Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013 **Bc. Eva Komínková**

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky

Molekulární charakterizace patogenu *Blumeria graminis*

Diplomová práce

Bc. Eva Komínková

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

Olomouc 2013 **Vedoucí práce: Mgr. Miroslav Valárik, Ph.D.**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Miroslava Valárika, Ph.D. za použití uvedených literárních a informačních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Bc. Eva Komínková

SOUHRN

Blumeria graminis f. sp. *hordei*, kauzální agens choroby ječmene označované jako padlí, je obligátně biotrofní patogenní houba, jejímuž studiu je vzhledem k rozsahu působených škod věnována značná pozornost. Výzkum tohoto modelového organismu v nedávné době zaznamenal výrazné úspěchy v podobě pozičního klonování prvních dvou genů avirulence a zejména projektu celogenomového sekvenování. Současný pokrok ve výzkumu zaměřeném na tento ekonomicky významný patogen shrnuje teoretická část této diplomové práce. Z uvedených poznatků pak vychází experimentální část, která se zaměřuje na odvození genotypovacího systému schopného rozlišit izoláty pocházející z geograficky omezeného území. S využitím dostupných sekvenčních dat byly navrženy a testovány markery založené na sekvencích mikrosatelitů a inzerčních místech transponovatelných elementů, které jsou velmi abundantní součástí genomu tohoto druhu. Vytvořený systém zahrnující 16 SSR, 14 SNP a 2 ISBP/RJM markery byl posléze aplikován na soubor 97 izolátů původem z České republiky, 50 australských izolátů a sbírku 11 izolátů reprezentujících světovou populaci padlí travního ječmene. Na základě použité sady markerů bylo dosaženo uspokojivého rozlišení studovaných izolátů, čímž se prokázalo, že navržený genotypovací systém představuje užitečný nástroj, který lze uplatnit při analýze diverzity, evolučních vztahů a prostorové i časové dynamiky izolátů na populační úrovni. V případě obohacení provedené analýzy o fenotypová data popisující virulence jednotlivých izolátů se otevírají další, atraktivní možnosti studia interakcí hostitele a patogenu v tomto modelovém systému.

SUMMARY

Fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, a causal agent of the powdery mildew disease of barley, is an obligate biotrophic pathogen. Due to the significant yield losses it causes the pathogen attracts substantial attention of scientific community worldwide and has become a model organism. Recently, the research has resulted in a major breakthrough, besides the successful positional cloning of two avirulence genes, the whole genome sequencing project has been launched. The present-day progress in research carried out on this economically significant pathogen is summarized in the theoretical part of this study. Taking into account the information provided, the experimental part focuses on developing a genotyping system capable to characterize different isolates which originate from geographically limited area. Available sequence data have been used to design a set of molecular markers based on sequences of microsatellites and insertion sites of transposable elements which represent a very abundant part of the genome. The final genotyping system comprises of 16 SSR, 14 SNP and 2 ISBP/RJM markers which were subsequently applied on a set of 97 isolates originating from the Czech Republic, 50 Australian isolates and a collection of 11 isolates representing world population of barley powdery mildew. Marker set developed in this study has provided significant resolution of studied isolates and thus has proved to be a useful tool for analysis of diversity and evolutionary relationships as well as spatial and time dynamics of isolates on the population level. Being supplemented with additional phenotype data describing virulences present in individual isolates, this study might open new and attractive opportunities of studying host-pathogen relationship in this model system.

Tato práce vznikla za podpory projektu Evropské unie spolufinancovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy – Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (č. ED0007/01/01).

Ráda bych poděkovala v první řadě svému školiteli, Mgr. Miroslavu Valárikovi, PhD., za odborné vedení této diplomové práce a veškerý čas, trpělivost i podnětné připomínky, které mi v průběhu jejího vzniku věnoval. Dále bych chtěla vyjádřit svou vděčnost i dalším lidem podílejícím se na vzniku práce, a to doc. Ing. Antonínu Dreiseitlovi, CSc. za poskytnutí biologického materiálu, Ing. Haně Šimkové, CSc., která mi věnovala řadu cenných rad a zkušeností týkajících se extrakce DNA, Mgr. Pavle Christelové, PhD. za pomoc s provedením fylogenetické analýzy, Mgr. Evě Hřibové, PhD. za lekce bioinformatiky a Ing. Marii Seifertové za její velmi vstřícný a ochotný přístup. Mé poděkování patří v neposlední řadě také doc. Ing. Jaroslavu Doleželovi, DrSc. za poskytnutí podmínek k provedení experimentální části této práce a rovněž všem zaměstnancům i studentům Ústavu experimentální botaniky v Olomouci, kteří se podíleli na spoluvytváření příjemné pracovní atmosféry.

OBSAH

1 ÚVOD 8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY 10
2.1 Padlí travní 10
2.1.1 Životní cyklus a průběh infekce....11
2.1.2 Důsledky infekce a faktory ovlivňující rozsah škod....14
2.1.3 Evoluční vztahy a diverzita v rámci druhu *Blumeria graminis*....15
2.1.3.1 Studie založené na analýze isozymů....16
2.1.3.2 Studie založené na DNA markerech....17
2.1.4 Genom....21
2.1.5 Interakce s obilovinami....25
2.2 Vybrané typy DNA markerů....31
2.2.1 Mikrosatelity....32
2.2.2 Markery založené na transponovatelných elementech....34
3 CÍL PRÁCE....36
4 MATERIÁL A METODIKA....37
4.1 Biologický materiál....37
4.2 Metodika....40
4.2.1 Navrhování primerů....40
4.2.1.1. SSR markery....40
4.2.1.2. Markery typu ISBP/RJM....41
4.2.2 Extrakce a purifikace DNA....43
4.2.3 Polymerázová řetězová reakce....44
4.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu....45
4.2.5 Sekvenování....46
4.2.6 Zpracování získaných dat....46
5 VÝSLEDKY....48
5.1 Odvozování markerů a genotypování....48
5.1.1 SSR markery....48
5.1.2 Markery typu ISBP/RJM....49
5.1.3 SNP markery....50
5.2 Evoluční vztahy mezi studovanými izoláty Bgh....52

6 DISKUSE.....57
7 ZÁVĚR.....64
8 LITERATURA.....65
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....75

1 ÚVOD

Před 12 000 lety započala na Blízkém východě výrazná etapa v dějinách lidstva, tzv. Neolitická revoluce, jejímž výsledkem byl vznik zemědělství vedoucí postupem času k domestikaci celé řady planě rostoucích druhů rostlin. Mezi nimi zaujaly klíčovou pozici obiloviny, které si nezastupitelnou úlohu ve výživě člověka udržely dodnes. Vzhledem k prudkému nárůstu světové populace, k němuž dochází v poslední době, a omezenému zemědělskému půdnímu fondu představuje zvýšení produkce zemědělských plodin hlavní výzvu pro šlechtitele a vědeckou komunitu. Podle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj bude nutné v příštích 40 letech zvýšit zemědělskou produkci o 60 %, aby byla uspokojena rostoucí poptávka (OECD-FAO Agricultural Outlook, 2013). Několik posledních desetiletí přineslo výrazný pokrok v technikách molekulární biologie a genomice, díky čemuž se značně urychlilo a zefektivnilo šlechtění nových odrůd disponujících ekonomicky výhodnějšími vlastnostmi. Kromě zvyšování výnosu je značná pozornost věnována i snaze vyhnout se ztrátám způsobeným abiotickými stresovými faktory a v neposlední řadě se usiluje o získání odrůd rezistentních vůči napadení patogeny. Interakce hostitele a patogenu je velice složitý proces, pochopení těchto komplexních vztahů je však nezbytným předpokladem pro efektivní ochranu plodin před nejrůznějšími infekcemi. Z tohoto důvodu je velmi důležité věnovat pozornost i prohlubování našich znalostí o samotných patogenech.

Vřeckovýtrusá houba *Blumeria graminis* DC., syn. *Erysiphe graminis* DC., která je původcem choroby označované jako padlí, je v současné době považována za šestý nejvýznamnější houbový patogen rostlin (Dean *et al*., 2012). Infekce tímto druhem způsobuje snížení výnosu obilovin v řádu desítek procent, proto je nutné neustále usilovat o zamezení jeho šíření. Existují dva základní způsoby, jak toho dosáhnout, a to aplikace fungicidů a pěstování rezistentních odrůd. Prováděná opatření však nefungují dlouhodobě vzhledem k rychlé adaptaci patogenu, díky níž se mohou v relativně krátké době objevit kmeny odolné vůči fungicidům, případně schopné překonat hostitelskou rezistenci. Proto je studium tohoto ekonomicky významného druhu a jeho interakcí s obilovinami stále aktuálním tématem. Díky značné pozornosti, které mu byla v posledních letech věnována, se padlí travní stalo modelem pro studium ostatních druhů padlí a jiných biotrofních patogenů.

Tato práce si klade za cíl najít markery vhodné pro molekulární charakterizaci izolátů *Blumeria graminis* (D.C.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Em. Marchal, specifické formy padlí travního parazitující na ječmeni setém (*Hordeum vulgare* L.), který patří objemem produkce

mezi deset celosvětově nejvýznamnějších zemědělských plodin (FaoStat, 2012). Rovněž v rámci České republiky se jedná o důležitou zemědělskou komoditu, společně s pšenicí, řepkou a kukuřicí se ječmen řadí mezi čtyři nejrozšířenější tuzemské plodiny. V loňském roce byla tato obilovina pěstována na rozloze 382 330 ha, což představuje 15 % celkových osevních ploch (Český statistický úřad, 2012). Bylo zjištěno, že v našich podmínkách je padlí zodpovědné za 50 % všech epidemií chorob jarního ječmene, u zimního ječmene tato hodnota dosahuje 40 % (Dreiseitl *et* Jurečka, 1996, 1997; cit. Dreiseitl, 2011).

Přestože již byla publikována řada studií využívajících molekulární markery pro studium diverzity a evolučních vztahů v rámci druhu *Blumeria graminis*, systém markerů schopných uspokojivě rozlišit blízce příbuzné izoláty pocházející z jediného hostitelského druhu dosud navržen nebyl. Takovéto markery jsou nevyhnutné pro studium dynamiky diverzity tohoto patogenu. V současné době se nabízí nové možnosti odvozování markerů využívající znalosti sekvence genomu společně s dostupnými bioinformatickými nástroji.

Primární aplikace těchto markerů by spočívala v rozlišení jednotlivých izolátů na genetické úrovni a objasnění jejich fylogeneze. V případě nalezení dostatečného počtu markerů pokrývajících celý genom by dále bylo možné testovat tyto markery na asociace s virulencemi charakterizujícími studované izoláty. Z dlouhodobého hlediska se pak nabízí i další perspektiva. Znalost genetické struktury populace a dynamiky jejích změn v důsledku odpovědi na kontrolní opatření by mohla pomoci při hledání trvalejších strategií boje proti tomuto patogenu. V neposlední řadě by získané poznatky mohly být aplikovány u dalších houbových patogenů s podobnou životní strategií.

Výzkum zaměřený na padlí travní je do značné míry komplikován obligátně biotrofní povahou tohoto druhu, z níž plyne nemožnost kultivace na umělých mediích spojená s řadou dalších omezení zahrnujících obtížné uchovávání biologického materiálu a problematické získávání genomické DNA v dostatečném množství a kvalitě. Díky těmto úskalím zůstává studium padlí travního jako modelového organismu stále velkou výzvou.

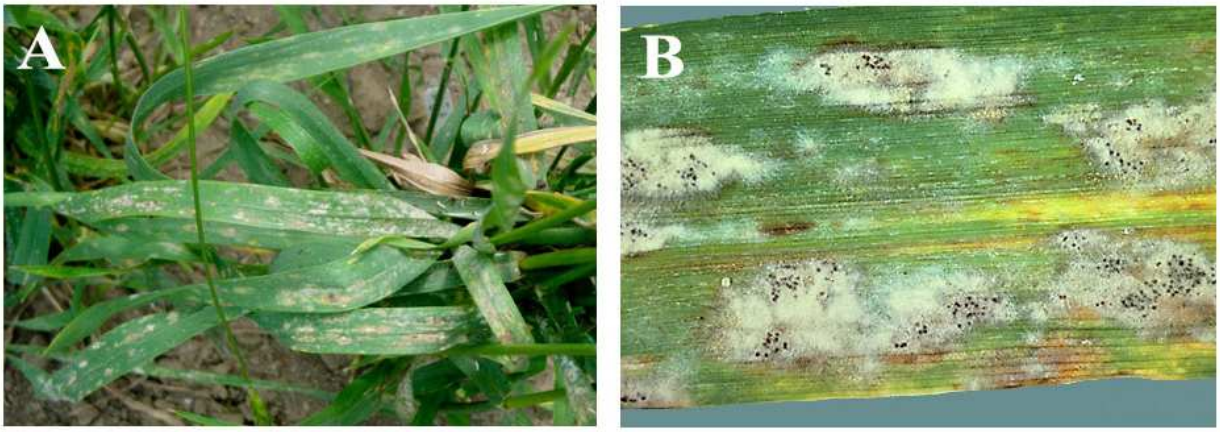
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Padlí travní

Padlí (angl. powdery mildews) je všeobecně rozšířené označení pro skupinu striktně obligátních biotrofních patogenů. Tato skupina vřeckovýtrusých hub z taxonomického hlediska náleží do řádu *Erysiphales* a čeledi *Erysiphaceae* zahrnující 13 rodů infikujících přes 650 druhů jednoděložných a více než 9 000 druhů dvouděložných rostlin (Schulze-Lefert *et* Vogel, 2000). O taxonomii a jejím vývoji včetně morfologických charakteristik zástupců této skupiny podrobně pojednává Braun *et al*. (2002). Mezi hostitele těchto patogenů patří mimo jiné i řada kulturně pěstovaných druhů krytosemenných rostlin (např. vinná réva, ovocné stromy, obiloviny, chmel, okrasné rostliny atd.), jejichž napadení padlím působí v celosvětovém měřítku značné ekonomické ztráty. Životní cyklus těchto houbových organismů je s výjimkou dormantních stádií zcela závislý na živém hostiteli, z jehož buněk získávají potřebné živiny. V důsledku obligátně biotrofní životní strategie se u zástupců této čeledi vyvinuly specifické a vysoce propracované mechanismy, které jim umožňují přežití v dynamickém systému interakcí s jejich hostiteli. Díky pozornosti, která je těmto druhům v dlouhodobém horizontu věnována, se padlí stalo modelem v základním výzkumu zaměřeném na vztahy mezi hostitelem a patogenem, a to navzdory komplikacím plynoucím z nemožnosti kultivovat tyto organismy na umělých médiích (Glawe, 2008; Matsuda *et* Takamatsu, 2003).

Vzhledem ke klíčovému postavení, které v globálním měřítku zaujímají obiloviny mezi všemi zemědělskými plodinami, je padlí travní (*Blumeria graminis* DC., syn. *Erysiphe graminis* DC.) (Obr. 1, A, B) považováno za jednu z nejvýznamnějších patogenních hub parazitujících na rostlinách (Dean *et al*., 2012). Tato práce je zaměřena na konkrétní hostitelskou formu (*Forma specialis*, f. sp.) tohoto druhu, a to *Blumeria graminis* DC. Speer f. sp. *hordei* Marchal (Bgh). Jedná se o původce nejrozšířenější choroby ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v Evropě, jeho výskyt však není geograficky limitován a působí značné ztráty na mnoha místech světa s příhodným klimatem poskytujícím dostatek srážek a vhodné teploty. Ve druhé polovině 20. století bylo zaznamenáno výrazné rozšíření areálu, v němž padlí travní představuje ekonomicky významného škůdce, a to směrem k oblastem se sušším a teplejším podnebím. K tomuto jevu došlo v důsledku rozsáhlých změn v zemědělství, jako např. aplikace zavlažování, zvýšené použití dusíkatých hnojiv a pěstování geneticky uniformních kultivarů (Bennett, 1984). Napadení ječmene tímto patogenem může vést ke značnému

poklesu výnosu, konkrétní údaje se však v různých publikacích liší. Yarwood (1957) uvádí snížení až o 42 %.



Obr. 1: Příznaky choroby padlí způsobené infekcí patogenem *Blumeria graminis* DC. na obilovinách

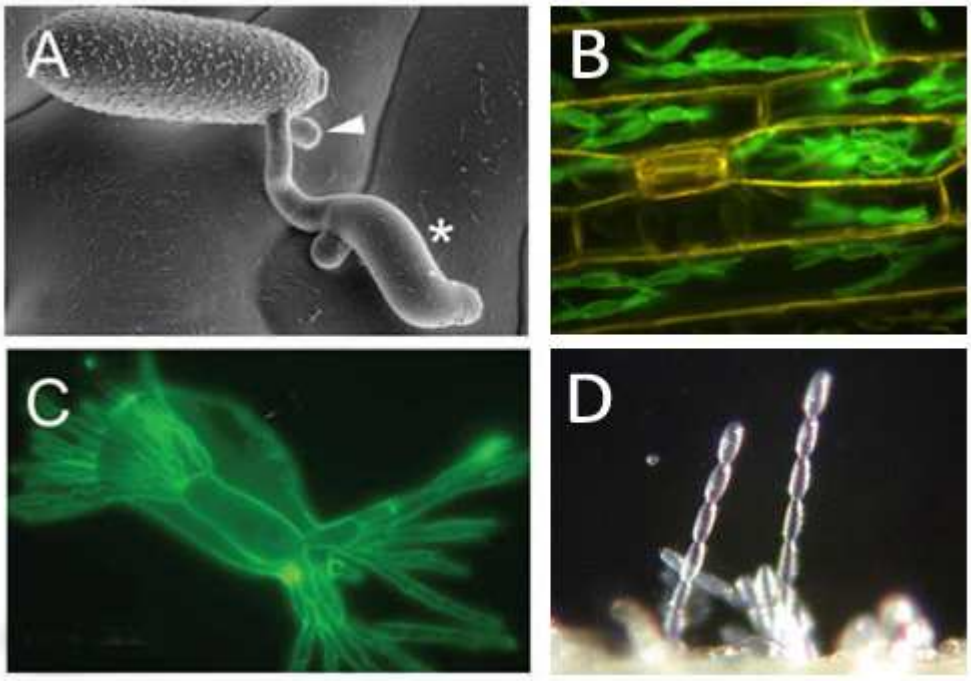
A) Pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.); B) Ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.).
(A: foto autor; B: převzato z http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/cultivarmixes/Pages/default.aspx)

2.1.1 Životní cyklus a průběh infekce

Životní cyklus padlí travního se dělí na pohlavní a nepohlavní. Po většinu roku se tento patogen rozmnožuje nepohlavní cestou, při níž je jediná kolonie schopna vyprodukovat až 200 000 spor šířících se větrem na vzdálenosti stovek kilometrů. Pohlavní cyklus je pozorován hlavně před nepříznivými obdobími a struktury, které při něm vznikají, zajišťují patogenu přežití. Tato houba je po většinu svého životního cyklu haploidní pouze s výjimkou krátké diploidní fáze během pohlavního rozmnožování (Jørgensen, 1994; Zhang *et al.*, 2005).

Nepohlavní cyklus je zahájen inokulací listu náchylného hostitele konidií a jejím klíčením (Obr. 2, A). Rychlost klíčení je ovlivněna vnějšími faktory, vhodná teplota, světlo a absence vody tento proces urychlují. Nezbytným předpokladem klíčení je fyzický kontakt s povrchem hostitele. Během jedné hodiny dochází ke tvorbě primární klíčící hyfy, ta v průběhu dalších několika hodin vyvolává vznik apresoriální klíčící hyfy, která se posléze diferencuje v apresorium. Jedná se o rozšířenou hákovitou strukturu zakončenou penetračními výběžky, které pomocí enzymatické aktivity a mechanické penetrace pronikají epidermální buněčnou stěnou hostitele. Uvnitř hostitelské buňky houba vytváří haustorium vzniklé zvětšením penetračního výběžku a jeho obklopením modifikovanou plazmatickou

membránou hostitele, přes kterou patogen absorbuje živiny (Obr. 2, B, C). Poté jsou tvořeny sekundární hyfy, které se prodlužují a větví, vznikají taktéž další haustoria, jichž můžeme v jediné epidermální buňce hostitele nalézt až 50. Po 3 – 4 dnech je na povrchu listů jasně patrné bílé mycelium a kolonie začíná produkovat nové spory pomocí nepohlavního rozmnožování. Z vegetativních hyf se vytváří konidiofory (Obr. 2, D) zakončené řetězci postupně dozrávajících a uvolňujících se konidií, které obsahují velké množství vody, což pravděpodobně přispívá ke schopnosti klíčit v její nepřítomnosti (Glawe, 2008; Jørgensen, 1994; Yarwood, 1957; Zhang *et al*., 2005).

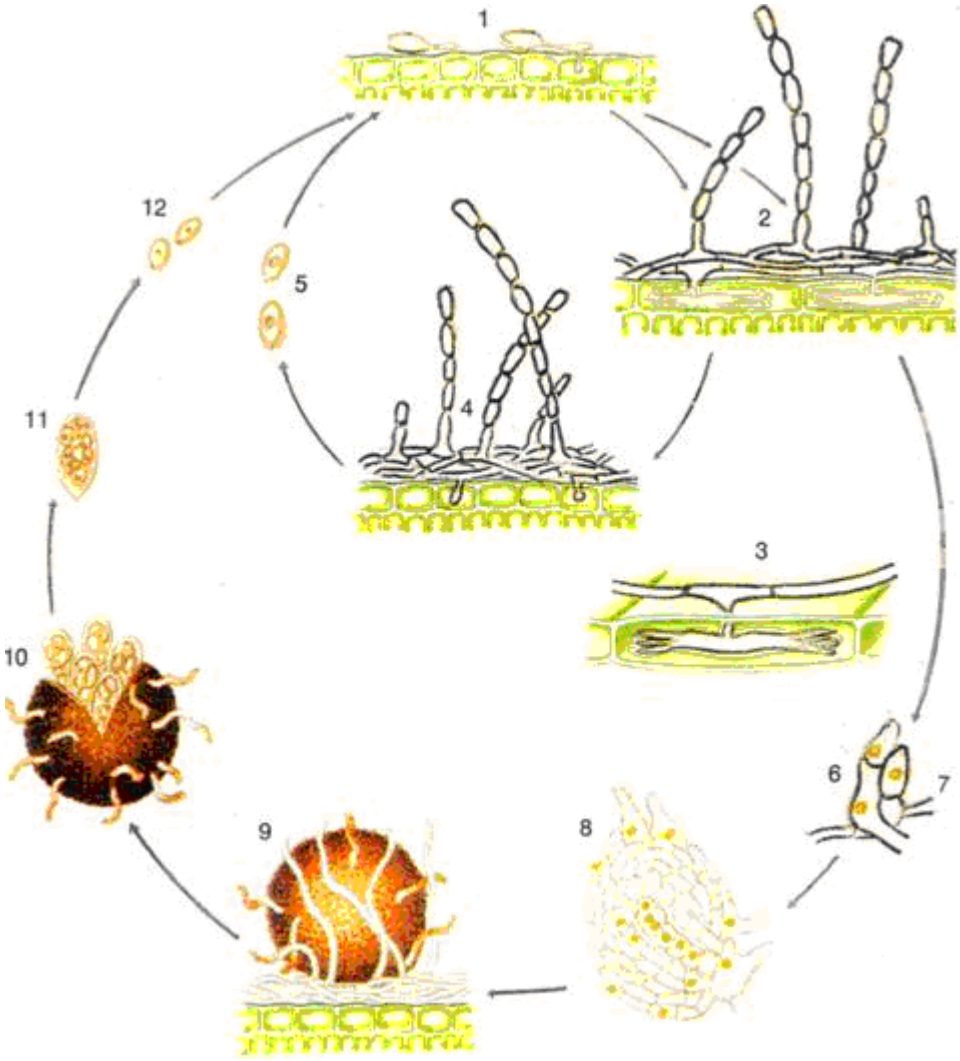


Obr. 2: Morfologie druhu *Blumeria graminis* DC.

A) Klíčící konidie (primární klíčící hyfa je označena šipkou, apresoriální klíčící hyfa hvězdičkou); B) Haustoria uvnitř epidermálních buněk hostitele; C) Detail haustoria; D) Konidiofory s řetězci konidií.
(Převzato ze Spanu *et al*., 2010; http://www.blugen.org)

Pohlavně vzniklé spory jsou produkovány v plodnicích typu chasmothecia, které se vytváří na stárnoucích listech (Zhang *et al.*, 2005). Z vnější vrstvy plodnic vyrůstají výběžky, tzv. apendixy, jejichž tvar je charakteristickým znakem umožňujícím rozlišení různých druhů padlí. Pohlavní rozmnožování je zahájeno tvorbou gametangií, a to samčích anteridií a samičích askogonií, mezi nimiž dochází ke vzájemnému propojení cytoplazem, tzv. plazmogamii, po níž následuje přenos jádra z anteridia do askogonia. Tento proces vede ke

vzniku dvoujaderné buňky, ze které pak dělením vzniká vřecko (askus), v němž dochází ke karyogamii a meióze. Výsledkem je vznik haploidních askospor (Braun *et al.*, 2002; Glawe, 2008). Kompletní životní cyklus padlí travního je přehledně znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Životní cyklus druhu *Blumeria graminis* DC.

Nepohlavní cyklus: 1 – klíčící konidie na povrchu listu; 2, 4 – konidiofory s konidiemi; 5 – oddělené konidie připravené k šíření. **Pohlavní cyklus**: 1 – klíčící askospory; 3 – detail haustoria; 6 – askogonium; 7 – anteridium; 8 – tvorba askokarpu; 9, 10 – plodnice typu chasmothecia; 11 – askus obsahující haploidní akospory; 12 – volné askospory.

(Převzato z http://www.scritube.com/biologie/botanica/BOLILE-GRAULUI1211191616.php)

Vzhledem ke své obligátně biotrofní povaze musí být padlí travní schopno určitým způsobem přežít období, kdy není k dispozici tkáň náchylného hostitele. Jak již bylo zmíněno výše, patogen může přečkat nepříznivé podmínky ve formě odolných chasmothecií. Tato možnost při následném klíčení na nových hostitelích zvyšuje šance na přežití díky tomu, že uvolněné askospory nesou maximální genetickou variabilitu tohoto organismu. Popsaná strategie se vyvinula jako prostředek pro přežití horkého a suchého léta v oblasti původu obilovin, ale v současnosti funguje i jako ideální systém u zemědělských plodin po celém světě. Další variantou je přečkání nepříznivých podmínek ve formě mycelia na přetrvávajících listech hostitele nebo na dormantních pupenech (Glawe, 2008; Wolfe, 1984).

2.1.2 Důsledky infekce a faktory ovlivňující rozsah škod

Míra výskytu Bgh na ječmeni se může do značné míry lišit v závislosti na konkrétní sezóně a pěstované odrůdě. K výraznějšímu šíření infekce dochází na sklonku jara až v létě, a to nezávisle na tom, zda se jedná o ječmen ozimý, či jarní. Napadení tímto patogenem způsobuje znatelný pokles výnosu, jehož přesnou podstatu lze objasnit na základě experimentů porovnávajících růst zdravých a infikovaných rostlin. Infekce postupuje rychle, čtyři týdny po inokulaci bylo zaznamenáno postižení 30 % povrchu listů a počet výhonů na rostlinu byl oproti kontrole snížen. Kromě menšího počtu výhonů padlí také negativně ovlivnilo jejich vzrůst v pozdějších fázích infekce. V průběhu dalších tří týdnů byl jasně patrný velikostní rozdíl napadených a zdravých výhonů, v tomto stadiu také započalo předčasné odumírání starších, ve větší míře napadených listů. Dále bylo prokázáno snížení celkové suché hmoty v důsledku infekce, a to 2,5krát. Tento efekt byl překvapivě výrazněji patrný u kořenů než u listů. Důsledkem snížení počtu a velikosti výhonů bylo i odpovídající zmenšení celkové plochy listů, avšak působením patogenu došlo i ke změně jejich struktury snižující množství suché hmoty na cm^2, stejný trend byl pozorován i v případě kořenů. Uvedené změny se následně odrážely ve snížené produkci klasů doprovázené jejich menší velikostí v porovnání s kontrolními rostlinami. Celkový pokles výnosu přímo souvisí se zmenšením plochy asimilujících a absorbujících povrchů rostliny a s nižší produkcí suché hmoty na jednotku plochy listu (Last, 1962).

Rozsah škod, které padlí travní působí, je ovlivněn různými faktory, mezi něž v neposlední řadě patří i podmínky prostředí. Rostliny pěstované při mírných teplotách a střední intenzitě světla spolu s dostatečnou vzdušnou vlhkostí, zálivkou a obsahem dusíku

v půdě jsou více náchylné vůči infekci než rostliny vystavené v průběhu svého růstu nepříznivým podmínkám působícím zpevnění jejich tkání, které následně brzdí růst patogenu. Toto spolupůsobení environmentálních faktorů je dlouhodobé a krátké výkyvy počasí na něj nemají vliv. Vnější podmínky však mohou průběh infekce modifikovat i svým vlivem na expresi genů podílejících se na vzniku rezistence (Tapke, 1953).

2.1.3 Evoluční vztahy a diverzita v rámci druhu *Blumeria graminis*

Díky velice úzké hostitelské specializaci, ke které dochází v důsledku adaptace patogenu na určitý hostitelský druh, lze padlí travní dále dělit na osm hostitelských forem (*Formae speciales*, ff. spp.), z nichž největší význam pro člověka mají *Blumeria graminis* ff. spp. *hordei*, *tritici*, *secalis* a *avenae* parazitující na obilovinách. Zbylé čtyři hostitelské formy se vyskytují na planě rostoucích travách (Wyand *et* Brown, 2003). Specializace na jediný hostitelský rod však neplatí absolutně. Eshed *et* Wahl (1970) prokázali, že spektrum potenciálních hostitelů u izraelských populací je výrazně širší. Do této geografické oblasti je řazeno centrum původu a diverzifikace předků dnešních obilovin, což naznačuje možnost společné evoluce tohoto patogenu a jeho hostitelů.

Hostitelská specializace je přirozeným důsledkem adaptace druhu na obligátně biotrofní způsob života. V případě dlouhodobé asociace určitého hostitele a patogenu mohlo dojít k oboustranné izolaci daných populací vedoucí k jejich kospeciaci. Pokud je tento předpoklad v případě padlí travního pravdivý, genetické vzdálenosti mezi jednotlivými hostitelskými formami by měly být ve vzájemné korelaci s genetickými vzdálenostmi mezi jejich hostiteli (Matsuda *et* Takamatsu, 2003). Za účelem ověření platnosti této hypotézy vzniklo několik studií usilujících o objasnění fylogenetických vztahů mezi jednotlivými hostitelskými formami. Kromě toho byla publikována i celá řada prací zabývajících se studiem variability v rámci těchto forem. Dostupné publikace lze rozdělit podle typu použitých markerů. Nejdéle používanou skupinou jsou markery založené na fenotypu, z nichž má v případě tohoto patogenu největší význam analýza virulencí a citlivosti k různým typům fungicidů. Tyto charakteristiky měly dříve nezastupitelný význam pro rozlišení jednotlivých izolátů, populací a také pro evoluční studie, jejich úskalím je však jejich omezený počet, náročné vyhodnocování a závislost na vnějších podmínkách. Kromě toho jsou tyto vlastnosti trvale pod silným selekčním tlakem a podléhají tedy neustálému vývoji (McDermott *et al*., 1994). Zvýšenou pozornost proto zasluhují další dvě skupiny markerů, a to biochemické

markery založené na analýze isozymů a molekulární markery čerpající z přirozeně se vyskytujícího polymorfismu v sekvenci DNA. Uvedené dělení bylo převzato od Kumara *et al*. (2009). Použití různých typů markerů pro analýzu variability v populacích rostlinných patogenů shrnují McDermott *et* McDonald (1993).

2.1.3.1 Studie založené na analýze isozymů

Isozymy byly původně definovány jako různé varianty téhož enzymu, které mají stejnou nebo podobnou funkci a nachází se v témže organismu. Jejich význam dramaticky vzrostl po objevu genetické podstaty jejich polymorfismu umožňujícím nový pohled na populační genetiku, evoluční procesy a fylogenetické vztahy (Stebbins, 1989). Isozymy sdílejí společný substrát, vznikly však jako produkty různých genů, případně různých alel téhož genu (v tomto případě se pro ně používá označení allozymy). Jejich polymorfismus je možné detekovat na základě různé elektroforetické mobility, technikami analýzy isozymů se podrobně zabývají Wendel *et* Weeden (1989). Výhodou tohoto typu markerů je jejich kodominantní charakter spolu s relativně snadnou a cenově nenáročnou analýzou. Mezi hlavní nevýhody pak patří omezený počet vhodných isozymových lokusů v genomu, nižší variabilita a potřeba čerstvého biologického materiálu (Weising *et al*., 2005).

Markery založené na polymorfismu mezi isozymy a nespecificky barvenými proteiny ve své práci využili Koch *et* Köhler (1990). Pro každou z hodnocených hostitelských forem (*Blumeria graminis* ff. spp. *hordei*, *avenae*, *secalis* a *tritici*) byl zvolen převažující genotyp definovaný 131 různými isozymy a 93 proteiny. Na základě rozdílů mezi těmito genotypy byla zjištěna nejvyšší homologie mezi *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* a *secalis*. S tímto výsledkem korespondovalo i porovnání hostitelských druhů *Triticum aestivum* a *Secale cereale*. K dosažení signifikantní korelace vedlo také srovnání rozdílů mezi ostatními hostitelskými formami a jejich hostitelskými druhy. V rámci každé hostitelské formy byla detekována pouze velmi nízká úroveň variability.

Na získané výsledky autoři navázali další studií blíže zaměřenou na diverzitu, populační strukturu a migraci v evropské populaci Bgh. Celkem 280 izolátů z celé Evropy bylo podrobeno analýze virulencí testováním na diferenciačních odrůdách ječmene nesoucích různé geny rezistence a na základě výsledků byly izoláty rozděleny na 90 patotypů. Ke zjištění diverzity bylo opět využito isozymů separovaných elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (PAGE) a nespecifických proteinů rozdělených pomocí

isoelektrické fokusace. Pouze u 7,5 % z celkového počtu studovaných izolátů byl nalezen polymorfismus, žádný izolát se od převažujícího genotypu nelišil ve více než jednom isozymu. Následně provedená asociační studie genů virulence a isozymů odhalila 22 divergentních izolátů mezi 17 patotypy. Nejvyšší počet divergentních izolátů byl zjištěn mezi vzorky pocházejícími z Itálie a Rakouska, u nichž byla zároveň odhalena nižší komplexita virulencí, zatímco populace pocházející ze severozápadní Evropy byly velmi homogenní pravděpodobně v důsledku působení selekce a genetického driftu (Koch *et* Köhler, 1991).

2.1.3.2 Studie založené na DNA markerech

DNA markery oproti isozymům disponují celou řadou výhodných vlastností. DNA lze snadno získat i z malého množství biologického materiálu pocházejícího z libovolné vývojové fáze studovaného organismu a poskytuje široký zdroj polymorfismu využitelného pro odvozování markerů, jejichž obrovskou výhodou je nezávislost na vnějším prostředí. První generace DNA markerů byla založena na různé délce fragmentů vzniklých restrikčním štěpením (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), k jejichž detekci se využívala hybridizace se značenou sondou. Tato technika však byla pracná, zdlouhavá a v případě použití radioaktivně značených sond i problematická. Přelomem byl objev polymerázové řetězové reakce (PCR; Mullis *et al*., 1986), který odstartoval vznik celé řady nových metod analýzy polymorfismu, jejichž společným rysem je extrémně citlivá a rychlá *in vitro* amplifikace určitého úseku genomické DNA. Široké spektrum známých typů markerů založených na PCR detailně popisuje a srovnává Kumar *et al*. (2009). Největší množství informace poskytuje určení DNA sekvence u porovnávaných jedinců umožňující odhalení jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Dříve hojně využívané Sangerovo sekvenování (Sanger e*t al*., 1977) je dnes nahrazováno dynamicky se rozvíjejícími sekvenačními technologiemi nové generace (Next Generation Sequencing, NGS). Principy a aplikace nejvýznamnějších z těchto technik shrnuje Metzker (2010).

Brown *et al*. (1990) využili RFLP markerů k analýze DNA polymorfismu mezi 97 testovanými izoláty Bgh sesbíranými v okolí Cambridge (UK), jejich cílem bylo objasnění populační struktury tohoto patogenu a dále porovnání získaných výsledků s fenotypovými znaky těchto izolátů. Tato studie odhalila vysoký stupeň diverzity v RFLP markerech mezi zkoumanými izoláty. Určité skupiny izolátů však vykazovaly velmi podobné RFLP profily

a byla u nich nalezena i shoda ve virulencích, což může být vysvětleno jejich klonálním původem z jediné linie. Naopak izoláty vyznačující se stejným fenotypem rezistence vůči fungicidu triadimenolu vykazovaly rozdílný RFLP profil i rozdílné virulence. Toto zjištění naznačuje, že rezistence k danému fungicidu se mohla vyvinout nezávisle u různých izolátů působením selekčního tlaku. Na základě dosažených výsledků nebyla nalezena žádná asociace RFLP markeru s virulencí nebo rezistencí k fungicidu.

Na RFLP je založena i studie, kterou publikovali Christiansen *et* Giese (1990). Autoři identifikovali 31 RFLP markerů, které využili pro analýzu vazby s pěti lokusy zodpovědnými za virulence. Pomocí odvozených markerů bylo však možné provést i charakterizaci různých izolátů Bgh.

Damgaard *et* Giese (1996) později aplikovali RFLP data k odhadu genetické variability Bgh ve třech lokálních populacích původem z Dánsku, analýza byla provedena na základě polymorfismu ve čtyřech jednolokusových RFLP markerech. Variabilita byla sledována pouze mezi izoláty, které nebyly klonálního původu a nesly tedy rozdílné genotypy virulencí. Jako parametry popisující variabilitu zde byly zvoleny genetická diverzita a efektivní velikost populace, kterou lze vyjádřit jako funkci mutační frekvence. Tato hodnota byla určena jako 10^{-9} mutací na bázi a generaci. Mezi studovanými populacemi vzájemně oddělenými geografickou vzdáleností v řádech stovek kilometrů nebyly odhaleny žádné známky genetické diferenciace, a to pravděpodobně v důsledku kontinuálně probíhající migrace, která potlačuje vliv genetického driftu.

Ve studii zaměřené na populační biologii Bgh v mezinárodním měřítku, kterou publikovali Wolfe *et al.* (1992), se objevuje nová generace DNA markerů založených na PCR. Předmětem zájmu byly izoláty sesbírané v různých částech Evropy, které byly podrobeny analýze na několika úrovních. Spolu s testováním virulencí byla sledována rezistence izolátů vůči triadimenolu a dále byla u vzorků provedena analýza deseti různých DNA lokusů pomocí polymorfismu mezi náhodně amplifikovanými fragmenty (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD). Na základě těchto charakteristik byla popsána vysoká variabilita v celoevropském měřítku, ale i v rámci jednotlivých lokalit.

McDermott *et* McDonald (1993) se v podobně koncipované studii pokoušeli objasnit členění evropské populace Bgh pomocí 580 izolátů z různých regionálních populací, u nichž byl sledován polymorfismus v 11 lokusech virulence a 11 RAPD markerech.

Aplikaci DNA markerů založených na PCR u Bgh popisují i McDermott *et al.* (1994). Pro zhodnocení genetické variability mezi 16 izoláty pocházejícími z různých oblastí Evropy a mezi 48 izoláty získanými odchytem v jediné lokalitě bylo opět využito RAPD markerů. Vybrané RAPD fragmenty byly dále převedeny na výhodnější typ markerů, který je založen na amplifikované oblasti charakterizované sekvencí (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR). Délkový polymorfismus jednoho z takto získaných SCAR markerů byl na základě sekvenování vysvětlen přítomností různého počtu kopií tandemově se opakujícího DNA motivu (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR). Na lokální úrovni byla odhalena nižší míra polymorfismu než mezi izoláty z různých částí Evropy. Výsledky genetické analýzy byly posléze porovnány s daty popisujícími geografickou distribuci virulencí a rezistencí k fungicidům. U použitých markerů bylo prokázáno, že segregují v populaci specifických hybridů.

Charakterizaci izolátů Bgh pomocí RAPD markerů jako doplnění k analýze jejich virulencí uplatnil ve své studii i Newton *et al.* (1998), tato práce uvádí zisk vysoce reprodukovatelných a polymorfních RAPD profilů. Testování korelace použitých RAPD markerů a studovaných virulencí však nevedlo k průkaznému výsledku. Autoři zde navrhují uplatnění polymorfismu založeného na štěpených amplifikovaných fragmentech (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) jako vhodnější alternativu pro nalezení markerů nacházejících se ve vazbě s virulencemi.

Později publikované práce se zaměřovaly téměř výhradně na analýzu evolučně vzdálených izolátů z různých hostitelských druhů. Wyand *et* Brown (2003) se zabývali otázkou koevoluce mezi patogeny a jejich hostiteli, vycházeli při tom z fylogenetické analýzy čtyř hostitelských forem padlí travního (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *secalis*, *hordei* a *avenae*) založené na polymorfismu v sekvencích genu kódujícího ß-tubulin a oblastí nacházejících se mezi geny pro ribozomální RNA (Internal Transcribed Spacer, ITS). Sekvence genu pro ß-tubulin vykazovaly výrazně větší míru divergence a vyšší četnost mutací než ITS oblasti, které byly u izolátů téže hostitelské formy zcela uniformní a jejich využití pro fylogenetické studie u blízce příbuzných taxonomických skupin je proto velmi omezené. Dendrogramy vytvořené na základě dat získaných analýzou 63 testovaných izolátů různých hostitelských forem pocházejících z Evropy, Asie a Severní Ameriky zobrazovaly rozdělení izolátů do skupin podle jejich hostitelského rodu. Stejně jako v případě studie Kocha *et* Köhlera (1990) byla zjištěna nejvyšší míra homologie mezi Bg *tritici* a *secalis*, to může naznačovat jejich teprve nedávnou divergenci. Získané výsledky byly posléze potvrzeny

i provedenou AFLP analýzou, avšak teorii koevoluce se prokázat nepodařilo, protože fylogenetické vztahy mezi hostitelskými formami padlí travního nebyly kongruentní s fylogenezí uvnitř podčeledi *Pooideae* sdružující jejich hostitelské druhy. AFLP data dále poukazovala na nepřítomnost korelace mezi geografickými a genetickými vzdálenostmi, což je v souladu s výsledky, které publikovali Damgaard *et* Giese (1996). Divergence mezi hostitelskými formami tohoto patogenu byla datována do období před 14 000 lety.

Další studie zabývající se objasněním fylogenetickým vztahů v rámci padlí travního vycházela z polymorfismu čtyř různých oblastí DNA, a to genu kódujícího chitin synthasu 1, genu pro ß-tubulin, 28S ribozomální DNA (rDNA) a ITS (Inuma *et al*., 2007). Stejně jako v předcházejícím případě bylo i zde prokázáno, že sekvence kódující proteiny jsou díky své diverzitě (převážně v oblastech intronů) pro potřeby fylogenetické analýzy vhodnější než relativně uniformní ITS oblasti, respektive rDNA. Studované izoláty sesbírané z obilovin a planě rostoucích trav v různých lokalitách po celém světě byly na základě výsledků analýzy uvedených DNA sekvencí rozčleněny do devíti různých skupin, izoláty z téhož hostitelského rodu patřily do téže skupiny s výjimkou představovanou rody *Lolium* a *Bromus*, u nichž došlo k rozdělení izolátů do více skupin. Dosažené výsledky poukazovaly na blízkou příbuznost izolátů pocházejících z pšenice a žita společně s izoláty z rodu *Agropyron*. Kromě sestavení fylogeneze bylo cílem této práce také odhadnout genetickou diverzitu druhu *Blumeria graminis* a odvodit evoluční vztahy mezi tímto druhem a jeho hostitely. Teorie společné speciace mezi padlí travním a jeho hostitelskými druhy v této studii stejně jako u předcházející práce Wyanda *et* Browna (2003) nebyla potvrzena. Dosažené výsledky naznačovaly, že během evoluce patogenu mohlo opakovaně dojít k jeho adaptaci na fylogeneticky odlišného hostitele. Autoři dále využili ITS oblastí jako molekulárních hodin pro výpočet doby divergence izolátů z pšenice a ječmene. Oddělení těchto skupin bylo datováno do doby před 4,6 miliony let, tedy až 6,4 milionů let po divergenci jejich hostitelských rodů (Inuma *et al*., 2007). Tato hodnota se poměrně výrazně odlišuje od hodnoty, kterou vypočetli Takamatsu *et* Matsuda (2004) s využitím molekulárních hodin založených na 28S rDNA. Podle jejich odhadu došlo k divergenci hostitelských forem *tritici* a *hordei* již před 10 miliony let.

Na datování doby divergence *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* a *tritici* se zaměřili i Oberhaensli *et al*. (2011). Jejich studie jako první využila k odhadu evolučních vztahů u padlí travního nekódující mezigenové sekvence, a to včetně transponovatelných elementů (TE). Na základě analýzy dvou různých lokusů získaných z BAC klonů *Blumeria graminis*

f. sp. *tritici* (Bgt) bylo určeno, že k oddělení daných hostitelských forem došlo před 10 miliony let, tedy ve stejné době, kterou odhadovali Takamatsu *et* Matsuda (2004). Zjištěný čas divergence podporuje navržený model koevoluce, ke které došlo během relativně krátké doby po oddělení hostitelských rodů, tedy pšenice a ječmene. Během tohoto přechodného období byl pravděpodobně tentýž patogen schopen růst na obou hostitelích.

Za účelem shrnutí všech do té doby získaných poznatků týkajících se evoluce a fylogeneze druhu *Blumeria graminis* byla zformulována teorie, podle níž může evoluce vztahu hostitele a patogenu proběhnout mnoha potenciálními cestami, a to od náhlé změny hostitele vedoucí k blízce příbuzným parazitům infikujícím vzdálené hostitelské druhy až po změnu hostitele během dlouhodobé vzájemné koevoluce. K určení nejčastějších cest, jimiž se evoluce tohoto systému ubírá, by bylo nutné provést další studie na širším spektru patogenů a jejich hostitelů (Oberhaensli *et al*., 2011).

2.1.4 Genom

Vzhledem k velké pozornosti, která je tomuto modelovému patogennímu organismu dlouhodobě věnována, jsou v současné době k dispozici poměrně rozsáhlé poznatky týkající se struktury jeho genomu, na jejichž prohlubování se dále intenzivně pracuje (Spanu *et* Panstruga, 2012). Tato kapitola shrnuje dosud publikované práce, jejichž výsledky přispěly k současnému pokroku v dané oblasti.

Chromosomy nacházející se v jádře padlí travního jsou velmi malé a obtížně barvitelné tradičními cytologickými metodami, což představuje značnou komplikaci pro stanovení jejich přesného počtu pomocí světelné mikroskopie. S jejím využitím byla minimální haploidní sestava chromosomů odhadnuta na n = 7, pozorované chromosomy bylo možné rozdělit do tří velikostních skupin. Separace vysokomolekulární DNA z Bgh pomocí inverzní gelové elektroforézy (Field Inversion Gel Elecrophoresis, FIGE) doprovázená hybridizačními experimenty odhalila kromě chromosomální DNA také přítomnost mitochondriální DNA a extrachromosomální plasmidové DNA o délce 9 kbp. Kombinací dvou výše popsaných technik bylo určeno, že haploidní genom Bgh obsahuje pět velmi malých (0,2 – 0,8 Mbp) a minimálně dva větší chromosomy (Borbye *et al*., 1992).

Nalezené extrachromosomální DNA typu plasmidu se blíže věnovali Giese *et al.* (1990). Přítomnost plasmidu v mitochondriích Bgh byla zjištěna pouze u poloviny studovaných izolátů, z čehož lze usuzovat, že se nejedná o strukturu nutnou k přežití. Jeho

výskyt byl četný zejména u izolátů pocházejících z Evropy, nebyla však odhalena žádná korelace mezi přítomností této DNA a virulencemi izolátů.

Významným cílem řady studií bylo a stále je získání podrobnějších informací o DNA obsažené ve chromosomech tohoto obligátního biotrofa. Hlavní překážkou při studiu organizace genomu v podobě distribuce důležitých genů však byl nedostatek znaků, které by bylo možné snadno vyhodnocovat, v minulosti byly sledovány téměř výhradně znaky související s virulencí a rezistencí vůči fungicidům. O'Dell *et al.* (1989) poprvé popisují organizaci repetitivních sekvencí v genomu padlí travního. Zjištěný obsah rozptýlených repetic byl výrazně vyšší než v případě genomů jiných vřeckovýtrusých hub, které byly do té doby charakterizovány. Dále bylo prokázáno, že mezi identifikovanými repeticemi existují výrazné délkové rozdíly, některé dosahovaly délky až tisíců bp. Značné rozdíly v organizaci repetitivních sekvencí eukaryotních genomů lze vysvětlit jejich rychlou evolucí v důsledku působení řady procesů, mezi něž patří nerovnoměrný crossing over, delece, transpozice a konverze. Na základě dosažených výsledků autoři navrhli využití vysokého obsahu repetic u padlí travního ke snadné detekci genetického polymorfismu pomocí štěpení restrikčními endonukleasami a následné hybridizace se sondami odvozenými z repetitivních sekvencí.

Ve snaze blíže nahlédnout do struktury genomu tohoto druhu byly z jeho genomické DNA opakovaně vytvářeny knihovny dlouhých inzertů. Kosmidová knihovna zhotovená Rasmussenem *et al.* (1993) poskytla další informace o organizaci a charakteru repetitivní DNA v genomu Bgh. Byly identifikovány tři rodiny nepříbuzných repetitivních elementů označené jako EGH1, EGH20 a EGH24, z nichž u poslední zmíněné byla zaznamenána nejvyšší četnost výskytu, podle odhadu tato rodina tvoří minimálně 5 % genomu. Analýzou sekvence EGH24 byla odhalena přítomnost znaků typických pro krátké rozptýlené elementy (Short Interspersed Nuclear Element, SINE) savců, které mají schopnost šířit se v genomu procesem retrotranspozice. Rodina EGH24 se tak stala prvním známým případem výskytu SINEs u vláknitých hub. Tento element byl nalezen převážně v hypomethylovaných oblastech genomu, což naznačuje možnost jeho inzerce do aktivních genů. Autoři zde vyslovují hypotézu, podle níž může integrace TE do kódujících nebo promotorových oblastí genů zapojených do patogenity spolu s nerovnoměrným crossing overem mezi retroelementy vedoucím k reorganizaci genomu přispívat k evoluci nových patotypů a zvyšovat tak adaptační potenciál tohoto patogenu.

Borbye *et* Giese (1994) připravili z vysokomolekulární genomické DNA padlí travního ječmene knihovnu dlouhých insertů využívající jako vektor umělé kvasinkové

chromosomy (Yeast Artificial Chromosome, YAC). Knihovna s průměrnou délkou insertu 220 kbp poskytovala deset ekvivalentů haploidního genomu a k její charakterizaci byly využity vícekopiové RFLP markery spolu se SINE elementem specifickým pro Bgh. YAC knihovna byla původně navržena jako prostředek umožňující poziční klonování, později však obecně převládlo použití knihoven DNA klonovaných ve vektoru BAC (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Tento systém v porovnání s YAC nabízí řadu výhod, mezi něž patří snadnější manipulace s BAC klony a zejména pak jejich stabilita a absence chimérismu. Z těchto důvodů byla posléze zhotovena rovněž BAC knihovna Bgh (Pedersen *et al*., 2002a) charakterizovaná průměrnou délkou insertu 41 kbp tvořící odhadem tři ekvivalenty genomu, jehož velikost byla odhadnuta na 100 – 160 Mbp. Kombinací s předchozí zmíněnou YAC knihovnou bylo získáno vyšší pokrytí umožňující sestavení kontigů, které byly následně využity pro mikrosynténní studie. Sekvenování konců BAC klonů (BAC-End Sequencing, BES) však odhalilo vysoký obsah repetitivní DNA, která tvorbu kontigů komplikuje. Pro identifikaci překryvů byly s největším úspěchem použity jednokopiové sekvence získané z cDNA klonů (Expressed Sequence Tags, ESTs), díky nimž se podařilo sestavit dva kontigy obsahující geny avirulence. Tyto kontigy byly následně ukotveny na již existující genetickou mapu (Pedersen *et al*., 2002b), což otevřelo cestu pro poziční klonování genů avirulence.

Dalším přístupem soustředícím se na kódující oblasti genomu byla identifikace genů pomocí analýzy ESTs (Thomas *et al*., 2001). Sekvence získané ze dvou cDNA knihoven Bgh byly použity pro porovnání genové exprese v klíčících konidiích a konidiích nacházejících se v klidovém stadiu. Ze všech dostupných sekvencí bylo sestaveno celkem 1 669 unikátních klonů, u nichž byla následně hledána homologie s již známými geny. Na základě této analýzy pak byla odhadována možná funkce genů exprimovaných u padlí travního. Polovina všech klonů však nevykazovala signifikantní homologii s žádnými geny o známé funkci. Porovnáním získaných dat se sekvencemi jiných patogenních a nepatogenních hub byla umožněna formulace hypotéz zabývajících se odhalením genů vyžadovaných pro patogenitu a růst na hostiteli.

S rozvojem genomiky zaměřené na houbové patogeny doprovázeným prudce narůstajícím množstvím generovaných sekvenačních dat se objevila další výzva ve formě potřeby vhodných bioinformatických nástrojů schopných získaná data analyzovat. Soanes *et al.* (2002) popisují tvorbu relační databáze COGEME (http://cogeme.ex.ac.uk/) obsahující významnou část do té doby dostupných EST dat z fytopatogenních hub včetně padlí travního. Obsah této databáze poté značně rozšířili Soanes *et* Talbot (2006), kteří provedli rozsáhlou

komparativní analýzu ESTs z patnácti druhů fytopatogenních a tří druhů saprofytických hub. Výsledkem pak byla databáze obsahující 57 727 unikátních anotovaných cDNA sekvencí, které byly rozděleny do kategorií podle funkce zjištěné na základě homologie se známými proteiny. Poněkud překvapivým výsledkem byla výrazná odlišnost ESTs z Bgh od ostatních houbových patogenů. Tato skutečnost byla vysvětlena hypotézou, podle níž k evoluci patogenity v říši hub došlo několikrát nezávisle na sobě, a to působením různých mechanismů. Mezi ně patří např. získávání nových genů podílejících se na patogenitě horizontálním genovým přenosem, duplikace ancestrálních genů doprovázené jejich divergencí, změny v regulaci genové exprese původních genů u nepatogenních druhů, případně ztráta určitých genů.

Přelomovým bodem pro genomiku padlí travního se stalo celogenomové sekvenování Bgh kmene DH14 (Spanu *et al*., 2010). V rámci tohoto projektu bylo dosaženo vysoké hodnoty coverage 140x, sestavením jednotlivých čtení se podařilo získat 15 111 kontigů tvořících 6 898 scaffoldů. Celková velikost genomu byla odhadnuta na 120 Mbp, tato hodnota je více než čtyřikrát větší než velikost genomu průměrného zástupce vřeckovýtrusých hub. Na základě anotace genomu bylo nalezeno 5 854 genů, tato hodnota je v porovnání se studovanými houbovými genomy podprůměrná. Srovnáním s genomem kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že u druhu *Blumeria graminis* chybí geny kódující rozmanité proteiny zapojené do regulace různých procesů a drah, jako např. anaerobní fermentace, biosyntéza glycerolu z meziproduktů glykolýzy nebo asimilace dusíku z anorganických sloučenin. Dále byl biotrofní způsob života dán do souvislosti se ztrátou enzymů zapojených do sekundárního metabolismu. Bioinformatická analýza kontigů odhalila v neposlední řadě také jejich masivní kolonizaci transponovatelnými elementy tvořícími 64 % genomu. Vysoký obsah repetitivní DNA pravděpodobně souvisí s absencí genů zapojených do mechanismu repeticemi-indukovaných bodových mutací (Repeat-Induced Point Mutations, RIPs), které jsou u většiny ostatních zástupců vřeckovýtrusých hub vysoce konzervované a podílí se na inaktivaci repetic. Nejpočetněji zastoupené rodiny byly identifikovány jako retrotransposony bez dlouhých koncových repetic (Long Terminal Repeats, LTRs), u nichž byla zaznamenána rovnoměrná distribuce v genomu. Kompletní data získaná sekvenováním a následnou anotací byla uveřejněna na webových stránkách BluGen konsorcia (the Blumeria Genome Sequencing Consortium) - http://www.blugen.org/.

Dalším krokem zaměřeným tentokrát na padlí travní pšenice byla příprava první genomické BAC knihovny pro tuto hostitelskou formu obsahující 12 288 klonů o průměrné

délce insertu 115 kbp poskytující 7,5násobné pokrytí genomu (Parlange *et al.*, 2011). Sestavené kontigy byly přiřazeny ke krátkým čtením získaným tzv. low-pass sekvenováním genomu technologií 454, jako další zdroj dat posloužilo BES. Velikost genomu Bgt byla odhadnuta na 174 Mbp, z čehož je minimálně 85 % tvořeno repetitivní DNA. Výstupem této studie se stala charakterizace 56 rodin transponovatelných elementů a vytvoření databáze repetic vyskytujících se u druhu *Blumeria graminis*. Podařilo se identifikovat 20 rodin dlouhých rozptýlených elementů (Long Interspersed Nuclear Elements, LINEs), dva SINEs homologní k dříve popsaným elementům nalezeným u Bgh (Rasmussen *et al.*, 1993) a celkem 27 LTR retrotransposonů, z nichž 13 rodin bylo zařazeno do nadrodiny *Gypsy* a devět rodin bylo klasifikováno mezi členy nadrodiny *Copia*. Dále bylo zjištěno, že převažujícím typem repetitivních elementů v genomu Bgt jsou non-LTR retrotransposony ve formě LINEs.

Pokrok, kterého bylo dosaženo ve snaze porozumět padlí travnímu na genetické úrovni, lze aplikovat i v širším měřítku. Využití přístupů komparativní genomiky otevírá další perspektivu ve formě možnosti porovnání získaných poznatků se studiemi zaměřenými na jiné patogenní houby. Na základě dosud osekvenovaných biotrofních patogenů byly odhaleny určité společné rysy zahrnující ztrátu některých skupin genů a větší velikost genomu způsobenou proliferací retrotransposonů. Spanu (2012) vyslovil teorii, podle níž aktivita transposonů představuje pro svého nositele výhodu v podobě zvýšení genetické variability. Díky tomu může docházet ke vzniku a diverzifikaci široké škály efektorových genů, a to i v době, kdy neprobíhá pohlavní rozmnožování.

2.1.5 Interakce s obilovinami

Se strukturou genomu úzce souvisí a částečně se prolíná i objasnění genetické podstaty interakcí mezi hostitelem a patogenem. Na začátku padesátých let minulého století se objevila klíčová teorie popisující tyto vztahy na molekulární úrovni, ze které se vychází dodnes. Flor (1971) formuloval hypotézu nazvanou „gene-for-gene“ (GFG) jako nejjednodušší vysvětlení výsledků získaných studiem dědičnosti patogenity u rzi lnové, *Melampsora Lini* Lév. Podle této hypotézy pro každý gen hostitele způsobující reakci na infekci existuje odpovídající gen zodpovědný za patogenitu parazita. Na základě tohoto konceptu je možné určit hypotetické genotypy hostitele a patogenu bez potřeby přímých genetických studií, a to pouze pozorováním reakce sady tzv. diferenciačních hostitelských variet na různé kmeny patogenů.

Důsledkem těchto pozorování je možnost boje proti patogenům šlechtěním rostlinných kultivarů nesoucích nové geny rezistence. Úskalí tohoto přístupu však spočívá v rychlé adaptaci populace patogenu na nové geny rezistence, proto byla postupem času zaměřena pozornost na klonování a charakterizaci genů avirulence, které by mohly poskytnout základ pro vývoj dlouhodobých strategií ochrany plodin.

Koncept GFG lze aplikovat i na padlí travní, vzhledem k jehož haploidní patogenní fázi jsou možné pouze dva genotypové stavy, a to avirulence, nebo virulence. Pozorovaný fenotyp pak přímo odráží genotyp patogenu, což představuje zjednodušení oproti diploidním druhům, u nichž je nutné dále zjišťovat alelickou konstituci. Aplikaci GFG teorie na případ interakce ječmene s příslušnou hostitelskou formou padlí travního se poprvé věnoval Moseman (1959). Ten se ve své studii zaměřil na geny rezistence ječmene Ml_g a Ml_k, k nimž jsou komplementární geny patogenu V_g a V_k. Hybridizačními pokusy a následným vyhodnocením patogenity pomocí sledování projevů inokulace hostitele byla prokázána nezávislá dědičnost daných genů zodpovědných za virulenci.

Na principu hypotézy GFG byla později založena i řada studií pokoušejících se vystopovat změny v evropské populaci Bgh na genetické úrovni. Konkrétní případ dynamiky vývoje interakcí v systému ječmen-Bgh uvádí McDermott *et* McDonald (1993). Na konci 70. let byl v Československu poprvé zaveden gen rezistence *Mla13*, již v polovině následující dekády pak u patogenu začal převažovat genotyp *Va13* virulentní vůči ječmeni nesoucí tento gen, došlo tedy k rychlému prolomení rezistence. S využitím RAPD markerů byl později potvrzen výskyt identických izolátů i ve Švýcarsku, což podávalo důkaz o šíření spor na velmi dlouhé vzdálenosti (v tomto případě 600 km).

Komplexní poznatky týkající se genetických základů všech známých typů rezistence ječmene vůči padlí travnímu přehledně shrnul Jørgensen (1994). V rámci rasově specifické rezistence uvádí veškeré do té doby známé *Ml* geny ječmene a příslušné geny virulence či avirulence u Bgh. Výčet zahrnuje 28 genů rezistence nacházejících se na lokuse *Mla* chromosomu 5 ječmene nebo v jeho blízkosti, které jsou označeny jako *Mla1* až *Mla31*. Na stejném chromosomu bylo kromě toho zamapováno pět dalších lokusů včetně *Mlk*, dva lokusy byly identifikovány na chromosomu 4 a po jednom lokuse na chromosomech 2 a 6. Celkem byla tedy popsána sestava 85 genů rezistence s odlišnou rasovou specificitou na 10 zamapovaných lokusech. Přítomnost genu rezistence a odpovídajícího genu avirulence vede k tzv. inkompatibilní interakci, při níž dochází k potlačení infekce. Naopak setkáním náchylného hostitele a virulentního izolátu propuká infekce a dochází ke kompatibilní

interakci. Fenotyp inkompatibilní interakce mezi linií ječmene s rasově specifickým genem rezistence a izolátem padlí travního s odpovídajícím genem avirulence je konečným důsledkem celé řady dosud málo objasněných procesů. Podle modelu elicitor-receptor produkt genu avirulence, tzv. elicitor, interaguje s receptorem, který je produktem genu rezistence. Pokud je elicitor rozpoznán receptorem, dojde k aktivaci genů hostitele zapojených do obranné reakce, jejímž důsledkem je programovaná buněčná smrt postižených hostitelských buněk známá jako tzv. hypersensitivní odpověď, která zabraňuje šíření infekce. Snahou parazita je tedy vyhnout se rozpoznání zprostředkovaným geny rezistence hostitele, čehož lze docílit změnou příslušného genu avirulence.

V souvislosti s různými typy rezistencí vyskytujících se v systému ječmen-Bgh je nutné zmínit trvalou, širokospektrální, rasově nespecifickou rezistenci zprostředkovanou recesivními *mlo* alelami, která nastává v důsledku mutace na lokuse Mlo vedoucí ke ztrátě jeho funkce. Jedná se o výjimečný typ dědičné rezistence vůči všem známým izolátům Bgh, z čehož vyplývá, že odstartování obranné reakce je nezávislé na přítomnosti genů avirulence (Freialdenhoven *et al*., 1996). Komerční odrůdy jarního ječmene nesoucí mutované *mlo* alely byly pěstovány od roku 1979 a tato rezistence si dlouhodobě zachovávala vysokou efektivitu, díky čemuž se stala nejhojněji využívanou rezistencí v Evropě (Lyngjær *et al*., 2000). Vzhledem k rychlosti adaptace tohoto patogenu a jeho schopnostem překonávat obranné mechanismy hostitele je však žádoucí pokračovat ve studiu této problematiky a hledat alternativní prostředky ochrany ječmene pro případ, že by byla rezistence zprostředkovaná *mlo* alelami v budoucnu prolomena. Proto byla i nadále věnována pozornost rasově specifické rezistenci a zejména genům avirulence, jejichž izolace by umožnila nahlédnout do molekulární podstaty vztahů, které se odehrávají mezi padlí travním a jeho hostitelem.

Brown *et* Jessop (1995) sledovali segregaci devíti genů avirulence u potomstva křížení izolátů Bgh CC107 x DH14 a CC138 x DH14, jedním z výsledků bylo odhalení vazby mezi geny Avr_{a10} a Avr_{k}, které později zaujaly klíčovou roli v pracích věnovaných této problematice. To bylo následně potvrzeno i podobně koncipovanou studií, v níž Caffier *et al*. (1996) na základě analýzy kříženců CC52 x DH14 uvádí odhalení jediné vazebné skupiny obsahující geny Avr_{a9}, Avr_{a10}, Avr_{a22}, Avr_{k1} a Avr_{a13}. Dalším významným krokem bylo sestavení genetické mapy Bgh obsahující celkem 359 lokusů, z nichž většinu tvořily AFLP a RFLP markery spolu s ESTs (Pedersen *et al*., 2002b). V rámci vzniklé mapy bylo identifikováno 34 vazebných skupin pokrývajících celkovou vzdálenost 2114 cM. Zamapováno bylo i sedm genů avirulence, z nichž pět se nacházelo v těsné vazbě a tvořilo

skupiny po dvou (*Avr*$_{a2}$, *Avr*$_{a3}$), respektive tří genech (*Avr*$_{a10}$, *Avr*$_{a22}$, *Avr*$_{k1}$), zbývající dva geny (*Avr*$_{a6}$, *Avr*$_{a7}$) byly lokalizovány odděleně. Tato genetická mapa založená na populaci potomstva izolátů C15 a JEH31 byla zhotovena jako základ pro poziční klonování genů avirulence, celogenomový sekvenační projekt a studium syntenie s jinými houbovými organismy.

Vzhledem k možnosti kontrolovaných křížení a převažující haploidní fázi v životním cyklu je padlí travní relativně vhodným objektem pro uplatnění přístupu pozičního klonování genů. Prvními geny avirulence u Bgh, které se podařilo izolovat, se staly *Avr*$_{a10}$ a *Avr*$_{k1}$, jejichž přítomnost u patogenu indukuje rezistenci u linií ječmene nesoucích geny *Mlk1* a *Mla10* (Ridout *et al*., 2006). Při klonování těchto genů se vycházelo z potomstva křížení izolátů DH14 x CC52 a DH14 x CC148, k dispozici byla BAC knihovna připravená z izolátu DH14. Bylo zjištěno, že produkty studovaných genů postrádají signální peptid pro sekreci přes endoplazmatické retikulum, čímž se odlišují od již známých proteinů avirulence u jiných hub. Na identifikovaném kandidátním genu *Avr*$_{k1}$ se podařilo prokázat tzv. indukovanou nepřístupnost. Jedná se o rys typický pro tento patogen, při němž dochází k jevu, kdy virulentní izolát nemůže napadnout živou hostitelskou buňku, která již byla před tím napadena avirulentním izolátem, případně izolátem jiné hostitelské formy. Dalším překvapivým pozorováním bylo signifikantní zvýšení počtu úspěšně napadených buněk náchylného hostitele virulentním izolátem v přítomnosti AVR$_{k1}$ proteinu, což naznačuje duální funkci identifikovaného genu *Avr*$_{k1}$. Kromě genu avirulence se podle těchto poznatků jedná o efektor zvyšujícího účinnost infekce při kompatibilních interakcích v nepřítomnosti příslušného genu rezistence. Druhý gen, *Avr*$_{a10}$, byl popsán jako paralog *Avr*$_{k1}$ nacházející se ve vzdálenosti 7,5 kbp a rovněž u něj byla odhalena dvojí funkce elicitoru a efektoru. Hybridizace s BAC klony spolu s porovnáním s dostupnými sekvencemi v databázi GenBank vedla ke zjištění, že popsané geny patří do velké genové rodiny zahrnující více než 30 paralogů vyskytujících se v genomu Bgh, jejichž homologní sekvence jsou přítomné i v jiných hostitelských formách. Toto odhalení by v případě vzájemné zastupitelnosti jednotlivých paralogů naznačovalo možnost rychlého překonávání genů rezistence hostitele pomocí vysokého počtu různých, avšak navzájem příbuzných AVR efektorů, mezi nimiž probíhá neustálá selekce. Potvrzení této teorie by však vyžadovalo izolaci většího počtu různých genů avirulence. Dalším významným poznatkem této práce byla lokalizace paralogů rodiny *Avr*$_{k1}$ v blízkosti retrotransposonů, tato fyzická asociace a její možné důsledky byly podrobně rozvedeny později.

Na poznatky dosažené klonováním prvních dvou genů avirulence u Bgh navázali Sacristan *et al*. (2009), kteří popisují rozsáhlou kolonizaci genomu Avr_{k1} genovou rodinou. Na základě genomické sekvence bylo algoritmem BLAST odhaleno 1 145 paralogů Avr_{k1}, které byly následně podrobeny analýze fylogenetické diverzity. Vyhledáváním v databázi EMBL/GenBank bylo ověřeno, že tato genová rodina je specifická pro padlí. Bližším studiem daných paralogů se podařilo detekovat přítomnost diverzifikovaných oblastí, které jsou pravděpodobně předmětem rychlé evoluce a mohly by být tedy zapojeny do procesu adaptace souvisejícího se snahou vyhnout se rozpoznání geny rezistence. Naopak u silně konzervativních oblastí se dá očekávat existence purifikující selekce působící proti mutacím pro zajištění funkčnosti kódovaných proteinů. Autoři dále vyslovují hypotézu o koevoluci této genové rodiny s TE1a retrotransposony ze skupiny LINEs, podle níž ze vzájemné asociace těží obě zúčastněné strany. Pro patogen představuje mechanismus amplifikace a diverzifikace efektorových genů, což přispívá k jeho adaptaci a tím i zvyšování fitness, retroelementy jsou na oplátku udržovány v genomu díky pozitivní selekci na hojně se vyskytující efektorové geny. Podložením této teorie bylo kromě porovnání fylogeneze obou skupin sekvencí také zjištění, že nadpoloviční většina Avr_{k1} paralogů se vyskytuje společně v jednom otevřeném čtecím rámci s TE1a elementy, případně se nachází v přilehlé oblasti stejného kontigu. Jedná se o první prokázaný případ koevoluce mezi efektory a retrotransposony, který nabízí nový pohled na patogenitu a specializaci u parazitů.

Dalšími geny avirulence, které se dostaly do centra pozornosti, byly Avr_{a22} a Avr_{a12}. Skamnioti *et al*. (2008) popisují jejich genetické a fyzické mapování spojené s hledáním dostatečně blízkých hraničních markerů umožňujících izolaci těchto genů. V případě Avr_{a12} se podařilo získat markery mapující pouze z jedné strany genu, z čehož lze usoudit, že tento gen se nachází v blízkosti konce chromosomu. Práce dále shrnuje všechny do té doby publikované výsledky týkající se segregace a vazby mezi známými geny avirulence.

Významným milníkem pro studium interakcí padlí travního a jeho hostitelů se stalo již zmíněné celogenomové sekvenování izolátu DH14 (Spanu *et al*., 2010). Kromě nalezení více než 1 350 paralogů známých genů avirulence bylo popsáno 248 kandidátních sekretovaných efektorových proteinů (Candidates for Secreted Effector Proteins, CSEPs) vyznačujících se přítomností signálního peptidu a absencí transmembránové domény, z nichž většina byla popsána výhradně u tohoto druhu. Analýzou genové exprese bylo dále zjištěno, že většina těchto kandidátních efektorů je transkribována preferenčně v haustoriích, což naznačuje jejich možnou roli v biotrofní patogenezi. Existence proteinů predikovaných na základě manuální

anotace *ab initio* byla následně experimentálně ověřována nezávislou proteogenomickou analýzou provedenou pomocí technik hmotnostní spektrometrie, díky nimž se podařilo identifikovat 24 % předpovězeného proteomu. Porovnáním proteomů haustorií a sporulujících hyf bylo objeveno 71 sekretovaných proteinů přítomných výhradně v haustoriích, z nichž u většiny nebyla nalezena žádná homologie v proteinových databázích. Tyto proteiny s dosud neobjasněnou funkcí by mohly být potenciálními efektory zapojenými do specifických interakcí patogenu a hostitele (Bindschedler *et al*., 2011). Jejich porovnání s kandidátními efektorovými proteiny popsanými na základě genomické sekvence (Spanu *et al*., 2010) odhalilo, že 43 proteinů z celkových 71 se vyskytuje rovněž mezi těmito bioinformaticky predikovanými efektory.

Novým příspěvkem rozšiřujícím naše znalosti o kandidátních efektorových proteinech je studie, v rámci níž se Pedersen *et al.* (2012) pokusili o sestavení globálního přehledu CSEPs vyskytujících se v genomu, transkriptomu a proteomu padlí travního. Předmětem této komplexně pojaté práce byla vedle analýzy predikované struktury a možných funkcí všech známých CSEPs také snaha o objasnění selekce podílející se na jejich diverzifikaci. Na základě manuální anotace dostupné genomické sekvence bylo identifikováno celkem 491 CSEPs, z nichž 407 bylo seskupeno do 72 různých rodin. Tyto hodnoty tvoří více než 7 % celkového počtu proteinů kódovaných v genomu Bgh. Za pozornost stojí zjištění, že vyhledávání známých proteinových domén v jejich aminokyselinových sekvencích vedlo u 54 CSEPs k odhalení příbuznosti s extracelulárními ribonukleasami, absence aktivních míst však naznačuje ztrátu ribonukleasové aktivity. Překvapujícím odhalením byl fakt, že mnohé CSEPs se od sebe odlišují výrazněji v sekvencích exonů než v nekódujících oblastech. V souvislosti s tímto objevem byly nalezeny důkazy podporující hypotézu diverzifikující selekce u 18 rodin CSEP. V návaznosti na získané poznatky byly veškeré popsané rodiny zahrnující CSEPs rozděleny do dvou jasně oddělených skupin. První z nich obsahuje kratší proteiny s převažující expresí v haustoriích a pozitivní diverzifikující selekcí, zatímco do druhé skupiny byly zařazeny delší proteiny vyznačující se slabšími důkazy o tkáňově specifické expresi a předchozím zmíněném typu selekce. Zjištěná početnost všech rodin CSEP naznačuje časté genové duplikace, k nimž docházelo v průběhu evoluce genomu. Studium distribuce paralogů CSEP v rámci genomu ukazuje, že 82 % genů se vyskytuje v klastrech zahrnujících členy jedné rodiny, které se nachází na jednotlivých sekvenčních „scaffoldech“. Často pozorovaným jevem bylo rovněž obklopení CSEP genů oblastmi obsahujícími repetitivní

DNA, která se mohla podílet na vzniku lokálních duplikací mechanismem nerovnoměrného crossing-overu.

Zhang *et al.* (2012) se zaměřili na kandidátní efektorový protein CSEP005 a pomocí kvasinkového dvouhybridového systému a hostitelem indukovaného umlčování genů prokázali, že se skutečně jedná o efektor podílející se na potlačení obranných mechanismů hostitele. Dále byla prokázána jeho interakce s některými členy rodin proteinů zapojených do patogeneze u ječmene (Pathogenesis-Related Proteins, PR), a to konkrétně PR1 a PR17.

Navzdory dlouhodobému úsilí věnovanému problematice interakcí mezi hostitelem a patogenem v rámci modelového systému ječmen-Bgh a řadě teorií, které byly v souvislosti s novými objevy vysloveny, v této oblasti výzkumu stále zůstává řada otázek a nejasností vyžadujících další studium. V návaznosti na pořádané mezinárodní workshopy zaměřené na padlí travní lze očekávat, že v budoucnu bude hlavní úsilí směřováno především na padlí travní pšenice, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, u nějž se předpokládá získaní kvalitnější genomické sekvence díky spolehlivosti scaffoldů sestavených na základě nové BAC knihovny (Parlange *et al*., 2011). Pozornost bude stále ve velké míře věnována kandidátním efektorům, počítá se rovněž s resekvenováním dalších izolátů padlí travního pocházejících z kulturně pěstovaných i planě rostoucích hostitelů. Jedním z resekvenovaných izolátů má být i Bgh částečně virulentní vůči jinak velmi rezistentnímu ječmeni nesoucímu *mlo* genotyp. Výzvou zůstává samozřejmě i klonování dalších genů avirulence a kromě toho také sestavení spolehlivého transformačního protokolu (Spanu *et* Panstruga, 2012).

2.2 Vybrané typy DNA markerů

Markery založené na polymorfismu v DNA sekvenci jsou účinným nástrojem využívaným pro celou řadu přístupů uplatňovaných např. ve šlechtitelské praxi, při genetickém i fyzickém mapování genomu, pozičním klonování genů a v neposlední řadě taktéž pro určování genetických vzdáleností na různých taxonomickým úrovních, z čehož lze následně čerpat při rekonstrukci fylogenetických vztahů a studiu genetické diverzity. Problematika markerů je velmi široká a byla jí již věnována řada publikací, proto není cílem této rešerše obsáhnout veškeré známé poznatky, ale zaměřuje se pouze na dva vybrané typy markerů významné pro tuto práci, a to konkrétně na mikrosatelity (Simple Sequence Repeats, SSRs) spolu s markery založenými na rozhraní mezi transposony a okolními DNA sekvencemi.

2.2.1 Mikrosatelity

Mikrosatelitové lokusy jsou úseky DNA složené z 1 – 6 bp dlouhých, tandemově se opakujících sekvenčních motivů, jejichž charakteristickým znakem je častý výskyt různých alel lišících se v počtu jednotek repetice. Tyto alely se vyznačují mendelovskou dědičností a lze je snadno skórovat pomocí PCR a elektroforetické separace, což činí z mikrosatelitů velmi výhodný typ kodominantních DNA markerů. Mezi jejich další podstatné přednosti patří mimo jiné i převažující selekční neutralita (Queller *et al*., 1993).

Mikrosatelity tvoří jednu z typických, hojně zastoupených složek eukaryotního genomu, která se nachází převážně v nekódujících, ale i kódujících oblastech. Tautz *et* Renz (1984) prokázali výskyt jednoduchých repetic v genomech pěti fylogeneticky velmi vzdálených eukaryotních druhů. Ke vzniku délkového polymorfismu způsobeného změnou v počtu tandemově se opakujících jednotek dochází primárně během replikace DNA v důsledku jevu známého jako „slippage“, jehož studiu při *in vitro* amplifikaci se věnovali Schlötterer *et* Tautz (1992). Vzhledem k četnosti tohoto jevu mohou být mikrosatelitové lokusy extrémně polymorfní i mezi různými jedinci téhož druhu, čehož se hojně využívá např. při zjišťování příbuzenských vztahů v rámci různých populací. Vznik těchto tandemových repetic však může mít i přirozený význam v evoluci. Tautz *et* Renz (1984) navrhují, že SSRs mohou hrát výraznou roli při vývoji genomu, a to např. umožněním nehomologní rekombinace, v jejímž důsledku může docházet mimo jiné ke zvýšení variability určitých genů. Jedná se tedy o jeden z mechanismů podílejících se na přestavbách a diverzifikaci genomu.

Různé strategie, které lze použít pro získávání SSR markerů, podrobně popisují a porovnávají Zane *et al*. (2002). Jejich odvozování *de novo* kvůli své pracnosti a časové náročnosti představuje hlavní úskalí tohoto typu markerů. Proto se v praxi často objevuje snaha o uplatnění již známých mikrosatelitových markerů i pro blízce příbuzné druhy taxonu, z nějž byly izolovány. Situace se značně zjednodušuje, pokud jsou pro daný organismus v databázích dostupná sekvenační data, v nichž lze SSRs lokusy snadno vyhledat a navrhnout specifické primery pro jejich amplifikaci.

Přestože jsou mikrosatelity považovány za nedílnou součást všech eukaryotních genomů, míra jejich zastoupení a další charakteristiky se mohou poměrně výrazně lišit v závislosti na konkrétním taxonu. Lim *et al.* (2004) se pokusili charakterizovat mikrosatelitové lokusy vyskytující se v říši hub na základě analýzy genomických sekvencí

14 různých druhů dostupných v databázích. Výsledkem bylo zjištění relativního zastoupení mikrosatelitů o různých délkách základního motivu spolu s nejčastějšími motivy v každé délkové skupině. U všech zkoumaných druhů zcela převažovaly mononukleotidové repetice, které tvořily 94 – 99 % všech nalezených mikrosatelitů. Následující místa v relativním zastoupení patřila di- a trinukleotidovým motivům, u delších jednotek pak byl zaznamenán výrazný propad v četnosti výskytu. Dalším zajímavým výsledkem byla negativní korelace mezi obsahem GC bází v genomu a výskytem SSRs. Pokud jde o počet tandemových repetic, 90 % mikrosatelitů bylo zařazeno do třídy s nejmenším počtem jednotek repetice (5 – 7). Relativní zastoupení SSRs o vysokém počtu repetic (20 a více) pozitivně korelovalo s velikostí genomu. Obecně platí, že vzhledem k četnosti výskytu, stupni polymorfismu a relativně snadnému skórování se jako nejvhodnější markery jeví di- a trinukleotidové repetice, s přítomností většího počtu jednotek se pravděpodobnost polymorfismu zvyšuje. Na základě této korelace lze v případě hub očekávat nízký polymorfismus u většiny mikrosatelitů. K potvrzení této hypotézy přispěla následující uvedená studie, v rámci níž bylo prováděno i vyhodnocení polymorfismu nalezených SSRs.

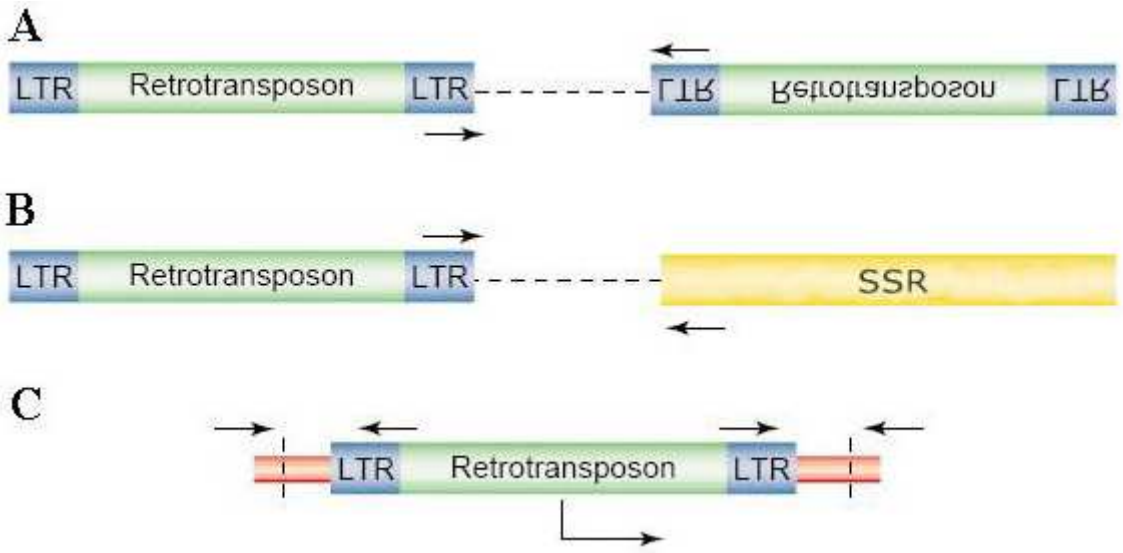
Dutech *et al*. (2007) se zabývali hodnocením mikrosatelitů přítomných v genomu hub v porovnání s genomy jiných organismů. Za tímto účelem bylo provedeno shrnutí již publikovaných i nově odvozených mikrosatelitových markerů z hub a získané výsledky byly srovnány s pěti dalšími fylogenetickými skupinami (krytosemenné rostliny, hmyz, ryby, ptáci, savci). Při *de novo* izolaci mikrosatelitových lokusů z houbových druhů byl zaznamenán nízký výtěžek v porovnání s jinými organismy za použití stejných protokolů. Během procedury odvozování polymorfních markerů byl úbytek v rámci testovaných lokusů rovněž velmi vysoký, v tomto ohledu bylo dosaženo podobných výsledků jako u rostlin, které jsou známy problematickou izolací mikrosatelitových markerů. U některých druhů hub se dokonce nepodařilo nalézt polymorfní lokusy na vnitropopulační úrovni. Dalším problémem byla signifikantně nižší průměrná délka houbových SSR lokusů v porovnání s většinou ostatních fylogenetických skupin, kromě nižšího počtu jednotek repetice byl odhalen i nižší počet alel. Rovněž testování cross-species přenositelnosti markerů u hub nepřineslo pozitivní výsledky. Vzhledem k uvedeným faktorům může být odvozování mikrosatelitových markerů zvláště u některých houbových druhů poměrně problematické, díky svým výrazným přednostem však tento typ markerů zůstává i zde v oblasti zájmu.

2.2.2 Markery založené na transponovatelných elementech

Tento poměrně nový typ markerů využívá rozptýlených repetic tvořících podstatnou část mnoha eukaryotních genomů. Procesem transpozice dochází k náhodným inzercím těchto elementů na různá místa genomu, čímž vznikají unikátní rozhraní mezi nově vloženými TE a okolními sekvencemi. Tato rozhraní pak mohou sloužit jako genomově specifické, jednokopiové markery, jejichž vlastnosti je činí velmi užitečnými zejména pro mapování velkých a komplexních genomů. Využití rozptýlených repetic pro získání specifických markerů popisují Lee *et al.* (1990), kteří ve své studii na hrachu setém prováděli PCR amplifikaci pomocí jednoho primeru navrženého uvnitř určitého retrotransposonu a druhého primeru odvozeného z okolní sekvence, případně z jejího rozhraní s daným elementem. Kromě získání unikátních markerů v rámci genomu je výhodou tohoto přístupu také možnost amplifikace fragmentu o požadované délce. Od té doby vzniklo několik variant markerových systémů vycházejících z TE, jejichž klasifikaci shrnují Kumar *et* Hirochika (2001). Mezi základní skupiny tohoto typu markerů založené na PCR patří Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP), Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) a Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism (RBIP). Společným rysem všech zmíněných systémů je předpoklad výskytu unikátních rozhraní mezi TE, jejich rozdíly spočívající v odlišném přístupu k designu primerů jsou názorně ilustrovány na Obr. 4. IRAP markery vychází z blízkosti LTR různých retrotransposonů nacházejících se ve vzájemně opačné orientaci, díky tomu pro amplifikaci postačuje jediný primer specifický k určité LTR sekvenci (Obr. 4, A). Další přístup, REMAP, detekuje polymorfismus v sekvencích nacházejících se mezi TE a mikrosatelity (Obr. 4, B). RBIP markery se vyznačují dvojicí primerů, z nichž jeden je navržen uvnitř daného TE a druhý v okolní sekvenci, vyhodnocuje tak se přítomnost či absence elementu v určitém místě genomu (Obr. 4, C). Z poslední zmíněné skupiny vychází markery typu Insertion Site-Based Polymorphism, tento pojem poprvé použili Paux *et al.* (2006). Uvedená práce dále členila primery podle jejich pozice ve vztahu k rozhraní repetic, jeden z primerů byl vždy lokalizován v sekvenci retrotransposonu, zatímco druhý se mohl vyskytovat v sekvenci jiného, v blízkosti se vyskytujícího TE nebo v okolní sekvenci. Devos *et al.* (2005) popisují uplatnění techniky Repeat Junction Markers (RJMs), v tomto případě byly primery navrženy tak, aby jeden z nich zahrnoval unikátní rozhraní daného TE s okolní sekvencí nebo jiným elementem a PCR amplifikace tak vedla k získání specifického produktu.

Nevýhodou tohoto typu markerů je nutnost charakterizace použitých transposonů a alespoň částečné znalosti sekvence pro navržení primerů. Tato úskalí jsou však v současnosti značně zredukována díky existenci specializovaných databází repetic pro různé druhy organismů spolu s neustále se zvyšujícím množstvím dostupných sekvenačních dat. V porovnání s mikrosatelity tyto markery disponují menší informativní hodnotou, velmi často jsou dominantní (poskytují pouze data o přítomnosti, nebo absenci určitého elementu na konkrétním místě genomu, Flavell *et al*., 1998). Současným trendem je využití programů vytvořených pro vyhledávání transposonů a automatické navrhování TE-odvozených markerů v kombinaci s cenově dostupnými technikami high-throughput genotypování umožňujícími zvýšení jejich informativní hodnoty díky detekci SNPs (Paux *et al*., 2010).

Přestože se tento typ markerů díky svému obrovskému potenciálu těší v případě rostlin značné oblibě, využití markerů vycházejících z transposonů u hub je dosud velmi sporadické (Web of Knowledge, leden 2013), ačkoliv se genomy řady houbových druhů vyznačují vysokým obsahem TE (Spanu *et al*., 2010).



Obr. 4: Schémata základních strategií návrhu primerů při hledání markerů vycházejících z přítomnosti transponovatelných elementů v genomu

A = IRAP; B = REMAP; C = RBIP. Šipky označují oblasti, z nichž jsou u jednotlivých strategií navrhovány primery. Mikrosatelitové sekvence jsou znázorněny žlutě, červená barva představuje sekvence obklopující retrotransposony (Upraveno podle Kumar *et* Hirochika, 2001).

3 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zaměřuje na ekonomicky významnou patogenní houbu, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Teoretický úvod je koncipován jako shrnutí komplexních poznatků týkajících se tohoto druhu s důrazem kladeným na jeho genom, interakce s obilovinami a dosud publikované studie zabývající se jeho evolucí a diverzitou.

Primárním cílem experimentální části této práce je využít informace získané z literárních zdrojů spolu s dostupnou genomickou sekvencí pro vytvoření genotypovacího systému umožňujícího molekulární charakterizaci izolátů padlí travního ječmene pocházejících z geograficky limitovaných populací. Další cíl navazující na předchozí výsledky představuje aplikace nově odvozených markerů na soubor izolátů zahrnující českou populaci Bgh z roku 2012 a vybrané izoláty světové populace, interpretace získaných dat ve vztahu ke geografickému původu daných izolátů a zhodnocení navrženého systému markerů z hlediska možností jeho uplatnění při studiu tohoto patogenu.

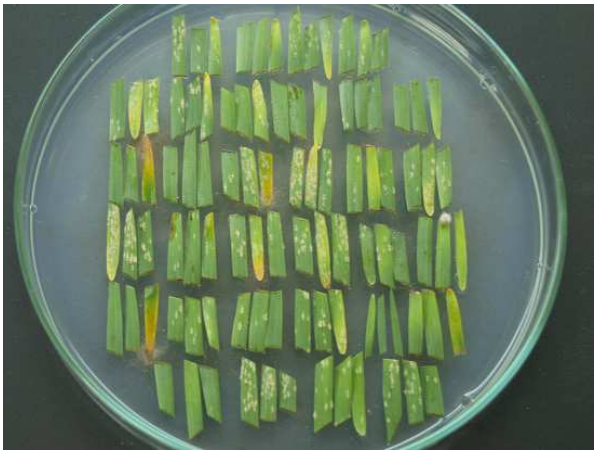
4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

Základním biologickým materiálem použitým pro extrakci DNA byly konidie padlí travního ječmene, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Primární testování markerů bylo prováděno na souboru 14 izolátů Bgh pocházejících převážně z odchytu na různých lokalitách ČR v roce 2010, jejichž seznam spolu s původem je uveden v Tab. I. Tyto izoláty byly využity pouze za účelem nalezení polymorfních markerů a nebyly součástí souboru, který byl následně podroben fylogenetické analýze. Jako kontrastní vzorek byl zvolen izolát padlí travního pšenice, *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, označený jako Tm258. Uvedených 15 izolátů bylo analyzováno již v rámci pilotní studie, která byla předmětem bakalářské práce, na niž tato diplomová práce navazuje (Komínková, 2011).

V dalším kroku byl prováděn screening odvozených markerů na sadě 50 izolátů pocházejících z Austrálie (Tab. II), 100 izolátů sesbíraných na různých místech České republiky v roce 2012 (Tab. III) a sbírce 11 izolátů s rozličným geografickým původem zahrnujícím lokality v Evropě, Africe, Asii, Austrálii a Jižní Americe (Tab. IV).

Veškerý biologický materiál spolu s průvodními informacemi charakterizujícími jednotlivé izoláty byl laskavě poskytnut Doc. Ing. Antonínem Dreiseitlem, CSc. ze Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži. Vzorky byly získávány odchytem konidií ze vzduchu následovaným jejich kultivací a množením na segmentech listů náchylného kultivaru ječmene umístěných na Petriho miskách s agarem. Podrobný postup manipulace s tímto patogenem popisuje Dreiseitl (2004), způsob kultivace je znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5: Ukázka kultivace padlí travního na listových segmentech v laboratorních podmínkách (Fotografii laskavě poskytnul doc. Ing. Antonín Dreiseitl, Csc.)

Tab. I: Seznam izolátů Bgh použitých k testování navržených markerů

Uvedené izoláty nebyly předmětem studia evolučních vztahů.

Patotyp	**Původ**	**Datum sběru**
3775	Odchyt z úseku Praha-Ejpovice	4.6.2009
4517	Odchyt z úseku Brno-Břeclav	28.5.2009
4553	Odchyt z úseku Praha-Chlumec n. Cidlinou	4.6.2009
5725	Odchyt z úseku Praha-Lovosice	4.6.2009
5771	Odchyt z úseku Praha-Ejpovice	4.6.2009
5774	Odchyt z úseku čerpací stanice Avanti-Praha	4.6.2009
7455	Odchyt z úseku Praha-Lovosice	4.6.2009
0020	Sběr v Jihoafrické republice	23.9.2004
0422	Sběr v Jihoafrické republice	23.9.2007
1765	Odchyt z úseku čerpací stanice Avanti-Praha	4.6.2009
4114	Odchyt z úseku čerpací stanice Avanti-Praha	4.6.2009
4773	Odchyt z úseku Kroměříž-Brno	28.5.2009
5775	Odchyt z úseku Praha-Řevničov	4.6.2009
7555	Odchyt z úseku Praha-Lovosice	4.6.2009

Tab. II: Seznam izolátů Bgh pocházejících z Austrálie a jejich původ (Dreisetil *et al*., 2013)

Izoláty	**Lokalita sběru**	**Stát**	**Datum sběru**
501, 504, 506	Toowoomba	Queensland	7.9.2011
507, 508, 512, 514	Tamworth	New South Wales	15.9.2011
518, 519, 520, 521, 522	Turretfield	South Australia	N/A
534	Horsham	Victoria	14.9.2011
537, 539	Toowoomba	Queensland	7.9.2011
541	Gatton	Queensland	7.9.2011
544, 548, 550	Tamworth	New South Wales	15.9.2011
553	Turretfield	South Australia	N/A
559, 561, 566, 569	Horsham	Victoria	14.9.2011
575, 576	Tamworth	New South Wales	15.9.2011
591, 594, 600, 605, 606, 607	Field	Tasmania	N/A
616, 618, 620, 643, 648	Perth	Western Australia	5.10.2011
654	Toowoomba	Queensland	7.9.2011
655	Tamworth	New South Wales	15.9.2011
680, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 689, 690	Wagga Wagga	New South Wales	13.10.2011
692	Field	Tasmania	N/A
693	Gatton	Queensland	5.9.2011

Tab. III: Seznam izolátů Bgh pocházejících z České republiky (sběr 2012)

Geografický původ daných izolátů je přehledně znázorněn na Obr. 10 (viz Výsledky, str. 59). Odchyt spor nebyl prováděn rovnoměrně po celé ČR, ale pouze v hlavních oblastech pěstování ječmene.

Izoláty	**Úsek odchytu**	**Datum sběru**
A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12	Kroměříž - Vyškov; Kroměříž - Brno	24 - 26.5.2012
B1, B2, B3, B4, B5, B6	Brno - Lechovice	25.5.2012
C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12	Brno - Břeclav	25.5.2012
D1, D2, D3, D4, D5	Vyškov - Olomouc - Přáslavice	24.5.2012
E1, E2, E3, E4, E5, E6, E9, E13, E14, E16, E19, E20, E25, E34, E37	Přáslavice - Ostrava Vítkovice - Mankovice - Velká Bystřice	24.5.2012
F1, F2, F3	Olomouc - Zábřeh na Moravě	24.5.2012
I2, I4, I11, I16, I21, I24, I25, I26, I27, I28, I30, I31, I32, I33, I36	Dálnice D1 90. km - Praha - Stodůlky	25., 26.5.2012
L1, L2	Praha Stodůlky - Karlovy Vary	26.5.2012
M1, M2, M3, M4, M5, M6	Praha - Teplice - Lovosice	25.5.2012
N1, N2, N3, N4, N5, N6	Praha - Mladá Boleslav - Březina	25.5.2012
O1, O2, O3	Praha - Hradec Králové - Chlumec n.Cidlinou	25.5.2012
X1, X2, X3, X5, X7, X10, X11, X15, X16, X19, X24, X25, X26, X28, X34	Brno - dálnice D1 90. km - 199. km	25., 26.5.2012

Tab. IV: Celosvětová sbírka Bgh a původ jednotlivých izolátů

Patotyp	**Označení izolátu**	**Původ**	**Datum sběru**
0004	3-33/03	Sběr v Yancheng, Čína	13.5.2003
0020	65/04	Sběr v Jihoafrické republice	23.9.2004
0022	655/11_N	Sběr v Tamworth, Austrálie	15.9.2011
0023	290/10	Sběr v Breeza, Queensland, Austrálie	16.9.2010
0061	54/05	Sběr v Bizcocho, Uruguay	7.10.2005
0422	4/20(C20)/07	Sběr v Jihoafrické republice	23.9.2007
1044	Race I	Japonsko	30.11.1998
7377	63-1/97	Expozice "Pallas" v poli, Kroměříž	6.6.1997
7515	X 30/12	Odchyt v úseku D1 95. km - Brno	26.5.2012
-	H-148	Sběr v Izraeli (Dreiseitl *et al.*, 2006)	26.3.2001
-	Y-069	Sběr v Izraeli (Dreiseitl *et al.*, 2006)	26.3.2001

4.2 Metodika

Metodika aplikovaná v této práci je kombinací bioinformatické analýzy dat využívající dostupné databáze a softwarové nástroje s klasickými experimentálními metodami molekulární biologie zahrnujícími extrakci DNA s následnou purifikací fenolem a chloroformem, polymerázovou řetězovou reakci (Mullis *et al*., 1986), elektroforetickou separaci v polyakrylamidovém gelu a sekvenování Sangerovou metodou (Sanger *et al*., 1977).

4.2.1 Navrhování primerů

Na základě dostupných literárních zdrojů byly pro účely této studie zvoleny dva zdroje DNA markerů, a to mikrosatelity a retrotransposony. Design markerů byl založen na znalosti genomické sekvence Bgh kmene DH14, která je volně přístupná na webových stránkách BluGen konsorcia - http://www.blugen.org/. U obou přístupů bylo výsledkem navržení sady primerů a jejich testování na sadě 15 izolátů uvedených v kapitole 4.1. Nalezené polymorfní markery byly posléze uplatněny při genotypování celého souboru dostupných izolátů Bgh.

4.2.1.1. SSR markery

Náhodně zvolené kontigy o minimální délce 10 kbp byly podrobeny vyhledávání tandemových repetic webovým programem WebSat (Martins *et al*., 2009). Vzhledem k nemožnosti vyhodnocení jednonukleotidových inzercí nebo delecí pomocí PAGE a ke zvyšující se pravděpodobnosti polymorfismu s rostoucím počtem opakování základní jednotky byly předmětem zájmu pouze motivy dlouhé 2 – 6 bp opakující se alespoň 8x. Na základě provedené analýzy bylo vybráno 10 kontigů obsahujících mikrosatelity o požadovaných parametrech, z jejichž přilehlého okolí byly za použití programu Primer3 (Rozen *et* Skaletsky, 2000) navrženy primery tak, aby předpokládaná délka amplifikovaného produktu nepřesáhla 200 bp. Tento limit byl určen s ohledem na detekční schopnosti dostupné elektroforetické aparatury za použití 6% polyakrylamidového gelu. Přehled primerů, které byly popsanou procedurou získány a podrobeny dalšímu testování, je uveden v Tab. V, jejíž součástí je i charakteristika konkrétních tandemových repetic, na něž byly dané primery navrženy.

Tab. V: Seznam navržených SSR primerů

Lokalizace (označení kontigu)	Název primeru	Sekvence primeru (5'->3')	Očekávaná délka amplikonu [bp]	SSR motiv	Marker
000403	Bgh SSR F1 Bgh SSR R1	GTATGGTTTGAGGGGTGGTCTA TTGACATTTTCTACTTCGCCCT	115	(CT)9	*obm21*
000935	Bgh SSR F2 Bgh SSR R2	CCTAGTTTTGTGCACCAGCA GGGTGAAACGGGCTGATAG	150	(GAAAAA)9	*obm22*
001220	Bgh SSR F3 Bgh SSR R3	CGATCGCGTTTACTAGGTCA TCCGGCACTGTAATGTGGTA	108	(AT)19	*obm23*
004927	Bgh SSR F4 Bgh SSR R4	TCATGCCTCTTGGGTTTAGG CTTGAAGCAAGCAATGGACA	129	(ATAC)16	*obm24*
006229	Bgh SSR F5 Bgh SSR R5	CCAATTGGAACTCAACAAATG AACTGAGTTAATGACTGTTGAGGA	88	(AT)11	*obm25*
002485	Bgh SSR F6 Bgh SSR R6	TAGGCAGAGAGGACCTGCAT CCTGTTCTGATCTGCACTCAA	121	(TAA)10	*obm26*
003803	Bgh SSR F7 Bgh SSR R7	AGCAATAGCATCTTCAGTTTTGA CATGTCCTTACATAGTCGCAGA	97	(GT)9	*obm27*
004468	Bgh SSR F8 Bgh SSR R8	GGCGTGACTGCGGTAACTAT CGAGTCGAAGAACTGGATCG	78	(CA)9	*obm28*
005093	Bgh SSR F9 Bgh SSR R9	GAGGAGCCCAATGTGCTAGA AGGATACAGGGAGGATTCAGG	105	(CACT)9	*obm29*
005649	Bgh SSR F10 Bgh SSR R10	TGGAGAGAGAATTCCTCAATCTAAA TTCAGGTCACAGGGAGAATCTT	98	(AT)10	*obm30*

4.2.1.2. Markery typu ISBP/RJM

Prvním krokem při odvozování RJMs založených na inzerčním místě TE bylo vyhledávání retrotransposonů v genomické sekvenci Bgh s využitím algoritmu BLASTN (Altschul *et al*., 1990) a knihovny repetitic pro druh *Blumeria graminis* uveřejněných v databázi Repbase (Jurka *et* Kohany, 2011; Spanu *et al*., 2010) dostupné na http://www.girinst.org. K další analýze bylo náhodně zvoleno deset kontigů obsahujících homologní sekvence k retrotransposonům nadrodin *Copia* a *Gypsy*, u nalezených elementů byly posléze vymezeny LTR oblasti spolu s unikátní pěticí nukleotidů tvořící duplikaci cílového místa (Target Site Duplication, TSD) a pro každý kontig byly na rozhraní daného elementu s okolními sekvencemi navrženy dva páry primerů metodou RJM, z nichž jeden byl vždy komplementární ke specifické TSD sekvenci, druhý primer se pak nacházel v oblasti LTR, případně v sekvenci obklopující daný retrotransposon. Umístění primerů bylo zvoleno s ohledem na žádoucí délku výsledného produktu PCR v rozmezí 450 – 650 bp, tento rozsah umožňoval sekvenování celého amplikonu a vyhledávání SNP polymorfismů v případě

absence délkového nebo „presence/absence variation“ (PAV) polymorfismu po separaci pomocí na PAGE. Souhrn všech testovaných primerů je uveden v Tab. VI.

Tab. VI: Seznam navržených ISBP/RJM primerů

Lokalizace (označení kontigu)	Název primeru	Sekvence primeru (5'->3')	Očekávaná délka amplikonu [bp]	Marker
000430	Bgh Copia1 F1	GCATTGAAAGTGCTGGGAAT	533	*obm1*
	Bgh Copia1 R1	GTTCTTGCCGGTGACTGATT		
	Bgh Copia1 F2	CGCCATCTAGGCATAGAAAAA	609	*obm2*
	Bgh Copia1 R2	TTATATTCCCAGCACTTTCAATG		
002314	Bgh Copia2 F1	CACAATCCAAAGATATGTTGAAGG	565	*obm3*
	Bgh Copia2 R1	CTGCATCGAGACTTTCAGCA		
	Bgh Copia2 F2	TCCAGTTGTGTTCTCTCTTCCTC	545	*obm4*
	Bgh Copia2 R2	TCATACCCTTCAACATATCTTTGG		
001302	Bgh Copia8 F1	GAACTTGGAGAGCAGCCAAC	526	*obm5*
	Bgh Copia8 R1	CCTGTCAACACTTGGCGTGT		
	Bgh Copia8 F2	GGAACCAACACCAAGACGAT	599	*obm6*
	Bgh Copia8 R2	ACCTGAACCCAATCCAGTCA		
007064	Bgh Copia6 F1	CCATGATGTTGTGTTAGACACTTAG	562	*obm7*
	Bgh Copia6 R1	CATCAAAATTGGCTTCGACA		
	Bgh Copia6 F2	CTTCCATGGAGTTTTGGTTGA	525	*obm8*
	Bgh Copia6 R2	CCCTAAGTGTCTAACACAACATCA		
003729	Bgh Copia13 F1	TGTCTTATCTTGTGTTGTGACTGG	537	*obm9*
	Bgh Copia13 R1	TTGAGAGCTTGTGCATGTTTG		
	Bgh Copia13 F2	CCCAGACATTTCCCTAGCTG	560	*obm10*
	Bgh Copia13 R2	TGCCAGTCACAACACAAGAT		
003457	Bgh Gypsy3 F1	CAAGTATGCCTGGATGTAACAG	557	*obm11*
	Bgh Gypsy3 R1	AGCCCTAGTGAAGTGGGCTA		
	Bgh Gypsy3 F2	CTAGCCGTCACACTGGATGA	579	*obm12*
	Bgh Gypsy3 R2	GCGCCTACTCTGATGAGTCC		
001347	Bgh Gypsy5 F1	AATTCTCCGCTATTGTGACG	525	*obm13*
	Bgh Gypsy5 R1	TTCACCTTTCTGGCAAGTCA		
	Bgh Gypsy5 F2	TCATTAAACTCTTACAGCTATGTCAAA	533	*obm14*
	Bgh Gypsy5 R2	CATGCCTTCATCATCCACTG		
002916	Bgh Gypsy15 F1	GGGTGACGGTTGCCTAGTAA	470	*obm15*
	Bgh Gypsy15 R1	CACCGTGACACGTGGTTATC		
	Bgh Gypsy15 F2	TGCTCGATAACCACGTGTC	573	*obm16*
	Bgh Gypsy15 R2	GTAGCGGAAAGGGATGATGA		
003563	Bgh Gypsy16 F1	CCGTGAATACCTGTGACAGAA	575	*obm17*
	Bgh Gypsy16 R1	TTGATGTTGATGGCGAAGAA		
	Bgh Gypsy16 F2	GGTCAAACCGTAACAATACCC	497	*obm18*
	Bgh Gypsy16 R2	TGGGCCTGATCACAACAGTA		
007186	Bgh Gypsy18 F1	TTCCCTACTGTCAGGGCTCTC	534	*obm19*
	Bgh Gypsy18 R1	TAAATCCCTCCGAACCGAAT		
	Bgh Gypsy18 F2	AGTCCGTGACACCTACTCAGG	524	*obm20*
	Bgh Gypsy18 R2	TGAGGCTTGGGTAGAAGTCAA		

4.2.2 Extrakce a purifikace DNA

Výchozím materiálem pro extrakci DNA byly konidiospory Bgh uchovávané při teplotě -80°C. Množství dostupných spor bylo limitováno jejich pracnou a časově náročnou propagací, v závislosti na konkrétním izolátu se pohybovalo v rozmezí 0,0015 – 0,0200 g.

Před vlastní extrakcí bylo pro zvýšení výtěžku DNA nutné provést narušení buněčných stěn spor, k čemuž byly použity dva odlišné přístupy. Spory izolátů pocházejících z Austrálie byly podrobeny mechanické homogenizaci o délce 1 min při 27 Hz v homogenizátoru MM 301 (Retsch, Německo) se dvěma skleněnými kuličkami o průměru 5 mm. Vzhledem k nestabilitě použitého biologického materiálu a značnému stupni degradace DNA, k níž během tohoto procesu docházelo, však byl popsaný postup u izolátů sesbíraných v ČR během sezóny 2012 nahrazen šetrnější enzymatickou degradací buněčných stěn, použití tohoto přístupu popisují Parlange *et al.* (2011). Dané množství spor bylo rozsuspendováno ve 150 µl roztoku obsahujícího 10 mg/ml směsi lyzačních enzymů získaných z houby *Trichoderma harzianum* (Glucanex®; Sigma-Aldrich, USA), 1 % Tritonu™ X-100 (Sigma-Aldrich, USA), 4 % β-merkaptoethanolu (Sigma-Aldrich) a 50 mmol/l kyseliny ethylendiamintetraoctové (Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA) o pH 5,6. Suspenze byla následně inkubována 2 hod při 37°C, během této doby bylo promíchání zopakováno.

Ke vzniklým sféroplastům bylo po uplynutí dané doby přidáno 100 µl lyzačního pufru, jehož základem je Basic Lysis Buffer (500 mmol/l chloridu sodného, 100 mmol/l tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu – Tris base, 50 mmol/l EDTA, pH 8,0) 0,02 % dodecylsíranu sodného (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS; Serva, Německo), 0,5 % w/v kyseliny L-askorbové (Sigma-Aldrich), 0,03 % w/v proteinasy K (Roche Diagnostics, Švýcarsko) a 4 % β-merkaptoethanolu. Vlastní lyze probíhala po dobu 45 min při 65°C, po ní pak následovala purifikace fenolem a chloroformem. K lyzátu bylo nejdříve přidáno stejné množství (250 µl) fenolu (pH 8,0), po důkladném protřepání a centrifugaci v chlazené centrifuze Jouan GR 20-22 s rotorem AG 2,20 (Thermo, USA) o délce 5 min při 10 000 g a 4°C byla vodná fáze odebrána a smíchána s 250 µl směsi chloroformu a izoamylalkoholu (24:1). Po opětovné centrifugaci po dobu 3 min byla vodná fáze opět odebrána a předcházející krok byl zopakován. Po provedení dvojí purifikace chloroformem bylo k přečištěnému lyzátu přidáno 20 µl octanu sodného (3 mol/l, pH 5,2) a 160 µl vychlazeného isopropanolu. Vysrážená DNA byla centrifugována 5 min, poté byl supernatant odstraněn a zbytky organických rozpouštědel a solí byly vymyty přídavkem 70% ethanolu a opětovnou centrifugací. Pro rychlejší vysušení extrahované DNA byl pelet promyt a centrifugován s 96%

ethanolem, následovalo sušení 15 min při 50 °C. Získaná DNA byla rozpuštěna ve 20 µl redestilované vody a inkubována 20 min při 37°C s 1 µl ribonukleasy A (10 mg/ml).

Množství DNA v každém vzorku bylo orientačně změřeno na fluorometru (Turner BioSystems, USA) za použití fluorescenčního barviva PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent (Molecular Probes, Inc., USA) dle postupu doporučeného výrobcem. Výtěžek extrakce se pohyboval v rozmezí 1 – 30 ng/µl v závislosti na výchozím množství spor a konkrétním izolátu, rozdíly v koncentraci DNA u jednotlivých vzorků byly vyrovnány ředěním. DNA byla poté uchovávána při teplotě -20°C.

U náhodně vybraných vzorků byl sledován rovněž stupeň degradace vyextrahované DNA pomocí elektroforetické separace v 1% agarosovém gelu (Serva, Německo) připraveném v 0,5x TBE pufru (0,54 % Tris base, 0,275 % kyseliny borité, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0). Jako nanášecí pufr byl použit roztok 6x Stop C (100 mmol/l EDTA, 1 % SDS, 0,05 % bromfenolové modři, 0,05 % xylenecyanolu, 42,5 % glycerolu), který byl smíchán se vzorkem v poměru 1:5. Horizontální elektroforéza probíhala v elektroforetické komůrce Owl B2 (Thermo Scientific, USA) se zdrojem napětí MP – 300 V (Major Science, USA) cca 45 min při 4 V/cm, k vizualizaci bylo použito barvení 0,05% roztokem interkalátoru ethidium bromidu (Sigma-Aldrich) po dobu 20 min. Separovaná DNA byla posléze pozorována pomocí UV transluminátoru a dokumentačního systému pro analýzu elektroforetických gelů (Syngene, Velká Británie).

4.2.3 Polymerázová řetězová reakce

Základní technikou, z níž se vycházelo při testování navržených primerů a následné genotypizaci všech studovaných izolátů, byla amplifikace požadovaných DNA fragmentů pomocí PCR. Celkový objem reakce se lišil dle konkrétní potřeby, součástí reakční směsi byl 1x PCR pufr (10 mmol/l Tris-HCl; 50 mmol/l chloridu draselného; 1,5 mmol/l chloridu hořečnatého; 0,1 % Tritonu X-100), 1x barvivo Cresol Red (0,01 % o-cresolsulfonephthaleinu; 1,5 % sacharosy), 0,2 mmol/l každého z nukleotidů dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Fermentas, Kanada), 0,3U *Taq* polymerasy, 1 µmol/l forward a reverse primeru a templát představovaný genomickou DNA extrahovanou ze spor Bgh v koncentraci pohybující se v řádu stovek pg/µl. V případě markerů typu ISBP/RJM vykazujících po následné elektroforetické separaci a vizualizaci polymorfismus typu PAV byla základní reakční směs dále rozšířena o interní standard umožňující ověření průběhu PCR. Jako interní standard byl zvolen fragment genu kódujícího glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (*GPD*), který díky své délce (cca 100 bp)

neinterferoval se skórovanými fragmenty daných markerů. Za tímto účelem bylo do reakce bylo přidáno 0,2 mmol/l primerů Bgh gpd F2 (5‘- ACGCACCCATGTTTGTCAT - 3‘) a Bgh gpd R2 (5‘- CCAATGGGGCAAGACAGTTA - 3‘) navržených v rámci bakalářské práce předcházející této studii (Komínková, 2011).

Vlastní PCR amplifikace prováděná v termocykléru C1000 Touch^{TM} (Bio-Rad, USA) byla zahájena počáteční denaturací 5 min při 95°C, následovalo 40 cyklů zahrnujících denaturaci při 95°C po dobu 30 s, dále fázi nasedání primerů (30 s) při různých teplotách v závislosti na konkrétních primerech (standardně však byly všechny primery testovány při t_a = 55°C) a elongační fázi o délce 1 min při 72°C. Posledním krokem po provedení všech 40 cyklů byla závěrečná elongace 10 min při 72°C.

4.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Produkty PCR byly podrobeny elektroforetické separaci v polyakrylamidovém (PAA) gelu za nedenaturujících podmínek ve vertikálním uspořádání. Celková koncentrace směsi akrylamidu s N,N´methylenbisakrylamidem (19:1; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) pro přípravu gelu byla zvolena na základě očekávané délky separovaných fragmentů, a to konkrétně 4 % pro RJMs a 6 % pro SSR markery. Dalšími složkami bylo 0,73 % v/v N, N, N‘, N‘-tetramethylethylendiaminu (TEMED; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) a 0,1 g peroxodisíranu amonného (APS; Fluka BioChemika, USA). Po smíchání všech komponent v 0,5x TBE pufru a nalití vzniklého roztoku do 1 mm široké mezery mezi dvěma skly k tomu určenými proběhla radikály zprostředkovaná polymerace, vzniklý gel byl umístěn do elektroforetické aparatury (C.B.S. Scientific Company, Inc., USA) naplněné 0,5x TBE pufrem. Po přídavku 10 µl 10% ethidium bromidu do anodového pufru byl spuštěn tzv. pre-run o délce cca 1 hod při 300 V, během něhož interkalační barvivo proniklo do gelu. Jako zdroje elektrického napětí byly využívány dva přístroje, a to MP – 500 V (Major Science, USA), případně Standard Power Pack P25 (Biometra®, Německo). Vlastní vzorky byly po nanesení separovány při 350 V, doba separace a objem vzorku nanášený do jamek na katodové straně gelu se lišily v závislosti na konkrétních markerech s ohledem na usnadnění jejich skórování. Každá sada vzorků byla doplněna 100 ng délkového standardu 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada) v 1x Stop C. Vizualizace byla provedena stejně jako v případě agarosového gelu, kapitola 4.2.2.

4.2.5 Sekvenování

V případě ISBP/RJM primerů poskytujících po PCR amplifikaci a separaci na gelu jediný fragment o stejné délce u všech izolátů bylo provedeno sekvenování daného amplikonu s cílem nalézt případné jednonukleotidové polymorfismy a využít tak navržené primery pro vývoj SNP markerů. Produkt PCR reakce byl nejprve enzymaticky přečištěn pomocí protokolu ExoSAP působením 1U exonukleasy I a 0,5U alkalické fosfatasy FastAP™ (Fermentas) během inkubace při 37°C po dobu 30 min, následovala denaturace 5 min při 95°C.

Sekvenování bylo prováděno pomocí komerčního kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies™). Sekvenační reakce probíhala v objemu 10 µl obsahujícím 3 µl vhodně naředěného a přečištěného PCR produktu, 1,5 µl 5x sekvenačního pufru, 1 µl primeru o koncentraci 10 µmol/l a 0,5 µl BigDye®, zbývající objem byl doplněn redestilovanou vodou. Během vlastní reakce byl nejprve daný fragment denaturován 5 min při 98°C, v další fázi bylo zopakováno 50 cyklů skládajících se z denaturace 10 s při 96°C, nasedání primeru 5 s při 50°C a syntézy nového řetězce 4 min při 60°C. Vzniklý produkt byl přečištěn pomocí roztoku magnetických kuliček, který je součástí kitu Agencourt® CleanSeq® (Beckman Coulter, USA), purifikace byla prováděna na robotické stanici Biomek® NX^{P} (Beckman Coulter). Následovala kapilární elektroforéza s detekcí fluorescenčně značených inkorporovaných dideoxynukleotidů na genetickém analyzátoru ABI 3730xl.

4.2.6 Zpracování získaných dat

Výstupem z genetického analyzátoru byly v případě sekvenování DNA sekvence ve formátu ABI, které byly po konverzi do souboru multi-FASTA programem DNA Baser Sequence Assembler v3.5.3 (Heracle BioSoft SRL, Rumunsko) dále analyzovány pomocí programu MEGA5 (Tamura *et al*., 2011) disponujícím nástrojem pro tzv. multiple alignment, který umožňuje porovnání sekvencí a detekci SNP markerů.

Vzhledem k charakteru dat byly pro rekonstrukci fylogenetických vztahů v rámci izolátů Bgh zvoleny distanční metody vycházející z matice vzdáleností mezi všemi dvojicemi taxonomických jednotek, které jsou předmětem studia. Genotypové profily jednotlivých izolátů byly převedeny na matici binárních dat, ta byla posléze manuálně upravena do formátu kompatibilního se softwarovým balíčkem PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2005). Izolát padlí travního pšenice s označením Tm258 byl při analýze použit jako outgroup tvořící sesterskou

skupinu izolátů z ječmene. Soubor binárních dat ve formátu phylip byl nejprve konvertován na distanční matici nástrojem Restdist, na základě níž byl posléze algoritmem neighbor-joining (Saitou *et* Nei, 1987) odvozen kladogram. Uvedený algoritmus je specifický tím, že vede k získání nezakořeněného stromu. Ke konstrukci kladogramu byl zvolen program Neighbor, jehož hlavní výhoda spočívá v jeho rychlosti. Požadovaný čas analýzy je proporční pouze druhé mocnině počtu analyzovaných taxonů, díky čemuž je tento program velmi vhodný i pro rozsáhlé soubory dat (Felsenstein, 2005). Výsledný strom byl vizualizován a dále upravován programem FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012). Bootstrap hodnoty byly vypočteny ze sady 1 000 replikací za použití nástrojů Seqboot, Restdist, Neighbor a Consense dostupných v softwarovém balíčku PHYLIP.

5 VÝSLEDKY

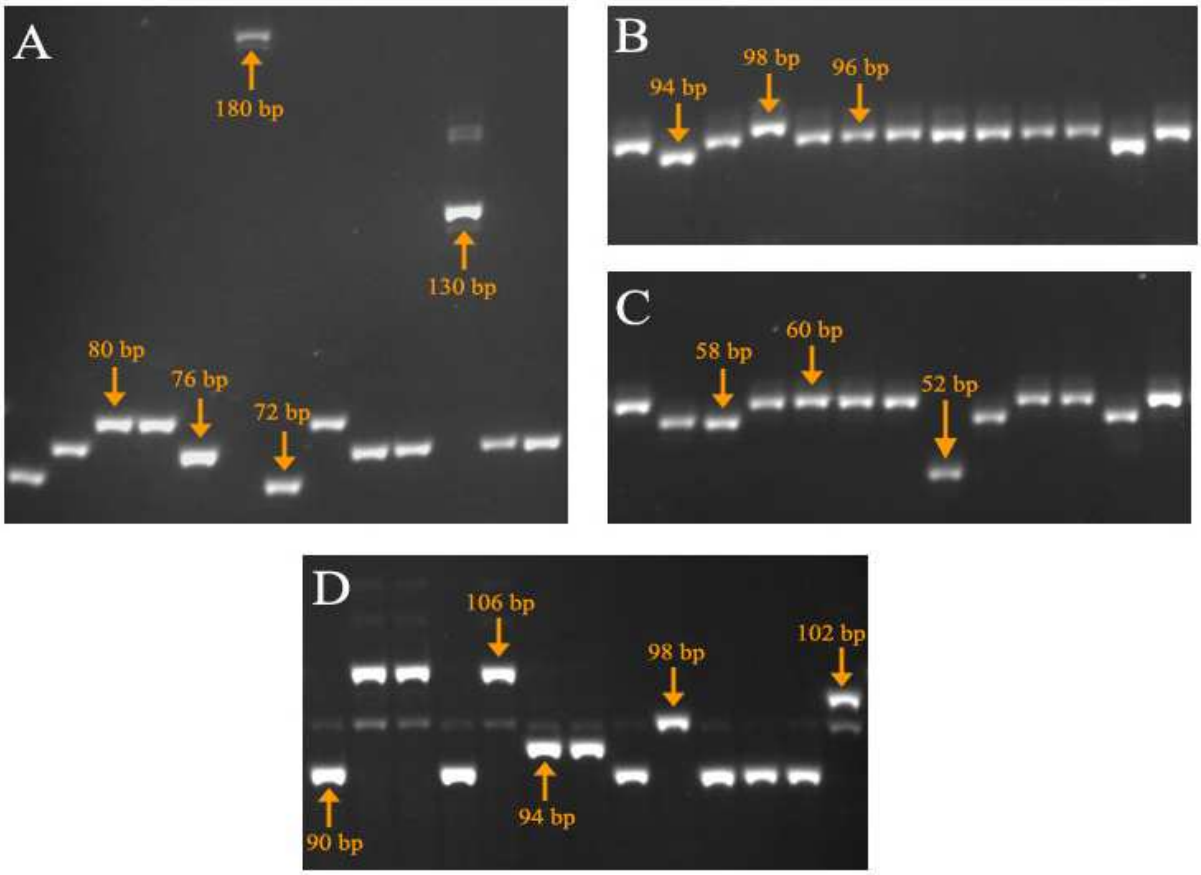
5.1 Odvozování markerů a genotypování

Experimentální část této diplomové práce byla zaměřena v první řadě na design sady markerů, které by vytvořily genotypovací systém s dostatečnou rozlišovací schopností vhodný pro molekulární charakterizaci populace izolátů padlí travního ječmene pocházejících z geograficky limitované oblasti. Všechny páry primerů navržené na základě popsané metodiky byly v první fázi testovány na sadě 15 kontrolních izolátů padlí travního a vyhodnocovány z hlediska úspěšnosti amplifikace, přítomnosti polymorfismu, možnosti skórování, spolehlivosti a reprodukovatelnosti. U amplikonů splňujících požadavky pro sekvenování byly dále vyhledávány jednonukleotidové polymorfismy za účelem maximálního využití variability přítomné v těchto potenciálních zdrojích markerů. Nalezené polymorfní markery byly následně uplatněny pro genotypování souboru izolátů Bgh zapojených do této studie. Z celkového počtu 161 izolátů byly získány genotypové profily 158 z nich. Tři izoláty pocházející ze sběru na území ČR v roce 2012 (N4, N6 a X2) byly vyřazeny kvůli nedostatečné kvalitě extrahované genomické DNA nebo přítomnosti sekundárních metabolitů způsobujících inhibici PCR (výrazné maximum absorbance extrahované DNA při vlnové délce 230 nm naznačovalo přítomnost fenolických látek). Markery, z nichž vycházela tato práce, lze podle typu rozčlenit do tří kategorií, a to SSR, ISBP/RJM a SNP.

5.1.1 SSR markery

První přístup odvozování markerů aplikovaný v této studii vychází z polymorfismu běžně se vyskytujícího u krátkých tandemových repetic. Primery navržené pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů poskytovaly v šesti případech z deseti délkově polymorfní PCR produkty. V případě *obm26* amplifikace vedla k získání komplexního fingerprintu, jehož vyhodnocení nebylo možné jednoznačně a reprodukovatelně provést, z tohoto důvodu byl uvedený marker z další analýzy vyřazen. Zbylé polymorfní páry primerů poskytovaly tři (*obm27*, *obm28*), případně pět (*obm24*, *obm29*) délkových variant PCR fragmentů s výjimkou *obm22*, jehož genotypování na kompletním souboru izolátů vedlo k detekci 48 polymorfních amplikonů. Přestože byl tento SSR marker jednoznačně největším objeveným zdrojem variability, získaná data vykazovala problematickou reprodukovatelnost, což vedlo k rozhodnutí uvedený zdroj markerů prozatím vyřadit a v budoucnu podrobit další

optimalizaci. Na kompletním souboru 158 izolátů bylo tedy genotypováno celkem 16 spolehlivých SSR markerů (Obr. 6).



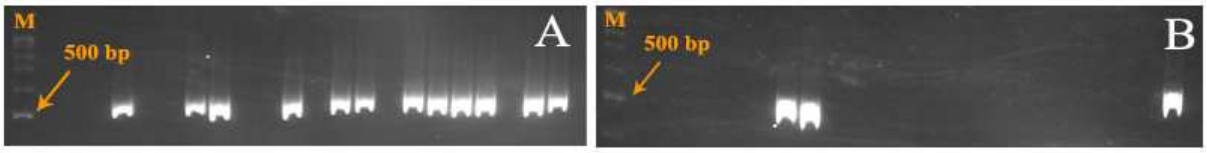
Obr. 6: Příklady polymorfních SSR markerů amplifikovaných na izolátech *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

A) *obm24*; **B)** *obm27*; **C)** *obm28*; **D)** *obm29*. Uvedené délky DNA fragmentů byly odhadnuty porovnáním se standardem 100 bp Plus DNA Ladder. Produkty PCR byly vizualizovány barvením ethidium bromidem po elektroforetické separaci na 6% PAA gelu.

5.1.2 Markery typu ISBP/RJM

Další přístup, z něhož se při hledání markerů v této práci čerpalo, je založen na polymorfismu v inzerčních místech rozptýlených repetic, zde konkrétně retrotransposonů nadrodin *Copia* a *Gypsy*. Podrobné výsledky testování 20 navržených párů primerů jsou shrnuty v Tabulce VII, důvodem k vyřazení potenciálního markeru byla problematická amplifikace, absence polymorfismu nebo špatná reprodukovatelnost. Celkem v pěti případech (*obm13*, *obm14*, *obm15*, *obm16* a *obm18*) byl po PCR amplifikaci a následné separaci na gelu

detekován polymorfismus typu PAV. Dvojice markerů *obm13* a *obm14*, stejně jako *obm15* a *obm16* však byly navrženy v rámci téhož kontigu, což potvrdila i shodná informace získaná jejich testováním na sadě zkušebních izolátů, k další analýze byl tedy postačující pouze jeden marker z každé dvojice. Pro další využití byly proto zvoleny tři RJMs, a to *obm14*, *obm16* a *obm18*. Při opakovaném genotypování na kompletní sadě izolátů však marker *obm16* neposkytoval spolehlivě reprodukovatelné výsledky, z tohoto důvodu byly do celkového genotypovacího souboru zařazeny pouze zbývající dva markery (Obr. 7). Tento soubor byl dále doplněn SNP markery detekovanými na základě sekvenování amplikonů *obm6*, *obm9* a *obm20* (Tab. VII).



Obr. 7: ISBP/RJM markery amplifikované na izolátech *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

A) *obm14*; **B)** *obm18*. M = 100 bp Plus DNA Ladder. Amplikony, jejichž přítomnost, či absence byla vyhodnocována, se nachází v oblasti 500 bp. Jako interní standard byl použit fragment genu pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu o délce 100 bp (není znázorněn). Produkty PCR byly vizualizovány barvením ethidium bromidem po elektroforetické separaci na 4% PAA gelu.

5.1.3 SNP markery

Nevýhoda markerů založených na inzerčním místě TE v podobě jejich dominantního charakteru a omezené informační hodnoty může být kompenzována jejich převedením na SNP markery. PCR amplikony ze specifických primerů odvozených z retrotransponů, které poskytovaly jediný DNA fragment o délce 450 – 650 bp u všech izolátů, byly dále sekvenovány a detekované SNPs doplnily soubor markerů určených pro charakterizaci izolátů Bgh. Sekvenování bylo provedeno pouze u 11 testovaných párů primerů splňujících výše uvedená kritéria. Porovnání sekvencí jednotlivých izolátů vedlo k nalezení tří unikátních zdrojů markerů - *obm6*, *obm9* a *obm20* (Tab. VII). V rámci těchto sekvencí byla pozorována poměrně vysoká variabilita, jak je patrné z Tab. VIII, v níž je uveden kompletní výčet nalezených informativních míst a pozic, na nichž byla daná místa detekována. Pozice 1 byla v případě všech sekvencí určena jako první nukleotid následující po 3‘ konci primeru. Sekvenování ISBP/RJM amplikonů výrazně obohatilo celkový počet markerů příspěvkem

13 jednonukleotidových polymorfismů a jediné delece o délce 63 bp vyskytující se u dvou izolátů původem z Izraele.

Tab. VII: Výsledky testování markerů typu ISBP/RJM

Páry primerů použité pro molekulární charakterizaci celkového souboru izolátů Bgh jsou vyznačeny šedě.

Pár primerů	PCR produkt	Polymorfismus na gelu	Sekvenování	Poznámka
obm1	ANO	NE	NE	Větší počet fragmentů; vyřazeno
obm2	ANO	NE	ANO	100% identita sekvencí; vyřazeno
obm3	ANO	NE	ANO	100% identita sekvencí; vyřazeno
obm4	ANO	NE	ANO	100% identita sekvencí; vyřazeno
obm5	ANO, velmi slabý	NE	NE	Vyřazeno
obm6	ANO	NE	ANO	**Detekce SNP** (viz Tab. VIII)
obm7	ANO	NE	ANO	100% identita sekvencí, vyřazeno
obm8	ANO	NE	ANO	100% identita sekvencí; vyřazeno
obm9	ANO	NE	ANO	**Detekce SNP** (viz Tab. VIII)
obm10	ANO	NE	ANO	**Detekce SNP;** marker zaměnitelný s *obm9*
obm11	ANO	ANO	NE	Problematické skórování, špatná reprodukovatelnost; vyřazeno
obm12	ANO, slabý	ANO	NE	Problematické skórování, špatná reprodukovatelnost; vyřazeno
obm13	ANO	ANO	-	Marker zaměnitelný s *obm14*
obm14	ANO	ANO	-	Obr. 7, A
obm15	ANO	ANO	-	Marker zaměnitelný s *obm16*
obm16	ANO	ANO	-	Špatná reprodukovatelnost; vyřazeno
obm17	ANO	NE	ANO	Směsná sekvence; vyřazeno
obm18	ANO	ANO	-	Obr. 7, B
obm19	ANO	NE	ANO	Směsná sekvence; vyřazeno
obm20	ANO	NE	ANO	**Detekce SNP** (viz Tab. VIII)

Tab. VIII: Markery odvozené ze sekvencí ISBP/RJM amplikonů

Marker	Označení SNP/indelu	Pozice	Alely	Poznámka
obm6	*obm6.1*	75	A/G	
	obm6.2	247	C/A	
	obm6.3	259	T/C	
	obm6.4	304	G/A	
obm9	*obm9.1*	133	T/C	delece 63 bp
	obm9.2	166 - 228	-	
	obm9.3	475	A/T	
obm20	*obm20.1*	94	T/A	
	obm20.2	106	A/G	
	obm20.3	250	C/T	
	obm20.4	324	G/T	
	obm20.5	388	A/T	
	obm20.6	437	C/T	
	obm20.7	449	T/A	

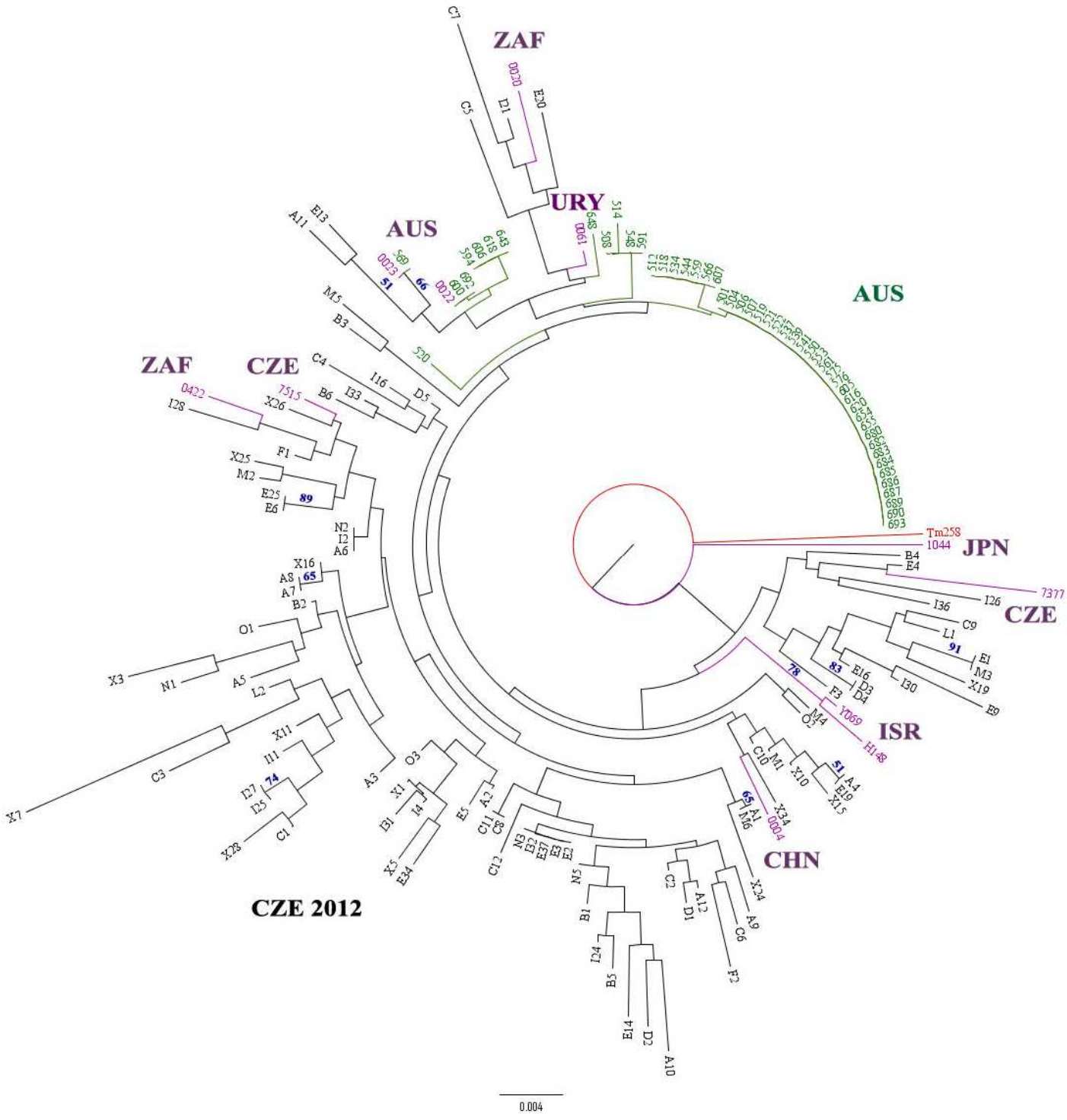
5.2 Evoluční vztahy mezi studovanými izoláty Bgh

Soubor 158 izolátů padlí travního ječmene různého geografického původu byl ve druhé fázi experimentální části této práce podroben fylogenetické analýze provedené na základě sady odvozených SSR, ISBP/RJM a SNP markerů. Výsledný genotypovací systém byl tvořen 32 polymorfními markery, kladogram zkonstruovaný s jejich uplatněním algoritmem neighbor-joining je znázorněn na Obr. 8. Na základě topologie vytvořeného kladogramu byl následně realizován jeden z hlavních cílů této studie, a to analýza genotypové variability izolátů Bgh ve vztahu k datům o jejich geografickém původu.

Jak je patrné z Obr. 8, většina studovaných izolátů poskytovala odlišné genotypové profily, díky čemuž je bylo možné vzájemně rozlišit, avšak vytvořené klady se z velké části vyznačovaly pouze slabou bootstrap podporou. V případě australských izolátů byla pozorována výrazná uniformita, většina z nich poskytovala identické profily a byla zařazena do společného kladu. Separace těchto izolátů vůči ostatním však nebyl úplná, jejich klad zahrnuje i několik izolátů z různých oblastí ČR a dva izoláty z jiných částí světa (Uruguay a Jihoafrická republika). Zaměříme-li se na distribuci jednotlivých izolátů celosvětové sbírky, na první pohled z nich vybočuje japonský patotyp 1044, kterému jako jedinému s výjimkou

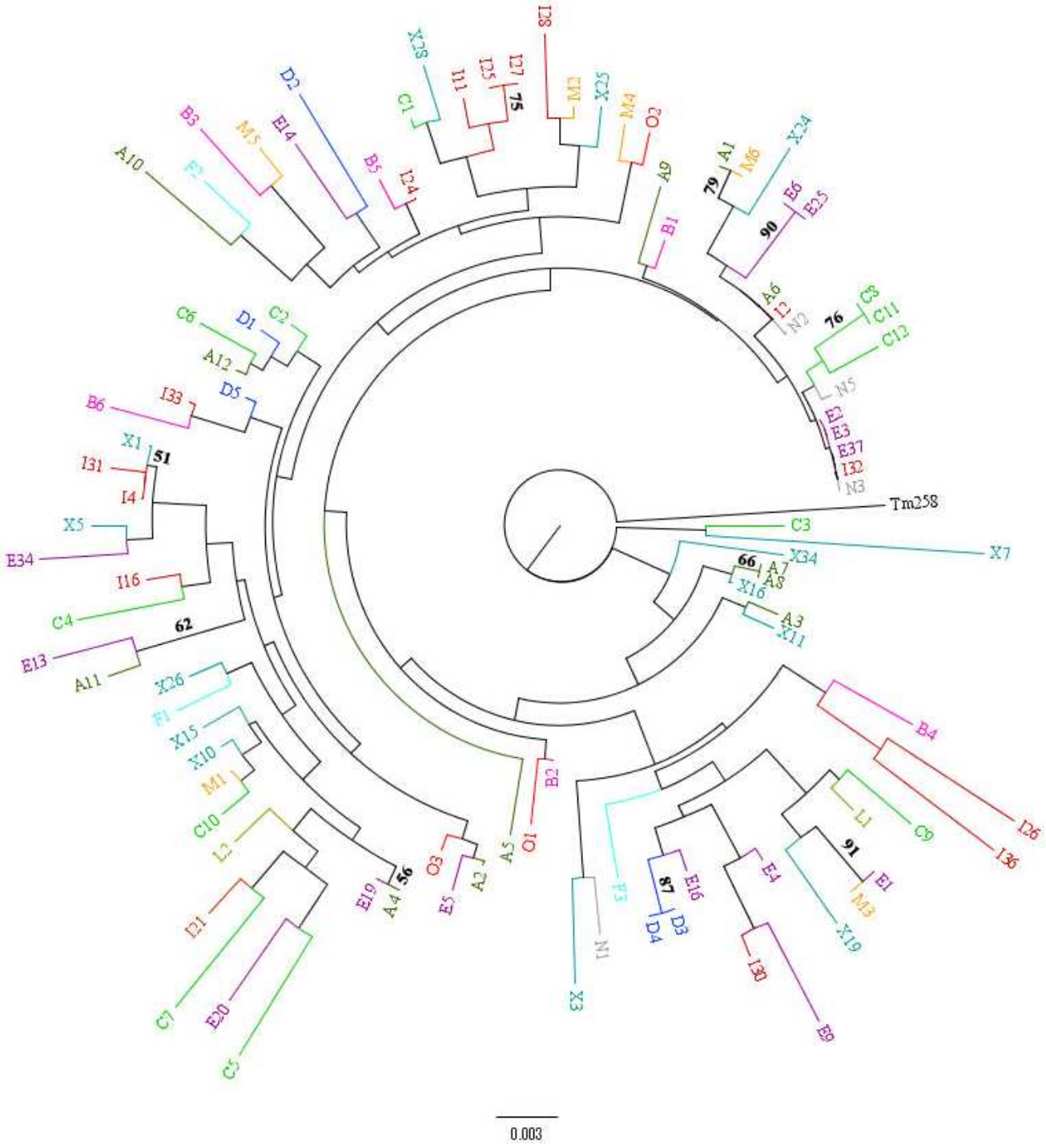
outgroupu Bgt náleží samostatná větev. Poměrně výrazně diverzifikovanou skupinou jsou i oba izraelské izoláty Y-069 a H-148, což potvrzuje i bootstrap podpora jejich společného kladu. Australské izoláty ze sbírky se dle očekávání přiřadily k dalším izolátům z tohoto kontinentu, zatímco oba jihoafrické izoláty se vyskytují odděleně v různých kladech. Za povšimnutí stojí fakt, že české izoláty z loňského sběru lze nalézt téměř ve všech vytvořených kladech společně s jednotlivými izoláty z jiných částí světa.

Dosažené výsledky lze dále charakterizovat absencí výrazných souvislostí mezi evolučními vztahy českých izolátů (Obr. 9) a lokalitami, na nichž byl výskyt daných izolátů zaznamenán (Obr. 10). Z uvedených obrázků je patrná variabilní distribuce izolátů v podobě výskytu genotypově shodných izolátů na různých místech (např. dvojice izolátů E1/M3, A4/E19, A11/E13 nebo A1/M6) a kolokalizace široké škály odlišných izolátů ve stejných oblastech. Navzdory popsané variabilitě se v rámci kladogramu vyskytuje i několik dvojic izolátů s identickým genotypovým profilem pocházejících ze stejného úseku a tvořících klad se silnou bootstrap podporou. Dá se očekávat, že v těchto případech se jedná s velkou pravděpodobností o jediný izolát, jehož klony byly odchyceny a dále zkoumány nezávisle na sobě, avšak správnost tohoto předpokladu ukážou až výsledky fenotypové charakterizace daných izolátů. Příkladem takovýchto potenciálně duplicitních izolátů jsou dvojice A7/ A8, D3/D4, I25/I27, E6/E25 a C8/C11.



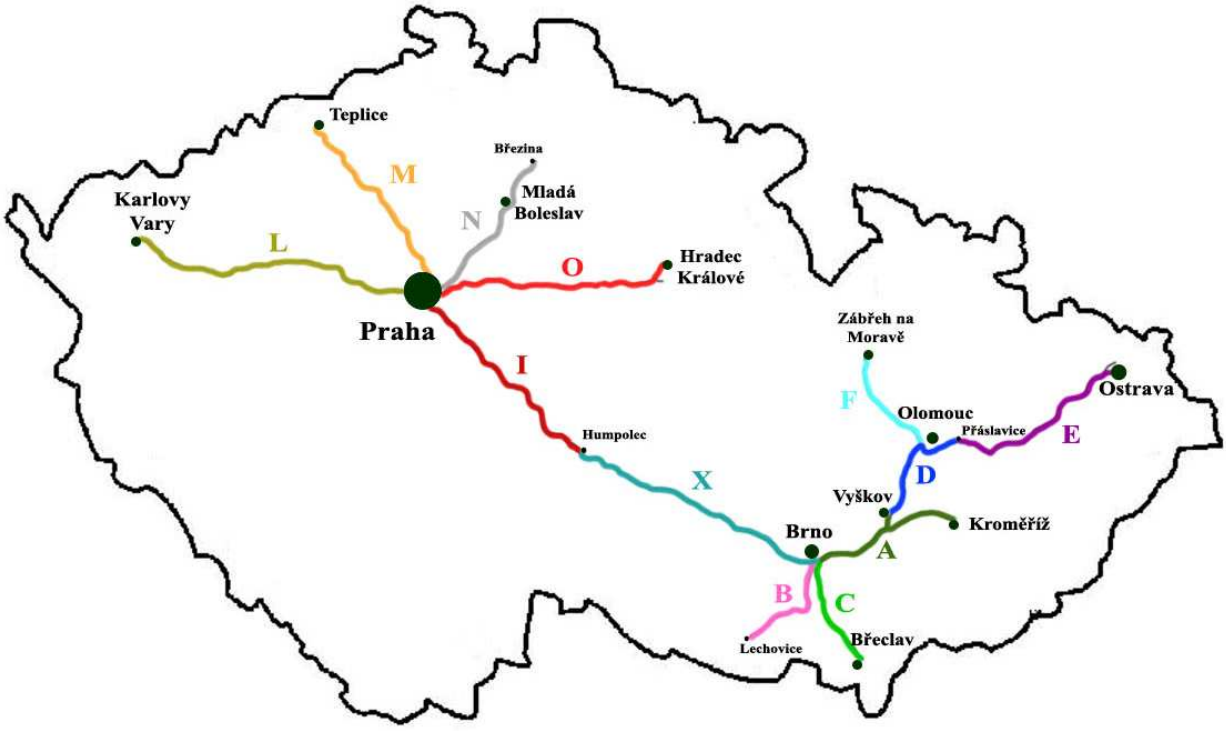
Obr. 8: Kladogram znázorňující evoluční vztahy mezi izoláty *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Fylogenetická analýza byla založena na 32 markerech typu SSR, ISBP/RJM a SNP; izolát Tm258 (červeně) pocházející z *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* byl použit jako outgroup. Modrá čísla značí bootstrap podporu daných větví vycházející z 1000 replikací v případech, kdy přesáhla 50 %. Izoláty původem z Austrálie (AUS) jsou vyznačeny zeleně, celosvětová sbírka fialově (ISR = Izrael; CHN = Čína; JPN = Japonsko; URY = Uruguay; ZAF = Jihoafrická republika), zbývající izoláty pochází ze sběru na území ČR v roce 2012 (CZE 2012).



Obr. 9: Evoluční vztahy mezi izoláty Bgh pocházejícími z České republiky

Fylogenetická analýza provedená pomocí algoritmu neighbor joining založená na sadě 32 markerů; izolát Tm258 pocházející z *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* byl použit jako outgroup. Černá čísla značí bootstrap podporu daných větví vycházející z 1000 replikací v případech, kdy přesáhla 50 %. Skupiny izolátů jsou barevně rozlišeny podle oblasti ČR, kde byly odchyceny při sběru v roce 2012 (Obr. 10).



Obr. 10: Distribuce studovaných izolátů Bgh v rámci České republiky podle oblasti původu

Barevné označení jednotlivých úseků koresponduje s barvou izolátů na Obr. 9; písmena (A, B, C, D, E, F, I, L, M, N, O, X) zastupují jednotlivé skupiny izolátů, které byly v příslušných oblastech odchyceny. Informace o původu izolátů laskavě poskytnul doc. Ing. Antonín Dreiseitl, Csc.

6 DISKUSE

Předložená práce si kladla za cíl vyvinout sadu vhodných markerů pro molekulární charakterizaci izolátů *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* vyskytujících se v České republice a začlenit je do kontextu variability izolátů různého geografického původu. Pro vývoj molekulárních markerů byla použita parciální genomická sekvence tohoto patogenu (Spanu *et al*., 2010), za účelem maximalizace úspěchu při odvozování polymorfních markerů pro izoláty z geograficky limitovaných oblastí byly zvoleny tři typy markerů (SSR, ISBP/RJM a SNP), u kterých lze podle dosavadních poznatků očekávat maximální pravděpodobnost polymorfismu a rovnoměrnou distribuci v genomu padlí travního.

Výzkumu zaměřenému na padlí travní je dlouhodobě věnována značná pozornost (Glawe, 2008; Hückelhoven *et* Panstruga, 2011; Schulze-Lefert *et* Vogel, 2000; Zhang *et al*., 2005), a to i přes řadu úskalí, která s sebou práce s tímto obligátním biotrofem přináší. Hlavní překážkou pro experimentální část této studie byly komplikace doprovázející extrakci genomické DNA z konidií. Přestože optimalizace metody extrakce DNA nepatřila mezi cíle práce, bylo nutné se touto problematikou zabývat. Vzhledem k technicky náročné kultivaci a propagaci tohoto houbového patogenu představovalo množství dostupných spor limitující faktor a úspěšná extrakce DNA tedy znamenala klíčový předpoklad umožňující další analýzu. DNA získaná standardní procedurou popsanou v této práci však vykazovala nahnědlé zbarvení a inhibiční účinky pro průběh PCR. Inhibiční efekt nenaředěné DNA přetrvával i po provedení dodatečné purifikace precipitací nebo imobilizací DNA na magnetických částicích Agencourt® CleanSeq® (Beckman Coulter) a několikanásobným promytím 70% ethanolem. Pozitivní účinek byl pozorován pouze po přečištění pomocí dialýzy, avšak tento přístup vedl k nezanedbatelným ztrátám v množství vzorku. Toto zjištění indikuje přítomnost sekundárního metabolitu s inhibičním účinkem a podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako DNA. Problém nevyřešilo ani použití kitu Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Stratec Molecular; Germany), které vedlo k minimálnímu výtěžku DNA. Rovněž pokusy o amplifikaci celogenomové DNA pomocí Φ29 DNA polymerasy technikou „Multiple Displacement Amplification“ (MDA) se nesetkaly s úspěchem a poskytovaly nestandardně nízký výtěžek v porovnání s výsledky získanými v případě natříděných chromosomů ječmene (Šimková *et al*., 2008) i celogenomové MDA amplifikace jiného zástupce čeledi *Erysiphaceae*, *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun & Shishkoff (Fernández-Ortuño *et al*., 2006). Nalezení vhodnějšího přístupu k extrakci DNA z omezeného množství spor tohoto specifického organismu bude vyžadovat další studium.

V první fázi praktické části této práce zabývající se navrhováním a testováním primerů odvozených z oblastí mikrosatelitů a inzerčních míst transponovatelných elementů bylo nalezeno celkem 32 použitelných polymorfismů, které byly posléze uplatněny pro genotypování všech studovaných izolátů Bgh a provedení fylogenetické analýzy vycházející ze získaných dat. V případě mikrosatelitových lokusů byl zjištěn vyhodnotitelný a reprodukovatelný polymorfismus u pěti párů primerů z deseti. Jedná se o poloviční úspěšnost, avšak testovaný soubor je příliš malý na to, aby bylo možné výsledky generalizovat a usuzovat z nich na závěry týkající se např. souvislostí mezi délkou základní jednotky repetice, počtem jejího opakování a stupněm polymorfismu nebo poměru transic a transversí. Takto vysoká úspěšnost i přesto vzbuzuje pozornost a bylo by bezesporu zajímavé zopakovat experiment ve větším měřítku, které by umožňovalo objektivnější pohled na možnosti využití mikrosatelitů jako markerů pro padlí travní, při jehož výzkumu byl tento typ markerů dosud uplatněn velmi sporadicky. Na základě studia dostupné literatury byl v rámci této práce testován jediný nalezený SSR marker se zveřejněnými sekvencemi primerů, a to CJR3, jehož odvození popisuje Ridout *et al*. (2006). Na studovaném souboru izolátů však tento marker nebylo možné vyhodnotit a pokusy o jeho optimalizaci se nesetkaly s úspěchem. Takto nízké využití potenciálu nabízeného SSR markery při studiu padlí travního je poměrně překvapivé. Genetická mapa tohoto druhu je založena převážně na molekulárních markerech typu AFLP, RFLP a EST (Pedersen *et al*., 2002b), zatímco k ukotvení kontigů sestavených na základě vytvořené BAC knihovny na genetickou mapu byly použity SNP markery (Pedersen *et al*., 2002a) a pro poziční klonování genů avirulence byla uplatněna kombinace markerů typu CAPS (Cleaved Amplified Polymorfic Sequence; markery založené na polymorfismu v restrikčních místech endonukleas), RFLP, RAPD, AFLP a SNP (Skamnioti *et al*., 2008). Vezmeme-li v úvahu jiné houbové druhy, výsledky získané testováním SSR primerů na izolátech Bgh jsou v souladu se studií, kterou publikovali Murat *et al*. (2011). Uvedená studie se zabývá houbou *Tuber melanosporum* Vittad. a při analýze genetické diverzity jejích izolátů čerpá stejně jako tato práce ze SSR markerů odvozených z mikrosatelitů identifikovaných *in silico* na základě sekvenačních dat. Výsledkem testování navržených primerů bylo získání 44 % polymorfních amplikonů z celkového počtu 135. Zajímavým údajem je rovněž vysoká četnost výskytu mikrosatelitů v genomické sekvenci tohoto druhu, zjištěná hodnota je 182 SSRs na 1 Mbp. Dalším příkladem využití SSR markerů je studie zaměřující se na diverzitu izolátů patogenní houby *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, která udává výskyt polymorfismu pouze v případě 37,5 % z celkového počtu 24 testovaných amplikonů (Silva *et al*., 2007).

Genom padlí travního se vyznačuje masivní kolonizací transponovatelnými elementy, které jsou zodpovědné za jeho výraznou expanzi v porovnání s genomy jiných hub (Spanu *et al*., 2010), proto bylo využití markerů založených na inzerčních místech retrotransposonů jasnou volbou. Navzdory velkému potenciálu těchto markerů pro vysoce repetitivní genomy (Paux *et al.*, 2006) však tato práce představuje jejich první známé uplatnění u houbového organismu. Arabi *et* Jawhar (2010) popisují úspěšné použití jiného typu markerů založeného na transponovatelných elementech, IRAP, pro fylogenetickou analýzu izolátů *Fusarium* spp. sesbíraných z pšenice na území Sýrie. IRAP markery vedly v tomto případě k získání vysokého stupně genetické variability, z celkového počtu 844 skórovaných DNA fragmentů bylo 50 % z nich vyhodnoceno jako polymorfní. Vysokou rozlišovací schopnost specifických markerů odvozených z IRAP v podobě jejich aplikace pro rozlišení různých izolátů *Fusarium oxysporum* Schltdl. f. sp. *lactucae* Matuo & Motohashi popisují i Pasquali *et al*. (2007). Specifické markery založené na inzerčních místech TE by mohly rovněž představovat široký zdroj variability, avšak pro prověření této možnosti by bylo nutné provést rozsáhlou analýzu zaměřenou na jejich odvozování. Přestože z celkového počtu dvaceti navržených párů primerů byly v této práci odvozeny pouze dva spolehlivé presence/absence markery typu ISBP/RJM, monomorfní amplikony se osvědčily jako bohatý zdroj polymorfismu ve formě SNPs, které v konečné fázi tvořily téměř polovinu celkové sady markerů.

Tato studie prokázala, že zvolené typy markerů (SSR, ISBP/RJM, SNP) představují užitečný nástroj pro studium diverzity padlí travního a jsou tedy hodné další pozornosti, ačkoliv vzhledem k možnostem, které v posledních letech nabízí techniky NGS (Metzker, 2010), je možné, že dojde k ústupu od „tradičních“ typů markerů u klíčových projektů studia genomu Bgh jako jsou konstrukce genetických map nebo klonování genů zodpovědných za virulenci. S využitím NGS pro získání velkého objemu sekvenačních dat z různých izolátů *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* i *hordei* a detekci nových SNPs počítají Spanu *et* Panstruga (2012). Nicméně náročnost extrakce a purifikace DNA, získání dostatečného množství biologického materiálu pro extrakci požadovaného množství DNA pro NGS techniky a cena NGS spolu s náročností bioinformatické analýzy sekvenačních dat jsou limitujícími faktory jejich uplatnění pro studie založené na velkém počtu izolátů.

Vzhledem k tomu, že dynamika populací a šíření izolátů Bgh začaly být systematicky sledovány až v relativně nedávné době, údaje z dlouhodobějšího časového horizontu jsou chybějícím článkem pro objasnění historického vývoje. Absence fosilních záznamů však může být částečně kompenzována rekonstrukcí evolučních vztahů mezi současnými izoláty

pomocí fylogenetické analýzy. Tohoto přístupu bylo dosud využito pouze na úrovni různých hostitelských forem padlí travního (Inuma *et al*., 2007; Oberhaensli *et al*., 2011; Wyand *et* Brown, 2003). Při studiu diverzity na úrovni jednotlivých izolátů téže hostitelské formy se dříve vycházelo převážně z fenotypových dat v podobě virulencí a citlivosti vůči různým fungicidům. Tyto znaky byly často analyzovány v kombinaci s molekulárními markery, a to konkrétně s isozymy (Koch *et* Köhler, 1991), RFLP (Brown *et al*., 1990; Christiansen *et* Giese, 1990), případně RAPD (McDermott *et* McDonald, 1993; McDermott *et al*., 1994; Newton *et al*., 1998; Wolfe *et al*., 1992). Součástí uvedených prací byly i pokusy o rozlišení izolátů na vnitropopulační úrovni pomocí DNA markerů, získané výsledky však v řadě případů vedly k detekci omezené míry variability a nebyly využívány pro analýzu evolučních vztahů. Kromě toho se výsledky různých studií od sebe vzájemně lišily, Damgaard *et* Giese (1996) zaznamenali, že izoláty oddělené vzdáleností stovek kilometrů se vyznačovaly absencí genetické diferenciace, zatímco Wolfe *et al.* (1992) uvádí naopak vysokou variabilitu v celoevropském měřítku i v rámci stejných lokalit. Příčina této inkonzistence by mohla spočívat v nedostatcích použitých typů markerů, které často vycházely z nespecifických primerů, případně v detekci pouze omezené míry variability. Jak je patrné z uvedeného shrnutí, studium genetické diverzity na vnitropopulační úrovni Bgh dosud nevedlo k jednotným výsledkům. V posledních letech se však hlavní úsilí zaměřené na tento patogen začalo ubírat jinými směry a cestami, genotypovací systém vhodný pro globální charakterizaci izolátů proto dosud nebyl vytvořen.

Strategie uplatněná v této práci vedla k detekci vysoké míry variability v rámci studovaných izolátů, u jednotlivých souborů však byly zaznamenány poměrně výrazné rozdíly. Zjištěná diverzita mezi izoláty sesbíranými v ČR během několika dní jediné sezóny byla mnohem vyšší než u izolátů pocházejících z Austrálie, přestože se jedná o území s téměř 100x větší rozlohou. Tento zdánlivý paradox může souviset s výrazně kratší historií patogenu na území Austrálie, počátky pěstování obilovin na tomto kontinentu jsou spojeny s příchodem evropských osadníků v roce 1788 (Gergis *et al*., 2010). Pozorovaný nízký stupeň vnitropopulační diverzity by mohl být vysvětlen uplatněním efektu zakladatele a genetického driftu (Villarino *et al*., 2012). Výraznou roli zde sehrála prostorová izolace od okolních kontinentů znemožňující přirozené rozšiřování genetického poolu, konkrétní příklad tohoto omezení uvádí Dreiseitl *et* Pickering (1999). Na základě porovnání virulencí charakterizujících populace Bgh v Jižní Austrálii a na Novém Zélandu vzdálené téměř 2 000 km bylo šíření patogenu mezi těmito dvěma pevninami oddělenými mořem

vyhodnoceno jako nepravděpodobné. Zjištěná uniformita australských izolátů tedy odpovídá předpokladům. Očekávaná uniformita těchto izolátů byla hlavním důvodem jejich zařazení ve větším počtu (50). Tento soubor izolátů sloužil jako kontrola specificity odvozeného panelu markerů a zároveň ověření jeho rozlišovací schopnosti. Kombinace obou sledovaných parametrů byla v případě tohoto panelu lepší než u jakýchkoliv jiných doposud použitých markerů zahrnujících RFLP (Brown *et al*., 1990; Christiansen *et* Giese, 1990; Damgaard *et* Giese, 1996), RAPD (McDermott *et* McDonald, 1993; McDermott *et al.*, 1994; Newton *et al*., 1998; Wolfe *et al*., 1992), 28S rDNA (Inuma *et al*., 2007; Matsuda *et* Takamatsu, 2004), ITS (Inuma *et al*., 2007; Wyand *et* Brown, 2003) a kódující genové oblasti (Inuma *et al*., 2007; Wyand *et* Brown, 2003). Zajímavým zjištěním je, že české izoláty byly zařazeny téměř do všech kladů dendrogramu, který byl výstupem fylogenetické analýzy a zahrnoval izoláty z celého světa (Obr. 8). Rozdíly v jejich genotypovém profilu prokazují, že se ve většině případů jedná o různé izoláty a ne o opakovaný sběr téhož izolátu. Porovnáme-li geografický původ jednotlivých izolátů z ČR (Obr. 10) a jejich pozici ve vytvořeném dendrogramu (Obr. 9), lze si povšimnout dvou jevů. Jednotlivé lokality se vyznačovaly přítomností širokého spektra genotypově odlišných izolátů a pozorován byl i opačný fenomén v podobě dvojic izolátů s identickým profilem, jejichž výskyt byl zaznamenán na různých lokalitách. Extrémním příkladem je dvojice genotypově shodných izolátů E1 a M3 odchycených v oblastech, které od sebe odděluje vzdálenost více než 200 km (Obr. 10). Uvedený poznatek lze vysvětlit velkým potenciálem padlí travního klonálně se šířit na dlouhé vzdálenosti pomocí větrem unášených spor, díky čemuž mohly být i geograficky vzdálené populace ve skutečnosti trvale v kontaktu a nedošlo u nich k oddělené evoluci. K podobným závěrům došli i Park *et al.* (1999) na základě výsledků studia populační struktury izolátů *Puccinia recondita* Roberge ex Desmaz. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. v západní Evropě, jejich práce prokázala klonální migraci spor tohoto patogenu na velké vzdálenosti.

Výrazná diverzita pozorovaná v rámci českých izolátů je v souladu s výsledky dříve provedené studie založené na fenotypu, která odhalila přítomnost vysokého počtu patotypů na území ČR (Dreiseitl, 2008), avšak větší potenciál pro vyvození konkrétních závěrů bude nabízet doplnění genotypových dat o virulence zjištěné přímo u izolátů, které byly předmětem této práce. Hledáním souvislostí mezi genotypovými profily a patotypy konkrétních izolátů u rzi *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* byl zjištěn výskyt genetických změn, ke kterým došlo nezávisle na patogenitě, i nezávislý vznik stejných patotypů na různém genetickém pozadí. Tento jev byl vysvětlen působením selekčního tlaku na překonání kombinací genů rezistence

vyskytujících se u nejrozšířenějších kultivarů hostitelského druhu (Park *et al.*, 1999). Zda bude podobný trend pozorován i v případě různých patotypů Bgh je otázkou dalšího výzkumu.

Zaměříme-li se na distribuci českých izolátů ve vztahu s izoláty z celosvětové sbírky (Obr. 8), zástupci těchto dvou skupin se vyskytují ve společných kladech s výjimkou velmi diverzifikovaného izolátu z Japonska tvořícího samostatný klad a dvojice izolátů pocházejících z Izraele (Dreiseitl *et al.*, 2006), které jsou v rámci kladogramu rovněž výrazně separovány. Vezmeme-li v úvahu distribuci zbývajících izolátů reprezentujících světovou populaci, výsledný dendrogram naznačuje, že vnitropopulační variabilita přítomná v České republice z velké části pokrývá genetický pool Bgh existující na celém světě. Při této interpretaci je však je nutné vzít v úvahu nízkou bootstrap podporu dosaženou u všech hierarchicky vyšších kladů, pro větší robustnost analýzy by bylo nutné zvýšit počet použitých markerů charakterizujících jednotlivé izoláty. Pokud se na území České republiky podíváme v kontextu jeho centrální polohy, kterou zaujímá v rámci celé Evropy, nabízí se dva různé pohledy na genotypovou variabilitu přítomnou v místní populaci Bgh. Podle prvního z nich by pozorovaná diverzita měla původ v populacích pocházejících ze zbylých částí světa, které se zde koncentrují, vzájemně kříží a dávají tím základ vzniku pestré škály nových, unikátních izolátů. Výrazná expanze v přepravě lidí i nákladů umožněná zejména masivním rozvojem letecké dopravy, k němuž došlo v posledních desetiletích, v podstatě odstranila přirozené bariéry pro šíření řady druhů organismů a je spojována s rostoucím počtem případů biologických invazí (Tatem *et al.*, 2005). Omezená životnost houbových spor mohla být v dřívějších dobách limitujícím faktorem jejich šíření v celosvětovém měřítku, avšak dálkové lety takovémuto šíření otevírají cestu. Druhá hypotéza vychází z původu hostitelských rostlin padlí travního. Centrum původu kulturní plodiny bylo definováno jako geografická oblast, kde daná rostlina vykazuje maximální stupeň diverzity, která má původ převážně v akumulaci mutací u daného druhu během dlouhé časové periody (Vavilov, 1926, cit. Acquaah, 2007). K domestikaci obilovin došlo na Blízkém východě, odkud však jejich pěstování poměrně záhy proniklo do Evropy. Za předpokladu koevoluce obilovin a padlí travního (Oberhaensli *et al.*, 2011) se tak Evropa mohla stát zdrojem jeho variability pro globální šíření na ostatní kontinenty.

Kromě formulování hypotéz zabývajících se diverzitou izolátů a dynamikou jejich populací lze vytvořený soubor markerů využít i pro jednoznačnou identifikaci různých patotypů nebo jejich skupin. Tato praktická aplikace by představovala doplnění ke klasickému

fenotypování založenému na pracném a časově náročném určování virulencí. Předpokladem pro ověřování fenotypu pomocí DNA polymorfismu je však nalezení markerů vyznačujících se dostatečně těsnou asociací se sledovanými virulencemi. Pro uplatnění přístupu asociační analýzy by bylo nutné rozšířit současnou sadu markerů nebo využít NGS techniky, případné nalezení signifikantních asociací by však znamenalo výrazné usnadnění práce. Potenciálním úskalím navrženého přístupu by se mohlo stát množství spor vyžadované pro získání DNA, proto by bylo nutné nejprve optimalizovat metodu extrakce DNA tak, aby vyhovovala specifickým vlastnostem tohoto biologického materiálu. Jako jedno z možných řešení popsaného problému se nabízí PCR amplifikace prováděná přímo z intaktních konidiospor (Aufauvre-Brown *et al*., 2003), případně některá z používaných modifikací tohoto protokolu. Po doladění metodických aspektů navrženého přístupu by molekulární data mohla být použita např. jako nástroj pro identifikaci převažujícího patotypu působícího škody v určité lokalitě, získané informace by následně bylo možné uplatnit pro výběr vhodného fungicidu, případně rezistentního kultivaru ječmene. V současné době je úspěšně využívána širokospektrální *mlo* rezistence, dosud bylo popsáno pouze její částečné, dočasné prolomení jako následek působení vodního stresu (Baker *et al*., 2000) nebo expozice vysokým teplotám v laboratorních podmínkách (Schwarzbach, 2001). Tyto faktory by mohly být zodpovědné i za příležitostně pozorované propuknutí infekce na poli s *mlo* kultivary. Pokud by však v budoucnu došlo k úplnému prolomení této dosud účinné rezistence, bude zapotřebí nového přístupu k ochraně ječmene před infekcí Bgh a úsilí věnované studiu tohoto patogenu by proto ani nadále nemělo polevit.

7 ZÁVĚR

Problematika patogeneze padlí travního je velmi obsáhlá a není v možnostech této práce postihnout ji celou se všemi specifiky a implikacemi, kterými se vyznačuje. Z tohoto důvodu byl v teoretickém úvodu kladen důraz pouze na základní informace o biologii, životní strategii a dopadu patogenu *Blumeria graminis*, větší pozornost byla věnována studiu diverzity a fylogeneze, a to zejména na vnitrodruhové úrovni, dále pak struktuře genomu a genetické podstatě interakcí s hostitelem. Ve stručnosti pak byla nastíněna některá základní fakta týkající se typů DNA markerů použitých v praktické části této práce.

Stěžejním cílem experimentální části předložené studie byl design sady markerů schopných rozlišit jednotlivé izoláty padlí travního ječmene, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*., jejichž uplatnění by postihovalo různé oblasti výzkumu zaměřeného na tento obligátně biotrofní patogen. Na základě genomické sekvence Bgh kmene DH14 bylo navrženo 10 párů primerů specifických pro lokusy s výskytem mikrosatelitových motivů a 20 párů primerů vycházejících z nalezených retrotransposonů nadrodin *Copia* a *Gypsy*. Testováním všech amplikonů byla získána sada 16 SSR, 2 ISBP/RJM a 14 SNP spolehlivých polymorfismů, které byly ve druhé fázi práce aplikovány na soubor studovaných izolátů Bgh.

Data získaná genotypováním 158 izolátů s využitím 32 uvedených markerů vedla k detekci dostatečné genetické variability umožňující ve většině případů jednoznačnou identifikaci daných izolátů. Genotypové profily jednotlivých izolátů se staly základem pro vytvoření kladogramu rekonstruujícího jejich vzájemné evoluční vztahy, který ve spojení s daty o geografickém původu daných izolátů otevírá novou perspektivu ve studiu dynamiky šíření různých patotypů v populaci Bgh, a to nejen v celosvětovém měřítku, nýbrž i v rámci geograficky limitovaného území, jakým je Česká republika. V případě dalšího rozšíření souboru markerů se nabízí jejich využití pro hledání asociací s daty o virulencích jednotlivých patotypů. Přidáním času jako další veličiny by popsaná strategie mohla v dlouhodobém horizontu napomoci posunutí hranic našeho poznání v oblasti dynamiky vývoje patogenu a jeho interakcí s hostitelem. Snaha o lepší pochopení tohoto silně provázaného a komplikovaného systému může v konečném důsledku zásadním způsobem přispět i k řešení na první pohled vzdáleného problému se zajištěním dostatku potravin pro neustále rostoucí lidskou populaci, kromě toho by mohla napomoci snížení zatížení životního prostředí omezením používání fungicidů.

8 LITERATURA

Acquaah, G. (2007): The art and science of plant breeding. In: Principles of Plant Genetics and Breeding, pp. 19, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 (3): 403 – 410.

Arabi, M. I. E., Jawhar, M. (2010): Heterogenity in *Fusarium* species as revealed by inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) analysis. Journal of Plant Pathology 92 (3): 753 – 757.

Aufauvre-Brown, A., Tang, C. M., Holden, D. W. (1993): Detection of gene-disruption events in *Aspergillus* transformants by polymerase chain reaction direct from conidiospores. Current Genetics 24 (1-2): 177 – 178.

Baker, S. J., Newton, A. C., Gurr, S. J. (2000): Cellular characteristics of temporary partial breakdown of *mlo*-resistance in barley to powdery mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology 56 (1): 1 – 11.

Bennett, F. G. A. (1984): Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes. Plant Pathology 33 (3): 279 – 300.

Bindschedler, L. V., McGuffin, L. J., Burgis, T. A., Spanu, P. D., Cramer, R. (2011): Proteogenomics and *in silico* structural and functional annotation of the barley powdery mildew *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Methods 54 (4): 432 – 441.

BluGen (2010): The Blumeria Sequencing Project. Available at http://www.blugen.org/, October 2011.

Borbye, L., Linde-Laursen, I. B., Christiansen, S. K., Giese, H. (1992): The chromosome complement of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* analyzed by light microscopy and field inversion gel electrophoresis. Mycological Research 96 (2): 97 – 102.

Borbye, L., Giese, H. (1994): Genome manipulation in recalcitrant species: construction and characterization of a yeast artificial chromosome (YAC) library from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, an obligate fungal pathogen of barley. Gene 144 (1): 107 – 111.

Brown, J. K. M., O'Dell, M., Simpson, C. G., Wolfe, M. S. (1990): The use of DNA polymorphisms to test hypotheses about a population of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Pathology 39 (3): 391 – 401.

Brown, J. K. M., Jessop, A. C. (1995): Genetics of avirulences in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Pathology 44 (6): 1 039 – 1 049.

Braun, U., Cook, R. T. A., Inman, A. J., Shin, H. D. (2002): The taxonomy of powdery mildew fungi. In: Bélanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J., Carver, T. L. V., (ed.): The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise, pp. 13 – 55, APS Press, St. Paul, USA.

Caffier, V., de Vallavieille-Pope, C., Brown, J. K. M. (1996): Segregation of avirulences and genetic basis of infection types in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Phytopathology 86 (10): 1 112 – 1 121.

Christiansen, S. K., Giese, H. (1990): Genetic analysis of the obligate parasitic barley powdery mildew fungus based on RFLP and virulence loci. Theoretical and Applied Genetics 79 (5): 705 – 712.

Český statistický úřad (2012): Vývoj osevních ploch a první odhad sklizně. Available at http://www.czso.cz/ , March 2013.

Damgaard, C., Giese, H. (1996): Genetic variation in Danish populations of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*: estimation of gene diverzity and effective population size using RFLP data. Plant Pathology 45 (4): 691 – 696.

Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D. (2012): The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 13 (4): 414 – 430.

Devos, K. M., Ma, J. X., Pontaroli, A. C., Pratt, L. H., Bennetzen, J. L. (2005): Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 102 (52): 19 243 – 19 248.

Dreiseitl, A., Pickering, R. A. (1999): Pathogenicity of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in New Zealand in 1997. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 27 (4): 273 – 280.

Dreiseitl, A. (2004): Virulence frequencies to powdery mildew resistance genes of winter barley cultivars. Plant Protection Science 40 (4): 135 – 140.

Dreiseitl, A., Dinoor, A., Kosman, E. (2006): Virulence and diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Israel and in the Czech Republic. Plant Disease 90 (8): 1 031 – 1 038.

Dreisetil, A. (2008): Virulence frequency to powdery mildew resistances in winter barley cultivars. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44 (4): 160 – 166.

Dreiseitl, A. (2011): Differences in powdery mildew epidemics in spring and winter barley based on 30-year variety trials. Annals of Applied Biology 159 (1): 49 – 57.

Dreiseitl, A, Fowler, R., Platz, G. (2013): Pathogenicity of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Australia in 2010 and 2011. Australasian Plant Pathology, accepted.

Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barrès., B., Carlier, J., Tharreau, D., Giraud, T. (2007): Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genetics and Biology 44 (10): 933 – 949.

Eshed, N., Wahl, I. (1970): Host ranges and interrelations of *Erysiphe graminis hordei*, *E. graminis tritici*, and *E. graminis avenae*. Phytopathology 60 (4): 628 – 634.

FaoStat (2012): Top Production – World (Total) – 2010. Available at http://faostat.fao.org/ , November 2012.

Felsenstein, J. (2005): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., de Vicente, A., Pérez-García, A. (2007): Multiple displacement amplification, a powerful tool for molecular genetic analysis of powdery mildew fungi. Current Genetics 51 (3): 209 – 219.

Flavell, A. J., Knox, M. R., Pearce, S. R., Ellis, T. H. N. (1998): Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. The Plant Journal 16 (5): 643 – 650.

Flor, H. H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9: 275 – 296.

Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., Schulze-Lefert, P. (1996): Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. The Plant Cell 8 (1): 5 – 14.

Gergis, J., Garden, D., Fenby, C. (2010): The influence of climate on the first european settlement of Australia: A comparison of weather journals, documentary data and paleoclimate records, 1788 – 1793. Enviromental History 15 (3): 485 – 507.

Giese, H., Christiansen, S. K., Jensen, H. P. (1990): Extrachromosomal plasmid-like DNA in the obligate parasitic fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Theoretical and Applied Genetics 79 (1): 56 – 64.

Glawe, D. A. (2008): A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 46: 27 – 51.

Hückelhoven, R., Panstruga, R. (2011): Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. Current Opinion in Plant Biology 14 (6): 738 – 746.

Inuma, T., Khodaparast, S. A., Takamatsu, S. (2007): Multilocus phylogenetic analysis within *Blumeria graminis*, a powdery mildew fungi of cereals. Molecular Phylogenetics and Evolution 44 (2): 741 – 751.

Jørgensen, J. H. (1994): Genetics of powdery mildew resistance in barley. Critical Reviews in Plant Sciences 13 (1): 97 – 119.

Jurka, J., Kohany, O. (2011): LTR retrotransposons from barley powdery mildew. Repbase Reports 11 (9), 2 333 – 2 333.

Koch, G., Köhler, W. (1990): Isozyme variation and genetic distances of *Erysiphe graminis* DC. *formae speciales*. Journal of Phytopathology 129 (2): 89 – 101.

Koch, G., Köhler, W. (1991): Isozyme variation and genetic diverzity of the European barley powdery mildew population. Journal of Phytopathology 131 (4): 333 – 344.

Komínková, E. (2011): Padlí travní a studium jeho diverzity v rámci České republiky. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.

Kumar, A., Hirochika, H. (2001): Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends in Plant Science 6 (3): 127 – 134.

Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., Pandey, B. K. (2009): Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics 2 (4): 141 – 162.

Last, F. T. (1962): Analysis of effects of *Erysiphe graminis* DC. on growth of barley. Annals of Botany 26 (102): 279 – 289.

Lee, D., Ellis, T. H. N., Turner, L., Hellens, R. P., Cleary, W. G. (1990): A *copia*-like element in *Pisum* demonstrates the uses of dispersed repeated sequences in genetic analysis. Plant Molecular Biology 15 (5): 707 – 722.

Lim, S., Notley-McRobb, L., Lim, M., Carter, D. A. (2004): A comparison of the nature and abundance of microsatellite in 14 fungal genomes. Fungal Genetics and Biology 41 (11): 1 025 – 1 036.

Lyngjær, M. F., Newton, A. C., Atzema, J. L., Baker, S. J. (2000): The barley *mlo*-gene: an important powdery mildew resistance source. Agronomie 20 (7): 745 – 756.

Martins, W. S., Lucas, D. C. S., Neves, K. F. S., Bertioli, D. J. (2009): WebSat – a web software for microsatellite marker developement. Bioinformation 3 (6): 282 – 283.

Matsuda, S., Takamatsu, S. (2003): Evolution of host-parasite relationships of *Golovinomyces* (Ascomycete: Erysiphaceae) interferred from nuclear rDNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 27 (2): 314 – 327.

McDemott, J. M., McDonald, B. A. (1993): Gene flow in plant pathosystems. Annual Review of Phytopathology 31: 353 – 373.

McDermott, J. M., Brändle, U., Dutly, F., Haemmerli, U. A., Keller, S., Müller, K. E., Wolfe, M. S. (1994): Genetic variation in powdery mildew of barley: Developement of RAPD, SCAR and VNTR markers. Phytopathology 84 (11): 1 316 – 1 321.

Metzker, M. L. (2010): Sequencing technologies – the next generation. Nature Reviews Genetics 11 (1): 31 – 46.

Moseman, J. G. (1959): Host-pathogen interaction of the genes for resistance in *Hordeum vulgare* and for pathogenicity in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Phytopathology 49 (8): 469 – 474.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, S., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 51: 263 – 273.

Murat, C., Riccioni, C., Belfiori, B., Cichocki, N., Labbe, J., Morin, E., Tisserant, E., Paolocci, F., Rubini, A., Martin, F. (2011): Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. Fungal Genetics and Biology 48 (6): 592 – 601.

Newton, A. C., Hackett, C. A., Guy, D. C. (1998): Diverzity and complexity of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* collected from barley cultivar mixtures or barley plots treated with a resistance elicitor. European Journal of Plant Pathology 104 (9): 925 – 931.

Oberhaensli, S., Parlange, F., Buchmann, J. P., Jenny, F. H., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Spanu, P. D., Keller, B., Wicker, T. (2011): Comparative sequence analysis of wheat and barley powdery mildew fungi reveals colinearity, dates divergence and indicates host-pathogen co-evolution. Fungal Genetics and Biology 48 (3): 327 – 334.

O'Dell, M., Wolfe, M. S., Flavell, R. B., Simpson, C. G., Summers, R. W. (1989): Molecular variation in populations of *Erysiphe graminis* on barley, oats and rye. Plant Pathology 38 (3): 340 – 351.

OECD-FAO Agricultural Outlook (2013): Overview: A time for change. Available at http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/ , January 2013.

Park, R. F., Jahoor, A., Felsenstein, F. G. (2000): Population structure of *Puccinia recondita* in western Europe during 1995, as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers. Journal od Phytopathology – Phytopathologische Zeitschrift 148 (3): 169 – 179.

Parlange, F., Oberhaesli, S., Breen, J., Platzer, M., Taudien, S., Šimková, H., Wicker, T., Doležel, J., Keller, B. (2011): A major invasion of transposable elements accounts for the large size of the *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* genome. Functional & Integrative Genomics 11 (4): 671 – 677.

Pasquali, M., Dematheis, F., Gullino, M. L., Garibaldi, A. (2007): Identification of race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* on lettuce by inter-retrotransposon sequence-characterized amplified region technique. Phytopathology 97 (8): 987 – 996.

Paux, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C. (2006): Characterizing the composition and evolution of homoelogous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. The Plant Journal 48 (3): 463 – 474.

Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J. P., Sourdille, P., Balfourier, F., Le Paslier, M. C., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C. (2010): Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome

saturation and marker-assisted selection in wheat. Plant Biotechnology Journal 8 (2): 196 – 210.

Pedersen, C., Wu, B. Q., Giese, H. (2002a): A *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* BAC library – contig building and microsynteny studies. Current Genetics 42 (2): 103 – 113.

Pedersen, C., Rasmussen, S. W., Giese, H. (2002b): A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes and molecular markers. Fungal Genetics and Biology 35 (3): 235 – 246.

Pedersen, C., van Themaat, E. V., McGuffin, L., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Barton, G., Bindschedler, L. V., Lu, X., Maekawa, T., Weßling, R., Cramer, R., Thordal-Christensen, H., Panstruga, R., Spanu, P. D. (2012): Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. BMC Genomics, 13 (1): 694.

Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C. R. (1993): Microsatellites and kinship. Tree 8 (8): 285 – 288.

Rambaut, A. (2012): FigTree version 1.4. Distributed by the author. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.

Rasmussen, M., Rossen, L., Giese, H. (1993): SINE-like properties of a highly repetitive element in the genome of the obligate parasitic fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Molecular & General Genetics 239 (1 – 2): 298 – 303.

Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G., Brown, J. K. M. (2006): Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. Plant Cell 18 (9): 2 402 – 2 414.

Rozen, S., Skaletsky, H. J. (2000): Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (eds): Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology, pp 365 – 386, Humana Press, Totowa, New York.

Sacristan, S., Vigouroux, M., Pedersen, C., Skamnioti, P., Thordal-Christensen, H., Micali, C., Brown, J. K. M., Ridout, C. J. (2009): Coevolution between a family of parasite virulence effectors and a class of LINE-1 retrotransposons. Plos One 4 (10): e7 463.

Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406 – 425.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74 (12): 5 463 – 5 467.

Schlötterer, C., Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research 20 (2): 211 – 215.

Schulze-Lefert, P., Vogel, J. (2000): Closing the ranks to attack by powdery mildew. Trends in Plant Science 5 (8): 343 – 348.

Schwarzbach, E. (2001): Heat induced susceptibility of *mlo*-barley to powdery mildew. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 37 (3): 82 – 87.

Silva, J. R. Q., Figueira, A., Pereira, G. A. G., Albuquerque, P. (2008): Development of novel microsatellites frim Moniliophthora perniciosa, causal agent of the witches‘ broom disease of Theobroma cacao. Molecular Ecology Resources 8 (4): 783 – 785.

Skamnioti, P., Pedersen, C., Al-Chaarani, G. R., Holefors. A., Thordal-Christensen, H., Brown, J. K. M., Ridout, C. J. (2008): Genetics of avirulence genes in *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and physical mapping of AVR_{a22} and AVR_{a12}. Fungal Genetics and Biology 45 (3): 243 – 252.

Soanes, D. M., Skinner, W., Keon, J., Hargreaves, J., Talbot, N. J. (2002): Genomics of phytopathogenic fungi and the developement of bioinformatic resources. Molecular Plant-Microbe Interactions 15 (5): 421 – 427.

Soanes, D. M., Talbot, N. J. (2006): Comparative genomic analysis of phytopathogenic fungi using expressed sequence tag (EST) collections. Molecular Plant Pathology 7 (1): 61 – 70.

Spanu, P. D., Abbott, J. C, Amselem J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Stüber, K., van Themaat, E. V. L., Brown, J. K. M, Butcher, S. A., Gurr, S. J., Lebrun, M. H., Ridout, C. J., Schulze-Lefert, P., Talbot, N. J., Ahmadinejad, N., Ametz, C., Barton, G. R., Benjdia, M., Bidzinski, P., Bindschedler, L. V., Both, M., Brewer, M.T., Cadle-Davidson, L., Cadle-Davidson, M. M., Collemare, J., Cramer, R., Frenkel, O., Godfrey, D., Harriman, J., Hoede, C., King, B. C., Klages, S., Kleemann, J., Knoll, D., Koti, P.S., Kreplak, J.,. López-Ruiz, F. J., Lu, X., Maekawa, T., Mahanil, S., Micali, C., Milgroom, M.G., Montana, G., Noir, S., O'Connell, R. J., Oberhaensli, S., Parlange, F., Pedersen, C., Quesneville, H., Reinhardt, R., Rott, M., Sacristán, S.,

Schmidt, S. M., Schön, M., Skamnioti, P., Sommer, H., Stephens, A., Takahara, H., Thordal-Christensen, H., Vigouroux, M., Weßling, R., Wicker, T., Panstruga, R. (2010): Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. Science 330 (6010): 1 543 – 1 546.

Spanu, P. D., Panstruga, R. (2012): Powdery mildew genomes in the crosshairs. New Phytologist 195 (1): 20 – 22.

Spanu, P. D. (2012): The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. Annual Review of Phytopathology 50: 91 – 109.

Stebbins G. L. (1989): Introduction. In: Soltis, D. E., Soltis, P. S. (ed.): Isozymes in Plant Biology, pp. 1 – 4, Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.

Šimková, H., Svensson, J. T., Condamine, P., Hřibová, E., Suchánková, P., Bhat, P. R., Bartoš, J., Šafář, J., Close, T. J., Doležel, J. (2008): Coupling amplified DNA from flow-sorted chromosomes to high-density SNP mapping in barley. BMC Genomics 9 (1): 294.

Tamura, K., Peterson, D., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2 731 – 2 739.

Takamatsu, S., Matsuda, S. (2004): Estimation of molecular clocks for ITS and 28S rDNA in *Erysiphales*. Mycoscience 45 (5): 340 – 344.

Tapke, V. F. (1953): Further studies on barley powdery mildew as influenced by environment. Phytopathology 43 (3): 162 – 166.

Tatem, A. J., Hay, S. I., Rogers, D. J. (2005): Global traffic and disease vector dispersal. Proceeidings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (16): 6 242 – 6 247.

Tautz, D., Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous compmonents of eukaryotic genomes. Nucleic Acid Research 12 (10): 4 127 – 4 138.

Thomas, S. W., Rasmussen, S. W., Glaring, M. A., Rouster, J. A., Christiansen, S. K., Oliver, R. P. (2001): Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. Fungal Genetics and Biology 33 (3): 195 – 211.

Web of Knowledge (2013): Web of Science® Search. Available at http://apps.webofknowledge.com/ , January 2013.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G. (2005): Detecting DNA variation by molecular markers. In: DNA Fingerprinting in Plants – Principles, Methods and Applications, pp. 21 – 74, CRC Press Taylor & Francis Group, New York, USA.

Wendel, J. F., Weeden, N. F. (1989): Visualization and interpretation of plant isozymes. In: Soltis, D. E., Soltis, P. S. (ed.): Isozymes in Plant Biology, pp. 5 – 45, Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA.

Wolfe, M. S. (1984): Trying to understand and control powdery mildew. Plant Pathology 33 (4): 451 – 466.

Wolfe, M. S., Brändle, U., Koller, B., Limpert, E., McDermott, J. M., Müller, K., Schaffner, D. (1992): Barley mildew in Europe – population biology and host resistance. Euphytica 63 (1 – 2), 125 – 139.

Wyand, R. A., Brown, J. K. M. (2003): Genetic and forma specialis diverzity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution. Molecular Plant Pathology 4 (3): 187 – 198.

Yarwood, C. E. (1957): Powdery mildews. Botanical Review 23 (4): 235 – 301.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11 (1): 1 – 16.

Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Skamnioti, P., Gurr, S. J. (2005): Of genes and genomes, needles and haystacks: *Blumeria graminis* and functionality. Molecular Plant Pathology 6 (5): 561 – 575.

Zhang, W., Pedersen, C., Kwaaitaal, M., Gregersen, P. L., Mørch, S. N., Hanisch, S., Kristensen, A., Fuglsang, A. T., Collinge, D. B., Thordal-Christensen, H. (2012): Interaction of barley powdery mildew effector candidate CSEP0055 with the defence protein PR17c. Molecular Plant Pathology 13 (9): 1 110 – 1 119.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

6-FAM	6-carboxyfluorescein
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	Ammonium Persulfate
AUS	Austrálie
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BES	BAC-End Sequencing
Bgh	*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*
Bgt	*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*
CAPS	Cleaved Amplified Polymorfic Sequence
cDNA	Complementary DNA
CSEP	Candidates for Secreted Effector Protein
CZE	Česká republika
DNA	Deoxyribonucleotide Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EST	Expressed Sequence Tag
ff. spp.	*Formae speciales*
FIGE	Field Inversion Gel Elecrophoresis
f. sp.	*Forma specialis*
GFG	Gene-for-gene
GPD	gen pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu
CHN	Čína
IGS	Ribosomal Intergenic Spacer
IRAP	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISBP	Insertion Site Based Polymorphism

ISR	Izrael
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
JPN	Japonsko
LINE	Long Interspersed Nuclear Element
LTR	Long Terminal Repeat
MDA	Multiple Displacement Amplification
NGS	Next Generation Sequencing
PAA	Polyacrylamide
PAGE	Polyacylamide Gel Electrophoresis
PAV	Presence/Absence Variation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Pathogenesis-Related Proteins
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal DNA
RBIP	Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism
REMAP	Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism
Rep-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIP	Repeat-Induced Point Mutation
RJM	Repeat Junction Marker
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SINE	Short Interspersed Nuclear Element
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat

TE	Transposable Elements
TEMED	N, N, N‘, N‘- tetramethylethylendiamin
TSD	Target Site Duplication
UK	Velká Británie
URY	Uruguay
USA	Spojené státy americké
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZAF	Jihoafrická republika