

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Dizertační práce

Zhodnocení genetické struktury *Mycosphaerella graminicola* a četnost výskytu alely rezistence ke QoI fungicidům v populaci na území České republiky

Praha 2012

Doktorand: Ing. Jana Drabešová

Školitel: Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Konzultant: Ing. Miloslav Zouhar, PhD.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a použila jsem jen zdrojů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

podpis:

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat mému školiteli Prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi za vedení práce a podporu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lubomíru Věchetovi, Csc. za poskytnutí části izolátů pro tuto práci a celému kolektivu katedry ochrany rostlin za rady a spolupráci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a mému příteli za všestrannou podporu po celou dobu mého studia

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. <i>MYCOSPHAERELLA GRAMINICOLA</i>	3
2.1.1. Taxonomické zařazení	3
2.1.2. Obecná charakteristika	3
2.1.3. Vývojový cyklus a rozmnožování	4
2.1.3.1. Pohlavní typy <i>M. graminicola</i>	5
2.1.4. Charakteristika genomu <i>M. graminicola</i>	6
2.1.4.1. Postradatelné, nadpočetné, mini nebo také 'B' chromosomy	6
2.1.4.1.1. Postradatelné chromosomy u <i>M. graminicola</i>	7
2.1.5. Epidemiologie	8
2.1.6. Ochranná opatření	10
2.1.6.1. Biologická ochrana	10
2.1.6.2. Rezistentní odrůdy	10
2.1.6.2.1. Princip gen proti genu (gene-for-gene)	11
2.1.6.2.2. Rezistence pšenice k <i>M. graminicola</i>	11
2.1.6.3. Fungicidní ochrana v České republice	14
2.1.6.3.1. Strobilurinové fungicidy (QoI inhibitory)	14
2.1.6.3.2. Rezistence houbových patogenů k fungicidům	16
2.1.6.3.2.1. Rezistence houbových patogenů ke strobilurinům	17
2.1.6.3.2.2. Rezistence <i>M. graminicola</i> ke strobilurinům	18
2.2. POPULAČNÍ GENETIKA PATOGENŮ	18
2.2.1 Populační genetika <i>M. graminicola</i>	19
2.2.2 Molekulární metody využívané ke studiu genetické struktury populací patogenů	21
2.2.2.1. RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA	21
2.2.2.2. RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism	21
2.2.2.3. SSRs – Simple Sequence Repeat – Microsatellites	22
2.2.2.4. AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism	22
2.2.2.5. DNA Sekvence	23
3. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	24
4. MATERIÁL A METODY	25
4.1. ZÍSKÁNÍ VZORKŮ Z ČESKÝCH POPULACÍ	25
4.1.1. Izolace jednotlivých izolátů a jejich kultivace	26
4.1.2. Extrakce DNA	27
4.2. GENETICKÁ STRUKTURA POPULACE	28
4.2.1. Metoda SSR markerů	28
4.2.2. Analýza dat	29
4.2.3. Genetická diferenciacie a migrace mezi evropskými populacemi	30
4.3. ROZLIŠENÍ POHLAVNÍCH TYPŮ	31
4.3.1. Analýza dat	32
4.4. DETEKCE QOI REZIDENTNÍ ALELY METODOU PCR-RFLP	32
4.4.1. Fungicidní test	34

5. VÝSLEDKY	36
5.1. GENETICKÁ DIVERZITA A STRUKTURA ČESKÉ POPULACE.....	36
5.2. ROZLIŠENÍ POHLAVNÍCH TYPŮ	40
5.3. GENETICKÁ DIFERENCIACE ČESKÝCH POPULACÍ V POROVNÁNÍ SE ZÁPADNÍ EVROPOU	41
5.4. DETEKCE REZISTENTNÍ ALELY GENU <i>CYT B</i> V ČESKÉ POPULACI	45
6. DISKUSE	47
6.1. GENETICKÁ DIVERZITA <i>M. GRAMINICOLA</i>	47
6.2. POPULAČNÍ STRUKTURA V ČESKÉ REPUBLICE	48
6.3. ČESKÉ POPULACE SE ODLIŠUJÍ OD POPULACÍ ZÁPADNÍ EVROPY	49
6.4. VÝSKYT A ROZŠÍŘENÍ REZISTENCE KE STROBILURINOVÝM FUNGICIDŮM.....	50
7. ZÁVĚR.....	53
8. PŘEHLED LITERATURY.....	54
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	68
10. PŘÍLOHY	70
11. PŘEHLED VLASTNÍ PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	79

1. Úvod

Pšenice (*Triticum aestivum* L.) je jedna z nejdůležitějších obilovin na světě a v mnohých oblastech je základním zdrojem potravy. V roce 2010 se pšenice pěstovala téměř na 217 milionech hektarů a bylo sklizeno okolo 650 miliónů tun zrna. V České republice byla v témže roce pěstována pšenice na 833 tisících hektarech a celková produkce zrna byla více než 4 milióny tun (data získaná z FAO).

Braničnatka pšeničná je jednou z významných listových chorob pšenice rozšířená ve všech oblastech pěstování pšenice na světě. V České republice se od 80. let minulého století její význam postupně zvyšuje. Za vhodných podmínek, jako je vlhko a nižší teploty, může způsobit ztráty na výnosu 30 až 50 %.

Tento patogen se rozmnožuje jak nepohlavně, tak pohlavně. Pohlavní rozmnožování má velký vliv na epidemiologii i populační strukturu patogenu. Znalost genetické struktury braničnatky pšeničné může být nápomocna při odhadech, například jak rychle si patogen může vytvořit rezistenci k novým fungicidům, nebo jak rychle překoná geny rezistence v rezistentních odrůdách. Genetická struktura populací tohoto patogenu byla již prostudována jak z hlediska globálního, tak lokálního, populace na území České republiky však nebyly do žádné z těchto studií zahrnuty. Předpokládáme, že jejich struktura bude podobná populacím z jiných evropských států. Informace jsou ale dostupné zatím jen ze států západní Evropy a je možné, že díky jiné pěstitelské a šlechtitelské praxi v průběhu druhé poloviny posledního století, bude místní populace mírně odlišná.

Většina v České republice pěstovaných odrůd pšenice je náchylná až středně rezistentní k braničnatce pšeničné. Proto je stále nejvíce využívaným ochranným opatřením fungicidní ochrana. V západoevropských zemích se před deseti lety objevily rasy *M. graminicola* rezistentní k některým skupinám fungicidů. Popsána byla rezistence k oběma hlavním skupinám fungicidů tzv. azolům a strobilurinům. Rezistence ke strobilurinovým fungicidům se může objevit na polích často ošetřovaných přípravky z této skupiny, a to nezávisle na genetickém pozadí dané populace. Od roku 2000 v ČR rapidně stoupla spotřeba strobilurinových fungicidů pro obilniny a v roce 2002 byly v malém vzorku populace objeveny rezistentní v in vitro podmínkách, lze tedy předpokládat, že se i zde

vyskytují rezistentní rasy *M. graminicola* ve vyšší míře. Tato práce by měla pomoci objasnit četnost jejího výskytu, popřípadě, zda se na našem území objevila nezávisle na okolních populacích nebo se sem rozšířila díky větrem přenosným askospóram ze západu.

2. Literární přehled

2.1. *Mycosphaerella graminicola*

Mycosphaerella graminicola je houbový patogen s českým názvem braničnatka pšeničná, způsobující chorobu nazývanou tečkovaná listová skvrnitost pšenice (jarní, ozimé i tvrdé).

2.1.1. Taxonomické zařazení

Mycosphaerella graminicola (Fuckel) J. Schröt. in Cohn (anamorpha: *Septoria tritici* Roberge in Desmaz.).

Říše: Houby

Kmen: Vřeckovýtrusné (Ascomycota)

Třída: Loculoascomycetes (vláknité ascomycety)

Řád: Dothideales

Čeleď: Mycosphaerellaceae

Rod: *Mycosphaerella*

Druh: *graminicola*

(Orton et al., 2011).

Rod *Mycosphaerella*, který nyní obsahuje několik různých čeledí i rodů, byl v nedávné době reorganizován a na základě porovnání 28S nrDNA sekvencí byl vytvořen nový rod *Zymoseptoria*, který by měl slučovat *Septorii*-podobné druhy vyskytující se na obilninách a jim příbuzných rostlinách. Tudíž bylo navrženo přejmenování *M. graminicola* na *Zymoseptoria tritici* (Quaedvlieg et al., 2011).

2.1.2. Obecná charakteristika

Anamorfu houby - *Septoria tritici* - poprvé popsal Desmarièze ve Francii již roku 1842, zatímco její teleomorfa *M. graminicola* byla se *S. tritici* spojena teprve o více než sto let později na Novém Zélandu (Sanderson, 1972). Poté bylo objevení této houby hlášeno ze

všech kontinentů s výjimkou většiny jihozápadní Asie. Předpokládá se, že tato houba pochází ze středního východu z oblasti úrodného půlměsíce, dnešního Iránu (McDonald et al., 1999; Stukenbrock et al. 2007; Medini & Hamza, 2008), kde se přizpůsobila pšenici během jejího procesu domestikace z planých trav, přibližně 8000 – 9000 př. n. l. (Stukenbrock & McDonald, 2008; Stukenbrock et al., 2010).

Její výskyt je nejhojnější především v oblastech s mírným klimatem (vlhké zimy s mírnými teplotami) (Eyal, 1999), kam patří i Česká republika. Epidemie této choroby může vést k závažným ztrátám na výnosech 30 až 50 % (Eyal et al., 1987).

Poslední dvě století byla mnohem významnějším patogenem pšenice braničnatka plevová (*Phaeosphaeria nodorum*), ale v osmdesátých letech se poměr mezi těmito dvěma patogeny obrátil a nyní se ve větší míře vyskytuje především *M. graminicola* (Shaw et al., 2008). I v České republice se ve sledovaných letech 2001-10 napadení *M. graminicola* výrazně zvýšilo (Šíp et al., 2011).

Až do šedesátých let nebyla diagnostika onemocnění způsobeného *M. graminicola* dobře rozvinutá dokonce ani mezi fytopatology. Pěstiteli byla viděna jako část přírodního procesu zrání. Na listu mohl být přítomen jakýkoliv z několika patogenů listových skvrnitostí, který přispěl k odumírání listů. Když byla choroba rozeznána, byla často nazývána „vrcholová septorióza“, kterou nyní známe pod názvem pyknidiální plevová skvrnitost (původce *P. nodorum*) a „listová septorióza“, kterou nyní známe pod názvem tečkovaná listová skvrnitost pšenice (původce *M. graminicola*). Obě se mohou často vyskytovat společně, zároveň s dalšími patogeny a obě mohou způsobit symptomy na všech nadzemních částech rostliny pšenice (Scharen et al., 1999).

Symptomy obou onemocnění jsou si velmi podobné. Je těžké je od sebe rozlišit bez použití lupy nebo mikroskopu. Léze způsobené oběma patogeny se mohou vyskytovat na stejném listu, mohou se vzájemně překrývat a tím ztěžovat diagnostiku (DiLeone et al., 1996).

2.1.3. Vývojový cyklus a rozmnožování

První příznaky způsobené oběma braničnatkami jsou žluté skvrny na spodních listech rostliny (DiLeone et al., 1996). Za optimálních podmínek 20-25 °C a vysoké relativní vlhkosti se obvykle příznaky objevují do deseti dnů po penetraci (Kema et al.,

1996b). K té dochází po vyklíčení sexuálních i asexuálních spor téměř výhradně přes průduchy (Duncan & Howard, 2000). Tato fáze růstu byla popsána jako biotrofická, přesto, že zde není žádný důkaz přijímání živin a nejsou zde žádné speciální vyživovací orgány vyskytující se u jiných patogenů, jako například haustoria nebo arbuskuly. Patogen v této fázi zřejmě využívá mechanismus programované buněčné smrti hostitele, obvykle spíše spojované s obrannou reakcí hostitele (Keon et al., 2007). Odumírání mezofylových buněk se projevuje chlorózami a nekrózami listů. Za optimálních podmínek se během 14-21 dnů v lézích objevují černo-hnědé kulovité pyknidy (Eyal et al., 1987). Po delší době ovlhčení jsou z otvoru pyknidy vytlačovány vyzrálé pyknidiospory v extracelulární hmotě (cirrus), která obsahuje $5-10 \times 10^3$ spor (Eyal, 1971). Proces vývoje askospor zatím nebyl detailně popsán, ale víme, že *M. graminicola* je heterotalická houba, a proto potřebuje k tvorbě pseudothecií obsahujících askospory dva jedince různých pohlavních typů, přítomné na stejném místě ve stejném čase (Kema et al., 1996a).

2.1.3.1. Pohlavní typy *M. graminicola*

Geny určující pohlavní typ jsou důležitou částí biologie a evoluce různých druhů hub. Znalost těchto genů proto může odhalit přítomnost a rozšíření pohlavního rozmnožování u různých druhů (Pöggeler et al., 2001).

U většiny vřeckovýtrusných hub je pohlavní rozmnožování řízeno geny umístěnými na takzvaném MAT lokusu. Tento lokus má dvě rozdílné alely a pouze v přítomnosti dvou jedinců s různými alelami může dojít k pohlavnímu rozmnožování (Kronstad & Staben, 1997).

Stejně jako u mnoha jiných jsou i u *M. graminicola* pohlavní typy určeny dvěma různými alelami, a to *mat1-1* a *mat1-2* (Kema et al., 1996a). Tyto alely jsou nazývány izomorfami, protože postrádají důležitou sekvenční shodu (Turgeon, 1998). Zhan et al. (2002b) ověřili na celkem 2035 izolátech hypotézu, že tyto dva pohlavní typy se v přírodních populacích vyskytují v rovnováze ve všech geografických regionech několika kontinentů, což je dalším důkazem častého pohlavní reprodukce tohoto patogenu. Toto v pozdějších letech potvrdily i další studie zkoumající diverzitu *M. graminicola* jednotlivých států (Abrinbana et al., 2010; Siah et al., 2010).

Pohlavní typ také do jisté míry ovlivňuje patogenitu jednotlivých izolátů. Pohlavní typ MAT1-1 měl během jednoho testování v průměru o 14-22 % větší patogenitu než izoláty pohlavního typu MAT1-2 (Zhan et al., 2007).

2.1.4. Charakteristika genomu *M. graminicola*

V roce 2011 byl kompletně sekvenován genom *M. graminicola* (Goodwin et al., 2011), což je obrovským přínosem pro další výzkum týkající se tohoto patogenu, ale i pro fytopatologii obecně. Prvním sekvenovaným izolátem byl holandský izolát s názvem IPO 323.

Celý genom *M. graminicola* se skládá ze dvou částí. První částí je takzvaný dispensom, který zahrnuje všechny části genomu, které mohou u některých izolátů částečně nebo zcela chybět, bez toho aniž by se projevil nějaký negativní vliv na růst patogenu, jeho rozmnožování nebo virulenci k hostiteli. U izolátu *M. graminicola* IPO 323 to bylo celkem osm chromosomů, u jiných izolátů to mohou být i další, ještě nepopsané. Druhou částí je hlavní („core“) genom skládající se z chromosomů, které jsou přítomny vždy, ve všech izolátech, pravděpodobně proto, že obsahují geny pro vitalitu nebo přežití, které nemohou být ztraceny. Kompletní genom měl velikost 39,7 Mb a skládal se z celkem 21 chromosomů, 8 z nich bylo postradatelných, původ postradatelných chromozómů zatím není zcela znám, ale zdá se, že vznikly při starověkém horizontálním transferu z neznámého dárce (Goodwin et al., 2011).

2.1.4.1. Postradatelné, nadpočetné, mini nebo také ‘B’ chromosomy

Tyto chromozomy byly objeveny u mnoha druhů rostlin, zvířat i hub. Poprvé byly popsány v roce 1907 u stejnokřídlého hmyzu (Wilson, 1907). V roce 1928 byly tyto chromozomy nalezeny u kukuřice a postupem času jim byl připisován různý význam (Randolph, 1941). V roce 1995 Jones definoval “B” chromosomy jako “postradatelné a nadbytečné chromosomy, u kterých nedochází k rekombinaci se žádným ze základních tzv. “A” chromosomů a které mají nepravidelnou dědičnost nepodléhající Mendlovým pravidlům.

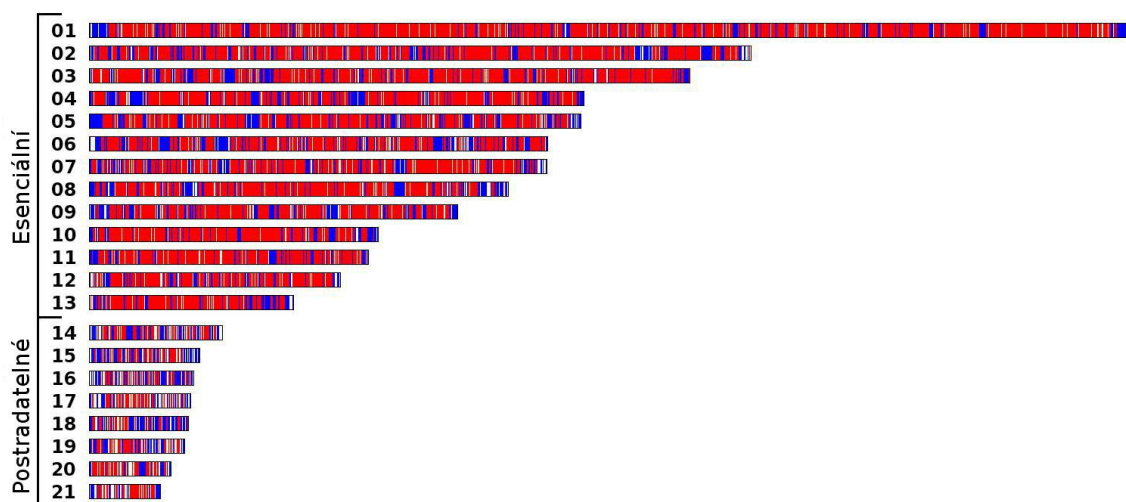
Název “postradatelné” chromosomy zdůrazňuje jejich hlavní vlastnost a to, že nejsou vždy přítomny u všech zástupců daného druhu (houby). Jelikož jsou tyto chromosomy rozšířeny náhodně, je zřejmé, že nemohou nést geny, které jsou nezbytné pro

základní, saprofytický, růst (Covert, 1998). Označení “postradatelný” může značit něco méněcenného nebo podřadného, ale několik příkladů z říše hub svědčí o opaku. V roce 1991 byly poprvé popsány “za určitých podmínek postradatelné” (conditionally dispensable) chromosomy na patogenu hrachu *Nectria haematococca* (Miao et al., 1991), bylo zjištěno, že tato houba může existovat v různých prostředích a že právě geny nacházející se na těchto postradatelných chromosomech řídí schopnost různá prostředí kolonizovat. Následný výzkum odhalil, že geny na těchto chromosomech se podílejí na rezistenci patogenu k rostlinným antimikrobiálním látkám, utilizaci specifických zdrojů uhlíku a dusíku a také na patogenitě ke specifickým hostitelům (Coleman et al., 2009). Dalším patogenem, u kterého byly nalezeny postradatelné chromosomy spojené s patogenitou, byla *Alternaria alternata* (Akamatsu et al., 1999). Jasným důkazem pak byla fúze rajčatového a jahodového patotypu tohoto patogenu, kdy výsledné patotypy, nesoucí oba postradatelné chromosomy, byly schopny napadnout jak rajče, tak jahodník (Akagi et al. 2008). Podobný jev byl nalezen také u patogenu *Fusarium oxysporum*, kde se předpokládalo, že geny pro patogenicitu byly u některých patotypů získány horizontálním transferem celého chromosomu od jiného patotypu, případně druhu (van der Does et al., 2008).

2.1.4.1.1. Postradatelné chromosomy u *M. graminicola*

Postradatelné chromosomy *M. graminicola* se podstatně liší od „B“ chromosomů objevených u jiných druhů, které obsahují pouze několik genů a jsou složeny především z repetitivních prvků přejatých z „A“ chromosomů. Tyto chromosomy oproti jiným obsahují unikátní a přebytečné geny. Postradatelných chromosomů, objevených v jiných houbách, bylo podstatně méně a byly delší. U *M. graminicola* jsou tyto chromosomy dlouhé 0,39-0,77 Mb, a tvoří kolem 38 % genomu. Wittenberg et al. (2009) zjistili, že počet chromosomů se mezi izoláty značně liší, některé izoláty měly až o tři chromosomy méně a při křížení 15-20 % potomstva ztratilo jeden nebo více chromosomů, které oba rodičovské izoláty měly. Na základě poznatků u jiných patogenů se předpokládalo, že tyto chromosomy by se mohly nějak účastnit procesu adaptace k hostiteli nebo procesu patogenity, ale dosud nebyly na těchto chromosomech zmapovány žádné geny pro patogenitu nebo kondici (Coleman et al., 2009).

Při srovnání genomu *M. graminicola* s jejím předkem S1 (vyskytující se na divokých trávách) byl nalezen důkaz, že strukturálním změnám podléhaly především postradatelné chromosomy, zatímco esenciální chromosomy byly syntenické. Na nukleotidové úrovni se tyto chromosomy vyvíjely velmi odlišně a některé geny vykazovaly pozitivní selekci. Je tedy možné, že právě geny umístěné na těchto malých chromosomech hrály důležitou roli v přizpůsobování patogenu novému hostiteli - pšenici (Stukenbrock et al., 2010).



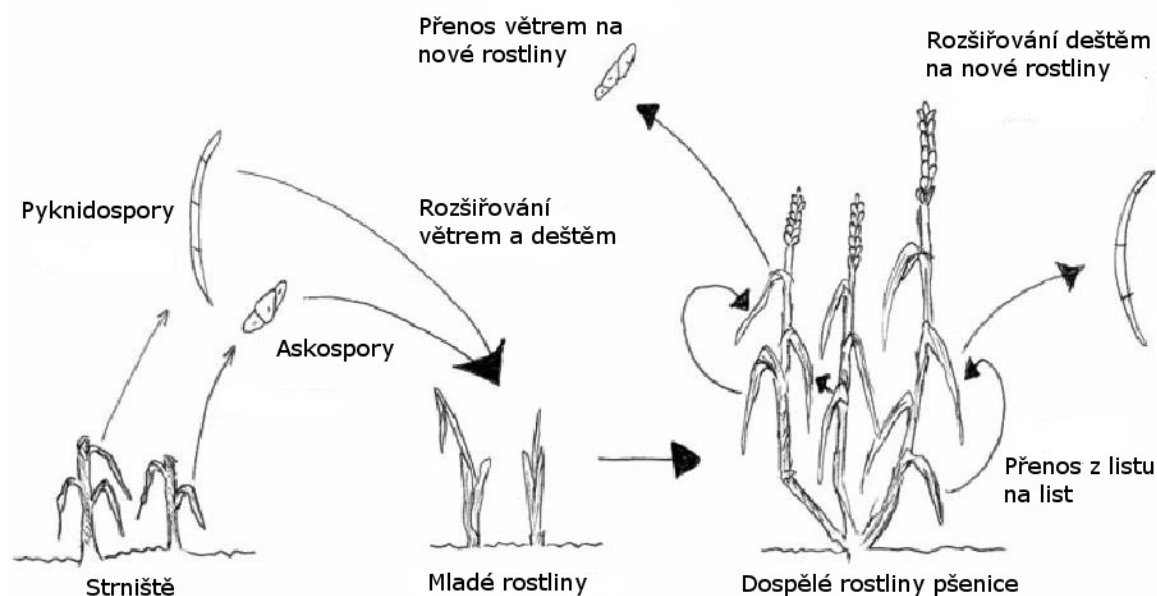
Obrázek 2.1: Genom *M. graminicola* s 21 chromosomy. Červená značí unikátní sekvence, repetitivní sekvence jsou značeny modře.

Studium výskytu postradatelných chromozomů u *M. graminicola* z různých geografických lokalit a jejich dědičnosti bylo náplní mé práce během tříměsíční stáže na ETH v Curychu. Má práce byla pouze malou součástí velkého projektu týkajícího se postradatelných chromosomů a na přání švýcarské strany výsledky nebudou v této práci uvedeny.

2.1.5. Epidemiologie

M. graminicola může napadat všechny nadzemní části rostliny, ale obvykle nenapadá semena (DiLeone et al., 1996). Počátečním inokulem bývají vzduchem přenosné askospóry (Shaw & Royle, 1987), dalším inokulem na začátku vegetace mohou být také

pyknidospory, které mohou na napadeném stmišti zůstat životaschopné až několik měsíců. Oba typy spor jsou uvolňovány za vysoké vzdušné vlhkosti (Eyal et al., 1987).



Obrázek 2.2: Životní cyklus *M. graminicola* (Palmer & Skinner, 2002).

Pyknidospory mohou být přeneseny na listy při prudkém dešti, který zvedne inokulum z rostlinných zbytků nebo spodních listů do vyšších listových pater rostliny (vertikální přenos) nebo na listy okolních rostlin (horizontální přenos). Horizontální přenos se může uskutečnit i za sucha, a to kontaktem nově se vyvíjejících listů se starými, již napadenými, listy (Lovell et al., 1997).

Askospory se šíří většinou na veliké vzdálenosti, v rámci kilometrů, a pyknidospory jsou rozšiřovány na relativně krátké vzdálenosti, v rámci metrů (Kema et al., 1996a). Některé epidemiologické studie předpokládaly, že askospory jsou pouze primárním inokulem kolonizujícím pšeničná pole, zatímco pyknidospory byly pokládány za hlavní zdroj sekundární infekce (Schuch, 1990). Později bylo zjištěno (Zhan et al., 1998; Hunter et al., 1999; Zhan et al., 2003b), že sexuální reprodukce se u této houby může objevit kdykoli během roku, což má samozřejmě velký vliv na její epidemiologii a na populační strukturu (Cowger et al., 2008).

2.1.6. Ochranná opatření

Výskyt *M. graminicola* může být snížen dodržováním osevního postupu. Byla nalezena jistá spojitost mezi termínem setí a intenzitou výskytu podzimní infekce *M. graminicola* na pšenici (Tvarůžek et al., 2008). Výskyt může být dále snížen správnou agrotechnickou praxí, pěstováním rezistentních odrůd, fungicidním ošetřením, pomocí biologické ochrany nebo kombinací výše uvedených v rámci systému integrované ochrany rostlin.

Vhodným doplňkem fungicidní ochrany může být také využití modelu predikce výskytu a škodlivosti patogenu (te Beest et al., 2009).

2.1.6.1. Biologická ochrana

Biologická ochrana představuje atraktivní alternativu pro budoucnost, protože používání pesticidů je pro společnost stále znepokojivé (Navi & Bandyopadhyay, 2002).

Biologickou ochranu na bázi antagonismu hub se snažili vyvinout v Argentině, kde je pro místní farmáře fungicidní ochrana ekonomicky neúnosná (Perello et al., 2006; Cordo et al., 2007). Perello et al. (2008, 2009) použili několik druhů *Trichoderma* ssp. k ošetření půdy a posléze i k postřiku na list. Ošetření bylo účinné především v počátečním stádiu choroby, ale po delší době nebyl viditelný rozdíl mezi ošetřenou variantou a kontrolou. Je tedy možnost ho využít jako doplněk k fungicidnímu ošetření v rámci snižování dávek.

Účinné bylo i ošetření pomocí *Bacillus megaterium* (Kildea et al., 2008) nebo *Drechslera teres* (Nolan & Cooke, 2000), ale žádná z těchto metod se v evropské praxi nevyužívá.

2.1.6.2. Rezistentní odrůdy

Koexistence hostitelských rostlin a jejich patogenů vedle sebe v přírodě naznačuje, že se oba dva musely vyvíjet společně. Zdá se, že změny ve virulenci patogenu jsou nepřetržitě vyrovnány změnami v rezistenci hostitele a naopak. Všechny rostliny mají určitou, ale ne vždy stejnou, úroveň možnosti nespecifické rezistence, která je účinná proti všem jejím patogenům. Taková rezistence je někdy nazývána nespecifická, obecná, kvantitativní, „adult-plant“, polní nebo trvalá rezistence, ale běžně je zmiňovaná jako horizontální rezistence. Ta je řízena několika geny (pravděpodobně desítkami, možná stovkami), proto polygenní nebo multigenní rezistence. Každý z těchto genů je samostatně

spíše neúčinný proti patogenu a hraje malou roli v celkové horizontální rezistenci (minor geny rezistence)(Agrios, 1997).

Patogeny a škůdci se vyskytují v geneticky odlišných typech, tzv. rasách. Rasy jsou takové typy patogenu, které v důsledku různých genů virulence vyvolávají odlišný ohlas u hostitelských genotypů (odrůd) (Chloupek, 2008). Vertikální rezistence je vždy řízena jedním genem nebo několika geny (proto pojmenování monogenní nebo oligogenní rezistence (Agrios, 1997). Tento major gen může být genetickými změnami patogenu překonán. Řada genů virulence v patogenu reaguje s odpovídajícími geny rezistence v hostiteli za vzniku rozdílné hostitelsko-patogenní interakce (Waller & Lenné, 2002).

2.1.6.2.1. Princip gen proti genu (gene-for-gene)

Na začátku minulého století bylo zjištěno, že v několika případech byla rezistence k chorobám zděděna jako monogenní znak, podle zákonů klasické Mendelovy genetiky.

H. H. Flor (1954) byl první fytopatolog, který analyzoval genetiku rezistentní interakce zároveň u rostliny i u patogenu. Studoval interakci mezi lnem (*Linum usitatissimum*) a původcem rziivosti lnu, houbou ze skupiny stopkovýtusných *Melampsora lini*. Z tohoto studia formuloval hypotézu gen proti genu jako nejpřesvědčivější vysvětlení pozorovaného jevu.

Většinou, ale ne vždy jsou u hostitele geny rezistence dominantní (R) zatímco geny pro náchylnost recesivní (r). Na druhou stranu u patogenu jsou geny avirulence (neschopnost infekce) většinou dominantní (A) kdežto geny pro virulenci jsou recesivní (a). Každý gen u hostitele může být rozpoznán pouze jeho protějším genem u patogenu a naopak. Ze čtyř možností kombinace genů je pouze kombinace AR interakce nekompatibilní (rezistentní)(Agrios, 1997). Když rostlina tento R gen nemá nebo ho ztratí, stává se náchylnou. Také když patogen ztratí nebo změní svůj gen patogenity, aby zabránil rostlině v rozpoznání, bude rezistence překonána. Jestliže tato skutečnost nastane, bude na rostlinnou populaci vyvíjen selekční tlak vedoucí k postupnému rozeznání jiných faktorů patogenity, čímž se může opět stát rezistentní (Dickinson, 2003).

2.1.6.2.2. Rezistence pšenice k *M. graminicola*

Výsledky McCartneyho et al. (2002) pokusů dokazují, že rezistence k *M. graminicola* je kvalitativní a je řízena neúplně dominantními geny, z nichž každý vykazuje

dominantní epistázi nad ostatními geny rezistence. Počet genů rezistence štěpících se při křížení závisí na zdroji rezistence a rase (izolátu) použité k testování. Také dokazují přítomnost rasově specifických genů rezistence, a tedy shodnost s mechanismem gen proti genu.

V nádobových pokusech i v polních podmínkách se vyskytovaly specifické interakce mezi odrůdami a různými izoláty *M. graminicola*. To zvýšilo pravděpodobnost, že tyto specifické interakce fungují na základě mechanismu gen proti genu, ve kterém je pro každý gen řídící rezistenci v hostiteli odpovídající gen pro avirulenci v patogenu. Nejvíce prostudovaná specifická interakce je mezi izolátem IPO323 z Holandska a několika kultivary pšenice s odlišným původem (Brading et al., 2002).

Dosud bylo určeno sedmnáct genů pro rezistenci k STB (*Stb1* – *Stb17*), v porovnání s jinými patogeny jako jsou rzi nebo padlí je ale toto číslo zanedbatelné (Tabib Ghaffary et al., 2011).

První známý zdroj rezistence k STB byla odrůda ozimé pšenice Bulgaria 88 (Rillo & Calwell, 1966). Gen způsobující rezistenci, pojmenovaný *Stb1*, byl přenesen do měkkých červených ozimých odrůd z Indiany Oasis a Sullivan. Tyto dvě odrůdy se začaly pěstovat během roku 1975 a 1979. Gen *Stb1* je dominantní a považovaný za dlouhodobě účinný, jelikož si zachoval účinnost po mnoho let v široce pěstovaných kultivarech v oblastech Indiany a sousedních států náchylných k STB (Adhikari et al., 2004a).

Geny rezistence *Stb2* a *Stb3* byly objeveny v odrůdách Veranapolis a Israel 493. Tyto geny společně řídily rezistenci k běžnému infekčnímu tlaku *M. graminicola* v Austrálii a USA (Wilson, 1979). Později byly nalezeny molekulární markery spojené s těmito geny a bylo rozpoznáno umístění těchto genů v genomu pšenice, *Stb2* na krátkém rameni chromosomu 3B a *Stb3* na krátkém rameni chromosomu 6D (Adhikari et al., 2004b). Jarní odrůda pšenice Tadinia obsahuje jeden dominantní gen *Stb4* pro rezistenci. Tento gen byl v Kalifornii úspěšně používán pro zvládnutí *M. graminicola* od roku 1975 (Somasco et al., 1996). Adhikari et al. (2004c) našli gen *Stb4* v potenciálním shluku genů rezistence na krátkém rameni chromozómu 7D blízko centromery, ten také obsahoval gen *Stb5* a pět dříve objevených genů rezistence ke mšici zhoubné (*Diuraphis noxia*). Gen rezistence *Stb5* byl nalezen na hexaploidní pšenici 'Synthetic 6x' s využitím izolátu IPO94269 (Arraiano et al., 2001). Kompatibilní reakci vykazovala odrůda Flame s izolátem

IPO323 a za pomoci mikrosatelitních markerů byla odhalena poloha nového genu rezistence, který byl pojmenován *Stb6* (Chartrain et al., 2005a). McCartney et al. (2003) určili polohu genu *Stb7* u jarní pšenice ST6 na dlouhém rameni chromozómu 4A. Syntetická hexaploidní pšenice W7984 vykazovala přítomnost jednoho významného genu rezistence k *M. graminicola*. Tento gen byl označen *Stb8* a jeho poloha byla nalezena za pomoci AFLP a mikrosatelitních markerů (Adhikari et al., 2003). Pomocí QTL markerů byl odhalen další gen rezistence *Stb9*, ten vykazoval kompatibilní reakci s izolátem IPO89011 a byl nalezen ve dvou odrůdách Courtot a Tonic (Chartrain et al., 2009). V odrůdě Kavkaz-K4500 L.6.A.4 byly spolu s geny *Stb6* a *Stb7* nalezeny nové dva geny pojmenované *Stb10* a *Stb12*. Tato odrůda vykazovala dobrou polní odolnost, což znamená, že pyramidovým hromaděním genů lze dosáhnout trvalejší polní rezistence (Chartrain et al., 2005b). Gen *Stb11* byl nalezen ve velmi odolné portugalské linii pšenice TE 9111, která vykazovala jak nespecifickou tak izolátově specifickou rezistenci a byla v té době nejodolnější známou linií pšenice v Evropě (Chartrain et al., 2005c). Geny *Stb13* a *Stb14* byly nalezeny v kanadské pšenci Salamouni na dlouhém rameni chromosomu 7B a na krátkém rameni chromosomu 3B (dostupné z: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/awn/53/Textfile/WGC.html>). Gen *Stb15* byl zmapován pomocí QTL markerů a vykazoval rezistentní reakci k etiopskému izolátu IPO88004 ve švýcarské odrůdě Arina (Arraiano et al., 2007). Jako poslední byly pomocí QTL markerů popsány geny *Stb16q* a *Stb17* u syntetické pšenice W-7976 (Tabib Ghaffary et al., 2011).

Jako u jiných chorob nemusí být rezistence k STB trvalá, jelikož populace *M. graminicola* je geneticky velice rozmanitá a může se sexuálně rozmnožovat několikrát během vegetační doby. To zvyšuje riziko adaptace patogenu k rezistentním genům rozmístěným v hostitelské populaci (Chartrain et al., 2004). Gen *Stb1* z ozimé odrůdy pšenice Bulgaria 88 vnesený do měkké červené ozimé odrůdy Oasis a Sullivan z Indiany si zachoval efektivnost více než 25 let. Jarní odrůda pšenice Tadiana obohatila jedním dominantním genem rezistence, *Stb4*, kalifornské odrůdy pšenice. Tato specifická rezistence zůstala efektivní přibližně 15 let, ale z vysoce rezistentní odrůdy Gene, která také obsahovala gen *Stb4*, se stala vysoce náchylnou 5 let po uvedení na trh v Oregonu. S takto rychlým poklesem rezistence vznikla potřeba začlenění dalších genů rezistence do odrůd pšenice určených pro produkci v oblastech, kde je STB hrozbou (Adhikari et al., 2003).

Vzhledem k rychlé ztrátě rezistence založené monogenně se výzkum v poslední době zaměřil na rezistenci kvantitativní. Poměrně úspěšné výsledky ve šlechtění pšenice s kvantitativní rezistencí k *M. graminicola* nedávno demonstrovali Risser et al. (2011). Šlechtění odrůd s kvantitativní rezistencí je však složitější než šlechtění odrůd s kvalitativní rezistencí, vyžaduje mnohem komplexnější přístup a trvá proto mnohem déle.

Pro malé množství jiných metod ochrany je v České republice stále nejpoužívanější ochranou proti *M. graminicola* ochrana fungicidní.

2.1.6.3. Fungicidní ochrana v České republice

Fungicidy jsou již dlouhou dobu nástrojem ke snížení ztráty na výnosu kulturních plodin. Jako první se objevily přípravky na bázi síry, vápna a mědi, např. Bordeauxská jícha. Tyto přípravky se však používaly víceméně omezeně až do konce druhé světové války, kdy se objevil první organický insekticid DDT a postupně další organické insekticidy a fungicidy. Tyto se však záhy ukázaly jako velice negativně působící na životní prostředí a byly postupně nahrazovány novějšími sloučeninami. V průběhu 70. a 80. let přicházely na trh ekologicky a ekonomicky příznivější pesticidy. Rozsah používání chemických přípravků v Československu byl největší koncem 80. let 20. století. Od roku 1980 docházelo k velkému rozvoji používání fungicidů, zejména systémových. Jejich používání však mělo vliv na vznik rezistentních populací původců houbových chorob. Na počátku 90. let vzhledem ke změně společenských a vlastnických vztahů došlo k významnému poklesu spotřeby pesticidů. Teprve po roce 1994 začíná pozvolný nárůst v jejich používání (Kazda, 2005). Podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnice Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS je však možné předpokládat velký tlak na omezení užívání přípravků na ochranu rostlin ze strany Evropské unie a úplný zákaz používání některých přípravků.

2.1.6.3.1. Strobilurinové fungicidy (QoI inhibitory)

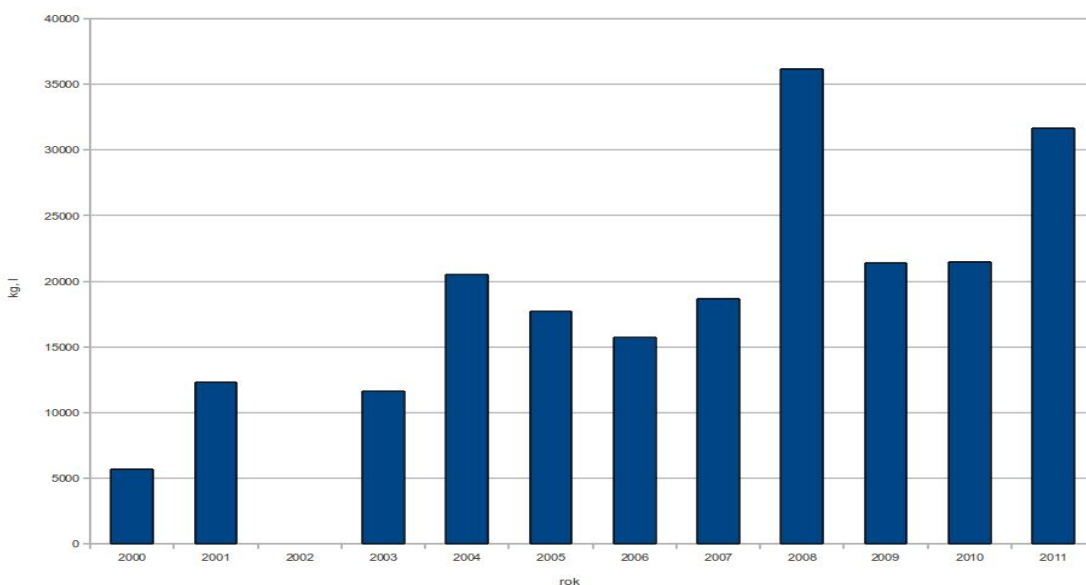
Vynález QoI fungicidů byl inspirován skupinou přírodních fungicidních derivátů kyseliny β -methoxyacrylové, jako jsou strobilurin A a oudemansin A tvořené stopkovýtusnými houbami *Strobilurus*, *Mycena* a *Oudemansiella* (Krajczyk et al., 1996). První molekula Strobilurinu A byla získána z tekuté kultury *Strobilurus tenacellus* v roce

1977 (Anke et al., 1977). První strobilurinový fungicid byl ale prodán až v roce 1996. Jejich fungicidní aktivita spočívá ve schopnosti inhibovat mitochondriální dýchání tím, že se naváží na takzvané Qo centrum (quinol-oxidation site) enzymového komplexu cytochromu *bc1* (komplex III). Tato inhibice blokuje přenos elektronů mezi cytochromem *b* a cytochromem *c1*, což vede k zastavení produkce ATP a tedy i k energetickému deficitu buňky.

QoI fungicidy mají v omezené dávce většinou nízkou toxicitu pro ptáky, savce (včetně člověka) a včely a jsou tedy hodnoceny jako málo rizikové. V závislosti na dávce ale vykazují jistou toxicitu pro vodní organismy. V přírodě se rozkládají relativně rychle a tak zde téměř nehrozí dlouhodobé vystavení těmto látkám, tudíž ani chronické nebezpečí (Barlett et al., 2002).

Cílem QoI je cytochrom *bc1*, proteinový komplex zakotvený ve vnitřní membráně mitochondrie nepostradatelný pro buněčné dýchání. U eukaryot tento komplex pracuje jako strukturální a funkční dimer o velikosti přibližně 480 kDa. Tento dimer je složen ze dvou samostatných jednotek skládajících se z 10 až 11 různých polypeptidů. Katalytické jádro enzymu tvoří tři podjednotky: cytochrom *b*, cytochrom *c* a Rieskeho železo-sirný protein. Cytochrom *b* je u všech eukaryot zakódován v mitochondriálním genomu (*cyt b* gen), ostatní podjednotky jsou pak zakódovány v genomu jaderném (Fisher & Meunier, 2008).

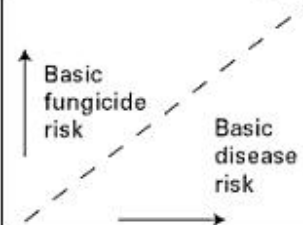
V České republice byl první strobilurinový fungicid prodán v roce 1997 a to Amistar s účinnou látkou azoxystrobin. Původně se používal samostatně, později se začal používat ve směsi s dalšími účinnými látkami, nejčastěji azoly (Babuška, 2010). Z následujícího grafu (2.1.) je patrné, jak se v letech následujících po uvedení na trh jejich spotřeba několikanásobně zvýšila.



Graf 2.1: Spotřeba strobilurinových fungicidů registrovaných do obilnin v ČR v letech 2000-2011. Spotřeba je uvedena v kg resp. litrech účinných látek. Data z roku 2002 nebyla dostupná (zdroj dat: Státní rostlinolékařská správa).

2.1.6.3.2. Rezistence houbových patogenů k fungicidům

Rezistence může mít velký dopad na účinnost fungicidů. Převážně v laboratorních podmínkách bylo identifikováno přes 300 rezistentních houbových patogenů. V praxi je to ale pravděpodobně něco přes třicet. Riziko vzniku rezistence závisí jak na druhu patogenu, tak na skupině používaných fungicidů (Obr. 2.2). Riziko vzniku je mnohem vyšší, v případě častého ošetřování rychle a hojně se množícího patogenu, fungicidem s jednostranným mechanismem účinku. Velký zájem je především o fungicidy, kde je riziko minimální, jako jsou fungicidy s mnohostranným mechanismem účinku, morpholiny a fungicidy, které aktivují hostitelskou rezistenci a neovlivňují tak přímo patogen. V porovnání se vznikem rezistence u insekticidů je zde ale mnohem méně problémů, částečně proto, že je dostupné větší chemické spektrum přípravků, které je možno kombinovat v úspěšné antirezistentní strategii (Hollomon, 2002).

Benzimidazoles Dicarboximides Phenylamides	H i g h (3)	3	6	9
Carboxanilides DMIs Phosphorothiolates Anilinopyrimidines Phenylpyrroles Strobilurins	M e d i u m (2)	2	4	6
Coppers Dithiocarbamates Melanin inhibitors Phthalimides Sulphur SAR-inducers	L o w (1)	1	2	3
		Low (1)	Medium (2)	High (3)
		Seed-borne (e.g. <i>Pyrenophora ustilago</i>) Soil-borne (e.g. <i>Phytophthora</i>) Cereal eyespot Cereal rust Rice sheath blight	Barley <i>Rhynchosporium</i> Wheat septoria	Apple scab Banana Sigatoka Cereal powdery mildew Grape <i>Botrytis</i> Potato blight Citrus <i>Penicillium</i> Rice blast

Obrázek 2.3: Riziko vzniku rezistence (Brent & Hollomon, 1998). Vertikálně: skupiny fungicidů a úroveň rizika vzniku rezistence k nim. Horizontálně: patogeny a úroveň jejich náchylnosti ke vzniku rezistence. Čísla 1-9 značí úroveň rizika vzniku rezistence, vzestupně.

2.1.6.3.2.1. Rezistence houbových patogenů ke strobilurinům

Díky své široké účinnosti na mnoho agronomicky významných chorob se tyto fungicidy rychle staly nezbytnou složkou ochrany rostlin. Byly registrovány v celé řadě zemí pro použití v nejrůznějších plodinách, včetně obilnin, vinné révy, zeleniny a okrasných rostlin. Bohužel je u této skupiny fungicidů vysoké riziko vzniku rezistence a je proto potřeba důsledně dodržovat antirezistentní strategie, jako jsou omezená ošetření nebo použití směsí s jinými účinnými látkami (McGrath, 2001).

První rezistentní rasa houbového patogenu byla objevena na obilninách. Konkrétně v roce 1998 byl v severním Německu nalezen rezistentní izolát padlí travního (*Erysiphe*

graminis DC f. sp. *tritici* Marchal) (Sierotzki et al., 2000). Od té doby byla tato rezistence objevena i u několika dalších patogenů (Barlett et al., 2002).

Podobně jako u přirozené rezistence stopkovýtrusných hub produkujících strobilurin (Kraiczky et al., 1996) je ve většině případů, rezistence způsobena bodovou mutací v mitochondriálním genu pro cytochrom b (*cyt b*) vedoucí k záměně aminokyseliny glycinu za alanin na pozici 143 (G143A) (Sierotzki et al., 2000; Gisi et al., 2002). Stejně tak je tomu i u *M. graminicola*. U některých organismů však může být tato změna letální, a proto například u rží nebo *Alternaria solani* Sorauer nebyl tento druh rezistence nikdy hlášen (Grasso et al., 2006). U některých organismů byly nalezeny i další mutace a mechanismy, jako například F129L nebo G137R způsobující polní rezistenci k QoI inhibitorům (Sierotzki et al., 2007, Fisher & Meunier, 2008).

2.1.6.3.2.2. Rezistence *M. graminicola* ke strobilurinům

První rezistentní izolát *M. graminicola* byl nalezen v roce 2001 (Fraaije et al., 2005b) ve Velké Británii a následně v roce 2002 v pěti dalších evropských zemích (Gisi et al., 2005). Pozdější studie dokazuje, že se rezistentní alela objevila v průběhu let 2001 a 2002 nezávisle na sobě nejméně ve čtyřech různých oblastech severozápadní Evropy (Torriani et al., 2008) a genotyp s touto alelou se rozšiřoval na východ pomocí větrem unášených askospor, přibližnou rychlostí 100 km za rok (Fraaije et al., 2005a).

V České republice byl potvrzen občasný výskyt rezistentních izolátů v populaci z roku 2002 pomocí *in vitro* testů na sadě vzorků (Tvarůžek & Horáková, 2005). V roce 2011 byl výskyt rezistence potvrzen molekulárně i pomocí *in vitro* testů a to na 17 vzorcích z oblasti Kroměříže, z nichž všechny byly rezistentní (Matušinsky et al., 2011). Ve stejném období probíhal také sběr poloviny izolátů pro tuto práci.

2.2. Populační genetika patogenů

Populační genetika se zaměřuje na procesy, které vedou ke genetické změně nebo evoluci, v populaci, v rámci času a prostoru. Většina studií populační genetiky pracuje v dlouhodobém rozsahu (např. několik pěstebních sezón, desítky až stovky generací patogenu) a ve velkém rozsahu (často celosvětovém u patogenů, jejichž spóry se mohou šířit desítky až stovky kilometrů). Populační genetika pracuje především s genetickými

procesy, jako jsou mutace, náhodný tlak (genetický drift), migrace (gene flow), rozmnožovací systém a přírodní výběr (McDonald, 2004).

Přestože je parazitizmus jeden z eukaryoty nejvíce využívaných způsobů života, populační genetika parazitů se ztrácí daleko za populační genetikou volně žijících organismů. Zřejmě je to proto, že v prostředí nejsou příliš nápadní a jejich morfologická a behaviorální variabilita, využívaná v počátcích studia populační genetiky, není tak zřetelná a jsou zřejmě méně atraktivní než makrofauna (Giraud et al., 2008). Nástup molekulárních markerů ale přinesl skvělé nástroje pro studium klíčových procesů v biologii parazitů, jako jsou rozšíření, rozmnožovací systém, přizpůsobení se hostiteli a schéma speciace.

Studium genetické struktury rostlinných patogenů se zabývá především množstvím a rozmístěním genetických rozdílů uvnitř a mezi jednotlivými populacemi. Znalost množství a rozmístění této variability v populaci rostlinného patogenu, potenciálu migrace a významu sexuálního a asexuálního vývoje, má přímý vliv na agro-ekosystém. Například znalost způsobu rozšiřování patogenu může poskytnout informace o tom, jak rychle se budou šířit genotypy s nově virulentní nebo k fungicidům rezistentní alelou mezi jednotlivými pěstebními oblastmi (McDonald & McDermott, 1993).

2.2.1 Populační genetika *M. graminicola*

Populační genetikou *M. graminicola* se v přibližně posledních dvaceti letech zabývala řada vědeckých týmů po celém světě. S nástupem molekulárních metod začali se studiem v USA McDonald a Martinez (1990), kteří s využitím nespecifických RFLP markerů prostudovali populaci *M. graminicola* pocházející z jednoho pole. V dalších letech byly studie postupně rozšiřovány až na celosvětové měřítko (McDonald et al., 1995; Chen & McDonald, 1996) a byla dokázána vysoká úroveň genové a genotypové variability, což potvrdilo domněnku o velkém vlivu pohlavní reprodukce na genetickou strukturu zkoumaných populací.

Většina genové variability (77 %) se nacházela na ploše o velikosti ≈ 1 až 9 m^2 . Při porovnání variability jednotlivých, od sebe vzdálených, populací byly rozdíly minimální, značící veliký podíl migrace. Byl zde však nalezen vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností mezi jednotlivými populacemi, naznačující, že tyto populace ještě nedosáhly rovnováhy mezi migrací a genetickým tlakem (Linde et al., 2002).

V dalších letech byly za použití dalších molekulárních metod detailně prostudovány populace jednotlivých států. Czembor a Arseniuk (1999) pomocí metody RAPD a MP-PCR studovali genetickou variabilitu polské populace. Stejnou metodu (RAPD) využili Razavi a Hughes (2004a) při studiu populace z polních pokusů v Saskatchevanu v Kanadě. Stejní autoři využili pro porovnání i SSR (mikrosatelitní) analýzu (Razavi & Hughes, 2004b). Metodu SSR markerů také využili Banke a McDonald (2005) ke studiu migrace mezi populacemi v globálním měřítku a Castillo et al. (2009) ji využili ke studiu populační genetiky v Argentině.

Metodu polymorfismu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) využilo mnoho autorů ke studiu populací *M. graminicola* v Německu, Tunisu, Alžíru, Kanadě, Iránu a USA (Schnieder et al., 2001; Abrinbana et al., 2010; Medini & Hamza, 2008; Kabbage et al., 2008; 2009). Ve Francii ke studiu variability místní populace využili SSR markery a PCR-SSCP metodu (El Chartouni et al., 2011). Mikrosatelitní markery byly použity také k charakterizaci struktury populace v Tunisu (Boukef et al., 2012).

Všechny studie potvrdily výsledky z předchozích let v tom, že míra genetické variability uvnitř populace je vysoká, ale míra variability mezi jednotlivými populacemi ze stejného regionu je nízká. Jsou zde ale i oblastní specifika, například v Iránu populace z jednotlivých pšeničných provincií vykazují významnou genetickou diferenciaci a nízkou hladinu migrace (Abrinbana et al., 2010), což podporuje teorii o tom, že *M. graminicola* se přizpůsobila domestikované pšenici právě v tomto regionu. Zvýšená úroveň genetické diferenciaci byla nalezena i ve Francii, zde jde zřejmě o přizpůsobení se *M. graminicola* rozdílným klimatickým podmínkám na severu a jihu státu (El Chartouni et al., 2011).

Studium populační genetiky *M. graminicola* nebylo zaměřeno jen na strukturu genomu jaderného, ale i genomu mitochondriálního, u kterého je, na rozdíl od jaderného genomu, diverzita mnohem nižší (Zhan et al., 2003a,b). K podrobnému studiu mitochondriálního genomu Torriani et al. (2011) využili nejpřesnější metodu, sekvenaci. Znalost populační genetiky a vývoje mitochondriálního genomu je z fytopatologického hlediska také důležitá. Příkladem může být sekvence genu pro cytochrom *b*, která se nachází právě v mitochondriálním genomu a mutací tohoto genu získává patogen rezistenci ke strobilurinovým fungicidům (Torriani et al., 2008).

2.2.2 Molekulární metody využívané ke studiu genetické struktury populací patogenů

Výběr genetického markeru může mít značný vliv na analýzu a interpretaci dat. Při řešení otázek spojených s velikostí populace, rozmnožovacím systémem a migrací je dáována přednost selektivně neutrálním markerům. Selektivní markery by měly být použity v otázkách vlivu selekce. Výjimkou je práce s některými houbami, které se rozmnožují převážně nepohlavně a vytváří tak populaci složenou především z klonálních linií a je u nich kompletní shoda mezi genotypem a fenotypem.

Pro řešení většiny otázek populační genetiky je nejlepší použít genetický marker, který je selektivně neutrální, má vysokou informační hodnotu, je reprodukovatelný a relativně jednoduchý (= levný) na použití (McDonald, 1997).

2.2.2.1. RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RAPD markery (Williams et al., 1990) byly velice populární díky jejich jednoduchému použití v analýzách. Pro fytopatologů bylo důležité, že se RAPD analýza dala provést i s relativně malým množstvím houbového pletiva, byl to tedy ideální nástroj pro práci s obligátními biotrofy, jako jsou rzi a padlí. RAPD data jsou snadno interpretovatelná, protože jsou založena na amplifikaci nebo neamplifikaci specifických DNA sekvencí a vytváří tak binární soubor dat. Bohužel ale mají RAPD markery také řadu nevýhod, které musí být brány v potaz (McDonald, 1997). Mají několik technických omezení, kvůli kterým může být problém zopakovat výsledky v jiné nebo dokonce v té samé laboratoři. Jsou zde také jisté analytické problémy při RAPD analýze, protože RAPD markery mají pouze dvě alely (amplifikace nebo ne) pro každý lokus. To je ideální pro genetické mapování, nikoli však pro měření genetické diversity, která je dána i počtem alel na daném lokusu. RAPD markery jsou markery dominantní, takže bez pokusu na potomstvu nelze rozlišit homozygoty a heterozygoty (Lynch & Miligan, 1994).

2.2.2.2. RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RFLP markery byly použity v mnoha studiích houbových patogenů rostlin. RFLP analýza je technicky složitější než RAPD, protože je založena na DNA-DNA hybridizaci, ale oproti RAPD je mnohem lépe reprodukovatelná. RFLP data jsou také snadno

interpretovatelná a jelikož jsou to markery s kodominancí, mohou zobrazit potenciálně neomezené množství alel. Jedinou nevýhodou RFLP analýzy může být potřeba relativně velkého množství DNA (5-10 µg) z každého jedince, houby tedy musí být před extrakcí DNA pěstovány v čisté kultuře (McDonald, 1997).

2.2.2.3. SSRs – Simple Sequence Repeat – Microsatellites

V genomu všech eukaryot je obsažena skupina sekvencí, nazývané mikrosatelity nebo také SSRs. S několikrát za sebou opakujícím se základním motivem <6 bp, se mikrosatelity projevily jako důležitý zdroj všudypřítomných genetických markerů v mnoho eukaryotních geomech (Tautz & Renz, 1984). Analýza mikrosatelitů je založena na PCR, která je mnohem jednodušší než analýza RFLP a snadněji se automatizuje. V rostlinách se u mnoha druhů osvědčily jako vysoce informativní a místně-specifické markery. Jelikož jsou multialeleické, mají mikrosatelity vysoký potenciál pro využití v evolučních studiích a ve výzkumech týkajících se genetických vztahů (Röder et al., 1998). Pro vytvoření primerů je potřeba znát sekvenci DNA lemující mikrosatelity (Bornet & Branchard, 2001). Ale právě díky těmto specifickým primerům se výsledky z analýzy mikrosatelitů lehce vyhodnocují a jsou dobře reprodukovatelné v různých laboratořích (Selkoe & Toonen, 2006).

První mikrosatelitní markery pro *M. graminicola* popsali Owen et al. v roce 1998. Později bylo díky využití databáze EST sekvencí rozpoznáno téměř 100 dalších (Goodwin et al., 2007), které jsou v poslední době při studiu genetické struktury tohoto patogenu hojně využívány (Banke & McDonald 2005, El Chartouni et al. 2011, Boukef et al. 2012).

2.2.2.4. AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

AFLP analýza (Vos et al., 1995) je dobrým nástrojem k hledání polymorfních DNA sekvencí u hub. AFLP markery mají mnoho společných charakteristik s RAPD markery, jsou dominantní a zobrazují pouze dvě alely pro každý lokus. Výhodou oproti RAPD markerům je testování více lokusů během jedné reakce a díky delším primerům je tato metoda lépe reprodukovatelná. Nevýhodou oproti RAPD je pouze větší technická náročnost (ligace, restrikce, polyakrylamidový gel) (McDonald, 1997).

2.2.2.5. DNA Sekvence

První metoda DNA sekvenace byla uvedena v roce 1977 (Sanger et al., 1977). Existuje několik možných strategií, jak identifikovat pořadí bází ve studované sekvenci, lišících se zpravidla v tom, jakým způsobem je získáno dostatečné množství nukleové kyseliny; lze například přímo amplifikovat cílovou DNA pomocí PCR nebo izolovat a sekvenovat RNA transkripty, do další skupiny patří metody klonování pomocí bakteriálních nebo virových vektorů. V současné době se využívají dva principy sekvenačních metod. Dideoxy metoda (Sangerova) je enzymová metoda, jejíž využití zcela zastínilo druhou, chemickou metodu (Maxam-Gilbertova metoda).

Ještě před několika roky bylo sekvenování prováděno manuálně; prakticky všechny kroky byly prováděny místně a s radioaktivním značením. Značné zefektivnění sekvenačního procesu přineslo použití automatických sekvenátorů. Přestože existuje několik typů automatického sekvenování, většina sekvenátorů je založena na termálně-cyklické modifikaci Sangerovy metody (Sambrook & Russel, 2001). Stálá inovace u těchto metod vede k jejich zefektivnění a hlavně ke snížení ceny (Pettersson et al., 2009) a v současné době se do popředí dostává tzv. sekvenování nové generace (Next-generation sequencing - NGS), které je v relativně krátkém čase schopné vyprodukovat velké objemy sekvenačních dat (Metzker, 2010).

3. Hypotézy a cíle práce

1. Hypotéza: Populace z ČR by měly mít podobné znaky jako již studované populace z jiných lokalit. Nejvíce by se pak měly podobat populacím z blízkých evropských států. Měly by tedy vykazovat vysokou variabilitu uvnitř jednotlivých populací a malé rozdíly mezi nimi.

2. Hypotéza: V případě, že v populaci *M. graminicola* dochází k pravidelnému pohlavnímu rozmnožování, vyskytují se v ní dva pohlavní typy tohoto patogenu, a to v poměru 1:1.

3. Hypotéza: Rezistence *M. graminicola* ke strobilurinovým fungicidům může vzniknout spontánně na místech ošetřovaných pravidelně přípravky na této bázi. V západní Evropě je tato rezistence v současné době rozšířená a větrem přenosné askospory jsou unášeny díky převažujícímu proudění větru ze západu na východ.

1. Cíl: Ověřit, zda zdejší genetická struktura populace *M. graminicola* odpovídá již dříve publikovaným výsledkům z jiných evropských států, nebo zda je zde nějaká lokální adaptace. Zjistit zda se významně liší populace pocházející z různých regionů ČR (např. Čecha a Morava)

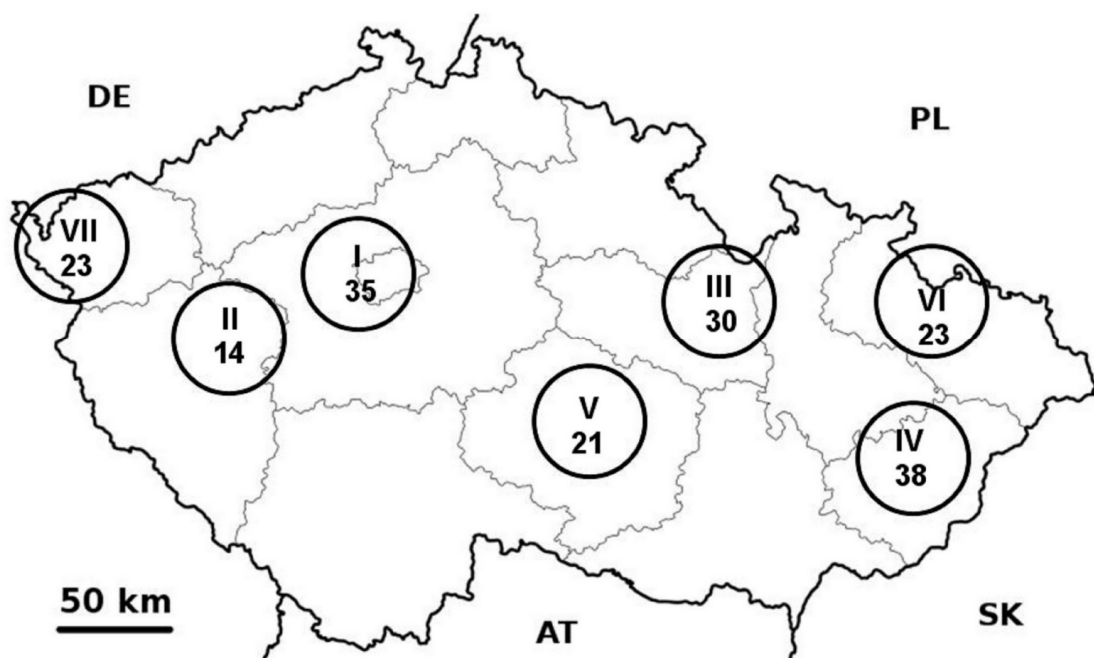
2. Cíl: Ověřit zda se vyskytují na území ČR oba pohlavní typy tohoto patogenu, případně v jakém poměru.

3. Cíl: Zjistit v jaké frekvenci se v ČR vyskytují izoláty rezistentní ke strobilurinovým fungicidům a zda se rezistentní alela rozšířila na území ČR ze západních zemí, nebo zda se zde také objevila spontánně.

4. Materiál a metody

4.1. Získání vzorků z českých populací

Vzorky listů pšenice infikované *M. graminicola* byly odebrány ze sedmi lokalit České republiky, a to z okolí měst Cheb (VII), Plzeň (II), Praha (I), Ústí nad Orlicí (III), Jihlava (V), Opava (VI) a Kroměříž (VII), z čehož vzorky z okolí Chebu, Plzně, Ústí nad Orlicí, Jihlavy a Opavy pocházely z jednotlivých polí vzdálených od sebe několik kilometrů na rozdíl od vzorků z okolí Prahy a Kroměříže, které byly odebrány z tamějších výzkumných ústavů. Listy byly odebrány z přírodně infikovaných porostů s použitím transektového schématu odběru, každý list byl odebrán z jiné rostliny. Místa odběru jednotlivých vzorků od sebe byla vzdálena 2 metry, v maloparcelových pokusech, a 10 metrů na ostatních polích. Jednotlivá pole byla od sebe vzdálena většinou několik kilometrů.



Obr. 4.1.: Lokality sběru vzorků zakreslené v mapě ČR

Polovinu izolátů, použitých v této práci, jsme získali již ve formě kultur na živném médiu ze sbírky VÚRV v.v.i. Ing. Lubomíra Věcheta, CSc., a to izoláty z let 2005-2009. Tyto izoláty byly odebrány z lokalit I-V. Pro rozšíření kolekce vzorků byly v roce 2011 odebrány další vzorky z lokalit IV a V a zároveň ze dvou nových lokalit VI a VII. Počet vzorků odebraných z jednotlivých lokalit se pohyboval okolo 50 vzorků. V roce 2011 tedy bylo celkem odebráno přibližně 200 listů, ze kterých byly, metodou popsanou níže, získány jednotlivé izoláty.

4.1.1. Izolace jednotlivých izolátů a jejich kultivace

K izolaci jednotlivých izolátů *M. graminicola* jsme využili metodu dříve popsanou McDonaldem et al. (1999a).

Listy s příznaky byly odebrány do papírových obálek, kde se nechaly za přístupu vzduchu 48 hodin schnout. Poté byly kvůli sterilizaci povrchu namáčeny postupně do 70% etanolu (10 sekund), 10% roztoku SAVO (60 sekund) a nakonec opláchnuty v destilované vodě (10 sekund). Mokrý listy byly stlačeny mezi papírovými utěrkami a umístěny na podložní sklíčko umístěné v Petriho misce s vlhkým filtračním papírem. Petriho misky pak byly inkubovány ve tmě po dobu 48 hodin při teplotě 18 °C, aby se podpořilo dozrání pyknid a vytlačení jejich obsahu na povrch. Po inkubaci byl sterilní jehlou opatrně přenesen obsah jednotlivých pyknid na Petriho misky s YMD agarem (složení viz níže). Misky se sporami pak byly dále inkubovány při 18 °C po dobu dvou týdnů. Po této době byly viditelné kolonie (mycelium a spory) rozetřeny po celé ploše média a byly inkubovány další dva až tři týdny za stejných podmínek.

Z každého listu bylo odebráno několik izolátů, každý ze samostatné pyknidy, pro další analýzy byl ale vybrán vždy pouze jeden z jedné listu. Výjimku tvořily izoláty, které byly použity pro hodnocení variability izolátů uvnitř jedné léze. Zde bylo ve třech případech odebráno a zařazeno do sbírky 3-5 izolátů z jedné léze. Každý izolát byl množen zvlášť v samostatné Petriho misce.

Každý izolát byl také umístěn do sterilní zkumavky naplněné silikagelem, ve které je možno izoláty při -20 °C (-80°C) dlouhodobě skladovat pro potřeby opětovné izolace DNA, inokulace rostlin a podobně a byla tak rozšířena již existující sbírka izolátů *M. graminicola*.

Složení YMD agaru:

destilovaná H ₂ O.....	1l
kvasničný extrakt.....	4g
sladinový extrakt.....	4g
dextróza.....	4g
agar.....	15g

4.1.2. Extrakce DNA

Narostlá směs mycélia a spor byla z Petriho misky opatrně seškrábnuta sterilní špachtlí do třecí misky a použita k izolaci DNA.

DNA extrakce byla provedena metodou chloroformové extrakce s následným postupem:

1. homogenizace ve třecí misce s pomocí tekutého dusíku.
2. přidání 400 µl extrakčního pufru (CTAB)
3. inkubace 1 hodinu při 65 °C
4. přidání 400 µl chloroformu s isoamylalkoholem (24:1)
5. třepání 10 minut
6. centrifugace 10 minut při 3500 g
7. odebrání supernatantu a opakování kroku 4. -6.
8. přidání 300 µl isopropanolu k odebranému supernatantu
9. precipitace v tekutém dusíku
10. centrifugace 10 minut při 7000g
11. slítí a centrifugace
12. promývání pelety 70% etanolem 2x
13. vysušení pelety
14. rozpuštění pelety ve 100µl TE pufru

Složení extrakčního CTAB pufru:

CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromid) 2%
 TrisHCl (pH=8) 100 mM
 EDTA..... 20 mM
 NaCl 1.4 M
 merkaptoetanol (přidán těsně před použitím)..... 0.15 %

Extrahovaná DNA byla ihned použita k následným analýzám nebo uchovávána v mrazáku při teplotě -20°C.

4.2. Genetická struktura populace

4.2.1. Metoda SSR markerů

K porovnání genetické struktury populace na území České republiky bylo použito celkem 192 úspěšně namnožených izolátů. Ty byly otestovány osmi mikrosatelitními markery. Názvy a sekvence primerů jsou uvedeny v následující tabulce. Každý vedoucí primer byl fluorescenčně označen.

Barva	název (vzorec opakování)	orientace primeru	sekvence primeru (5' to 3')
Zelená (VIC-)	TCC-09	F	TCAATTGCCAATAATTCGGG
		R	AGACGAGGCAGTTGGTTGAG
	AC-01	F	CACCACACCGTCGTTCAAG
		R	CGTAAGTTGGTGGAGATGGG
	GT-03	F	GCCATGCACGACATCTCC
		R	TCAAGGTGGTTCTCGCAGTC
Červená (PET-)	CCA-03	F	TTGTTTGACCGTCGTTCTCTC
		R	CAAAGATAGCAGCCCAGGTG
	GGC-01	F	GATACCAAGGTGGCCAAGG
		R	CACGTTGGGAGTGTCAAG
Modrá (FAM-)	TCC-08	F	AAAAGACATGACGCCCCGAC
		R	ACGAGGAATAATCGCGGAAC
Žlutá (NED-)	AG-11	F	TTGAGCAGGTTACGGAGAGG
		R	CCAGCTGGGAGATATTCGTG
	AG-06	F	TAACCAACACCAGGGGAATG
		R	CATCAGTTGTCAGCGAATGG

Tabulka 4.1: Specifikace jednotlivých mikrosatelitních markerů.

Každá reakční směs (20 μ l) obsahovala:

Taq pufr.....1x
dNTPs.....10mM
primery (2).....10 μ M
Taq polymeráza (Fermentas).....0,05 U/ μ l
Templátová DNA.....25ng
rozpuštěno vddH₂O

a amplifikace probíhala za těchto podmínek

96 °C5 min
(94 °C.....30s
53 °C.....30s
72 °C.....30s) 31x
72 °C.....5 min

Separace amplifikovaných fragmentů byla posléze provedena na kapilárové elektroforéze (Applied Biosystem) s použitím GeneScan-500 LIZ (Live technologies) hmotnostního standardu.

4.2.2. Analýza dat

Délka jednotlivých fragmentů odpovídajících různým alelám byla vyhodnocena v programu GeneMapper software v4.1 (Applied biosystem, Live technologies), kdy délka jednotlivých fragmentů byla odečtena vizuálně a pro každý marker jednotlivě. Izoláty vykazující stejné alely ve všech osmi lokusech byly vyhodnoceny jako klony a v populaci byl pro další analýzy ponechán pouze jeden reprezentativní haplotyp. Z výsledných dat upravených do požadovaného formátu byla poté, pomocí programu GenoDive (verze 2.0; Meirmans & Tienderen, 2004), vypočítána hodnota genotypové diverzity (G), genové diverzity (H) a fixačního indexu (G_{ST}) podle Neia (1973).

Zda probíhá v populacích pravidelná rekombinace, bylo ověřeno zjištěním hodnoty indexu asociace (IA) v programu LIAN 3.5 (Haubold & Hudson, 2000).

Za pomoci online nástroje Tree drawing (dostupné z <http://pubmlst.org/>) byl vytvořen UPGMA analýzou dendrogram, zobrazující genetickou variabilitu.

4.2.3. Genetická diferenciacie a migrace mezi evropskými populacemi

Díky spolupráci se švýcarskou skupinou na ETH v Curychu se nám podařilo získat data z mikrosatelitní analýzy z dalších evropských států, data byla použita také v publikaci Boukef et al. (2012) (*tabulka 10.5*). Stejně jako v naší analýze bylo i zde použito stejných osm mikrosatelitních markerů. Izoláty pocházely z Německa (n=32), Velké Británie (n=32) a Švýcarska (n=32). Ke zjištění úrovně genetické diferenciacie mezi populacemi z různých zemí byla použita analýza molekulárního rozptylu (AMOVA), která byla také jedním z nástrojů programu GenoDive (verze 2.0; Meirmans & Tienderen, 2004).

Pro identifikování struktury populace bez znalosti jednotlivých subjektů jsme použili baesiánský algoritmus implementovaný v softwaru STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Inicializace počátečního běhu programu s 20 replikacemi pro skupiny $K = 1$ až 15 byla s burn-in na hodnotě 5'000 a s Markovovými řetězci pro metodu Monte Carlo (MCMC) s 50'000 generacemi. Nejpravděpodobnější počet skupin jsme našli vykreslením reziduí ΔK ve shodě s Evanno et al. (2005), což určuje míru změny druhého řádu distribucí hodnot $L(K)$. Analýzu pro zjištění nejpravděpodobnější hodnoty K jsme opakovali s burn-in periodou 500'000 a MCMC vzorkem 1'000'000 generací.

Odhad míry nedávné migrace byl určen pomocí programu BayesAss (verze 3; Rannala & Yang, 2003). Baesiánský přístup předpokládá aposteriorní odvození průměru m , který značí podíl genotypů v populaci způsobený migrací v několika posledních generacích. Použili jsme následující a priori pravděpodobnosti pro metodu MCMC. „Mixing“ parametr pro frekvence alel byl zpočátku nastaven na 0,3 a „mixing“ parametr pro inbríding koeficienty byl nastaven na 0,1. Dovolili jsme pro burn-in 1'000'000 iterací a pro vzorkování MCMC 10'000'000 iterací. Ověřili jsme tak, že velká fluktuace v logaritmicke pravděpodobnosti je omezena na burn-in fázi a že během MCMC vzorkování se nevyskytují žádné velké oscilace vzhledem k předpokladům.

Kromě odhadu nedávných migrací jsme použili i metodu maximální věrohodnosti z programu MIGRATE-N (verze 3.2.16; Beerli, 2011) pro určení míry historické migrace. Haploidní data jsme převedli na diploidní podle instrukcí programu. Počáteční hodnoty pro

míru migrace byly odvozeny na základě párového F_{ST} (G_{ST}). Použili jsme 10 krátkých a tři dlouhé řetězce s burn-inem z 10000 stromů pro každý řetězec a 4 teploty, adaptivní „heating scheme“.

Abychom zohlednili mutační model na mikrosatelitních lokusech, upravili jsme parametry pro Brownův model mutací pro mutace mikrosatelitních lokusů. Brownovský mutační model sleduje klasický krokový model mutací, ale má menší nároky na výpočetní výkon.

4.3. Rozlišení pohlavních typů

Pohlavní typy izolátů byly určeny pomocí multiplex PCR pro obě pohlavní idiomorfy (Waalwijk et al., 2002).

Sekvence primerů pro idiomorfu MAT 1-1 a MAT 1-2 jsou uvedeny v následující tabulce.

idiomorfa	sekvence	délka fragmentu
MAT 1-1 (for)	5'-CCGCTTTCTGGCTTCTTCGCACTG-3'	340 bp
MAT 1-1(rew)	5'-TGGACACCATGGTGAGAGAACCT-3'	
MAT 1-2 (for)	5'-GGCGCCTCCGAAGCAACT-3'	660bp
MAT 1-2 (rew)	5'-GATGCGGTTCTGGACTGGAG-3'	

Tabulka 4.2: Sekvence primerů pro rozlišení pohlavních typů

Každá reakční směs obsahovala (20 μ l):

Taq Buffer1x
MgCl₂.....10mM
dNTPs.....10mM
primery (4).....10 μ M
Taq polymeráza (Fermentas).....0,04 U/ μ l
Templátová DNA.....25ng
rozpuštěno vddH₂O

a amplifikace probíhala za těchto podmínek v termocykleru MJ Research PTC-200:

94 °C3 min
(94 °C.....60 s
68 °C.....30 s
72 °C.....60 s) 35x
72 °C.....10 min

Vzorky byly poté skladovány před nanesením na gel při teplotě 4 °C.

Pro separaci produktů PCR byla využita souprava pro horizontální elektroforézu (Biometra). PCR produkty byly nanášeny na 1% agarózový gel, připravený rozvařením agarózy v 1 x TBE pufru (Eppendorf). K vizualizaci DNA fragmentů byl použit ethidium bromid (Fluka) v množství 1 µl na 30 ml gelu. Do tuhého gelu byly nanášeny vzorky amplifikované DNA spolu s detekčním barvivem 6x loading dye solution (Fermentas) v poměru 5:1. Pro porovnání velikostí získaných fragmentů byl nanesen molekulární marker 1 kb DNA ladder (Fermentas). Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 80 V. Přibližně po 60 min byla pozorována přítomnost DNA fragmentů v gelu na UV transiluminátoru při vlnové délce 280 nm a výsledky elektroforetické separace byly zdokumentovány pomocí vizualizačního systému Ingenius Syngene a programu GeneSnap (Syngene).

4.3.1. Analýza dat

Statistický χ^2 test byl použit pro zjištění, zda se pohlavní typy MAT1-1 a MAT1-2 nacházejí v Hardy-Weinbergově rovnováze, tedy v předpokládaném poměru 1:1. Testování bylo provedeno pro každou populaci zvlášť a pro také všechny populace dohromady.

4.4. Detekce QoI rezistentní alely metodou PCR-RFLP

Všech 192 vzorků bylo otestováno na přítomnost QoI rezistentní alely A143 pomocí běžné PCR reakce a následným štěpením pomocí restrikčního enzymu. V publikaci Torrianiho et al. (2008) byl použit enzym *Fnu4HI*. My jsme použili restrikční endonukleázu *SatI* (Fermentas) se stejným štěpným palindromem.

Primer	Sekvence
Cytb (for)	5'-TCG TTA CTG GTG TTA CAC TTG C-3'
Cytb (rew)	5'-GCC ATA ACA TAA TTC TCG CTG TCA CC-3'

Tabulka 4.3: Primery pro amplifikaci úseku genu cytochromu *b*

Každá reakční směs pro PCR obsahovala (20 µl):

Taq pufr.....1x
dNTPs.....10 mM
primery (2).....10 µM
Taq polymeráza (Fermentas).....0,05 U/ µl
Templátová DNA.....25 ng
rozpuštěno vddH₂O

a amplifikace probíhala za těchto podmínek:

96 °C2 min
(96 °C.....60 s
50 °C.....60 s
72 °C.....60 s) 35x
72 °C.....5 min

Amplifikovaný produkt byl poté štěpen pomocí restriční endonukleázy.

Endonukleáza *SatI* štěpí DNA molekulu v tomto palindromu:

...GCNGC... → ...GC / NGC...
...CGNCG... → ...CGN / CG...

Každá reakční směs obsahovala:

10x pufr G2 µl
PCR produkt.....10 µl
Enzym *SatI*.....1 U
ddH₂O.....18 µl

Tato směs byla inkubována v 37 °C po dobu 4 hodin. Poté byla aktivita enzymu zastavena inkubací 20 minut při teplotě 65 °C. Výsledné naštěpené produkty byly vizualizovány na 1% agarózovém gelu (popsáno výše) po 1 hodině při napětí 80V.

Pro izolát náchylný (bez rezistentní alely) bylo možno na agarózovém gelu pozorovat dva fragmenty o velikosti 442 bp a 210 bp. U izolátů rezistentních bylo možno pozorovat fragmenty tři, a to o velikosti 298 bp, 210 bp a 144 bp.

4.4.1. Fungicidní test

Pro ověření, zda izoláty jeví se při testování DNA jako náchylné, jsou opravdu náchylné, jsme provedli in-vitro fungicidní test.

Test byl založen na růstu mycélia na plotnách s YMD agarem (složení viz kapitola 4.1.1). Spóry byly namnoženy v tekutém YM médiu a před aplikací na Petriho misky byla jejich koncentrace upravena na hodnotu 100 spor na μl .

Složení YM tekutého média:

destilovaná H_2O1l
kvasničný extrakt.....4g
sladinový extrakt.....0.5g

Plotny se selektivním médiem obsahovaly azoxystrobin, který byl do média přidán v podobě fungicidního přípravku Amistar (obsah azoxystrobinu 250g/l).

Kvůli zabránění výskytu falešné rezistence byla do média přidána také kyselina salicylhydroxamová (SHAM) v koncentraci, která inhibuje alternativní oxidázu (AOX). AOX umožňuje přenos elektronů v alternativním dýchacím řetězci (Ziogas et al., 1997). Obě látky byly rozpuštěny v metanolu a přidány do média o teplotě 60°C. Koncentrace methanolu nepřesáhla koncentraci 0.3% v/v.

Jelikož se koncentrace jednotlivých látek použitá pro fungicidní testy lišila v různých publikacích (Torriani et al., 2008; Ziogas et al., 1997) přistoupili jsme nejprve k optimalizaci koncentrace. Azoxystrobin byl použit v koncentracích 0,5; 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ a SHAM v koncentracích 0,5; 1 a 2 mM. Byly otestovány i jejich různé kombinace.

Na každou plotnu s médiem bylo nanášeno 3 x 5 µl suspenze spor každého ze tří izolátů. Každá plotna měla tři stejná opakování. Každý náchylný i rezistentní izolát byl také pěstován na kontrolní plotně bez fungicidu. Všechny plotny byly inkubovány po dobu dvou týdnů ve tmě a při teplotě 20 °C. Růst mycelia byl poté vizuálně zhodnocen a porovnán s růstem kolonií na kontrolních plotnách.

Celkem bylo použito následujících 12 citlivých izolátů a 3 izoláty rezistentní (tučně): CRI0111, CRI0189, CRI0273, CRI0464, **CRI0469**, CRI 0633, CZU1006, CZU1010, CZU1026, CZU1027, **CZU1037**, CZU1052, **CZU1057**, CZU1081, CZU1096. Izoláty byly vybrány z různých populací a z různých let sběru.

5. Výsledky

Ze zhruba 200 izolátů odebraných v roce 2011 se nám podařilo úspěšně namnožit celkem 96 izolátů, které dohromady s 96 izoláty z ruzyňské sbírky vytvořili kolekci izolátů reprezentující téměř celou Českou republiku.

5.1. Genetická diverzita a struktura české populace

Všech osm mikrosatelitních markerů tvořilo polymorfni fragmenty DNA. Celkem bylo detekováno 66 různých alel. Počet u jednotlivých lokusů se pak pohyboval v rozmezí 4 do 14 alel pro lokus (*tabulka 5.1*). Izoláty, které neamplifikovaly na více jak čtyřech lokusech byly z dalších analýz vyřazeny, v tomto případě jich bylo celkem osm. V konečném počtu 184 izolátů bylo nalezeno celkem 158 unikátních haplotypů. 17 haplotypů bylo nalezeno ve více než jedné kopii a jednalo se zřejmě o klony. Tyto klony byly nalezeny jak v rámci jedné léze, tak i v oblasti zahrnující více populací. Stejných haplotypů vyskytujících se ve více jak jedné populaci bylo nalezeno devět. Nejčastěji se vyskytovaly v párech (8 krát), dvakrát se vyskytly ve třech kopiích, dvakrát ve čtyřech kopiích a jednou dokonce v sedmi kopiích. Tento nejčastěji se vyskytující haplotyp byl nalezen celkem v pěti různých populacích. Ve dvou případech stejný haplotyp vykazoval různý pohlavní typ, proto do dalších analýz nebyly tyto izoláty zahrnuty jako klony, ale jako unikátní izoláty.

marker	TCC_09	GGC_01	AG_06	TCC_08	AC_01	CCA_03	GT_03	AG_11
množství alel	6	14	13	4	11	9	13	6

Tabulka 5.1: Počet alel na jednotlivých lokusech

Genotypová diverzita byla v jednotlivých populacích rozdílná. Nejvíce rozmanitá byla populace VII, kde každý izolát vykazoval unikátní haplotyp. Nejméně rozmanitá pak byla populace III, kde se v celkovém počtu 31 izolátů nacházelo pouze 24 unikátních haplotypů. Hodnota Neiovy genové diverzity (H) se pohybovala v rozpětí od 0,439 do 0,584 (*tabulka 5.2*).

	Lokalita	Vzorků celkem	Počet genotypů	G	H
I	Praha	34	28	0.988	0.511
II	Plzeň	14	13	0.989	0.494
III	Ústí n. Orlicí	31	24	0.981	0.439
IV	Kroměříž	38	32	0.987	0.584
V	Jihlava	21	18	0.986	0.512
VI	Opava	23	20	0.984	0.55
VII	Cheb	23	23	1	0.499
	Celkově	184	158	0.998	0.523

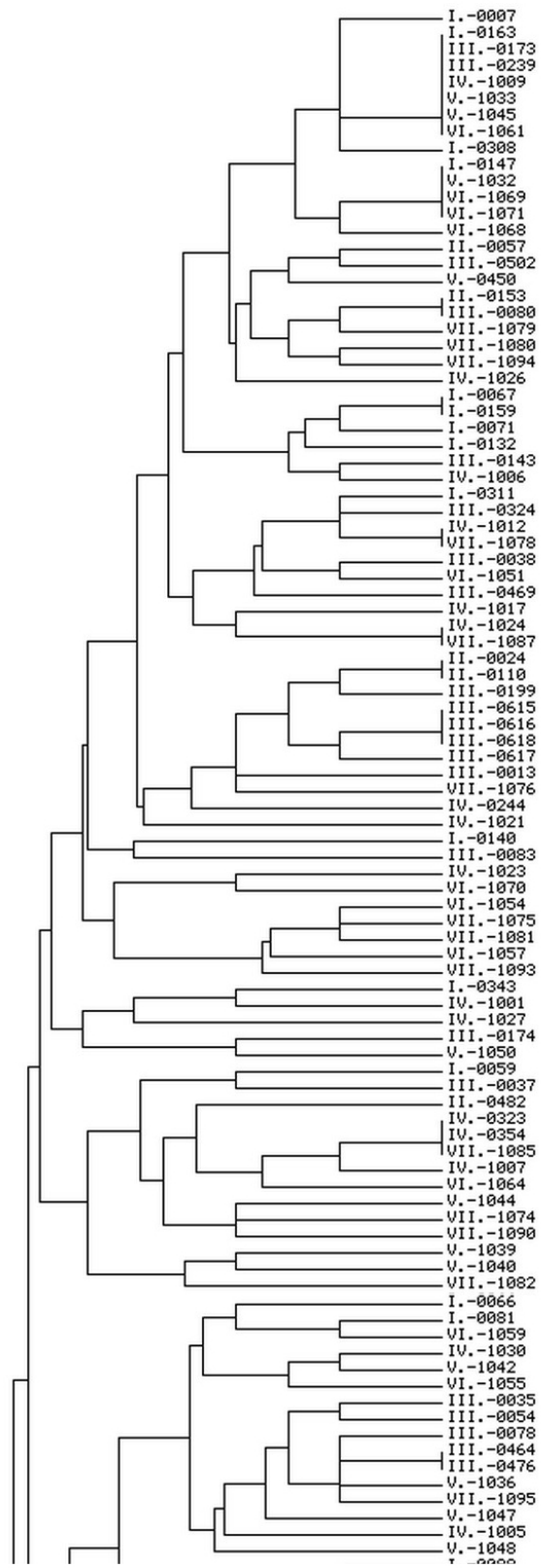
Tabulka 5.2: Hodnoty genotypové a genetické diverzity pro jednotlivé populace

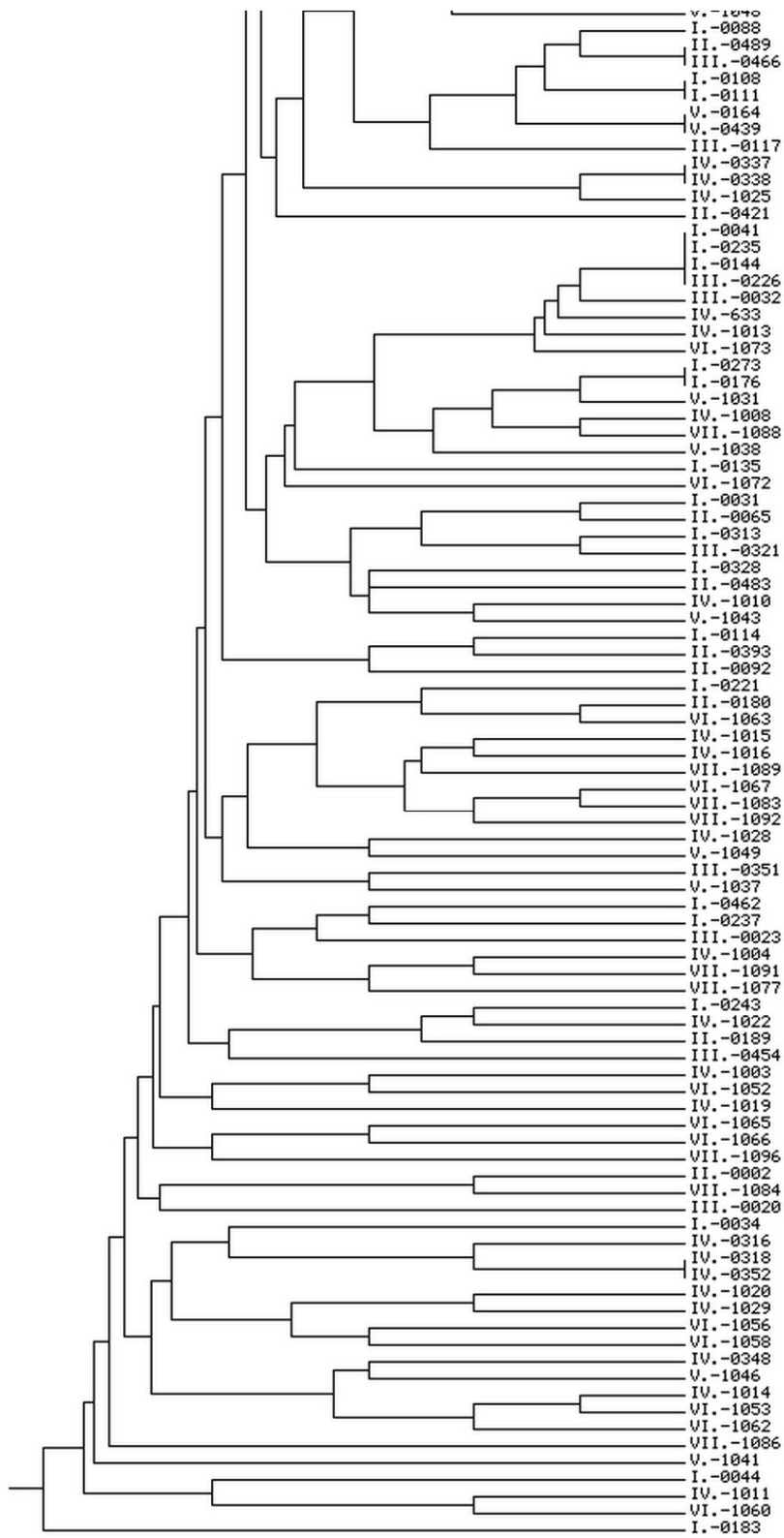
Genetická diference mezi jednotlivými populacemi v České republice byla spočítána podle Neia (Nei, 1973) a její hodnota byla nízká $G_{ST} = 0,038$.

Při srovnání jednotlivých populací pomocí párové analýzy byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi následujícími páry populací: I (Praha) a IV (Jihlava); III (Ústí n. Orlicí) a IV (Jihlava), V (Kroměříž); VII (Cheb) a všemi ostatními (tabulka 5.3.). Nejsilnější diference byla nalezena mezi populacemi I (Praha) a VII (Cheb) ($G_{ST} = 0,067$, $p = 0.001$).

Ze statistické analýzy AMOVA můžeme usuzovat, že 97,6 % veškeré genetické variability může být vysvětleno rozdíly mezi jednotlivými izoláty uvnitř populací (vnitropopulační variabilita). Oproti tomu pouze 2,4 % z celkové variability může být vysvětleno rozdíly mezi jednotlivými populacemi (mezipopulační variabilita). Nevelký vliv geografické polohy jednotlivých lokalit je také dobře poznat z dendrogramu (obrázek 5.1), kde není patrné žádné výraznější shlukování izolátů ze stejných lokalit.

Phylogenetic tree





0.1

Obrázek 5.1: Dendrogram vytvořený na základě UPGMA analýzy. Římská číslice značí populaci, další číslo je označení izolátu.

Jelikož *M. graminicola* preferuje chladnější a vlhčí prostředí, zajímalo nás, zda se populace v regionech s vyšší nadmořskou výškou a častějšími srážkami liší od populací vyskytujících se v oblastech níže položených, teplejších a sušších a zjistili jsme zde také mírně zvýšenou úroveň diferenciaci ($G_{ST} = 0.028$, $p = 0.004$). Průměrný roční úhrn srážek a průměrné teploty v jednotlivých lokalitách jsou uvedeny v *tabulce 10.1* v přílohách. Izoláty z různých lokalit byly odebírány v různých letech, ověřili jsme proto také zda se významně neliší kolekce izolátů pocházejících z let 2005-2009 a kolekce izolátů z roku 2011. Zde nebyl prokázán žádný významný rozdíl.

GST/p	I	II	III	IV	V	VI	VII
I	-	NS	NS	0.025	NS	NS	0.067
II	0.759	-	NS	NS	NS	NS	0.045
III	0.629	0.953	-	0.029	NS	0.028	0.035
IV	0.025	0.558	0.025	-	NS	NS	0.038
V	0.437	0.905	0.597	0.253	-	NS	0.039
VI	0.076	0.583	0.046	0.969	0.302	-	NS
VII	0.001	0.021	0.016	0.004	0.015	0.073	-

Tabulka 5.3: Výsledky párové analýzy. Data pod úhlopříčkou - GST hodnoty, data nad úhlopříčkou - p hodnoty . NS – statisticky nevýznamná hodnota

5.2. Rozlišení pohlavních typů

U všech 192 izolátů byla zaznamenána amplifikace fragmentu odpovídajícího jednomu nebo druhému pohlavnímu typu. U žádného izolátu se nevyskytovaly fragmenty oba, což znamená mimo jiné, že při manipulaci s izoláty nedošlo ke kontaminaci.



Obrázek 5.2: Amplifikované DNA fragmenty odpovídající pohlavním typům MAT 1-1 (340bp) a MAT 1-2 (660bp) na agarózovém gelu

Ve skupině vzorků zahrnující všechny izoláty, včetně klonů bylo 48 % pohlavního typu MAT1-1 a 52 % pohlavního typu MAT1-2. Ve skupině vzorků, ze které byly klony vyřazeny, to pak bylo 47 % pohlavního typu MAT1-1 a 53 % pohlavního typu MAT1-2 (obrázek 10.1 přílohy).

Podle výsledků χ^2 testu se poměr mezi jednotlivými pohlavními typy významně neliší od očekávaného poměru 1:1, a to v žádné z jednotlivých populací ani v celkovém měřítku.

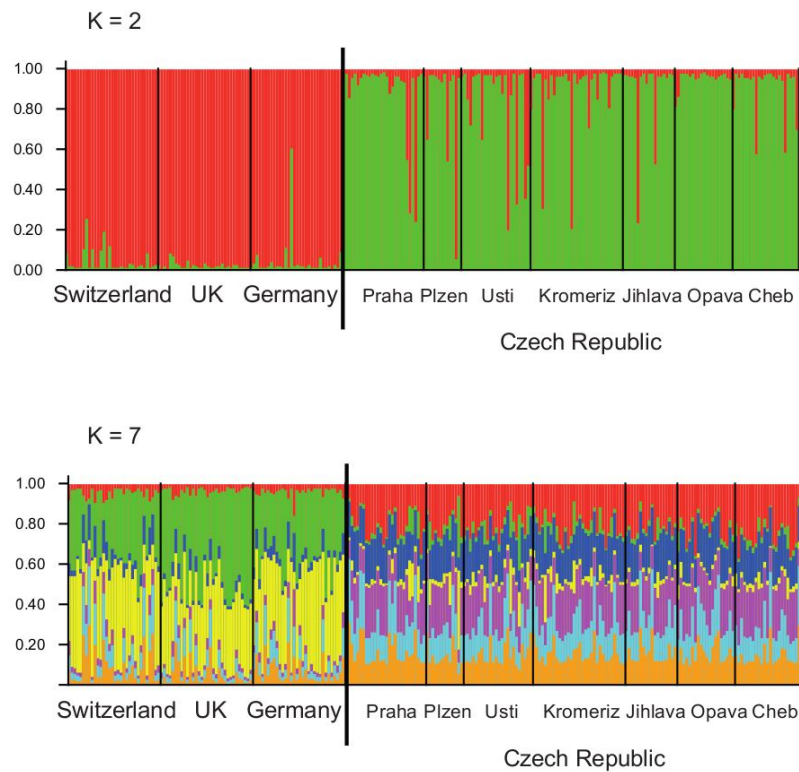
	I	II	III	IV	V	VI	VII	celkem
MAT 1-1	21/16	6/6	13/10	18/14	11/9	12/11	12/12	93/78
MAT 1-2	17/16	8/7	17/13	22/20	12/11	11/9	12/11	99/88

Tabulka 5.4: Počty jedinců příslušných pohlavních typů podle lokalit (s klony/bez klonů)

5.3. Genetická diferenciacie českých populací v porovnání se západní Evropou

Analýza genetické diferenciacie zahrnující další populace pocházející z Německa, Velké Británie a Švýcarska v kombinaci s českými populacemi ukázala, že pouze 3,2 % ($p = 0.001$) ze všech genetických odlišností mezi populacemi může být vysvětleno zemí původu. Další podíl 1.7 % ($p = 0.009$) z těchto odlišností můžeme připisovat rozdílům mezi jednotlivými českými populacemi. Mezi státy západní Evropy a Českou republikou nebyl nalezen žádný izolát, který by tyto populace sdílely.

MCMC nepracuje s populacemi, ale hledá nejvhodnější populačně genetickou strukturu mezi jedinci a každého přiřadí do určité fiktivní populace. Bez předchozích znalostí subjektů jsme provedli bayesiánskou analýzu populační struktury v programu STRUCTURE a zjistili jsme, že $K = 2$ byl nejnižším podporovaným počtem skupin, jehož věrohodnost byla podporována vysokou hodnotou ΔK (obrázek 5.3). V první skupině se blízce seskupily populace z Německa, Švýcarska a Velké Británie a v druhé populace z České republiky. Všechny české populace obsahovaly izoláty s vysokou posteriorní pravděpodobností k zařazení do populací západní Evropy zatímco jeden německý izolát vykazoval vysokou posteriorní pravděpodobnost k zařazení do českých populací.

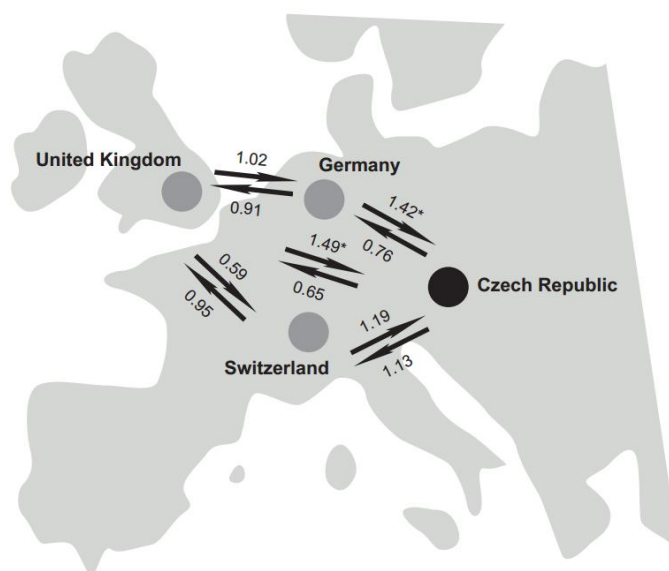


Obrázek 5.3: Výstupy z programu STRUCTURE. Grafické znázornění populací s počtem skupin 2 a 7.

Odhad nedávné migrace jsme provedli v programu BayesAss. MCMC vzorkování neukázalo žádnou velkou oscilaci a auto-korelaci v iteracích, což značí dobrou konvergenci pro míry migrace. Značná migrace byla nalezena z Německa a Velké Británie do Švýcarska, ale tato migrace byla značně asymetrická, jelikož Švýcarsko přispělo pouze několika migranty do Německa a Velké Británie (*tabulka 5.5*). Migrace z Německa, Švýcarska a Velké Británie do Čech byla relativně nízká, pohybovala se v rozmezí 0,71 % a 3,38 %, ale žádná míra migrace se významně nelišila od nuly. Podobně jsme našli nízkou migraci i z České republiky do západní Evropy (0,78 - 3,69 %). V rámci České republiky jsme našli velký příliv migrantů v kroměřížské populaci (IV) ze všech ostatních populací (20,78 - 24,76 %). Tato migrace byla velice asymetrická a migrace v opačném směru byla velice malá, pohybující se v rozmezí 0,81 - 0,84 %.

Míra historické migrace byla odhadnuta na základě analýzy maximální podobnosti v programu MIGRATE-N. Sloučili jsme dohromady všechny české populace a odhadli

dlouhodobou míru migrace M (stupňované podle míry mutace) mezi Českou republikou a třemi západoevropskými populacemi. Nalezli jsme nevelké míry historické migrace mezi těmito čtyřmi evropskými lokalitami (*obrázek 5.4*). Migrace byla většinou stejná jako odhadovaná míra mutace ($M = 1$). Významná asymetrická migrace byla zaznamenána z Německa a z Velké Británie do České republiky.



Obrázek 5.4: Grafické zobrazení míry historické migrace mezi jednotlivými státy

		Zdroj migrantů																				
		Švýcarsko		UK		Německo		Česká republika														
								Praha		Plzeň		Ústí n O.		Kroměříž		Jihlava		Opava		Cheb		
Cíl migrantů	Švýcarsko	67,51	(0.81)	1,60	(1.43)	25,05	(2.51)	0,72	(0.70)	0,72	(0.7)	0,72	(0.70)	1,54	(1.36)	0,71	(0.69)	0,72	(0.70)	0,72	(0.70)	
	UK	0,79	(0.78)	89,53	(3.10)	3,52	(2.34)	0,80	(0.79)	0,79	(0.78)	0,80	(0.78)	1,38	(1.33)	0,80	(0.77)	0,80	(0.77)	0,79	(0.77)	
	Německo	0,80	(0.78)	1,53	(1.19)	91,87	(2.27)	0,79	(0.77)	0,80	(0.78)	0,79	(0.77)	1,04	(0.99)	0,80	(0.77)	0,79	(0.78)	0,79	(0.77)	
	Česká republika	Praha	0,79	(0.76)	1,58	(1.46)	2,34	(2.11)	67,70	(1.01)	0,81	(0.79)	0,81	(0.78)	23,54	(3.02)	0,80	(0.78)	0,81	(0.79)	0,82	(0.79)
		Plzeň	1,25	(1.18)	2,21	(2.00)	1,95	(1.91)	1,23	(1.17)	68,25	(1.46)	1,23	(1.18)	20,21	(3.62)	1,23	(1.17)	1,22	(1.17)	1,22	(1.16)
		Ústí n O.	0,87	(0.84)	2,09	(2.16)	1,85	(1.62)	0,87	(0.85)	0,88	(0.85)	67,71	(0.99)	23,12	(3.23)	0,87	(0.84)	0,86	(0.83)	0,88	(0.84)
		Kroměříž	0,80	(0.78)	1,02	(0.96)	1,04	(0.99)	0,79	(0.77)	0,80	(0.79)	0,81	(0.78)	92,36	(2.23)	0,79	(0.76)	0,80	(0.79)	0,81	(0.78)
		Jihlava	1,02	(0.99)	2,60	(2.32)	1,56	(1.47)	1,03	(0.99)	1,04	(1.00)	1,03	(1.00)	21,72	(3.54)	67,95	(1.21)	1,03	(1.00)	1,02	(0.98)
Opava	0,96	(0.93)	1,18	(1.13)	1,38	(1.28)	0,96	(0.92)	0,96	(0.92)	0,95	(0.91)	23,88	(2.75)	0,95	(0.91)	67,83	(1.10)	0,96	(0.93)		
Cheb	0,90	(0.87)	1,90	(1.75)	1,50	(1.29)	0,88	(0.85)	0,88	(0.84)	0,89	(0.87)	23,54	(2.9)	0,89	(0.86)	0,89	(0.86)	67,74	(1.03)		

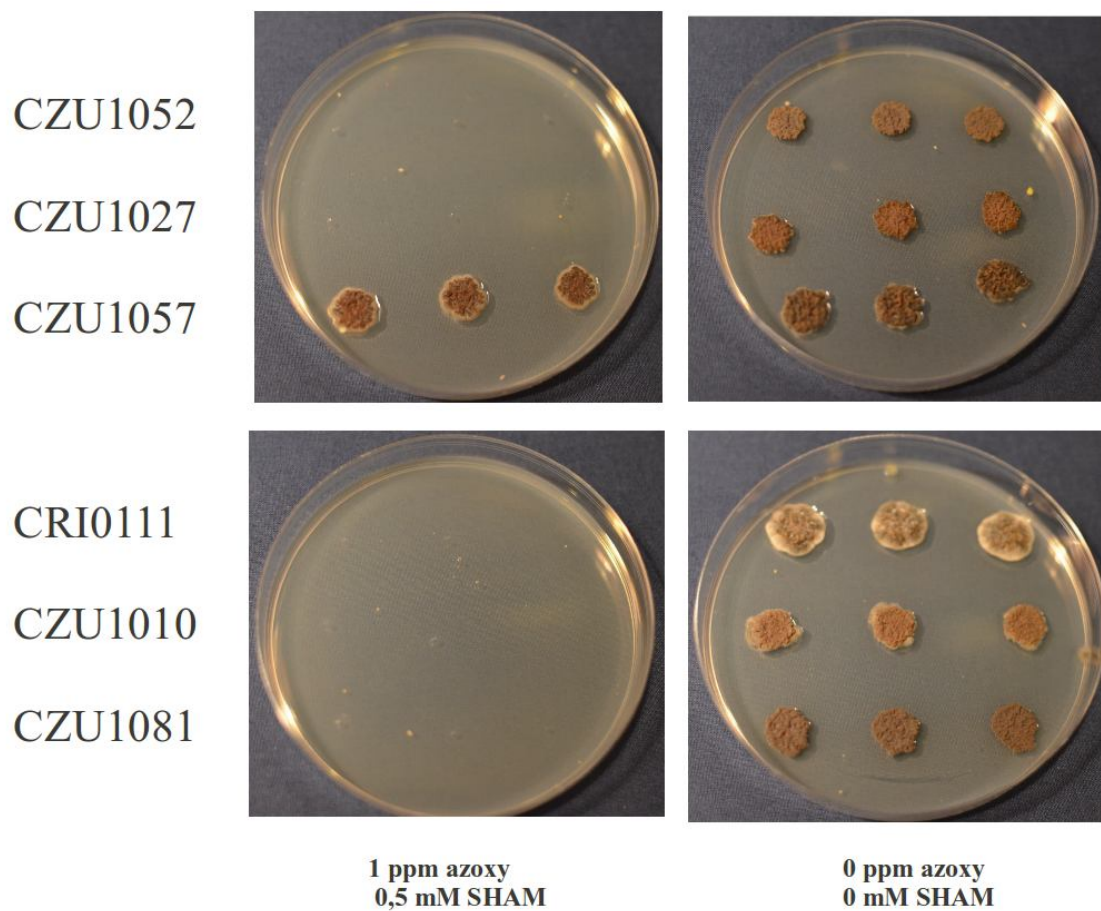
Tabulka 5.5: Odhad míry historické migrace mezi Českými populacemi a populacemi států západní Evropy (% populace tvořené nedávnými imigranty) vytvořený v programu BayesAss.

5.4. Detekce rezistentní alely genu *cyt b* v české populaci

V izolátech pocházejících z let 2005-2006 (n=32) jsme nenašli žádný izolát nesoucí rezistentní alelu ke QoI fungicidům. První rezistentní izoláty jsme našli ve sbírce pocházející z roku 2007, a to v populaci z okolí Ústí nad Orlicí, kde 6 z 10 izolátů již vykazovalo rezistenci. Mezi izoláty odebranými v dalších letech (2008-2009) se rezistentní izoláty objevily i v sousedících lokalitách kde bylo 15 z celkových 43 izolátů rezistentních (35%). Ve sbírce izolátů z roku 2011 (n=96) už se rezistentní izoláty vyskytovaly ve všech lokalitách, na kterých byl odběr prováděn (42 %). V populaci pocházející z okolí Jihlavy rezistenci vykazovaly dokonce všechny odebrané izoláty (*obrázek 10.2 přílohy*).

Pomocí fungicidního testu, založeném na růstu mycelia, jsme ověřili relevantnost detekce rezistentních izolátů pomocí testování DNA. Po optimalizaci testu byla zvolena jako optimální varianta s koncentrací azoxystrobinu 1 ppm a koncentrací SHAM 0.5 mM. Při koncentraci azoxystrobinu nižší než 1 ppm nebylo možné jednoznačně rozlišit rezistentní izoláty od náchylných, při vyšších koncentracích změny nebyly pozorovány. Naopak při koncentraci SHAM vyšší než 1 mM všechny izoláty na médiu vykazovaly zpomalený růst, dávka 2 mM se jevila již jako letální.

Všech 12 testovaných náchylných izolátů nevykazovalo žádný růst na plotnách obsahujících fungicid, na kontrolních plotnách byl růst normální. Rezistentní izoláty na plotnách obsahujících fungicid vykazovaly stejný růst jako na plotnách kontrolních (*obrázek 5.5*).



Obrázek 5.5: Výsledky fungicidního testu. Na plotnách s fungicidem roste pouze rezistentní izolát (CZU1057), ostatní izoláty náchylné rostou pouze na plotnách kontrolních.

6. Diskuse

6.1. Genetická diverzita *M. graminicola*

Pro předpověď vývojového potenciálu patogenu je znalost genetické struktury populace velice důležitá. Při vývoji nových a trvalejších kontrolních strategií hrají pak tyto informace velice důležitou roli (Stkenbrock & McDonald, 2008). V současné době nebyla k dispozici žádná data týkající populační struktury *M. graminicola* v České republice. Tato práce tedy představuje první popis populační struktury *M. graminicola* založený na mikrosatelitních markerech. Mikrosatelitní markery byly a jsou hojně využívány při studiu populační genetiky zvířat, rostlin i nižších organismů díky jejich vysokému polymorfismu a specifitě (Seolke & Toonen, 2006). Dá se říci, že tyto markery jsou pro populační studie vhodnější než například AFLP, RFLP nebo RAPD, protože jsou velice dobře reprodukovatelné v odlišném laboratorním prostředí. V této práci byla tato jejich vlastnost také prokázána, když se nám podařilo úspěšně sloučit data z České republiky a západní Evropy, která byla získána v různých laboratořích, různými pracovníky a v různých letech. Všech osm námi použitých mikrosatelitních markerů bylo také vysoce polymorfních a spolehlivě amplifikovatelných. Konkrétně, nejvíce polymorfní marker GGC_01 tvořil 14 různých alel, nejméně polymorfní marker TCC_08 pak 4 různé alely.

Analýza provedená pomocí těchto markerů odhalila ve všech českých populacích *M. graminicola* vysoký stupeň genetické diverzity, čemuž odpovídá také nízký podíl klonů nalezených v jednotlivých populacích. Maximální počet klonů byl 22% a to v populaci, do které byly zahrnuto pět izolátů z jedné skvrny, které pravděpodobnost výskytu klonů zvyšují. Tato zjištění jsou v souladu s dřívějšími studiemi, které objevily vysokou genetickou diverzitu polních populací ve všech hlavních pšeničných pěstitelských oblastech po celém světě (Zhan et al., 2003b).

V několika případech se shodné haplotypy vyskytovaly ve více populacích. Je pravděpodobné, že v tomto případě je tento jev způsoben velmi vysokou variabilitou uvnitř jednotlivých populací a ne díky struktuře populace.

Oba pohlavní typy *M. graminicola* jsme našli ve všech populacích v rovnováze a nebyla nalezena ani žádná významná odchylka od vazebné rovnováhy (linkage equilibrium) jednotlivých mikrosatelitních lokusů. To dokazuje, že na území České republiky dochází v populacích tohoto patogenu k častému pohlavnímu rozmnožování. Tyto výsledky jsou v souladu s prací Zhana et al. (2002b), kteří našli rovnovážný stav obou pohlavních typů v populacích různého geografického rozsahu. Časté pohlavní rozmnožování umožňuje patogenu snáze překonávat rezistentní mechanismy rostlin, přizpůsobovat se novým podmínkám nebo vyvíjet rezistenci k novým skupinám fungicidů (Stukenbrock & McDonald, 2008). Je tedy téměř jisté, že k tomuto dochází i na území České republiky.

6.2. Populační struktura v České republice

Mezi jednotlivými českými populacemi byly nalezeny pouze nevýrazné rozdíly, necelá 3 % z celkové variability. To souhlasí s relativně nízkými rozdíly nalezenými v jiných evropských populacích, jako například v Německu a ve Francii (Schnieder et al., 2001; El Chartouni et al., 2011), ale také v celosvětovém měřítku (Zhan et al., 2003b). Mírně zvýšený rozdíl jsme zaznamenali pouze při porovnávání populací s odlišnými klimatickými podmínkami. Je známo, že *M. graminicola* způsobuje závažnější škody ve vlhčích a chladnějších oblastech (Eyal et al., 1987), je tedy možné, že rozdíl mezi vlhčími chladnějšími oblastmi a oblastmi suššími a teplejšími může značit lokální adaptaci k rozdílné aplikaci fungicidů, klimatu nebo odrůdám pšenice, tam pěstovaných. Zaznamenali jsme také asymetrickou migraci mezi jednotlivými populacemi v ČR, nejvíce zvýšenou směrem k populaci IV (Kroměříž) v porovnání s ostatními populacemi. Vysvětlením může být to, že je Kroměříž položena v nejsušší a nejteplejší oblasti a také je zde umístěna významná šlechtitelská stanice. Můžeme se tedy domnívat, že pozorovaná asymetrie v migraci mohla být spojena s přenosem infikovaných semen či rostlinného materiálu z jiných lokalit do a z této stanice.

Obecně byly ve světě zjištěny velice malé rozdíly mezi populacemi na menším geografickém území, přesto ale byly nalezeny i výjimky, kde byla diferenciací silnější, například ve Francii (El Chartouni et al., 2011) nebo v Íránu (Abrinbana et al., 2010). Ve Francii jsou rozdílné klimatické podmínky mezi severní a jižní oblastí pěstování pšenice, od kterých se odvíjí i pěstební praxe a lokální adaptace těmto podmínkám se jeví jako

nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto jevu. V Iráku by mohl být vysvětlením pro zvýšenou populační strukturu a genetickou diverzitu výskyt v oblasti domnělého místa původu *M. graminicola*, tedy v oblasti úrodného půlměsíce (Stukenbrock et al., 2007). Přestože máme v současné době k dispozici mnoho dat o genetické struktuře z různých geografických lokalit, jejich vzájemné porovnání je i nadále problematické. Povaha a množství použitých molekulárních markerů, úroveň zjištěného polymorfismu a statistických metod pro analýzu dat, činí porovnávání jednotlivých studií takřka nemožné. Je známo, že různé genetické markery vytváří různé stupně genetické struktury s těmi samými vzorky (např. Nybom, 2004). Teprve komplexní analýza pokrývající celý geografický rozsah výskytu populací *M. graminicola*, založená na jednom a tom samém markeru (např. mikrostatelity) by teprve dokázala přesně odhalit úroveň variability v populační struktuře v různých geografických lokalitách.

6.3. České populace se odlišují od populací západní Evropy

Při porovnání populací České republiky a tří dalších západoevropských zemí (Švýcarsko, Velká Británie a Německo) byla objevena zřetelná diference mezi českými populacemi z ostatních zemí. Kdežto populace jednotlivých států západní Evropy vykazovaly genetickou diferenciaci velice nízkou. Genetická diference se může přirozeně zvýšit buď snížením migrace, nebo lokální adaptací. Nedávná migrace (v několika posledních generacích) byla zaznamenána především z Německa a Velké Británie do švýcarských populací. K této migraci mohla přispět relativně stejná pěstební praxe používaná ve všech státech a také relativní geografická blízkost. Zato české populace vykazovaly značnou genetickou diferenciaci a nižší migraci v nedávné době vzhledem k ostatním evropským populacím. Důvodem pro nižší migraci by mohla být přítomnost přirozené bariéry v podobě pohoří obklopujícího Českou republiku ze tří stran. Nicméně historická migrace byla značně asymetrická, a to z Velké Británie a Německa směrem do České republiky, na které mohlo mít podíl převažující proudění vzduchu právě tímto směrem.

Je známo, že pěstování nových odrůd a zemědělská praxe mohou ovlivnit genetickou diverzitu populací *M. graminicola* (Zhan et al., 2002a; Stukenbrock & McDonald, 2008). Proto můžeme považovat velmi rozdílnou pěstební praxi během čtyřicetileté éry komunismu, za jedno z pravděpodobných vysvětlení toho, proč se české populace takto liší od populací v západoevropských státech. Do druhé světové války se zemědělství v České republice výrazně nelišilo od zemědělské praxe ve stávající západní Evropě. Po druhé světové válce však byla pole kolektivizována a zde pěstované lokální, německé a francouzské odrůdy byly nahrazeny převážně odrůdami pocházejícími z východní Evropy a jejich kříženci. Byl značně omezen dovoz a vývoz zemědělských produktů a za zmínku stojí i stagnace a pokles v zemědělské produkci koncem 80. a začátkem 90. let.

Pro jednoznačné určení toho, zda se rozdílný zemědělský systém podílel na lokální adaptaci patogenu v České republice, by bylo potřeba provést stejnou analýzu populací v další evropské zemi. Zajímavé výsledky by mohly přinést studie ze sousedního Slovenska nebo Polska, kde byl pěstební systém v posledních sto letech velice podobný. Populačně genetická studie jiného podobného patogenu *Pyrenophora tritici-repentis* (také vřeckovýtrusné houby) ukázala velikou podobnost mezi státy východní Evropy (Leišová et al., 2008). I přesto, že pěstitelská praxe rozhodně hraje roli v utváření genetické diverzity, její přesný vliv je třeba teprve prozkoumat.

6.4. Výskyt a rozšíření rezistence ke strobilurinovým fungicidům

Pro výskyt QoI rezistence v České republice jsme měli dvě různé hypotézy. Jedna počítá s migrací ze západoevropských zemí, kde byla tato rezistence objevena dříve než v České republice a druhá s nezávislým výskytem na polích ošetřovaných strobilurinovými fungicidy. Největší spotřeba fungicidů byla v ČR v 80. letech minulého století, tento náhlý vzestup ale vystřídal markantní pokles po roce 1989 způsobený politickými změnami a následnou změnou vlastnických vztahů. Z našich výsledků vyplývá, že populace *M. graminicola* v ČR prodělaly během několika let velice rychlý obrat z náchylné populace k téměř zcela rezistentní.

První rezistentní kmeny se zřejmě objevily v oblasti Českomoravské vrchoviny a Orlických hor (populace III a V). Tyto lokality jsou relativně výše položené a je zde vyšší objem srážek, to jsou optimální podmínky pro mnoho listových patogenů a závažnější škody způsobené braničnatkou pšeničnou byly prvně hlášeny právě z tohoto regionu. Pravděpodobně zde bylo potřeba i častější ošetření fungicidy, čímž mohlo dojít k selekci rezistentních kmenů, které již byly v populaci přítomny, ale ve velice nízké frekvenci. Toto zjištění koresponduje s výsledky Tvarůžka a Horákové (2005), kteří zaznamenali lehce zvýšený výskyt rezistentních izolátů v této oblasti již v roce 2002. To, že v naší sbírce první rezistentní izolát pocházel až z roku 2007, si lze vysvětlit rozdílností ve sběru vzorků (přesná lokalita, množství vzorků) nebo také nízkou frekvencí rezistentní alely v populaci do této doby. V některých případech se může stát, že i rezistentní izolát se při testování DNA může jevit jako citlivý, jelikož mohlo dojít k mutaci na jiném místě, než je cílový palindrom pro restriktázu (Ishii, 2010). Přítomnost chyby v testování DNA jsme zde ale vyloučili provedením fungicidního testu.

Populace I a IV pocházely z experimentálních maloparcelových ploch, které nebyly buď vůbec, nebo velmi málo ošetřovány fungicidy, přesto zde byl nalezen vysoký podíl rezistentních izolátů, což svědčí o tom, že se rezistentní kmeny *M. graminicola* mohou na pole dostat velmi snadno z okolních ošetřovaných polí, ať už pomocí člověka nebo větrem přenášených askospor.

Faktorem, který značně komplikuje snahu zamezit šíření této rezistence je to, že přítomnost mutace způsobující rezistenci není pro tento patogen energeticky ani jinak nákladná nebo omezující, jak je tomu běžně u rezistence k jiným fungicidům (Grasso et al., 2006). Proto si populace, které získaly rezistenci k QoI fungicidům, selekčním tlakem, uchovávají tuto rezistenci i v období, kdy se selekční tlak zmírnil, či zcela vymizel.

Výskyt a rychlý nárůst rezistence k QoI fungicidům byl již dříve hlášen ze západní Evropy (Fraaije et al., 2005b). Tam se rezistence objevila nezávisle na různých genetických pozadích, v různých geografických regionech a rychle se rozšířila dál pomocí větrem přenosných askospor (Torriani et al., 2008). Migrace, popisovaná výše, mohla přinést rezistentní alely ze západní Evropy do České republiky. Také vysoká úroveň migrace v rámci České republiky mohla následně přispět rychlému šíření do různých oblastí, poté co se zde rezistentní kmeny objevily. I přesto jsou zde dva faktory, které naznačují, že

rezistence se vyvinula v ČR nezávisle. Za prvé, migrace mezi západní Evropou a Českou republikou byla v nedávné době na nízké úrovni, což činí možnost rychlého šíření rezistentních alel ze sousedních zemí méně pravděpodobnou. A za druhé, QoI rezistence byla poprvé zaznamenána v centrální části republiky, následně pak v sousedních lokalitách. Můžeme se tedy domnívat, že rezistence se objevila nezávisle na okolí ve středu republiky, odkud se pak šířila do dalších oblastí. Výsledky v publikaci Tvarůžka a Horákové (2005) tuto teorii podporují.

V budoucnosti by bylo také vhodné otestovat populace v České republice na výskyt rezistence k tzv. azolovým fungicidům, která již byla také na jiných místech zaznamenána.

7. Závěr

Tato práce přinesla první popis českých populací *M. graminicola* z hlediska její populační genetiky a také poskytla první informace o utváření populací patogenu v rozdílných podmínkách střední a východní Evropy ovlivněných érou Sovětského svazu.

Výsledky v této práci jsou v souladu s předešlymi studii zahrnující populace celosvětové sbírky. Nicméně jsme našli vyšší diferenciaci mezi českými populacemi a mezi populacemi ve státech západní Evropy, která svědčí o tom, že odrůdy pšenice a zemědělská praxe mohou ovlivnit populační strukturu patogenu. Rychlý rozvoj rezistence k fungicidům jen vystihuje, jakým rizikem může být pravidelné pohlavní rozmnožování patogenu s velkou populací a rychlým způsobem šíření. Přítomnost častého pohlavního rozmnožování a vysoká úroveň genetické diverzity uvnitř populací umožňuje braničnatce pšeničné rychle se přizpůsobit měnícím se podmínkám. Při vývoji trvalých ochranných opatření je potřeba tyto znalosti zohlednit, vzít v potaz evoluční potenciál tohoto patogenu a efektivně ho začlenit do kontrolních strategií proti braničnatce pšeničné. Především je důležité rozumné používání fungicidních přípravků, dodržování antirezistentních strategií a v neposlední řadě využívání dostupných odrůd s vyšší polní odolností.

8. Přehled literatury

- Abrinbana M., Mozafari J., Shams-bakhsh M., Mehrabi R.** 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* population in Iran. *Plant Pathology* **59**: 829-838.
- Adhikari T.B., Anderson J.M., Goodwin S.B.** 2003 Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **93**:1158-1164.
- Adhikari T. B., Yang X., Cavaletto J. R., Hu X., Buechley G., Ohm H. W., Shaner G., Goodwin S. B.** 2004a. Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **109**:944-953.
- Adhikari T. B., Wallwork H., Goodwin S. B.** 2004b. Microsatellite markers linked to the *Stb2* and *Stb3* genes for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Crop Science* **44**:1403-1411.
- Adhikari T.B., Cavaletto J. R., Dubcovsky J.R., Gieco J. O., Schlatter A. R., Goodwin S. B.** 2004c. Molecular mapping of the *Stb4* gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat. *Phytopathology* **94**:1198-1206.
- Agrios, G.N.** 1997. *Plant pathology*, 4th ed., Academic Press a division of Harcourt & Company. San Diego. ISBN 0-12-044564-6, 635 p.
- Akagi Y., Taga M., Yamamoto M., Tsuge T., Fukusama-Nakai Y., Otani H., Kodama M.** 2008. Chromosome constitution of hybrid strains constructed by protoplast fusion between the tomato and strawberry pathotypes of *Alternaria alternata*. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 101-109.
- Akamatsu H. Taga M., Kodama M., Johnson R., Otani H., Kohomoto K.** 1999. Molecular karyotypes for *Alternaria* plant pathogens known to produce host-specific toxins. *Current Genetics* **35**: 647-656.
- Anke T., Oberwinkler F., Steglich W., Schramm G.** 1977. Strobilurins - New antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *The Journal of Antibiotics* **30** (10): 806-810.

- Arraiano L.S., Worland A. J., Ellerbrook C., Brown J. K. M.** 2001. Chromosomal location of a gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x'. Theoretical and Applied Genetics **103**:758-764.
- Arraiano L.S., Chartrain L., Bossolini E., Slatter H.N., Keller B., Brown J.K.M.** 2007. A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. Plant Pathology **56**: 73-78.
- Babuška P.** 2010. Amistar family - rodina pomocníků pro intenzivní technologie. Agromanuál **4**(2010): 32.
- Banke S., McDonald B.A.** 2005. Migration pattern among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Ecology **14**: 1881-1896.
- Barlett D. W., Clough J. M., Godwin J. R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzansky B.** 2002. The strobilurine fungicides. Pest Management science **58**: 649-662.
- Beerli P.** 2011. *Migrate-N*, version 3.2.16. URL <http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate>
- te Beest D.E., Shaw M.W., Paveley N.D., van den Bosh F.** 2009. Evaluation of predictive model for *Mycosphaerella graminicola* for economic and environmental benefits. Plant Pathology **58**: 1001-1009. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02142.x.
- Bornet B., Branchard M.** 2001. Noanchored inter sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Report **19**: 209–215. DOI: 10.1007/BF02772892.
- Boukef s. McDonald B.A., Yahyaoui A., Rezgui S., Brunner P.C.** 2012. Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. European Journal of Plant Pathology. **132**:111-122.
- Branding, P. A., Verstappen, E. C. P., Kema, G. H. J., Brown, J. K. M.** 2002 A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria tritici blotch pathogen. Phytopathology **92**:439-445.
- Brent K.J., Hollomon D.W.** 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC monograph no.2.edition. Brussels. 52 p. dostupné z: www.frac.info.
- Castillo N., Cordo C., Simón M.R.** 2009. Molecular variability among isolates of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of septoria tritici blotch, in Argentina. Phytoparasitica **38**: 379-389.

- Chartrain L., Brading P. A., Brown J. K. M.** 2005a Presence of the *Stb6* gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in cultivars used in wheat-breeding programs worldwide. *Plant Pathology* **54**:134-143.
- Chartrain L., Berry S.T., Brown J.K.M.** 2005b. Resistance of wheat line Kavkaz-K4500 L-6.A.4 to Septoria tritici blotch controlled by isolate-specific resistance genes. *Phytopathology* **95**: 664-671. DOI: 10.1094/PHYTO-95-0664.
- Chartrain L., Brading P. A., Makepeace J. C., Brown J. K. M.** 2004. Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* **53**: 454-460.
- Chartrain L., Sourdille P., Bernard M., Brown J.K.M.** 2009. Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology* **58**: 547-555. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.02013.x.
- Chartrain L., Joaquim P., Berry S.T., Arraiano L.S., Azanza F., Brown J.K.M.** 2005c. Genetics of resistance to septoria tritici blotch in Portuguese wheat breeding line TE 9111. *Theoretical and Applied Genetics* **49**: 445-451.
- Chen R.S., McDonald B.A.** 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics* **142**: 1119-1127.
- Chloupek O.** 2008. Genetická diverzita, šlechtění a semenářství. Academia. Praha. ISBN 978-80-200-1566-2. 307 s.
- Coleman J.J., Rounsley S.D., Rodriguez-Carres M., Kuo A., Wasmann C.C., Grimwood J., Schmutz J., Taga M., White G.J., Zhou S., Schwartz D.C., Freitag M., Ma L.J., Danchin E.G., Henrissat B., Coutinho P.M., Nelson D.R., Straney D., Napoli C.A., Barker B.M., Gribskov M., Rep M., Kroken S., Molnár I., Rensing C., Kennell J.C., Zamora J., Farman M.L., Selker E.U., Salamov A., Shapiro H., Pangilinan J., Lindquist E., Lamers C., Grigoriev I.V., Geiser D.M., Covert S.F., Temporini E., Vanetten H.D.** 2009. The genome of *Nectria Haematococca*: Contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics* **5**(8): e1000618. doi:10.1371/journal.pgen.1000618.
- Cordo C.A., Monaco C.I., Segarra C.I., Simon M.R., Mansilla A.Y., Perello A.E., Kripelz N.I., Bayo D., Conde R.D.** 2007. Trichoderma spp. as elicitors of wheat plant defense responses against Septoria tritici. *Biocontrol Science and Technology* **17**(7): 687-698. DOI:10.1080/09583150701527094.

- Covert S.F.** 1998. Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Current Genetics* **33**: 311-319.
- Cowger C., Brunner P.C., Mundt C.C.** 2008. Frequency of sexual recombination by *Mycosphaerella graminicola* in mild and severe epidemics. *Phytopathology* **98**: 752-759.
- Czembor P.C. and Arseniuk E.** 1999. Study of variability among monopycnidial monopycnidospore isolates derived from single pycnida of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR techniques. *Journal of Phytopathology* **147**: 539-546.
- Dickinson, M.** 2003. *Molecular Plant Pathology*. BIOS Scientific Publishers. London. ISBN:1-85996-044-8.
- DiLeone J. A., Coakley S. M., Karow R., Jundy Ch. C.** 1996. The biology and control of the septoria diseases of winter wheat in western Oregon, Special report 960, Agricultural Experiment Station Oregon State University.
- van der Does H. CH., Lievens B., Claes L., Houterman P.M., Cornelissen B.J.C., Rep M.** 2008. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology* **10**(6): 1475-1485.
- Duncan K.E., Howard R.J.** 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* **104**(9): 1074-1082.
- Evano G., Regnaut S., Goudet J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611-2620
- Eyal Z.** 1971. The kinetics of pycnospore liberation in *Septoria tritici*. *Canadian Journal of Botany* **49**: 1095-1099.
- Eyal Z.** 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* **105**: 629-641.
- El Chartouni L., Tisserant B., Siah A., Duyme F., Leducq J.-B., Deweer C., Fichter-Roisin C., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault P.D.** 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* **103**(4): 764-774.
- Eyal Z., Scharen A. L., Prescott J.M., Van Ginkel M.** 1987. The *Septoria* diseases of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico City, DF, Mexico.

- Fisher N., Meunier B.** 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome *bc1* inhibitors. *TEMS Yeast Research* 8: 183-192.
- Flor H. H.** 1954. The genetics of host-parasite interaction in flax rust. *Phytopathology*. 44(9): 488-488.
- Fraaije B.A., Cools H.J., Fountaine J., Lovell L.J., Motteram J., West J.S., Lucas J.A.** 2005a. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **95**: 933-941.
- Fraaije B. A., Burnett F. J., Clark W.S., Motteram J., Lucas J.A.** 2005b. Resistance development to QoI inhibitors in populations in response to selection by different fungicides. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*. Eds.: Dehne H.W., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E., Lyr H. BCPC. Alton. Hants. UK. p. 63-71.
- Giraud T., Enjalbert J., Fournier E., Delmotte F., Dutech C.** 2008. Population genetics of fungal diseases of plants. *Parasite* **15**: 449-454.
- Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A.** 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest management science* **58**: 859-867.
- Gisi U., Pavic L., Stanger C., Hugelshofer U., Sierotzki H.** 2005. Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*. Eds.: Dehne H.W., Gisi U., Kuck K.H., Russell P.E., Lyr H. BCPC. Alton. Hants. UK. p. 73-80.
- Grasso V., Palermo S., Sierotzki H., Garibaldi A., Gisi U.** 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* **62**: 465-472.
- Goodwin S.B., van der Lee T.A.J., Cavaletto J.R., Hekkert B., Crane C.F., Kema G.H.J.** 2007. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 398-414
- Goodwin S.B., M'Barek S.B., Dhillon B., Wittenberg A.H.J. Crane C.F., Hane J.K., Foster A.J., Van der Lee T.A., Grimwood J., Aerts A., Antoniw J., Bailey A., Bluhm B., Bowler J., Bristow J., van der Burgt A., Canto-Canché B., Churchill A.C., Conde-Ferràez L., Cools H.J., Coutinho P.M., Csukai M., Dehal P., De Wit P., Donzelli B., van de Geest H.C., van Ham R.C., Hammond-Kosack K.E., Henrissat B., Kilian A.,**

- Kobayashi A.K., Koopmann E., Kourmpetis Y., Kuzniar A., Lindquist E., Lombard V., Maliepaard C., Martins N., Mehrabi R., Nap J.P., Ponomarenko A., Rudd J.J., Salamov A., Schmutz J., Schouten H.J., Shapiro H., Stergiopoulos I., Torriani S.F., Tu H., de Vries R.P., Waalwijk C., Ware S.B., Wiebenga A., Zwijs L.H., Oliver R.P., Grigoriev I.V., Kema G.H.** 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics* 7(6): e1002070. doi:10.1371/journal.pgen.1002070.
- Haubold H., & Hudson R.R.** 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847-848.
- Hollomon D.W.** 2002. Fungicides. In: Waller J.M., Lenné J.M., Waller S.J. (eds.). *Plant pathologist's pocketbook*. 3rd edition. CABI Publishing. ISBN: 0-85199-459-8. 516 p.
- Hunter R., Coker R.R., Royle D.J.** 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in UK. *Plant Pathology* 48: 51-57.
- Ishi H.** 2010. QoI fungicide resistance: Current status and the problems associated with DNA-based monitoring. In: Gisi U., Chet I., Gullino M.L. (eds). 2010. *Recent developments in management of plant diseases. Plant Pathology in the 21st Century 1*. doi: 10.1007/978-1-4020-8804-9_3. Springer Science + Business Media B.V. ISBN 978-1-4020-8803-2.
- Kabbage M., Leslie J.F., Hulbert S.H., Bockus W.W.** 2009. Comparison of natural populations of *Mycosphaerella graminicola* from single fields in Kansas and California. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 55-59.
- Kabbage M., Leslie J.F., Zeller K.A., Hulbert S.H., Bockus W.W.** 2008. Genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of Septoria tritici blotch, in Kansas winter wheat. *Journal of Agricultural, Food, and Environmental Sciences* Volume: 2. Issue 1. ISSN 1934-7235 .
- Kazda J.** 2005. *Chemická ochrana rostlin a předpisy*. Česká zemědělská univerzita. 1. vydání. Power Print. Praha. 55 s.
- Kema G.H.J, Verstappen E.C.P., Todorova M., Waalwijk C.** 1996a. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analysis demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 30: 251-258.

- Kema G.H.J., Yu D.Z., Rijkenberg F.H.J., Shaw M.W., Baayen R.P.** 1996b. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* **86**(7): 777–786.
- Keon J., Antoniw J., Carzaniga R., Deller S., Ward J.L., Baker J.M., Beale M.H., Hammond-Kosack K., Rudd J.J.** 2007. Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 178-193.
- Kildea S., Ransbotyn V., Khan M.R., Fagan B., Leonard G., Mullins E., Doohan F.M.** 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biological Control* **47**(1): 37-45. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2008.07.001.
- Kraiczky P., Haase V., Gencic S., Flindt S., Anke T., Brandkt V., Von Jagox G.** 1996. The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome *bc1* complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qo inhibitors. *European Journal of Biochemistry* **235**: 54-63.
- Kronstad J.W., Staben C.** 1997. Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics* **31**: 245-276.
- Linde C.C., Zhan J., McDonald B.A.** 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: From lesions to continents. *Phytopathology* **92**: 946-955.
- Leiřova L., Hanzalova A., Kucera L.** 2008. Genetic diversity of *Pyrenopora tritici-repentis* isolates as revealed by AFLP analysis. *Journal of Plant Pathology* **90**: 233-245.
- Lovell D.J., Parker S.R., Hunter T., Royal D.J., Coker R.R.** 1997. Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat. *Plant Pathology* **46**: 126-138.
- Lynch M., Miligan B.G.** 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- Matuřinsky P., Tvaruřek L., Vyřohlidova M., Horackova S.** 2011. Potvrzení vyskytu rezistence ke strobilurinu z *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*) v oblasti Kromuřize. *Obilnarske listy* **19**(3-4): 51-53.
- Meirmans P.G., Van Tienderen P.H.** 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes* **4**: 792-794.

- Metzker M.L.** 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* **11**: 31-46.
- McCartney C.A., Brûlé-Babel A.L., Lamari L.** 2002. Inheritance of race-specific resistance to *Mycosphaerella graminicola* in Wheat. *Phytopathology* **92**:138-144.
- McCartney C.A., Brûlé-Babel A.L., Lamari L., Somers D.J.** 2003 Chromosomal location of a race-specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring wheat ST6. *Theoretical and Applied Genetics* **107**:1181-1186.
- McDonald B.A.** 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* **87**(4): 448-453.
- McDonald B.A.** 2004. Population genetics of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-A-2004-0524-01.
- McDonald B.A., Martinez J.P.** 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology* **80**:1368-1373
- McDonald B.A., McDermott Mc.** 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi: Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *BioScience* **43**(5):311-319.
- McDonald B.A., Zhan J., Burdon J.J.** 1999a. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Ecology and Population Biology* **89**(8): 639-645.
- McDonald B.A., Pettway R.E, Chen R.S., Boeger J.M., Martinez J.P.** 1995. The population genetics of *Septoria tritici* (Teleomorph *Mycosphaerella graminicola*). *Canadian Journal of Botany* **73**: 292-301.
- McDonald B.A., Mundt C.C., and Zhan J.; Ginkel, van M., McNab, A., Krupinsky, J.** eds 1999b. Population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Phaeosphaeria nodorum*. In: *Septoria and Stagonospora diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. eds. 1999 Mexico, DF, CIMMYT. ISBN: 970-648-035-8.
- McGrath M.T.** 2001. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. *Plant Disease* **85**: 236-245.
- Medini M., Hamza S.** 2008. Pathotype and molecular characterization of *Mycosphaerella graminicola* isolates collected from Tunisia, Algeria, and Canada. *Journal of Plant Pathology* **90** (1): 65-73.

- Miao V.P., Covert S.F., Vanetten H.D.** 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on dispensable (B) chromosome. *Science* **254**: 1773-1776
- Moravec D., Votýpka J.** 1998. Klimatická regionalizace České republiky. Karolinum - Nakladatelství Univerzity Karlovy, 1. vydání. 87 s.
- Navi S.S., Bandyopadhyay R.** 2002. Biological control of fungal plant pathogens. In: Waller J.M., Lenné J.M., Waller S.J. (eds.). *Plant pathologist's pocketbook*. 3rd edition. CABI Publishing. ISBN: 0-85199-459-8. 516 p.
- Nei M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* **70**. p. 3321-3323.
- Nolan S., Cooke B.M.** 2000. Control of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat by pre-treatment with *Drechslera teres*, a non-host pathogen. *European Journal of Plant Pathology* **106**(2): 203-207. DOI:10.1023/A:1008764832765.
- Nybom H.** 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimation intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **7**:1611-1612
- Orton E.S., Deller S., Brown J.K.M.** 2011. *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular Plant Pathology* **12**(5): 413-424.
- Owen P.G., Pei M., Karp A., Royle D.J., Edwards K.J.** 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **7**: 1611-1612.
- Palmer C.L., Skinner W.** 2002. *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology* **3**(2): 63-70.
- Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A.** 2009. Generations of sequencing technologies. *Genomic* **93**: 105-111. DOI:10.1016/j.ygeno.2008.10.003.
- Perello A.E., Moreno M.V., Mónaco C., Simón M.R.** 2008. Effect of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. *BioControl* **53**(6): 895-904. DOI: 10.1007/s10526-007-9110-4.
- Perello A.E., Moreno M.V., Mónaco C., Simón M.R., Cordo C.A.** 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl* **54**: 113-122. DOI 10.1007/s10526-008-9159-8.

- Perello A.E., Mónaco C., Moreno M.V., Cordo C.A., Simón M.R.** 2006. The effect of *Trichoderma harzianum* and *T. koningii* on the control of tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and leaf blotch (*Mycosphaerella graminicola*) of wheat under field conditions in Argentina. *Biocontrol science and technology* **16**(8): 803-813. DOI: 10.1080/09583150600700099.
- Pöggeler S.** 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:589-601.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Quaedvlieg W., Kema G.H.J., Groenewald J.Z., Verkley G. J.M., Seifbarghi S., Razavi M., Mirzadi Gohari A., Mehrabi R., Crous P.W.** 2011. *Zymosepotria* gen. Nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia* **26**: 57-69. DOI:10.3767/003158511X571841
- Quitt E.** 1997. Klimatické oblasti Československa. *Studia Geographica* 16. GgÚ ČSAV Brno. 73 s.
- Ranala B., Yang Z.** 2003. Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences from multiple loci. *Genetics* **164**:1645-1656
- Randolph L.F.** 1941. Genetic characteristics of the B chromosomes in maize. *Genetics* **26**: 608-631.
- Razavi M., Hughes G.R.** 2004a. Molecular variability of *Mycosphaerella graminicola* as detected by RAPD markers. *Journal of Phytopathology* **152**: 543-548.
- Razavi M., Hughes G.R.** 2004b. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome* **47**: 789-794.
- Rillo A.O., Caldwell R.M.** 1966. Inheritance of resistance to *Septoria tritici* in *Triticum aestivum* subsp. vulgare 'Bulgaria 88' (abstract). *Phytopathology* **56**: 897.
- Risser P., Ebmezer E., Korzun V., Hartl L., & Miedaner T.** 2011. Quantitative trait loci for adult-plant resistance to *Mycosphaerella graminicola* in two winter wheat populations. *Phytopathology* **101**(10): 1209-1216.
- Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M-H., Leroy, P., Ganal, M.W.** 1998. Microsatellite map of wheat. *Genetics* **149**: 2007-2023.

- Sambrook J., Russell D.W.** 2001. Molecular cloning. Laboratory manual. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanderson F.R.** 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. New Zealand Journal of Botany **10**: 707-710.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(12): 5463-5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Scharen A.L.; Ginkel, van M., McNab, A., Krupinsky, J.** eds.1999. Biology of the Septoria/Stagonospora pathogens: An Overview. In: *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, DF, CIMMYT. ISBN: 970-648-035-8.
- Schnieder F., Koch G., Jung Ch., Verreet J.-A.** 2001. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. European Journal of Plant Pathology **107**: 285-290.
- Schuch W.** 1990. Influence of tillage systems on disease intensity and spatial pattern of Septoria leaf blotch. Phytopathology **80**:1337-1340.
- Selkoe K.A., Toonen R.J.** 2006. Microsatellites for ecologist: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters **9**: 615-629.
- Shaw M. W., Royle D. J.** 1987. Spatial distributions of *Septoria nodorum* and *Septoria tritici* within crops of winter wheat. Plant Pathology **36**: 84-94.
- Shaw M.W., Bearchell S. J., Fitt B. D. L., Fraaije B. A.**2008. Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. New Phytologist **177**: 229-238.
- Siah A., Tisserant B., Chartouni L. E., Duyme F., Deweer C., Rosin-Fichter C., Sanssené J., Durand R., Reignault P., Halama P.** 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low bud distinct levels of molecular polymorphism. Fungal Biology **114**: 980-990.
- Sierotzki H., Wullschleger J., Gisi U.** 2000. Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f sp *tritici* field isolates. Pesticide Biochemistry and Physiology **68**: 107- 112.

- Sierotzki H., Frey R., Wullschleger J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U.** 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implication for QoI resistance. *Pest Management Science* **63**: 225-233.
- Somasco O.A., Qualset C.O., Gilchrist D.G.** 1996. Single-gene resistance to *Septoria tritici* blotch in the spring wheat cultivar 'Tadinia'. *Plant Breeding* **115**: 261-267.
- Stukenbrock E.H., McDonald B.A.** 2008. The origins of plant pathogens in agroecosystem. *Annual Reviews of Phytopathology* **46**: 75-100.
- Stukenbrock E.H., Banke S., Javan-Nikkhah M., McDonald B.A.** 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Molecular Biology and Evolution* **24**(2): 398-411.
- Stukenbrock E.H., Jørgensen F.G., Zala M., Hansen T.T., McDonald B.A., Schierup M.H.** 2010. Whole-genome and chromosome evolution associated with host adaptation and speciation of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS Genetics* **6**(12): e1001189. doi:10.1371/journal.pgen.1001189.
- Šíp V., Hanzalová A., Chrpová J.** 2011. Braničnatka pšeničná – rozšíření, škodlivost a ochrana. *Úroda* **5**: 36-38.
- Tabib Ghaffary S.M., Faris J.D., Friesen T.L., Visser R.G., van der Lee T.A., Robert O., Kema G.H.** 2011. New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. Published online. DOI 10.1007/s00122-011-1692-7.
- Tautz D., Renz M.** 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**(10): 4127-4138. DOI: 10.1093/nar/12.10.4127.
- Torriani S.F.F., Brunner P.C., McDonald B.A.** 2011. Evolutionary history of the mitochondrial genome in *Mycosphaerella* populations infecting bread wheat, durum wheat and wild grasses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **58**: 192-197.
- Torriani S.F.F., Brunner P.C., McDonald B.A., Sierotzki H.** 2008. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* **65**: 155-162.
- Tvarůžek L., Horáková P.** 2005. Resistance behavior of *Septoria tritici* to some fungicides in the territory of the Czech Republic. *Acta Agrobotanica* **58**(1): 79-84.

- Tvarůžek L., Spáčilová V., Horáková P.** 2008. Analýza výskytu tečkované listové skvrnitosti pšenice (*Septoria tritici* Rob. ex Desm., teleomorph. *Mycosphaerella graminicola* (Fückel) Schroeter) na ozimé pšenici v letech 2002-2005 v období obnovení jarní vegetace. *Obilnářské listy* **16**(3): 72-76.
- Turgeon B.G.** 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology* **36**:115-137.
- Vos P., Hogers R., Rijans M., Van de Lee T., Horens M., Fijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407- 4414.
- Waalwijk C., Mendes O., Verstappen E.C.P., Waard M.A., Kema G.H.J.** 2002. Isolation and characterization of the mating type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **35**: 227-286.
- Waler J.M., Lenné J.M.** 2002. Disease resistance. In:Waller J.M., Lenné J.M., Waller S.J.(eds). *Plant pathologist's pocketbook*. 3rd ed. CABI Publishing. New York. ISBN 0-85199-459-8. 516 p.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.
- Wilson E.B.** 1907. The supernumerary chromosomes of *Hemiptera*. *Science* **26**: 870–871
- Wilson R.E.** 1979. Resistance to *Septoria tritici* in two wheat cultivars determined by independent single dominant genes. *Australasian Plant Pathology* **8**(2): 16-18.
- Wittenberg A.H.J., van der Lee T.A.J., M'Barek S., Ware S.B., Goodwin S.B., Kilian A., Visser R.G.F., Kema G.H.J., Schouten H.J.** 2009. Meiosis drives extraordinary genome plasticity in the haploid fungal plant pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS Genetics* **4**(6): e5863. doi:10.1371/journal.pone.0005863.
- Zhan J., Mundt C.C., McDonald B.A.** 1998. Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **88**:1330-1337.
- Zhan J., Kema G.H.J., McDonald B.A.** 2003a. Evidence for natural selection in the mitochondrial genome of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* **94**: 261-267.

- Zhan J., Pettway R.E., McDonald B.A.** 2003b. The global genetic structure of wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 286-297.
- Zhan J., Torriani S.F.F., McDonald B.A.** 2007. Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 339-346.
- Zhan J., Mundt C.C., Hoffer M.E., McDonald B.A.** 2002a. Local adaptation and effect of host genotype on the rate of pathogen evolution: an experimental test in plant pathosystem. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 634-647.
- Zhan J., Kema G.H.J., Waalwijk C., McDonald B.A.** 2002b. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesion to continents. *Fungal Genetics and Biology* **36**: 128-136.
- Ziogas B. N., Baldwin B.C., Young J.E.** 1997. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* **50**: 28-34

9. Seznam použitých zkratek

AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů (z angl. Amplified Fragment Length Polymorphism), metoda molekulární biologie
bp	páry bází (Base pairs)
ddH ₂ O	dvakrát destilovaná voda
DDT	dichlordifenyltrichlormethylmethan, dříve užívaný pesticid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleotid acid)
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
<i>Fnu</i>	lat. <i>Fusobacterium nucleatum</i>
F _{ST}	fixační index, měřítko populační diferenciace, speciální případ F-statistiky
G _{ST}	alternativa F _{ST} používaná v případě velkého počtu markerů (lokusů)
Mb	milion párů bází (Mega base)
MCMC	statistická metoda zkratka z anglického názvu Markov chain Monte Carlo
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, molekulární metoda)
RFLP	délkový polymorfismus štěpených fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism), metoda molekulární biologie
PCR-RFLP-SSCP	jednovláknový konformační polymorfismus (Single-Strand Confirmation Polymorphism), metoda molekulární biologie
QoI	inhibitor mitochondriálního dýchání (Quinone outside inhibitors)
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikovaných fragmentů DNA (Random Amplified Polymorphic DNA), metoda molekulární biologie
<i>Sat</i>	lat. <i>Staphylococcus arlettae</i>
SHAM	kyselina salicylhydroxamová (Salicylhydroxamic acid)
SSRs	jednoduché opakující se sekvence (mikrosatelity)(Simple Sequence Repeats) metoda molekulární biologie
STB	choroba - hnědá tečkovitá skvrnitost pšenice (Septoria tritici blotch) způsobená patogenem <i>M. graminicola</i>
<i>Taq</i>	lat. <i>Thermus aquaticus</i>

TBE pufr	pufr Tris-kyselina boritá s EDTA
TE pufr	pufr Tris s EDTA
Tris	trihydroxymethylaminomethan
UV	ultrafialové záření
YM médium	kvasnično-maltózové médium (yeast-maltose)
YMD agar	kvasnično-maltózový agar (yeast-maltose-dextrose)

10. Přílohy

Lokalita	Počet vegetačních dní ($t > 10^\circ$)		Průměrná teplota ($^\circ\text{C}$)				Průměrné srážky (mm)	
	Quitt 1971 *	Moravec and Votýpka 1998 **	Leden *	Duben *	Červenec *	Říjen *	Vegetační období *	Zima *
I	160-170	160-177	-2 - -3	8-9	18-19	7-9	350-400	200-300
II	140-160	142-159	-2 - -3	7-8	17-18	7-8	350-400	200-250
III	140-160	142-159	-3 - -4	6-7	16-17	6-7	450-500	250-300
IV	160-170	160-177	-2 - -3	8-9	18-19	7-9	350-400	200-300
V	120-140	124-141	-3 - -4	6-7	16-17	6-7	350-450	250-300
VI	140-160	160-177	-2 - -3	7-8	17-18	7-8	400-450	200-250
VII	140-160	142-159	-3 - -4	6-7	16-17	6-7	450-500	250-300

Tabulka 10.1: Průměrný úhrn srážek a průměrné teploty v jednotlivých lokalitách (*Quitt, 1971; **Moravec a Votýpka, 1998)

Lokalita	I	II	III	IV	V	VI	VII
I	-	60	159	127	245	256	138
II	60	-	221	294	178	317	82
III	159	221	-	100	93	95	296
IV	127	294	100	-	122	80	379
V	245	178	93	122	-	170	261
VI	256	317	95	80	170	-	400
VII	138	82	296	379	261	400	-

Tabulka 10.2.: Vzdálenosti jednotlivých lokalit v kilometrech. Měření bylo provedeno za použití mapových podkladů z Google map (dostupné z maps.google.com)

Lokalita	Osevní plocha				
	Celkem	Ozimá pšenice	%	Jarní pšenice	%
I	488800	172000	35	12700	3
II	195000	60000	31	3600	2
III	175600	49500	28	3500	2
IV	96300	34000	35	1800	2
V	279000	70400	25	4700	2
VI	124200	40200	32	2400	2
VII	32800	12400	38	500	2

Tabulka 10.3: Osevní plocha pšenice v jednotlivých lokalitách v roce 2011 (zdroj dat: Český statistický úřad)

No.	Lokalita	Místo	Rok	Mikrosatelitní marker								Pohlavní typ		OoI rezistence
				TCC 09	ACC 01	AG 06	TCC 08	AC 01	CCA 03	GT 03	AG 11	MAT 1-1	MAT 1-2	
0088	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	166	158	192	170	148	184	■		ne
0007	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	162	158	192	160	148	184		■	ne
0012	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	?	161	?	?	148	?		■	ne
0462	I. Praha	VÚRV	2009	165	252	179	158	192	160	144	186		■	ne
0343	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	?	161	205	160	148	182		■	/
0328	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	162	161	206	160	139	184	■		ne
0081	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	?	161	192	160	136	184		■	ne
0031	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	162	161	?	160	145	182		■	ne
0243	I. Praha	VÚRV	2005	165	254	?	158	192	170	148	182	■		ne
0034	I. Praha	VÚRV	2009	168	252	?	161	218	167	151	182	■		ano
0308	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	162	158	192	160	148	190	■		ne
0311	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	164	155	192	160	148	182	■		ano
0313	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	162	161	192	170	145	184		■	ano
0041	I. Praha	VÚRV	2005	162	252	162	161	192	160	136	182	■		ne
0042	I. Praha	VÚRV	2005	165	?	?	158	?	170	148	?	■		ne
0044	I. Praha	VÚRV	2005	159	252	161	158	194	170	139	184	■		ne
0159	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	171	161	192	160	148	182	■		ne
0163	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ne
0059	I. Praha	VÚRV	2006	168	252	166	158	192	160	151	182		■	ne
0108	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	166	158	192	160	139	184		■	ne
0066	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	173	161	192	160	143	184	■		ne
0067	I. Praha	VÚRV	2009	165	252	171	161	192	160	148	182	■		ne
0071	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	171	158	192	160	148	182		■	ne
0273	I. Praha	VÚRV	2006	165	249	166	161	192	160	136	182	■		ne
0237	I. Praha	VÚRV	2005	165	252	?	158	192	157	145	186	■		ne
0144	I. Praha	VÚRV	2005	162	252	162	161	192	160	136	182	■		ne
0147	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	162	158	192	160	144	182		■	ne
0111	I. Praha	VÚRV	2007	165	252	166	158	192	160	139	184		■	ne
0114	I. Praha	VÚRV	2008	165	252	168	161	192	170	148	?	■		ne
0121	I. Praha	VÚRV	2009	?	?	?	161	205	160	136	?		■	ano
0132	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	171	161	192	170	148	182		■	ne
0135	I. Praha	VÚRV	2009	165	252	166	164	194	160	136	182		■	ne
0140	I. Praha	VÚRV	2005	165	252	171	158	192	157	148	180		■	ne
0176	I. Praha	VÚRV	2006	165	249	166	161	192	160	136	182	■		ne
0221	I. Praha	VÚRV	2006	165	252	162	158	205	160	148	190	■		ne
0226	I. Praha	VÚRV	2004	162	252	162	161	192	160	136	182	■		ne
0235	I. Praha	VÚRV	2005	162	252	162	161	192	160	136	182	■		ne
0183	I. Praha	VÚRV	2006	165	254	?	161	194	157	139	182		■	ne
0057	II. Plzeň	Hadačka	2006	165	252	164	158	192	160	151	182		■	ne

0024	II. Plzeň	Hadačka	2007	165	252	171	158	190	160	148	182		■	ne
0092	II. Plzeň	Hadačka	2007	165	? 252	171	161	192	160	148	?	■		ne
0153	II. Plzeň	Hadačka	2007	165	252	166	158	192	160	136	182	■		ne
0110	II. Plzeň	Hadačka	2006	165	252	171	158	190	160	148	182		■	ne
0065	II. Plzeň	Hadačka	2006	165	252	162	161	192	160	145	182		■	ne
0482	II. Plzeň	Hadačka	2009	168	252	162	161	201	160	148	182	■		ne
0483	II. Plzeň	Hadačka	2009	165	252	162	161	190	160	136	?		■	ne
0489	II. Plzeň	Hadačka	2009	165	252	166	158	192	160	148	184		■	ne
0180	II. Plzeň	Hadačka	2006	165	252	162	158	205	160	136	184		■	ne
0002	II. Plzeň	Hadačka	2006	162	257	162	155	194	160	148	182		■	ne
0189	II. Plzeň	Hadačka	2007	165	253	162	161	192	170	148	182	■		ne
0393	II. Plzeň	Hadačka	2009	165	252	168	161	?	160	148	?	■		ne
0421	II. Plzeň	Hadačka	2009	180	252	162	158	192	160	138	184	■		ne
0199	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2007	165	252	171	158	205	160	148	182		■	ano
0321	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2008	165	252	162	161	192	170	145	?		■	ne
0324	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2008	165	252	166	155	192	160	148	182	■		ano
0239	III. Ústí nad Orlicí	Květná	2007	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ano
0351	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2008	165	252	162	155	192	160	136	180	■		ano
0173	III. Ústí nad Orlicí	Květná	2007	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ano
0174	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2007	165	248	162	158	194	160	148	182	■		ano
0499	III. Ústí nad Orlicí	Vysoké Mýto	2009	165	?	?	158	?	?	?	?		■	ne
0502	III. Ústí nad Orlicí	České Heřmanovice	2009	165	252	171	158	192	160	151	182	■		ano
0615	III. Ústí nad Orlicí	Vysoké Mýto	2009	165	252	175	158	190	160	148	182		■	ano
0616	III. Ústí nad Orlicí	Vysoké Mýto	2009	165	252	175	158	190	160	148	182		■	ano
0617	III. Ústí nad Orlicí	Vysoké Mýto	2009	165	252	175	158	188	160	148	182		■	ano
0618	III. Ústí nad Orlicí	Vysoké Mýto	2009	165	252	175	158	190	160	148	182		■	ano
0013	III. Ústí nad Orlicí	Tisová	2006	165	252	177	158	182	160	148	182		■	ne
0020	III. Ústí nad Orlicí	Sázava	2007	165	257	162	158	194	160	151	?		■	ne
0023	III. Ústí nad Orlicí	Tátenice	2007	165	246	168	158	192	160	148	186		■	ano
0032	III. Ústí nad Orlicí	Domoradice	2004	162	252	162	161	192	160	136	?	■		ne
0035	III. Ústí nad Orlicí	Vračovice	2005	165	252	166	161	205	160	148	184		■	ne
0037	III. Ústí nad Orlicí	Ústí nad Orlicí	2005	168	252	?	158	192	160	145	182	■		ne
0038	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2008	165	252	?	155	192	160	148	?	■		ne
0054	III. Ústí nad Orlicí	Damníkov	2006	165	252	166	161	192	160	148	184		■	ne
0078	III. Ústí nad Orlicí	Lipová	2007	165	252	179	161	192	160	148	184		■	ne
0080	III. Ústí nad Orlicí	Lipová	2007	165	252	166	158	192	160	136	182	■		ne
0083	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2007	165	252	171	158	192	160	136	188		■	ano
0117	III. Ústí nad Orlicí	Tisová	2007	165	252	166	158	194	170	148	184	■		ne
0143	III. Ústí nad Orlicí	Damníkov	2006	165	252	166	161	192	160	148	182	■		ne
0454	III. Ústí nad Orlicí	Libchavy	2009	165	257	166	158	192	?	136	182		■	N

0464	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2009	165	252	171	161	192	160	148	184		■	ne
0466	III. Ústí nad Orlicí	Choceň	2009	165	252	166	158	192	160	148	184		■	ano
0469	III. Ústí nad Orlicí	Libchavy	2009	165	252	166	155	192	160	148	188	■		ano
0476	III. Ústí nad Orlicí	Jehnědí	2009	165	252	171	161	192	160	148	184		■	/
0316	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	171	161	205	159	150	186		■	ne
0318	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	171	161	205	160	151	186		■	ne
0352	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	171	161	205	160	151	186		■	ne
0323	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	168	161	192	160	148	182	■		ne
0337	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	171	161	192	160	136	184		■	ne
0338	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	171	161	192	160	136	184		■	ne
0244	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	165	252	?	158	190	160	136	182	■		ne
0348	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	171	252	162	161	205	170	136	182		■	ne
0354	IV. Kroměříž	ZVÚK	2008	168	252	168	161	192	160	148	182	■		ne
0633	IV. Kroměříž	ZVÚK	2009	180	252	162	161	192	160	136	182	■		ne
1001	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	246	164	161	205	160	148	182		■	ne
1002	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	164	161	?	?	?	?	■		ano
1003	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	164	161	194	160	138	184		■	ano
1004	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	164	158	192	170	148	186	■		ano
1005	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	164	?	192	160	148	184		■	ano
1006	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	164	161	192	160	148	182		■	ne
1007	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	168	252	168	158	192	160	148	182		■	ano
1008	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	307	164	161	192	160	136	182	■		ano
1009	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	162	158	192	160	148	182		■	ano
1010	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	162	161	205	160	152	186		■	ne
1011	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	162	155	207	170	144	184		■	ano
1012	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	162	155	192	160	148	182	■		ano
1013	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	162	261	162	161	192	160	136	182	■		ano
1014	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	168	252	168	161	192	170	150	182	■		ano
1015	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	168	252	168	155	205	160	148	184		■	ano
1016	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	168	155	205	160	144	184		■	ano
1017	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	168	155	192	160	146	182		■	ano
1018	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	249	162	158	?	?	?	?	■		ano
1019	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	248	162	161	?	160	144	180		■	ano
1020	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	171	252	171	158	205	160	148	184		■	ano
1021	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	166	158	207	160	150	182	■		ano
1022	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	302	162	158	192	170	148	182	■		ano
1023	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	254	171	158	192	160	144	182		■	ne
1024	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	171	155	192	160	144	182	■		ne
1025	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	168	252	171	155	192	160	136	184		■	ano
1026	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	168	158	192	160	150	182		■	ne

1027	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	260	162	161	217	160	148	182	■		ne
1028	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	254	166	155	205	160	147	184	■		ano
1029	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	171	252	171	161	205	160	148	182	■		ano
1030	IV. Kroměříž	ZVÚK	2011	165	252	166	161	192	160	144	184	■		ano
0164	V. Jihlava	Humpolec	2007	171	252	166	158	192	160	148	184		■	ano
0439	V. Jihlava	Humpolec	2009	171	252	166	158	192	160	148	184		■	ne
0450	V. Jihlava	Humpolec	2009	165	252	171	158	192	160	141	182		■	ano
1031	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	166	161	192	160	136	182		■	ano
1032	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	158	192	160	144	182	■		ano
1033	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ano
1034	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	249	166	155	?	?	?	?		■	ano
1035	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	161	?	?	?	?	■		ano
1036	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	161	192	160	148	184		■	ano
1037	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	155	188	163	148	180	■		ano
1038	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	352	166	155	192	160	136	182	■		ano
1039	V. Jihlava	Jihlava	2011	168	254	162	158	192	160	136	182	■		ano
1040	V. Jihlava	Jihlava	2011	168	249	162	158	192	160	148	182	■		ano
1041	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	257	162	161	192	161	147	184		■	ano
1042	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	166	161	192	160	144	182		■	ano
1043	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	161	192	160	148	186	■		ano
1044	V. Jihlava	Jihlava	2011	168	252	168	155	192	160	136	182		■	ano
1045	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ano
1046	V. Jihlava	Velké Meziříčí	2011	168	252	162	158	?	170	136	182	■		ano
1047	V. Jihlava	Velké Meziříčí	2011	165	252	171	161	217	160	148	184		■	ano
1048	V. Jihlava	Velké Meziříčí	2011	165	262	162	161	192	160	148	184		■	ano
1049	V. Jihlava	Velké Meziříčí	2011	165	252	166	155	192	?	147	184	■		ano
1050	V. Jihlava	Jihlava	2011	165	248	166	158	205	160	148	182		■	ano
1051	VI. Opava	Otice	2011	165	252	162	155	192	160	148	?		■	ano
1052	VI. Opava	Otice	2011	165	252	164	161	217	160	144	186	■		ne
1053	VI. Opava	Otice	2011	168	252	168	161	192	170	136	182		■	ano
1054	VI. Opava	Otice	2011	165	302	164	155	192	160	148	182	■		ne
1055	VI. Opava	Otice	2011	165	252	171	161	192	160	144	184	■		ne
1056	VI. Opava	Otice	2011	171	252	168	161	207	160	136	182	■		ne
1057	VI. Opava	Otice	2011	165	254	164	161	192	160	148	182	■		ano
1058	VI. Opava	Otice	2011	171	252	168	161	201	160	148	180	■		ne
1059	VI. Opava	Otice	2011	165	252	160	161	192	160	136	184		■	ne
1060	VI. Opava	Otice	2011	165	252	162	158	217	170	144	184	■		ne
1061	VI. Opava	Štěbořice	2011	165	252	162	158	192	160	148	182	■		ne
1062	VI. Opava	Štěbořice	2011	168	252	162	161	192	170	139	182		■	ano
1063	VI. Opava	Štěbořice	2011	165	252	171	158	205	160	136	184		■	ne

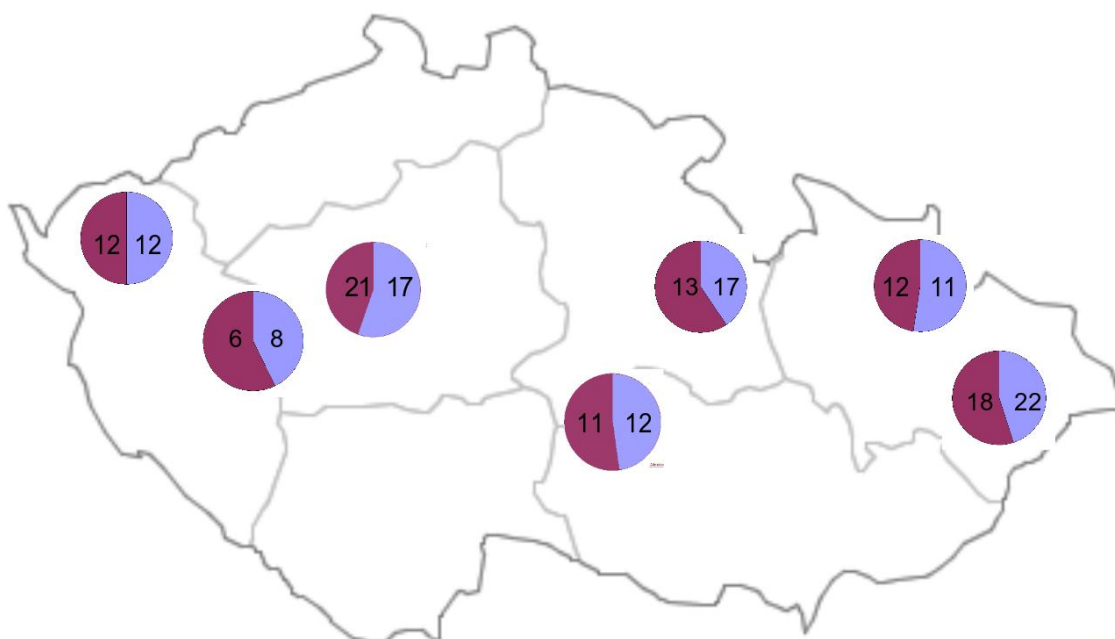
1064	VI. Opava	Štěbořice	2011	168	252	168	158	194	160	148	182		■	ne
1065	VI. Opava	Štěbořice	2011	165	252	168	158	201	160	147	182		■	ne
1066	VI. Opava	Štěbořice	2011	165	252	166	158	201	166	144	182		■	ano
1067	VI. Opava	Štěbořice	2011	165	252	166	155	205	160	148	182	■		ne
1068	VI. Opava	Opava	2011	165	252	162	155	192	160	144	182	■		ne
1069	VI. Opava	Opava	2011	165	252	162	158	192	160	144	182		■	ne
1070	VI. Opava	Opava	2011	165	307	164	158	192	160	144	182		■	ne
1071	VI. Opava	Opava	2011	165	252	162	158	192	160	144	182		■	ne
1072	VI. Opava	Opava	2011	165	253	171	161	192	160	150	182	■		ne
1073	VI. Opava	Opava	2011	162	252	164	161	192	160	136	182	■		ano
1074	VII. Cheb	Hranice	2011	168	252	170	155	192	160	148	182		■	ano
1075	VII. Cheb	Hranice	2011	165	254	164	155	192	160	148	182		■	ano
1076	VII. Cheb	Hranice	2011	165	252	166	158	217	160	148	182		■	ne
1077	VII. Cheb	Hazlov	2011	165	252	171	155	192	170	148	184	■		ano
1078	VII. Cheb	Hazlov	2011	165	252	162	155	192	160	148	182	■		ne
1079	VII. Cheb	Hazlov	2011	165	252	166	158	192	160	148	182		■	ne
1080	VII. Cheb	Hazlov	2011	165	252	164	158	192	160	136	182	■		ano
1081	VII. Cheb	Hazlov	2011	165	247	164	155	192	160	148	182	■		ne
1082	VII. Cheb	Hazlov	2011	168	252	162	158	192	160	136	186	■		ano
1083	VII. Cheb	Cheb	2011	165	252	166	155	205	160	148	184	■		ano
1084	VII. Cheb	Cheb	2011	162	252	166	155	194	160	148	182	■		ano
1085	VII. Cheb	Cheb	2011	168	252	168	161	192	160	148	182	■		ano
1086	VII. Cheb	Cheb	2011	168	302	167	158	217	160	148	182		■	ano
1087	VII. Cheb	Cheb	2011	165	252	171	155	192	160	144	182	■		ano
1088	VII. Cheb	Mýtina	2011	165	252	164	161	192	160	136	182		■	ano
1089	VII. Cheb	Mýtina	2011	165	252	168	155	205	160	136	182		■	ano
1090	VII. Cheb	Mýtina	2011	168	252	166	155	192	160	138	182		■	ano
1091	VII. Cheb	Mýtina	2011	165	252	164	155	192	170	147	186		■	ano
1092	VII. Cheb	Mýtina	2011	165	252	164	155	205	160	148	186	■		ano
1093	VII. Cheb	Mýtina	2011	165	254	164	155	192	160	136	182		■	ano
1094	VII. Cheb	Sokolov	2011	165	252	164	158	192	160	148	182		■	ne
1095	VII. Cheb	Sokolov	2011	165	252	164	161	192	160	148	184	■		ne
1096	VII. Cheb	Sokolov	2011	165	252	168	158	194	162	150	180	■		ne

Tabulka 10.4: Seznam všech použitých izolátů spolu daty o sběru vzorků a výslednými daty. Legenda k barvám v prvním sloupci: zelená - opakující se haplotyp (klon; vyřazený z analýz do kterých nebyly klony zahrnuty), šedá - izolát vyřazený z populační analýzy (amplifikace u méně než čtyř markerů), žlutá - izoláty odebrané ze stejné skvrny.

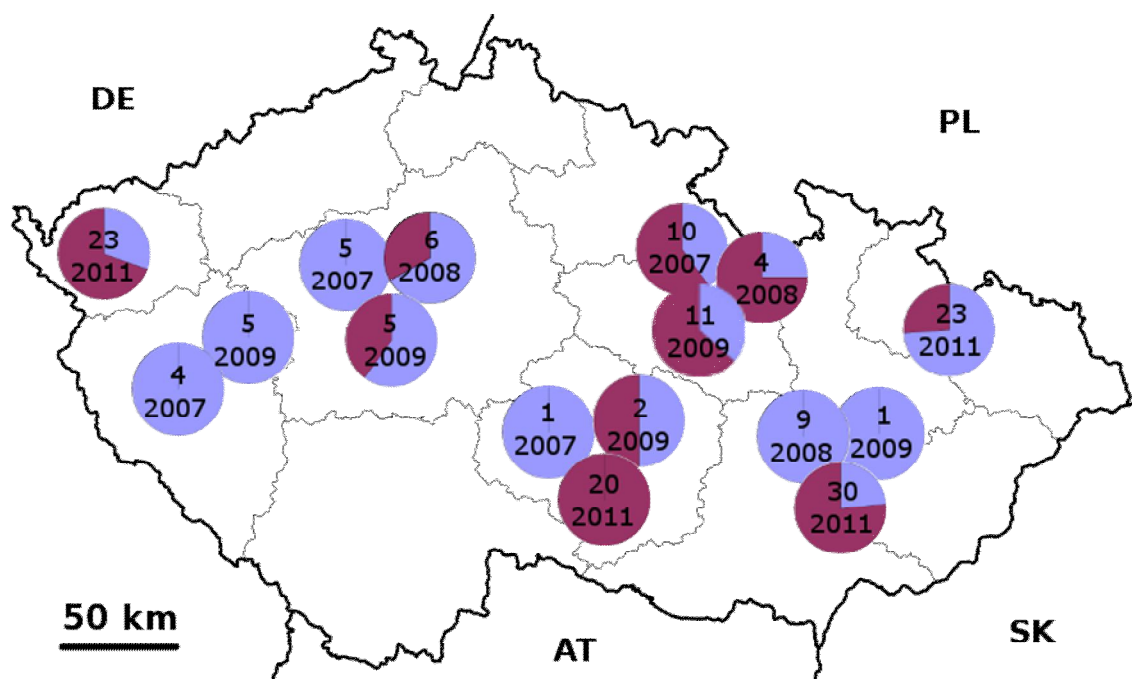
No.	Země původu	TCC 09	AC 01	CCA 03	GGC 01	AG 11	GT 03	AG 06	TCC 08
Ind001	Švýcarsko	165	194	160	252	184	148	170	158
Ind002	Švýcarsko	165	192	160	252	182	136	162	158
Ind003	Švýcarsko	165	192	160	252	184	148	168	158
Ind004	Švýcarsko	162	192	157	252	182	136	170	161
Ind005	Švýcarsko	165	192	160	252	182	136	170	158
Ind006	Švýcarsko	162	180	163	252	182	136	162	158
Ind007	Švýcarsko	165	206	160	252	186	144	166	158
Ind008	Švýcarsko	168	194	166	255	182	140	166	161
Ind009	Švýcarsko	165	192	157	252	184	136	164	158
Ind010	Švýcarsko	168	186	160	252	184	148	162	161
Ind011	Švýcarsko	165	206	160	252	184	150	168	161
Ind012	Švýcarsko	165	206	169	252	184	136	166	158
Ind013	Švýcarsko	168	204	160	252	182	148	162	158
Ind014	Švýcarsko	165	192	160	252	180	140	162	161
Ind015	Švýcarsko	165	192	160	252	184	150	172	161
Ind016	Švýcarsko	171	192	160	252	182	148	168	158
Ind017	Švýcarsko	165	206	157	252	182	146	162	161
Ind018	Švýcarsko	165	192	160	252	182	140	170	161
Ind019	Švýcarsko	165	192	160	252	182	146	164	158
Ind020	Švýcarsko	165	192	160	258	186	148	166	155
Ind021	Švýcarsko	165	192	157	252	182	150	162	161
Ind022	Švýcarsko	165	192	160	249	182	146	162	158
Ind023	Švýcarsko	180	206	160	252	182	150	162	158
Ind024	Švýcarsko	165	192	160	252	182	136	162	161
Ind025	Švýcarsko	165	192	160	252	182	150	162	158
Ind026	Švýcarsko	165	192	160	258	182	148	166	158
Ind027	Švýcarsko	162	204	160	252	182	140	166	161
Ind028	Švýcarsko	165	192	157	252	182	136	164	158
Ind029	Švýcarsko	165	186	160	252	182	136	168	161
Ind030	Švýcarsko	165	180	160	252	186	136	172	158
Ind031	Švýcarsko	165	192	157	252	182	148	162	161
Ind032	Švýcarsko	165	192	160	252	182	148	164	158
Ind033	Velká británie	165	192	160	252	184	148	166	155
Ind034	Velká británie	165	206	160	252	182	152	170	158
Ind035	Velká británie	165	192	160	252	184	148	162	158
Ind036	Velká británie	165	192	160	252	182	150	170	158
Ind037	Velká británie	165	194	160	252	184	148	170	158
Ind038	Velká británie	165	192	160	249	188	138	162	158
Ind039	Velká británie	165	206	160	252	188	136	166	155
Ind040	Velká británie	165	192	160	252	182	148	162	155
Ind041	Velká británie	165	192	163	246	186	148	162	161
Ind042	Velká británie	165	192	160	252	182	150	162	155
Ind043	Velká británie	165	232	160	252	182	150	168	155
Ind044	Velká británie	165	192	160	252	184	118	162	155
Ind045	Velká británie	165	192	160	252	188	136	162	161
Ind046	Velká británie	165	206	160	252	182	150	166	155
Ind047	Velká británie	165	192	160	252	182	150	169	155

Ind048	Velká británie	165	192	160	252	182	140	168	161
Ind049	Velká británie	165	192	160	252	188	136	166	155
Ind050	Velká británie	177	192	160	252	184	142	162	158
Ind051	Velká británie	165	192	160	252	182	150	164	158
Ind052	Velká británie	165	192	160	252	184	136	170	158
Ind053	Velká británie	168	192	169	252	184	146	166	161
Ind054	Velká británie	162	192	160	252	184	148	166	158
Ind055	Velká británie	165	192	160	252	182	148	166	155
Ind056	Velká británie	165	192	160	252	184	150	162	155
Ind057	Velká británie	165	192	160	252	184	150	166	155
Ind058	Velká británie	165	192	160	252	182	150	162	158
Ind059	Velká británie	168	206	160	252	184	150	166	158
Ind060	Velká británie	165	192	160	252	184	148	162	161
Ind061	Velká británie	165	192	160	252	182	118	162	158
Ind062	Velká británie	165	192	160	252	182	150	162	155
Ind063	Velká británie	165	192	160	252	184	150	162	155
Ind064	Velká británie	162	192	160	252	184	150	166	155
Ind065	Německo	195	192	160	252	184	150	164	158
Ind066	Německo	162	220	160	252	182	140	164	161
Ind067	Německo	165	192	160	252	184	144	162	158
Ind068	Německo	165	192	169	252	186	136	164	158
Ind069	Německo	183	192	160	252	184	140	176	158
Ind070	Německo	162	206	160	252	182	146	168	161
Ind071	Německo	165	192	160	252	182	154	168	158
Ind072	Německo	192	194	169	252	182	150	164	158
Ind073	Německo	165	206	160	255	182	148	162	158
Ind074	Německo	165	192	160	252	186	136	162	158
Ind075	Německo	165	192	160	252	184	148	162	158
Ind076	Německo	165	192	160	252	182	152	170	155
Ind077	Německo	165	208	169	252	182	148	166	161
Ind078	Německo	165	206	157	252	184	148	168	158
Ind079	Německo	168	194	160	252	182	148	162	158
Ind080	Německo	165	206	160	252	184	148	162	158
Ind081	Německo	165	190	160	252	184	148	169	158
Ind082	Německo	165	206	160	252	186	136	170	161
Ind083	Německo	165	192	160	249	186	148	168	158
Ind084	Německo	165	192	160	252	184	140	162	158
Ind085	Německo	165	192	160	252	184	148	168	161
Ind086	Německo	165	192	157	246	184	148	168	158
Ind087	Německo	165	192	169	252	182	148	164	158
Ind088	Německo	165	192	169	252	186	136	164	158
Ind089	Německo	165	220	160	252	186	148	168	158
Ind090	Německo	165	192	160	252	184	148	169	158
Ind091	Německo	165	192	157	255	182	148	162	161
Ind092	Německo	165	192	160	252	184	148	162	158
Ind093	Německo	192	192	157	252	184	140	162	161
Ind094	Německo	165	192	160	252	182	148	164	158
Ind095	Německo	162	206	160	246	184	148	168	158
Ind096	Německo	162	194	169	252	186	148	162	161

Tabulka 10.5: Data z mikrosatelitní analýzy populací pocházejících ze států západní Evropy



Obrázek 10.1: Poměr jednotlivých pohlavních typů v jednotlivých lokalitách. Světlá barva – pohlavní typ MAT 1-1. Tmavá barva – pohlavní typ MAT 1-2



Obrázek 10.2: Frekvence výskytu QoI rezistentních izolátů v jednotlivých lokalitách v různých letech. Tmavá barva značí poměr rezistentních izolátů z celkového počtu izolátů v dané lokalitě (číslo nahoře) v daném roce (číslo dole).

11. Přehled vlastní publikační činnosti

Vědecké články

Drabešová J., Ryšánek P., Brunner P., McDonald B.A., Croll D. 2012. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s10658-012-0080-8

Příspěvky ve sborníku (*struktura celého vědeckého článku*)

Drabešová J., Zouhar M., Mazáková J., Ryšánek P., Věchet L. 2010. Variabilita braničnatky pšeničné (*Mycosphaerella graminicola*) na území ČR.: Vědecká příloha časopisu Úroda 58 (12): 239-242

Abstrakty ve sborníku

Drabešová J., Ryšánek P., Brunner P., McDonald B.A., Croll D. 2012. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. In: Zborník abstraktov z XIX. Slovenskej a českej konferencie o ochraně rastlín. SPU v Nitre. 2012. Nitra. Str. 100. ISBN: 978-80-552-0838-1 (*Ústní prezentace*)

Drabešová J., McDonald B.A., Ryšánek P., Zala M., Croll D. 2011 Population genomics of dispensable chromosomes in *Mycosphaerella graminicola*. In: 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora*. Diseases of Cereal. 11.-14.9. 2011, s. 22, Mexico City, Mexico. WRD. ISBN 978-970-648-180-1. (*Ústní prezentace*)

Drabešová J., Zouhar M., Mazáková J., Ryšánek P., Věchet L. 2010. Old Czech wheat cultivars as a new possible source of resistance to *Mycosphaerella graminicola* In: Abstracts of oral and poster presentations, 8th International Wheat Conference St. Petersburg, Russia, June 1- 4, 2010 page: 246 (*Poster*)

Drabešová J, Zouhar M., Mazáková J., Věchet L., Ryšánek P. 2010. Detekce genů rezistence k braničnatce pšeničné ve starých českých odrůdách pšenice seté. In: Sborník recenzovaných příspěvků kategorie Věda má budoucnost, Studentská vědecká konference 2010, Ostrava, str. 23-26,ISBN 978-80-7368-719-9 (*Ústní prezentace*)

Zouhar M., Drabešová J., Mazáková J., Věchet L., Ryšánek P. 2009. Molekulární markery rezistence proti *Mycosphaerella graminicola* jako prostředek pro hledání vhodných genetických zdrojů. In: Sborník abstraktů. XVIII. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. MZLU v Brně. 2009. Brno. ,str. 133. ISBN: 978-80-7375-316-0 (*Poster*)