

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

**STUDIUM GENETICKÉ VARIABILITY HOUBOVÝCH
PATOGENŮ A MOŽNOSTI JEJICH DETEKCE
V PLETIVECH HOSTITELSKÉ ROSTLINY**

Doktorská disertační práce

Leona Leišová

Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze – Ruzyni



Prohlašuji, že doktorskou disertační práci jsem vypracovala samostatně a že jsem použila pouze prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Klára Ševčíková

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Jaroslavě Ovesné, CSc. za zadání tématu práce, za odbornou pomoc při řešení dané problematiky a za připomínky k textu této disertační práce.

Dále bych ráda poděkovala Ing. Ladislavu Kučerovi, CSc. za čas, který mi věnoval při plánování pokusů a za statistické zpracování získaných dat.

Můj dík patří Ing. Mgr. Věře Minaříkové za dodání izolátů většiny studovaných hub, jejich určení a za poskytnutí mnoha cenných rad a informací.

Dále děkuji Mgr. Janě Palicové-Šárové, PhD. za poskytnutí izolátů hub *Pyrenophora tritici-repentis* a za napěstování všech izolátů pro izolaci DNA. Mgr. Aleně Hanzalové děkuji za zapůjčení prostoru ve skleníku a za pomoc při realizaci pokusů umělé infekce rostlin ve skleníkových podmínkách.

Mnohokrát děkuji Ing. Pavlovi Bartošovi, DrSc. za vždy ochotné pročtení a jazykovou korekturu anglicky psaných článků.

Závěrem bych ráda poděkovala Haně Udavské za technickou pomoc v laboratoři a za morální podporu po celou dobu řešení projektu, jehož výsledky jsou shrnuty v této disertační práci.

Summary

Net blotch caused by fungus *Pyrenophora teres* Drechs. (anamorph. *Drechslera teres* Sacc.) is an important disease of barley (*Hordeum vulgare*). It is widespread and causes considerable yield losses. There are two morphologically similar forms of *Pyrenophora teres*: *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* and *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* that differ in leaf symptoms. The genetic structure of *Pyrenophora teres* populations was examined using amplified fragment length polymorphism analysis (AFLP). Using 19 primer combinations 948 polymorphic bands were detected in 83 mainly Czech isolates of *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora tritici-repentis* and *Helminthosporium sativum*. Each species had distinct AFLP profile. All main clusters in dendrogram correspond to the studied species. Even the two forms of *Pyrenophora teres* constituted different clusters.

Unweighted pair-group method (UPGMA) analysis of the 37 isolates of *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* and 30 isolates of *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*, using 469 polymorphic bands, showed that the variability seemed to have been influenced more by the year of sampling than by the geographic origin of the isolate. The presence of intermediate haplotypes with a relatively high number of shared markers between the two groups indicated that hybridisation between the forms of *Pyrenophora teres* could happen, but it is probably often overlapped by selection pressure or genetic drift.

In spite of the symptoms it is difficult to distinguish the two forms morphologically in culture. As resistance to the two forms of *Pyrenophora teres* is inherited independently it is important the pathogen to be correctly identified. For this purpose, molecular markers were developed. AFLP analysis was used also to identify amplification products that are characteristic of either *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* or *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Selected fragments were cloned, sequenced and primer pairs were designed. They permitted specific detection of *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* or *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* using conventional PCR.

To monitor and quantify the occurrence of the both forms of *Pyrenophora teres* during the growing season, diagnostic system based on real-time PCR was developed. Primers and TaqMan MGB probes were designed. They showed high specificity for each of the two forms of *Pyrenophora teres*. As a host plant internal standard, primers and TaqMan probe based on *RacB* gene sequence were designed. The method was optimised on a pure fungal and plant DNA samples. The starting copy numbers of target sequences present in each reaction were calculated by comparing the Ct values of unknown samples to the Ct values of plasmid

standards dilutions with known copies number of target DNA. The Ct value depends on the input of starting copies and is defined as that cycle number at which a statistically significant increase in the reporter fluorescence can be first detected. The assay detects down to five gene copies per reaction. It is able to produce reliable data over a range of six orders of magnitude.

The developed assay was used to differentiate and quantify the both forms of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves. A good correlation between Ct values and the size of necrotic symptoms was obtained ($R^2=0.52$) at the early stage of the infection. Application of the TaqMan technology to field samples collected in 20 barley varieties in the region Kroměříž during the growing season of 2003 and 2004 revealed that *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* predominated on barley leaves in these two years.

The TaqMan real-time PCR assay showed to be a useful tool to quantify and monitor the dynamics of the occurrence of the both forms of *Pyrenophora teres* during growing seasons.

Přehled zkratk

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARMS	Amplified Refractory Mutation System
CCD	Charge-Coupled Device
Ct	Cycle Treshold
DI	Diversity Index
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
gdph	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTZ	Hmotnost Tisíce Zrn
ICBN	International Code of Botanical Nomenclature
IGS	Intergenic Spacer
ITS	Internal Transcribed Spacer
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAS	Marker Assisted Selection
MGB	Minor Groove Binder
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pyggy	<i>Pyrenophora graminea</i> gypsy
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid
SCAR	Sequence-Characterised Amplified Region
SDS PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulphate PolyacrylAmide-Gel Electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
S-SAP	Sequence-Specific Amplified Polymorphism
SSH	Suppression Subtractive Hybridisation
STS	Sequence Tagged Site
tRNA	transfer Ribonucleic Acid

Obsah

1. Úvod a cíle disertační práce	8
2. Literární přehled	10
2.1. Taxonomie	10
2.2. Morfologie a životní cyklus patogena	13
2.3. Epidemiologie	17
2.3.1. Hostitelé	17
2.3.2. Výskyt	17
2.3.4. Symptomy	18
2.3.5. Infekční cyklus	18
2.3.6. Infekce	19
2.3.7. Toxiny	22
2.4. Genom a genetická variabilita	24
2.5. Možnosti detekce	29
2.6. Hospodářský význam a ochrana	32
3. Výsledky	35
3.1. Studium variability populace <i>Pyrenophora teres</i> metodami molekulární biologie	35
3.2. Využití DNA markerů v diagnostice <i>Pyrenophora teres</i>	46
3.3. Vývoj metody pro druhově specifickou kvantitativní detekci <i>Pyrenophora teres</i> v pletivech hostitelské rostliny.....	66
4. Diskuse	92
5. Závěr	99
6. Literatura	101

1. Úvod a cíle disertační práce

Obecně přijímaným trendem současné doby je minimalizace používání chemických přípravků v rostlinné produkci. Proto je všude tam, kde je to možné, dávána přednost pěstování rezistentních odrůd před ochranou porostů chemickými přípravky. Šlechtění na rezistenci vůči houbovým patogenům naráží na několik základních spolu souvisejících problémů.

Jedním z nich je značná míra genetické variability patogenů měnící se jak s geografickou vzdáleností, tak i s časem. Je tedy nutno hovořit ne o patogenu jako jedinci, ale o populaci patogena, jejíž struktura je ovlivňována genetickými faktory, podmínkami prostředí a systémem hospodaření, jako je například zavedení pěstování rezistentních odrůd, aplikace fungicidů, zavlažování, střídání plodin apod. Genetické faktory zahrnují mutační procesy, způsob rozmnožování, migraci, velikost populace a selekci. Populace patogenů se vždy adaptují na změněné podmínky a ze šlechtění na rezistenci se tak stává nekonečný proces. Hlubší znalosti struktury populací patogenů a faktorů ovlivňujících jejich strukturu, zvýší účinnost šlechtitelských programů a prodlouží životnost odrůd vyšlechtěných na rezistenci k danému patogenu resp. populaci patogena.

Dalším problémem je určení a přesná detekce patogena jak na kvalitativní, tak i na kvantitativní úrovni, což činí kontrolu daného onemocnění velmi komplikovanou. U velmi variabilních druhů je rozlišení patogenů do druhů, forem či ras obtížné, ale nutné, zvláště, když fungicidy jsou účinné jen na určité druhy či formy, a geny rezistence k jednotlivým druhům, formám a rasám se dědí nezávisle. Navíc může docházet i k záměnám symptomů způsobených patogenem s tzv. fyziologickými skvrnitostmi způsobenými nejčastěji abiotickými stresy.

K vyřešení obou problémů mohou významně přispět metody molekulární biologie. Mohou poskytnout obraz o genetické variabilitě studovaných populací patogena a mohou posoudit, do jaké míry ji ovlivňují jednotlivé uvedené faktory. Pomocí molekulárních markerů lze rozlišit i blízce příbuzné druhy, formy či rasy patogena a lze jejich přítomnost detekovat v napadeném pletivu hostitelských rostlin na kvalitativní i na kvantitativní úrovni.

Hlavním cílem předkládané disertační práce je studium genetické variability houbových patogenů a možnosti jejich detekce v pletivech hostitele. Jako konkrétní modelový organismus byla zvolena houba *Pyrenophora teres* způsobující listové skvrnitosti na ječmeni (*Hordeum vulgare*). Podílí se tak na snížení velikosti asimilující listové plochy, a tím

významně ovlivňuje výnos u sladovnického ječmene a kvalitu píce u krmného ječmene.

Pyrenophora teres patří mezi houbové patogeny vyznačující se vysokou mírou variability, která se mění v závislosti na geografickém výskytu i na čase. Vyskytuje se ve dvou formách (*Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*), které se mohou vzájemně křížit a vytvářet intermediární formy, které se obtížně rozlišují. Rovněž se obtížně odlišuje od druhu *Pyrenophora graminea*, se kterým je rovněž křížitelná *in vitro*. Geny rezistence k tomuto patogenu se dědí ke každé formě nezávisle, a proto je nutno šlechtit na rezistenci ke každé formě zvlášť. Navíc může být tato rezistence snadno překonána nově vzniklým či nově rozšířeným patotypem patogena. Tato fakta činí z druhu *Pyrenophora teres* zajímavý organismus pro studium na úrovni fytopatologické i molekulárně-biologické.

Dílčími cíli práce jsou:

- Studium variability populace *Pyrenophora teres* metodami molekulární biologie
- Využití DNA markerů v diagnostice *Pyrenophora teres*
- Vývoj metody pro druhově specifickou kvantitativní detekci *Pyrenophora teres* v pletivech hostitelské rostliny

2. Literární přehled

2.1. Taxonomie

Listové skvrnitosti na listech ječmene (*Hordeum vulgare* L.) patří mezi nejdůležitější choroby ve všech oblastech, kde je ječmen dominantní zemědělskou plodinou. Jsou způsobovány komplexem houbových patogenů, z nichž každý vytváří odlišné typy symptomů. Nejčastější z nich jsou síťovitá, hnědá a pruhovitá skvrnitost (net blotch, spot blotch a leaf stripe). Hnědá skvrnitost je způsobována houbami: *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* (anamorph. *Drechslera teres* f. sp. *maculata*) a *Helminthosporium sativum* (anamorph. *Drechslera sorokiana* syn. *Bipolaris sorokiana*). Původcem klasické síťovité skvrnitosti listů ječmene je houba *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (anamorph. *Drechslera teres* f. sp. *teres*). Za pruhovitou skvrnitost je zodpovědná houba *Pyrenophora graminea* (anamorph. *Drechslera graminea*) (Minaříková, 2002).

Převážná většina druhů rodu *Pyrenophora* je úzce specializovaná jen na jeden hostitelský rod trav z čeledi Lipnicovité (*Poaceae*). Část druhů má polyfágní vlastnosti a může parazitovat na více rozdílných rodech trav (Ondřej, 2000a; Ondřej, 2000b; Ondřej, 2000c; Campbell and Medd, 2003).

Anamorfní stádium *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem., syn. *Helminthosporium teres* Sacc. je zařazeno do systému takto:

Oddělení: *Eumycota*
Pododdělení: *Deuteromycotina*
Třída: *Hyphomycetes*
Řád: *Hyphomycetales*
Čeleď: *Dematiaceae*
Rod: *Drechslera*

Teleomorfní stádium *Pyrenophora teres* Drechs., syn. *Pleospora teres* Died. je zařazeno do systému takto:

Oddělení: *Eumycota*
Pododdělení: *Ascomycotina*
Třída: *Ascomycetes*
Řád: *Dothideales*
Čeleď: *Pleosporaceae*
Rod: *Pyrenophora*

Fylogenetická analýza rodu *Pyrenophora/Drechslera* založená na analýzách ITS (Internal Transcribed Spacer) oblastí a sekvenčním polymorfismu genu *gpdh* pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu ukázala, že izoláty téhož druhu, nehledě na asexuální či sexuální stádium, tvoří tutéž větev dendrogramu (Zhang and Berbee, 2001). Výsledky této studie odpovídají výsledkům získaným na základě morfologických studií jednotlivých druhů.

Drechslera teres Sacc. byla poprvé nalezena v Itálii roku 1878 a popsána Saccardem roku 1882 pod jménem *Helminthosporium teres* Sacc. Teleomorfní stádium bylo popsáno Drechslerem v roce 1923 jako *Pyrenophora teres* Drechs (Shoemaker, 1962).

V roce 1897 byla poprvé pozorována houba způsobující hnědé skvrnitosti odlišné od těch způsobených houbou *Drechslera teres* a byla popsána Atkinsonem pod jménem *Helminthosporium tuberosum* Atk., později *Drechslera tuberosa* Atk. (Shoemaker, 1962). Teleomorfní stadium bylo nalezeno a popsáno roku 1930 v Japonsku pod jménem *Pyrenophora japonica* Ito & Kurib. Shoemaker (1957) ukázal, že druh původně určený jako *Pyrenophora secalis* Whitehead and Dickson by měl být považován za synonymum *Pyrenophora japonica*.

Odlišení *Pyrenophora japonica* od *Pyrenophora teres* spočívá hlavně v odlišném typu symptomu na listech. Navíc má houba *Pyrenophora japonica* širší okruh hostitelů: Sveřep (*Bromus*), Pohánka (*Cynosurus*), Ječmen (*Hordeum*), Žito (*Secale*) (Shoemaker, 1962). Podle Shoemakera (1962) se *Pyrenophora japonica* od *Pyrenophora teres* odlišuje užšími vřecy (*japonica* 30-42 μ m, *teres* 46-62 μ m) a užšími askosporami (*japonica* 13-19 μ m, *teres* 21-24 μ m). Velikost konidiální jizvy je u *Drechslera teres* 4-6 μ m a u *Drechslera tuberosa* 5 – 6 μ m, rozměry bazální konidiální buňky u se *Drechslera teres* uvádějí 18-20 x 17-19 μ m a u *Drechslera tuberosa* 15-23 x 12-18 μ m. Počet přehrádek je shodný 4-6.

Pro značnou nejednotnost v určení uvedených druhů hub se této problematice věnovalo mnoho autorů. McDonald (1967) došel k závěru, že *Pyrenophora japonica* je mutantní forma značně variabilního druhu *Pyrenophora teres*.

Roku 1971 se Smedegård-Petersen zabýval v Dánsku srovnávacím studiem všech tří úzce příbuzných druhů: *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea* a *Pyrenophora japonica*. Došel k závěru, že morfologické odlišnosti mezi izoláty jsou natolik nevýznamné, že se jedná pravděpodobně o tři formy téhož druhu *Pyrenophora teres*. Jediným rozdílem je typ symptomů, které způsobují na listech hostitele, a tak na základě rozdílného typu skvrnitosti rozdělil druh *Pyrenophora teres* na dvě odlišné formy *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (net typ) a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* Smedeg.-Peters. f. nov. (spot typ) (Smedegård-Petersen, 1971). Druh *Pyrenophora graminea* ponechal nezměněn, neboť se od *Pyrenophora teres* liší

významněji tím, že infekci *Pyrenophora graminea* nelze provést inokulací listů, onemocnění se tedy šíří výhradně obilkami (Smedegård-Petersen, 1976).

V roce 1977 publikoval Smedegård-Petersen práci, ve které se pokusil křížit výše uvedené druhy hub mezi sebou. Získal stabilní potomstvo hybridů, které vykazovaly intermediární typy symptomů na hostitelské odrůdě ječmene Wing (Smedegård-Petersen, 1977a). Autor se na základě výsledků své dlouholeté práce domnívá, že typ symptomů je dán geneticky, dědí se podle Mendelových zákonů a není ovlivněn ani genotypem hostitele ani vlivy prostředí. Pozdější práce Smedegård-Petersena z roku 1983 ukázala, že schopnost *Pyrenophora teres* produkovat net a spot symptomy na listech a *Pyrenophora graminea* pruhovité symptomy na listech odrůdy ječmene Wing je kontrolována třemi genovými páry Ss, Nn a Gg na třech lokusech. Lokusy pro spot (Ss) a net (Nn) symptomy segregují nezávisle a lokusy pro spot (Ss) a pruhovitou skvrnitost (Gg) jsou v úzké vazbě. Virulence a avirulence *Pyrenophora teres* u odrůdy Wing je kontrolována jedním genovým párem.

Ne všechny pozdější pokusy s křížením *Pyrenophora graminea* a dvou forem *Pyrenophora teres* mezi sebou byly úspěšné (Campbell et al., 1999; Peltonen et al., 1996). Vysvětlením je fakt, že jak *Pyrenophora teres* tak i *Pyrenophora graminea* jsou heterotalické houby, u kterých je párovací typ určen jedním genovým párem (McDonald, 1963; Smedegård-Petersen, 1983).

Scott (1991) se věnoval studiu morfologického vzhledu (textury) kolonií izolátů na živných půdách, studiu tvaru a rozměrů konidioforů a konidií a studiu agresivity izolátů v umělých inokulačních testech. Mezi izoláty net a spot typů zjistil řadu podstatných rozdílů a došel k závěru, že se jedná o dva samostatné druhy hub: *Pyrenophora teres* (net typ) a *Pyrenophora japonica* (spot typ) a doporučil ponechat pro původce symptomů typu spot název *Pyrenophora japonica*. Ve své práci uvedl, že spot typ je v Jižní Africe v porostech všech komerčních odrůd ječmene obecně rozšířen, zatímco net typ je vzácný a je nalézán pouze u introdukovaných šlechtitelských materiálů.

Obdobné stanovisko jako Scott, tj. že spot typ (*Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*) tedy *Pyrenophora japonica* je vedle *Pyrenophora teres* samostatným druhem zastává ve své práci i Walwork (1992), který popsal další druh rodu *Pyrenophora* parazitující na ječmeni v Austrálii a nazval ho *Pyrenophora hordei*.

K odlišnému názoru dospěli Louw et al. (1995). Na základě výsledků studia DNA polymorfismu 30 izolátů spot a net typů metodou RAPD se přiklonili k názoru Smedegård-Petersena (1971), že se jedná o dvě formy téhož druhu: *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Zároveň potvrdili identičnost izolátů *Pyrenophora*

japonica a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Morfologické rozdíly mezi oběma formami jsou podle těchto autorů dány vysokou variabilitou v rámci celého druhu *Pyrenophora teres* a značným vlivem prostředí. Udávají jediný stabilní rozdíl mezi oběma formami, a to délku konidií – spot typy mají konidia delší než net typy.

Campbell et al. (1999) studovali délkovou variabilitu amplikonů DNA získaných metodou RAPD u izolátů nalezených v Jižní Africe. Na základě získaných výsledků podpořili tvrzení Louwa et al. (1995), že izoláty způsobující spot typ listové skvrnitosti na ječmeni popsané jako *Pyrenophora japonica* (Scott, 1991) a *Pyrenophora hordei* (Walwork et al., 1992) jsou ve skutečnosti izoláty formy druhu *Pyrenophora teres* – *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Navíc se jim podařilo úspěšně zkřížit obě formy *Pyrenophora teres*, podobně jako Smedegård-Petersen (1977a). Existenci hybridů prokázali inokulací náchylné odrůdy ječmene získanými kříženci a zároveň metodou AFLP, kdy potomstvo křížení vykazovalo odlišné (intermediární) symptomy na listech ječmene a taktéž odlišný profil DNA amplikonů od rodičovských. Někteří kříženci navíc vykazovali zvýšenou rezistenci k testovaným fungicidům. V pozdějších letech titíž autoři uvedené výsledky zopakovali a potvrdili (Campbell and Crous, 2003). Dokonce se jim podařilo nalézt hybridní genotypy v přírodě a tak prokázat, že k této rekombinaci dochází spontánně ve volné přírodě (Campbell et al., 2002). Existence hybridů ukazuje na to, že obě formy *Pyrenophora teres* a zřejmě i *Pyrenophora graminea* mají společného předka, od kterého se oddělily poměrně nedávno (Smedegård-Petersen, 1983).

Přestože otázka, zda spot a net typ houby *Pyrenophora teres* jsou dva druhy nebo dvě formy jednoho druhu není uspokojivě zodpovězena, v literatuře se v současné době uvádějí pod názvy *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*.

Podle mezinárodního kódu botanické nomenklatury (ICBN – International Code of Botanical Nomenclature) se uvádí název pro teleomorfní stádium: *Pyrenophora teres* i přesto, že se obvykle pracuje s anamorfním stádiem houby (*Drechslera teres*).

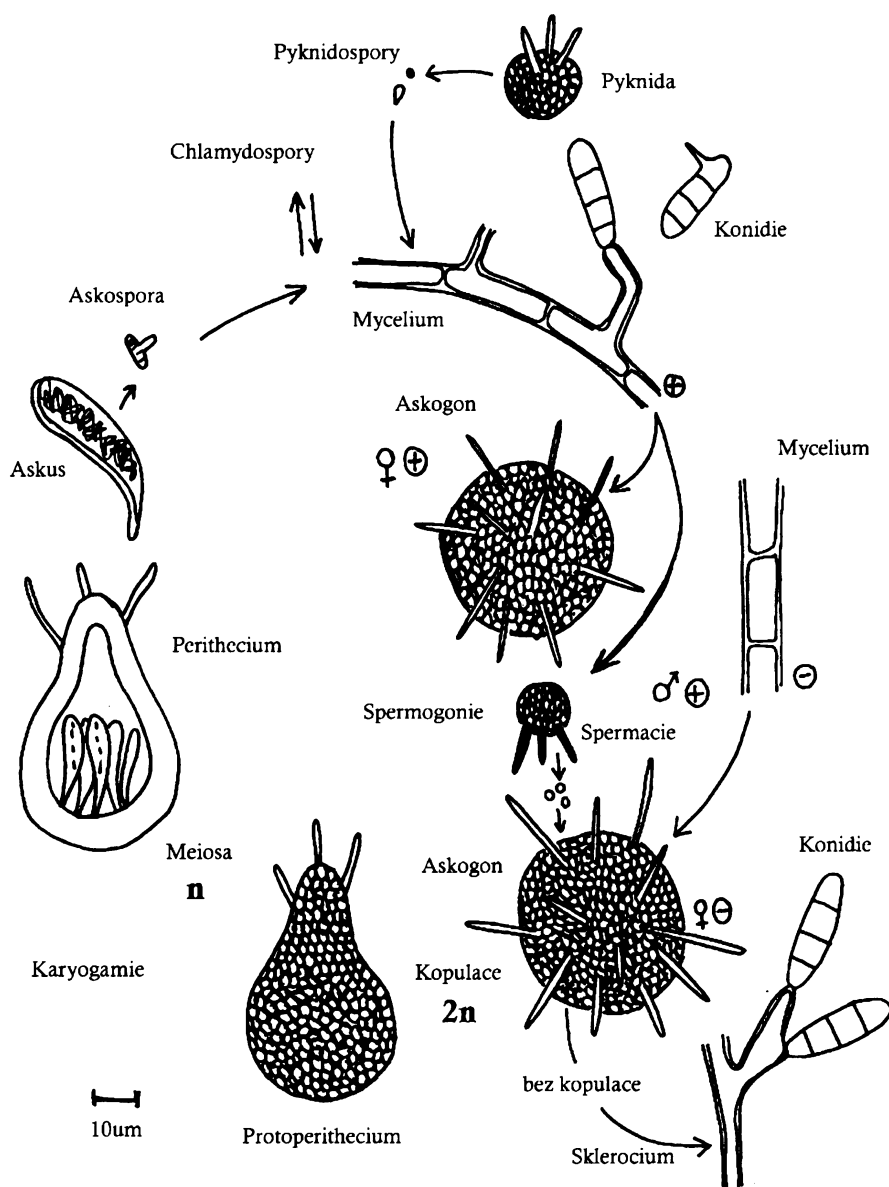
2.2. Morfologie a životní cyklus patogena

Stélka hub sestává z hyf, které tvoří mycelium. Obsahují přehrádky (septa) a mohou být vícejaderná. Mycelium postrádá chlorofyl, a proto jsou houby odkázány na heterotrofní způsob výživy. *Pyrenophora teres* patří mezi fakultativní nekrotrofy, střídá ve svém životním cyklu nekrotrofní a saprotrofní fázi vývoje a způsobu výživy.

Pyrenophora teres je schopna se rozmnožovat jak sexuálně tak i asexuálně (Obrázek 1). Houba vytváří sexuální generaci na posklizňových zbytecích rostlin mezi vegetačními

obdobími a několik asexuálních generací na rostlinách během vegetace (Peever and Milgroom, 1994). Sexuální stádium bylo nalezeno pouze v některých populacích (Shipton et al., 1973). Stále se ještě neví, jak běžně se sexuální stádium vyskytuje, je-li opravdu asexuální forma rozmnožování u *Pyrenophora teres* dominantní.

Obrázek 1 Životní cyklus houby *Pyrenophora teres* (Ali-Haimoud, 1994)



Pyrenophora teres je heterotalický organismus (Obrázek 1) (McDonald, 1963), u kterého je párovací typ určen jedním genovým párem MAT1/ MAT2 kódujícím proteiny o 379/ 333 aminokyselinách (Rau et al., 2005).

Konidie hub rodu *Drechslera* ve stavu zralosti jsou v podstatě cylindrická, lehce žlutohnědá (Obrázek 2). Vznikají přímo na myceliu nebo na konidioforech, které se tvoří volně na myceliu nebo se seskupují v koremie. Vnější stěna konidií je pevná, jemně pigmentovaná a velmi tenká. Vnitřní stěna je amorfni, obvykle hyalinní a často u suchých konidií vypadá, jako by byla zesílená. Protoplasty jsou spojeny póry v přehrádce. Přehrádky v konidiích hub rodu *Drechslera* nejsou přímo spojeny s pevným pigmentovaným exosporiem. Ke konodioforu jsou připojeny malým pórem. Pór je často zakryt tmavým pigmentem, který ho obklopuje. Pigmentová oblast je nápadnější než pór a je popisována jako jizva. Jizva a nevyčnívá z hladkého obrysu bazální buňky. Zralé konidie jsou asi 80-140 μm dlouhé a 16-20 μm široké (Shoemaker, 1962).

Obrázek 2 Konidie *Pyrenophora teres*



Konidiofory jsou červenohnědé barvy s výjimkou světle hnědé stopky. Báze konidioforu je obvykle protáhlá a buď s oválnou nebo špičatou stopkou. Stopka má uniformní průměr, je rovná, přímá a jednoduše nebo vzácně větvená. Přehrádky se vyskytují v pravidelných intervalech. Šířka stopky je 5–15 μm a délka 25–385 μm (Shoemaker, 1962).

Houba vytváří též chlamydospory, klidové spory, které vznikají z článku mycelia ztlustěním stěny nebo uvnitř konidií. Po prasknutí stěny se uvolňují do prostředí.

Plodnice (askokarpy) perfektního stádia *Pyrenophora teres* jsou tvořeny pletivou haploidních hyf. Mají tvar pseudoperithecia, obsahují jednu nebo více dutin, ve kterých je

vždy větší počet vřecek uspořádaných v hymeniu. Zezhora jsou široce eliptická a z boku hemisférická (Obrázek 1). Obsahují jeden nebo více zobáčků. Ve zralosti jsou měkké konzistence a jejich velikost je velmi variabilní (Barrault, 1989).

Vřečka jsou bitunikátní, široce cylindrická, 195-255 μm dlouhá, 46-62 μm široká v nejširším místě a zužující se k vrcholu (Shoemaker, 1962). V mladém vřecku dochází ke karyogamii. Následující meiózou a mitózou vzniká obvykle 8 haploidních jader, ze kterých se vyvíjejí haploidní askospory.

Askospory jsou žlutohnědé, elipsoidní, se třemi příčnými a jednou podélnou přehrádkou v centrálních buňkách. Jejich velikost je 48-53-57 μm x 21-23-24 μm pro *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a 34-51-67 μm x 15-21-28 μm pro *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Rozšiřují se větrem, ale nejsou zdrojem primární infekce, vytvářejí sekundární inokulum. Mohou existovat volně po dobu i dvou let (Shoemaker, 1962).

Kultury na umělých živných médiích tvoří tmavě hnědé chomáče mycelia. Vytvářejí tmavé melaninové a oranžové antrachinonové pigmenty, které se v myceliu obou forem *Pyrenophora teres* vyskytují ve formě krystalků. Syntéza oranžového barviva je ovlivněna podmínkami prostředí, vyskytuje se hlavně v saprofytním myceliu (Barrault, 1989). Růst obou forem *Pyrenophora teres* je rychlý. Optimální teplota pro růst mycelia je 23°C.

Obrázek 3 *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (a) a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* (b) v čisté kultuře na agaru

a



b



2.3. Epidemiologie

2.3.1. Hostitelé

Pyrenophora teres na rozdíl od např. *Pyrenophora tritici-repentis* patří mezi monofágní organismy, je vázána na úzký okruh hostitelů. Jsou jimi různé druhy rodu *Hordeum*: *Hordeum vulgare*, *Hordeum spontaneum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum bulbosum* a *Hordeum marinum*; z jiných druhů byla *Pyrenophora teres* nalezena pouze na *Eragrostis megastachya* (Barrault, 1989) a *Bromus diandrus* (Shipton et al., 1973).

Pouze u *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* byla jak ve skleníkových, tak i v polních podmínkách prokázána schopnost přechodu na pšenici (*Triticum aestivum*). Na listech pšenice vytváří nekrotické skvrny a dokonce sporuluje. Inokulace pšenice formou patogena *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* byla zcela negativní, což potvrdily i testy laboratorní metodou testace segmentů listů na roztoku benzimidazolu (Minaříková, 2002).

Pyrenophora teres f. sp. *maculata* se vyskytuje častěji na ozimém šestiřadém ječmeni (*Hordeum vulgare*) než na jarním dvouřadém (Minaříková and Polišínská, 1999). Má větší konkurenční schopnost, je agresivnější a zřejmě potlačuje i rozvoj net typu (*Pyrenophora teres* f. sp. *teres*) (Scott, 1991; Ondřej, 2000a). K podobnému vývoji došlo i v Jižní Africe, kde byl nejprve pozorován dominantní výskyt *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (Smith and Rattay, 1930), avšak nedávný průzkum odhalil, že net typ se na některých lokalitách nevyskytuje vůbec a že byl nahrazen spot typem (*Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*) (Louw et al., 1996).

Klasický net typ, *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* dominuje na jarních dvouřadých odrůdách ječmene (*Hordeum vulgare*) (Minaříková and Polišínská, 1999).

2.3.2. Výskyt

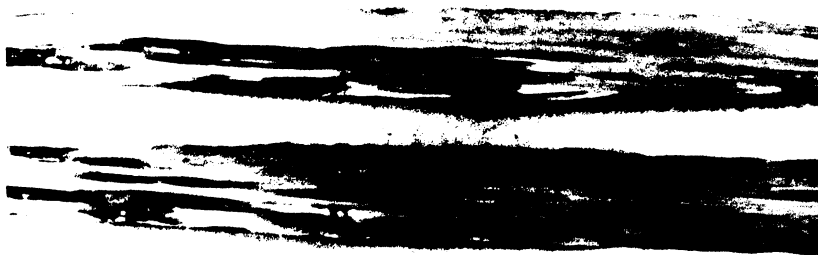
Pyrenophora teres se vyskytuje všude tam, kde se pěstuje ječmen: v Evropě hlavně v Německu, České republice, Dánsku, Finsku, Velké Británii, Rakousku, Holandsku, Polsku, a dalších zemích; v Americe: ve Spojených státech severoamerických, Kanadě, Brazílii, Argentíně; v Asii v Číně, Indii, Iráku, Iránu, Nepálu, Pakistánu, v zemích bývalého Sovětského Svazu a dalších; v Austrálii a na Novém Zélandu (Shipton et al., 1973; Distribution Maps of Plant Diseases 1986, ed. 4, Wallingford, UK, 364).

2.3.3. Symptomy

Každý druh/ forma hub rodu *Pyrenophora* se projevuje typickými symptomy na listech hostitele: *Pyrenophora graminea* způsobuje protáhlé léze, které vedou po celé délce listové čepele a jednoznačně vycházejí už z pochvy. Později způsobují rozštěpení takto napadené listové čepele. Podobné jsou symptomy způsobované net formou *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* s tím rozdílem, že houba nekrotizuje listové pletivo i napříč nervaturou (vytváří síťku) a zásadně se její symptomy objevují nejčastěji v horní třetině listové čepele.

Pyrenophora teres f. sp. *teres* se tedy projevuje protáhlými světle hnědými lézemi s tmavě hnědým síťováním. Nekrotické léze jsou vždy doprovázeny chlorotickou zónou. S časem symptomy mění barvu až do tmavě šedo-hnědé nikoliv však tvar (Shipton et al., 1973) (Obrázek 4).

Obrázek 4 Symptomy na listech ječmene způsobené houbou *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*



Pyrenophora teres f. sp. *maculata* způsobuje na listech tmavě hnědé nekrotické skvrny oválného tvaru bez síťování obklopené různě širokou chlorotickou zónou.

2.3.4. Infekční cyklus

Pyrenophora teres je schopna polycyklické infekce, tzn. že během jedné sezóny tvoří několik generací: několik asexuálních na živých rostlinách během vegetace a jednu sexuální na posklizňových zbytcích rostlin.

Zatímco se *Pyrenophora graminea* šíří výhradně osivem, *Pyrenophora teres* se rozšiřuje jak osivem, tak i inokulací listů během vegetace. Přenos osivem má význam jen v dosud nezamořených oblastech. Je-li však přítomen jiný zdroj primárního inokula, nemá

přenos osivem patrně velký význam (Shipton et al., 1973). Primárním zdrojem inokula jsou zejména posklizňové zbytky rostlin (Piening 1968; Jordan 1981) není však jisté, zda primárním inokulem jsou konidiospory nebo askospory.

Askospory se tvoří během saprofytní fáze života patogena na posklizňových zbytcích, které zůstávají na povrchu půdy (Barrault, 1989). Doba zrání perithécií je 3 až 5 měsíců v závislosti na teplotě (Barrault, 1989). Askospory představují velké nebezpečí z hlediska hostitele hlavně jako potencionální zdroj nových genotypů patogena spíše, než že by byly primárním inokulem (Campbell and Crous, 2003).

Konidie vytvářející se na infikovaných posklizňových zbytcích jsou pravděpodobně nejčastějším primárním inokulem (Barrault, 1989). Konidie, které se tvoří na povrchu nekrotických lézí na listech infikovaných rostlin, a to i rezistentních, způsobují sekundární infekce dalších listů téže rostliny nebo dalších rostlin v okolí. Konidie se šíří větrem, dešťovými kapkami a větrným deštěm.

Konidie klíčí v časovém rozmezí od 30 minut až do 2 hodin při teplotách 20-30°C s optimem při 25°C. Pro infekci listů je optimální teplota 15-25°C a pro kolonizaci 25-29°C (Shipton et al., 1973). Askospory mohou též snadno klíčit po několika hodinách, ale askospory pocházející z křížení často klíčí pomalu nebo neklíčí vůbec (McDonald, 1967).

2.3.5. Infekce

Konidie klíčí asi po pětihodinové periodě vlhka při teplotách mezi 10-25°C po adhezi k povrchu listu hostitele a tvoří apresoria, které pronikají epidermální vrstvou hostitele do 24 hodin po infekci.

Klíčení konidií může být stimulováno různými faktory jako je hydratace, tvrdost povrchu hostitele, dostatek živin a chemické signály. Během klíčení se mobilizují zásobní molekuly jako lipidy, polyalkoholy a uhlovodíky doprovázené rychlou biosyntézou membrán a buněčných stěn (Tucker and Talbot, 2001). Všechny tyto procesy jsou řízeny na úrovni genové exprese. Dilger et al. (2003) studovali, které geny jsou exprimovány během klíčení konidií pomocí metod cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragments Length Polymorphism) a SSH (Suppression Subtractive Hybridisation). Jedenáct z 35 nalezených transkriptů vykazovaly homologii s již popsányými geny jiných vřeckovýtrusých hub. Byly to geny pro transkripční faktory, regulační proteiny, pro protein nutný pro biosyntézu cytochromu C, gen pro oxidázu, threonin syntetázu, gen pro podjednotku fenylalanin-tRNA syntetázy, pro podjednotku RNA polymerázy I, gen pro protein transportující kationty a gen pro podjednotku ATP syntetázy (Dilger et al., 2003).

Z apresoria vyrůstají penetrační hyfy, které pronikají kutikulou a pod ní ležící buněčnou stěnou. K penetraci epidermem dochází jak enzymatickou hydrolýzou kutikuly, tak i mechanicky tlakem apresoria. Penetrační otvor je kulatý, s hladkým okrajem a má průměr 0,7 μ m (Keon and Hargreaves, 1983). Stěny penetrovaných buněk a části stěn sousedních epidermálních buněk bývají impregnovány materiálem s vysokou elektronovou hustotou. Ale tyto vrstvy mizí, jakmile dojde k reorientaci fibrilární struktury buněčné stěny v důsledku pronikání patogena.

V buňkách epidermu se vytvářejí velké primární váčky (vezikuly), které zpočátku obsahují cytoplasmu s množstvím cytoplasmatických měchýřků. Během dalšího vývoje primárního váčku se počet cytoplasmatických měchýřků snižuje, až postupně vymizí. Zároveň narůstá počet mitochondrií, jader, endoplasmatického retikula, dictyosomů a lipidových kapének. Následuje vytvoření sekundárních váček (vezikulů), ze kterých během penetrace vnitřní epidermální vrstvou buněk vyrůstají infekční hyfy a haustoria. Následný růst hyf pletivy mezofylu hostitele se omezuje jen na mezibuněčné prostory. Hlavní funkcí haustorií je absorpce živin z buněk hostitele, které jsou zničeny úplnou ztrátou integrity buněčné membrány.

Pokud se apresoriím nepodaří proniknout do hostitele, je to dáno zesílením stěn buněk hostitele nebo tvorbou papil na povrchu buněčných stěn (Keon and Hargreaves, 1983). Hyfy, které se dostaly do kontaktu s papilami vykazují hustou cytoplasmu s četnými váčky nebo vypadají splaskle či nekroticky. Mechanismus, jak papily zabraňují hyfám patogena v růstu, není znám. Tvoří mechanickou bariéru pronikání jak houby, tak i jejích metabolitů do pletiv hostitele.

Autoři Nachtigal and Kopahnke (1999) se na základě svých výsledků domnívají, že k průniku houby buňkami epidermu dochází u náchylných i u rezistentních genotypů hostitele. Růst hyf je u rezistentních genotypů inhibován až v pletivech mezofylu.

V případě úspěšné penetrace se po dvou dnech vytvářejí léze, které se rozšiřují a hnědnou ukládanými oxidačními produkty enzymatické přeměny polyfenolů v buňkách hostitele. Léze se rozšiřují mezi hlavními cévními svazky a později též mezi příčnými svazky. Buňky infikovaného pletiva vykazují po dvou až třech dnech různé typy poškození a dezorganizace: dochází k vezikulaci tonoplastu, fragmentaci membrán až ke kompletní ztrátě jejich integrity, k poškození chloroplastů, k tvorbě hustých osmofilních částec, posléze i ke zničení jádra. Uvnitř i na povrchu těchto buněk jsou ukládány látky s vysokou elektronovou hustotou. Po úplné ztrátě integrity cytoplasmatické membrány dochází k depozici látek s vysokou elektronovou hustotou uvnitř buněčné stěny i v mezibuněčných prostorech léze.

Hyfy vyskytující se v lézích překonávají intercelulární prostor a jsou připojeny k buněčným stěnám elektronově bohatou vrstvou. Ve třech dnech starých lézích je možné pozorovat, že všechny poškozené buňky jsou ve fyzickém kontaktu s intracelulárně rostoucími hyfami patogena. Žádné hyfy nebyly pozorovány ve zjevně nepoškozených pletivech v blízkosti lézí (Keon and Hargreaves, 1983).

Po sedmi dnech od infekce jsou hnědé léze obklopeny chlorózami a list nese typické známky senescence. Buňky postrádají organely, mizí i vnitřní membrány, ačkoliv cytoplasmatická membrána zůstává intaktní. Uvnitř těchto buněk se hromadí tělíska s látkou s vysokou elektronovou hustotou. V této části pletiva se hyfy patogena vyskytují překvapivě relativně zřídka a to hlavně v blízkosti původní léze. Smrt buněk chlorotického pletiva může být způsobena toxickými sekundárními metabolity patogena, které zde plní funkci spouštěče senescence (Keon and Hargreaves, 1983).

Krupinska et al. (2002) objevili gen, exprimující se v buňkách napadeného pletiva a nazvali ho HvS40. Vysoká hladina transkriptu HvS40 byla pozorována pátý den po infekci v nekrotických a chlorotických pletivech rostliny a to hlavně v buňkách mezofylu. Expres tohoto genu je indukována jasmonáty a kyselinou salicylovou, které jsou známy jako látky účastníci se senescence a obrany rostlin proti patogenům. Krupinska et al. (2002) zjistili, že protein kódovaný genem HvS40 se podílí na degeneraci chloroplastů během senescence a infekce rostlin patogenem *Pyrenophora teres*. Vzhledem k tomu, že *Pyrenophora teres* je nekrotrofní organismus, nejedná se zde o obranu rostliny, ale pravděpodobně naopak patogen vyvolává proces senescence v napadeném pletivu. Aktivní formy kyslíku pak mohou hrát roli spouštěče exprese HvS40 genu (Krupinska et al., 2002). Tento názor může být podpořen výsledky práce Amandy Able (2003), která detekovala přítomnost aktivních forem kyslíku v pletivech ječmene (*Hordeum vulgare*) po infekci houbou *Pyrenophora teres* (Able, 2003). Zjistila, že v napadených buňkách epidermu je přítomen superoxidový anion ($\text{HO}_2^- / \text{O}_2^-$), zatímco v napadených buňkách mezofylu je akumulován peroxid vodíku (H_2O_2). Patogen sám je schopen produkovat superoxidové anionty na stejné úrovni, jaká byla pozorována v systému patogen-rostlina (Able et al., 1998). Houba sama, jakožto nekrotrof, využívá zřejmě systému obrany rostliny (hypersensitivní reakce) účinnou vůči biotrofním patogenům a používá aktivní peroxidové a superoxidové molekuly jako spouštěče senescence a buněčné smrti pletiv hostitele (Mayer et al., 2001).

Infekce ječmene (*Hordeum vulgare*) patogenem *Pyrenophora teres* je rovněž charakterizována zvýšeným obsahem cytokininů v poškozených pletivech rostliny (Angra-Sharma and Sharma, 1999). Cytokininy mj. zpomalují proces senescence listů, a zvyšují

kapacitu sinku, a tak napomáhají růstu nekrotrofních patogenů, jakým je *Pyrenophora teres*. Tento fakt potvrdily autoradiografické studie autorů Angra-Sharma and Sharma (1999). Naopak u rezistentních genotypů hostitele byla po napadení patogenem detekována nižší hladina cytokininů, což může být pro rostlinu signál pro spuštění obranné reakce vůči přítomnému patogenu v raných stádiích infekce (Angra-Sharma and Sharma, 1999).

V lézích dochází ke sporulaci. Konidiofory vyrůstají obvykle přímo z mezibuněčného prostoru epidermální vrstvy a vyskytují se samostatně nebo ve skupinách po dvou nebo třech. Konidiofory mohou být tvořeny i v lézích rezistentních kultivarů hostitele. Konidie se uvolňují a šíří větrem a vodou na další rostliny nebo na další listy téže rostliny (Ruiz-Roldán et al., 2001).

V patogenezi vláknitých hub hraje důležitou roli signální dráha indukovaná proteinkinázami aktivovanými mitogeny (MAPKs) (Lev et al., 1999; Vergara et al., 2003). Ruiz-Roldán et al. (2001) identifikovali a charakterizovali MAPKinázový gen houby *Pyrenophora teres* a pojmenovali ho *PTK1*. Je to extracelulární, signálem regulovaná, kináza náležející k rodině MAPKináz skupiny YERK1. Její hlavní funkcí je přenos extracelulárních signálů. Gen *PTK1* je přítomen v genomu houby v jedné kopii a je exprimován během infekce hostitele. Mutanti *Pyrenophora teres*, nesoucí porušenou kopii genu *ptk1*, netvořili apresoria a zcela ztratili schopnost infikovat listová pletiva hostitele (Ruiz-Roldán et al., 2001).

Přestože je mnoho známo o míře variability z hlediska virulence izolátů *Pyrenophora teres* (Arabi et al., 2003), gen virulence nebyl dosud identifikován. Weiland et al. (1999) připravili mapovací populaci křížením vysoce virulentního a málo virulentního izolátu *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*. Analýzou potomstva křížení metodou RAPD a infekcemi odrůdy ječmene Harbin zjistili, že virulence patogena *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* je vzhledem k odrůdě Harbin kontrolována jedním genem (Weiland et al., 1999). K odlišným výsledkům dospěli Pavlyushin et al. (2004), kteří podle zvolené odrůdy našli od jednoho do tří genů kontrolujících virulenci *Pyrenophora teres*.

2.3.6. Toxiny

V roce 1977 Smedegård-Petersen jako první izoloval dva termostabilní toxiny z izolátů hub *Pyrenophora teres* pěstovaných *in vitro* a nazval je toxin A a toxin B (Smedegård-Petersen, 1977b). O dva roky později byl objeven a popsán třetí toxin – toxin C (Bach et al., 1979). Všechny tři toxiny jsou neproteinové povahy.

Toxin A je L,L-N-(2-amino-2-karboxyethyl)aspartová kyselina (Bach et al., 1979). Působí zejména tmavě žluté chlorotické skvrny a v menší míře hnědé nekrotické léze.

Toxin B je 1-(2-amino-2-karboxyethyl)-6-karboxy-3-karboxymethyl-2-piperazinon (Bach et al., 1979). Byl již dříve popsán a pojmenován jako anhydroaspergillo-marasmin A (Haenni et al., 1965). Je velmi slabě toxický a vzniká samovolně neenzymatickou cestou při nízkých pH (Friis et al., 1991).

Toxin C, již dříve charakterizovaný a nazvaný aspergillomarasmin A (Haenni et al., 1965) je N-[2-(2-amino-2-karboxyethyl-amino)-2-karboxyethyl]aspartová kyselina (Bach et al., 1979). V koncentracích od 0,25mM se projevuje výraznými nekrotickými symptomy obklopenými světle žlutými chlorózami na listech hostitele.

Toxiny jsou izolovány z mycelia *Pyrenophora teres* pěstovaného *in vitro* chromatografií na silně bazických ionexových pryskyřičných kolonách ve formě acetátů. Čisté sloučeniny jsou krystalické povahy a bílé barvy (Weiergang et al. 2002b).

Toxin A může být syntetizován adicí diaminopropionové kyseliny na maleinovou kyselinu. Ze vzniklé racemické směsi je dále metabolizován *in vivo* pouze L,L-stereoizomer (Friis et al., 1991). Friis et al. (1991) dále zjistili, že toxin A se hromadí v kulturách *Pyrenophora teres* jen v nízkých koncentracích na rozdíl od toxinu C a soudí tedy, že je toxin A *in vivo* pouze prekurzorem toxinu C, který je hlavním toxinem produkovaným houbou *Pyrenophora teres*. Friis et al. (1991) rovněž potvrdili, že obě formy houby *Pyrenophora teres* produkují týž toxin a ve stejné intenzitě.

Gäumann et al. (1950) se domnívají, že toxin aspergillomarasmin A tvoří komplexy s ionty železa (Fe^{III}), nacházejícími se v rostlinných pletivech a že jsou tyto komplexy toxickejší než samotný toxin. Nicméně mechanismus vlivu toxinů na napadené pletivo hostitele není dosud znám.

Weiergang et al. (2002a) testovali listové segmenty jak purifikovanými toxiny A a C, tak i izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Zjistili, že genotypy ječmene (*Hordeum vulgare*) citlivé k patogenu jsou rovněž citlivé k čistým toxinům (A a C) a naopak. Metoda testování listových segmentů přímo čistým toxinem C může být tedy využita k selekci linií ječmene v raných stádiích šlechtitelských programů (Krämer et al., 1989; Weiergang et al., 2002a).

Dalšími toxiny extrahovanými z kultur *Pyrenophora teres* jsou pyrenolin A a pyrenolin B, patřících chemicky mezi izochinoliny (Coval et al., 1990; Benali et al., 1995). Reprezentují novou třídu bioaktivních metabolitů podobných dalším sekundárním metabolitům *Pyrenophora teres* jako jsou pyrenolidy (Nukina and Hirota, 1992) a aspergillomarasminy. Jejich úloha v biologii a epidemiologii patogena však není známa.

2.4. Genom a genetická variabilita

Genom vláknitých hub o velikosti 20 až 50 Mb je rozdělen na jaderný, mitochondriální a plasmidový (Orbach et al., 1988; Howlett, 1996). Obsahuje málo repetitivní DNA s výjimkou genů pro rRNA, tRNA a úseků podobných retrotranspononům. Jaderný genom je uspořádán v chromosomech podobně jako u ostatních eukaryot. Mitochondriová DNA je většinou kružnicová a je značně velikostně i sekvenčně variabilní. Plasmidy u vláknitých hub se primárně vyskytují v mitochondriích.

Genom houby *Pyrenophora teres* je uspořádán do 9 chromozomů a jeho velikost je odhadována na 34,95 Mb (Aragona et al., 2000). Známý, a v databázi EMBL, jsou uvedeny sekvence ITS oblastí, genů *PTK1*, *gdp*, *Act1* (aktin), genu pro acyl CoA ligázu, genů pro párovací typ *MAT1/MAT2* a sekvence některých PCR produktů (např. Williams et al., 2001).

Základní hnací silou vývoje populací patogenů je migrace, genetický drift a rekombinace. Mnoho rostlinných patogenů se může rozšiřovat na velmi velké vzdálenosti vzduchem (Aylor, 1990) nebo ve spojení se svými hostiteli (Shipton et al., 1973). To umožňuje opakující se migraci mezi populacemi patogenů nebo do nových oblastí, kde se vyskytuje vhodný hostitel. Způsob hospodaření může způsobovat velké změny ve velikostech populací jak hostitele, tak i patogena, což vede ke genetickému driftu (Burdon, 1992). Introdukce rostlinného patogena na nové území zahrnuje pouze malé množství jedinců z původní zdrojové populace. Tento proces je známý jako zakladatelský efekt (founder effect) (Hartl and Clark, 1989). Rekombinací se vytvářejí nové genotypy v populacích patogena, které často překonávají rezistenci hostitele a bývají rezistentní vůči jindy úspěšným fungicidům. Populace patogenů, kde převažuje sexuální reprodukce bývají geneticky variabilnější než ty, u kterých převládá asexuální reprodukce nebo sexuální stadium chybí úplně (Burdon and Roelfs, 1985).

Existují dva přístupy ke studiu struktury populace. Prvním je studium genetické diferenciace nebo rozdělení mezi populacemi. K rozdělení populace dochází selekcí a genetickým driftem kombinovaným s omezeným přenosem genů (gene flow). Nízká hladina diferenciace může být způsobena značnou migrací mezi populacemi nebo tím, že se jedná o mladou populaci nedávno se vyvinuvší ze zdrojové populace. Peever and Milgroom (1994) detekovali vysokou úroveň diferenciace u populací *Pyrenophora teres* a zdůvodňují ji selekcí odlišných genotypů patogeny v daném prostředí.

Druhým přístupem je studium variability uvnitř populací, která je dána zejména typem reprodukce. Mnoho patogenů je schopno se rozmnožovat jak sexuálně tak i asexuálně a

relativní příspěvek každého z obou způsobů reprodukce může ovlivnit genetickou strukturu populací patogena (Milgroom et al., 1992).

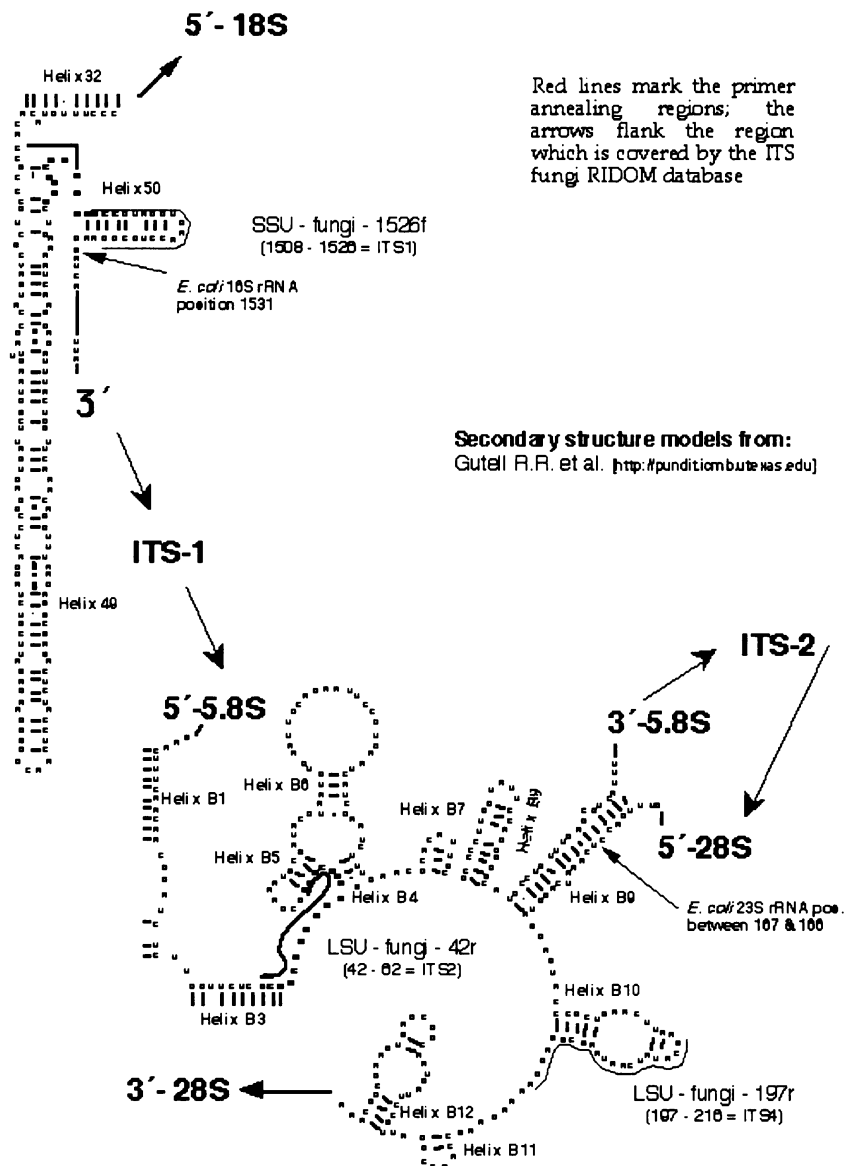
Hlavním důvodem, proč je tak důležité zkoumat míru variability patogena je problém stability rezistence hostitelské rostliny vůči danému patogenu. Populace patogena s velkou mírou genetické variability jsou schopné se rychle přizpůsobovat změnám prostředí. Znalost genetické struktury populací patogena má značný vliv na šlechtění rostlin na rezistenci a též na vývoj účinných fungicidů.

Existuje a využívá se mnoho metod ke studiu variability populací hub, od morfologických, fyziologických pozorování přes studium virulence jednotlivých izolátů hub, až po imunochemické a biochemické metody. Např. Gatti et al. (1992), Arabi and Jawhar (2004) a další využili biochemickou metodu SDS PAGE k porovnání proteinového spektra studovaných izolátů. Gubiš et al. (2003) testovali variabilitu virulence slovenských izolátů *Pyrenophora teres in vitro* na listových segmentech. V posledních letech, zejména po objevení polymerázové řetězové reakce, jsou stále častěji vyvíjeny a využívány různé metody molekulární biologie: RAPD, RFLP, AFLP, analýza ITS oblastí apod. (McDonald, 1997).

Pyrenophora teres i *Pyrenophora graminea* jsou známy svojí velkou mírou variability v rámci populací i mezi populacemi jak z morfologického tak i z fyziologického hlediska (Tekauz, 1990; Gatti et al., 1992). Navíc je známo, že morfologické vlastnosti hub mohou být značně ovlivněny podmínkami prostředí a proto studium pouze morfologie může vést k zavádějícím výsledkům (Stevens et al., 1998). Metody molekulární biologie posledních let značně přispěly k ujasnění taxonomie studovaných druhů hub a k poznání míry genetické variability populací *Pyrenophora teres*.

Prvními studii, kde byla využita PCR u hub byly realizovány na ribosomálních rRNA. Geny kódující ribosomální rRNA se v genomu vyskytují v mnoha opakováních. Každá opakující se jednotka je tvořena kódujícími oblastmi, kde jsou geny pro 18S, 5,8S a 26S rRNA odděleny mezerníky, tzv. ITS (Internal Transcribed Spacer). ITS1 se nachází mezi geny pro 18S rRNA a 5,8S rRNA a ITS2 mezi geny pro 5,8S rRNA a 26S rRNA. Mezi jednotlivými opakujícími se jednotkami jsou opět mezerníky, tzv. IGS (Intergenic Spacers). Kódující oblasti jsou značně konzervativní, naopak oblast mezerníků ITS a IGS vykazují vysokou míru variability. Pomocí primerů ITS1 a ITS4 (White et al., 1990) (Obrázek 5) lze amplifikovat oblast obou mezerníků ITS1 a ITS2 včetně genu pro 5,8S rRNA u prakticky všech hub. Na základě sekvenčního polymorfismu oblastí ITS 1 a ITS 2 je dnes postaveno mnoho taxonomických studií (Mugnier, 1995).

Obrázek 5 Sekundární struktura parciální sekvence jednotky obsahující geny pro 18S a 28S rRNA



Stevens et al. (1998) studovali délkovou a sekvenční variabilitu ITS1 a ITS2 oblasti u druhů *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* a *Pyrenophora graminea*. Zjistili, že se uvedené druhy/formy liší pouze v ITS1 oblasti. Délka ITS1 oblasti je dlouhá u *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* 180 bp, u *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* 178 bp a u *Pyrenophora graminea* 178-180bp. Sekvenčně se liší v pozicích 144-158 oblasti ITS1: *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* má v této oblasti repetici devíti deoxythymidin-5'-fosfátů (T), *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* repetici sedmi deoxythymidin-5'-fosfátů (T) a *Pyrenophora graminea* repetici 7-9 deoxyadenosin-5'-fosfátů (A). Vzhledem ke značné homologii sekvencí oblastí ITS1 a ITS2 se autoři domnívají, že se ve skutečnosti jedná pouze

o jeden druh. Přesto byl i tak malý zjištěný sekvenční polymorfismus využit k přípravě diagnostických markerů rozlišujících obě formy *Pyrenophora teres* a *Pyrenophora graminea* (Bates et al., 2001).

RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) je metoda, ve které je sledován délkový polymorfismus produktů PCR s jedním primerem o délce nejčastěji 10 oligonukletidů. Výhodou metody je její jednoduchost, nízká cena a časová náročnost analýz; nevýhodou je nízká reproducibilita výsledků (Jones et al., 1997). Délkový polymorfismus DNA ampliconů může být využit pro rozlišení genotypů, které jsou si geneticky velmi blízké.

Peever and Milgroom (1994) studovali pomocí RAPD variabilitu izolátů *Pyrenophora teres* pocházejících z různých oblastí (Kanada, Německo a USA). Amplifikacemi DNA s pěti různými primery získali velký počet polymorfních signálů, např. 9 odlišných RAPD profilů u vzorků pouze z Německa, čtyři u vzorků ze státu New York, apod. Nalezená míra variability vyjádřená hodnotou G_{ST} (Nei, 1973) = 0,46 mezi populacemi *Pyrenophora teres* převyšuje hodnoty pro jiné populace hub, u kterých se hodnota G_{ST} pohybuje od 0 do 0,2 (Goodwin et al., 1993). Důvodem může být genetický drift, omezená migrace a místní adaptace *Pyrenophora teres* na alternativní hostitele. Na druhou stranu, studie Peever & Milgrooma (1994) ukázala vysokou míru diferenciaci ($G_{ST} = 0,54$) i uvnitř populací *Pyrenophora teres*, dokonce větší než mezi populacemi.

Důvodů pro tak značnou míru variability může být několik. Sexuální rekombinace obou forem *Pyrenophora teres* hraje pravděpodobně důležitou roli ve vývoji populací (Campbell et al., 2002). Dalším důvodem je vývoj populací podle prostředí, neboť ty se mohou vyvíjet jak lokalizovaně, kdy houba přežívá na jednom místě na zbytcích rostlin a rozšiřuje se pouze na krátké vzdálenosti v rámci jednoho pole či sousedních polí v podobě spor větrem a deštěm. Na druhou stranu má kapacitu šířit se na velké vzdálenosti zejména infikovaným osivem (Peever & Milgroom, 1994). Rovněž fakt, že se tento patogen vyskytuje všude, kde se pěstuje ječmen, tedy v oblastech s různými klimatickými podmínkami, pěstebními postupy a odlišnou skladbou odrůd a může se šířit z jedné oblasti do druhé např. infikovaným osivem hraje značnou roli v míře variability tohoto patogenu (Tekauz, 1990; Steffenson and Webster, 1992; Afanasenko et al., 1995; Peltonen et al., 1996). Tyto vlastnosti a možnosti propůjčují patogenu *Pyrenophora teres* velkou kapacitu adaptovat se na různá prostředí a rychle se šířit (Jonsson et al., 2000).

Peltonen et al. (1996) studovali pomocí metody RAPD míru variability finských izolátů *Pyrenophora teres*. Detekovali vysokou úroveň variability mezi populacemi a zároveň zjistili, že koeficient podobnosti (G_{ST}), a tedy i genetická struktura populací, se příliš nemění

z roku na rok. Z toho dovozují, že v populacích *Pyrenophora teres* ve Finsku převládá asexuální stádium a způsob rozmnožování. K podobným výsledkům dospěli i Jonsson et al. (2000), kteří analyzovali 64 izolátů *Pyrenophora teres* pocházejících ze Švédska. Na základě výsledků se domnívají, že k vývoji perithécií a křížení jedinců dochází jen vzácně. Dominantním způsobem rozmnožování je tedy pravděpodobně asexuální způsob pomocí konidií.

Wu et al. (2003) použili metodu RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) založenou na analýzy restrikčních fragmentů ke studiu variability izolátů *Pyrenophora teres* pocházejících z různých zemí světa. Zjistili, že mezi izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* jsou větší rozdíly než mezi izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Jinými slovy, pomocí metody RFLP se nepodařilo rozlišit dvě formy *Pyrenophora teres*.

Další metodou, kterou je možno studovat variabilitu populací hub je AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism). Principem metody je selektivní amplifikace restrikčních fragmentů pomocí specifických primerů (Vos et al., 1995). AFLP poskytuje tzv. neutrální markery a postihuje celý genom studovaného organismu. Vzhledem k velikosti genomu hub (asi 40 Mb) je obvykle získáno asi 150 tisíc EcoRI/ MseI restrikčních DNA fragmentů, z nichž většina je velikosti do 500 bp. Nevýhodou AFLP je, že je každý fragment hodnocen nezávisle, i když tomu tak ve skutečnosti není. To vede k nadhodnocení variability souboru. Spíše se vlastně hodnotí přítomnost či nepřítomnost restrikčního místa a sekvenční variabilita v těsné blízkosti rozpoznávacího místa restrikční endonukleázy MseI nebo EcoRI (2 bp) (Majer et al., 1996).

Tuto metodu použili Williams et al. (2001) spíše však než pro studium variability izolátů *Pyrenophora teres* tak pro ověření specifičnosti jimi vyvinutých markerů. Pomocí metody AFLP rozlišili izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*, *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora graminea*.

Rau et al. (2003) potvrdili svými výsledky, že metodou AFLP lze jasně odlišit *Pyrenophora teres* od *Pyrenophora graminea* a dokonce i *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* od *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Nalezli 117 odlišných haplotypů v rámci 150-ti analyzovaných izolátů *Pyrenophora teres* pocházejících ze Sardinie. V populaci *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* byl nalezen menší poměr počtu haplotypů k počtu vzorků než u populace *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Velký počet genotypů v obou skupinách předpokládá že rekombinace hraje majoritní roli u obou forem patogena. Naproti tomu byla nalezena větší genetická diference mezi populacemi *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* než mezi populacemi

Pyrenophora teres f. sp. *maculata*. Vysvětlením tohoto faktu může být, že genetický drift spolu s omezenou migrací hraje hlavní roli v populacích *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* spíše než v populacích *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Obě formy mají tedy pravděpodobně odlišné způsoby šíření. *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* se více šíří na velké vzdálenosti napadeným osivem a větrem; *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* se naopak šíří spíše jen na krátké vzdálenosti vzdušnou turbulencí nebo vodou (Rau et al., 2003).

Novou metodou studia genetické variability u houbových patogenů se stává v současné době analýza retrotransponů. Taylor et al. (2004) optimalizovali metodu S-SAP (Sequence-specific Amplified Polymorphism) (Waugh et al., 1997) za použití primeru odvozeného na základě sekvence LTR oblasti (Long Terminal Repeat) retrotransponu objeveného v genomu *Pyrenophora graminea* a pojmenovaného Pyggy. Retrotranspon Pyggy patří do rodiny retrotransponů Ty3-gypsy. Replikuje se prostřednictvím RNA a následně se integruje zpět do genomu, kde zůstává stálý. Dochází tak k asexuální rekombinaci genomu houby. Tato třída retrotransponů je obzvláště vhodná pro fylogenetické studie. Principem metody S-SAP je amplifikace restrikčních fragmentů DNA (v případě Taylor et al., 2004: MseI/ EcoRI restrikční fragmenty) za použití jednoho primeru specifického vůči rozpoznávací sekvenci restrikční endonukleázy (např. MseI) a druhého primeru odvozeného ze sekvence LTR oblasti Pyggy retrotransponu. Na základě výsledků studie variability populací *Pyrenophora teres* a *Pyrenophora graminea* pomocí Pyggy S-SAP se Taylor et al. (2004) domnívají, že u druhu *Pyrenophora graminea*, kde je míra genetické variability srovnatelná s genetickou variabilitou populací *Pyrenophora teres*, ale kde se sexuální stádium vyskytuje mnohem vzácněji než u *Pyrenophora teres*, lze tuto variabilitu vysvětlit větší tolerancí k transpozicím Pyggy elementů.

2.5. Možnosti detekce

Klasická metodika detekce houbových patogenů zahrnuje pěstování na umělých živných médiích (Arabi and Jawhar, 2003), imunologické testy (ELISA) a patologické testy na diferenciačních odrůdách hostitele (Afanasenko et al., 1995). Tyto metody selhávají tam, kde se jedná o vysoce variabilní populaci patogena a tam, kde existují druhy či formy geneticky si velmi blízké. To je případ houby *Pyrenophora teres*, jejíž populace vykazují vysokou míru variability, a která se vyskytuje ve dvou formách: *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* (Smedegård-Petersen, 1971). Obě formy produkují podobné kultury na umělých živných půdách, mají takřka identickou morfologii; liší se pouze typem symptomu na listech hostitele. Vzhledem k tomu, že se rezistence k oběma formám

dědí nezávisle (Ho et al., 1996) je důležité, aby byl patogen korektně identifikován. Taktéž následný výzkum chování patogena musí být založen na správné identifikaci druhu a formy.

Nové možnosti detekce patogenů se otevřely s objevením polymerázové řetězové reakce. První metodou použitou k detekci a vzájemnému rozlišení druhů *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* a *Pyrenophora graminea* byla RAPD (Reeves and Ball, 1991). Autoři použili 4 primery, z nichž pomocí jednoho dokázali rozlišit všech osm studovaných izolátů. Tento počet je však pro přípravu markeru nedostatečný. Peltonen et al. (1996) dokázali pomocí metody RAPD rozlišit 50 izolátů *Pyrenophora teres* a *Pyrenophora graminea*. Dvě formy *Pyrenophora teres*: *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* však rozlišit nedokázali.

Taylor et al. (2001) použili 60 RAPD primerů k vyhledání diagnostického druhově specifického markeru. Ten převedli na tzv. SCAR (Sequence-Characterised Amplified Region) marker, pomocí něhož lze specificky detekovat *Pyrenophora graminea* v zrna ječmene (*Hordeum vulgare*). Tento postup: převod RAPD markeru na specifický SCAR marker je hojně využíván, pro detekci *Pyrenophora teres* jej použili Williams et al. (2001). Vytvořili diagnostický set molekulárních SCAR markerů vyvinutých pomocí metody RAPD, specificky detekujících obě formy *Pyrenophora teres*.

V posledních několika letech se objevuje snaha vyvinout metodiku pro kvantitativní stanovení obsahu houbového patogena v pletivech hostitele. Metody kvantifikace lze rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi nepřímé metody patří ty, které nestanovují vlastní obsah patogena, ale posuzují jej z míry jeho vedlejších projevů: velikosti lézí, množství vyprodukovaných mykotoxinů či dalších sekundárních metabolitů, míry vlivu na výnos, apod. Nepřímými metodami jsou např.: vizuální hodnocení míry napadení, počítání hmotnosti tisíce zrn (HTZ) či stanovení obsahu příslušných mykotoxinů a dalších sekundárních metabolitů pomocí metod ELISA a HPLC. Pro správnou interpretaci výsledků je nutné, aby stanovené hodnoty korelovaly se skutečnou mírou napadení rostliny patogenem.

Přímé metody kvantifikace stanovují přímo obsah patogena v pletivech hostitele. Kromě metody ELISA se dnes využívá řada metod molekulární biologie založených výhradně na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Böhm et al., 1999; Bates et al., 2001; Edwards et al., 2002; Fraaije et al., 2002; Schena et al., 2004).

Doohan et al. (1999) použili techniku kompetitivní PCR s druhově specifickými primery ke kvantitativní detekci přítomnosti patogenů rodu *Fusarium* v pletivech pšenice (*Triticum aestivum*). Jako kompetitoru použili DNA o známé koncentraci izolovanou z mycelia patogena napěstovaného *in vitro*. Touž technikou stanovili Mahuku et al. (1995)

obsah patogena *Leptosphaeria maculans* v pletivech řepky. Výhodou metody je její jednoduchost, nenáročnost na vybavení a nízká cena analýz, nevýhodou malá přesnost daná velikostí chyby při odečtu intenzit záření barviva ethidiumbromidu interkalovaného do PCR produktů po elektroforetické separaci v agarózovém gelu.

Simpson et al. (2001) studovali závislost obsahu patogena a jím produkovaných toxinů v zrně na množství použitých fungicidů mj. pomocí kvantitativní SYBRGreen real-time PCR. Tuto metodu popsal Hopwood et al. (1997) a je založená na sledování PCR reakce se specifickými primery v reálném čase. V každém cyklu reakce je detekován vzrůst fluorescence interkalačního barviva SYBRGreen při $\lambda = 530$ nm, který odpovídá rostoucímu počtu kopií amplikonu. Metoda je přesnější než kompetitivní PCR, neboť hodnoty fluorescence jsou odečítány CCD kamerou, nevýhodou je nutnost post amplifikačních kontrol přítomnosti nespecifických PCR produktů pomocí elektroforetické separace nebo analýzy disociačních křivek. Tato metoda byla použita např. ke stanovení obsahu rzi pšeničné (*Erysiphe graminis*) v listových pletivech pšenice (*Triticum aestivum*) (Fraaije et al., 2002) či patogena *Pyrenophora graminea* v zrně ječmene (*Hordeum vulgare*) (Bates et al., 2001).

Další metodou kvantifikace patogenů je opět real-time PCR se specifickými primery, kde jsou PCR produkty detekovány pomocí různých typů sond. Nejčastěji se využívají tzv. TaqMan sondy, což jsou oligonukleotidy, které se specificky hybridizují od oblasti mezi primery a tím zvyšují specifičnost reakce. Na 5' konci jsou značeny fluorescenční značkou (FAM, VIC, apod.) a na 3' konci je kovalentně navázán zhášec fluorescence, kterým může být buď fluorescenční značka TAMRA nebo nefluorescenční kovalentně navázaný MGB (Minor Groove Binder) zhášec. 5'3' exonukleázová aktivita Taq polymerázy v elongačních fázích PCR způsobuje degradaci sondy a tím dochází ke vzrůstu intenzity fluorescence, která je v každém cyklu PCR reakce detekována pomocí CCD kamery. Porovnáním odečtených hodnot Ct (Cycle threshold) s kalibrací lze stanovit kvantitativní zastoupení PCR produktu v reakční směsi. Böhm et al. (1999) použili tuto metodu ke stanovení rozsahu napadení pletiv hostitele patogeny rodu *Glomus* a *Phytophthora*.

Bates and Taylor (2001) vyvinuli nový typ sondy pro real-time PCR, který využívá Scorpion Amplified Refractory Mutation System (ARMS) technologie. Jedná se vlastně o forward primer prodloužený přes interní zhášec a nástavce tvořící vlásenku o sondu a fluorescenční značku FAM. Během reakce se uvolňuje vlásenka, sonda se „rozbalí“ a hybridizuje se na nově se tvořící vlákno DNA. Dochází tak k oddálení fluoroforu od zhášeče. Uvolněné kvantum záření je detekováno CCD kamerou. Sonda byla vytvořena na základě sekvence ITS oblasti hub *Pyrenophora teres* a *Pyrenophora graminea*, kde se v pozici 42

vyskytuje druhově specifická bodová mutace (SNP) (Stevens et al., 1998). Deoxythimidin-5'-fosfát (T), specifický pro druh *Pyrenophora teres*, je umístěn na 3' konci forward primeru a tím je zaručena vysoká specifičnost reakce (Bates and Taylor, 2001).

Výhodou metod real-time PCR s použitím sond je, že je možné provádět multiplexové analýzy, kdy jsou v reakci použity dvě sondy s různými fluorescenčními značkami (např. FAM a VIC). Je pak možno kvantifikovat zároveň obsah patogena i hostitelské DNA (Winton et al., 2002). Jako standardy se používají často DNA extrahované z nenapadené rostliny a čistého mycelia pěstovaného *in vitro*. Pro přesnější kvantifikaci se používají standardy, kdy je cílový fragment DNA klonován do plasmidu a amplifikován spolu se vzorky (Fontaine and Guillot, 2002; Block and Schwarz, 2003; Reischer et al., 2004).

2.6. Hospodářský význam choroby a ochrana

Za příznivých podmínek může toto onemocnění vážně ohrozit výnos a sladovnickou kvalitu ječmene. Uvádí se výnosové ztráty 10-40% (Porta-Puglia et al., 1986; Steffenson and Webster, 1992). Vážné epidemie postihly mnoho oblastí České republiky v letech 1996 a 1997 (Minaříková and Polišenská, 1999). Přítomnost hub *Pyrenophora teres* a *Pyrenophora graminea* působí kvantitativní změny spektra zásobních proteinů zrna a tím negativně ovlivňuje sladovnickou kvalitu ječmene (Arabi et al., 2001).

Ztráty mohou být redukovány kontrolou zdravotního stavu osiva, rotací plodin, zaorávání posklizňových zbytků, aplikací listových fungicidů a pěstováním rezistentních odrůd ječmene (Shipton et al., 1973; Tekauz, 1990; Minaříková, 2002; Turkington et al., 2004). Vzhledem k ekonomickému tlaku na co nejnižší vstupní náklady je zvýšený zájem o vyšlechtění odrůd s rezistencí k listovým skvrnitostem. Šlechtění na rezistenci k tomuto patogenu je však značně obtížné pro jeho velkou intraspecifickou variabilitu.

Analýzy lokálních populací patogena předcházejí výběru vhodných donorů rezistence. Skutečně efektivními donory rezistence jsou plané druhy ječmene z původních oblastí pěstování ječmene (Fetch et al., 2003; Saker, 2005). Jsou ale víceřadé, poskytují nízký výnos, poléhají a jsou náchylné k jiným druhům onemocnění, zvláště ke rzím (Schaller and Wiebe, 1951; Minaříková and Polišenská, 1999). Vzhledem ke značné variabilitě patogena je nutné tyto materiály testovat izoláty *Pyrenophora teres* z různých částí světa (Arabi et al., 2003). Ty, které vykazují největší míru rezistence jsou pak vybírány jako potenciaální rodiče do šlechtitelských programů (Gupta et al., 2003).

Genetické studie ukázaly, že rezistence k síťovité skvrnitosti je podmíněna jedním až třemi geny s majoritním účinkem a několika dalšími geny s minoritním účinkem v závislosti

na virulenci izolátu patogena a studované mapovací populaci, tedy vzhledem ke zdroji rezistence (Steffenson and Webster, 1992; Arabi et al., 2003). Navíc bylo zjištěno, že se spektrum lokusů zodpovědných za rezistenci liší u semenáčků a u dospělých rostlin (Williams et al., 2003).

QTL mapování genů rezistence k *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* u populace křížení odrůd ječmene Chevron a Stander ukázalo, že se zde jedná o dva geny. Gen *Rpt1* byl lokalizován na krátké rameno chromosomu 6H mezi markery Xksua3b a Xwg719d, *Rpt2* byl lokalizován na krátké rameno chromosomu 2H mezi markery Xcdo786 a Xabc156a (Ma et al., 2004). Cakir et al. (2003) připravili dvě mapovací populace z křížení odrůd ječmene Tallon a Kaputar a VB9524 a ND11231. Pomocí molekulárních markerů identifikovali 3 lokusy nesoucí geny rezistence k *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a lokalizovali je na chromosom 6H, 2H a 3H (Cakir et al., 2003). Raman et al. (2003) našli tři lokusy QTL u pěti populací křížení náchylných a rezistentních odrůd ječmene a lokalizovali je pomocí molekulárních markerů na chromosom 2H, 3H a 4H. Dva mikrosatelitní markery EBmac0906 a Bmac0181 s 93%ní pravděpodobností předpovídají rezistentní či náchylný fenotyp a mohou být využity pro MAS (Marked Assisted Selection) (Raman et al., 2003).

Gen rezistence k *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* v populaci křížení odrůd ječmene Galleon a Haruna Nijo byl označen jako *Rpt4* a lokalizován na dlouhém rameni chromosomu 7 (Williams et al., 1999). Tento gen je zodpovědný za rezistenci semenáčků ječmene k *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* (Williams et al., 2003). U pěti populací ječmene byly nalezeny lokusy QTL na chromosomu 7H jako *Rpt4*, ale vzdáleněji od centromery, dále lokusy na chromosomech 4H a 5H zodpovědné za rezistenci dospělých rostlin k *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* (Williams et al., 2003).

Obtížnou situaci šlechtitelů navíc komplikuje fakt, že rezistence obecně souvisí s prostředím a že konkrétně u *Pyrenophora teres* může být překonána novým pathotypem (Pinnschmidt and Hovmöller, 2004).

U *Pyrenophora graminea* je situace obdobná. Uvádějí se tři geny rezistence *Rdg1*, *Rdg2* a *Rdg3* (Delogu et al., 1989; Valè et al., 1998; Pecchioni et al., 1999; Tacconi et al., 2001).

Další metodou ochrany porostů ječmene může být indukovaná rezistence. Jörgensen et al. (1998) publikovali práci, ve které rostliny nejprve inokulovali pro ječmen cizími patogeny *Bipolaris maydis*, napadající kukuřici a *Septoria nodorum* parazitující na pšenici a pak izoláty *Pyrenophora teres*. Zjistili, že napadení rostlin vyvolá indukovanou rezistenci mj. tvorbou

papil a že dochází k omezení penetrace a zastavení růstu hyf *Pyrenophora teres* (Jørgensen et al., 1998).

Významnější posun ve šlechtění ječmene na rezistenci k patogenu *Pyrenophora teres* přinese zřejmě až hlubší poznání variability populací *Pyrenophora teres* a pochopení vztahů patogen-hostitel na molekulární úrovni (Kosack and Parker, 2003).

3. Výsledky

3.1. Studium variability populace *Pyrenophora teres* metodami molekulární biologie



GENETIC DIVERSITY OF *PYRENOPHORA TERES* ISOLATES AS DETECTED BY AFLP ANALYSIS. Journal of Phytopathology 153: 569-578.

Laboratory of Molecular Biology, Research Institute of Crop Production, Prague, Czech Republic

Genetic Diversity of *Pyrenophora teres* Isolates as Detected by AFLP Analysis

L. LEIŠOVA¹, V. MINARÍKOVÁ², L. KUČERA¹ and J. OVESNÁ¹

Authors' addresses: ¹Laboratory of Molecular Biology, Research Institute of Crop Production, Drnovská 507, 16106 Prague 6, Ruzyně; ²Agricultural Research Institute, Havlickova 2787, 76707 Kromeriz, Czech Republic (correspondence to L. Leišova. E-mail: leisova@vurv.cz)

Received April 24, 2005; accepted July 5, 2005

Keywords: barley net blotch, barley spot blotch, amplified fragment length polymorphism, molecular markers, genetic diversity

Abstract

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis has been used to analyse mainly 83 Czech isolates of *Pyrenophora teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* and *Helminthosporium sativum*. Each species had distinct AFLP profiles. Using 19 primer combinations 948 polymorphic bands were detected. All main clusters in dendrogram correspond to the studied species. Even the two forms of *P. teres* – *P. teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM) – formed different clusters. Genetic diversity, with regard to the locality and the year of the sample's collection, was analysed separately within the AFLP-based dendrogram cluster of PTT and PTM. Unweighted pair-group method (UPGMA) analysis of the 37 isolates of PTT and 30 isolates of PTM, using 469 polymorphic bands, showed that the variability seemed to have been influenced more by the year of sampling than by the geographic origin of the isolate. The presence of intermediate haplotypes with a relatively high number of shared markers between the two groups indicated that hybridization between the forms of *P. teres* could happen, but it is probably often overlapped by selection pressure or genetic drift.

Introduction

Net blotch of barley (*Hordeum vulgare* L.) is caused by the fungus *Pyrenophora teres* Drechs. (anamorph: *Drechslera teres* [Sacc.] Shoem.) and is common throughout the major barley-growing regions of the world. Under favourable conditions it may become a serious threat to both grain yield and malt quality. During 1996 and 1997 severe epidemics of net blotch developed at many sites of the Czech Republic (Minaříková and Polišínská, 1999). In this case, yield loss can reach 40% as was described by Steffenson and Webster (1992).

The net blotch pathogen is variable in a number of cultural and morphological characters (Shipton et al.,

1973). In addition, this pathogen can induce different symptoms in barley. Smedegård-Petersen (1971) recognized two forms of *P. teres* on the basis of symptoms on host plant leaves: *P. teres* f. *teres* (PTT; the net form) causes typical net blotch lesions that have dark brown striations extending longitudinally and transversely within a lesion to form a netlike pattern, whereas *P. teres* f. *maculata* (PTM; the spot form) produces dark brown circular or elliptical lesions without netting. Spot form lesions are encircled by varying widths of chlorosis and are often associated with water-soaked tissue. The two pathogens have different but overlapping distributions. The spot form is prevalent in Scandinavia (Smedegård-Petersen, 1971) and the net form is more common in western Canada (Tekauz, 1990). In the Czech Republic both forms currently occur (Ondřej, 2000). Winter barley is infected at a higher level by a spot form of the pathogen (PTM) while spring barley is more sensitive to the classical net form, PTT (Minaříková and Polišínská, 1999).

Both spot and net forms of *P. teres* are composed of a large number of pathotypes and resistance to the two forms is inherited independently (Afanasenkov et al., 1995; Ho et al., 1996; Arabi et al., 2003). The two forms of *P. teres* can be hybridized to produce lesions that are morphologically intermediate between spot and net forms, although it is not clear whether it occurs in nature (Campbell et al., 1999).

Genetic diversity in populations of plant pathogenic fungi causes major problems for stability of host–plant disease resistance. Pathogen populations with large genetic variation distributed on a small-scale are capable of evolving rapidly as a response to environmental changes (Peltonen et al., 1996). The knowledge of the genetic structure of pathogen populations has, therefore, important implications for plant breeding and also fungicide screening programmes. Molecular markers such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), randomly amplified polymorphism

detection (RAPD) and amplified fragment length polymorphism (AFLP) offer a good means for the study of genetic diversity in pathogens (Peever and Milgroom, 1994; Louw et al., 1995; Peltonen et al., 1996; Jonsson et al., 2000; Wu et al., 2003).

Several studies on molecular variation in *P. teres* have been done. Peever and Milgroom (1994) used RAPD markers to assay the level and the distribution of genetic variation within- and between-populations from the USA, Canada and Germany. On this scale genetic diversity and divergence between populations ($G_{ST} = 0.46$) were high. Moreover, Peever and Milgroom (1994) deduced from the multilocus structure within populations of *P. teres* that sexual reproduction was frequent in four of the five populations analysed. On the country scale, Peltonen et al. (1996) detected a high level of RAPD variation within their collection of *P. teres* isolates from Finland. Williams et al. (2001) found that AFLP assays distinguished between isolates of PTT and PTM more reliably than leaf symptoms. Rau et al. (2002) used the AFLP method to evaluate the population genetic structure of *P. teres* in Sardinian landraces of barley. Cluster analysis resolved the isolates into two strongly divergent groups, corresponding to the net and spot forms of *P. teres*. The absence of intermediate genotypes and the low number of shared markers between the two groups indicated that hybridization between the two formae is rare or absent under the field condition of Sardinia (Rau et al., 2002).

Amplified fragment length polymorphism is a reliable, polymerase chain reaction (PCR)-based marker system for obtaining quantitative estimates of genetic relationships (Vos et al., 1995). The utility of AFLP fingerprinting has been demonstrated on several fungi (Majer et al., 1996; Purwantara et al., 2000; Schnieder et al., 2001). This technique is reproducible and samples the genome widely allowing discrimination among closely related individuals within a species (Majer et al., 1996). As polymorphism is detected as the presence or absence of amplified restriction fragments, AFLPs are usually considered to be dominant markers (Powell et al., 1996). Moreover, the high resolution of AFLP markers also enables testing for clone identity among individuals and thus permits inferences about the contribution of sexual vs. asexual modes of reproduction to the observed pattern of genetic variation (Rosendahl and Taylor, 1997). This study was conducted to screen genetic variation mainly in Czech isolates of *P. teres* by the AFLP technique. The aim was to determine the genetic relationship between the two forms of the pathogen and the degree of genetic diversity within the both forms.

Materials and Methods

Fungal isolates

Thirty isolates of PTT, 36 isolates of PTM, five of *P. graminea*, three of *P. tritici-repentis*, one *P. flavispora* and four isolates of *Helminthosporium sativum* were evaluated (Table 1). These isolates were collected from different barley-growing regions of the Czech and Slovak Republics (see Fig. 1). Five isolates that origin-

ated from Norway, Germany and Syria were added (see Table 1). Isolates of *H. sativum* were used as outliers for molecular variability analysis. All isolates were derived from single conidia taken from leaf tissue. Leaf segments with disease symptoms were excised and incubated at 20–23°C. For DNA extraction, mycelia were cultured in 20 ml of potato dextrose broth according to Anonymous (1990).

DNA isolation

DNA was extracted from mycelia according to the optimized protocol of Leisova et al. (2005) using extraction buffer [0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.5], lysis buffer (2 M NaCl, 0.2 M Tris, 50 mM EDTA, 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), pH 7.5) and 5% solution of CTAB in the medium of high concentration of NaCl (minimum 0.5 M). DNA was precipitated by one volume of absolute ethanol and diluted in an appropriate volume of TE buffer. DNA was run in a 0.8% agarose gel to verify the quality and the concentration. As to size and concentration standards, λ HindIII (Fermentas, Vilnius, Lithuania) was used.

AFLP analysis

AFLP analyses were carried out according to the AFLP™ Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *MseI* and *EcoRI* were used as restriction nucleases. The selective amplification, with *MseI* primers and fluorescently marked *EcoRI* primers, was performed as multiplex PCR in the reaction mixture of 10 μ l [0.2 mM dNTP, 1 μ M *MseI* primer, 3 \times 0.5 μ M *EcoRI* primers, 1 U *Taq* polymerase (Qiagen GmbH, Germany), 1X buffer with 10 mM MgCl₂ and 1 μ l diluted (1 : 20) preselective amplification reaction] in the cycler ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). The amplification products were separated by capillary electrophoresis in ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA). Rox500 (PN 401734, Applied Biosystems) was used as the internal size standard. Chromatograms were processed by the software GENESCAN and GENOTYPER. For each isolate a binary matrix, reflecting specific AFLP fragment presence (1) or absence (0), was generated.

Statistical analysis

Pairwise distances between the isolates, based on Hamman similarity metrics (Armstrong et al., 1994), were calculated using the Microsoft® Excel VBA (Visual Basic for Applications) macros. Cluster analysis by means of an unweighted pair-group method that used an arithmetic averaging algorithm (UPGMA) and principal component analysis (PCA) were performed by STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc., Praha, ČR).

The genetic diversity index (DI) based on the Gini-Simpson index (Gini, 1912)

$$DI = 1 - \sum p_i^2$$

where, p_i is the frequency of the i th allele was used as the measure of marker information content.

Table 1
List of the isolates with their sources, host cultivars and the year of collection

Isolate	Taxon	Geographic origin	Year of collection	Host cultivar
HS-01	<i>Helminthosporium sativum</i>	CR – Hradec nad Svit.	1999	Barley – Forum
HS-02	<i>H. sativum</i>	CR – Kroměříž	2001	Barley – Sabel
HS-03	<i>H. sativum</i>	CR – Kroměříž	2001	Barley – Forum
HS-04	<i>H. sativum</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Forum
PF-1	<i>Pyrenophora flavispora</i>	Syria	2002	Barley – unknown
PG-01	<i>P. graminea</i>	CR – Ruzyně	2001	Barley – unknown
PG-02	<i>P. graminea</i>	CR – Ruzyně	2001	Barley – unknown
PG-03	<i>P. graminea</i>	CR – Ruzyně	2001	Barley – unknown
PG-04	<i>P. graminea</i>	CR – Kroměříž	2001	Barley – unknown
PG-05	<i>P. graminea</i>	CR – Kroměříž	2001	Barley – unknown
PTM-02	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Tiffany
PTM-03	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Tábor	1996	Barley – Kromoz
PTM-04	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Tábor	1996	Barley – Kromoz
PTM-05	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Okál
PTM-06	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Okál
PTM-07	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Velký Beranov	2001	Barley – Okál
PTM-08	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Luran
PTM-09	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Zářičí	2001	Barley – unknown
PTM-10	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Zářičí	2001	Barley – unknown
PTM-11	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2001	Barley – Tiffany
PTM-12	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2001	Barley – Okál
PTM-13	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2001	Barley – SGL
PTM-14	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2001	Barley – Tiffany
PTM-15/PTT	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Tovačov	2002	Barley – unknown
PTM-16/PTT	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Tovačov	2002	Barley – unknown
PTM-17	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Kroměříž	2002	Barley – Okál
PTM-18	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Červenka	2002	Barley – Luran
PTM-19	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Čáslav	2002	Barley – Nordus
PTM-20	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Chrlice	2002	Barley – Heris
PTM-21	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Chrlice	2002	Barley – Nordus
PTM-22	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Domanínec	2002	Barley – Amulet
PTM-23	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Filipov	2002	Barley – Heris
PTM-24	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Stupice	2002	Barley – Luran
PTM-25	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Filipov	2002	Barley – Heris
PTM-26	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Libějovice	2003	Barley – Tiffany
PTM-27	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Filipov	2003	Barley – Olbram
PTM-28	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2002	Barley – Merlot
PTM-29	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Chrastava	2002	Barley – Merlot
PTM-30/PF	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	Syria	2002	Barley – unknown
PTM-31	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2003	Barley – Lu844
PTM-32	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2003	Barley – Lu844
PTM-33	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Puste Jakartice	2002	Barley – Nordus
PTM-34/PTT	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Hradec nad Svit.	2003	Barley – Madonna
PTM-35	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Postoupky	1996	Barley – Forum
PTM-36	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2002	Barley – Merlot
PTM-37	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2002	Barley – Merlot
PTM-38	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2003	Barley – Lu844
PTM-39	<i>P. teres</i> f. <i>maculata</i>	CR – Lužany	2003	Barley – Lu844
PTR-12	<i>P. tritici-repentis</i>	CR – Uhřetice	1999	Wheat – unknown
PTR-14	<i>P. tritici-repentis</i>	CR – Uhřetice	1999	Wheat – unknown
PTR-15	<i>P. tritici-repentis</i>	CR – Uhřetice	1999	Wheat – unknown
PTT-02	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Rýmařov	1999	Barley – unknown
PTT-03	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Druholec	1999	Barley – Akcent
PTT-04	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Hradec nad Svit.	2001	Barley – Tiffany
PTT-05/PTM	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Hradec nad Svit.	2000	Barley – Forum
PTT-06	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Velký Beranov	1997	Barley – Amulet
PTT-07	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	Norway	2001	Barley – unknown
PTT-08/PTM	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	Germany	2000	Barley – unknown
PTT-09/PTM	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Kroměříž	2000	Barley – Marna
PTT-10	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Druholec	1998	Barley – Akcent
PTT-11/PTM	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Hradec nad Svit.	1999	Barley – Forum
PTT-12	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	Norway	2001	Barley – unknown
PTT-13	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Kroměříž	2002	Barley – Jersey
PTT-14	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Kroměříž	2002	Barley – Jersey
PTT-15	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Kroměříž	2002	Barley – Jersey
PTT-16	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Kroměříž	2002	Barley – Jersey
PTT-17	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Tovačov	2002	Barley – unknown
PTT-18	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Zhoř	1999	Barley – Angora

Table 1
Continued

Isolate	Taxon	Geographic origin	Year of collection	Host cultivar
PTT-19	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Stupice	2001	Barley – unknown
PTT-20	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	SR – Malý Šariš	2002	Barley – Kompakt
PTT-21	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	SR – Malý Šariš	2002	Barley – Kompakt
PTT-22	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Chrlice	2003	Barley – Olbram
PTT-23	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Velký Beranov	2003	Barley – Prestige
PTT-24	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Velký Beranov	2003	Barley – Prestige
PTT-25	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Velký Beranov	2003	Barley – Prestige
PTT-26	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Lipa	2002	Barley – Nordus
PTT-27	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Uhřetice	2003	Barley – unknown
PTT-28	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Uhřetice	2003	Barley – unknown
PTT-29	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Chrlice	2002	Barley – Jersey
PTT-30	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Chrudim	2003	Barley – Sabel
PTT-31	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Velký Beranov	2003	Barley – Prestige
PTT-32	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Střelice	2003	Barley – Jersey
PTT-33	<i>P. teres</i> f. <i>teres</i>	CR – Hlavnice	2003	Barley – Sabel

0 50 km

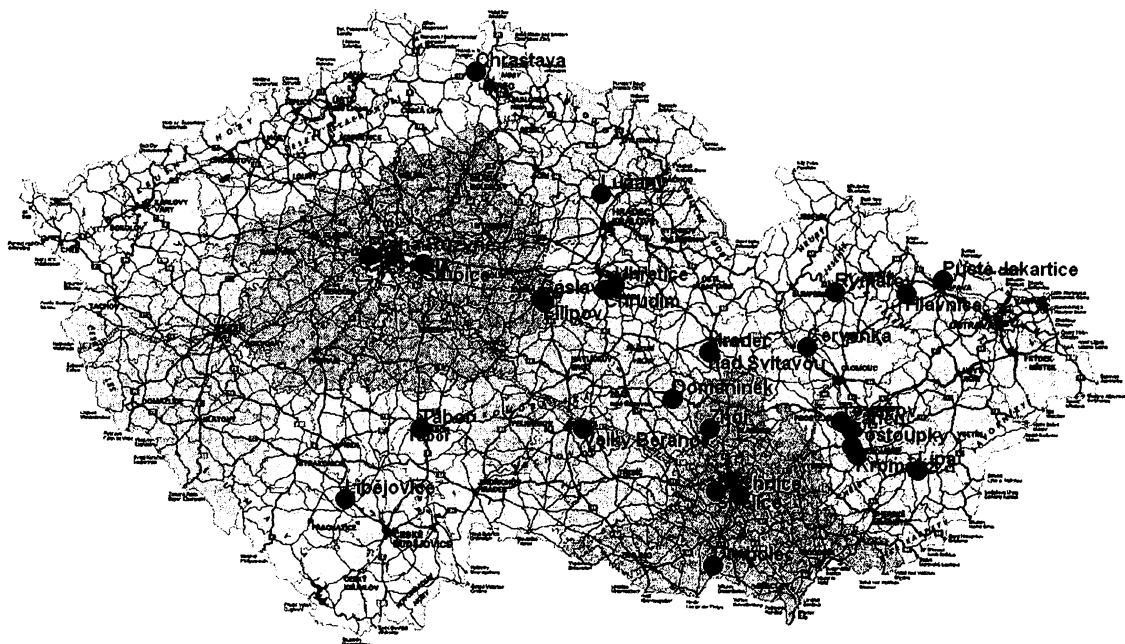


Fig. 1 The map of the Czech Republic with the sites of the geographic origin of pathogens

Results

AFLP analysis

AFLP analysis was conducted on DNA prepared from 83 isolates of *P. teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* and *H. sativum* (as an outlier) using 19 primer combinations (see Table 2) that were selected on the basis of the results of preliminary study when 33 primer combinations were used. The most informative primer pairs were taken into this work. For each of 19 primer pairs, 36–76 length polymorphic DNA fragments of 80–500 bp in size were detected. A total of 948 AFLP polymorphic bands were recorded across all studied isolates, which corresponds to an average of 50 polymorphic bands per primer combination. The number of polymorphic alleles and the average DIs per primer combination are given in Table 2.

When subjected to a UPGMA clustering analysis based on genetic distances, six main clusters were found on the level of linkage distance being 0.4 (Fig. 2). The first three clusters are formed by PTT-22; PF-1 and PTM-30; and PTM-02 isolates. PF-1 isolate was included in the file as *P. flavispora*. The PTM-30 isolate was collected from a barley leaf from Syria as PTM. Then, it was genotyped as an unknown species and subsequently determined to be *P. flavispora* (M. Ondřej, personal communication). The PTT-22 and PTM-02 isolates provided completely different AFLP haplotypes. We did not manage to determine them and they remained unknown species. The fourth cluster is formed by *H. sativum* isolates and the fifth one by *P. tritici-repentis* isolates. The last biggest cluster is formed by *P. teres* and *P. graminea* isolates.

Table 2
Multiplexed AFLP primer combinations used in the present study

MseI	EcoRI-fam	Number of polymorphic alleles	DI (average)
	EcoRI-ned EcoRI-joe		
CAC	TG	43	0.145
	AT	51	0.143
	AG	76	0.132
CAG	TC	40	0.167
	AT	57	0.149
	TA	49	0.121
CAA	TC	47	0.162
	AT	45	0.149
	AA	61	0.138
CTA	TG	36	0.144
	TA	48	0.138
CTA	TC	48	0.165
	AT	41	0.124
	AA	53	0.136
CTG	TC	47	0.157
	AA	52	0.159
CTT	AT	48	0.145
	TG	45	0.183
	AG	61	0.148
Total	19	948	0.144

AFLP, amplified fragment length polymorphism; DI, diversity index.

Within the *P. teres* cluster, two groups differentiating both forms of *P. teres* were found with only some exceptions. Four isolates (PTT-05, PTT-08, PTT-09 and PTT-11) that were initially collected as PTT showed to be a part of the PTM cluster group and three isolates (PTM-15, PTM-16 and PTM-34) that were collected as PTM were found in the PTT cluster (Fig. 1). The validations, done subsequently on a morphological and physiological level, confirmed the AFLP analysis results (M. Ondřej, personal communication).

The analysis also showed that the *P. teres* isolates were much closer to *P. graminea* (linkage distance = 0.44) than to *P. tritici-repentis*, *P. flavispora* and *H. sativum* (linkage distance = 0.73). Within *P. teres* and *P. graminea* cluster, *P. graminea* isolates are situated closer to PTM (linkage distance = 0.39) than to PTT (linkage distance = 0.44; see Fig. 2).

Genetic diversity with regard to the place and year of sampling as well as host variety was analysed separately within a group of *P. teres* isolates, with the exception of PTM-30, PTT-22 and PTM-02 isolates, which were also left out. AFLP analysis of 67 *P. teres* isolates with 19 primer combinations provided a total of 469 bands; only 19 of them were monomorphic, while the rest (95.9%) were polymorphic. UPGMA cluster analysis using AFLP data did not reveal distinct groups corresponding to either geographic origin or host variety. PCA showed that the isolates seemed to be grouped according to the time of sampling rather than to their geographic origin or host variety (Fig. 3).

The measure of genotype diversity based on AFLP fingerprints can provide approximation of the fraction of a population that results from asexual reproduction. Table 3 shows comparisons of average pairwise dissimilarities calculated for PTT samples collected from

different locations in 2 years. A noticeable decrease of PTT variability was observed between seasons 2002 and 2003, unlike seasons 1996–2001, when a similar level of genetic variability, like in the year 2002, was noticed (data not shown).

Similarly to the UPGMA cluster analysis, the three-dimensional (3D) plot resulted from PCA suggests that the studied isolates split into two main clusters according to the form of *P. teres*. Within both clusters it is possible to find two groups formed by isolates collected in different years (Fig. 3). PTM-15 and PTM-16 isolates appear to form an intermediate group between the two *P. teres* forms. This phenomenon is possible to see better in the 2D plot resulted from the PCA (Fig. 4). In both figures (Figs 3 and 4) factor 1 represents the separation of *P. teres* into two distinct clusters formed either by PTT or by PTM isolates. Factor 2 supporting factor 1 reflects differences between 'pure' form haplotypes and some distinct haplotypes. Factor 3 is especially the factor of time and factor 4 highlights a difference between main PTT and PTM clusters and intermediate haplotypes.

Discussion

There are two approaches to study the population structure. The first is to study genetic differentiation among populations. The variability on this level is influenced mainly by the age of population and by selection of pathogen genotypes in each environment and on different host plants. The second point of view is to study genetic diversity within populations that are affected by the contribution of sexual and asexual modes of reproduction. Sexually reproducing populations of plant pathogenic fungi are often genetically more variable than those reproducing asexually (Goodwin et al., 1992).

Pyrenophora teres is, like most ascomycetes, capable of both sexual and asexual reproduction. The relative contribution of each of these modes of reproduction can affect the genetic structure of pathogen populations (Peever and Milgroom, 1994). The asexual reproduction is predominant and it tends to produce a limited number of genotypes showing strong allelic associations between loci. Sexual reproduction, on the other hand, breaks up allele associations and causes an increase of genetic variability within fungal populations (Jonsson et al., 2000).

The frequency of sexual reproduction of *P. teres* depends mainly on an agronomic management because only barley stubble makes it possible for the fungus to produce a sexual stage and spread it to the next crop on the same field or to nearby fields in subsequent growing seasons. Although mature ascospores are the source of new alleles and they can survive for several years, they represent only a secondary inoculum. The most important infective propagules in the epidemiology of the net blotch disease are considered to be conidia that arise from mycelium during the vegetation period in barley stubble (Steffenson and Webster, 1992).

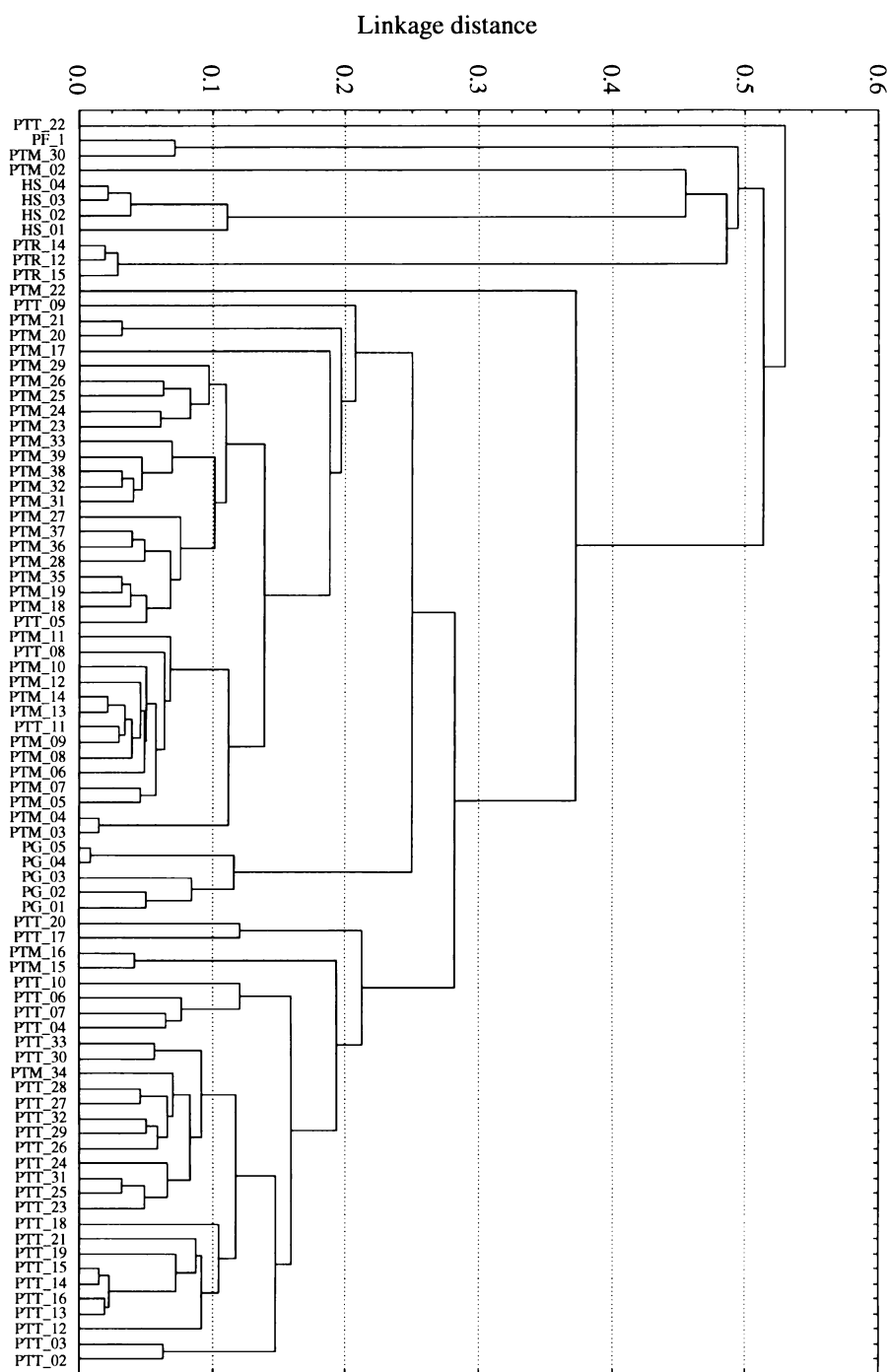


Fig. 2 Dendrogram produced using a unweighted pair-group method (UPGMA) cluster analysis based on Hamman dissimilarity coefficients calculated from 948 different amplified fragment length polymorphism (AFLP) polymorphic fragments from *Pyrenophora teres* f. *teres* (PTT), *P. teres* f. *maculata* (PTM), *P. graminea* (PG), *P. tritici-repentis* (PTR), *P. flavispora* (PF) and *Helminthosporium sativum* (HS)

On the basis of RAPD analysis Peever and Milgroom (1994) found that a high amount of alleles shared out of all studied populations of *P. teres*. Therefore, they suppose that all *P. teres* populations have derived from a common source population, which was probably situated in the region of the Middle East. According to these authors, the high level of differentiation among *P. teres* populations was due to selection caused by genetic drift combined with the restricted migration and local adaptation of the fungus to alternate hosts.

Peltonen et al. (1996) investigated the genetic variability of 48 Finnish isolates of PTT using RAPD markers, as well as aggressiveness, growth rate and

morphological features. Clustering of the RAPD data resulted in a mean similarity coefficient of approximately 68%. No correlation between RAPD clusters and geographic origin, aggressiveness, or growth rate was found. They also found that the genetic structure of *P. teres* did not change much across the growing seasons as shown by the relatively stable similarity coefficient values between the subsequent years. This might be due to the fungus reproducing mainly asexually. The perfect stage of *P. teres* has been found only a few times on overwintered barley stubble in Finland (Peltonen et al., 1996). Similar results were found by Jonsson et al. (2000) in Swedish *P. teres* isolates.

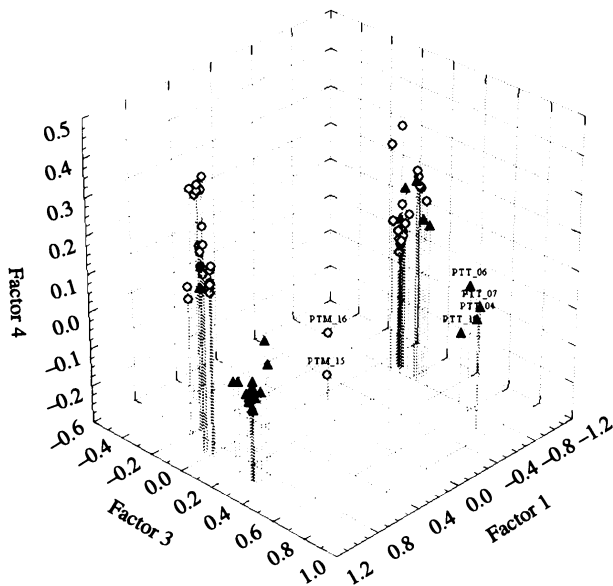


Fig. 3 Three-dimensional principal component analysis (PCA) plot of *Pyrenophora teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM) isolates sampled in the period from 1996 to 2001 (black triangles) and in the period from 2002 to 2003 (white circles) based on unweighted pair-group method (UPGMA) clustering analysis

In the present study, AFLP analysis clearly differentiated between *P. teres* and the other four barley leaf pathogen species: *P. graminea*, *P. tritici-repentis*, *P. flavispora* and *H. sativum*. Additionally, intraspecific variation clearly resolved two groups of *P. teres* isolates: PTT and PTM (Fig. 2).

AFLP analysis revealed that the Czech population of *P. teres* contained a high level of genetic variation. As Peltonen et al. (1996) we found no geographic isolation in studied *P. teres* isolates even between Czech and Norwich or Czech and Slovak isolates. Contrary to Peltonen et al. (1996), isolates seemed to be grouped according to the time of sampling rather than to their geographic origin or host variety (Fig. 5). A comparison of average pairwise dissimilarities calculated for PTT isolates sampled from one locality and for the isolates sampled from four different localities within and between 2 years of sample collection (Table 3) showed that in 2003 it came to a noticeable decrease of PTT variability. Likewise, for PTM isolates collected in 2003, a significantly lower level of variability was found in them than for the isolates sampled in earlier years (data not shown). It could be caused by a lower share of sexual reproduction between seasons 2002 and 2003 or to the contrary by a higher share of asexual reproduction and other influences such as selection pressure and genetic drift. We found that this phenomenon was probably caused by extensive floods that affected the whole of middle Europe in autumn 2002. This corresponds to the general opinion that genetic structure may also be influenced by drift and selection pressure exerted by mainly climatic conditions.

AFLP markers reflect random variability over the entire genome. In the present study, AFLP genotyping has showed to be a sensitive method that enabled the differentiation of the two forms of *P. teres*. The identi-

Table 3
Average pairwise dissimilarities of *Pyrenophora teres* f. *teres* samples collected from different localities in 2 years

	2002			2003		
	One locality	Four different localities	Proportion	One locality	Four different localities	Proportion
Minimum	0.0148	0.0570	0.26	0.0316	0.0570	0.55
Maximum	0.0274	0.2363	0.12	0.0865	0.0970	0.89
Average	0.0204	0.1501	0.14	0.0549	0.0738	0.74

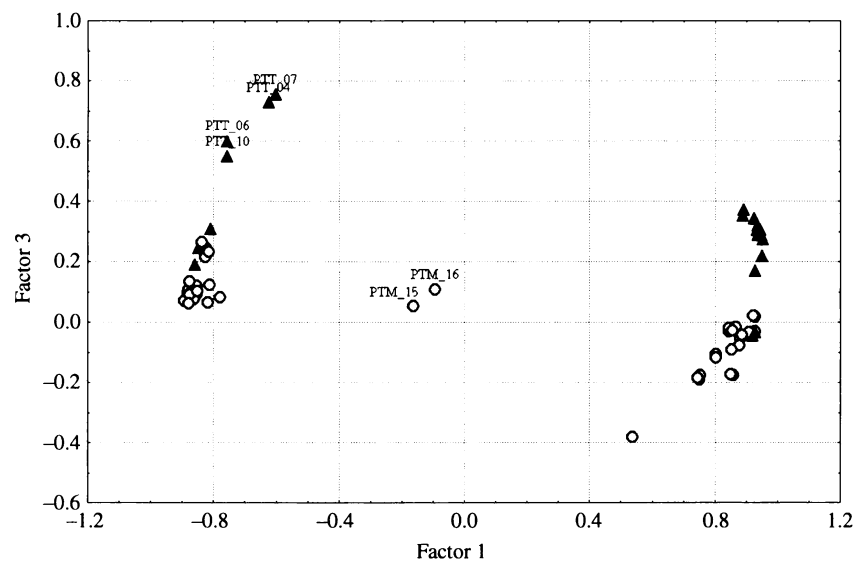


Fig. 4 Two-dimensional principal component analysis (PCA) plot of *Pyrenophora teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM) isolates sampled in the period from 1996 to 2001 (black triangles) and in the period from 2002 to 2003 (white circles) based on unweighted pair-group method (UPGMA) clustering analysis

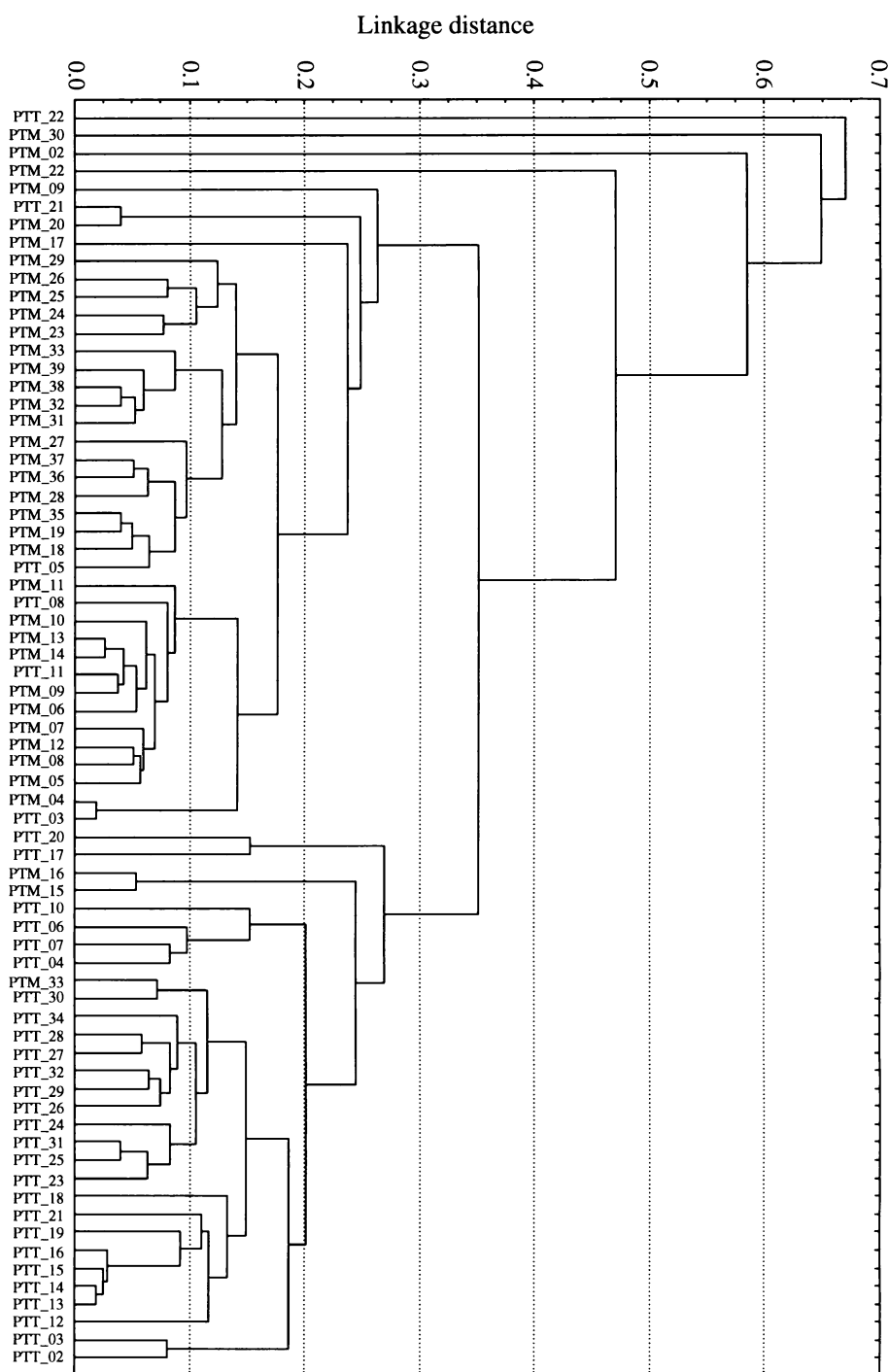


Fig. 5 Dendrogram produced using a unweighted pair-group method (UPGMA) cluster analysis based on Hamman dissimilarity coefficients calculated from 469 different amplified fragment length polymorphism (AFLP) polymorphic fragments from *Pyrenophora teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM)

fication, based solely on the symptoms that *P. teres* pathogens produce on barley leaves, requires experience in comparing two forms of genetically similar species as *P. teres*. Reflecting the difficulty with symptomatological identification, eight of the 83 isolates used in this study were shown to be misidentified. They were re-cultivated and redetermined on the morphological and physiological level. The results agreed with that obtained on the basis of AFLP analysis. Also, Williams et al. (2001) found that AFLP assays distinguished between isolates of PTT and PTM more reliably than leaf symptoms did. The method of AFLP

seems to be a better predictor of *forma specialis* than symptoms expression.

Moreover, several diagnostic markers were identified: 83 specific to PTT and 134 specific to PTM. Some of them were used for the development of markers that are able to differentiate both forms of *P. teres* and to detect them in infected host plant tissue (Leisova et al., 2005).

Two very different genotypes, PTM-02 and PTT-22 (Fig. 2), were likely a mixture of several pathogens because very different AFLP profiles were repeatedly found. Even the PCR with specific primers (Leisova

et al., 2005) and the amplification of ITS regions provided completely different products than other *P. teres* isolates. It was probably due to unsuccessful transfer of these samples' spores to the *in vitro* culture.

The reliability of the AFLP results is often discussed (Majer et al., 1996; Powell et al., 1996). We conducted the replication by approximately 30 genotypes of *P. teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* and *H. sativum* given in this study. The same AFLP profiles were found. The only important thing is to observe the same terms by all AFLP analysis. The reliability of AFLP was also tested by the development of *P. teres* species-specific markers (Leisova et al., 2005).

In the present study, although the two forms of the pathogen appear strongly differentiated, two isolates form an intermediate group (Fig. 4). Rau et al. (2002), also using AFLP analysis, found two markedly differentiated PTT and PTM clusters too, but without any intermediate group. Our observation indicates contrarily to Rau et al. (2002) that an intermediate group between the two *P. teres* forms exists in Czech regions, although it is rare. Several authors successfully hybridized the two forms obtaining stable progeny (Smedegård-Petersen, 1977; Campbell et al., 1999). Pathogenicity trials with progeny from mating revealed symptoms that are intermediate between spot and net forms. As of now, it has not been clear if this occurs in nature. In addition, Campbell et al. (1999) reported the difficulty in obtaining viable progeny from the matings of some *P. teres* strains, and suggested that one reason for strain incompatibility could be the heterothallic biallelic mating system of *P. teres* (McDonald, 1963).

Another problem is how to prove the existence of the cross progeny. Smedegård-Petersen (1977) claimed that it is not possible with certainty to distinguish even between *P. graminea* and *P. teres* only on the basis of the morphology of conidia and conidiophores. He found most of the characters to be strongly variable and uncertain in value. The distinguishing of the cross progeny between the two forms of *P. teres* would be much worse. The proof, based on symptoms, is currently used because the ascospore progeny produce intermediate symptoms clearly different to the symptoms produced by the parental isolates (Campbell et al., 1999). On the contrary, it is conceivable that symptoms caused by ascospores, produced as a result of a cross between a net blotch and a leaf spot isolate may also lead to confusion in the identification of this fungus with other *Pyrenophora* sp. pathogenic to barley. That is why Campbell et al. (1999) used RAPD and AFLP markers to demonstrate the evidence that recombination occurred during mating between PTT and PTM isolates.

In the present study, PTM-15 and PTM-16 isolates from the Tovacov region showed to be genetically similar to both the *P. teres* forms and formed an intermediate haplotype. We hypothesize according to the

statistical analysis of AFLP data that PTM-15 and PTM-16 isolates could be progeny of the hybridization between PTT and PTM. However, it is necessary to collect and analyse more isolates, from several different years, from the region of Tovacov to confirm this hypothesis.

Acknowledgements

This project was supported by the National Agency for Agricultural Research in the Czech Republic – project no. QC1361. The authors thank Jana Šarová for the help with isolate growing.

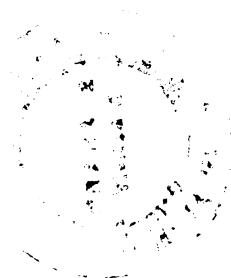
References

- Afanasenkov OS, Hartleb H, Guseva NN, Minaříková V, Janosheva M. (1995) A set of differentials to characterise populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for international use. *J Phytopathol* **143**:501–507.
- Anonymous (1990) CBS list of cultures. In: Fungi and yeasts. *Baarn-Delft* **32**:508.
- Arabi MIE, Al-Safadi B, Charbaji T. (2003) Pathogenic variation among isolates of *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *J Phytopathol* **151**:376–382.
- Armstrong JS, Gibbs AJ, Peakall R, Weiller G. (1994) *The RAP Distance package*. Available at: <http://life.anu.edu.au/molecular/software/RAPDistance>. Date of last accession: 27th February 2003.
- Campbell GF, Crous PW, Lucas JA. (1999) *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycol Res* **103**:257–267.
- Gini CW. (1912) Variabilità e mutabilità. Studi Economico-Giuridici della R. *Univ Cagliari* **3**:3–159.
- Goodwin SB, Spielman LJ, Matuszak JM, Bergeron SN, Fry WE. (1992) Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology* **82**:955–961.
- Ho KM, Tekauz A, Choo TM, Martin RA. (1996) Genetic studies on net blotch resistance in a barley cross. *Can J Plant Sci* **76**:715–719.
- Jonsson R, Säll T, Bryngelsson T. (2000) Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Can J Plant Pathol* **22**:258–264.
- Leisova L, Kucera L, Minarikova V, Ovesna J. (2005) AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathol* **54**:66–73.
- Louw JP, Victor D, Crous PW, Holz G, Janse BJH. (1995) Characterisation of *Pyrenophora* isolates associated with spot and net type lesions on barley in South Africa. *J Phytopathol* **143**:129–134.
- Majer D, Mihten R, Lewis BG, Vos JP, Oliver RP. (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol Res* **100**:1107–1111.
- McDonald WC. (1963) Heterothallism in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* **53**:771–773.
- Minaříková V, Polišenská I. (1999) Analysis of population of *Pyrenophora teres* on barley in the Czech Republic. *Plant Prot Sci* **35**:115–120.
- Ondřej M. (2000) Problematika hub rodu *Drechslera* na ječmeni (*Hordeum*). *Agro* **5**:14.
- Peever TL, Milgroom MG. (1994) Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Can J Bot* **72**:915–923.
- Peltonen S, Jalli M, Kammiovirta K, Karjalainen R. (1996) Genetic variation in *Drechslera teres* populations as indicated by RAPD markers. *Ann Appl Biol* **128**:465–477.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* **2**:225–238.
- Purwantara A, Barrins JM, Cozijnsen AJ, Ades PK, Howle BJ. (2000) Genetic diversity of isolates of the *Leptosphaeria maculans* species complex from Australia, Europe and North America using

- amplified fragment length polymorphism analysis. *Mycol Res* **104**:772–781.
- Rau D, Brown AHD, Brubaker CL et al. (2002) Population genetic structure of *Pyrenophora teres* Drechs. the causal agent of net blotch in Sardinian landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* **106**:947–959.
- Rosendahl S, Taylor JW. (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. *Mol Ecol* **6**:821–829.
- Schnieder F, Koch G, Jung Ch, Verreet JA. (2001) Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. *Eur J Plant Pathol* **107**:285–290.
- Shipton WA, Khan TN, Boyd WJR. (1973) Net blotch of barley. *Rev Plant Pathol* **52**:269–290.
- Smedegård-Petersen V. (1971) *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. *Aars Kong Vet Land* 124–144.
- Smedegård-Petersen V. (1977) Inheritance of genetic factors for symptoms and pathogenicity in hybrids of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. *Phytopathol Z* **89**:193–202.
- Steffenson BJ, Webster RF. (1992) Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley. *Phytopathology* **82**:170–177.
- Tekauz A. (1990) Characterisation and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Pyrenophora teres* f. *maculata* from western Canada. *Can J Plant Pathol* **12**:141–148.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**:4407–4414.
- Williams KJ, Smyl C, Lichon A, Wong KY, Wallwork H. (2001) Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Aust Plant Pathol* **30**:37–44.
- Wu HL, Steffenson BJ, Li Y, Oleson AE, Zhong S. (2003) Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. *Can J Plant Pathol* **25**:82–90.

3.2. Využití DNA markerů v diagnostice *Pyrenophora teres*

DNA MARKERY V DIAGNOSTICE HOUBOVÝCH PATOGENŮ. In: Sborník přednášek z česko-slovenského workshopu „Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchovávání zdrojů rostlin“, Šumperk 4.-6. listopadu 2002, 181-190.



DNA MARKERY V DIAGNOSTICE HOUBOVÝCH PATOGENŮ

LEONA LEIŠOVÁ*, VĚRA MINAŘÍKOVÁ**, LADISLAV KUČERA*, JAROSLAVA OVESNÁ*

* Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně, e-mail: leisova@vurv.cz;

** Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, Havlíčkova 2787, 76707 Kroměříž, e-mail: minarikova@vukrom.cz

Abstract: Molecular markers are used more and more in study of fungi pathogens and their relationship to the host plants. Two SCAR markers, three primers pairs to analyse ITS regions and 33 AFLP primers combinations were used to study intra and interspecific variability of fungal pathogens of *Pyrenophora* spp. and *Helminthosporium sativum*. Using SCAR markers it is possible to discriminate only *P. graminea*. The length of ITS-I region varied among all studied species but it is necessary to obtain sequence data to dissolve the taxonomic problems of *Pyrenophora* species. The most precise data was obtained from AFLP analysis. Dendrogram based on genetic distances calculated from 1247 polymorphic bands shows five main groups according to five studied species. In spite of it is difficult to definitely discriminate *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* from *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*.

Keywords: molecular markers, barley, *Pyrenophora teres*, ITS, SCAR, AFLP

Houbové patogeny patří mezi nejrozšířenější rostlinné patogeny vůbec (Bruns et al. 1991). Způsobují značné ekonomické ztráty a proto se jejich studiu věnuje stále větší pozornost.

Houby (*Fungi*) jsou eukaryotické, stélkaté organismy, jejichž heterotrofie je odkazuje k saprofytickému, parazitickému nebo symbiotickému způsobu výživy. Genom vláknitých hub o velikosti asi 40.000 kb je rozdělen na jaderný, mitochondriový a plasmidový. Obsahuje málo repetitivní DNA s výjimkou genů pro rRNA, tRNA a úseků DNA podobných retrotranspozonům. Jaderný genom je uspořádán v chromozomech podobně jako u ostatních eukaryot. Mitochondriová DNA je většinou kružnicová a je značně sekvenčně variabilní.

Na rozdíl od kvasinek (*Saccharomyces*) se až v posledních deseti letech těžiště výzkumu patogenních hub přesouvá od fenotypu ke studiu genotypu. Výzkum je v současné době směřován k přesnému určení sledovaného taxonu, zařazení do systému, studiu intraspecifické variability hub v závislosti na čase, geografické poloze či napadeném pletivu hostitelské rostliny, ke kvalitativní i kvantitativní detekci konkrétního druhu patogena v pletivech hostitele. Získané poznatky vedou ke hlubšímu studiu podstaty rezistence k houbovým patogenům a k pochopení mechanismu napadení rostliny patogenem a její reakce na napadení. Ve všech fázích výzkumu se využívají v rámci molekulárně-biologických metod molekulární markery. Použití konkrétního typu markeru a tím i metody se liší podle druhu zkoumaného organismu a podle výzkumného záměru.

Z fytopatologického hlediska se molekulární markery u genomu hostitele využívají k mapování rezistence. Nejvhodnějšími metodami pro mapování jsou techniky RFLP, AFLP, STS a SSR (Chantret et al. 2000, Pecchioni et al. 1999, Anderson et al. 2001, Buerstmayr et al. 2002). U rezistencí založených monogenně je situace poměrně jednoduchá, na základě znalostí sekvence daného genu je možné získat STS marker pro konkrétní lokus, který se pak využívá při šlechtění k selekci rezistentních a náchylných linií. Robert et al. (1999) publikovali SCAR marker na detekci genu rezistence ke rzi pšeničné (*Puccinia tritici*) Yr17, Möhler & Jahoor 1996 publikovali STS marker rezistence k padlí travnímu (*Erysiphe graminis*) u obilovin. U rezistencí založených polygenně závisí úspěch na počtu a intenzitě

nalezených QTL rezistence k danému patogenu (Williams et al. 1999, Tacconi et al. 2001). Často se jen obtížně hledají spolehlivě fungující markery (Huang et al. 2000).

Genom hub bývá studován z několika hledisek a podle toho se též liší metodika studia. V taxonomických studiích a ve sledování intra a interspecifické variability se vedle morfologických znaků čím dál více uplatňují molekulárně-biologické analýzy pomocí molekulárních markerů. Ke studiu variability populací se velmi často používá metod, které nejsou lokusově specifické, ale naopak postihují celý genom organismu, jsou vysoce polymorfní a méně technicky náročné. Takovými metodami jsou např. RAPD a AFLP. Zhong & Steffenson (2001) použili techniku AFLP ke studiu variability a virulence patogena *Cochliobolus sativus* způsobujícího tmavé skvrny na listech ječmene. Tato metoda byla užita také u studia populací *Septoria tritici* v Německu (Schnieder et al. 2001). AFLP fingerprinting izolátů hub rodu *Pyrenopeziza* publikovali Majer et al. (1996). Řada laboratorů upřednostňuje jednoduchou a rychlou metodu RAPD ke studiu variability houbových patogenů (Jonsson et al. 2000, Peltonen et al. 1996, Peever & Milgroom, 1994).

Nejstudovanější částí genomu hub z hlediska variability je mtDNA (Bruns et al. 1991). U několika druhů byla sekvencována (Cummings et al. 1990, Brown et al. 1985). Souhrnnou informaci o organizaci a variabilitě mitochondriového genomu u hub podává Wolf et al. (1988).

Mnoho taxonomických prací se opírá o analýzy ITS a IGS. Jedná se o netranskribované mezerníky mezi geny pro 18S, 5.8S a 26S rRNA (ITS) či mezi jednotkami repetitivní rRNA (IGS). Geny pro 18S a 26S rRNA jsou vysoce sekvencně konzervativní a jsou vhodným cílovým místem pro primery PCR. Studován je jak délkový, tak i sekvencní polymorfismus (Appel & Gordon, 1995, Lloyd-Macgilp et al. 1996, Chen et al. 1996, Sreenivasaprasad et al. 1996, Lee & Taylor, 1992).

Pro selektivní stanovení konkrétního druhu patogena v pletivech hostitele se využívají specifické markery: SCAR, které jsou odvozené z produktů analýzy RAPD a STS lokusově specifické markery. Brown et al. (1993) použili ITS oblastí k získání specifických PCR primerů k detekci *Cylindrocarpon heteronema* v pletivech jabloní. Parry & Nicholson (1996) vyvinuli druhově specifické primery pro detekci patogenů rodu *Fusarium* parazitujících na pšenici. Doohan et al. (1998) použili publikované druhově specifické markery pro patogeny rodu *Fusarium* ke sledování výskytu jednotlivých druhů v napadených rostlinách. Pomocí SCAR markerů Taylor et al. (2001) detekovali přítomnost patogena *Pyrenophora graminea* v osivu ječmene.

V posledních několika letech se objevuje snaha vyvinout metodiku pro kvantitativní stanovení obsahu houbového patogena v pletivech hostitele. Řešením je nalézt způsob jak kvantifikovat produkty PCR. Doohan et al. 1999 použili techniku kompetitivní PCR s druhově specifickými primery ke kvantitativní detekci přítomnosti patogenů rodu *Fusarium* v pletivech pšenice (*Triticum aestivum*). Jako kompetitoru použili DNA o známé koncentraci izolovanou z mycelia patogena napěstovaného *in vitro*. Touž technikou stanovili Mahuku et al. (1995) obsah DNA patogena *Leptosphaeria maculans* v pletivech řepky.

Simpson et al. (2001) studovali závislost obsahu patogena a jím produkováných mykotoxinů v zrnu na množství použitých fungicidů mj. pomocí kvantitativní SYBR Green Real-time PCR. Tuto metodu popsal Hopwood et al. (1997). Byla dále použita ke stanovení obsahu rzi pšeničné (*Erysiphe graminis*) (Fraaije et al. 2002) či *Pyrenophora graminea* v zrnu ječmene (Taylor et al. 2001).

Další metodou, jak kvantifikovat PCR produkty je tzv. TaqMan real-time PCR. Kromě páru primerů je třeba ještě jedné tzv. Taq Man sondy, což je oligonukleotid, který se hybridizuje do oblasti mezi primery. Je značen na 5' konci fluorescenční značkou a na 3' konci je opatřen zhášecem fluorescence. Využívá se 5'3' exonukleázové aktivity Taq polymerázy během cyklů PCR a detekuje se vzrůst fluorescence. Porovnáním odečtených hodnot s kalibrací lze stanovit kvantitativní zastoupení produktu PCR v reakční směsi. Böhm

et al. (1999) použili této metody ke stanovení rozsahu napadení pletiv hostitele patogeny rodu *Glomus* a *Phytophthora*.

Houbové patogeny rodu *Pyrenophora* parazitují na různých druzích trav (Ondřej 2000). Ze zemědělského hlediska jsou nejdůležitější druhy *P. tritici repentis*, jejím hostitelem je pšenice (*Triticum aestivum*) a *P. graminea* a *P. teres*, které způsobují hnědé skvrnitosti na listech ječmene (*Hordeum vulgare*). *P. graminea* je přenášena obilkami, *P. teres* zbytky rostlinných pletiv. *P. teres* se vyskytuje ve dvou formách: *P. teres* f. sp. *teres* a *P. teres* f. sp. *maculata*, které se liší charakterem symptomů na listech (Smedegaard-Petersen, 1977). *P. teres* f. sp. *maculata* byla některými autory považována za druh *P. japonica* (Scott, 1991), ale pozdější práce tento názor vyvrátily (Wallwork et al. 1992, Louw et al. 1994, Crous et al. 1995). Dokonce někteří autoři považují druh *P. graminea* i obě formy *P. teres* za různé formy jednoho druhu (Stevens et al. 1998). Taylor et al. (2001) publikovali práci, ve které se jim podařilo získat specifický marker pro kvantitativní detekci patogenní houby *P. graminea* v osivu (Bates et al.).

Genetická variabilita populací druhů rodu *Pyrenophora* byla studována řadou metod molekulární biologie: RFLP (Wu et al. 1993), RAPD (Reeves et al. 1991, Peever & Milgroom 1994, Peltonen et al. 1996, Jonsson et al. 2000), AFLP (Campbell et al. 1999) a analýzou ITS oblastí (Stevens et al. 1998).

Cílem této práce je aplikovat některé z uvedených metod na kolekci houbových patogenů rodu *Pyrenophora* spp. (imperfektní stadium *Drechslera* spp.) a zjistit tak míru intra i interspecifické variability. Toto „zmapování terénu“ je součástí řešení projektu NAZV, jehož výsledkem by mělo být nalezení druhově specifického markeru pro kvantitativní stanovení patogena v hostiteli metodou TaqMan real-time PCR.

MATERIÁL A METODY

Houbové izoláty:

Ke studiu bylo použito 35 monosporidiálních izolátů *Pyrenophora teres*, *P. tritici repentis*, *P. graminea* a *Helminthosporium sativum* (Tab.1). Izoláty byly získány z napadených listů pšenice či ječmene a kultivovány *in vitro* na PDA médiu.

Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí detergentu CTAB. Mycelium bylo rozetřeno v porcelánové misce v prostředí kapalného dusíku na jemný prášek. Po přidání extrakčního pufru (0,35M sorbitol, 0,1M Tris, 5mM EDTA, pH=7,5), lyzujícího pufru (2M NaCl, 0,2M Tris, 50mM EDTA, 2% CTAB, pH=7,5) a 5% roztoku sarkosylu byla směs inkubována 20 minut při 65°C. DNA byla extrahována směsí chloroformu a izoamylalkoholu (24:1) a precipitována 1x objemem absolutního etanolu. DNA byla promyta 75% roztokem etanolu a rozpuštěna v minimálním množství TE pufru. RNA byla odstraněna inkubací roztoku s RNázou A při 37°C po dobu 10 minut. Kvalita a koncentrace DNA byla stanovena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Ethidium-bromidem vizualizovaná DNA byla detekována pod UV lampou. Porovnáním se standardem HindIII byla zjištěna kvalita a koncentrace DNA.

Tab. 1 - Izoláty houbových patogenů rodu *Drechslera* a *Helminthosporium sativum*

Pořadí	Označení izolátu	Název	Specifikace
1/01	DTR-01	<i>Drechslera tritici repentis</i>	1034
2/01	DTR-02	<i>Drechslera tritici repentis</i>	
3/01	DTR-03	<i>Drechslera tritici repentis</i>	10137JS
4/01	DT-01	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>Teres</i>	N1, KM2000 Beate
5/01	DT-02	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	N7, Rýmařov99
6/01	DT-03	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Druholec99, Akcent
7/01	HS-01	<i>Helminthosporium sativum</i>	Hradec nad Svitavou99, Forum
8/01	DM-01	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	KM2000, Monaco
1/02	DG-01	<i>Drechslera graminea</i>	Ruz 01/1
2/02	DG-02	<i>Drechslera graminea</i>	Ruz 01/2
3/02	DG-03	<i>Drechslera graminea</i>	Ruz 01/4
4/02	DG-04	<i>Drechslera graminea</i>	KM 01/1
5/02	DG-05	<i>Drechslera graminea</i>	KM 01/3
6/02	DM-02	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Sv 01/ Tif S
7/02	DM-03	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Tab 96/ Kromoz S1
8/02	DM-04	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Tab 96/ Kromoz S2
9/02	DM-05	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Sv 01/ Okál S1
10/02	DM-06	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Sv 01/ Okál S2
11/02	DT-04	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Sv 01/ Tif N
12/02	DT-05	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Sv 00/ Forum
13/02	DT-06	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	VB 97/ Amulet
14/02	DT-07	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Nor 01/ N1
15/02	DT-08	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	SRN 00/ N1
16/02	DM-07	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	VB 01/ Okál S2
17/02	DM-08	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Sv 01/ Lur S
18/02	DM-09	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Z 01/ výd S2
19/02	DM-10	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Z 01/ výd S1
20/02	DM-11	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Lu 01/ Tif S2
21/02	DM-12	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Lu 01/ Okál S1
22/02	DM-13	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Lu 01/ SGL S2
23/02	DM-14	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>maculata</i>	Lu 01/ SGL S1
24/02	DT-09	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Km 00/ Mar N
25/02	DT-10	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Dr 98/ AkN
26/02	DT-11	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Sv 99/ Forum N
27/02	DT-12	<i>Drechslera teres</i> sp. <i>teres</i>	Nor 01/ N2

SCAR, ITS

V Tab. 2 jsou uvedeny sekvence a hybridizační teploty primerů užitých ve SCAR a ITS analýze. PCR reakce v 15µl reakční směsi (0,2mM dNTP, 1x pufr, 1U Tth polymerázy DYNEX, 2mM MgCl₂, 100ng DNA) byly prováděny v cykleru PTC-200 fy MJ Research. Výsledky reakce byly analyzovány buď pomocí elektroforézy v agarózovém gelu s ethidium-bromidem a vizualizovány pod UV lampou nebo metodou kapilární elektroforézy na přístroji ABI PRISM 310 fy Perkin-Elmer s vnitřním standardem Tamra 500 (Applera, P/N 401733). Výsledkem analýzy elektroforetogramů programem GeneScan a Genotyper jsou velikosti fragmentů a jejich zařazení do kategorií podle velikosti v bp.

Tab. 2 - Primery SCAR a pro analýzu ITS oblasti

SCAR primery:		Tm (°C)	
PG1 F:	5'-GTT TCT ACC TAC GGA TAG-3'	50	Taylor et al. (2001)
PG1 R:	5'-TAG CGA GGT AGT AAA GAA GC-3'		
PG2 F:	5'-CTT CTT AGC TGG GGC TAC CGT C-3'	68	
PG2 R:	5'-ACC GAC TCG GGA AAA GAG CA-3'		
Primery pro ITS oblasti:		Tm (°C)	EMBL
ITS1:	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	55	databáze; Lee and
ITS2:	5'-GCT GCG TTC TTC ATG GAT GC-3'		
ITS3:	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'	55	Taylor (1992)
ITS4:	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'		
ITSF:	5'-GCA GAT TGG GTA GTC CCC GCT TT-3'	65	Stevens et al.(1998)
ITSR:	5'-GAG CCC GCC AAG GAA ACA AGT AGT-3'		

AFLP

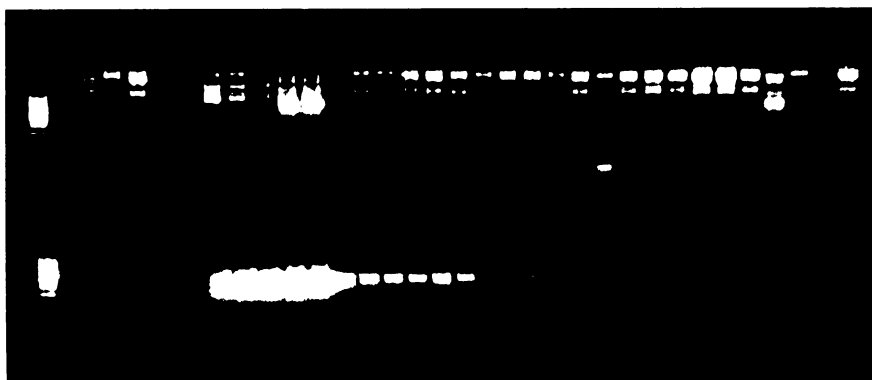
Metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) je založena na analýze restrikčních fragmentů pomocí PCR se značenými specifickými primery. Vzorek obsahující 100ng DNA byl inkubován s restrikčními endonukleázami MseI a EcoRI a adaptory (MseI a EcoRI) při teplotě 37°C po dobu 2 hodin. Restrikční fragmenty byly amplifikovány podle protokolu AFLPTM Plant Mapping, fy Applied Biosystems - kit č. P/N 402273 v cyklu UNO II fy Biometra. Selektivní amplifikace s fluorescenčně značenými EcoRI primery byla prováděna podle protokolu Applied Biosystems jako multiplex PCR v reakční směsi o objemu 10 µl (0,2mM dNTP, 1µM MseI primer, 3 x 0,5µM EcoRI primery, 1U Taq polymerázy Quiagen, 1x pufr s 10mM MgCl₂, 1µl preselektivně-amplifikační reakce) v cyklu ABI PRISM 7700. Produkty reakce byly analyzovány pomocí kapilární elektroforézy dle protokolu firmy Applied na přístroji ABI PRISM 310. Jako interní velikostní standard byl použit Rox 500 (Applied, P/N 401734). Analýzy byly zpracovány pomocí softwaru GeneScan a Genotyper na základě velikosti fragmentů v bp.

Pro každý genotyp byla vygenerována matice přítomnosti (1) či absence (0) signálu v dané kategorii. Aplikací programu RAPDALIGN (Armstrong et al. 1994) byly získány relativní genetické vzdálenosti. Dalším zpracováním dat programem STATISTICA byly získány odpovídající dendrogramy a analýzy principiálních komponent.

VÝSLEDKY A DISKUSE

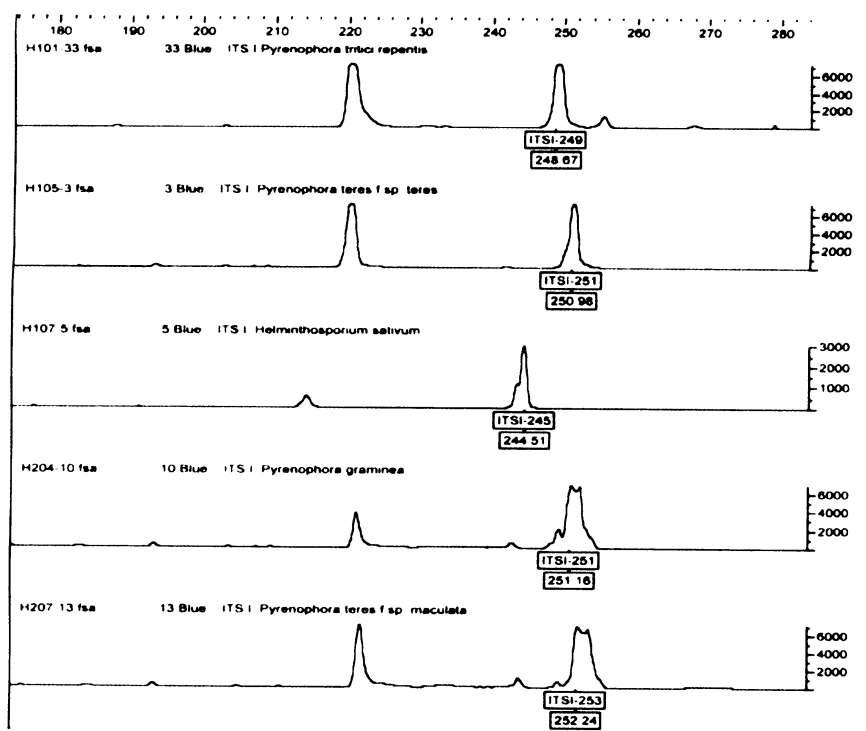
Výsledky analýzy houbových patogenů pomocí SCAR primerů PG1 a PG2 odpovídají publikovaným výsledkům. PCR reakce s PG1 primerovým párem poskytuje množství fragmentů, které nejsou druhově specifické (viz Obr.1a). Výsledkem PCR s primerovým párem PG2 je produkt o délce 435bp (viz Obr.1b). Není striktně specifický pro *P. graminea*, k hybridizaci primerového páru dochází i u některých izolátů *P. teres*, ale v mnohem menší intenzitě. Lze jej tedy použít pro kvantitativní stanovení *P. graminea*, zvláště když je tento druh detekován v osivu, kde se *P. teres* nevyskytuje.

Obr. 1 - Amplifikace se SCAR primery PG1 (nahore) a PG2 (dole)



ITS oblasti byly amplifikovány PCR s primery ITS1/2, které uvozují oblast ITS I.; ITS 3/4, které ohraničují oblast ITS II; ITS F/R uvozují část oblasti ITS I a pomocí kombinace primerů byla amplifikována ITS I i II včetně 5,8S rDNA. Byl pozorován délkový polymorfismus produktů amplifikace ITS I oblasti (viz obr. 2). Z obrázku vyplývá, že se jednotlivé druhy rodu *Pyrenophora* liší právě v oblasti ITS I. K jednoznačnému závěru by však bylo třeba získat údaje o sekvenci daného úseku u studovaných izolátů. Oblast ITS II neposkytuje jednoznačné výsledky. Velikosti produktů se u *P. graminea* pohybují v rozmezí 298 - 346 bp, u *P. teres* f. sp. *maculata* od 298 do 344 bp, u *P. teres* f. sp. *teres* od 298 do 348 bp u *P. tritici-repentis* 338 bp a u druhu *Helminthosporium sativum* 354 bp. Amplifikací části ITS I oblasti pomocí primerového páru ITS F/R byly získány produkty o velikosti 92bp u všech studovaných izolátů. Celá oblast ITS byla analyzována pomocí restričních enzymů, ale neposkytla žádné výsledky, které by byly použitelné k rozlišení jednotlivých druhů či forem patogenů *Pyrenophora*.

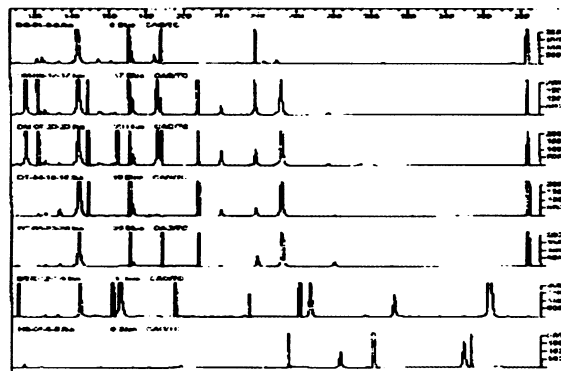
Obr. 2 Elektroforetogram analýzy ITS I



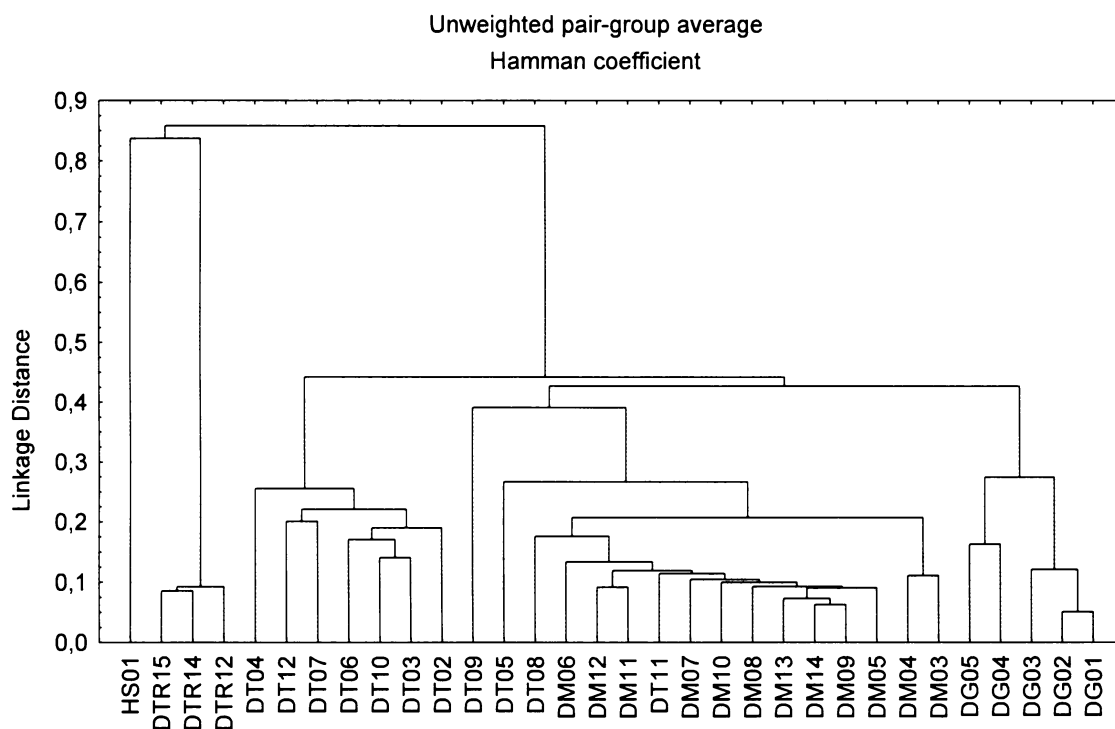
K dalšímu studiu byla zvolena metoda AFLP. Analýzou produktů PCR s 33 primerovými kombinacemi bylo detekováno 1247 polymorfních signálů (viz Obr. 3). Jejich statistickým zpracováním na základě genetických vzdáleností byl vytvořen dendrogram (viz obr.4). Z něho vyplývá, že lze na základě polymorfismu restričních míst rozlišit studované druhy rodu *Pyrenophora*. Nelze však jednoznačně rozlišit *P. teres* f. sp. *teres* od *P. teres* f. sp. *maculata*. Pro zjištění míry intraspecifické variability mezi oběma formami je třeba doplnit

informace o údaje ze sekvenace některých vybraných oblastí.

Obr.3 Ukázka elektroforetogramu analýzy AFLP



Obr.4 - Dendrogram získaný na základě dat z analýzy AFLP



Závěrem lze říci, že molekulární markery poskytují užitečné informace o studovaném genotypu. Na základě studia intra a interspecifické variability je možné získat markery, které selektivně rozliší jednotlivé druhy patogenů v napadeném pletivu hostitele. Dalším cílem je vypracování metodiky kvantifikace přítomnosti patogena v rostlině, která umožní studium míry poškození hostitele na míře napadení rostliny či vlivu fungicidů nebo vnějších faktorů na rozšíření patogena.

LITERATURA

- ARMSTRONG J.S., GIBBS A.J., PEAKALL R., WEILLER G. (1994): The RAPDistance package.ftp: life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance or http://life anu.edu.au/molecular/software.
- ANDERSON J.A., STACK R.W., LIU S., WALDRON B.L., FJELD A.D., COYNE C., MORENO-SEVILLA B., MITCHELL FETCH J., SONG Q.J., CREGAN P.B., FROHBERG R.C. (2001): DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor. Appl. Genet.*, **102**: 1164-1168.
- APPEL D.J., GORDON T.R. (1995): Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Exper. Mycology*, **19**: 120-128.
- BATES J.A., TAYLOR E.J.A., KENYON D.M., THOMAS J.E.: The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. (unpublished).
- BÖHM J., HAHN A., SCHUBERT R., BAHNWEG G., ADLER N., NECHWATAL J., OEHLMANN R., OSWALD W. (1999): Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *J. Phytopathol.* **147**: 409-416.
- BROWN A.E., MUTHUMEENAKSHI S., SREENIVASAPRAASAD S., MILLS P.R., SWINBURNE T.R. (1993): A PCR primer-specific to *Cylindrocarpon heteronema* for detection of the pathogen in apple wood. *FEMS Microbiol. Letters*, **108**: 117-120.
- BROWN T.A., WARING R.B., SCAZZOCCHIO C., DAVIES R.W. (1985): The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. *Curr. Genet.*, **9**: 113-117.
- BRUNS T.D., WHITE T.J. TAYLOR J.W. (1991): Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Syst.*, **22**: 525-64.
- BUERSTMAYR H., LEMMENS M., HARTL L., DOLDI L., STEINER B., STIERSCHNEIDER M., RUCKENBAUER P. (2002): Molecular mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor. Appl. Genet.*, **104**: 84-91.
- CAMPBELL G.F., CROUS P.W., LUCAS J.A. (1999): *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot on barley in South Africa. *Mycol. Res.*, **103**: 257-267.
- CROUS P.W., JANSE B.J.H., TUBRIDGE J., HOLZ G. (1995): DNA homology between *Pyrenophora japonica* and *P. teres*. *Mycol. Res.*, **99**: 1098-1102.
- CUMMINGS D.J., MCNALLY K.L., DOMENICO J.M., MATSUURA E.T. (1990): The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, **17**: 375-402.
- DOOHAN F.M., PARRY D.W., NICHOLSON P. (1999): *Fusarium* ear blight of wheat : the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathol.*, **48**: 209-217.
- DOOHAN F.M., PARRY D.W., JENKINSON P., NICHOLSON P. (1998): The use of species-specific PCR-based assays to analyse *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathol.*, **47**: 197-205.
- FRAAIJE B.A., BUTTERS J.A., COELHO J.M., JONES D.R., HOLLOMON D.W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.*, **51**: 45-54.

- HOPWOOD A., OLDROYD N., FELLOWS S., WARD R., OWEN S.A., SULLIVAN K. (1997): Rapid quantification of DNA samples extracted from buccal scrapes prior to DNA profiling. *Biotechniques*, **23**: 18-20.
- HUANG X.Q., HSAM S.L.K., ZELLER F.J., WENZEL G., MOHLER V. (2000): Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene Pm24 and marker validation for molecular breeding. *Theor. Appl. Genet.*, **101**: 407-414.
- CHANTRET N., SOURDILLE P., RODER M., TAVAUD M., BERNERD M., DOUSSINAULT G. (2000): Location and mapping of the powdery mildew resistance gene MIRE and detection of a resistance QTL by bulked segregant analysis (BSA) with microsatellites in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **100**: 1217-1224.
- CHEN W., GRAY L.E., GRAU C.R. (1996): Molecular differentiation of fungi associated with brown stem rot and detection of *Phialophora gregata* in resistant and susceptible soybean cultivars. *Phytopathology*, **86**: 1140-1148.
- JONSSON R., SALL T., BRYNGELSSON T. (2000): Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Can. J. Plant. Pathol.*, **22**: 258-264.
- LEE S.B., TAYLOR J.W. (1992): Phylogeny of five fungus like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.*, **9**(4): 636-653.
- LLOYD-MACGILP S.A., CHAMBERS S.M., DODD J.C., FITTER A.H., WALKER C., YOUNG J.P.W. (1996): Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **133**: 103-111.
- LOUW J.P.J., VICTOR D., CROUS P.W., HOLZ G., JANSE B.J.H. (1995): Characterisation of *Pyrenophora* isolates associated with spot and net type lesions on barley in south Africa. *J. Phytopathology*, **143**: 129-134.
- MAHUKU G.S., GOODWIN P.H., HALL R. (1995): A competitive polymerase chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape. *MPMI*, **8**, 5: 761-767.
- MAJER D., MITHEN R., LEWIS B.G., VOS P., OLIVER R.P. (1996): The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol. Res.* **100**: 1107-1111.
- MÖHLER V., JAHOOOR A. (1996): Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powdery mildew resistance loci in cereals. *Theor. Appl. Genet.*, **93**: 1078-1082.
- ONDŘEJ M. (2000): Houby rodu *Drechslera* na košťavách a jilcích. *Agro*, **9**: 8-10.
- PARRY D.W., NICHOLSON P. (1996): Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathol.*, **45**: 383-391.
- PECCHIONI N., VALE G., TOUBIA-RAHME H., FACCIOLI P., TERZI V., DELOGU G. (1999): Barley - *Pyrenophora graminea* interaction: QTL analysis and gene mapping. *Plant Breeding*, **118**: 29-35.
- PEEVER T.L., MILGROOM M.G. (1994): Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. Bot.*, **72**: 915-923.
- PELTONEN S., JALLI M., KAMMIOVIRTA K., KARJALAINEN R. (1996): Genetic variation in *Drechslera teres* populations as indicated by RAPD markers. *Ann. Appl. Biol.*, **128**: 465-477.

- REEVES J.C., BALL S.F.L. (1991): Research note: Preliminary results on the identification of *Pyrenophora* species using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Plant Varieties and Seeds*, **4**: 185-189.
- ROBERT O., ABELARD CH., DEDRYVER F. (1999): Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat. *Mol. Breeding*, **5**: 167-175.
- SCOTT D.B. (1991): Identity of *Pyrenophora* isolates causing net-type and spot-type lesions on barley. *Mycopathologia*, **116**: 29-35.
- SCHNIEDER F., KOCH G., JUNG CH., VERREET J.A. (2001): Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella gaminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. *Europ. J. Plant Pathol.*, **107**: 285-290.
- SIMPSON D.R., WESTON G.E., TURNER J.A., JENNINGS P., NICHOLSON P. (2001): Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Europ. J. Plant Pathol.*, **107**: 421-431.
- SMEDEGAARD-PETERSEN V. (1977): Inheritance of genetic factors for symptoms and pathogenicity in hybrids of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. *Phytopath. Z.*, **89**: 193-202.
- SREENIVASAPRASAD S., SHARADA K., BROWN A.E. MILLS P.R. (1996): PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.*, **45**: 650-655.
- STEVENS E.A., BLAKEMORE E.J.A., REEVES J.C. (1998): Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Mol. Plant Pathol.*, on-line.
- TACCONI G., CATTIVELLI L., FACCINI N., PECCHIONI N., STANCA A.M., VALE G. (2001): Identification and mapping of a new leaf stripe resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **102**: 1286-1291.
- TAYLOR E.J.A., STEVENS E.A., BATES J.A., MORREALE G., LEE D., KENYON D.M., THOMAS J.E. (2001): Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathol.*, **50**: 347-355.
- WALLWORK H., LICHON A., SIVANESAN A. (1992): *Drechslera wirreganensis* - a new hyphomycete affecting barley in Australia. *Mycol. Res.* **96**: 886-888.
- WILLIAMS K.J., LICHON A., GIANQUITTO P., KRETSCHMER J.M., KARAKOUSIS A., MANNING S., LANGRIDGE P., WALLWORK H. (1999): Identification and mapping of a gene conferring resistance to the spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) in barley. *Theor. Appl. Genet.*, **99**: 323-327.
- WOLF K., DEL GIUDICE L. (1988): The variable mitochondrial genome of *Ascomysetes*: organisation, mutational alteration and expression. *Adv. Genet.*, **25**: 185-308.
- WU H., STEFFENSON B.J., YOU L., OLESON A.E. (1993): Restriction fragment length polymorphism of *Pyrenophora* species pathogenic on barley. *Phytopathology*, **83**: 887.
- ZHONG S., STEFFENSON B.J. (2001): Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, **91**: 469-476.

Tato práce je součástí řešení projektu NAZV č. 1361/2001.

**AFLP-BASED PCR MARKERS THAT DIFFERENTIATE SPOT AND NET FORMS
OF *PYRENOPHORA TERES*.** Plant Pathology **54**: 66-73.



AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*

L. Leisova^{a*†}, L. Kucera^a, V. Minarikova^b and J. Ovesna^a

^aResearch Institute of Crop Production, Drnovska, 507, 161 06 Prague 6 – Ruzyne; and ^bAgricultural Research Institute, Havlickova 2787, 76707 Kromeriz, Czech Republic

Specific polymerase chain reaction (PCR) primers were developed from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fragments of *Pyrenophora teres*, the causal agent of net blotch on barley leaves. The primers were designed specifically to amplify DNA from *P. teres* f. *teres* (net form) and allow its differentiation from *P. teres* f. *maculata* (spot form), which is morphologically very similar to *P. teres* f. *teres* in culture. The PCR amplification was carried out successfully from DNA extracted from fungal mycelium. The PCR assay was validated with 60 samples of *Pyrenophora* species. The amplification with four designed PCR primer pairs provided *P. teres* form-specific products. No cross-reaction was observed with DNA of several other species, such as *P. tritici-repentis*, *P. graminea* and *Helminthosporium sativum*.

Keywords: barley net blotch, PCR detection, *Pyrenophora teres* f. *maculata*, *Pyrenophora teres* f. *teres*, SCAR markers

Introduction

Net blotch caused by *Pyrenophora teres* (anamorph: *Drechslera teres*) is an important seed-borne disease of barley (*Hordeum vulgare*). It is widespread and causes considerable yield losses, ranging in the Czech Republic from 10 to 40% (Minarikova & Polisenka, 1999).

There are two forms of the pathogen: *P. teres* f. *teres* (anamorph, *D. teres* f. *teres*) and *P. teres* f. *maculata* (anamorph, *D. teres* f. *maculata*) which differ in the symptoms induced on barley leaves. *Pyrenophora teres* f. *teres* causes a typical lesion which is characterized by dark brown blotches that look like a net, accompanied by chlorosis, whilst *P. teres* f. *maculata* causes distinctly different symptoms, consisting of dark-brown, round to elliptical lesions surrounded by a chlorotic (yellow) halo (Smedegard-Petersen, 1977).

In spite of the symptoms, it is difficult to distinguish the two forms morphologically in culture. Wallwork *et al.* (1992) and Crous *et al.* (1995) identified slight differences between them. These differences, expressed as *P. teres* f. *maculata* having slightly narrower and tempered spores, are too slight to provide reliable diagnosis in isolation.

Traditionally, this pathogen has been identified by plating seeds on a culture medium and examining them microscopically after a period of incubation. This method

is time-consuming and unreliable. In recent years DNA technology has become one of the major tools for the identification and detection of fungal plant pathogens (Mugnier, 1995). Most published works concerning the study of *Pyrenophora* isolate variability have been based on the analysis of ITS regions (Stevens *et al.*, 1998), on molecular methods like random amplified polymorphic DNA (RAPD; Peever & Milgroom, 1994; Peltonen *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1999; Jonsson *et al.*, 2000) or restriction fragment length polymorphism (RFLP; Louw *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2002).

Taylor *et al.* (2001) developed specific markers PG1 and PG2, derived from a RAPD product to detect *P. graminea* in a real-time PCR system in barley seed. These markers can differentiate *P. graminea* isolates from *P. teres* isolates, but they are not able to differentiate the spot and net forms of *P. teres*.

A new type of marker for real-time PCR-based detection and quantification of *P. teres* was developed by Bates & Taylor (2001). Scorpion ARMS (amplified refractory mutation system) primers were designed such that a single nucleotide base mismatch in the primer sequence could distinguish *P. teres* from *P. graminea*. As the Scorpion primers are based on ITS sequences, they amplify both net and spot forms of *P. teres* (Stevens *et al.*, 1998). Williams *et al.* (2001) described a PCR test that can discriminate between the two forms of *P. teres*, but the assay showed a cross-reaction with *P. graminea* and could not differentiate these two species.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a reliable PCR-based marker system for estimating genetic relationships (Vos *et al.*, 1995). This technique is

*To whom correspondence should be addressed.

†E-mail: leisova@vurv.cz

Accepted 20 September 2004.

advantageous because variability can be assessed at a large number of independent loci, and data are obtained quickly and are reproducible (Majer *et al.*, 1996; Zhong & Steffenson, 2001). Since polymorphism is detected as the presence or absence of amplified restriction fragments, AFLPs are usually considered dominant markers (Powell *et al.*, 1996). The resulting DNA fingerprint provides a large number of genetic markers and the multiplex ratio, defined as the number of information points analysed per experiment, is much higher than for other types of markers (Powell *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1999). AFLP is reported to be especially informative in establishing relationships within closely related genotypes. Campbell *et al.* (1999) used AFLP for a precise taxonomic study of *Pyrenophora* species occurring in South Africa. More recently, AFLPs have been used to evaluate variability within *P. teres* and *P. graminea* isolates from Australia (Williams *et al.*, 2001).

In the Czech Republic both forms of *P. teres* occur. As the resistance to the two forms of net blotch is inherited independently (Ho *et al.*, 1996), it is important that the pathogen is correctly identified. The main aim of this study was focused on the development of specific primers that differentiate spot form and net form isolates of the net blotch fungus *P. teres* from each other and also from *P. graminea*. The AFLP method was chosen for this purpose.

Materials and methods

Thirty isolates of *P. teres* f. *teres*, 36 isolates of *P. teres* f. *maculata*, five isolates of *P. graminea*, three isolates of *P. tritici-repentis*, one isolate of *P. flavispora* and four isolates of *Helminthosporium sativum* were evaluated (Table 1). These isolates were collected from different barley-growing regions of the Czech and Slovak republics. Five isolates that originated from Norway, Germany and Syria were also included (see Table 1). Isolates of *H. sativum* were used as outliers for molecular variability analysis.

All isolates were derived from single conidia taken from leaf tissue. Leaf segments with disease symptoms were excised and incubated at 20–23°C. For DNA extraction, mycelia were cultured in 20 mL of potato-dextrose broth.

DNA isolation

DNA was extracted from mycelia according to the optimized protocol using extraction buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris, 5 mM EDTA, pH 7.5), lysis buffer (2 M NaCl, 0.2 M Tris, 50 mM EDTA, 2% CTAB, pH 7.5) and 5% solution of CTAB in a high concentration of NaCl (min. 0.5 M). DNA was precipitated by one volume of absolute ethanol and diluted in an appropriate volume of TE buffer. DNAs were run in a 0.8% agarose gel to verify the quality and the concentration. λ HindIII (Fermentas) was used as a standard for size and concentration.

AFLP analysis

Amplified fragment length polymorphism analyses were done according to the AFLP Plant Mapping Protocol

(Applied Biosystems). *MseI* and *EcoRI* were used as restriction nucleases.

The selective amplification, with *MseI* primers and fluorescently marked *EcoRI* primers, was done as multiplex PCR in a reaction mixture of 10 μ L [0.2 mM dNTP, 1 μ M *MseI* primer, 3 \times 0.5 μ M *EcoRI* primers, 1 U *Taq* polymerase (QIAGEN), 1 \times buffer with 10 mM MgCl₂ and 1 μ L diluted (1:20) preselective amplification reaction] in an ABI PRISM 7700 cycler (Applied Biosystems). The amplification products were separated by capillary electrophoresis in ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Rox500 (PN 401734, Applied Biosystems) was used as an internal size standard. Chromatograms were processed by the software GeneScan and Genotyper. For each isolate, a binary matrix, reflecting specific AFLP fragment presence (1) or absence (0), was generated. Pairwise distances between the isolates, based on Hamman similarity metrics (Armstrong *et al.*, 1994), were calculated using the Microsoft Excel VBA (Visual Basic for Applications) macros. Cluster analysis was performed by Statistica for Windows (StatSoft, Inc.) by means of an unweighted pair-group method that used an arithmetic averaging algorithm (UPGMA).

Cloning and sequencing

Form-specific AFLP fragments were extracted from 3% agarose gel using a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), cleaned using a StrataPrep PCR purification kit and cloned in a pPCR-Script Amp SK(+) cloning vector according to the manufacturer's instructions (Stratagene). The recombinant plasmids were transformed into XL 10-Gold Ultracompetent cells of *E. coli* (Stratagene) using a heat shock (60 s at 42°C). Plasmids were extracted using QIAprep columns (QIAGEN). The presence of expected inserts was verified by PCR, using AFLP selective amplification primers. Amplification products were separated by capillary electrophoresis, using ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

Inserts were sequenced using a Big Dye Terminator 3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems) and universal sequencing primers, either T3 or T7. Extension products were separated on an ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems). Electrophoretic data were analysed in Sequence Analysis for Windows NT software (Applied Biosystems).

Sequence alignments were assembled using T-COFFEE software (Notredame *et al.*, 2000). *Pyrenophora teres* form-specific primers were designed using the Primer Express for Windows NT 1.5 software (Applied Biosystems).

PCR assay

Amplifications were performed in a total volume of 15 μ L. Reaction mixtures consisted of 0.33 μ M of each primer, 0.25 mM dNTP, 1 \times PCR reaction buffer (Biotools), 2 mM MgCl₂, 1 U Tth polymerase (Biotools) and 100 ng DNA template. PCR was performed in a Flexigene cycler (Techne) under the following conditions: an initial denaturing step of 95°C for 5 min, followed by 35

Table 1 Summary of the isolates of *Pyrenophora* spp. and *Helminthosporium sativum* used in the study, and the amplification results using the developed markers

Fungus	Isolate	Country of origin	Amplification with developed markers				
			DTM494d (161 bp)	DTM494d7 (379 bp)	DTT429g (93 bp)	DTT471h (91 bp); DTT339i (81 bp)	DTM348j (66 bp)
<i>Pyrenophora tritici repentis</i>	PTR-12	CZ – Uhretice	–	–	–	–	+
	PTR-14	CZ – Uhretice	–	–	–	–	–
	PTR-15	CZ – Uhretice	–	–	–	–	–
<i>Pyrenophora graminea</i>	PG-01	CZ – Ruzyne	–	+	+	–	–
	PG-02	CZ – Ruzyne	–	+	+	–	–
	PG-03	CZ – Ruzyne	–	+	+	–	–
	PG-04	CZ – Kromeriz	–	+	+	–	–
	PG-05	CZ – Kromeriz	–	+	+	–	–
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTM-02	CZ – Hradec Sv.	–	+	–	–	–
	PTM-03	CZ – Tabor	+	+	+	–	+
	PTM-04	CZ – Tabor	+	+	+	–	+
	PTM-05	CZ – Hradec Sv.	+	+	+	–	+
	PTM-06	CZ – Hradec Sv.	+	+	+	–	+
	PTM-07	CZ – Velky Beranov	+	+	+	–	+
	PTM-08	CZ – Hradec Sv.	+	+	+	–	+
	PTM-09	CZ – Zarici	+	+	+	–	+
	PTM-10	CZ – Zarici	+	+	+	–	+
	PTM-11	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-12	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-13	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-14	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTM-15/ PTT	CZ – Tovacov	–	+	+	+
PTM-16/ PTT		CZ – Tovacov	–	+	+	+	–
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTM-17	CZ – Kromeriz	+	+	+	–	+
	PTM-18	CZ – Cervenka	+	+	+	–	+
	PTM-19	CZ – Caslav	+	+	+	–	+
	PTM-20	CZ – Chrlice	+	+	+	–	+
	PTM-21	CZ – Chrlice	+	+	+	–	+
	PTM-22	CZ – Domaninek	+	+	+	–	+
	PTM-23	CZ – Filipov	+	+	+	–	+
	PTM-24	CZ – Stupice	+	+	+	–	+
	PTM-25	CZ – Filipov	+	+	+	–	+
	PTM-28	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-29	CZ – Chrastava	+	+	+	–	+
	PTM-31	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-32	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-33	CZ – Puste Jakartice	+	+	+	–	+
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTM-34/ PTT	CZ – Hradec Sv.	–	+	+	+	–
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTM-35	CZ – Postoupky	+	+	+	–	+
	PTM-36	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-37	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-38	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	PTM-39	CZ – Luzany	+	+	+	–	+
	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTT-02	CZ – Rymarov	Not tested			
PTT-03		CZ – Druholec	Not tested				
PTT-04		CZ – Hradec Sv.	–	+	+	+	–
PTT-05/ PTM		CZ – Hradec Sv.	+	+	+	–	+
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTT-06	CZ – Velky Beranov	–	+	+	+	–
	PTT-07	Norway	–	+	+	+	–
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTT-08/ PTM	Germany	+	+	+	–	+
	PTT-09/ PTM	CZ – Kromeriz	+	+	+	–	+
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTT-10	CZ – Druholec	–	+	+	+	–
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTT-11/ PTM	CZ – Hradec Sv.	+	+	+	–	+
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTT-12	Norway	–	+	+	+	–
	PTT-13	CZ – Kromeriz	–	+	+	+	–
	PTT-14	CZ – Kromeriz	–	+	+	+	–
	PTT-15	CZ – Kromeriz	–	+	+	+	–
	PTT-16	CZ – Kromeriz	–	+	+	+	–

Table 1 Continued

Fungus	Isolate	Country of origin	Amplification with developed markers				
			DTM494d (161 bp)	DTM494d7 (379 bp)	DTT429g (93 bp)	DTT471h (91 bp); DTT339i (81 bp)	DTM348j (66 bp)
	PTT-17	CZ – Tovacov	–	+	+	+	–
	PTT-18	CZ – Zhor	–	+	+	+	–
	PTT-19	CZ – Stupice	–	+	+	+	–
	PTT-20	Slovak Rep.	–	+	+	+	–
	PTT-21	Slovak Rep.	–	+	+	+	–
	PTT-23	CZ – Velky Beranov	–	+	+	+	–
	PTT-24	CZ – Velky Beranov	–	+	+	+	–
	PTT-25	CZ – Velky Beranov	–	+	+	+	–
	PTT-26	CZ – Lipa	–	+	+	+	–
	PTT-27	CZ – Uhretice	–	+	+	+	–
	PTT-28	CZ – Uhretice	–	+	+	+	–
	PTT-29	CZ – Chrlice	–	+	+	+	–
	PTT-31	CZ – Velky Beranov	–	+	+	+	–
	PTT-32	CZ – Strelice	–	+	+	+	–
	PTT-33	CZ – Hlavnice	–	+	+	+	–
<i>Pyrenophora flavispora</i>	PF-01	Syria	–	–	–	–	–
	PTM-30/ PF	Syria	–	+	–	–	–
<i>Helminthosporium sativum</i>	HS-01	CZ – Hradec nad Sv.	–	–	–	–	–
	HS-02	CZ – Kromeriz	–	–	–	–	–
	HS-03	CZ – Kromeriz	–	–	–	–	–
	HS-04	CZ – Hradec Sv.	–	–	–	–	–

cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C (annealing temperature for primers DTT339i and DTM348j) or 30 s at 55°C (annealing temperature for primer pair DTM494d) or 30 s at 62°C (annealing temperature for primer pairs DTT429g, DTT471 h and DTM494d7), 40 s at 72°C and 72°C for 5 min.

Products (10 µL of PCR reaction) were analysed using agarose gel electrophoresis.

Results

AFLP analysis

Amplified fragment length polymorphism analysis was conducted on DNA prepared from 32 isolates of *P. teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* and *Helminthosporium sativum* (as an outlier), using 33 primer pairs (see Table 2). For each of 33 primer pairs, 27–50 polymorphic DNA fragments of 50–500 bp in size were detected. A total of 1247 AFLP polymorphic bands were recorded across all studied isolates. The AFLP patterns were distinct among the different species, even between the two forms of *P. teres*. When subjected to a UPGMA clustering analysis based on genetic distances, five groups were found (Fig. 1). Each group was represented by the isolates of one tested *Pyrenophora* species. The two forms of *P. teres* were differentiated into two groups, with the exception of four isolates (PTT-05, PTT-08, PTT-09 and PTT-11) that were initially collected as *P. teres f. teres* but on the basis of AFLP data were placed in the *P. teres f. maculata* cluster group (Fig. 1). Subsequent morphological and physiological checks confirmed the AFLP analysis results (M. Ondrej, Agritec, Sumperk, CZ, personal communication).

Table 2 Multiplexed amplified fragment length polymorphism (AFLP) primer combinations used in present study; AFLP products in bold were used for the cloning work

Msel	EcoRI-fam	EcoRI-ned	EcoRI-joe
CAC	TG	AT	AG
CAG	TG	TT	TA
	406 bp, 429 bp	411 bp	
CAG	TC	AT	AA
	252 bp		
CAA	TG	TT	TA
CAA	TC	AT	AG
	376 bp		494 bp
CTA	TG	TT	TA
			272 bp
CTA	TC	AT	AA
CTC	TC	AT	AA
CTG	TC	AT	AA
CTT	TC	AT	AA
CTT	TG	TT	AG
	471 bp		339 bp, 348 bp

AFLP converted specific primers

The results obtained from AFLP analysis showed a high level of polymorphism between the two forms of *P. teres*. Markers strictly specific to either spot or net form of *P. teres* AFLP were chosen. The specificity and reproducibility of selected markers were verified by uniplex selective amplification. PCR products were analysed by capillary electrophoresis and also in agarose gel. Reproducibility was found to be 99%. Ten markers that provided the most robust PCR products were selected and used on 10

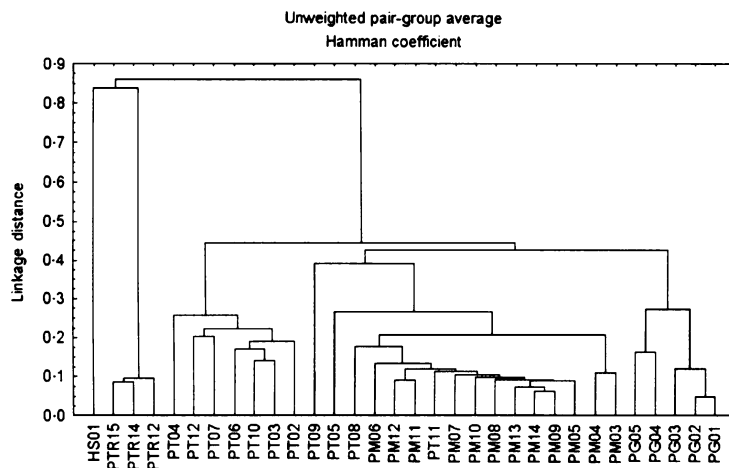


Figure 1 Dendrogram produced using a UPGMA cluster analysis based on Hamman dissimilarity coefficients calculated from 1247 different amplified fragment length polymorphism polymorphic fragments from *Pyrenophora teres* f. *teres*, *P. teres* f. *maculata*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis* and *Helminthosporium sativum*.

PTT	..TGC GTACC	AATTCAGGCA	TCATCATAGC	TGCAGAAGGA	AGCGGCACAT	GTGAGGGGGA	60
PTM	ACTGCGTACC	AATTCAGGCA	TCATCATAGC	TGCAGAAGGA	AGCGGCACAT	GTGAGGGGGA	
				DTT350i-F			
PTT	TATCTTTGGT	CTTTGTTTG	TTTTCTCGCA	TCACCATTCC	AGCATCTTGA	TGCGCTGGAG	120
PTM	TATCTTTGGT	CTTTGTTTG	TTTTCTCGCA	TCACCATTCC	AGCATCTTGA	TGCGCTGGAG	
				DTM340j-F			
PTT	TGAGACACGT	CTCGTGGATA	CTCTA...C	AT.....AG	GTGGAAATGC	ATGGCTAGCG	180
PTM	TGAGACACGT	CTCATGGATA	CTCTAGGTAC	ATACCAGTAG	GTGGAAATGC	ATAGCTAGCG	
				DTT340i-R		DTM350j-R	
PTT	TGATGCGGCG	T ATGTACATA	GTTTGTACGC	TAACTTGATT	GAGAAGTACG	TGCTACTGGG	240
PTM	TGATGCGGCG	...GTACATA	GTTTATACGC	TAACTTGATT	GAGAAGTACG	CGTACTGGG	
PTT	ACTTCATTCC	AGCAGGACCT	AGGTTGGAGG	CTGCATAGTG	GGAGTTGGCG	TATATATTCC	300
PTM	ACTTCATTCC	AGCAGGACCT	AGGTTGGAGG	CTGCATAGTG	GGAGTTGGCG	TATATATTCC	
PTT	ATGGTGTAAT	GAGTTCAGAT	GCCAGGATTA	TGAAGTTACT	CAGGACTCAT	C	351
PTM	ATGGTGTAAT	GAGTTCAGAT	GCCAGGATTA	TGAAGTTACT	CAGGACTCAT	C	

Figure 2 Sequences of the CTT/AG (339 bp) and CTT/AG (348 bp) AFLP fragments amplified from *Pyrenophora teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM) (sequence differences between the forms are indicated with bold letters).

selected genotypes – five isolates of *P. teres* f. *teres* (PTT-04, PTT-06, PTT-07, PTT-08/PTM, PTT-09/PTM) and five isolates of *P. teres* f. *maculata* (PTM-03, PTM-04, PTM-05, PTM-06, PTM-13) (see Tables 1 and 2). Seven cloned AFLP products were chosen for sequencing: CAA/TC-376 bp, CAA/AA-494 bp, CAG/TG-406 bp, CAG/TG-429 bp, CTT/TG-471 bp, CTT/AG 348 bp and CTT/AG-339 bp. Ten inserts of each selected clone were sequenced both forwards and in reverse using either T3 or T7 primers.

Only CAA/AA-494 bp, CAG/TG-429 bp, CTT/TG-471 bp, CTT/AG-339 bp and CTT/AG-348 bp sequenced DNA fragments could reliably be used to design specific PCR primers. The sequence of the CAA/TC-376 bp DNA fragment was totally homologous between the two forms of *P. teres* samples. The sequence of the cloned CAG/TG-411 bp DNA fragment showed it to be unreliable for primer design.

Very high homology was found between two of the cloned DNA fragments: CTT/AG (339 bp) and CTT/AG (348 bp). The first one was specific to *P. teres* f. *teres* and the second one was specific to *P. teres* f. *maculata* (Fig. 2).

Sequences of five DNA fragments were used to design *P. teres* form-specific primers (Table 3).

PCR

Three primer pairs, DTT429g, DTT471 h and DTT339I, were designed to detect *P. teres* f. *teres*. The sizes of amplification products were 93, 91 and 81 bp, respectively. Three other primer pairs, DTM494d, DTM494d7 and DTM348j, were designed to detect *P. teres* f. *maculata*. The amplification product sizes were 161, 379 and 66 bp, respectively. Each of them was validated on a panel of isolates of both forms of *P. teres* and other related species (see Table 1). The analysis of PCR products showed that only

Table 3 Sequences of specific primers for detecting forms of *Pyrenophora teres*

Target species	Primer name	Sequence	Amplicon size	Original AFLP fragments
<i>Pyrenophora teres</i> <i>f. teres</i>	DTT429g	F 5'-CTTTTGGCAAGGGTCGTGC-3' R 5'-GCTGATGACATAAGTCGCTGC-3'	93 bp	CAG/TT 411 bp
	DTT471h	F 5'-CCTGAGTAACTTGCCCCACC-3' R 5'-GAAAAGAGATGATGCGGACAC-3'	91 bp	CTT/TG 471 bp
	DTT339i	F 5'-TGATGCGCTGGAGTGAGACAC-3' R 5'-TGTACATACGCCGCATCACG-3'	81 bp	CTT/AG 339 bp
<i>Pyrenophora teres</i> <i>f. maculata</i>	DTM494d	F 5'-TAT TCTGCTAAGAGCTAGCATCCTA-3' R 5'-ACTGCGTACCAAT TCTCTACAATA-3'	161 bp	CAA/AA 494 bp
	DTM3494d7	F 5'-TTTACCTCTACACAGCCACACC-3' R 5'-AACATAT TCTTCGCCTACACATCG-3'	379 bp	CAA/AA 494 bp
	DTM348j	F 5'-CTTGATGCGCTGGAGTGAGA-3' R 5'-TGCATTTCACACTACTGGTATGTAC-3'	66 bp	CTT/AG 348 bp

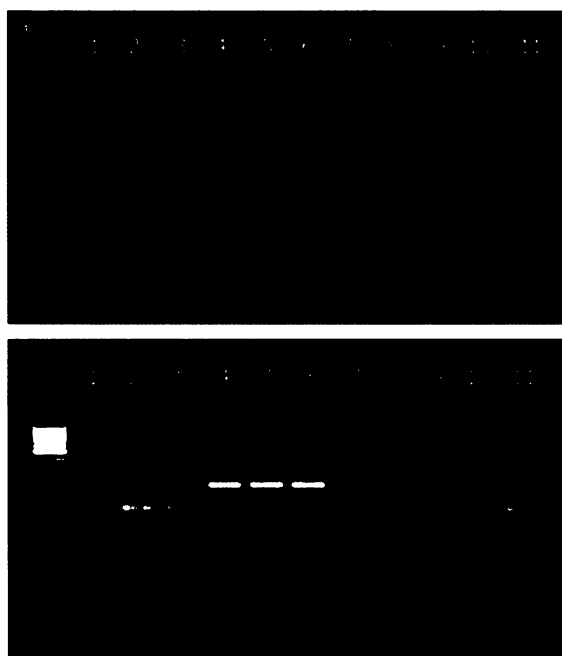


Figure 3 Agarose gels showing amplification products with primer pair DTT471h (a) and primer pair DTM494d (b). DNA templates were: lanes 1–3, *Pyrenophora teres* f. *teres*, isolates PTT-31, PTT-32 and PTT-33; lanes 4–6, *P. teres* f. *maculata*, isolates PTM-36, PTM-37 and PTM-38; lane 7, *Helminthosporium sativum*, isolate HS-04; lane 8, *P. tritici-repentis*, isolate PTR-12; lane 9, *P. graminea*, isolate PG-05; lane 10, *P. flavispora*, isolate PF-01; marker shown on the left is 50-bp ladder.

DTT471h (Fig. 3a) and DTT339i were specific to *P. teres* f. *teres*, while DTM494d (Fig. 3b) and DTM348j were specific to *P. teres* f. *maculata*. Primer pairs DTT429g and DTM494d7 amplified both forms of *P. teres*, as well as *P. graminea* isolates.

The assays were validated during a survey of isolates of *P. teres* from major barley-producing areas of the Czech Republic (see Table 1). Four isolates collected as *P. teres*

f. *teres* were genotyped as *P. teres* f. *maculata*. Three isolates collected as *P. teres* f. *maculata* were genotyped as *P. teres* f. *teres*. Isolate number PTM-30 that was collected from a barley leaf from Syria as *P. teres* f. *maculata* was genotyped as an unknown species. It was subsequently determined to be *P. flavispora* (M. Ondrej, Agritec, Sumperk, CZ, personal communication). All the results obtained are given in Table 1.

Discussion

The correct identification of pathogens is important for disease management, plant breeding and epidemiological studies. The taxonomy of *P. teres* has often been in dispute, with the pathogen causing spot symptoms variously described as *P. japonica* (Ito & Kuribayashi, 1931; Sivanesan, 1987; Scott, 1991), a mutant strain of *P. teres* (McDonald, 1967) or *P. hordei* (Wallwork *et al.*, 1992). However, following mating studies, Smedegard-Petersen (1971) concluded that the two pathogens causing spot and net type lesions developed from the same species, and thus named them *P. teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata*. Smedegard-Petersen's taxonomy was supported in studies of DNA banding patterns and sexual compatibility by Crous *et al.* (1995).

The question of whether *P. teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* are two forms of one species or two distinct species is still open. Smedegard-Petersen (1983) successfully crossed both forms of *P. teres* with each other, and each of them with *P. graminea*. He obtained stable and fertile progeny. If the definition of a biological species is accepted as a group of actually interbreeding natural populations which are reproductively isolated from each other, the two forms of *P. teres* and even *P. graminea* would be considered as one species. However, whether hybridization also takes place in nature is still not known. The designation of spot and net forms of *P. teres* and even of *P. graminea* as distinct species was based on morphology, and supported by the differences in symptoms induced on barley and in the type of infection process.

On the molecular side, the results are controversial. Stevens *et al.* (1998) have concluded, by considering the polymorphism of ITS regions, that *P. graminea* and the two forms of *P. teres* are intraspecific forms of the same species. On the other hand, Reeves & Ball (1991) were able to differentiate the two species using RAPD.

From the data presented here, *Pyrenophora* species variability using AFLP suggests that both *P. graminea* and the two forms of *P. teres* are distinct species. All three genotypes were grouped in the distinct clusters. These results were supported by the morphological and physiological study of the pathogen samples (M. Ondrej, Agritec, Sumperk, CZ, personal communication).

Furthermore, AFLP genotyping has been shown to be a sensitive method that enables one to discern genotypes closely related as *P. teres f. teres* and *P. teres f. maculata*. In several cases (PTM-05, PTM-06 and several others, see Table 1), the results proved more precise than visual evaluation alone. The validations, done subsequently on a morphological and physiological level, confirmed the AFLP analysis results (M. Ondrej, Agritec, Sumperk, CZ, personal communication). The PTM-02 sample was likely to be a mixture of several pathogens because it provided a very different AFLP profile.

Several net or spot form AFLP products (see Table 2) were so robust that they allowed the development of specific PCR-based assays. There were two problems with converting AFLP markers to specific markers. Firstly, numerous similarly sized fragments were identified, resulting in a mixture of fragments flanking the selected AFLP band. Consequently, the size of the latter had to be verified after cloning.

The second problem with converting AFLP markers to specific PCR-based assays was that an AFLP product specific to *P. teres f. teres* isolates was not present in *P. teres f. maculata* isolates. As a result, only the sequence of one form was obtained. It is likely that the same locus would show very high homology between the two forms of *P. teres*. This fact could be the reason why the primer pairs DTT429g and DTM494d7 did not provide specific PCR products, even though they were designed on the basis of the sequences of form-specific AFLP products. Williams *et al.* (2001) came across a similar problem when they isolated a RAPD fragment that was specific for *P. teres f. maculata* and sequenced its ends. Primers designed from the sequences of these ends were used to amplify DNA from both forms of *Pyrenophora teres*. No specificity was seen, so the amplicons were sequenced. The authors found very high homology between the two forms, with only a few single nucleotide polymorphisms (SNPs). Moreover, the PCR with PTT and PTM primer pairs and with several *P. teres f. teres* and *P. teres f. maculata* isolates (from Table 1) as DNA templates did not provide specific products. The sequencing of PCR products showed that at least one of the published SNPs (C/T-384 bp) does not occur in Czech *Pyrenophora teres* isolates. These results correspond to the fact that *P. teres* shows very high intraspecific variability (Peltonen *et al.*, 1996; Minarikova & Polisenka, 1999; Jonsson *et al.*, 2000).

This problem could also refer to two different AFLP fragments, CTT/AG (339 bp) and CTT/AG (348 bp), which showed very high sequence homology (Fig. 2). Further studies are necessary to verify whether these fragments are in fact from the same locus or not. Primers designed using the sequence differences between *P. teres f. teres* and *P. teres f. maculata* CTT/AG (339 bp) and CTT/AG (348 bp) AFLP fragments were specific for each form of the pathogen.

In conclusion, AFLPs were found to be a suitable method to generate specific PCR-based assays that are likely to be useful in taxonomic studies with *Pyrenophora* and in epidemiology and resistant breeding.

Acknowledgements

This project was supported by the National Agency for Agricultural Research in the Czech Republic (project no. QC1361). The authors thank Jana Sarova for help with growing the isolates. Many thanks are due to Michal Ondrej for all his personal communications.

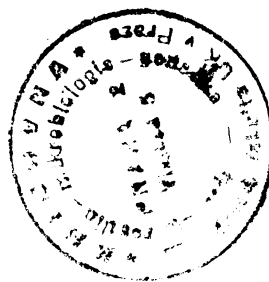
References

- Armstrong JS, Gibbs AJ, Peakall R, Weiller G, 1994. *The RAPDistance Package*. Online. [[ftp://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance](http://life.anu.edu.au/pub/software/RAPDistance); or <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>].
- Bates JA, Taylor EJA, 2001. Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology* 2, 275–80.
- Campbell GF, Crous PW, Lucas JA, 1999. *Pyrenophora teres f. maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycological Research* 103, 257–67.
- Crous PW, Janse BJH, Tunbridge J, Holz G, 1995. DNA homology between *Pyrenophora japonica* and *P. teres*. *Mycological Research* 99, 1098–102.
- Ho KM, Tekauz A, Choo TM, Martin RA, 1996. Genetic studies on net blotch resistance in a barley cross. *Canadian Journal of Plant Science* 76, 715–9.
- Ito S, Kuribayashi K, 1931. The ascigerous forms of some gramminicolous species of *Helminthosporium* in Japan. *Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University* 29, 85–125.
- Jonsson R, Sall T, Bryngelsson T, 2000. Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 258–64.
- Louw JPJ, Victor D, Crous PW, Holz G, Janse BJH, 1995. Characterisation of *Pyrenophora* isolates associated with spot and net type lesions on barley in South Africa. *Journal of Phytopathology* 143, 129–34.
- Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP, 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100, 1107–11.
- McDonald WC, 1967. Variability and the inheritance of morphological mutants of *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 57, 747–55.
- Minarikova V, Polisenka I, 1999. Analysis of populations of *Pyrenophora teres* on barley in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 4, 115–20.

- Mugnier J, 1995. Les taches brunes des orges: une nouvelle approche du diagnostic de l'Helminthosporiose la PCR. *Phytoma* **469**, 17–20.
- Notredame C, Higgins D, Heringa J, 2000. T-Coffee: a novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology* **302**, 205–17.
- Peever TL, Milgroom MG, 1994. Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Botany* **72**, 915–23.
- Peltonen S, Jalli M, Kammiövirta K, Karjalainen R, 1996. Genetic variation in *Drechslera teres* populations as indicated by RAPD markers. *Annals of Applied Biology* **128**, 465–77.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A, 1996. The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**, 225–38.
- Reeves JC, Ball SFL, 1991. Preliminary results on the identification of *Pyrenophora* species using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Plant Varieties and Seeds* **4**, 185–9.
- Sanchez G, Restrepo S, Duque MC, Fregene M, Bonierbale M, Verdier V, 1999. AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistant and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB). *Genome* **42**, 163–72.
- Scott DB, 1991. Identity of *Pyrenophora* isolates causing net-type and spot-type lesions on barley. *Mycopathologia* **116**, 29–35.
- Sivanesan A, 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* **158**, 1–261.
- Smedegard-Petersen V, 1971. *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. & *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. *Aarsskrift Kongelige Veterinaer Og Landbohøjskole* **1971**, 124–44.
- Smedegard-Petersen V, 1977. Inheritance of genetic factors for symptoms and pathogenicity in hybrids of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **89**, 193–202.
- Smedegard-Petersen V, 1983. Cross fertility and genetic relationship between *Pyrenophora teres* and *P. graminea*: the causes of net blotch and leaf stripe of barley. *Seed Science & Technology* **11**, 673–80.
- Stevens EA, Blakemore EJA, Reeves JC, 1998. Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Molecular Plant Pathology On-line* [<http://www.bspp.org.uk/mppol1998/1111stevens>].
- Taylor EJA, Stevens EA, Bates JA, Morreale G, Lee D, Kenyon DM, Thomas JE, 2001. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology* **50**, 347–55.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Horners M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuijper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407–14.
- Wallwork H, Lichon A, Sivanesan A, 1992. *Pyrenophora hordei* – a new ascomycete with *Drechslera* anamorph affecting barley in Australia. *Mycological Research* **96**, 1068–70.
- Williams KJ, Smyl C, Lichon A, Wong KY, Wallwork H, 2001. Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australasian Plant Pathology* **30**, 37–44.
- Wu HL, Steffenson BJ, Li Y, Olesona AE, Zhong S, 2002. Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**, 82–90.
- Zhong S, Steffenson BJ, 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* **91**, 469–76.

**3.3. Vývoj metody pro druhově specifickou kvantitativní detekci
Pyrenophora teres v pletivech hostitelské rostliny**

**THE QUANTIFICATION OF *PYRENOPHORA TERES* IN INFECTED BARLEY
LEAVES USING REAL-TIME PCR. Journal of Microbiological Methods (*in press*).**



Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR

L. Leisova^{1*}, V. Minarikova², L. Kucera¹, J. Ovesna¹

¹Research Institute of Crop Production, Drnovska 507, 16106 Prague 6 Ruzyne, the Czech Republic

²Agricultural Research Institute, Havlickova 2787, 76707 Kromeriz, the Czech Republic

* Corresponding author. Tel. +420 233 022 425; E-mail address: leisova@vurv.cz

Summary

Net blotch is a barley foliar disease caused by two forms of *Pyrenophora teres*: *P. teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM). To monitor and quantify their occurrence during the growing season, diagnostic system based on real-time PCR was developed. TaqMan MGB (Minor Groove Binder) primers and probes were designed that showed high specificity for each of the two forms of *P. teres*. As a host plant internal standard, TaqMan MGB primers and probe based on *RacB* gene sequence were designed. The method was optimised on pure fungal DNA and on plasmid standards dilutions. Quantification was accomplished by comparing Ct values of unknown samples with those obtained from plasmid standards dilutions. The assay detects down to five gene copies per reaction. It is able to produce reliable quantitative data over a range of six orders of magnitude. The developed assay was used to differentiate and quantify the both forms of *P. teres* in infected barley leaves. Correlation $R^2=0.52$ was obtained between Ct values and the size of symptoms in early stage of infection. Application of the TaqMan MGB technology to field samples collected in 20 barley varieties in the region Kromeriz during the growing season of 2003 and 2004 revealed that *P. teres* f. *teres* predominated on leaves in these two years. The developed method is an important tool to quantify and monitor the dynamics of the two forms of *P. teres* during growing season.

Keywords: Real-time PCR; TaqMan MGB probes; *Pyrenophora teres* f. *teres*; *Pyrenophora teres* f. *maculata*

Introduction

For the investigation of early plant response reactions as well as for disease control, rapid and sensitive quantification methods are required to detect invading pathogen even in the absence of visible host plant symptoms. Several methods can be used. On the protein level, ELISA and on the DNA level, competitive PCR and real-time PCR are the methods currently applied as quantitative molecular diagnostics (Burns and George, 1995; Schena et al., 2004).

Competitive PCR is an end-point measurement which relies on internal standards that react with the same primers as the target DNA, but generates an amplicon that differs in size. Species-specific competitive PCR assays have been developed for example for the detection of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in wheat grains (Nicholson *et al.*, 1998), for *Leptosphaeria maculans* detected in oilseed rape tissues (Mahuku *et al.*, 1995) and for many other pathogen species.

Real-time PCR monitors the accumulation of PCR products in each cycle of PCR reaction. There are several possibilities how to detect PCR product over reaction cycles. SybrGreen I dye binding to double stranded DNA is one alternative. It was used to quantify several fungal pathogens (Fraaije *et al.*, 2002; Fillion *et al.*, 2003; Schena et al., 2004).

The other possibility is the use of specific probes like molecular beacons, scorpion or TaqMan probes. They have contributed to the development of extremely specific, sensitive and accurate assays. TaqMan probes are the most widely used types of probes. Until now, it has been used to detect various pathogens like viruses (Schaad *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2005), bacteria (Salm and Geider, 2004), protozoan (Fontaine and Guillot, 2002) and fungi (Böhm *et al.*, 1999; Winton *et al.*, 2002; Reischer *et al.*, 2004). TaqMan probes are oligonucleotides that contain a fluorophore on one end and a quencher on the other end. The fluorophore is excited by LASER and passes its energy, via FRET, to the quencher. During the extension step of the PCR, the 5'-3' exonuclease activity of the Taq polymerase cleaves only annealed probe molecules. Release of the fluorophore results in a fluorescent signal which is measured by the sequence detection system during each cycle of the PCR process.

Traditionally the FRET pair has been FAM or VIC as the fluorophore and TAMRA as the quencher. New developed TaqMan MGB (Minor Groove Binder) probes bind to the minor groove of the DNA helix with strong specificity and affinity. When TaqMan MGB probe is complemented with DNA, it forms a very stable duplex with DNA and permits to work with higher T_m , thus shorter probes, which are more specific and sensitive.

As different reporter dyes can be attached to separate species-specific TaqMan probes, it is possible to simultaneously quantify both the host and pathogen DNA in infected tissues as Winton *et al.* (2002) reported.

Barley diseases caused by *Pyrenophora* spp. result in severe economic losses for farmers in many different countries (Porta-Puglia *et al.*, 1986; Duczek *et al.*, 1991; Minarikova and Polisenska, 1999). Three distinct types of disease are found: leaf stripe symptoms, caused by *Pyrenophora graminea*; net blotch, caused by *Pyrenophora teres* f. *teres*; and the spot form of net blotch, caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata*.

Bates *et al.* (2001) developed the SYBR green real-time PCR assay to quantify *Pyrenophora graminea* and *P. teres* in infected seeds. Primers were developed on the base of ITS regions (Internal Transcribed Spacer) sequence data of *Pyrenophora* spp.

Taylor *et al.* (2001) used also SYBR green real-time PCR to detect *Pyrenophora graminea* in infected seeds but with primers derived from RAPD. Assays from the both studies have been involved into a rapid seed health test to prevent of the spread of *Pyrenophora* pathogen.

In the same year, Bates and Taylor (2001) designed scorpion ARMS (Amplification Refractory Mutation System) primer that combines probe with specific target sequence for PCR in a single molecule. They used the single base pair difference at position 42 of the ITS1 sequence to distinguish between *P. teres* and *P. graminea* (Stevens *et al.*, 1998). Scorpion ARMS real-time PCR detected successfully *P. teres* and *P. graminea* in barley seeds.

In the Czech Republic, there is not such a big problem with *P. graminea* infection but the both forms of *P. teres* caused several epidemics in a few past years (Ondrej, 2000; Minarikova and Polisenska, 1999). The both forms of *Pyrenophora* are composed of a large number of pathotypes and resistance to the two forms is inherited independently (Afanasenko *et al.*, 1995; Arabi *et al.*, 2003). That is why we pointed at the development of a real-time quantitative PCR assay that would be able to distinguish between spot and net form of *P. teres* and to quantify them in infected barley leaves. We tested the assay on several barley varieties artificially infected by *P. teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* in green house experiment and on barley naturally infected in open field experiment.

Material and methods

Fungal isolates and inoculum preparation

Thirty isolates of *Pyrenophora teres* f. *teres*, 36 isolates of *P. teres* f. *maculata*, five of *P. graminea*, three of *P. tritici-repentis*, one *P. flavispora* and four isolates of

Helminthosporium sativum evaluated for genetic variability using AFLP (Leisova *et al.*, 2005b) were used to develop and optimise the species specific real-time PCR assay. Isolates utilised as inoculum are listed in Table 1.

All isolates were derived from single conidia taken from leaf tissue. Leaf segments with disease symptoms were excised and incubated on PLA (Potato Lactose Agar) medium (Himedia, the Czech Republic) at 20-23°C. Conidia were scraped off the surface of 10-day old cultures, mixed in distilled water and filtered through twofold gauze. Approximately 0.1ml of Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) (Sigma-Aldrich, Germany) was added to the 100 ml of inoculum. The concentration of mycelial suspension was adjusted to be from 5000 to 10000 conidia per ml with sterile water.

Collection of infected barley leaves

For green-house experiments five barley genotypes were used including a universal resistant barley genotype (CI739) and the susceptible variety Beate (Table 1). Plants were grown in plant pots at 20°C (18°C-22°C). They were inoculated at the stage when the second leaves were growing. The inoculum is sprayed uniformly (15 ml of mycelial suspension per one plant pot with about 20 plants) with a hand operated applicator until run-off occurred. Inoculated plants were maintained at 100% relative humidity for the first 48 hours after inoculation. Leaves with symptoms (usually the second leaves, in one experiment also the first leaves) were harvested. The size of disease symptoms on barley leaves was measured using a digital image analysis LUCIA (Laboratory Imaging, Czech Republic) just after leaves harvest. Then the leaves were directly processed or placed between two sheets of filter paper and dried.

Field experiment was carried out in two years (2003, 2004) in the locality Kromeriz in the East of the Czech Republic where climate conditions are favourable for net blotch disease development (the altitude of 235mm; the climate: warm and moderately dry; the average year temperature: 8.7°C; the average year rainfall: 599mm with the maximum in July and August and with the minimum in February). Twenty two barley varieties currently grown in the Czech Republic and itemised in the National list of varieties (Table 2) were sown by hand in April. The evaluation was made three times (in the middle of May, June and July) in the scale from 1 (the most damaged plants) to 9 (the least damaged plants). The results were calculated as an average of three evaluations and they are mentioned in Table 2. The sampling was carried out with the last evaluation in the middle of July. Leaves were harvested and placed between two sheets of filter paper and dried.

Fungal DNA extraction

DNA was extracted from mycelia according to the optimised protocol of Leisova *et al.* (2005a). DNA was run in a 0.8% agarose gel to verify the quality and the concentration. λ HindIII (Fermentas, Vilnius, Lithuania) was used as a standard for size and concentration.

DNA extraction from infected leaves

DNA extraction from fresh or dried infected leaves was done from three different aliquots of each genotype and sampling to compensate for variations in extraction efficiency. About 0.5mg of infected leaves was placed into 2ml Eppendorf tube with 0.7ml of CTAB buffer (2M NaCl, 0.2M Tris-HCl, 50mM EDTA, 2% CTAB) and pulverized using TissueLyser (Qiagen, Germany) at 30Hz for 3 minutes. After that the samples were incubated in a water bath at 60°C for 30 minutes. During the incubation about 10 mg of PVP (polyvinylpyrrolidone) was added into each sample. To remove proteins and polysaccharides two extractions with a mixture of chloroform and isoamylalcohol (24:1) was used. DNA was precipitated in the presence of 3mM sodium acetate (pH 4.8) by an equal volume of absolute ethanol. After centrifugation and supernatant removal, DNA pellet was washed by 75% solution of ethanol and dried. DNA was diluted in an appropriate volume of TE buffer. The quality and the concentration were verified using agarose gel electrophoresis. λ HindIII (Fermentas, Lithuania) was used as a standard for size and concentration. All samples were diluted on the concentration of 50ng per μ l and the concentration was verified spectrophotometrically using Gene Quant Pro spectrophotometer at $\lambda = 260$ nm (Amersham, Cambridge, UK).

TaqMan probes and primers for real-time PCR

TaqMan probes and primers were developed on the base of DNA sequence differences between *P. teres f. teres* and *P. teres f. maculata*. The method of AFLP was used to obtain form specific amplicons that were cloned into pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and sequenced using a Big Dye Terminator 3.1 Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as was described by Leisova *et al.* (2005a). Sequence alignments were assembled using T-COFFEE software (Notredame *et al.*, 2000). Primers and TaqMan Probe specific to host plant were designed on the base of consensus sequence of RacB gene extracted from the EMBL database (Accession number AJ344223). Primers and probes were designed using the Primer Express software 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following a BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) search of the

GenBank nucleic acid database for sequences from closely related species. The sequence chosen for primers and probes design was aligned with these sequences to judge specificity of amplification. The probes detecting *Pyrenophora teres* were labelled with FAM fluorescent dye; the probes detecting plant host were labelled with VIC fluorescent dye. All probes contained minor groove binder (MGB) ligands as quencher. Designed primers and TaqMan probes are presented in Table 3.

Real-time PCR assay standards

Firstly, a mixture of pure fungal and barley DNA was used as one-tube quantification standards for each probe/primer set. Fungal standards diluted in 8-fold dilution steps ranged from 1pg to 100ng, and barley standards ranged from 100pg to 500ng. These standards were run in triplicate for each assay.

Next year, the 91, 66, 81 and 181bp respective, amplicons obtained by PCR with the primers PT, PTT, PTM and *RacB* were cloned into the pCR[®]2.1-TOPO plasmid. The resulting ligation products were used to transform *Escherichia coli* TOPO10 competent cells according to the manufacturer's protocol (Topo TA Cloning[®] Kit, Invitrogen, Paisley, UK). Purification of plasmid DNA was carried out using QIA prep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany). The plasmid DNA concentration was estimated by measuring the optical density at 260nm. Standards were diluted in 8-fold dilution steps, from 5 to 10⁸ gene copies for fungal pathogen and from 10³ to 10¹¹ for host plant. They were combined so the ratio of *P. teres*, *P. teres f. teres* or *P. teres f. maculata* plasmid copies to barley (*RacB* gene) plasmid copies in each DNA standard to be 1:1000.

Real-time PCR assay

Reactions were carried out in 25 µl reaction volume consisting of 1x PCR buffer, 4mM MgCl₂, 100µM each of dNTP, 1.25U AmpliTag Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0.3µM each of primers, 0.2µM TaqMan MGB probes for pathogen (labelled with FAM fluorescent dye) and for host plant (labelled with VIC fluorescent dye) and 250ng of template DNA in 5µl. Real-time quantitative PCR was performed using the cycler ABI PRISM 7700 in MicroAmp optical 96-well plates (Applied Biosystems, Foster City, USA). Reaction consisted of 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) collected data for the reporter dye every 7 seconds from each well, generating a fluorescence profile for the each amplification. The threshold cycle (Ct)

was recorded for each dye as the cycle at which fluorescent signal, associated with an exponential growth of PCR product, exceeded statistically significantly the background fluorescence.

PCR controls in every assay included no template (negative) controls and the genomic DNA standards (positive) controls for both forms of *P. teres* and for barley. Combined standards in 8-fold dilution steps (described previously) were run in quadruplet on every wellplate. Standard curves for both fungal pathogen and host plant were generated by plotting the logarithm of plasmid standards dilutions (number of target DNA copies) against the Ct values collected by the SDS software and regression equation was calculated. Unknown samples were quantitated from measured Ct values by interpolation using the regression equation. The fungal contamination in field samples was expressed as a quotient of fungal and plant DNA copy number (cn) or DNA concentration in ng per μl (c).

PCR efficiencies (E) were calculated by

$$E = 10^{-1/b} - 1$$

where b is the slope of the linear regression equation of standard curves (Block and Schwarz, 2003).

Results and discussion

TaqMan real-time PCR assays development

Primers and TaqMan probes designed for the both forms of *Pyrenophora teres* were derived from form specific AFLP amplicons as was described in more detail in previous work (Leisova *et al.*, 2005a). The list of *Pyrenophora* isolates used for this purpose as well as the study of intraspecific variability was published by Leisova *et al.* (2005b). TaqMan probe and primers detecting specifically barley host plant were designed on the base of *RacB* gene sequence taken out from EMBL database (Accession number AJ344223). This gene is usually used as housekeeping standard in genes express studies. It was chosen because it occurs only in one copy in haploid barley genome (Schultheiss *et al.*, 2002). Designed primers and probes were analysed for specificity *in-silico* by blast analysis using the NCBI Blast feature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). No significant similarity was found; expect value E of all designed primers/probes was greater than 10. Developed primers and TaqMan probes are summarised in Table 3.

Primers, probes and the PCR protocol were evaluated by amplifying DNA from pure culture isolates of *P. teres* f. *teres* (PTT) and *P. teres* f. *maculata* (PTM) as well as the developed plasmid standards. Specificity was assessed by amplification of the genomic DNA

from isolates of *Pyrenophora teres*, *P. graminea*, *P. tritici-repentis*, *P. flavispora* and *Helminthosporium sativum*. The absence of cross-reactivity or interference with non-target DNAs that may be present in infected leaves samples indicates the high specificity of the method. Primers and TaqMan probes PTT and PTM respective are specific to the net form and spot form respective of *P. teres*. Primers and probe PT detect but do not differentiate the both forms of *P. teres*. The set of primers and probe *RacB* amplify only plant host but not pathogen. All PCR products were of the expected size (see Table 3) when examined by agarose gel electrophoresis (data not shown).

TaqMan real-time PCR assays optimisation

TaqMan real-time PCR was optimised for primers, MgCl₂ and input DNA concentration. A concentration of 300 nM for each primer was selected to ensure that the amount of primer was not limiting for the reaction. As for MgCl₂, an optimal concentration of 4mM was found as the most suitable. The optimization of primer and MgCl₂ concentration was performed with 250 ng of DNA extracted from *P. teres* isolates PTT-32 and PTM-38 grown *in vitro*. Pure DNA was diluted to the concentrations 50ng/μl, 25ng/μl and 10ng/μl. Five μl of the DNA solution was included in the reaction mixture. The results showed that the optimal input DNA concentration is 50 ng/ μl. A lower input amount of total DNA decreases assay sensitivity. A higher input amount of total DNA increases a risk of presence of PCR inhibitors. The same amount of template DNA (250ng) was used in all assays.

TaqMan real-time PCR assays detection limits

Detection limit and dynamic range of the TaqMan real-time PCR assays were deduced from standard curves for each of primers/probe system using plasmid standards. Their preparation was inspired by the work published by Block and Schwarz (2003). They optimised the way how to prepare plasmid standards for the quantification of genetically modified rapeseed by real-time PCR and studied how different DNA background can influence the results. That is why a total of eight dilution steps of plasmids standards (from 2.5×10^1 to 2.5×10^9 plasmid copies for pathogen and from 15×10^3 to 1.5×10^{11} plasmid copies for host plant) were run in three quadruplets: 1) as uniplex - plasmid standard for each species separately; 2) as multiplex - one-tube quantification standards prepared as a mixture of appropriate fungal and host plant standards so the ratio of pathogen/ barley in the DNA standard was 1:1000; 3) as multiplex when fungal standards were mixed with a constant amount of the pure barley DNA. No change in threshold cycle values was observed among

these three combinations. The amplification of the standard dilution series yielded linear and reliable results ($R^2=0.99$ for *P. teres* - Figure 1) in the range from 10 to 10^8 copies of the target DNA locus per PCR reaction (range of quantification). The correlation between the Ct-values and log-values of known plasmid copies number was high as well as for *P. teres* f. *teres* ($R^2=0.97$), *P. teres* f. *maculata* ($R^2=0.99$) and for barley ($R^2=0.99$). The qualitative detection limit for fungal as well as for barley target DNA locus was as low as 5 gene copies. It was estimated from standard curve equation where Ct (y) equals 40. The same results were reached by Reischer *et al.* (2004) who used plasmid standards for the quantification of *Fusarium graminearum* in infected plants.

The efficiencies of all reactions were high: 97% for *P. teres* standards, 96% for *P. teres* f. *maculata* standards, 97% for *P. teres* f. *teres* standards and 93% for barley standards.

Analysis of infected barley leaves samples

Developed assays were applied on the total DNA extracted from infected barley leaves get from greenhouse and open field experiments. Each TaqMan real-time PCR assay contained positive control (pure fungal DNA as a template), negative no-template control and a total of eight dilution steps of plasmid standards (from 10 to 10^8 plasmid copies for pathogen and from 10^3 to 10^{11} plasmid copies for host plant) in quadruplet on every wellplate. The overall efficiency of the PCR amplification was very high regardless of template origin or unspecific DNA background and reached the values from 89 to 101%.

Five barley varieties (Table 1) were inoculated with spot form (PTM-38) or net form (PTT-32) or the both form of *Pyrenophora teres* (PTT-32 + PTM-38) in green house experiment (Table 1). Beate was used as a susceptible genotype and CI739 as a universal resistant barley genotype. Forum, Akcent and Scarlett are varieties currently grown in the Czech Republic.

The infection was done in the stage when the second leaves started to grow. Six days after inoculation the first and the second leaves in triplicates were taken. Firstly, the size of disease symptoms was measured using image analysis (LUCIA software) and then total DNA was extracted. The quantification was carried out using TaqMan real-time PCR with form specific primers/probes PTT, PTM and RacB set. No cross amplification was observed. PTT set amplified only DNA extracted from plants infected by *P. teres* f. *teres* inoculum, and on the contrary PTM amplified only DNA extracted from plants infected by *P. teres* f. *maculata* inoculum (Figure 2). In all plants, *P. teres* f. *maculata* developed quicker than *P. teres* f. *teres* (Figure 2a and 2b). Forum was the most affected by the spot form and Beate by the net form

of *P. teres* (Figure 2a and 2b). The both pathogens were detected in plants infected by the mixture of the two forms of *P. teres* (1:1). *P. teres* f. *maculata* developed also much quicker than *P. teres* f. *teres* in all samples, in Forum, Scarlett and Beate even quicker than in the same varieties infected by each form separately (Figure 2b). Scarlett showed the most affected first leaves. Beate, on the other hand, had the most affected second leaves (data not shown). It indicates that in very susceptible variety like Beate, pathogen moves earlier to the second leaves than in less susceptible varieties. This fact was observed in all plants of variety Beate. Line CI739 showed to be resistant to *P. teres*. Like other six-rowed barley it is more susceptible to the spot form of *P. teres* (PTM) (Minarikova, personal communication).

Better correlation between size of disease symptoms and Ct values was found on the second leaves ($R^2=0.52$; Figure 3b) than on the first leaves ($R^2=0.25$; Figure 3a). On the second leaves, fungi had just started to grow and only symptoms caused directly by fungal growth occurred. On the first leaves, there were larger necrotic and chlorotic blotches. *P. teres* is a necrotrophic and toxins producing fungus. Necrotic symptoms are caused by cell death in the immediate vicinity of growing fungal hypha. Cells in the chlorotic areas of the leaf show ultrastructural evidence of senescence. As the fungus was not be found in these cells it is caused probably by toxins or by other compound produced by fungus triggering the normal senescence process of the leaf (Keon and Hargreaves, 1983). That is why the size of symptoms more corresponded to the content of pathogen on the second less damaged leaves.

In the next experiment, the same barley varieties were used but they were inoculated by a mixture of the both forms of *P. teres* (PTT-30, PTT-31, PTT-32, PTT-33 and PTM-38) (Table 1) also in greenhouse experiment. To better see the aggressiveness of the both forms of *P. teres* the ratio PTT:PTM = 4:1 was used. Only the second leaves of each barley variety in triplicate were sampled the third, the thirteenth and the twenty-first day after inoculation. Total DNA was extracted and the content of pathogens was set using TaqMan real-time PCR assays with primers/probe sets PT, PTT, PTM and RacB. A distinct gradual increase in gene copies of the both forms of *P. teres* was measured, corresponding to the fungal growth during the infection (Figure 4). *P. teres* f. *teres* grew the most rapidly in variety Beate and the less rapidly in the variety CI739. The presence of *P. teres* f. *maculata* was detected only in variety Forum (data not shown). This experiment revealed that in spite of faster growth of *P. teres* f. *maculata* in infected plants when the infection ratio between the two forms of *P. teres* was PTT:PTM 1:1, a ratio PTT:PTM 4:1 was too much favourable for net form (PTT). Although the net form (PTT) was previously supposed to be less aggressive to the host plant than the spot form (PTM) of *P. teres* when the infection pressure of the net form is high, it

will win in the competition between the two forms of *P. teres*. It could be a real situation in open fields. But in theoretical study, a ratio between PTT and PTM 1:1 should be used to compare a real measure of the aggressiveness of the two forms of *P. teres*.

In 2003 and 2004, the natural occurrence of *P. teres* was monitored in open field experiment in the locality Kromeriz where the conditions are suitable for *P. teres* to spread. Visual disease rating was done three times in each year and the average values were calculated. A list of evaluated barley varieties and the values of visual disease rating are given in Table 2. The quantification was done using developed assays and primers/probe sets PT, PTT, PTM and RacB. The results were correlated with the visual disease rating and the correlation coefficient was found to be $R^2=0.31$ (Figure 5). The low correlation relationship can be explained similarly to the previous experiment. Leaf tissue was too damaged by this necrotrophic fungus and plant defence to do more accurate visual estimate of pathogen content. Other problem was that we collected samples in the middle of July and it was too late. Leaves were damaged a lot and dry. We successfully extracted DNA from them and the real-time quantitative assays provided reliable results but only for fungus. That is why the content of *P. teres* in samples in Figure 5 is expressed pre μg of dry leaf tissue not as in other experiment. It means that this assay is capable to distinguish and quantify the two forms of *P. teres* in seriously infected barley leaves when it is useful to know the measure of infection pressure in fields.

The ratio between *P. teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* development was calculated on the base of quantification data and it is given in Table 2. In 2003, the infection pressure of *P. teres* f. *maculata* was more severe than in 2004. In total the studied barley varieties were affected more by *P. teres* f. *teres* than by *P. teres* f. *maculata* with the exception of three barley varieties: CI739, Ladik and Saloon.

Quantitative diagnostics is essential in research on the ecology and population dynamics of plant pathogens and on the epidemiology of diseases, because they enable pathologists to monitor fungal populations over time and space and in this case to compare the aggressiveness of the two forms of fungal pathogen *P. teres*. Although they occur separately in different climate conditions (Smedegaard-Petersen, 1971; Tekauz, 1990) and with the regard to the fact that the resistance is inherited independently (Ho *et al.*, 1996), their hybridization producing intermediate genotypes could overcome the level of resistance accomplished to the both forms separately. That is why this type of study is useful and can help to more understand the relationship between pathogens and between pathogen and host plant.

The method developed in this study allows a fast species specific identification and quantification of plant infections caused by *P. teres*. In comparison with the competitive PCR or SYBR Green real-time PCR, TaqMan real-time PCR do not need to verify the specificity by post PCR analysis steps such as for example gel electrophoresis. It can be applied on DNA extracted directly from infected plant material and is not affected by an unspecific background of either plant or fungal DNA, even from other pathogens causing leaves blotch diseases on barley. The sensitivity of the method would allow the quantification of fungal growth in different plant tissues during the progress of infection. Due to its simplicity it could also be used in routine analysis, for the monitoring of *Pyrenophora teres* epidemics and for the measure of fungicide efficiency.

Acknowledgements

This project was supported by the National Agency for Agricultural Research in the Czech Republic (project no. QC1361). The authors thank Jana Sarova and Alena Hanzalova for help with greenhouse experiments.

References

- Afanasenko, O.S., Hartleb, H., Guseva, N.N., Minarikova, V., Janosheva, M., 1995. A set of differentials to characterise populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for international use. *J. Phytopathol.* 143, 501-507.
- Arabi, M.I.E., Al-Safadi, B., Charbaji, T., 2003. Pathogenic variation among isolates of *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *J. Phytopathol.* 151, 376-382.
- Bates, J.A., Taylor, J.A., Kenyon, D.M., Thomas, J.E., 2001. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Mol. Plant Pathol.* 2, 49-57.
- Bates, J.A., Taylor, E.J.A., 2001. Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Mol. Plant Pathol.* 2, 275-280.
- Block, A., Schwarz, G., 2003. Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real-time PCR. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 421-427.
- Böhm, J., Hahn, A., Schubert, R., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwatal, J., Oehlmann, R., Oswald, W., 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isoalted spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring

of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. J. Phytopathol. 147, 409-416.

Burns, R., George, E., 1995. The use of monoclonal antibodies for detection of fungi. Bulletin OEPP 25(1/2), 31-37.

Duczek, L.J., Kindrachuk, C.R., Dyadic, D.A., 1991. Diseases of irrigated spring wheat and spring barley in Saskatchewan from 1986 to 1989. Can. J. Plant Pathol. 13, 124-130.

Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H., 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. J. Microbiol. Methods 53, 67-76.

Fontaine, M., Guillot, E., 2002. Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. FEMS Microbiol. Lett. 214, 13-17.

Fraaije, B.A., Butters, J.A., Coelho, J.M., Jones, D.R., Hollomon, D.W., 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. Plant Pathol. 51, 45-54.

Ho, K.M., Tekauz, A., Choo, T.M., Martin, R.A., 1996. Genetic studies on net blotch resistance in barley cross. Can. J. Plant Sci. 76, 715-719.

Keon, J.P.R., Hargreaves J.A., 1983. A cytological study of the net blotch disease of barley caused by *Pyrenophora teres*. Physiol. Plant Pathol. 22, 321-329.

Leisova, L., Kucera, L., Minarikova, V., Ovesna, J., 2005a. AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. Plant Pathol. 54, 66-73.

Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L., Ovesna, J., 2005b. Genetic diversity of *Pyrenophora teres* isolates as detected by AFLP analysis. J. Phytopathol. 153, 569-578.

Mahuku, G.S., Goodwin, P.H., Hall R., 1995. A competitive chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape. Mol. Plant-Microbe Inter. 8, 761-767.

Minarikova, V., Polisenska, I., 1999. Analysis of populations of *Pyrenophora teres* on barley in the Czech Republic. Plant Prot. Sci. 4, 115-120.

Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W., Joyce, D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiol. Mol. Plant Pathol. 53, 17-37.

Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J., 2000. T-COFFEE: a novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217.

Ondrej, M., 2000. Problematika hub rodu *Drechslera* na ječmeni (*Hordeum*). Agro 5, 14.

- Porta-Puglia, A., Delogu, G., Vannacci, G., 1986. *Pyrenophora graminea* on winter barley seed : effect on disease incidence and yield losses. J. Phytopathol. 117, 26-33.
- Reischer, G.H., Lemmens, M., Farnleitner, A., Adler, A., Mach, R.L., 2004. Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TagMan probe. J. Microbiol. Methods 59, 141-146.
- Salm, H., Geider, K., 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. Plant Pathol. 53, 602-610.
- Schaad, N.W., Opgenorth, D., Gaush, P., 2002. Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. Phytopathol. 92, 721-728.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D., 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur. J. Plant Pathol. 110, 893-908.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H., Hueckelhoven, R., 2002. A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. Plant Physiol. 128, 1447-1454.
- Smedegaard-Petersen, V., 1971. *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. Aars. Kong. Vet. Land., 124-144.
- Stevens, E.A., Blakemore, E.J.A., Reeves, J.C., 1998. Relationships amongst isolates of *Pyrenophora* spp. based on the sequences of the ribosomal DNA spacer regions. Mol. Plant Pathol., On-line <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>.
- Taylor, E.J.A., Stevens, E.A., Bates, J.A., Morreale, G., Lee, D., Kenyon, D.M., Thomas, J.E., 2001. Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. Plant Pathol. 50, 347-355.
- Tekauz, A., 1990. Characterisation and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Pyrenophora teres* f. *maculata* from western Canada. Can. J. Plant Pathol. 12, 141-148.
- Ward, E., Kanyuka, K., Motteram, J., Korniyukhin, D., Adams, M.J., 2005. The use of conventional and quantitative real-time PCR assays for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. New Phytol. 165, 875-885.
- Winton, L.M., Stone, J.K., Watrud, L.S., Hansen, E.M., 2002. Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. Phytopathol. 92, 112-116.

Table 1 Material used in greenhouse experiments

Barley varieties	Fungal isolates used as inoculum		Geographic origin
	Isolate	Taxon	
Beate	PTT-30	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	Chrudim
CI739	PTT-31	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	Velky Beranov
Forum	PTT-32	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	Strellice
Akcent	PTT-33	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	Hlavnice
Scarlett	PTM-38	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	Luzany

Table 2 Material used in field experiment

Barley varieties	Extend of infection estimated by visual disease rating		Ratio between PTT and PTM content detected by TaqMan real-time PCR assay cn(PTM):cn(PTT) in %	
	2003	2004	2003	2004
	Prestige	2.7	2.0	0 : 100
Philadelphie	4.3	3.3	85 : 15	0 : 100
Olbram	4.3	4.0	89 : 11	0 : 100
Nordus	3.3	4.3	94 : 6	0 : 100
Maridol	7.3	5.3	94 : 6	0 : 100
Madonna	5.0	5.3	0 : 100	0 : 100
Madeira	3.0	5.7	0 : 100	0 : 100
Krona	4.0	4.3	0 : 100	0 : 100
Jersey	5.0	4.3	33 : 67	0 : 100
Forum	6.3	4.0	0 : 100	0 : 100
Atribut	4.3	6.0	84 : 16	30 : 70
Annabell	7.0	5.7	90 : 10	0 : 100
Akcent	6.0	4.0	0 : 100	0 : 100
Primus	7.7	6.3	90 : 10	14 : 86
Ortheqa	7.7	6.7	0 : 100	0 : 100
Ladik	7.3	6.7	62 : 38	64 : 36
Heris	8.0	8.0	98 : 2	0 : 100
Saloon	5.3	3.7	65 : 35	57 : 43
Sabel	2.7	2.7	92 : 8	0 : 100
CI739	9.0	9.0	-	78 : 22

Table 3 Sequences of primers and TaqMan probes for real-time quantitative PCR assay

Species	Primers/ TaqMan Probes	Sequence	Amplicon size
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>	PTM-F	5'-TGATGCGCTGGAGTGAGACAC-3'	81 bp
	PTM-R	5'-TGTACATACGCCGCATCACG-3'	
	PTM-probe-fam	5'-TCGTGGATACTCTACATAGGT-3'	
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	PTT-F	5'-CTTGATGCGCTGGAGTGAGA-3'	66 bp
	PTT-R	5'-TGCATTTCCACCTACTGGTATGTAC-3'	
	PTT-probe-fam	5'-ACGTCTCATGGATACTC-3'	
<i>Pyrenophora teres</i>	PT-F	5'-TACACCTACGCTTGACGCATG-3'	91 bp
	PT-R	5'-GATATCTTCATCTGCGGACCG-3'	
	PT-probe-fam	5'-AGTTGTTTGTGGTTTTTC-3'	
<i>Hordeum vulgare</i>	RacB-F	5'-AGGCGCACCCCTACTACATCG-3'	181 bp
	RacB-R	5'-ACCACCTTTATTGCCGCATC-3'	
	RacB-probe-vic	5'-AGCTCGAAGACCCAACT-3'	

Figure 1 Standard curve demonstrating the quantification of *P. teres* (the both forms) DNA using TaqMan real-time PCR assay with PT primers/probe set. Cycle thresholds (Ct) were plotted against the log of the copy number of plasmid containing DNA insert common to the both forms of *P. teres*. Linear regression equation was calculated for the quantification of unknown samples by interpolation. Similar curves were obtained for each form of *P. teres* and for barley host plant

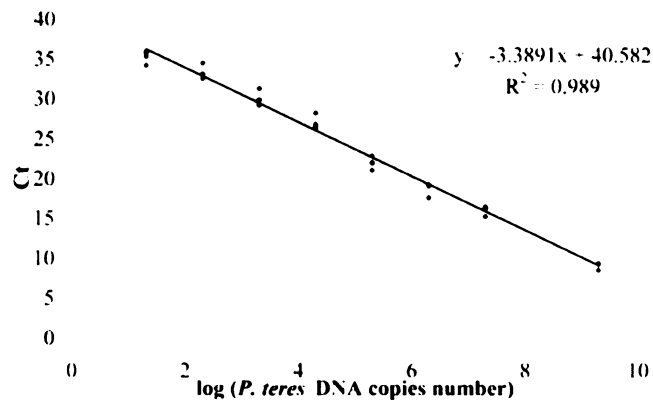
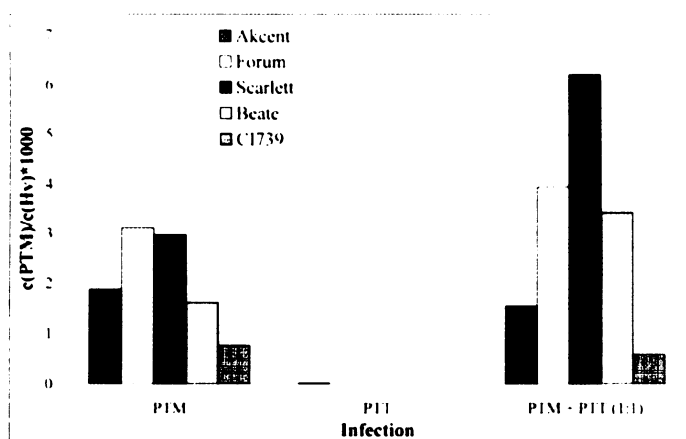


Figure 2 The fungal contamination in samples inoculated either by *P. teres* f. *teres* (PTT) or by *P. teres* f. *maculata* (PTM) or inoculated by a mixture of the two forms of *P. teres*. It was expressed as a quotient of fungal and plant DNA concentration in ng per μ l (c), for easier reading the values were multiplied by 1000. Figure 2a shows the results of real-time PCR assay with PTM primers/probe set and in Figure 2b there are results of the assay with PTT primers/probe set.



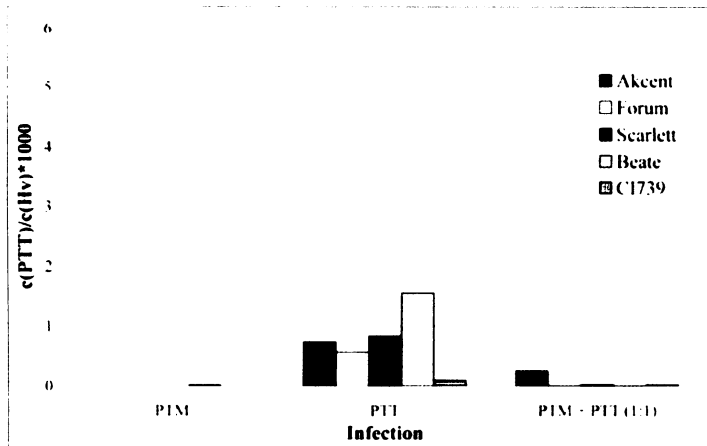


Figure 3 Correlation between Ct values from TaqMan real-time PCR and the size of symptoms (in mm²) on the first barley leaves samples (Figure 3a) and on the second barley leaves samples (Figure 3b) with the linear regression equation

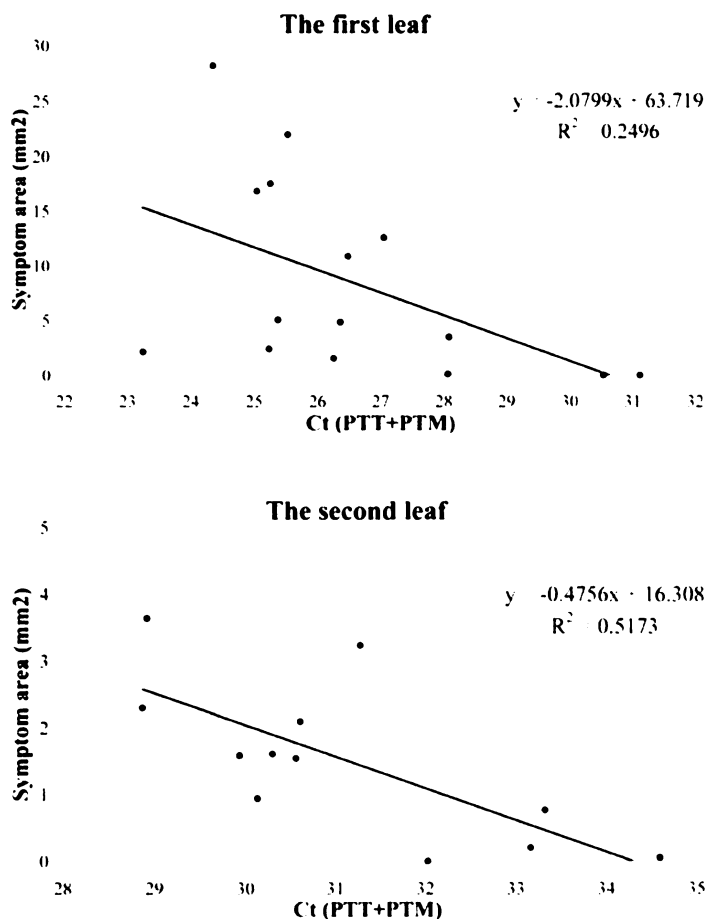


Figure 4 *P. teres* (the both forms) fungal copy numbers (Q) detected using TaqMan real-time PCR assay taken from the inoculation experiment 6, 13 and 21 days post infection (dpi). The

bars represent an average value of 9 separate reactions with PT TaqMan primers/probe set for each day and barley variety with SD = 0,07

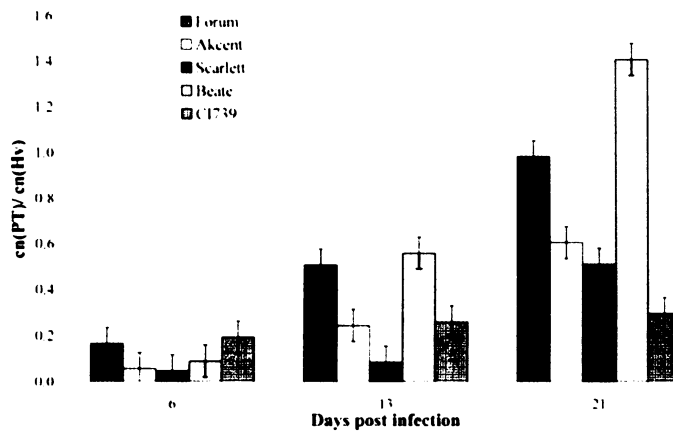
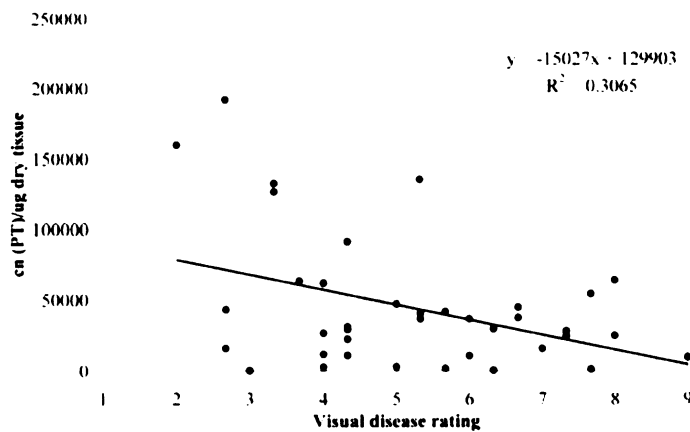


Figure 5 Correlation between visual disease rating and the extent of infection calculated as *P. teres* copy number (cn) detected using TaqMan real-time assay per µg of dry leaf tissue



KVANTITATIVNÍ DETEKCE HOUBOVÝCH PATOGENŮ V ROSTLINNÝCH PLETIVECH S VYUŽITÍM MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝCH METOD. In: Sborník přednášek semináře „Choroby rostlin, s důrazem na obilniny, jejich symptomy a rezistence, molekulární a biochemická charakteristika interakcí hostitel-patogen“, Praha 4. listopadu 2004, 71-74.

Kvantitativní detekce houbových patogenů v rostlinných pletivech s využitím molekulárně-biologických metod

Leona Leišová¹, Ladislav Kučera¹, Dagmar Kučerová¹, Světlana Sýkorová¹, Věra Minaříková², Jana Chrpová¹, Václav Šíp¹, Jaroslava Ovesná¹

¹VÚRV, Drnovská 507, Praha 6–Ruzyně, tel.: +420 233 022 425;

²ZVU, Havlíčkova 2787, 767 01 Kroměříž, ČR

E-mail: leisova@vurv.cz

ABSTRACT

Real-time PCR is a method that allows quantitative detection of fungal pathogens in plant host tissue. The specificity is given by primers and TaqMan probes design accuracy. Primers and TaqMan probes were evaluated for quantitative detection of *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *P. teres* f.sp. *maculata* and of *Fusarium culmorum*. In all cases primers are strictly species specific. The two configurations: multiplex and uniplex were tested and the same results were obtained. In *Pyrenophora* project multiplex configuration was used that enabled detection of fungal and barley DNAs in one sample. In *Fusarium* case the uniplex configuration was chosen because it has been relatively easy to get additional data like for example DON content that is rated to be the marker of *Fusarium* infection measure. Ct values obtained in *Pyrenophora* experiment were compared with the size of symptoms caused by *Pyrenophora teres* on barley leaves measured using image analysis LUCIA. A good correlation was found. In *Fusarium* project Ct values were compared with DON contents. Especially in barley case, a good correlation between Ct values and DON contents was found ($R^2 = 0,96$). In wheat case, a complicated correlation relationship between Ct values and DON contents was found. Further study showed that these differences were caused by different course of infection by studied varieties. The quantification of the fungal pathogens using real time PCR could be useful in phytopathological praxis; especially where the classical methods do not correlate well with infection measure.

ÚVOD

Houbové patogeny patří mezi nejrozšířenější rostlinné patogeny vůbec (Bruns et al. 1991). Způsobují značné ekonomické ztráty, a proto se jejich studiu věnuje stále větší pozornost.

Houby (*Fungi*) jsou eukaryotické, stélkaté organismy, jejichž heterotrofie je odkazuje k saprofytickému, parazitickému nebo symbiotickému způsobu výživy. Genom vláknitých hub o velikosti asi 40.000 kb je rozdělen na jaderný, mitochondriový a plasmidový. Obsahuje málo repetitivní DNA s výjimkou genů pro rRNA, tRNA a úseků DNA podobných retrotranspozonům. Jaderný genom je uspořádán v chromozomech podobně jako u ostatních eukaryot. Mitochondriová DNA je většinou kružnicová a je značně sekvenčně variabilní.

Na rozdíl od kvasinek (*Saccharomyces*) se až v posledních deseti letech těžiště výzkumu patogenních hub přesouvá od fenotypu ke studiu genotypu. Výzkum je v současné době směřován k přesnému určení sledovaného taxonu, zařazení do systému, studiu intraspecifické variability hub v závislosti na čase, geografické poloze či napadeném pletivu hostitelské rostliny, ke kvalitativní a kvantitativní detekci konkrétního druhu patogena v pletivech hostitele. Získané poznatky vedou ke hlubšímu studiu podstaty rezistence k houbovým patogenům a k pochopení mechanismu napadení rostliny patogenem a její reakce na napadení. Ve všech fázích výzkumu se využívají molekulárně-biologické metody.

V posledních několika letech se objevuje snaha vyvinout metodiku pro kvantitativní stanovení obsahu houbového patogena v pletivech hostitele. Řešením je nalézt způsob jak kvantifikovat produkty PCR. Doohan et al. 1999 použili techniku kompetitivní PCR s druhově specifickými primery ke kvantitativní detekci přítomnosti patogenů rodu *Fusarium* v pletivech pšenice (*Triticum aestivum*). Jako kompetitoru použili DNA o známé koncentraci izolovanou z mycelia patogena napěstovaného *in vitro*. Touž technikou stanovili Mahuku et al. (1995) obsah DNA patogena *Leptosphaeria maculans* v pletivech řepky.

Simpson et al. (2001) studovali závislost obsahu patogena a jím produkovaných mykotoxinů v zrně na množství použitých fungicidů mj. pomocí kvantitativní SYBR Green real-time PCR. Tuto metodu popsal Hopwood et al. (1997). Byla dále použita ke stanovení obsahu rzi pšeničné (*Erysiphe graminis*) (Fraaije et al. 2002) či patogena *Pyrenophora graminea* v zrně ječmene (Taylor et al. 2001).

Další metodou, jak kvantifikovat PCR produkty je tzv. TaqMan real-time PCR. Kromě páru primerů je třeba ještě jedné tzv. TaqMan sondy, což je oligonukleotid, který se hybridizuje do oblasti mezi primery. Je značen na 5' konci fluorescenční značkou a na 3' konci je opatřen zhášecem fluorescence, kterým může být buď fluorescenční značka tamra nebo nefluorescenční kovalentně navázaný MGB zhášec. Důsledkem 5'3' exonukleázové aktivity Taq polymerázy je rozštěpení TaqMan sondy a tudíž vzrůst fluorescence během cyklů PCR, který je detekován pomocí CCD kamery. Porovnáním odečtených hodnot s kalibrací lze stanovit kvantitativní zastoupení produktu PCR v reakční směsi. Böhm et al. (1999) použili této metody ke stanovení rozsahu napadení pletiv hostitele patogeny rodu *Glomus* a *Phytophthora*.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodu TaqMan real-time PCR a vytvořit standardní operační postup pro kvantitativní detekci vybraných patogenů v pletivech hostitelských rostlin. Studovanými patogeny byly houby *Pyrenophora teres*, parazitující na listech ječmene a *Fusarium culmorum* napadající obilky pšenice a ječmene.

MATERIÁL A METODY

K přípravě primerů a sond a k optimalizaci metody TaqMan real-time PCR bylo použito 50 izolátů hub *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*, *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* a 10 izolátů hub *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum*. Za hostitele bylo zvoleno 10 odrůd ječmene *Hordeum vulgare* a 10 odrůd pšenice *Triticum aestivum*.

Primery a Taq Man sondy byly navrženy pomocí programu Primer Expres (Applied Biosystems) na základě publikovaných sekvencí (Leišová et al. 2003; Leišová et al. 2004; Šíp et al. 2004).

Inokulace u každého z patogenů byla provedena podle na pracovišti VÚRV zavedených protokolů. V případě listových pletiv napadených *P. teres* byl materiál zamražen a DNA byla izolována pomocí detergentu CTAB (Leišová et al. 2004). V případě obilky napadených *F. culmorum* byly obilky rozemlety a DNA byla izolována pomocí DNAeasy Plant Mini kitu (QIAGEN). Koncentrace DNA byla zjištěna spektrofotometricky; vzorky byly naředěny na koncentraci 50ng DNA/μl.

TaqMan real-time PCR reakce byly prováděny v cykleru ABI PRISM 7700 podle protokolu PN 402823 (Applied Biosystems). PCR reakce byly prováděny jak v multiplexovém tak i v uniplexovém uspořádání. TaqMan MGB sondy pro detekci houbového patogena byly značeny fluorescenční barvou FAM a sondy detekující DNA rostliny fluorescenční barvou VIC.

Pro kvantifikaci DNA rostlinného hostitele byly zvoleny jednokopiový gen *RacB*. Primery a TaqMan MGB sondy byly navrženy pomocí programu Primer Expres na základě publikované sekvence (Schultheiss et al. 2002).

Reakční směs o objemu 25 μ l obsahovala 1 x PCR pufru, 4mM MgCl₂, 0,1mM (každého) dATP, dGTP, dCTP, 0,2mM dUTP, 2,5U Gold Taq polymerázy, 0,3 μ M směsi primerů, 0,3 μ M Taq Man MGB sond značených fluorescenčními značkami fam a vic a 250ng templátové DNA. Reakce byly prováděny v optických PCR destičkách s optickými víčky v přístroji ABI PRISM 7700. Reakce obsahuje následující kroky: 2min. při 50°C, 10 min. při 95°C a 40 cyklů: 15 sec. při 95°C, 1 min. při 60°C. Ke sběru a analýze dat byl použit program ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Na základě nadefinovaných hodnot koncentrací DNA a zjištěných hodnot Ct reakcí s DNA ředicí řady směsi standardů byla vytvořena kalibrační křivka. Z rovnice kalibrační křivky byl vytvořen vzorec pro výpočet počátečního obsahu DNA z naměřených hodnot C_T reakcí se vzorky.

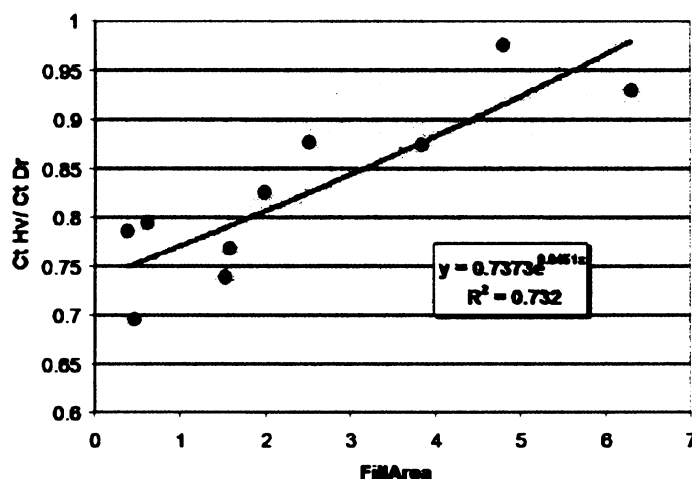
VÝSLEDKY A DISKUSE

Prvním problémem, který byl řešen byla specifita navržených primerů a TaqMan sond. Výsledky ukázaly, že jsou specificky amplifikovány pouze cílené úseky DNA dle navržených primerů. TaqMan sondy přispívají značně ke specifitě reakcí.

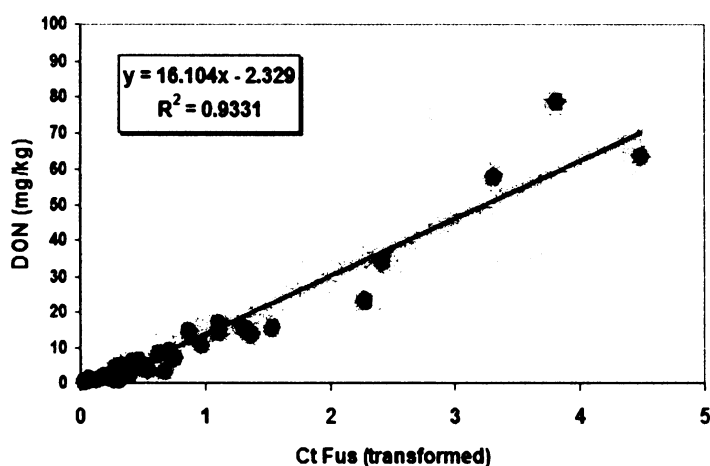
Dále byly testovány dvě možnosti uspořádání real-time PCR reakcí: multiplexové a uniplexové. V případě detekce patogena *Pyrenophora teres*, kde je zvláště výhodné stanovovat obsah jak houbové tak i rostlinné DNA v jedné reakci výsledky ukázaly, že hodnoty Ct pro daný vzorek jsou v obou uspořádáních totožné.

Další otázkou, kterou bylo potřeba zodpovědět bylo, zda výsledky reakcí ovlivněny přítomností inhibitorů. Použitím ředicích řad vzorků DNA extrahovaných z obilí napadených v různé míře houbou *Fusarium culmorum* jsme zjistili, že v tomto případě reakce nejsou ovlivněny přítomností inhibitorů.

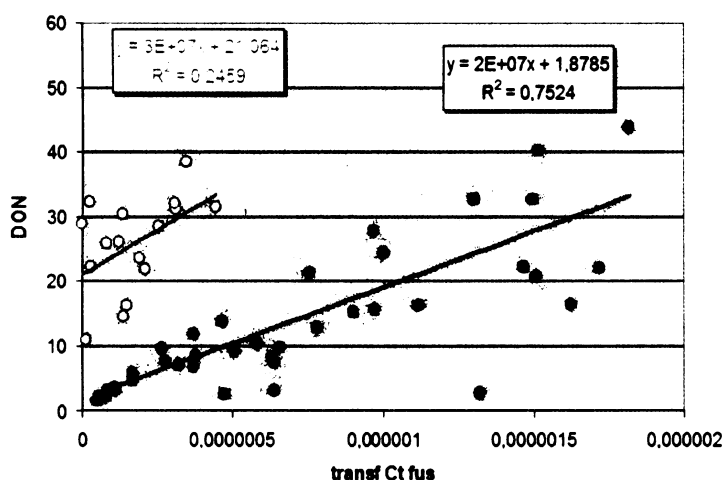
Nejvýznamnějším problémem je správná interpretace získaných výsledků. Zde byla použita nezávislá stanovení, která ukázala nakolik jsou získané výsledky relevantní. V případě kvantitativní detekce obsahu patogena *Pyrenophora teres* v listových pletivech ječmene byla použita metoda obrazové analýzy Lucia. Výsledky z real-time PCR byly porovnávány s velikostí symptomů na listech a byla zjištěna velmi dobrá korelace mezi oběma stanoveními. Na následujícím obrázku je uvedena závislost Ct hodnot na velikosti symptomu na listech (v mm²).



Výsledky kvantitativní detekce obsahu *Fusarium culmorum* v obilkách pšenice a ječmene byly porovnávány s obsahem mykotoxinu deoxyvalenolu (Šíp et al. 2004). V případě vzorků ječmene byla nalezena velmi dobrá korelace mezi oběma stanoveními. Na následujícím obrázku je uvedena závislost Ct hodnot na obsahu DON.



U studovaných vzorků pšenice byla korelace rovněž nalezena, ale interpretace výsledků byla ztížena skutečností, že byly jako hostitelé použity odrůdy pšenice, které se značně lišili dobou kvetení. Proto je v našem případě závislost obsahu DON na Ct hodnotách zobrazena dvěma přímkami.



Závěrem lze říci, že Real Time PCR je metodou, která poskytuje spolehlivé a relevantní výsledky. Je tedy velmi užitečnou metodou tam, kde je potřeba zjistit míru napadení rostliny patogenem – u výběru osiva, před použitím fungicidů, u expresních studií apod. Může se tedy uplatnit jak v zemědělské praxi tak i při hlubším studiu účinku patogenů na hostitelské rostliny.

LITERATURA

- BÖHM J., HAHN A., SCHUBERT R., BAHNWEIG G., ADLER N., NECHWATAL J., OEHLMANN R., OSWALD W. (1999): Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *J. Phytopathol.* **147**: 409-416.
- DOOHAN F.M., PARRY D.W., NICHOLSON P. (1999): *Fusarium* ear blight of wheat : the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathol.*, **48**: 209-217.
- FRAAIJE B.A., BUTTERS J.A., COELHO J.M., JONES D.R., HOLLOMON D.W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* using quantitative

allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. *Plant Pathol.*, **51**: 45-54.

HOPWOOD A., OLDROYD N., FELLOWS S., WARD R., OWEN S.A., SULLIVAN K. (1997): Rapid quantification of DNA samples extracted from buccal scrapes prior to DNA profiling. *Biotechniques*, **23**: 18-20.

LEIŠOVÁ L., MINAŘÍKOVÁ V., KUČERA L., OVESNÁ J. (2003): Quantitative detection of *Drechslera* sp. in barley leave tissue using Taq Man Real-Time PCR. In: 5th International Symposium in the series: Recent Advances in Plant Biotechnology, Stará Lesná, September 7-13, 2003, 121.

LEIŠOVÁ L., KUČERA L., MINAŘÍKOVÁ V., OVESNÁ J. (2004): AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net form of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathology*, in press.

MAHUKU G.S., GOODWIN P.H., HALL R. (1995): A competitive polymerase chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape. *MPMI*, **8**, 5: 761-767.

SIMPSON D.R., WESTON G.E., TURNER J.A., JENNINGS P., NICHOLSON P. (2001): Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *Europ. J. Plant Pathol.*, **107**: 421-431.

ŠÍP V., TVARŮZEK L., CHRPOVÁ J., SÝKOROVÁ S., LEIŠOVÁ L., KUČERA L., OVESNÁ J. (2004): Evaluation of Barley resistance to *Fusarium* head blight infection and mycotoxin contamination of grain. 9th International Barley Gent. Symp., Brno 2004, 315-328.

TAYLOR E.J.A., STEVENS E.A., BATES J.A., MORREALE G., LEE D., KENYON D.M., THOMAS J.E. (2001): Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathol.*, **50**: 347-355.

4. Diskuse

Taxonomie patogena *Pyrenophora teres* byla dlouho předmětem diskusí. Otázka, zda se jedná o dvě formy nebo o dva samostatné druhy nebyla dosud spolehlivě vyřešena. Mnohem víc než faktické rozdíly či podobnosti obou druhů/forem rozhoduje o taxonomickém zařazení definice druhu. Mayr (1940) definoval biologický druh jako skupinu aktuálně nebo potencionálně se křížících populací, které jsou z hlediska reprodukce izolované od jiné takové skupiny. Jestliže se obě formy *Pyrenophora teres* a dokonce i druh *Pyrenophora graminea* volně kříží v přírodních podmínkách a produkují fertilní potomstvo (Campbell et al., 2002), pak tvoří jednu skupinu geneticky otevřených populací, kde genetická rekombinace a následná variabilita a míšení genotypů nedovolují jasné odlišení tří druhů pomocí morfologických, fyziologických, chemických, cytologických, genetických a jiných metod. Uvedená definice byla aplikována pouze na *Pyrenophora teres* a uvádí se tedy existence dvou forem *Pyrenophora teres*: *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. *Pyrenophora graminea* byla dosud ponechána jako samostatný druh.

„Genetická struktura“ se popisuje jako množství a distribuce genetické variability v rámci populace a mezi populacemi. Definovat genetickou strukturu populace je prvním logickým krokem ve studiu populační genetiky hub, protože genetická struktura populace odráží vývoj populace a její možnosti vyvíjet se dále do budoucna. Aby mohlo dojít k vývoji přírodním výběrem, musí v populaci existovat variabilita v biologické zdatnosti (fitness) mezi individui. Fisherův základní teorém přírodního výběru praví, že průměrná biologická zdatnost populace neustále roste, a že je míra tohoto růstu úměrná množství přidané variability biologické zdatnosti populace (Fisher, 1930). Druhým krokem po zjištění genetické struktury populace je odhalení, které síly nejvíce ovlivňují vývoj populace: tok genů, genetický drift, způsob rozmnožování a přírodní výběr.

Výběr genetického markeru může mít podstatný dopad na analýzu a interpretaci dat. Hledáme-li odpovědi na otázky, jakou roli hrají velikost populace, způsob rozmnožování a tok genů, pak je na místě užít neutrální genetické markery. Pro odpovědi na otázky spojené s vlivy selekce jsou vhodné genově specifické markery. U populací hub, které se rozmnožují převážně nepohlavně a jejich populace jsou tvořeny převážně potomstvem klonů lze obecně použít neutrální markery ke studiu faktorů ovlivňujících strukturu populace. Navíc se jedná o haploidní organismus, kde genotyp (DNA fingerprint) odpovídá fenotypu (patotypu), i když to nemusí platit bezvýtku. Byly nalezeny odlišné patotypy, které se vyvinuly z téhož klonu, a to jako výsledek selekce (Goodwin et al., 1995; Drenth et al., 1996). Pro získání odpovědi

na většinu otázek populační genetiky je nejvhodnější použít genetické markery, které jsou neutrální, vysoce informativní, reprodučibilní a dostupné (McDonald, 1997).

Pro studium struktury populace *Pyrenophora teres* v České republice byla zvolena metoda AFLP. AFLP markery jsou neutrální, dominantní a poskytují reprodučibilnější výsledky než RAPD. Metoda je výhodná pro DNA fingerprinting, protože může být v jedné reakci detekován velký počet lokusů. Je rovněž výhodná tam, kde o genomu studovaného organismu není mnoho známo, jako byla např. *Pyrenophora teres* v době, kdy jsme se jí začali zabývat.

Často je diskutována otázka reproducibility výsledků AFLP analýz (Majer et al., 1996; Powell et al., 1996). V rámci této práce byla u 30 vzorků *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora tritici-repentis* a *Helminthosporium sativum* po asi dvou letech analýza AFLP opakována. Výsledkem obou opakování byly tatáž sestava produktů AFLP analýz.

Analýza AFLP byla provedena dvakrát, ale ne u stejného počtu vzorků a se stejným počtem primerových kombinací. První analýzy byly provedeny se 33 primerovými kombinacemi u 30 izolátů hub rodu *Pyrenophora*. Bylo získáno 1247 polymorfních signálů. Výsledky byly analyzovány a na základě jejich vypovídací hodnoty (DI - Diversity Index) bylo zvoleno 19 primerových kombinací. S těmi bylo znovu analyzováno 83 izolátů hub rodu *Pyrenophora* a získáno 948 polymorfních signálů.

Houby vykazují široké spektrum strategií rozmnožování, které mají dopad na biologii populace (Taylor et al., 1999). Důležitým faktorem pro mnoho hub parazitujících na rostlinách je relativně často se vyskytující způsob pohlavního a nepohlavního rozmnožování v rámci populací během jednoho vegetačního období. Nepohlavním způsobem rozmnožování vznikají potomstva klonů, které vykazují omezené spektrum virulence v rámci každého potomstva. Pohlavním rozmnožováním se vytváří mnoho nových genotypů, kdy jsou s každou sexuální generací nové či již existující alely genů virulence rekombinovány. Výsledkem je překonání genů rezistence u druhu hostitelské rostliny a nutnost šlechtit na rezistenci k danému patogenu znovu.

U hub reprodukcujících se sexuálně i asexuálně mluvíme o genové diverzitě (diverzita individuálního lokusu) a genotypové diverzitě (diverzita založená na počtu geneticky odlišných individuí v populaci). Genová diverzita je výsledkem počtu a frekvence alel sledovaného lokusu. Je ovlivněna hlavně stářím populace, velikostí populace a přírodním výběrem. Starší populace vykazují více alel, protože měly více času na mutační procesy, introdukci nových variant a genetický drift, který zvyšuje frekvenci nových alel na

detekovatelnou hladinu (Flegr, 2005). Takto na místech původu, odkud se daný druh rozšířil by měly populace vykazovat vyšší úroveň diverzity než jiné populace, neboť jsou starší. Naopak populace s nízkou genovou variabilitou mohou být ovlivněny velkým snížení velikosti populace, tzv. efektem hrdla láhve (bottleneck) nebo tzv. zakladatelským efektem (founder effect), který eliminuje mnoho alel (McDonald, 1997).

Na základě analýzy RAPD se Peever a Milgroom (1994) domnívají že se všechny populace *Pyrenophora teres* se vyvinuly ze společné zdrojové populace, pravděpodobně pocházející z oblasti Blízkého Východu, kde došlo k domestikaci ječmene 10 tisíc let př. Kr. Velkou míru diverzifikace mezi populacemi *Pyrenophora teres* vysvětlují přírodním výběrem, genetickým driftem kombinovaným s omezeným genovým tokem a lokální adaptací houby na alternativní hostitele (Peever and Milgroom, 1994).

Populace *Pyrenophora teres* v České republice rovněž vykazuje vysokou míru variability. Podobně jako v práci Peltonena et al. (1996) nebyla nalezena žádná významná korelace mezi genetickými a geografickými vzdálenostmi mezi populacemi. Avšak na rozdíl od práce Peltonena et al. (1996) byla nalezena korelace mezi genetickými vzdálenostmi a rokem sběru izolátu. Porovnáním průměrných párových nepodobností vypočtených pro izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* získané z jedné lokality a pro izoláty získané ze čtyřech různých lokalit během dvou let se zjistilo, že v roce 2003 nastal významný pokles genetické variability. Taktéž u izolátů *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* získaných v roce 2003 byla nalezena výrazně nižší úroveň variability než u izolátů získaných v dřívějších letech. Tento fakt může být způsoben nižší životaschopností sexuální generace mezi lety 2002 a 2003 nebo naopak vyšší životaschopností asexuální generace a jinými vlivy jako je selekční tlak a genetický drift. Tento fenomén byl v tomto případě pravděpodobně způsoben rozsáhlými záplavami, které postihly na podzim roku 2002 celou střední Evropu. Genetická struktura populace může být též ovlivněna genetickým driftem a selekčním tlakem vyvolaným klimatickými podmínkami.

Studium genotypové diverzity může poskytnout informace, jaká frakce populace je výsledkem nepohlavního způsobu rozmnožování. Genotypovou diverzitu rovněž ovlivňuje přírodní výběr, protože frekvence genotypů s vysokou mírou biologické zdatnosti s časem roste. Znalost prostorové distribuce genotypů v populaci může poskytnout informaci o potencionálním rozšíření na poli. Na základě získaných dat lze pak definovat hranice populace. Pokud nelze, je třeba určit zdroj introdukce a cestu migrace mezi populacemi. Pokud se mezi populacemi nešíří ani gamety ani individua, předpokládá se, že náhodné změny frekvencí alel v neutrálních lokusech v různých populacích způsobuje genetický drift.

Pokud je genový tok mezi populacemi omezený, měla by existovat korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností mezi populacemi. Tok genů může být sledován nepřímo sledováním frekvencí alel v různých populacích a odhadem stupně rozdělení na subpopulace. Jestliže žádné genotypy nejsou sdílené mezi populacemi, a tok genů nebyl prokázán pak lze úspěšně stanovit karanténní hranice populace.

Pyrenophora teres je, jako většina vřeckovýtusých hub, schopna jak sexuálního tak i asexuálního způsobu rozmnožování. Nepohlavní způsob rozmnožování je dominantní a vede k snížení genové variability v důsledku přírodního výběru a fixace alel genetickým driftem. Pohlavním způsobem rozmnožování na druhou stranu dochází k rekombinaci a vzniku nových sestav alel. Genetická variabilita uvnitř populací hub roste (Jonsson et al., 2000). Frekvence sexuální reprodukce *Pyrenophora teres* závisí hlavně na způsobu hospodaření, protože se sexuální stádium tvoří pouze na posklizňových zbytcích rostlin, které zůstávají nezaorány na poli přes zimu. Přestože zralé askospory nepředstavují primární inokulum jsou zdrojem nových kombinací alel a mohou přežít i dva roky. Navíc u hub *Pyrenophora teres* může docházet ke křížení jejích dvou forem. Fakt, že byly nalezeny hybridy pocházející z křížení dvou forem *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* ve volné přírodě (Campbell et al., 2002) a že zůstávají geneticky stabilní a schopné inokulace po dobu několika let (Campbell and Crous, 2003) má značný dopad na epidemiologii choroby listové skvrnitosti. Otázka hybridizace je důležitá, protože znamená introdukci nových genotypů do přírodních populací. Hybridy dokonce mohou infikovat odrůdy ječmene (*Hordeum vulgare*), které byly rezistentní vůči oběma formám *Pyrenophora teres*. Sexuální rekombinace tedy vede k rychlé adaptaci na nové genotypy hostitele.

Izoláty PTM-15 a PTM-16 z Tovačova jsou pravděpodobně potomky kříženců hub *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Tvoří intermediární haplotyp. Rau et al. (2003) ve své práci rozlišili pomocí AFLP analýz izoláty obou forem *Pyrenophora teres*, ale žádnou intermediární skupinu se jim najít nepodařilo. Naše pozorování znamená, že se na rozdíl od Sardinie (Rau et al., 2003) v České republice vyskytují intermediární haplotypy, přestože pravděpodobně ne často. Pro potvrzení existence kříženců obou forem *Pyrenophora teres* bude zapotřebí analyzovat větší počet izolátů *Pyrenophora teres* z oblasti Tovačova.

Korektní identifikace patogenů je důležitá pro kontrolu choroby, šlechtění na rezistenci a epidemiologické studie. Zvláště v případě houby *Pyrenophora teres*, kde křížení jejích dvou forem poskytuje genotypy projevující se intermediárními symptomy, které mohou být zaměnitelné s jinými patogeny je nutná přesná diagnostika. V této práci se AFLP ukázala

jako citlivá metoda, která dokázala rozlišit obě formy *Pyrenophora teres*. Podobně Williams et al. (2001) dospěl k názoru, že pomocí AFLP lze obě formy *Pyrenophora teres* rozlišit a určit spolehlivěji než na základě symptomů.

Na základě výsledků analýz AFLP bylo zjištěno, že osm z 83 izolátů analyzovaných v rámci této studie bylo na základě symptomů určeno špatně. Byly proto znovu kultivovány a jejich příslušnost k jedné z forem byla revidována na základě morfologických a fyziologických znaků. Výsledky potvrdily taxonomické zařazení provedené na základě AFLP dat.

Přímé použití metody AFLP pro detekci a rozlišení patogenů je příliš zdlouhavé a finančně nákladné, proto jsme se snažili převést některé z diagnostických markerů: 83 specifických k *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a 134 specifických pro *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* na specifické, tzv. STS (Sequence Tagged Site) markery. V té době byly publikovány SCAR markery vyvinuté ze specifických RAPD DNA fragmentů (Williams et al., 2001). Specifičnost těchto markerů byla založena na detekci dvou bodových mutací (SNPs) rozdílných mezi oběma formami *Pyrenophora teres*. Amplifikací DNA českých izolátů *Pyrenophora teres* s těmito markery byly získány u obou forem *Pyrenophora teres* oba produkty. Přestože autoři testovali specifičnost těchto markerů na australských a kanadských izolátech *Pyrenophora teres* (Williams, osobní sdělení), ukázaly se jako nespecifické pro české izoláty. To opět dokazuje velkou genetickou variabilitu tohoto patogena.

Primerové páry, které jsou výsledkem této práce jsou navrženy tak, aby postihovaly větší rozdíly mezi oběma formami: více bodových mutací, inzerci či delecí čtyř až šesti nukleotidů. Tím se zvýší pravděpodobnost, že je bude možno použít k rozlišení izolátů *Pyrenophora teres* i z jiných oblastí světa. Optimalizovaná metodika byla použita k detekci obou forem *Pyrenophora teres* přímo v pletivech hostitele.

AFLP byla použita rovněž pro navržení primerů a TaqMan sond pro kvantitativní detekci *Pyrenophora teres* metodou real-time PCR. Metoda TaqMan real-time PCR byla zvolena zejména pro svou vysokou specifičnost, citlivost a přesnost. Existuje několik technik pro kvantifikaci fytopatogenních hub založených na konvenční PCR. Jsou však pracné a méně přesné, zejména proto, že během pozdějších cyklů klesá účinnost PCR reakce (Ginzinger, 2002). Ve stanovení pomocí real-time PCR je počet amplikonů detekován v časných cyklech, kdy je účinnost reakce stále konstantní (Schena et al., 2004). Počet cyklů PCR nutných k vygenerování fluorescenčního signálu, který statisticky významně převyšuje úroveň pozadí

(Ct, Cycle threshold) je nepřímo úměrný logaritmu počátečního množství cílových sekvencí DNA.

Otázka účinnosti reakce je v literatuře často diskutována (Bar et al., 2003; Block and Schwarz, 2003; Tichopad et al., 2003; Schena et al., 2004). V této práci byly účinnosti reakce počítány podle práce Blockové a Schwarze (2003). Ve všech stanoveních byly vysoké s průměrnou hodnotou 95% a průměrnou standardní odchylkou mezi stanoveními 3,3%.

Přesnost stanovení rovněž ovlivňuje volba standardů. Plasmidové standardy obsahující cílovou sekvenci DNA patogena či hostitele a mohou být amplifikovány zároveň se vzorky. Do reakce vstupují kopie plasmidů místo koncentrace DNA vzorku houby a rostliny zvolené za standard. Tím dochází ke zpřesnění vstupní informace o počtu cílových kopií a následné kalibrační křivky. Směs plasmidových standardů v poměru 1:1000 simulovala velmi zhruba poměr obsahu DNA patogena a hostitele v napadeném pletivu. Ředící řada se sestávala z osmi vzorků směsi plasmidových standardů každý v poměru 1:1000 s koncentracemi od 10^8 do 10^3 počtu kopií plasmidu s DNA patogena a od 10^{11} do 10^5 počtu kopií plasmidů s DNA hostitele. Detekčním limitem TaqMan real-time PCR ve všech stanoveních bylo 5 kopií cílové DNA sekvence v reakci, podobně jako v práci Reischera et al. (2004). Optimalizovaná metodika poskytuje spolehlivá data v rozsahu šesti řádů vstupního počtu kopií cílové DNA sekvence.

Pokud jsou v reakci dvě sondy značené různými fluorofory, je možno kvantifikovat simultánně DNA hostitele i patogena (Winton et al., 2002). V tomto případě detekce hostitelské DNA slouží jako interní pozitivní kontrola k odstínění odlišností daných extrakcí DNA a účinností reakce. Rovněž lze pak vyjádřit množství patogena jako míru napadení hostitele, což je z hlediska fytopatologické praxe výmluvnější.

Kvantifikace a odhad míry napadení hostitele patogenem je nejatraktivnější aplikací real-time PCR přímo využitelnou v zemědělské praxi. Aplikací TaqMan technologie na vzorky 20 odrůd ječmene pěstovaných v Kroměříži v letech 2003 a 2004 se ukázalo, že v těchto letech byl dominantní výskyt formy *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*. U několika odrůd ječmene byl sledována rychlost růstu a pronikání dvou izolátů *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. Pokud byly rostliny inokulovány směsí obou forem, *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* se ukázala jako agresivnější u všech odrůd ječmene.

Rovněž může být tato metoda využita ke studiu pronikání patogena do pletiv hostitelské rostliny a reakcí rostliny na tento biotický stres. Např. nízký obsah DNA patogena v rezistentní rostlině by mohl být důsledkem účinné obrany rostliny a zastavení růstu houby. Přítomnost vysokého obsahu patogena v pletivech rezistentního hostitele svědčí spíše o toleranci než o opravdové rezistenci. V této práci byla nalezena statisticky významná korelace

mezi hodnotami Ct a velikostmi symptomů na listech ($R^2= 0,52$) pouze v počátečních stádiích infekce. V pozdějších stádiích velikost symptomů neodpovídá obsahu patogena, rozsah nekrotických pletiv bývá větší než skutečný obsah patogena. Tato skutečnost odpovídá i faktu, že *Pyrenophora teres* produkuje toxiny, které usmrcují buňky v okolí penetrujících hyf (Keon and Hargreaves, 1983).

5. Závěr

V předložené doktorské dizertační práci byla řešena problematika variability populace hub *Pyrenophora teres* v České republice a možnosti její detekce v pletivech napadených rostlin pomocí metod molekulární biologie. Tato práce je shrnutím poznatků získaných během pěti let řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum České republiky: Vývoj metody pro kvantifikaci houbových patogenů na bázi real-time PCR (QC1361) a postupně publikovaných v odborných fytopatologických časopisech a ve sbornících ze seminářů a konferencí.

Nejdůležitější výsledky práce jsou:

- Studium genetické variability 83 izolátů hub *Pyrenophora teres*, *Pyrenophora graminea*, *Pyrenophora tritici-repentis* a *Helminthosporium sativum* z České republiky, Německa, Slovenska, Norska a Sýrie pomocí metody AFLP ukázalo velkou míru variability mezi jednotlivými izoláty. Nebyla prokázána korelace mezi genetickou variabilitou a geografickým výskytem izolátu: byla nalezena větší genetická vzdálenost mezi českými izoláty navzájem než mezi českými a např. norskými izoláty. Vyšší korelace byla nalezena mezi genetickou variabilitou a rokem sběru izolátů. Spektrum patotypů *Pyrenophora teres* se tedy v České republice liší z roku na rok.
- Analýzou ITS oblastí ani aplikací publikovaných STS markerů se nepodařilo rozlišit české izoláty obou forem *Pyrenophora teres*.
- Pomocí metody AFLP byly jasně odlišeny jednotlivé studované druhy a dokonce i obě formy *Pyrenophora teres*. Byly nalezeny dva izoláty s intermediárními haplotypy, které by mohly být potomky křížení forem *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*.
- Na základě AFLP DNA fragmentů specifických pro *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* byly vyvinuty molekulární markery rozlišující obě

formy. Lze pomocí nich specificky detekovat obě formy *Pyrenophora teres* v listových pletivech hostitele.

- Byla vyvinuta a optimalizována metodika pro kvantitativní detekci obou forem *Pyrenophora teres* v listových pletivech rostlin získaných jak z umělých infekcí, tak i ze sběrů z polních podmínek. Pro další analýzy bylo použito multiplexové uspořádání se simultánní detekcí obsahu DNA patogena a rostliny. Plasmidové standardy umožňují absolutní kvantifikaci DNA obou forem *Pyrenophora teres* a odrůdy ječmene Beate (*Hordeum vulgare*).
- U vzorků uměle infikovaných izoláty *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* a *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* byla nalezena významná korelace mezi obsahem patogena a velikostí symptomů na listech pouze v ranných stádiích infekce. Pokud jsou rostliny inokulovány směsí obou forem v poměru 1:1, je *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata* ve srovnání s *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* agresivnější, tj. její podíl roste rychleji.
- Pomocí TaqMan real-time PCR bylo zjištěno, že v roce 2003 a 2004 byl na lokalitě Kroměříž dominantní výskyt *Pyrenophora teres* f. sp. *teres*.

6. Literatura:

ABLE A.J., GUEST D.I., SUTHERLAND M.W. (1998): Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *nicotinae*. *Plant Physiology* **117**: 491-499.

ABLE A.J. (2003): Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* **221**: 137-143.

AFANASENKO O.S., HARTLEB H., GUSEVA N.N., MINARIKOVA V., JANOSHEVA M. (1995): A set of differentials to characterize populations of *Pyrenophora teres* Drechs. for international use. *Journal of Phytopathology* **143**: 501-507.

ALI-HAIMOUD D.E. (1994): Contribution à l'étude de la lutte biologique contre *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem., parasite de l'orge. Thèse de doctorat d'État, L'Institut National Polytechnique, Toulouse, 1994.

ANGRA-SHARMA R., SHARMA D.K. (1999): Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres*-barley and *Drechslera maydis*-maize interactions during early stages of infection. *Mycopathologia* **148**: 87-95.

ARABI M.I.E., MIRALI N., JAWHAR M., AL-SAFADI B. (2001): The effects of barley seed infected with *Pyrenophora graminea* on storage protein (hordein) patterns. *Plant Varieties and Seeds* **14**: 113-117.

ARABI M.I.E., JAWHAR M. (2003): *In vitro* quantification of barley reaction to leaf stripe. *Plant Breeding* **122**: 444-446.

ARABI M.I.E., AL-SAFADI B., CHARBAJI T. (2003): Pathogenic variation among isolates of *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *Journal of Phytopathology* **151**: 376-382.

ARABI M.I.E., JAWHAR M. (2004): Genetic variation among Syrian *Pyrenophora graminea* isolates as determined by protein profile analysis. *Advance in Horticultural Science* **18**: 132-137.

ARAGONA M., MONTIGIANI M., PORTA-PUGLIA A. (2000): Electrophoretic karyotypes of the phytopathogenic *Pyrenophora graminea* and *P. teres*. *Mycological Research* **104**: 853-857.

AYLOR D.E. (1990): The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**: 73-92.

BACH E., CHRISTENSEN S., DALGAARD L., LARSEN P.O., OLSEN C.E., SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1979): Structures, properties and relationship to the aspergillomarasmines of toxins produced by *Pyrenophora teres*. *Physiological Plant Pathology* **14**: 41-46.

BAR T., STÄHLBERG A., MUSZTA A., KUBISTA M. (2003): Kinetic outlier detection (KOD) in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **31** (17): e105.

BARRAULT G. (1989): L'Helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Thèse de doctorat d'État, L'Institut National Polytechnique, Toulouse, 1989.

BATES J.A., TAYLOR E.J.A., KENYON D.M., THOMAS J.E. (2001): The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology* **2**: 49-57.

BATES J.A., TAYLOR E.J.A. (2001): Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology* **2**: 275-280.

- BENALI D., LYAMANI A., ZAID A., SAMIH M., HALOUI N. (1995): Cinétique de production de toxines de type pyrenoline A et pyrenoline B par des isolates marocains de *Pyrenophora teres*. *Phytopathologia Mediterranea* **34**: 120-125.
- BLOCK A., SCHWARZ G. (2003): Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed by real-time PCR. *European Food Research and Technology* **216**: 421-427.
- BÖHM J., HAHN A., SCHUBERT R., BAHNWEG G., ADLER N., NECHWATAL J., OEHLMANN R., OSWALD W. (1999): Real-time quantitative PCR: DNA determination isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology* **147**: 409-416.
- BURDON J.J. (1992): Host population subdivision and the genetic structure of natural pathogen populations. *Advances in Plant Pathology* **8**: 81-94.
- BURDON J.J., ROELFS A.P. (1985): The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* **75**: 1068-1073.
- CAKIR M., GUPTA S., PLATZ G.J., ABLETT G.A., LOUGHMAN R., EMEBIRI L.C., POULSEN D., LI C.D., LANCE R.C.M., GALWEY N.W., JONES M.G.K., APPELS R. (2003): Mapping and validation of the genes for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Australasian Journal of Agricultural Research* **54**: 1369-1377.
- CAMPBELL G.F., CROUS P.W., LUCAS J.A. (1999): *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycological Research* **103**: 257-267.
- CAMPBELL G.F., LUCAS J.A., CROUS P.W. (2002): Evidence of recombination between net- and spot-type populations of *Pyrenophora teres* as determined by RAPD analysis. *Mycological Research* **106**: 602-608.
- CAMPBELL M.A., MEDD R.W. (2003): Leaf, floret and seed infection of wheat by *Pyrenophora semeniperda*. *Plant Pathology* **52**: 437-447.
- CAMPBELL G.F., CROUS P.W. (2003): Genetic stability of net x spot hybrid progeny of the barley pathogen *Pyrenophora teres*. *Australasian Plant Pathology* **32**: 283-287.
- COVAL S.J., HRADIL C.M., LU H.S.M., CLARDY J. (1990): Pyrenoline-A and -B, two new phytotoxins from *Pyrenophora teres*. *Tetrahedron Letters* **31**: 2117-2120.
- DELOGU G., PORTA-PUGLIA A., VANNACCI G. (1989): Resistance of winter barley varieties subjected to natural inoculum of *Pyrenophora graminea*. *Journal of Genetics and Breeding* **43**: 61-66.
- DILGER M., FELSENSTEIN F.G., SCHWARZ G. (2003): Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. *Molecular Genetics and Genomics* **270**: 147-155.
- DOOHAN F.M., PARRY D.W., NICHOLSON P. (1999): *Fusarium* ear blight of wheat: the use of quantitative PCR and visual disease assessment in studies of disease control. *Plant Pathology* **48**: 209-217.
- DRENTH A., WHISSON S.C., MACLEAN D.J., IRWIN J.A.G., OBST N.R., RYLEY M.J. (1996): The evolution of races of *Phytophthora sojae* in Australia. *Phytopathology* **86**: 163-169.
- EDWARDS S.G., O'CALLAGHAN J., DOBSON A.D.W. (2002): PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* **106**: 1005-1025.

- FETCH T.G., STEFFENSON B.J., NEVO E. (2003): Diversity and sources of multiple disease resistance in *Hordeum spontaneum*. *Plant Disease* **87**: 1439-1448.
- FISHER R.A. (1930): *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford.
- FLEGR J. (2005): *Evoluční biologie*, Academia, Praha.
- FONTAINE M., QUILLOT E. (2002): Development of a TaqMan quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters* **214**: 13-17.
- FRAAIJE B.A., BUTTERS J.A., COELHO J.M., JONES D.R., HOLLON D.W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green. *Plant Pathology* **51**: 45-54.
- FRIIS P., OLSEN C.E., MØLLER L. (1991): Toxin production in *Pyrenophora teres*, the Ascomycete causing the net-spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Biological Chemistry* **266** (20): 13329-13335.
- GATTI A., RIZZA F., DELOGU G., TERZI V., PORTA-PUGLIA A., VANNACCI G. (1992): Physiological and biochemical variability in a population of *Drechslera graminea*. *Journal of Genetics and Breeding* **46**: 179-186.
- GÄUMANN E., NAEF-ROTH S., MIESCHER G. (1950): Untersuchungen über das Lycomarasmin. *Phytopathologische Zeitschrift* **16**: 257-288.
- GINZINGER D.G. (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the main-stream. *Experimental Hematology* **30**: 503-512.
- GOODWIN S.B., SAGHAI-MAROOF M.A., ALLARD R.W., WEBSTER R.K. (1993): Isozyme variation within and among populations of *Rhynchosporium secalis* in Europe, Australia and the United States. *Mycological Research* **97**: 49-58.
- GOODWIN S.B., SUJKOWSKI L.S., FRY W.E. (1995): Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* **85**: 669-676.
- GUBIŠ J., GUBIŠOVÁ M., GUBIŠ V. (2003): Frekvencia výskytu virulentných klonov v populáciách *Pyrenophora teres* Drechs. z rôznych lokalít Slovenska na jarnom jačmeni. *Acta fytotechnica et zootechnica* **3**: 61-65.
- GUPTA S., LOUGHMAN R., PLATZ G.J., LANCE R.C.M. (2003): Resistance in cultivated barleys to *Pyrenophora teres* f. *teres* and prospects of its utilisation in marker identification and breeding. *Australasian Journal of Agricultural Research* **54**: 1379-1386.
- HAENNI A.L., ROBERT M., VETTER W., ROUX L., BARBIER M., LEDERER E. (1965): Structure chimique des aspergillomarasmines A et B. *Helvetica Chimica Acta* **48**: 729-750.
- HARTL D.L., CLARK A.G. (1989): *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass.
- HO K.M., TEKAUZ A., CHOO T.M., MARTIN R.A. (1996): Genetic studies on net blotch resistance in a barley cross. *Canadian Journal of Plant Science* **76**: 715-719.
- HOPWOOD A., OLDROYD N., FELLOWS S., WARD R., OWEN S.A., SULLIVAN K. (1997): Rapid quantification of DNA samples extracted from buccal scrapes prior to DNA profiling. *Biotechniques* **23**: 18-20.
- HOWLETT B.J. (1996): Application of pulsed field gel electrophoresis to the study of genomes of fungal pathogens of plants. *Australasian Plant Pathology* **25**: 219-225.

JONES C.J., EDWARDS K.J., CASTIGLIONE S., WINFIELD M.O., SALA F., VAN DE WIEL C., BREDEMEIJER G., VOSMAN B., MATTHES M., DALY A., BRETTSCHEIDER R., BETTINI P., BUIATTI M., MAESTRI E., MALCEVSCI A., MARMIROLI N., AERT R., VOLCKAERT G., RUEDA J., LINACERO R., VAZQUEZ A., KARP A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* **3**: 381-390.

JONSSON R., SÄLL T., BRYNGELSSON T. (2000): Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **22**: 258-264.

JORDAN V.W.L. (1981): Aetiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *Plant Pathology* **30**: 77-87.

JÖRGENSEN H.J.L., LÜBECK P.S., THORDAL-CHRISTENSEN H., DE NEERGAARD E., SMEDEGAARD-PETERSEN V. (1998): Mechanisms of induced resistance in barley against *Drechslera teres*. *Phytopathology* **88**: 698-707.

KEON J.P.R., HARGREAVES J.A. (1983): A cytological study of the net blotch disease of barley caused by *Pyrenophora teres*. *Physiological Plant Pathology* **22**: 321-329.

KOSACK K.E.H., PARKER J.E. (2003): Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177-193.

KRÄMER R., OPEL M., SIEBERT A. (1989): Reaktion abgetrennter Gerstenblätter auf ein teilgereinigtes Toxinpräparat von *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **25**: 277-283.

KRUPINSKA K., HAUSSÜHL K., SCHÄFER A., VAN DER KOOIJ T.A.W., LECKBAND G., LÖRZ H., FALK J. (2002): A novel nucleus-targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiology* **130**: 1172-1180.

LEV S., SHARON A., HADAR R., MA H., HORWITZ B.A. (1999): A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation and pathogenicity: Diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **96**: 13542-13547.

LOUW J.P.J., VICTOR D., CROUS P.W., HOLZ G., JANSE B.J.H. (1995): Characterization of *Pyrenophora* isolates associated with spot and net type lesions on barley in South Africa. *Journal of Phytopathology* **143**: 129-134.

LOUW J.P., CROUS P.W., HOLZ G. (1996): Relative importance of the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. sp. *teres* (net-type) and *P. teres* f. sp. *maculata* (spot-type). *African Plant Protection* **2**: 89-95.

MA Z.Q., LAPITAN N.L.V., STEFFENSON B. (2004): QTL mapping of net blotch resistance genes in a doubled-haploid population of six-rowed barley. *Euphytica* **137**: 291-296.

MAHUKU G.S., GOODWIN P.H., HALL R. (1995): A competitive polymerase chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8** (5): 761-767.

MAJER D., MITHEN R., LEWIS B.G., VOS P. (1996): The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* **100**: 1107-1111.

- MAYER AM., STAPLES R.C., GIL-AD N.L. (2001): Mechanisms of survival of necrotrophic fungal pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**: 33-41.
- MAYR E. (1940): Speciation phenomena in birds. *American Naturalist* **74**: 249-278.
- MCDONALD B.A. (1997): The population genetics of Fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* **87**: 449-453.
- MCDONALD W.C. (1963): Heterothallism in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* **53**: 771-773.
- MCDONALD W.C. (1967): Variability and the inheritance of morphological mutants in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* **57**: 747-755.
- MILGROOM M.G., LIPARI S.E., POWELL W.A. (1992): DNA fingerprinting and analysis of population structure in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* **131**: 297-306.
- MINAŘÍKOVÁ V., POLIŠENSKÁ I. (1999): Analysis of populations of *Pyrenophora teres* on barley in the Czech Republic. *Plant Protection Science* **35**: 115-120.
- MINAŘÍKOVÁ V. (2002): Aktuálně k výskytu houbových chorob ječmene. *Úroda* **4**: 10-12.
- MUGNIER J. (1995): Les taches brunes des orges – Une nouvelle approche du diagnostic de l'Helminthosporiose : la PCR. *Phytoma* **469**: 17-20.
- NACHTIGALL M., KOPAHNKE D. (1999): Microscopical studies of the infection process on resistant and susceptible barley cultivars after inoculation with *Pyrenophora teres* f. *teres* (Sacc.) Shoem. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **32** (1): 29-40.
- NEI M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **70**: 3321-3323.
- NUKINA M., HIROTA H. (1992): Pyrenolide D, a new cytotoxic fungal metabolite from *Pyrenophora teres*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **56** (7): 1158-1159.
- ONDŘEJ M. (2000a): Problematika hub rodu *Drechslera* na ječmeni (*Hordeum*). *Agro* **5**: 11-14.
- ONDŘEJ M. (2000b): Houby rodu *Drechslera* na kostřavách a jílčích (*Festuca, Lolium*). *Agro* **9**: 8-10.
- ONDŘEJ M. (2000c): Patogenní houby rodu *Drechslera* na travách (*Agrostis* spp.). *Agro* **10**: 9-10.
- ORBACH M.J., VOLLRATH D., DAVIS R.W., YANOFSKY C. (1988): An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 1469-1473.
- PAVLYUSHIN V.A., AFANASENKO O.S., MIRONENKO N.V., FILATOVA O.A. (2004): Genetics of interrelations in the *Hordeum vulgare* – *Pyrenophora teres* pathosystem. *Russian Agricultural Sciences* **5**: 45-50.
- PECCHIONI N., VALÈ G., THOUBIA-RAHME H., FACCIOLI P., TERZI V., DELOGU G. (1999) : Barley-*Pyrenophora graminea* interaction : QTL analysis and gene mapping. *Plant breeding* **118**: 29-35.
- PELTONEN S., JALLI M., KAMMIOVIRTA K., KARJALAINEN R. (1996): Genetic variation in *Drechslera teres* populations as indicated by RAPD markers. *Annual of Applied Biology* **128**: 465-477.

- PEEVER T.L., MILGROOM M.G. (1994): Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Botany* **72**: 915-923.
- PIENING L. (1968): Development of barley net blotch from infested straw and seed. *Canadian Journal of Plant Science* **48**: 623-625.
- PINNSCHMIDT H.O., HOVMØLLER M.S. (2004): Resistance against net blotch, scald and *Ramularia* of barley. DJF-rapport **98**: 61-71.
- PORTA-PUGLIA A., DELOGU G., VANNACCI G. (1986): *Pyrenophora graminea* on winter barley seed: effect on disease incidence and yield losses. *Journal of Phytopathology* **117**: 26-33.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C. (1996): The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**: 225-238.
- RAMAN H., PLATZ G.J., CHALMERS K.J., RAMAN R., READ B.J., BARR A.R., MOODY D.B. (2003): Mapping of genomic regions associated with net form of net blotch resistance in barley. *Australasian Journal of Agricultural Research* **54**: 1359-1367.
- RAU D., BROWN A.H.D., BRUBAKER C.L., ATTENE G., BALMAS V., SABA E., PAPA R. (2003): Population genetic structure of *Pyrenophora teres* Drechs. the causal agent of net blotch in Sardinian landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **106** (5): 947-959.
- RAU D., MAIER F.J., PAPA R., BROWN A.H.D., BALMAS V., SABA E., SCHAEFER W., ATTENE G. (2005): Isolation and characterisation of the mating-type locus of the barley pathogen *Pyrenophora teres* and frequencies of mating-type idiomorphs within and among fungal populations collected from barley landraces. *Genome* **48** (5): 855-869.
- REEVES J.C., BALL S.F.L. (1991): Research note: Preliminary results on the identification of *Pyrenophora* species using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Plant Varieties and Seeds* **4**: 185-189.
- REISCHER G.G., LEMMENS M., FARNLEITNER A., ADLER A., MACH R.L. (2004): Quantification of *Fusarium graminearum* in infected wheat by species specific real-time PCR applying a TaqMan probe. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 141-146.
- RUIZ-ROLDÁN M.C., MAIER F.J., SCHÄFER W. (2001): PTK1, a mitogen-activated-protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation and pathogenicity of *Pyrenophora teres* on barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 116-125.
- SAKER M.M. (2005): A biological and molecular characterization of some Egyptian genotypes which are resistant to net blotch disease. *Cellular and Molecular Biology Letters* **10**: 265-280.
- SCOTT D.B. (1991): Identity of *Pyrenophora* isolates causing net-type and spot-type lesions on barley. *Mycopathologia* **116**: 29-35.
- SHIPTON W.A., KAHN T.N., BOYD W.J.R. (1973): Net blotch of barley. *Reviews in Plant Pathology* **52**: 269-290.
- SHOEMAKER R.A. (1957): Atkinson's species of *Helminthosporium* on grasses from Alabama. *Canadian Journal of Botany* **35**: 269-277.
- SHOEMAKER R.A. (1962): *Drechslera* Ito. *Canadian Journal of Botany* **40**: 808-836.
- SCHALLER C.W., WIEBE G.A. (1951): Sources of resistance to net blotch of barley. *Agronomy Journal* **42**: 334-336.

- SCHENA L., NIGRO F., IPPOLITO A., GALLITELLI D. (2004): Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 893-908.
- SIMPSON D.R., WESTON G.E., TURNER J.A., JENNINGS P., NICHOLSON P. (2001): Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 421-431.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1971): *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. In: Yearbook of the Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, 124-144.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1976): Pathogenesis and genetics of net-spot blotch and leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. D.S.R. Forlag, Copenhagen, 176pp.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1977a): Inheritance of genetic factors for symptoms and pathogenicity in hybrids of *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **89**: 193-202.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1977b): Isolation of two toxins produced by *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net-spot blotch of barley. *Physiological Plant Pathology* **10**: 203-211.
- SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (1983): Cross fertility and genetic relationship between *Pyrenophora teres* and *P. graminea*. The causes of net blotch and leaf stripe of barley. *Seed Science and Technology* **11**: 673-680.
- SMITH N.J.G., RATTAY J.M. (1930): Net blotch, spot blotch and leaf-stripe diseases of barley in South Africa. *South African Journal of Science* **27**: 341-351.
- STEFFENSON B.J., WEBSTER R.K. (1992): Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley. *Phytopathology* **82**: 170-177.
- STEVENS E.A., BLAKEMORE E.J.A., REEVES J.C. (1998): Relationships amongst barley and oat infecting isolates of *Pyrenophora* spp. based on sequences of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. *Molecular Plant Pathology On-line* [<http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1111stevens>].
- TACCONI G., CATTIVELLI L., FACCINI N., PECCHIONI N., STANCA A.M., VALÉ G. (2001): Identification and mapping of a new leaf stripe resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 1286-1291.
- TAYLOR E.J.A., STEVENS E.A., BATES J.A., MORREALE G., LEE D., KENYON D.M., THOMAS J.E. (2001): Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology* **50**: 347-355.
- TAYLOR E.J.A., KONSTANTINOVA P., LEIGH F., BATES J.A., LEE D. (2004): Gypsy-like retrotransposons in *Pyrenophora*: an abundant and informative class of molecular markers. *Genome* **47**: 519-525.
- TAYLOR J.W., JACOBSON D.J., FISHER M.C. (1999): The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology* **37**: 197-246.
- TEKAUZ A. (1990): Characterization and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* from western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* **12**: 141-148.

- TICHOPAD A., DILGER M., SCHWARZ G., PFAFFL M.W. (2003): Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research* **31** (20): e122.
- TUCKER S.L., TALBOT N.J. (2001): Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 385-417.
- TURKINGTON T.K., KUTCHER H.R., CLAYTON G.W., O'DONOVAN J.T., JOHNSTON A.M., HARKER K.N., XI K., STEVENSON F.C. (2004): Impact of seedbed utilization and fungicide application on severity of net blotch (*Pyrenophora teres*) and production of barley. *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**: 533-547.
- VALÈ G., ARAGONA M., TORRIGIANI E., CATTIVELLI L., MONTIGIANI M., STANCA A.M., PORTA-PUGLIA A. (1998): Characterisation of a hypovirulent insertional mutant of *Pyrenophora graminea* and analysis of the barley defence response after inoculation. *Plant Pathology* **47**: 657-664.
- VERGARA M., CRISTANI C., VANNACCI G. (2003): Differential transcripts in *Pyrenophora graminea* and *Pyrenophora teres* putatively related to pathogenicity. *Journal of Plant Pathology* **85**: 157-164.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- WALLWORK H., LICHON A., SIVANESAN A. (1992): *Pyrenophora hordei* - a new ascomycete with *Drechslera* anamorph affecting barley in Australia. *Mycological Research* **96**: 1068-1070.
- WAUGH R., MCLEAN K., FLAVELL A.J., PEARCE S.R., KUMAR A., THOMAS B.B.T., POWELL W. (1997): Genetic distribution of Bare-1 like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics* **253**: 687-694.
- WEIERGANG I., LYNDS JØRGENSEN H.J., MØLLER I.M., FRIIS P., SMEDEGAARD-PETERSEN V. (2002a): Correlation between sensitivity of barley to *Pyrenophora teres* toxins and susceptibility to the fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**: 121-129.
- WEIERGANG I., LYNDS JØRGENSEN H.J., MØLLER I.M., FRIIS P., SMEDEGÅRD-PETERSEN V. (2002b): Optimization of *in vitro* growth conditions of *Pyrenophora teres* for production of the phytotoxin asperillomarasmine A. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**: 131-140.
- WEILAND J.J., STEFFENSON B.J., CARTWRIGHT R.D. WEBSTER R.K. (1999): Identification of molecular genetic markers in *Pyrenophora teres* f. *teres* associated with low virulence on "Harbin" barley. *Phytopathology* **89**: 176-181.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics. *In: INNIS ET AL. PCR protocols*, Academic Press, 1990, 315-322.
- WILLIAMS K.J., LICHON A., GIANQUITTO P., KRETSCHMER J.M., KARAKOUSIS A., MANNING S., LANGRIDGE P., WALLWORK H. (1999): Identification and mapping of a gene conferring resistance to the spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 323-327.
- WILLIAMS K.J., SMYL C., LICHON A., WONG K.Y., WALLWORK H. (2001): Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens

causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australasian Plant Pathology* **30**: 37-44.

WILLIAMS K.J., PLATZ G.J., BARR A.R., CHEONG J., WILLSMORE K., CAKIR M., WALLWORK H. (2003): A comparison of the genetics of seedling and adult plant resistance to the spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*). *Australasian Journal of Agricultural Research* **54**: 1387-1394.

WINTON L.M., STONE J.K., WATRUD L.S., HANSEN E.M. (2002): Simultaneous one-tube quantification of host and pathogen DNA with real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* **92**: 112-116.

WU H.L., STEFFENSON B.J., LI Y., OLESON A.E., ZHONG S. (2003): Genetic variation for virulence and RFLP markers in *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**: 82-90.

ZHANG G., BERBEE M.L. (2001): *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **93** (6): 1048-1063.