2 vzorky z Podivína)**

V roce 2014 byla u tří izolátů *P. halstedii* pocházejících z experimentálního pole v Olomouci-Holici identifikována rasa 71060, která se vyskytovala i u dvou vzorků v Podivíně. Další izoláty z Olomouce-Holice (1414 a 1415) špatně rostly a nepodařilo se provést uspokojivý počet opakování pro spolehlivé určení rasy. V Podivíně byly u dvou izolátů *P. halstedii* detekovány rasy 70471, u jednoho 71471. Na stejné lokalitě byly prokázány i zcela nové rasy **70571** u třech izolátů a **71571** u dvou izolátů. Tyto výsledky budou spolu s předchozími výsledky (včetně Bartůšek, 2015) v průběhu roku 2016 publikovány v časopise Plant Protection Science (Sedlářová *et al.*, 2016).

6.2. Výskyt ras v populacích *P. halstedii* v ČR v letech 2009-2014

Vzhledem k tomu, že molekulární studium bylo prováděno na širším souboru izolátů *P. halstedii*, jsou v dalším textu zmíněny výsledky studia fytopatologické laboratoře KB PřF UP pod vedením prof. Ing. Aleše Lebedy, DrSc. Na stanovení ras *P. halstedii* u izolátů pocházejících ze sběrů v letech 2009-2014 se podíleli i další studenti pod vedením doc. RNDr. M. Sedlářové, Ph.D.: Tomáš Bartůšek (2013), Zuzana Trojanová (2013), Karel Stojaspal (2009) a Romana Pospíchalová (nepublikováno).

Výskyt jednotlivých ras v populacích *P. halstedii* v ČR v letech 2009-2014 je zachycen v Tabulce č. 8. U izolátů z let 2013 a 2014 byl k určení ras použit rozšířený soubor 15 diferenciačních linií slunečnice a získané rasy *P. halstedii* byly označeny pomocí nově zaváděného pětičíselného kódu. Srovnávání trojčíselného označení ras detekovaných původním diferenciačním souborem s prvním trojčíslím nově získaného kódu je možné, protože linie HA-304 nese totožné geny rezistence jako linie GB a linie QHP-1 má totožné geny rezistence jako QHP-2. Původní diferenciační soubor byl nezměněn až na linie HA-304 a QHP-1 (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012).

Na experimentálním poli v Olomouci-Holici byly v průběhu šestiletého pozorování identifikovány dvě rasy, 70060 a 71060. Zajímavé zjištění přinesly výsledky studia populace *P. halstedii* z oblasti Podivína. Z uvedené časové řady vyplývá, že se na tomto území zvyšuje patogenní variabilita, která je nejvyšší ze všech sledovaných oblastí ČR. V roce 2014 zde byly prokázány dvě zcela nové rasy 70571 a 71571 (Sedlářová *et al.*, 2016).

Tabulka č. 8: Výskyt jednotlivých ras v populacích *P. halstedii* v ČR v letech 2009-2014. (Bartůšek, 2013; Sedlářová *et al.*, 2016).

Lokalita	Identifikované rasy <i>P. halstedii</i>					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Brno-Chrlice	–	–	–	–	71060	–
Lednice	–	–	700, 710	–	70471	–
Lednice-MENDELU	–	–	–	–	71471	–
Olomouc-Holice	700	–	700, 710	710	71060	70060, 71060
Podivín	700	710	700, 704, 714	704	71060	71060, 70471, 70571, 71571

Pro testování mikrosatelitových markerů byla použita genomická DNA izolovaná ze zoosporangií 39 izolátů *P. halstedii* z různých lokalit z České republiky a Maďarska. Detailní údaje o použitých izolátech, včetně místa původu, roku odběru izolátu, fytopatologických charakteristikách, koncentraci a kvalitě vyizolované DNA, jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Přehled testovaných izolátů *P. halstedii*.

Tabulka obsahuje: číslo a rok sběru izolátu, lokalitu sběru, koncentraci (c) genomické DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), stanovenou čistotu DNA – poměr absorbancí při 260 a 280 nm, stupeň napadení rostliny a určenou rasu daného izolátu.

Číslo izolátu	Rok sběru	Lokalita	c DNA [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}/A_{280}	Stupeň napadení	Rasa izolátu
1303	2013	Lednice	1083,1	1,85	2-3	70471
1307	2013	Lednice MENDELU	1183,6	1,89	1	71471
1313	2013	Brno-Chrlice	–	–	3-4	71060
1315	2013	Olomouc - Holice	–	–	2-3	71060
1316	2013	Olomouc - Holice	636,3	1,64	2-3	71060
1317	2013	Olomouc - Holice	386,2	1,44	2-3	71060
1318	2013	Olomouc - Holice	923,7	1,81	2-3	71060
1319	2013	Olomouc - Holice	1011,3	1,83	2-3	71060
1401	2014	Podivín	642	1,66	3-4	70571
1402	2014	Podivín	2252,2	1,94	3-4	70571
1403	2014	Podivín	1052,5	1,84	3-4	70571
1404	2014	Podivín	784,9	1,71	3-4	70471
1405	2014	Podivín	368	1,43	3-4	71060
1406	2014	Podivín	2263,3	1,94	3-4	71571
1407	2014	Podivín	835	1,75	3-4	70471
1408	2014	Podivín	1034,7	1,78	3-4	–
1409	2014	Podivín	948,2	1,8	3-4	71060
1410	2014	Podivín	1218,3	1,82	3-4	71571
1411	2014	Podivín	654,9	1,84	3-4	71471
1412	2014	Olomouc - Holice	1977,3	1,93	3-4	71060
1413	2014	Olomouc - Holice	1659,7	1,99	2-3	71060
1415	2014	Olomouc - Holice	1000,3	1,8	2-3	–
1416	2014	Olomouc - Holice	1546,5	1,94	2-3	71060
1418	2014	Olomouc - Holice	1008,2	1,77	2-3	70060
1419	2014	Olomouc - Holice	1010	184	2-3	70060
1420	2014	Olomouc - Holice	730,1	1,73	2-3	71060
1503	2015	Olomouc - Holice	1034,6	1,81	–	–
1 M	2015	Maďarsko	574,6	1,39	–	–
2 M	2015	Maďarsko - SV nad městem Tokaj	885,7	1,67	–	–
3 M	2015	Maďarsko	843,9	1,27	–	–
4 M	2015	Maďarsko	1795,8	1,88	–	–
5 M	2015	Maďarsko	1306,9	1,79	–	–
6 M	2015	Maďarsko	766	1,67	–	–

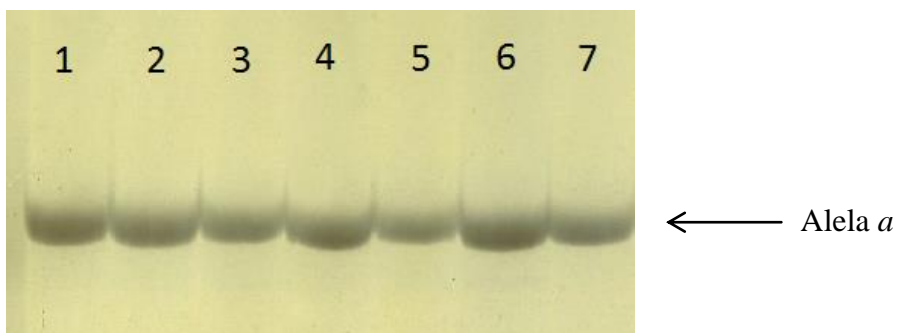
Tabulka č. 9: Pokračování 1.

Číslo izolátu	Rok sběru	Lokalita	c DNA [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Stupeň napadení	Rasa izolátu
7 M	2015	Maďarsko - Z od města Szolnok	1083,1	1,84	–	–
8 M	2015	Maďarsko	108	1,99	–	–
9 M	2015	Maďarsko	1439,9	1,87	–	–
10 M	2015	Maďarsko	1288,2	1,84	–	–
11 M	2015	Maďarsko	764,1	1,69	–	–
12 M	2015	Maďarsko - JV	690,2	1,66	–	–
13 M	2015	Maďarsko - Budapešť	413,3	1,48	–	–
14 M	2015	Maďarsko	448,3	1,28	–	–

6.3. Výsledky testování mikrosatelitových markerů *P. halstedii*

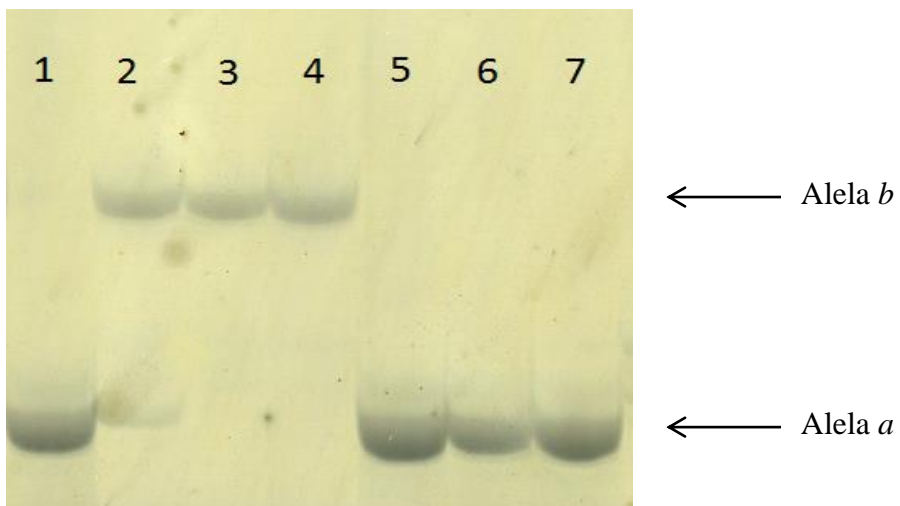
V této části práce jsem se zaměřila na využitelnost mikrosatelitových markerů navržených v práci Sharma *et al.* (2015), ve které byl publikován genom *P. halstedii*. Mým úkolem bylo optimalizovat podmínky PCR reakce pro všech 112 navržených markerů (3 mitochondriální a 109 jaderných) pomocí gradientové PCR a následné vizualizace vzniklých PCR produktů na agarózovém gelu. Ověřovala jsem tedy funkčnost (správnost) navržených primerů a optimalizovala teplotní profil PCR reakce. Pokud jsem na agarózovém gelu detekovala PCR produkty, považovala jsem daný marker za funkční a ze záznamu jsem stanovila nejvyšší použitelnou annealingovou teplotu pro daný marker. U markerů poskytujících PCR produkt jsem měla následně provést další testování na podsouboru sedmi izolátů s cílem nalézt variabilní markery.

Z celkového počtu 112 testovaných mikrosatelitových markerů, došlo u 66 z nich k úspěšné amplifikaci a detekci PCR produktů. Dalším testováním na sedmi izolátech *P. halstedii* byly na polyakrylamidové elektroforéze u 23 mikrosatelitů detekovány monomorfní produkty (Obrázek č. 5) a 16 markerů bylo nehodnotitelných pro jejich komplexní pattern nebo velmi slabou amplifikaci. Tyto testované markery byly z dalšího testování vyřazeny.

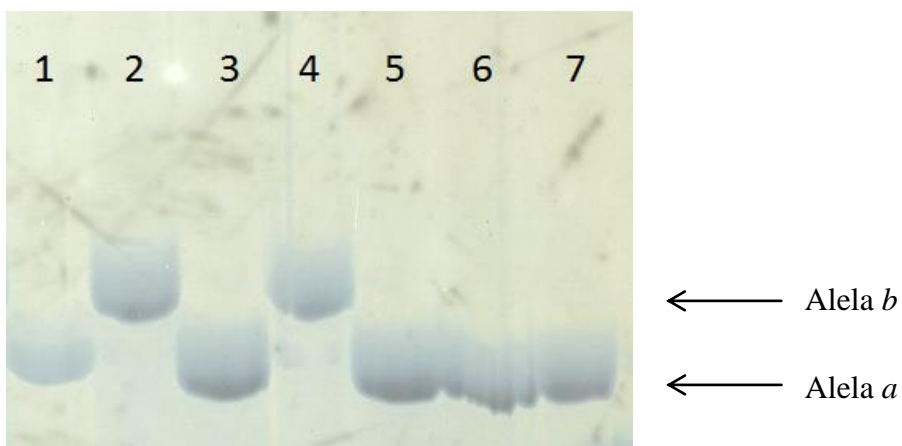


Obrázek č. 5: Elektroforetogram produktů PCR amplifikace monomorfního mikrosatelitového markeru PH-025. Annealingová teplota: 50 °C, počet cyklů při PCR reakci: 33, počet alel: 1.

U 27 mikrosatelitů, u kterých došlo k detekci minimálně dvou alel, byly označeny jako polymorfní (Obrázky č. 6 a 7). U některých z těchto markerů byla na základě vizuálního hodnocení separovaných PCR produktů v polyakrylamidovém gelu provedena další optimalizace podmínek PCR reakce (tj. annealingová teplota a počet cyklů). Pokud byly produkty slabě viditelné a hodnotitelné, bylo nutné během PCR reakce snížit jejich teplotu annealingu, popř. zvýšit počet cyklů. Naopak, pokud byly produkty v gelu příliš silné a nebylo možné stanovit počet alel, byla annealingová teplota zvyšována a/nebo snižován počet cyklů. Nejnižší hodnota teploty annealingu byla 56 °C (u markeru PH-082), nejvyšší hodnota dosáhla teploty 65,4 °C (u markeru PH-109). V Tabulce č. 10 je uveden seznam polymorfních markerů, annealingová teplota optimalizovaná pro daný marker a přehled konstituce alel, které byly pro daný marker detekovány. Počet alel u polymorfních markerů se pohyboval v rozmezí od 2 do 4.



Obrázek č. 6: Elektroforetogram produktů PCR amplifikace polymorfního mikrosatelitového markeru PH-108. Annealingová teplota: 57 °C, počet cyklů při PCR reakci: 33, počet alel: 2.



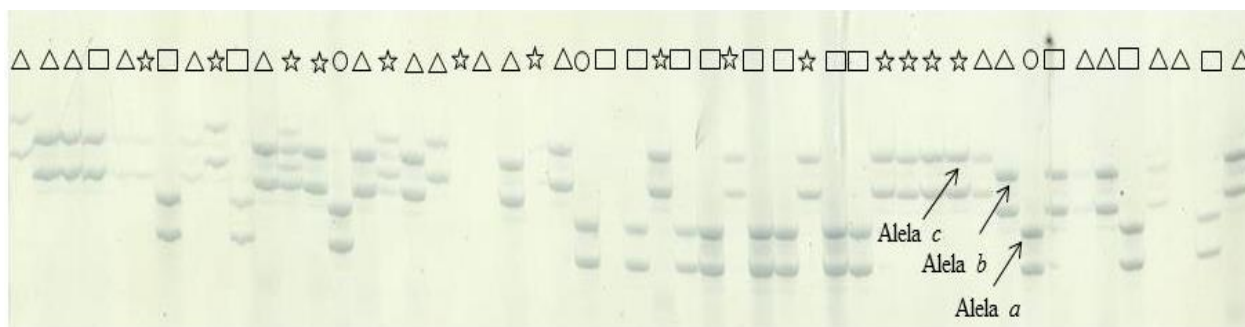
Obrázek č. 7: Elektroforetogram produktů PCR amplifikace polymorfního mikrosatelitového markeru PH-078. Annealingová teplota: 63 °C, počet cyklů při PCR reakci: 33, počet alel: 2.

Tabulka č. 10: Polymorfní mikrosatelitové markery nalezené u *P. halstedii*.

V tabulce je uvedeno: označení markeru, optimalizovaná teplota annealingu (Ta), počet cyklů v PCR reakci, počet alel (N) a genotypové profily testovaných izolátů (označení, geografický původ a rok sběru); ČR, Česká republika; HU, Maďarsko. Podrobnější informace o izolátech jsou uvedeny v Tabulce č. 9.

Označení markeru	Ta [°C] / počet cyklů	N	Genotypy testovaných izolátů <i>P. halstedii</i>						
			M2 / HU 2015	M13 / HU 2015	1403 / ČR 2014	1405 / ČR 2014	1412 / ČR 2014	1303 / ČR 2013	1319 / ČR 2013
PHmit-01	60 / 33	3	aa	aa	bb	bb	aa	bb	aa
PH-004	60 / 33	2	bb	aa	bb	aa	bb	bb	bb
PH-006	62 / 33	2	bb	bb	aa	bb	aa	aa	aa
PH-020	63 / 33	2	ab	ab	bb	aa	bb	bb	bb
PH-029	62 / 33	2	aa	bb	aa	bb	aa	aa	aa
PH-033	63 / 33	2	aa	bb	aa	bb	bb	bb	bb
PH-035	60 / 33	2	bb	bb	bb	aa	bb	bb	bb
PH-036	62 / 33	3	cc	bb	cc	bb	cc	cc	cc
PH-038	60 / 33	3	bb	aa	bb	cc	bb	bb	bb
PH-042	63 / 33	2	aa	aa	bb	aa	bb	aa	bb
PH-051	64 / 32	3	aa	cc	bb	cc	aa	aa	cc
PH-054	62 / 33	4	cc	aa	aa	aa	cc	cc	dd
PH-057	62 / 33	2	bb	aa	bb	aa	bb	bb	bb
PH-070	62 / 33	3	cc	bc	aa	bb	bb	bb	aa
PH-071	64 / 32	3	cc	bc	aa	cc	cc	cc	aa
PH-072	64 / 32	3	cc	bc	aa	cc	cc	cc	aa
PH-078	63 / 33	2	aa	bb	aa	bb	aa	aa	aa
PH-082	56 / 33	2	bb	aa	aa	aa	bb	bb	aa
PH-086	63 / 33	4	bb	dd	aa	bb	aa	cc	cc
PH-094	60 / 33	2	bb	bb	aa	aa	aa	bb	aa
PH-099	63 / 33	2	bb	bb	bb	aa	bb	bb	bb
PH-104	62 / 33	2	bb	aa	ab	aa	bb	bb	bb
PH-107	60 / 33	3	aa	cc	aa	cc	aa	aa	aa
PH-108	57 / 33	2	aa	bb	bb	bb	aa	aa	aa
PH-109	65,4 / 33	3	cc	aa	bb	aa	cc	cc	cc

V poslední části diplomové práce jsem provedla orientační posouzení genetické variability na souboru všech 39 izolátů *P. halstedii*, které byly hodnoceny ve fytopatologické části této práce. Pro tyto účely byl vybrán z časových důvodů pouze jeden mikrosatelitový marker a to PH-051. Výsledek tohoto testu je zobrazen na Obrázku č. 8.



Obrázek č. 8: Elektroforetogram produktů PCR amplifikace vybraného polymorfního mikrosatelitového markeru PH-051. Annealingová teplota: 63,4 °C, počet cyklů při PCR reakci: 32, počet alel: 3.

Legenda: Jednotlivé symboly znázorňující lokality sběru izolátů.

- | | |
|-----------|------------|
| △ Olomouc | □ Podivín |
| ○ Lednice | ☆ Maďarsko |

Z elektroforetogramu markeru PH-051 vyplývá, že v lokalitě Olomouc-Holice, ze které pocházelo 12 izolátů *P. halstedii*, převažuje homozygotní genotyp *bb* (u 8 izolátů), genotyp *cc* se vyskytoval u 3 izolátů, u jednoho izolátu nedošlo k amplifikaci a detekci PCR produktu. Z lokality Lednice pocházely 2 izoláty, přičemž u obou byl zjištěn genotyp *aa*. Z Podivína pocházelo celkem 11 izolátů *P. halstedii*, přičemž převažoval homozygotní genotyp *aa* a to u 9 izolátů. U jednoho izolátu se vyskytl genotyp *bb* a u jednoho izolátu neproběhla amplifikace. Z Maďarska jsem měla k dispozici celkem 14 izolátů *P. halstedii*. V této skupině izolátů převažoval genotyp *cc*, který byl prokázán u 9 izolátů, u 2 izolátů byl detekován genotyp *bb* a u jednoho izolátu nedošlo k detekci PCR produktu. Zajímavostí je, že se u 2 maďarských izolátů vyskytla heterozygotní konstituce alel *bc*. Mezi detekovanými genotypovými profily PH-051 a fytopatologickou determinací ve formě ras jednotlivých vzorků nebyla zjištěna souvislost. Na Obrázku č. 8 je také patrné, že u několika izolátů nebyly detekovány PCR produkty. Zde není možné s jistotou rozhodnout, zda se jedná o technickou chybu při přípravě PCR mixu nebo o detekci nulových alel. Pro vysvětlení by bylo nutné u tohoto markeru zopakovat PCR reakci a znovu separovat a detekovat produkty na polyakrylamidovém gelu.

7. Diskuze

V průběhu dvouletého studia jsem se zabývala vnitrodruhovou variabilitou populací *P. halstedii*. U 13 izolátů z ČR z roku 2014 byly rasy stanoveny metodou „drench soil“ inokulace semenáčků 15 linií diferenciačního souboru slunečnice. Doposud byl mezinárodně schválen soubor devíti genotypů slunečnic (Gulya, 2007), později doplněný dalšími šesti liniemi (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012; Gascuel *et al.*, 2016), který by měl lépe postihnout vývoj patogenity izolátů *P. halstedii*. Rozšířený diferenciační soubor patnácti genotypů slunečnic souvisí s novým označováním ras *P. halstedii* pomocí pětímístného místo tříčíselného kódu. Tento systém je otevřený, umožňuje srovnání s předchozími výsledky a neomezuje rozšíření o další triplety diferenciačních linií v budoucnu. Tourvieille de Labrouhe *et al.* (2012) předpokládají, že změny v nomenklatuře kódového systému a rozšiřování diferenciačního souboru bude nutné obměňovat každých 10 let. Postupné rozšiřování souboru genotypů slunečnice však vede k časové náročnosti metody, obtíže mohou nastat s prostorem i rostlinným materiálem. I proto rozšíření diferenciačního souboru předchází dlouhá diskuse mezi vědci v rámci ISA („international sunflower association“).

V roce 2014 bylo v České republice identifikováno 5 různých ras *P. halstedii* (71060, 70471, 71471, 70571, 71571). Nejčastěji vyskytující se rasou byla rasa 71060, u 2 izolátů z Podivína a 3 izolátů z Olomouce-Holice. Vzhledem k tomu, že tyto dvě lokality jsou sledovány od roku 2007, lze říci, že přírodní lokalita podmáčených políček v Podivíně je vhodným prostředím k mikroevoluci *P. halstedii*. Zajímavým přínosem byla v roce 2014 detekce dvou ve světě dosud nezaznamenaných nových ras s kombinací virulence 70571 a 71571 (Sedlářová *et al.*, 2016). Na patotesty nebyly použity monosporické izoláty, proto bylo možné, že jsou rasy 70571 a 71571 směsicí méně virulentních ras. Opakované testy a izolace patogenu z náchylných linií tuto teorii vyloučily. Nově zaznamenané rasy jsou virulentnější, a proto mohou vytlačovat rasy méně virulentní (Delmotte *et al.*, 2008; Virányi *et al.*, 1995). Oospory *P. halstedii* jsou schopny přežít v půdě po dobu až 10 let, a proto je více než pravděpodobné, že se v této lokalitě v budoucnu mohou objevit některé dosud nezaznamenané rasy.

Problematiku *P. halstedii* ještě ztěžuje možnost „cross“ infekcí, tj. přenos inokula mezi hostitelskými populacemi slunečnice a např. *Rudbeckia* (třapatka). Rivera *et al.* (2016) pomocí 15 polymorfních SSR markerů testovali celkem 232 vzorků *P. halstedii* pocházející

z 8 lokalit z USA a 1 lokality ve Francii (odebraných v letech 1883 až 2014). Autoři zjistili, že nové epidemie na *Rudbeckia fulgida* jsou vyvolány jinými genotypy *P. halstedii* než v minulosti (přelom 19.-20. století), a že izoláty z třapatky jsou geneticky odlišné od izolátů ze slunečnice, ale přesto ji mohou infikovat.

Biotrofní parazit *P. halstedii* je v současné době téměř celosvětově rozšířen, selekčním tlakem dochází k jeho rapidnímu genetickému vývoji a vzniku nových silně virulentních genotypů. Do roku 2013 bylo zjištěno celkem 24 ras *P. halstedii* v Evropě a 36 ras v Americe (Virányi *et al.*, 2015). Vysvětlením, proč jsou tato čísla tak vysoká, může být několik faktorů: 1/ šíření oospor *P. halstedii* na kratší vzdálenosti kontaminovanou půdou nebo obdělávání pozemků; 2/ šíření oospor na větší vzdálenosti větrem; 3/ na geograficky větší vzdálenosti na úrovni států jsou virulentní rasy zaváděny pouze prostřednictvím osiva (Virányi *et Spring*, 2011).

V Evropě v současných populacích *P. halstedii* převládají rasy 330, 700, 710 a 730. Rasy 700 a 730 byly identifikovány v 8 zemích, rasa 710 byla zaznamenána v 7 zemích. Pokud bychom srovnali seznam dominantních ras v Evropě před rokem 2007 (Gulya, 2007) a po roce 2013 (Virányi *et al.*, 2015), zjistili bychom, že se sice objevilo několik více virulentnějších ras *P. halstedii*, ale rasy dominantní v předchozích letech se v populacích stále vyskytují. Nejvyšší patogenní variabilita *P. halstedii* byla v roce 2013 zachycena v USA, v Kanadě a ve Francii. Výskyt nových ras na daném území je zapříčiněn buď přenosem semen, které jsou zdrojem nové rasy, a/nebo lokálním vývojem virulentní rasy (Virányi *et al.*, 2015). Některé evropské státy se poměrně intenzivně zabývají studiem a populační dynamikou ras *P. halstedii*. Např. ve Francii bylo detekováno celkem 14 ras *P. halstedii*, a to 100, 300, 304, 307, 314, 334, 700, 703, 704, 707, 710, 714, 717 a 730 (Delmotte *et al.*, 2012), v Maďarsku byl potvrzen výskyt ras 100, 330, 700, 704, 710, 714, 730, a 770 (Bán *et al.*, 2014), v Německu byly identifikovány rasy 100, 300, 310, 330, 700, 703, 710, 720, 730, 770 (Gulya, 2007) a ve Španělsku zase rasy 100, 130, 310, 330, 700, 703, 710, 730, 731 a 753 (Molinero-Ruiz *et al.*, 2002). Z těchto souhrnných poznatků vyplývá, že v minulosti převažovaly rasy 100, 700, 710 a 730 a nacházejí se ve všech čtyřech zmíněných zemích. V ČR nebyla patogenní variabilita *P. halstedii* studována v takovém rozsahu jako v jiných zemích Evropy, navíc její výskyt je spíše lokální. I přesto vyžaduje tento patogen značnou pozornost a další studium.

Posledních 10-15 let se objevují snahy vyvinout molekulární metody, které by rozlišily vnitrodruhovou variabilitu populací *P. halstedii* (As-sadi *et al.*, 2011; Thines *et al.*, 2005; Virányi *et Spring*, 2011). Nadějně se zdají být metody založené na tzv. sekvenování nové generace, NGS. Spolehlivou metodou by mohlo být 454 pyrosekvenování, pomocí kterého lze určit polymorfizmy ve formě jednonukleotidových záměn („single nucleotide polymorphism“, SNP) mezi různými rasami *P. halstedii* (As-sadi *et al.*, 2011).

V experimentální části této diplomové práce jsem se rovněž zabývala optimalizací podmínek PCR reakce u nově navržených mikrosatelitových markerů pomocí gradientové PCR a prováděla výběr variabilních markerů, které budou použity pro studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*. Ze 112 testovaných primerů došlo u 66 k úspěšné PCR amplifikaci a detekci PCR produktů. Důvodů, proč jsem u zbylých 46 primerů nezískala výsledný PCR produkt, může být několik. Jednak nesprávný výběr primerů ve výstupním souboru programu Primer3, který byl při designu použit (Sharma *et al.*, 2015). Program navrhuje kombinaci několika primerových sekvencí a pro některé markery nemusela být použita optimální varianta. Dalším důvodem mohou být např. rozdíly v primerových sekvencích sekvenovaného izolátu a v sekvencích izolátu použitého pro optimalizaci PCR podmínek v této práci. Z 66 funkčních markerů bylo 23 markerů vyloučeno z dalšího hodnocení pro svůj monomorfní charakter, tzn., že PCR produkty byly u těchto markerů detekovány ve formě jednoho bandu. Mohou být však dodatečně testovány na větším počtu izolátů, zejména ze vzdálenějších lokalit (zvyšuje se pravděpodobnost detekce dalších alel). U 16 markerů byl detekován záznam, který vylučuje možnost jejich dalšího využití. Hlavním výstupem této části diplomové práce je nalezení 27 polymorfních markerů s potenciálem dalšího využití genetické variability plísně na slunečnici. Pro srovnání počtu mikrosatelitových markerů v populačně genetických studiích u oomycet můžeme uvést například práci Stewart *et al.* (2016) využívající srovnatelný počet (21) polymorfních SSR markerů pro analýzu genetické struktury *Phytophthora sojae* v USA. Podobně ve studii Cai *et al.* (2013) bylo pro populačně genetickou studii *Anisogramma anomala* (vřeckovýtrusé houby, původce karanténní „východní spály“ lísky) použito 23 markerů (navrženo 236 markerů, u 228 došlo ke tvorbě PCR produktu, 214 markerů z nich bylo monomorfních). Pro rozlišení komplexu fusarióz napadající sóju (*Fusarium virguliforme*, *F. brasiliense*, *F. crassistipitatum*, *F. tucumaniae*) bylo použito 12 polymorfních markerů (108 lokusů testovaných) (Wang *et Chilvers*, 2016). Daleko nižší počet markerů (3) byl ale použit ve studii Knapová *et Gisi* (2002) pro analýzu izolátů *Phytophthora infestans* pocházející

z Francie a Švýcarska. Jako příklad daleko vyššího počtu použitých SSR markerů může sloužit studie Luo *et al.* (2015), ve které použili 82 markerů pro genotypizaci 21 izolátů biotrofní parazitické houby *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (rez plevová).

Pro další srovnání výsledků lze využít práci Rivera *et al.* (2016), ve které bylo odvozeno 15 polymorfních SSR markerů, které odlišily izoláty *P. halstedii* ze dvou druhů hostitelských rostlin, slunečnice (*H. annuus*) a třapatky (*Rudbeckia fulgida* cv. Goldstrum). Pomocí těchto markerů se podařilo dále postihnout jemnější rozdíly i mezi izoláty pocházejících z jednoho hostitele (8 podskupin pro izoláty ze slunečnice, 3 podskupiny pro třapatku). Z epidemiologického hlediska je zajímavé, že izolát *P. halstedii* z třapatky infikoval slunečnici a vykazoval fenotyp virulence odpovídající rase 734. Pro posouzení, zda se markery publikované v obou studiích překrývají, jsem provedla jednoduché srovnání vyhledáváním sekvencí primerů Rivera *et al.* (2016) v genomu *P. halstedii* z práce Sharma *et al.* (2015). Použila jsem vyhledávací funkci textového editoru v souboru genomu *P. halstedii* (fasta format), kdy byl pro každý z markerů Rivera *et al.* (2016) identifikován příslušný scaffold v genomu z práce Sharma *et al.* (2015). Při srovnávání tabulky primerových sekvencí bylo zjištěno, že pouze dvěma markerům (3593 a 250) z práce Rivera *et al.* (2016) odpovídají scaffoldy 262 a 1211 z práce Sharma *et al.* (2015; Supplementary Table 3). Pro scaffold 262 byly navrženy markery PH-011 a PH-012, pro scaffold 1211 markery PH-018 až PH-021. Pomocí software Mega 6 byla následně stanovena poloha primerů, přičemž bylo zjištěno, že žádný z lokusů navržených v obou studiích se nepřekrývá. Tyto lokusy leží v relativně těsné vzdálenosti v genomu *P. halstedii* a jejich současné použití v populačně genetických studiích není vhodné. Při porovnání s výsledky funkčních SSR markerů optimalizovaných v Tabulce č. 10 lze ale konstatovat, že se ani u jednoho z těchto šesti markerů (PH-011, PH-012, PH-018 - PH-021) nepodařilo optimalizovat podmínky PCR amplifikace.

Polymorfní markery optimalizované v této diplomové práci vhodně doplňují SSR markery publikované pro *P. halstedii* v práci Rivera *et al.* (2016) a představují velký potenciál pro další studium patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii*.

8. Závěr

V této práci jsem se zabývala studiem patogenní variability *Plasmopara halstedii* v České republice a testovala jsem mikrosatelitové markery, které by bylo možné použít pro populačně genetické studie *P. halstedii*.

Pomocí metody inokulace semenáčků bylo u 13 izolátů z roku 2014 identifikováno celkem 5 různých ras *P. halstedii* (71060, 70471, 70571, 71471, 71571). Nejvyšší variabilita byla zaznamenána na přírodní lokalitě u Podivína, kde byly nalezeny všechny uvedené rasy, naopak homogenní byla populace v Olomouci-Holici, kde byla v roce 2014 zaznamenána pouze rasa 71060.

Dalším úkolem práce bylo ověřit funkčnost navržených primerů a optimalizovat podmínky PCR reakce pro všech 112 mikrosatelitových markerů prostřednictvím gradientové PCR. Ze 112 testovaných markerů došlo u 66 k detekci PCR produktů. Markery poskytující PCR produkt byly dále podrobeny testování na podsouboru sedmi izolátů *P. halstedii*. U 27 mikrosatelitů proběhla amplifikace polymorfních produktů, 23 mikrosatelitů mělo monomorfní profil a 16 markerů nebylo možné vyhodnotit kvůli jejich komplexnímu patternu či slabé amplifikaci. Polymorfní marker PH-051 byl ověřen jako vhodný nástroj studia genetické variability populací *P. halstedii* na souboru 39 izolátů z ČR a Maďarska.

Předběžně lze usuzovat, že genotypový profil izolátů je pravděpodobně spojen s geografickým původem izolátů. Stejně jako u předchozích molekulárních studií provedených u patosystému *Helianthus annuus* – *Plasmopara halstedii* se nepodařilo prokázat souvislost mezi patogenitou (rasou) a genotypem izolátu.

9. Literatura

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, Ch. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. H., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 99-451.
- As-sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M., Bordat, A., Boniface, M., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L., Vincourt, P. (2011). Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics*, 12: 498.
- Bán, R., Kovács, A., Körösi, K., Perczel, M., Turoczi, G. (2014). First report on the increased distribution of pathotype 704 of *Plasmopara halstedii* in Hungary. *Disease Notes*, 98: 844.
- Bartůšek, T. (2013). Patogenní variabilita *Plasmopara halstedii* a rezistence vůči metalaxyly v České republice. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie a životního prostředí, 38.
- Bayraktar, H., Dolar, F. S., Tor, M. (2007). Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (pass.) labr., the cause of ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3): 341-347.
- Biasi, A., Martin, F., Schena, L. (2015). Identification and validation of polymorphic microsatellite loci for the analysis of *Phytophthora nicotianae* populations. *Journal of Microbiological Methods*, 110: 61-67.
- Bojňanský, V. (1956). Peronospora slnečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. & de Toni) v ČSR. *Pol'nohospodárstvo*, 3: 397-401.
- Bojňanský, V. (1957). Bude peronospora slnečnicová i u nás vážnou chorobou? *Za vysokou úrodu*, 6: 19.
- Bouterige, S., Tronchin, G., Lesourd, M., Marot-Leblond, A., Molinéro, V., Bouchara, J.-P., Robert, R. (2003). Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology*, 93: 1023-1030.
- CABI and EPPO. *Plasmopara halstedii*. Data Sheets on Quarantine Pests, 5 p. [http://www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Plasmopara_halstedii/PLASHA_ds.pdf, přístup 9. 1. 2016].

- Cai, G., Leadbetter, C. W., Muehlbauer, M. F., Molnar, T. J., Hillman, B. I. (2013). Genome-wide microsatellite identification in the fungus *Anisogramma anomala* using Illumina sequencing and genome assembly. *PLoS one*, 8 (11): 1-11.
- Carlsson, J. (2008). Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity*, 6: 616-623.
- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73 (3): 203-266.
- Constantinescu, O., Thines, M. (2010). *Plasmopara halstedii* is absent from Australia and New Zealand. *Polish Botanical Journal*, 55: 293-298.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504-509.
- Daniels, J., Holmans, P., Williams, N., Turic, D., McGuffin, P., Plomin, R., Owen, M. J. (1998). A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 62: 1189-1197.
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., Hansson, B., Bacon, I., Bird, S., Klein, A., Krupa, A. P., Lee, J. W., Gálvez, D. M., Simeoni, M., Smith, G., Spurgin, L. G., Burke, T. (2010). New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475-494.
- del Castillo-Múnera, J., Cárdenas, M., Pinzón, A., Castañeda, A., Bernal, A. J., Restrepo, S. (2013). Developing a taxonomic identification system of *Phytophthora* species based on microsatellites. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30 (2): 88-95.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. (2008). Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 534-540.
- Delmotte, F., Tourvieille de Labrouhe, D., Ahmed, S. (2012). Emerging races arising from recombination facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew *Plasmopara halstedii* in France. Proceedings of 18th International Sunflower Conference, Mar Del Plata & Balcarce, Argentina 27. 2.-1. 3. 2012, 4.
- Dick, M. W. (2001). Straminipilous fungi. Kluwer Academic, Dordrecht Publisher, 670.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

- Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès, B., Carlier, J., Tharreau, D., Giraud, T. (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44 (10): 933-949.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Review Genetics*, 5: 435-445.
- Engelbrecht, C., Harrington, T., Steimel, J., Capretti, P. (2004). Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. *Molecular Ecology*, 13: 2995–3005.
- Faircloth, B. C. (2008). MSATCOMMANDER: Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*, 8: 92–94.
- García-Ruiz, R., López-Rivera, S., García-Carneros, A. B., Molinero-Ruiz, L. (2012). Field incidence of sunflower downy mildew using seed dressing with metalaxyl-M. In: Proceedings of the 18th International Sunflower Conference. Mar del Plata, Argentina, 5.
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface M. C., Vear, F., Pichon, M., Godiard, L. (2015). The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology*, 16: 109-122.
- Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (2003). Microsatellites: Evolution and application. Oxford University Press, Eastbourne.
- Gulya, T. J. (1996). Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask. In: Proc. 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, U.S.A., 11.–12. 1. 1996, 39-48.
- Gulya, T. J. (2007). Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: Lebeda A., Spencer-Phillips P. T. N. (eds.) Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings of the 2nd International Downy Mildews Symposium. UP in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hané, Czech Republic, 121-134.
- Gulya, T. J., Miller, J. F., Virányi, F., Sackston, W. S. (1991). Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11-20.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., et al. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461: 393-398.
- Hudspeth, D. S. S., Stenger, D., Hudspeth, M. E. S. (2003). A *cox2* phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. *Fungal Diversity*, 13: 47-57.
- Hýsek, J. (2006). Plíseň slunečnicová (*Plasmopara halstedii*) – její šíření a nebezpečnost v posledních letech. *Agro – ochrana, výživa, odrůdy*, 11: 30-32.
- Chapuis, M. P., Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.

- Choi, Y.-J., Thines, M. (2015). Host jumps and radiation, not co-divergence drives diversification of obligate pathogens. A case study in downy mildews and *Asteraceae*. *PloS one*, 10 (7): 1-21.
- Christiakov, D. A., Hellemans, B., Volchaert, F. A. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 225: 1-29.
- Iliescu, H. (1980). La lutte contre le mildiou du tournesol par des traitements chimiques. In: *Proceedings IX Conferencia International del Girasol*. Torremolinos, Spain, 152-161. [http://isasunflower.org/fileadmin/documents/Proceedings/9thISC1980/1980Breeding/T1980BRE14_009.pdf, přístup 29. 2. 2016].
- Ioos, R., Barres, B., Andrieux, A., Frey, P. (2007). Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni* ssp. *alni*, and cross-amplification with related taxa. *Molecular Ecology Notes*, 7 (1): 133-137.
- IPM images (2016). Online. [<http://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5490505>, přístup: 9. 1. 2016].
- Jana, T., Sharma, T. R., Singh, N. K. (2005). SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research*, 109: 81-86.
- Kalina, T., Váňa, J. (2005). Sinice, řasy houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova, Praha, 606.
- Kanetis, L., Wang, X., Wadl, P. A., Neufeld, K., Holmes, G., Ojiambo, P. S., Cubeta, M. A., Trigiano, R. N. (2009). Microsatellite loci from the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1460–1466.
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A. C., Balmuth, A. L., Robert-Seilantantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D. J., MacLean, D., Jones, J. D. (2011). Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PloS Biology*, 9 (7): 1-21.
- Kiss, L., (1998). Natural occurrence of *Ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. *New Phytology*, 140: 709–714.
- Kokeš, P., Müller, J. (2004). Checklist of downy mildews, rusts and smuts of Moravia and Silesia. *Czech Mycology*, 56: 121-148.
- Kudlíková, I., Veverka, K. (1999). Výsledky šlechtění slunečnice na odolnost vůči chorobám. In: *Nové poznatky o vztahu hostitel – patogen*, 4. 11. 1999, Česká fytopatologická společnost, Praha, (Sborník referátů), 37-41.
- Lebeda, A., Mazáková, J., Táborský, V. (2006). Protozoa a Chromista: taxonomie, biologie a hospodářský význam. Česká fytopatologická společnost, Praha, 92.

- Lees, A. K., Wattier, R., Shaw, D. S., Sullivan, L., Williams, N. A., Cooke, D. E. L. (2006). Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, 55: 311-319.
- Lukman, R., Afifuddin, A., Lubberstedt, T. (2013). Unraveling the genetic diversity of maize downy mildew in Indonesia. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4 (2): 1-8.
- Luo, H., Wang, X., Zhan, G., Wei, G., Zhou, X., Zhao, J., Huang, L., Kang, Z. (2015). Genome-wide analysis of simple sequence repeats and efficient development of polymorphic SSR markers based on whole genome re-sequencing of multiple isolates of the wheat stripe rust fungus. *PloS one*, 10 (6): 1-18.
- Mayer, Ch. (2006-2010). Phobos - a tandem repeat search tool for complete genomes - Version 3.3.12. [http://www.ruhr-uni-bochum.de/spezzoo/cm/cm_phobos.htm, přístup 28. 4. 2016].
- Melero-Vara, J. M., Garcia-Baudin, C., Lopez-Herrera, C. J., Jimenez-Diaz, R. M. (1982). Control of sunflower downy mildew with metalaxyl. *Plant Disease*, 66: 132-135.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, Ch. (2000). Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*, 10: 72-80.
- Molinero-Ruiz, M. L., Dominguez, J., Gulya, T. J., Melero-Vara, J. M. (2005). Reaction of field populations of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) to metalaxyl and mefenoxam. *Helia*, 28: 66-74.
- Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M. Domínguez, J. (2002). Inheritance of resistance to race 330 of *Plasmopara halstedii* in three sunflower lines. *Plant Breeding*, 121: 61-65.
- Molinero-Ruiz, M. L., Melero-Vara, J. M., Gulya, T. J., Dominguez, J. (2003). First report to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by *Plasmopara halstedii* in Spain. *Plant Disease*, 87: 749-749.
- Mulpuri, S., Liu, Z., Feng, J., Gulya, T. J., Jan, C-C. (2009). Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene *Pl₁₃* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 795-803.
- Oliveira, E. J, Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 294-307.
- Orellana, R. G. (1970). Resistance and susceptibility to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 97: 91-97.
- Primmer, C. R., Moller, A. P., Ellegren, H. (1996). A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology*, 5: 365-378.

- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merila, J. (2005). Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*, 36: 348-360.
- Prospero, S., Black, J. A., Winton, L. M. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death. *Molecular Ecology Notes*, 4: 672-674.
- Qi, L. L., Foley, M. E., Cai, X. W., Gulya, T. J. (2016). Genetics and mapping of a novel downy mildew resistance gene, *Pl₁₈*, introduced from wild *Helianthus argophyllus* into cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1-12.
- Rashid, K. Y. (2014). Changes in sunflower downy mildew races in Manitoba, 2004–2013. National Sunflower Association. Research Forum. [http://www.sunflowernsa.com/uploads/research/1221/rashid_changes.dm.races.2004-13.poster_2014.pdf, přístup 23. 3. 2016].
- Rivas, G., Zapater, M., Abadie, C., Carlier, J. (2004). Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. 13: 471–482.
- Rivera, Y., Creswell, T. C., Ruhl, G., Crouch, J. A. (2015). First report of downy mildew caused by *Plasmopara halstedii* on native *Rudbeckia fulgida* Aiton var. *speciosa* (Wender.) Perdue in Indiana. *Plant Disease*, 99: 1278.
- Rivera, Y., Salgado-Salazar, C., Gulya, T. J., Crouch, J. A. (2016). Newly emerged populations of *Plasmopara halstedii* infecting rudbeckia exhibit unique 2 genotypic profiles and are distinct from sunflower-infecting strains. *Phytopathology*, in press, [<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-12-15-0335-R>, přístup 25. 4. 2016].
- Rouxel, M., Papura, D., Nogueira, M., Machefer, V., Dezette, D., Richard-Cervera, S., Carrere, S., Mestre, P., Delmotte, F. (2012). Microsatellite markers for characterization of native and introduced populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Applied and environmental microbiology*, 78 (17): 6337-6340.
- Sackston, W. E. (1981). Downy mildew of sunflower. In: The downy mildews (Ed. by Spencer, D. M.), Academic Press, London, UK, 545-575.
- Sedlář, J., Sedlářová, M., Flusser, J. (2009). Image processing methods for determination of downy mildews from light microscopy images. In: Signal Processing Symposium. 28.-30. 5. 2009, Warsaw, Poland, 4.
- Sedlářová, M., Pospíchalová, R., Drábková Trojanová, Z., Bartůšek, T., Slobodianová, L., Lebeda, A. (2016). First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from Czech Republic – short communication. *Plant Protection Science*, in press.
- Sedlářová, M., Stojaspal, K., Lebeda, A. (2010). Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*, původce plísně slunečnice, v České Republice. *Rostlinolékař*, 1: 17-20.

- Sedlářová, M., Trojanová, Z., Lebeda, A. (2013). Distribution and harmfulness of *Plasmopara halstedii* on sunflower in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 49: 1-10.
- Sharma, R., Xiaojuan, X., Cano, L. M., Evangelisti, E., Kemen, E., Judelson, H., Oome, S., Sambles, Ch., van den Hoogen, D. J., Kitner, M., Klein, J., Meijer, H. J. G., Spring, O., Win, J., Zipper, R., Bode, H. B., Govers, F., Kamoun, S., Schornack, S., Studholme, D. J., van den Ackerveken, G., Thines, M. (2015). Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. *BMC Genomics*, 16: 741-764.
- Shetty, K. (1998). Managing metalaxyl-resistance in *Plasmopara halstedii* from a chemical company perspective. *Proceedings of the International Sunflower Association Symposium III, Sunflower Downy Mildew*. Fargo, ND, U.S.A., 74-78.
- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA., 109: 365-371.
- Spring, O. (2001). Non-systemic infections of sunflower with *Plasmopara halstedii* and their putative role in the distribution of the pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 108: 3029-336.
- Spring, O., Zipper, R., Heller-Dohmen, M. (2006). First report of metalaxyl resistant isolates of *Plasmopara halstedii* on cultivated sunflower in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113: 224.
- Spurný, M. (2005). Hybridy slunečnice Rustica úspěšné v boji proti plazmopaře. In: Řepka, mák, slunečnice a hořčice. Sborník referátů 22.-23. 2. 2005, Česká společnost na ČZU v Praze a Katedra rostlinné výroby, Praha, 146-166.
- Stewart, S., Robertson, A. E., Wickramasinghe, D., Draper, M. A., Michel, A., Dorrance, A. E. (2016). Population Structure Among and Within Iowa, Missouri, Ohio, and South Dakota Populations of *Phytophthora sojae*. *Plant Disease*, 100 (2): 367-379.
- Stewart, S., Wickramasinghe, D., Dorrance, A. E., Robertson, A. E. (2011). Comparison of three microsatellite analysis methods for detecting genetic diversity in *Phytophthora sojae* (Stramenopila: Oomycete). *Biotechnology letters*, 33 (11): 2217-2223.
- Stojaspal, K. (2009). Studium interakcí slunečnice - *Plasmopara halstedii*. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, 58.
- Šedivý, J., Chod, J., Kodys, F., Kúdela, V., Sychrová, E., Šebesta, J. (1977). Klíč k určování chorob a škůdců polních plodin. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 485.
- Šindelková, M., Brnický, P., Svobodová, I., Šamánek, J. (2008). Plíseň slunečnice *Plasmopara halstedii*. Ministerstvo zemědělství, 167-172.

- Thines, M., Komjati, H., Spring, O. (2005). Exceptional length of ITS in *Plasmopara halstedii* is due to multiple repetitions in the ITS-2 region. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 395-398.
- Tobler, K., Ackermann, M., Griot, C. (2003). SARS-agent and lessons to be learned from pathogenic coronaviruses of animals. *Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde (Switzerland)*. 316-322.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Gulya, T., Maširevic, S., Penaud, A., Rashid, K., Virányi, F. (2000). New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, 61-66.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Mestries, E., Walser, P., (2005). Quelles perspectives pour la lutte genetique vis-a-vis du mildiou du tournesol? *Oleagineux*, 7: 404-405.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Leguillon, M., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P., Vear, F. (2012). Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proceedings of 18th International Sunflower Conference, Mar Del Plata & Balcarce, Argentina. 27. 2.-1. 3. 2012.
- Trigiano, R. N., Wadl, P. A., Dean, D., Hadziabdic, D., Scheffler, B. E., Runge, F., Telle, S., Thines, M., Ristaino, J., Spring, O. (2012). Ten polymorphic microsatellite loci identified from a small insert genomic library for *Peronospora tabacina*. *Mycologia*, 104 (3): 633-640.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15): 1-12.
- Veverka, K., Křížková-Kudlíková, I. (2006). Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: Sborník abstraktů XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin, 12.-14. 9. 2006, ČZU Praha, 287-288.
- Viljoen, A., Wyk van, P. S., Nowell, D. C., Gulya, T. J. (1997). Occurrence of downy mildew on sunflower in South Africa. *Disease Notes*, 81: 111.
- Vincourt, P., As-sadi, F., Bordat, A., Langlade, N. B., Gouzy, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Serre, F., Godiard, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F. (2012). Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 909-920.

- Virányi, F., Gulya, T. J., Tourvieille de Labrouhe, D. (2015). Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different continents. *Helia*, 38: 149-162.
- Virányi, F. (2002). The sunflower – *Plasmopara halstedii* pathosystem: Natural and artificially induced coevolution. In: Spencer-Philips, P. T. N, Gisi, U., Lebeda, A. (eds.): *Advances in Downy Mildew Research. Volume 1*. Kluwer Academic Publisher, London, UK, 167-172.
- Virányi, F., Gulya, T. J. (1995). Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* from Hungary. *Plant Pathology*, 44: 619-624.
- Virányi, F., Spring, O. (2011). Advances in sunflower downy mildew research. *European Journal of Plant Pathology*, 129: 207-220.
- Wang, J., Chilvers, M. I. (2016). Development and characterization of microsatellite markers for *Fusarium virguliforme* and their utility within clade 2 of *Fusarium solani* species complex. *Fungal Ecology*, 20: 7-14.
- Wang, Y., Chen, M., Wang, H., Wang, J. F., Bao, D. (2014). Microsatellites in the genome of the edible mushroom, *Volvariella volvacea*. *BioMed research international*, 1-10.
- Watson, D. J., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Losick, R. (2008). *Molecular biology of the gene*, sixth edition. Pearson International Education/Personal Education, Inc., San Francisco.
- Wehtje, G., Zimmer, D. E. (1978). Downy mildew of sunflower: biology of systematic infection and the nature of resistance. *Phytopathology*, 68: 1568-1571.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 427.
- Winton, L. M., Krohn, A. L., Leiner, R. H. (2007). Microsatellite markers for *Sclerotinia subarctica* nom. prov., a new vegetable pathogen of the High North. *Molecular Ecology Notes*, 7 (6): 1077-1079.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Piálek, J. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum, Praha, 310.

10. Přílohy

10.1. Seznam použitých zkratek

A	Adenin
AA	Akrylamid
AFLP	„Amplified fragment length polymorphism“, polymorfizmus délky amplifikovaných fragmentů
AgNO ₃	Dusičnan stříbrný
bp	„Base pair“, páry bází
C	Cytosin
CO ₂	Oxid uhličitý
CTAB	Cetyltrimethylamoniumbromid
dH ₂ O	Deionizovaná voda
DNA	„Deoxyribonucleic Acid“, deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
F	„Forward“ primer
G	Guanin
H ₃ BO ₃	Kyselina boritá
HNO ₃	Kyselina dusičná
ISSR	„Inter simple sequence repeat“, nemá český ekvivalent
Mb	„Mega base“, mega báze
Na ₂ CO ₃	Uhličitan sodný
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraoctan sodný
Na ₂ S ₂ O ₃	Thiosíran sodný
NaAc	Octan sodný
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NGS	„Next-generation sequencing“, sekvenační metody nové generace
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Peroxodisíran amonný
PAA gel	Polyakrylamidový gel
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, polymerázová řetězová reakce
R	„Reverse“ primer

RAPD	„Random amplified polymorphic DNA“, variabilita délek náhodně amplifikované DNA
SSR	„Simple sequence repeats“, repetice jednoduchých sekvencí
STR	„Short tandem repeats“, krátké tandemové repetice
T	Thymin
Ta	„Temperature of annealing“, teplota nasedání primerů
0,5x TBE pufr	0,5x Tris-borát-EDTA pufr
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylendiamin
Tm	„Temperature of melting“, teplota tání
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultrafialové světlo

10.2. Použité chemikálie

10x Kapa *Taq* Buffer with Dye (Promega)
3-methakryloxypropyltrimethoxysilan (Silan) (Serva)
AFLP[®] DNA ladder 30–330 bp (Invitrogen)
Agaróza (Serva)
Akrylamid (Merck)
Akrylamid-BIS směs (Merck)
Bromfenolová modř (Serva)
CTAB (Sigma)
Deionizovaná voda
Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP) (Promega)
Dusičnan sodný (Prolabo)
Dusičnan stříbrný (Lachner)
Etanol 96% roztok (Sigma – Aldrich)
Ethidium bromid (Sigma)
Ethyldiamintetraacetát disodný (Sigma)
Ethyldiamintetraoctová kyselina (Lachema)
Formaldehyd (Lachner)
Formamid (Lachema)
Gel Red[™] Nucleid Acid, Gel Stain, 10,000x in water (Biotium)
Chlorid sodný (Lachner)
Chloroform (Lachner)
Isoamylalkohol (Lachner)
Isopropanol (Lachner)
Kapa *Taq* DNA polymeráza 5 U/μl (Promega)
Kyselina boritá (Lachner)
Kyselina dusičná (Merck)
Kyselina octová 0,5% (Lachner)
Merkaptoethanol (Sigma)
N, N, N', N' - tetramethylethyldiamin (Merck)
Octan sodný (Tamda)
Peroxodisíran amonný (Merck)
Primery – forward, reverse (Macrogene)

Rain-X Repelent, Clear Vue (Turtle Wax)

RNasa A, zásobní roztok 20 mg/ml, (Sigma)

Thiosíran sodný (Lachema)

Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Sigma)

Uhlíčitan sodný (Lachner)

Xylenová modř (Applichem)

10.3. Přístroje a laboratorní vybavení

Centrifuga, 5804 R (Eppendorf)

Digestoř (Merci)

Digitální kamera Kodak, Edas 290 (Kodak)

Elektroforetická komůrka, Hoeffler HF33 (Hoefler)

Elektroforetické zdroje, Minis 300 a MP-2000P (Major Science)

Elektroforéza T – REX, OWL S3S (Thermo Scientific)

Chladnička (Liebherr)

Kultivační skříň (Sanyo)

Mikropipeta, 0,1 – 2,5 µl (Eppendorf)

Mikropipeta, 0,5 – 10 µl (Eppendorf)

Mikropipeta, 1 – 10 µl (Finnpipette)

Mikropipeta, 1 – 10 µl (Swiss)

Mikropipeta, 10 – 100 µl (Eppendorf)

Mikropipeta, 100 – 1000 µl (Eppendorf)

Mikroskop CX 31 (Olympus)

Mikrovlnná trouba, ETA 3203, (ETA)

Minicentrifuga, MCF 2360 (LMS)

Nanodrop, ND-1000 (Thermo Scientific)

Negatoskop, ELLA NHQ1R (Legros)

Osmikanálová pipeta, 1 - 10 µl (Eppendorf)

PCR cyklér, Master cycler, pro S (Eppendorf)

Sušárna, HS62A (Chirana)

Thermocycler, TC-XP (Bioer)

Třepačka, GFL 3017 (Merci)

UV transiluminátor, UVITEC (Cambridge)

Váhy, PM 2000 (Mettler)

Vortex – Minishaker, MS2 (IKA)

Výrobník deionizované vody, Aqual 29 XL (Aqual)

Výrobník ledu, Icematic F 100, Compact (Castel Mac)

10.4. Použité roztoky

Akrylamid (6% zásobní roztok)

- 420 g močoviny
- 484 ml deionizované vody
- 50 ml 10x TBE
- 150 ml 40% zásobního roztoku akrylamid: N,N'-metylenbisakrylamid 19:1
- po rozpuštění všech složek přefiltrovat a uskladnit v temné láhvi ve 4 °C (lednice)

Akrylamid: N,N'-metylenbisakrylamid 19:1 (40% zásobní roztok)

- 380 g akrylamidu
- 20 g N,N'-metylenbisakrylamidu
- vše rozpustit v 500 ml deionizované vody a doplnit do objemu 1 l
- roztok nalít do temné láhve a uchovávat ve 4 °C

CTAB, extrakční pufr

- 4 g CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid)
- 20 ml Tris ($1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 8
- 8 ml EDTA ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 8
- 56 ml NaCl ($5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
- 80 ml dH₂O
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 200 ml

Dusičnan stříbrný AgNO₃ (0,1% roztok)

- 2 g AgNO₃
- rozpustit v 1 l deionizované vody, poté doplnit do 2 l
- těsně před použitím přidat 3 ml formaldehydu

Ethylendiamintetraoctová kyselina EDTA ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8)

- 37,22 g EDTA
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 200 ml, upravit pH pomocí NaOH, poté autoklávovat

Fix/stop roztok

- 165 ml ledové kyseliny octové
- doplnit do 2000 ml deionizovanou vodou

Chlorid sodný NaCl ($5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

- 17,5 g NaCl
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 60 ml

Kyselina dusičná HNO₃ (1% roztok)

- 18 ml konc. kyseliny dusičné HNO₃
- doplnit deionizovanou vodou do objemu 1200 ml

Nanášecí pufr

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

Octan sodný NaAc (3 mol·l⁻¹, pH 5,2)

- 24,61 g NaAc
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml, upravit pH ledovou kyselinou octovou, poté autoklávovat a uchovávat v lednici při teplotě 4°C

Peroxodisíran amonný (NH₄)₂S₂O₈ (10% zásobní roztok)

- 1 g (NH₄)₂S₂O₈ rozpustit v 10 ml deionizované vody
- Rozpipetovat do mikrozkušavek po 400μl a uchovávat při teplotě - 20 °C

Polyakrylamidový gel (6%)

- 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu
- 46,7 μl N,N,N',N'- tetramethylethyldiaminu (TEMED)
- 467 μl 10% roztoku peroxodisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈

TBE pufr (10 x zásobní roztok)

- 108 g Tris
- 55 g kyseliny borité H₃BO₃
- 40 ml roztoku Na₂EDTA 0,5 mol·l⁻¹, pH 8,0
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 1 l

Tris(hydroxymethyl)aminomethan Tris (1 mol·l⁻¹, pH 8)

- 12,11 g Tris
- doplnit deionizovanou vodou do celkového objemu 100 ml, upravit pH pomocí NaOH, poté autoklávovat

Vývojka

- 45 g uhličitanu sodného Na₂CO₃
- rozpustit v cca 1 l deionizované vody, poté doplnit do 1,5 l
- vychladit v lednici (4 °C), krátce před použitím přidat 2,25 ml formaldehydu a 300 μl thiosíranu sodného Na₂S₂O₃