Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Travní druhy rzí s aecii na rodech *Ranunculus* a *Ficaria* - molekulární analýza

Grass rust fungi with aecia on *Ranunculus* and *Ficaria* - molecular analysis

Markéta Hejná

Diplomová práce

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jaroslava Marková, CSc.

Odborný konzultant: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Diplomová práce **Markéty Hejné** byla obhájena na katedře botaniky PřF UK v Praze dne 23.9.2008 a ohodnocena klasifikačním stupněm **výborně**.

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně,
jen s použitím citovaných literárních pramenů

Markéta Hejná

OBSAH

Předmluva ... 1
1. LITERÁRNÍ ÚVOD ... 3
1.1. Druhy travních rzí s aecii na rodu *Ranunculus* a *Ficaria* ... 3
1.1.1. *Puccinia magnusiana* Körnicke, 1876 ... 3
1.1.2. *Puccinia perplexans* Plowright, 1885 ... 5
1.1.3. *Uromyces dactylidis* Otth, 1861 ... 7
1.1.4. *Uromyces festucae* H. et P. Sydow, 1900 ... 8
1.1.5. *Uromyces poae* Rabenhorst, 1866 ... 10
1.1.6. *Uromyces poae-alpinae* Rytz, 1911 ... 12
1.2. Izolace DNA ze spor rzí ... 14
1.2.1. Úvod ... 14
1.2.2. Metody podle jednotlivých autorů ... 14
1.2.3. Shrnutí ... 18
1.3. Molekulární metody používané při studiu rzí ... 20
1.3.1. PCR ... 20
1.3.2. Analýza vybraných úseků DNA ... 21
1.3.3. RFLP ... 24
1.3.4. RAPD ... 25
1.3.5. AFLP ... 26
1.4. Další techniky používané u hub pro rozlišování druhů ... 27
1.4.1. rep-PCR ... 27
1.4.2. ISSR ... 28
2. MATERIÁL A METODIKA ... 30
2.1. Sběry ... 30
2.2. Izolace DNA ... 32
2.2.1. Vlastní metoda izolace ... 32
2.2.2. Izolace DNA komerční sadou na izolaci ... 32
2.2.3. Měření koncentrace získané DNA ... 32
2.3. Gelová elektroforéza ... 33
2.4. PCR amplifikace ... 33
2.4.1. Amplifikace rDNA oblastí a zpracování sekvencí ... 33
2.4.2. RAPD metoda ... 35
2.4.3. PCR s primery ERIC a M13 core ... 36
2.4.4. ISSR ... 37
2.5. PCR – RFLP ... 37
2.6. Studium morfologie aeciospor ... 38
2.6.1. Studium ornamentiky ... 38
2.6.2. Měření délky a šířky spor ... 39
2.6.3. Zpracování naměřených hodnot ... 39
3. VÝSLEDKY ... 40
3.1. Izolace DNA ... 40
3.2. PCR amplifikace rDNA ... 41
3.2.1. Optimalizace PCR reakce ... 41
3.2.2. Analýza sekvencí ITS oblastí ... 43
3.2.3. Analýza sekvencí LSU oblastí ... 48

3.3. Hledání vhodné metody identifikace aecií ... 49
3.3.1. RAPD ... 49
3.3.2. PCR s primery ERIC a M13 ... 50
3.3.3. ISSR ... 50
3.3.4. PCR-RFLP ... 51
3.4. Studium morfologie aeciospor ... 53
3.4.1. Měření délky a šířky aeciospor ... 53
3.4.2. Studium ornamentiky aeciospor ... 54
3.4.3. Morfologická odlišnost aecií vzorku 08-1 ... 57
4. DISKUSE ... 58
4.1. Metodika ... 58
4.2. Vyčlenění skupin a posouzení jejich taxonomické hodnoty ... 60
4.3. Zhodnocení použitelnosti testovaných metod k identifikaci druhů ... 63
4.4. Morfologická pozorování ... 65
5. ZÁVĚR ... 66
SUMMARY ... 67
POUŽITÁ LITERATURA ... 68

Předmluva

Tato diplomová práce se zabývá studiem heteroecických druhů travních rzí, které mají jarní ložiska na druzích rodu *Ranunculus* a *Ficaria*. Při práci jsem se věnovala možnosti využití molekulárních metod při determinaci jednotlivých druhů i při posouzení příbuzenských vazeb ve studované skupině rzí.

Základ taxonomie rzí (*Uredinales*) tradičně tvoří znaky morfologické a ekologické. Klasifikace byla postavena na morfologických znacích všech typů ložisek a spor, na charakteru životního cyklu a na specializaci k hostitelským druhům rostlin.

Pro objektivní posouzení příbuzenských vazeb u mnoha skupin rzí (včetně travních) však nemusí být tyto znaky dostačující. Dokonce ani rody *Puccinia* a *Uromyces* nejsou jednoznačně vymezené. Ukazuje se, že členění na základě počtu buněk teliospor není správné a oba rody jsou polyfyletické (Maier et al 2003).

Přesto, že rzím byla od nepaměti věnována velká pozornost, byly rzi na planě rostoucích travách skupinou poněkud opomíjenou a v mnoha ohledech zůstávají stále nedokonale prostudovány. Zejména fyziologická a ekologická variabilita v rámci jednotlivých druhů, mnohdy široce pojatých, je dosud málo prozkoumána.

Jednou z málo prostudovaných skupin jsou právě heteroecické rzi, které mají aecia na druzích rodu *Ranunculus* a *Ficaria*. Jedná se o druhy *Puccinia magnusiana, Puccinia perplexans, Uromyces dactylidis, Uromyces festucae* a *Uromyces poae*. Dodnes nebyla vyjasněná ani situace okolo samostatnosti druhů *Uromyces poae* a *Uromyces festucae*. Mnozí autoři je řadí pouze do synonymiky druhu *Uromyces dactylidis* (více viz. kapitola 1.1.).

Aecia jednotlivých studovaných druhů nelze na základě morfologických znaků od sebe odlišit. V minulosti bylo možné vzájemný vztah aecií a ostatních stádií dokázat pouze infekčními pokusy. Nálezy aecií na pryskyřnících proto často zůstávají blíže neurčeny pod názvem *Aecidium ranunculacearum* DC. Kromě znaků morfologických a ekologických se v poslední době při studiu rzí stále častěji uplatňují znaky molekulární.

Rzi jsou skupinou obligátních biotrofních parazitů, které není možné běžným způsobem kultivovat. Z povahy jejich životní strategie plyne, že je nutné pracovat s přírodními sběry, u kterých bývá limitujícím faktorem malé množství vstupního materiálu. U takového materiálu navíc hrozí velké riziko kontaminace. Z těchto důvodů nejsou u rzí molekulárně taxonomické studie tak četné jako u ostatních skupin hub. Přesto bylo v posledních letech publikováno několik studií založených většinou na analýze rDNA. Nejčastěji se věnují blízce příbuzným nebo morfologicky shodným druhům rzí, případně studiu vnitrodruhové variability (kapitola 1.3.2.).

Cíle práce byly tyto:

- ✓ Zvolit vhodný postup pro získávání molekulárních dat.
- ✓ Na základě získaných dat identifikovat a rozlišit jednotlivé druhy, případně definovat hostitelské okruhy jednotlivých druhů.
- ✓ Vybrat spolehlivou metodu pro rutinní přiřazování aecií k příslušným druhům.
- ✓ Objasnit příbuzenské vztahy mezi studovanými druhy a případně zařadit skupinu do širšího fylogenetického kontextu.
- ✓ Zjistit zda jsou druhy *U. poae* a *U. ficariae* tzv. *correlated species*.
- ✓ Zpětně hledat morfologické mezidruhové odlišnosti aeciospor (velikost, ornamentika jejich buněčné stěny).

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Jaroslavě Markové, CSc. za uvedení do problematiky studované skupiny rzí i za další ochotnou pomoc, bez které by má práce vznikala jen velmi obtížně.

Za seznámení s molekulárními metodami a nesčetné rady děkuji Mgr. Miroslavovi Kolaříkovi Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat i RNDr. S. Pažoutové, CSc., vedoucí Laboratoře fyziologie a genetiky vláknitých hub MBÚ AV ČR, ve které mi bylo umožněno využívat potřebnou techniku.

Děkuji i všem ostatním, kteří mi během studia a při sepisování diplomové práce byli jakýmkoliv způsobem nápomocni.

Za soustavnou podporu nejen při studiu si mé velké díky zaslouží Tomáš Hrabě a celá moje rodina.

Za finanční podporu děkuji grantové agentuře GAUK (číslo grantu 188\2006\B-BIO\PřF).

1. LITERÁRNÍ ÚVOD

1.1. Druhy travních rzí s aecii na rodu Ranunculus a Ficaria

V této části jsou zpracovány informace o heteroecických druzích travních rzí, které mají jako mezihostitele druhy rodů *Ranunculus* a *Ficaria* a jsou víceméně všemi významnými autory přijímány jako druhy samostatné. Zpracovány byly pouze druhy zaznamenané na území ČR, výjimkou je druh *Uromyces poae-alpinae*, ten byl zařazen z důvodu výskytu na Slovensku a v Rakousku. Středem zájmu byly zejména morfologické charakteristiky jednotlivých druhů a jejich případné vazby na hostitelské rostliny.

1.1.1. *Puccinia magnusiana* Körnicke, 1876

Spermogonia amfigenní, ve skupinkách, medově žlutohnědá ca 80 µm v průměru (Urban 1966).

Aecia ve skupinkách na žlutavých skvrnách, na spodní straně listů, na řapících a lodyhách. Peridie pohárkovitá, ohrnutá, roztřepená. Vnější stěna buněk 7-8 µm tlustá, jemně rýhovaná, vnitřní 2-4 µm tlustá, hrubě bradavčitá (Gäumann 1959).

Aeciospory v řetízcích, polyedrické až eliptické. Velké: 23-26 × 21-23 µm (Cummins 1971), 16-26 × 18,7-22 µm (Azbukina 1974), 14-25 × 14-18 µm (Urban 1966), 15-17 × 16-21 µm (Gäumann 1959, Majewski 1979). Stěna bezbarvá, o tloušťce do 1 µm (Urban 1966, Majewski 1979), 1-1,5 µm (Cummins 1971), hustě pokrytá jemnými bradavkami (rozestupy okolo 0,5 µm).

Uredia amfigenní 0,3-1 mm velká, převážně epifylní, oválného tvaru, poměrně dlouho krytá pokožkou. Barvu mají světlou, žlutohnědou. Uredia zpravidla bývají prostoupena četnými tlustostěnnými parafýzami hlavicovitě kyjovitého tvaru. Ve starších ložiscích parafýzy výrazně převládají (Urban 1966). Stěna parafýz 1,5-4 µm tlustá (Cummins 1971), ve vrcholku hlavice ještě o něco tlustší. Délka parafýz 50-60 µm (Urban 1966, Gäumann 1959). Azbukina (1974) uvádí rozměry parafýz 48-73(80) × 14-19 µm, Majewski (1979) 50-76 ×15-23 µm.

Urediospory často eliptické, velké: (20)26-35(42) × (13)15-19(21) µm (Cummins 1971), 24-40 × 19-24 µm (Azbukina 1974), (19)24-27(32) × (15)20-24(27) µm (Gäumann 1959), 27-36 × 15-20 µm (Majewski 1979), (17)24-27(30) × (15)19-24(27) µm (Urban 1966). Stěna žlutavá, ostnitá (rozestup ostnů 2-2,5 µm), s 8-11 nepravidelně uspořádanými nevýraznými

póry, Cummins uvádí tendenci k bizonálnímu rozložení pórů. Stěna tlustá 2-2,5 μm (Urban 1966), 1,2-2 μm (Azbukina 1974), 1,5-3 μm (Cummins 1971).

Telia amfigenní, úzká, podlouhlá (až 3 mm dlouhá a 0,25 mm široká), vypouklá. Vyskytují se na listech, listových pochvách i stéblech, často splývají v dlouhé tmavohnědé až černé linie.

Teliospory kyjovité, na vrcholu zaokrouhlené nebo uťaté, zúžené u přepážky. Barva hnědá, na temeni tmavší. Stěna hladká, do 2 μm tlustá, na vrcholku ztlustlá na 6-9 μm (Urban 1966). Stěna 1-3μm tlustá, na vrcholku (4)7-10(14) μm (Cummins 1971), 7-12 μm (Gäumann 1959). Stopka vytrvalá, hladká, světle žlutohnědá, kratší než spora, obvykle 20-50 μm dlouhá (Azbukina 1974). Velikosti teliospor: (35)42-56(62) × (13)15-24(29) μm (Cummins 1971), 30-54 × 16-22 μm (Azbukina 1974), 40-55 × 15-24 μm (Majewski 1979), (32)37-55(66) × (14)20-24(28) μm (Urban 1966), (32)42-48(66) × (14)20-24(28) μm (Gäumann 1959).

Mezihostitelé: zejména *Ranunculus repens* L. Dále také *R. bulbosus* L. a *R. illyricus* L. *R. montanus* Willd. Cummins (1971) uvádí jako hostitele aecií rody *Ranunculus, Clematis* a *Anemone*. Majewski (1979) uvádí jako možného, ale nejistého mezihostitele i *Ranunculus acris* L.

Hlavní hostitelé: *Phragmites australis* (Cav.) Steud. (= *P. communis* Trin.), méně běžnými hostiteli jsou *Phragmites japonica* Steud., *P. longivalvis* Steud., *P. karka* Trin. a také *Arundo donax* L.

Aecium mnohdy nazývané jako *Aecidium ranunculi-repentis* Sacc., je morfologicky neodlišitelné od aecií patřících do životních cyklů jiných rzí. Např. od aecií *Uromyces dactylidis*, *U. festucae* a *U. poae*.

Vztahy aecií a dalších stádií byly v minulosti prokazovány infekčními pokusy. Tak bylo zjištěno, že některé druhy rodu *Ranunculus* jsou vůči rzi *P. magnusiana* imunní, zatímco mnohé další druhy téhož rodu jsou náchylné. Infekčními pokusy bylo zjištěno, že *Ranunculus acer* L., *R. auricomus* L. a *Ficaria verna* Huds. jsou imunní. Oproti tomu silně náchylné jsou druhy *Ranunculus breyninus* Crantz. a *R.montanus* Wild. (Gäumann 1959). Mezi potencionální mezihostitele patří také *R. sceleratus* L., *R. flammula* L., *R. lingua* L.

Vývoj infekce na *R. repens* v porovnání s *R. bulbosus*, je pomalejší a početně slabší (Urban 1966).

Výskyt: Rozšířena v mírném pásu severní polokoule. U nás hlavně střední a východní

Čechy a Morava (zejména úvaly řeky Moravy), také Slovensko (Urban 1966). Třeboňsko (Turečková 1986). Vyskytuje se v úvalech řek a nížinách, někdy vystupuje i do pahorkatin, ale hranici 400 m. n. m. překračuje jen velmi zřídka.

V mírném pásu závazně heteroecická, ale ve Středomoří je nezávislá na střídání hostitele a přežívá zimu díky tvorbě urediospor (Jørstad 1951).

V přírodě bývá *Puccinia magnusiana* často na listech společně s *Puccinia phragmitis*. Odlišovací znaky: *P. magnusiana* má v urediích kyjovité parafýzy. Důsledkem přítomnosti parafýz jsou kompaktní uredia. Parafýzy se vyskytují i na okraji telií. Ložiska zimních výtrusů jsou oproti *P. phragmitis* menší, tmavší a méně vystouplá (Urban 1966). Stopky teliospor druhu *P. magnusiana* kratší než spora, u *P. phragmitis* stopky dlouhé až 200 μm (Cummins 1971).

1.1.2. *Puccinia perplexans* Plowright, 1885

Spermogonia amfigenní, ve skupinkách, 100-115 μm v průměru, perifýzy vyčnívající, až 60 μm dlouhé (Gäumann 1959).

Aecia v malých skupinkách, na žlutavých, mírně zduřelých skvrnách; na listech, řapících i lodyhách (Marková et Urban 1997). Na spodní straně listů (Majewski 1979). Peridie bělavá, ohrnutá, jemně roztřepená. Buňky peridie volně spojené (Gäumann 1959 uvádí peridiální buňky v řadách), naspodu příliš nepřesahující směrem dolů, vnější stěna 8-11 μm tlustá, jemně pruhovaná, vnitřní stěna 3-5 μm tlustá, hruběji bradavčitá (Urban 1966).

Aeciospory kulaté až eliptické či polyedrické, o velikosti 18-26 × 15-20 μm (Urban 1966, Majewski 1979, Gäumann 1959). Stěna bezbarvá, do 1 μm tlustá, pokrytá jemnými bradavkami, na horní části spory jsou bradavky hrubší (Majewski 1979). Bradavky v odstupu cca 1 μm (Gäumann 1959).

Uredia převážně na horní straně listů, eliptická, do 0,5 mm dlouhá, žlutohnědá, zprvu překrytá epidermis, později nahá, rezavě zlatá, prášivá (Majewski 1979). Uredia za čerstva rezavá, v herbářových položkách bělavá, bez parafýz (Marková et Urban 1997). Gäumann ale uvádí kyjovité parafýzy dlouhé 35-40 μm. Podle Urbana (1966) nejsou v urediích parafýzy, ale hlavicovitě ztlustlé stopky urediospor, toto tvrzení později ve své práci potvrzuje například Blechtová (1990).

Urediospory o rozměrech: (21)24-32(35) × (20)21-28(31) μm (Marková et Urban 1997),

19-35 × 14-25, v průměru 21 × 19 μm (Gäumann 1959), 15-43 × 13-35, v průměru 28 × 24,5 μm (Blechtová 1990), 20-24 × 17-21 μm (Majewski 1979). Spory široce eliptické, stěna žlutavá nebo nahnědlá, 1,5-2 μm tlustá, pokryta ostny v odstupech 2-3 μm (Majewski 1979). Klíčních pórů (5)6-8(10) (Majewski 1979), (2)6-7(9) (Blechtová 1990), Marková et Urban (1997) uvádějí (4)5-7(10) roztroušených pórů, překrytých malou plochou papilou.

Telia na spodní straně listů a na stéblech, krátce čárkovitá, do 1 mm dlouhá, krytá epidermis, leskle černá (Gäumann 1959). Někdy v hustých okrouhlých skupinkách, rozčleněna hnědými parafýzami (Marková et Urban 1997).

Teliospory často nepravidelného tvaru, kyjovité, vřetenovité či podlouhlé, někdy ohnuté. Na temeni zakulacené, uťaté či zašpičatělé. U přepážky nebývají zaškrceny, nebo jen mírně (Marková et Urban 1997). Stěna žlutohnědá, hladká, tenká 1-1,5 μm, na temeni ztlustlá na 3-6 μm a tmavší, kaštanověhnědá (Majewski 1979). Teliospory: 35-60 × 14-23 μm (Gäumann 1959), 33-56 × 15-25 μm (Majewski 1979), (30)40-55(62) × (12)16-25(30) × (9)12-17,5(20) μm (Marková et Urban 1997). Stopka teliospor hnědavá, krátká, vytrvalá (Majewski 1979); 3-6(10) μm dlouhá (Marková et Urban 1997).

Mezihostitelé: *Ranunculus acer* L., možná také *R. lanuginosus* L. či *R. serbicus* Vis.

Hlavní hostitelé: *Alopecurus geniculatus* L., *Alopecurus pratensis* L. a další druhy rodu *Alopecurus.* Dále také *Muehlenbergia mexicana* Trin.

Rozšíření na území ČR: Šumava, Krkonoše a Podkrkonoší, České středohoří, okolí Prahy, jižní a východní Čechy, Morava (Blechtová 1990), Třeboňsko (Turečková 1986).

Jørstad (1951) i Gäumann (1959) považují *P. perplexans* za samostatný druh. Ale samostatnost tohoto druhu nebyla úplně jasná, například Cummins (1971) zahrnuje druh *Puccinia perplexans* do komplexu druhů *Puccinia recondita* Rob. ex Desm.

Urban (1966) uvádí druh *P. perplexans* jako *P. perplexans* var. *perplexans* a přiřazuje k tomuto druhu ještě varietu *triticina.*

Později bylo druhu *P. perplexans* věnováno několik prací (přehled v Marková et Urban 1997) a dnes již není o jeho samostatnosti pochyb.

1.1.3. *Uromyces dactylidis* Otth, 1861

Spermogonia v malých skupinkách na horní straně listů, 115-127 μm v průměru, s vyčnívajícími perifýzami (Urban 1966).

Aecia v malých skupinkách, někdy jednotlivě, na spodní straně listů. Peridie 0,3 mm v průměru (Majewski 1977), žlutavá, ohrnutá, jemně roztřepená (Urban 1966). Buňky peridie mají vnější stěnu 7-13 μm tlustou, skoro hladkou, vnitřní stěnu mají 3-6 μm tlustou, hrubě bradavčitou (Majewski 1977).

Aeciospory oválné (Majewski 1977), tupě polyedrické (Urban 1966); stěna hyalinní (Cummins 1971) nebo lehce žlutavá (Majewski 1977), 1 μm tlustá, pokrytá drobnými, ale výraznými bradavkami. Velikost aeciospor: 18-22 × 15-20 μm (Cummins 1971), 17,8-24 × 13-20 μm (Azbukina 1974), 18-24 × 18-21 μm (Majewski 1977), 18-26 × 13-24 μm (Urban 1966).

Uredia amfigenní, roztroušená, žlutohnědá (Urban 1966 uvádí rezavá až do oranžova), oválná, dlouhá až 0,5 mm, dlouho krytá epidermis (Majewski 1977). Bez pravých parafýz (Urban 1966). Vzácně s pravými parafýzami, mnohem častěji s parafýzovitě deformovanými stopkami urediospor (Gäumann 1959).

Urediospory oválné, o rozměrech: (22)25-30(34) × (18)20-24(26) μm (Cummins 1971), 20-30(32) × 14-24(26) μm (Azbukina 1974), 21-28 × 20-25 μm (Majewski 1977), (22,5)27,5-31,5(37,5) × (21)23-26(30) μm (Urban 1966). Stěna spor zlatohnědá, 1,5-2 μm tlustá (Cummins 1971), 1-3 μm (Azbukina 1974), pokrytá ostny v odstupech 2-3 μm (Majewski 1977, Urban 1966). (7)8-9(14) klíčních pórů přibližně ve dvou rovinách (Urban 1966), Cummins (1971) udává pórů 7-9(10) a Majewski (1977) 7-9 nepravidelně uspořádaných, s plochými papilami.

Telia amfigenní nebo epifylní (Cummins 1971), oproti tomu Urban (1966) i Majewski (1977) uvádějí telia převážně hypofylní. Eliptická nebo podlouhlá do 1 mm délky, trvale krytá pokožkou (Majewski 1977). Někdy splývající ve skupině kolem uredia (Urban 1966), prostoupená hojnými hnědými parafýzami (Cummins 1971).

Teliospory variabilní, nepravidelně eliptické, na špičce zaokrouhlené, zploštělé, nebo zašpičatělé (Majewski 1977), často nesouměrné. Kaštanově hnědé, na temeni tmavší, hladké. Stěna 1-1,5 μm tlustá (Cummins 1971), na temeni 3-5 μm (Azbukina 1974, Urban 1966), 2-4(6) μm (Cummins 1971). Stopka bezbarvá nebo slabě žlutavě nahnědlá, dlouhá jako výtrus či kratší (Urban 1966), kolabující, do 40 μm dlouhá, obvykle ale okolo 25 μm (Cummins 1971). Velikost teliospor: (18)22-30(34) × (12)16-20(24) μm (Cummins 1971), 18-30(36) × 14-20(25) μm (Azbukina 1974), 25-33 × 15-21 μm (Majewski 1977), (20)24-31(35)

× (13)17-21,5(27,5) μm (Urban 1966).

Mezihostitelé: zejména *Ranunculus acer* L., *R. repens* L., *R. bulbosus* L., dále také *R. aconitifolius* L., *R. polyanthemus* L., *R. sceleratus* L., *R. lanuginosus* L. Možná také *Ficaria verna* Huds.; v tomto případě není jisté, zda tato aecia nepatří spíše k *Uromyces poae* Rabenh. (Urban 1966). Mezihostitelem *U. dactylidis* není *Ranunculus auricomus* L., je to ale běžný hostitel *U. poae*.

Aecia nelze bezpečně odlišit od aecií jiných druhů rzí (*P. magnusiana, P. perplexans, U. poae, U. festucae*).

Hlavní hostitelé: *Dactylis glomerata* L., případně jiné druhy tohoto rodu.

Rozšíření na území ČR: po celém území republiky. Urban (1966) uvádí sběry z Jeseníku, středních a jižních Čech, Moravy, Podkrkonoší a Polabí.

Urban (1966) považuje *U. dactylidis* i *U.poae* za samostatné druhy. *U. dactylidis* odlišuje většími urediosporami opatřenými větším počtem (8-9) klíčních pórů. Barva stěny letních výtrusů bývá tmavší, než u *U. poae*. Parafýzy nebývají přítomny. Temeno teliospor není zpravidla hnědě ztlustlé a krupičkovitě zrnité.

Cummins (1971) klade do synonymiky *U. dactylidis* také druhy *U.poae* a *U. poae-alpinae*, které rozlišuje jako variety. Uvádí, že oproti varietám *poae* a *poae-alpinae* má varieta *dactylidis* znatelně větší spory, varieta *poae-alpinae* je snadno odlišitelná díky bezbarvým teliálním parafýzám. Taxonomická hodnota obou taxonů je tedy stále nejasná. Na rozdíl od *U. poae* vystupuje *U. dactylidis* do značných výšek, až nad 1000 m n. m., ale nejčastěji se vyskytuje v nížinách.

1.1.4. *Uromyces festucae* H. et P. Sydow, 1900

Spermogonia na obou stranách listu, zanořená pod epidermis, džbánkovitého tvaru, s vyčnívajícími perifýzami, asi 80-100 μm v průměru (Gäumann 1959).

Aecia na spodní straně listu, pohárkovitá. Peridie 0,3-0,4 mm v průměru (Majewski 1977). Vnější stěna peridiálních buněk 7-8 μm tlustá, jemně příčně pruhovaná, vnitřní stěna 3-5 μm tlustá a bradavčitá (Urban 1966).

Aeciospory polyedrické, zaoblené, bezbarvé, jemně bradavčité (Gäumann 1959). Stěna méně než 1 μm tlustá (Gäumann 1959), 1,5 μm tlustá (Majewski 1977, Săvulescu 1953). Na

velikosti aeciospor 17-21 × 15-20 µm se shodují Gäumann (1959), Majewski (1977), Urban (1966) i Săvulescu (1953).

Uredia epifylní, na žlutavých skvrnách viditelných i na rubu, bez parafýz, oranžová (Urban 1966), hnědožlutá (Gäumann 1959). Dlouhá do 1 mm, poměrně dlouho krytá pokožkou, v malých skupinkách.

Urediospory eliptické či kulaté, o rozměrech: 18-28 × 17-25 µm (Gäumann 1959), 22-30 × 17-23 µm (Majewski 1977), 20-32 × 18-24 µm (Săvulescu 1953), 20-30(32,5) × 17,5-24 µm (Urban 1966). Stěna 2-2,5 µm silná, žlutá, pokryta ostny v odstupech 2-3 µm (Majewski 1977), se (6)7-8(9) (Urban 1966), 4-8 (Gäumann 1959) klíčními póry.

Telia na svrchní straně listů, často vznikající na základě uredií (Gäumann 1959), 0,5-6 mm dlouhá (Urban 1966), někdy splývající do skupin (Majewski 1977). Dlouho krytá epidermis a tehdy hnědá, pokožka posléze štěrbinovitě puká (Urban 1966).

Teliospory různého tvaru, oválné až nepravidelné. Stěna světle hnědá, na temeni tmavší, hladká, tlustá 1,5-2 µm, na temeni ztlustlá na 2-3 µm (Majewski 1977). Stopka slabě nažloutle nahnědlá, 15-40(60) µm dlouhá (Urban 1966), vytrvalá (Gäumann 1959). Přítomny jsou žlutohnědé parafýzy (Majewski 1977). Teliospory velké: 20-40 × 14-22 µm (Gäumann 1959), 25-38 × 15-23 µm (Majewski 1977), (20)25-33(45) × 15-22(27,5) µm (Urban 1966), 20-33 × 17-22 µm (Săvulescu 1953).

Mezihostitelé: Urban (1966) zmiňuje pouze *Ranunculus bulbosus* L., Gäumann (1959) ale uvádí i další druhy rodu *Ranunculus*. Např. *Ranunculus repens* L., *R. illyricus* L., *R. montanus* Willd., *R. sceleratus* L.

Hlavní hostitelé: *Festuca ovina* L., *F. rubra* L., *F. heterophylla* Lam., *F. pratensis* Huds. a další druhy rodu *Festuca*.

Rozšíření po celém území ČR, zejména v nižších polohách do 500-600 m n. m. (Urban 1966).

Okolo tohoto druhu se objevuje hned několik nejasností. Aecia na *Ranunculus bulbosus* mohou patřit do životního cyklu jiných druhů rzí (*U. dactylidis, U. poae* či *P. magnusiana*). Dalším problémem je nerozlišitelnost uredií, ta mohou patřit k *Uromyces festucae*, nebo k druhu *Puccinia festucae* Plow. Jørstad (1951) i jiní autoři podobné nálezy uvádějí jako *Uredo festucae* DC.

Nejistota také panuje vůbec ohledně samostatnosti tohoto druhu. Zatímco Cummins (1971) uvádí *Uromyces festucae* pouze jako varietu *Uromyces dactylidis*, jiní autoři

se přiklání k samostatnosti druhu *U. festucae* (Urban 1966, Majewski 1977, Săvulescu 1953).

Velmi blízce příbuzným druhem, ne-li totožným, je *Uromyces ranunculi-festucae* Jaap. Autoři Săvulescu (1953), Gäumann (1959) nebo Urban (1966) tento druh sice uvádějí jako synonymum druhu *U. festucae,* ale vyjadřují v tomto ohledu určitou míru nejistoty.

1.1.5. *Uromyces poae* Rabenhorst, 1866

Spermogonia amfigenní, převážně epifylní v malých skupinkách, žlutavá, 115-160 μm v průměru (Majewski 1977).

Aecia převážně na spodní straně listů, též na řapících a lodyhách. Ve větších skupinkách, velmi těsně vedle sebe, do 5 mm v průměru. Pseudoperidie bělavá (podle Majewskeho 1977 spíše žlutavá), ohrnutá, roztřepená. Vnější stěna buněk 7-10 μm (5-7 μm Majewski 1977), vnitřní 3-4 μm tlustá, drobně bradavčitá (Gäumann 1959).

Aeciospory kulovité nebo oválné. Velké: 18-24 × 10-18 μm (Urban 1966, Gäumann 1959), 17-23 × 15-18 μm (Majewski 1977), 17-24 × 10-20 μm (Săvulescu 1953). Stěna aeciospor tenká (do 1 μm), bezbarvá, jemně bradavčitá. Nápadné jsou v menším počtu se vyskytující silně světlolomné ploché bradavky, které se snadno odlamují a zanechávají holé místo (Urban 1966).

Uredia se vyskytují na obou stranách listů, jsou eliptická, cca 1 mm dlouhá, roztroušená nebo splývající (příčně i podélně); barva žlutooranžová. Uredia jsou poměrně dlouho kryta pokožkou, na okraji ložiska někdy bývají přítomny tenkostěnné parafýzy.

Urediospory kulovité až eliptické, stěna bezbarvá nebo slabě nažloutle nahnědlá, 1,5-2,5 μm tlustá (Majewski 1977), pokrytá ostny v odstupu 2-3 μm (Majewski 1977, Urban 1966). Urban (1966) uvádí (5)6-7(9) klíčních pórů ve dvou rovinách, se zploštělými papilami. Săvulescu (1953) uvádí klíčních pórů 8-9. Velikost urediospor: (19)22-25(29) × (16)18-22(24) μm (Urban 1966), 18-25 × 15-21 μm (Majewski 1977), (12)17-22(27) × (10)13-17(22) μm (Gäumann 1959), 17-23 × 13-18 μm (Săvulescu 1953).

Telia převážně hypofylní, černá, čárkovitá, dlouhá nejčastěji do 1 mm, někdy v elipse kolem uredia (Urban 1966). Trvale krytá epidermis, rozčleněná hnědými parafýzami (Gäumann 1959).

Teliospory kyjovité nebo eliptické, stěna hladká, hnědá, na temeni tmavší. Stěna 1,5-2 μm tlustá, na temeni ztlustlá na 2-5 μm (Urban 1966). Rozměry teliospor: (20)24-33(36) × (12,5)15-23(25) μm (Urban 1966), 22-33 × 13-18 μm (Majewski 1977), (19)30-35(41) ×

(12)18-20(30) µm (Gäumann 1959), 18-33 × 14-20 µm (Săvulescu 1953). Stopka teliospor až 30 µm dlouhá, lámavá (Majewski 1977). Bezbarvá nebo stejné barvy jako výtrus (Urban 1966). V temeni stopky bývá polokulovitý, nahnědlý, bradavčitě zrnitý pupík asi 2,5-3(4) µm vysoký, vyčnívající směrem do lumen stopky (Urban 1966).

Mezihostitelé: *Ficaria verna* Huds., *Ranunculus auricomus* L., *R. bulbosus* L., *R. repens* L., *R. cassubicus* L., *R. nemorosus* DC., *R. acer* L. Poelt et Zvetko (1997) uvádějí jako mezihostitele pouze *Ficaria verna* Huds.

Aecia na *Ficaria verna* mohou patřit do životního cyklu *Uromyces rumicis*, nálezy na *Ranunculus repens* opět mohou být z cyklu jiného druhu rzi například *Uromyces dactylidis* nebo *Puccinia magnusiana.*

Hlavní hostitelé: *Poa annua* L., *Poa nemoralis* L., *Poa palustris* L., *Poa pratensis* L., *Poa remota* Forselles, *Poa trivialis* L., Brandenburger (1994) uvádí jako hostitele také *Poa bulbosa* L., Săvulescu ještě *Poa compressa* L.

Rozšíření na území ČR: nižší polohy po celém státu, 500 m.n.m. přesahuje jen zřídka. Známé jsou výskyty na Třeboňsku (Turečková 1986), v Podkrkonoší, Polabí a na Olomoucku (Urban 1966).

Samostatnost druhu *Uromyces poae* Rasbenh. je nejistá, Urban (1966) ho považuje za samostatný, ale například Cummins (1971) považuje tento druh pouze za součást *Uromyces dactylidis*, uvádí ho jako *U. dactylidis* var. *poae*. Fyziologicky se *U. poae* liší od *U. dactylidis* v tom, že nepřechází na *Dactylis glomerata* a opačně *U. dactylidis* je specifickou pro *Dactylis*. *U. dactylidis* zatím nebyla zjištěna na *Ficaria verna* a *Ranunculus auricomus* (Urban 1966). Dále Urban uvádí, že urediospory *U. poae* jsou menší a počet klíčních pórů má tendenci k číslu 6-7, proti tomu má *U. dactylidis* urediospory větší, opatřené větším počtem klíčních pórů (zpravidla 8-9). Odlišností je také pupík ve stopce teliospor, který u *U. dactylidis* většinou chybí.

Gäumann (1959) ve své práci uvádí mnoho speciálních forem druhu *U. poae*, podle kombinací hostitelů. Např. f. sp. *ficariae-nemoralis*, f. sp. *ficariae-pratensis*, f. sp. *repenti-trivialis* apod. Oproti tomu Urban (1966) se přiklání k existenci pouze dvou forem a to f. sp. *ficariae* a f. sp. *ranunculi.* Dokládá to faktem, že při přenosech teliosporami z *Poa trivialis* byl infikován buď *Ranunculus repens* nebo *Ficaria verna*, ale nikdy oba současně.

1.1.6. *Uromyces poae-alpinae* Rytz, 1911

Spermogonia nepopsána.

Aecia na obou stranách listů v malých kulatých nebo nepravidelných skupinkách (Gäumann 1959). Oproti tomu Urban (1966) uvádí aecia hypofylní, hluboce zanořená. Peridie není ohrnuta (Urban 1966). Buňky peridie na vnitřní straně zaoblené, vysoké 23-35 μm, široké 20-23 μm (Gäumann 1959), vnitřní stěna 3-6 μm, vnější 5-9 μm tlustá (Majewski 1977).

Aeciospory kulaté nebo podlouhlé, často polyedrické (Gäumann 1959). Stěna tenká, hyalinní, jemně ostnitá (Majewski 1977). Velikost: 18-21 × 15-18 μm (Gäumann 1959, Urban 1966), 17-24 × 15-20 μm (Majewski 1977, Cummins 1971).

Uredia amfigenní, žlutohnědá (Majewski 1977) či hnědá, dosti dlouho krytá pokožkou, bez parafýz (Urban 1966).

Urediospory kulovité, elipsoidní, hranaté (Gäumann 1959). Stěna slabě nažloutle nahnědlá nebo skoro bezbarvá, 1,5-2 μm tlustá, ostnitá. Ostny nepravidelně roztroušené tak, že vznikají lysiny (Urban 1966). Majewski (1977) uvádí ostny v odstupech 2-3 μm a 8-10(12) slabě viditelných klíčních pórů. Podle Gäumanna (1959) i Guyota (1939) mají spory pouze 2-3(4) nezřetelné klíční póry. Rozměry spor: 24-29 × 19-25 μm (Urban 1966), 23-27 × 19-23 μm (Majewski 1977), (20)23-27(30) × (17)19-23(24) μm (Cummins 1971), 23-34 × 14-21 μm (Gäumann 1959).

Telia amfigenní, vznikají často z uredií, (0,5)0,8-1,2 × (0,2)0,4-0,5 mm velká (Urban 1966). Tmavě hnědá až černá, krytá epidermis, vystlána tlustostěnými bezbarvými parafýzami (Cummins 1971).

Teliospory kulaté, hruškovité či protáhlé, často nepravidelné, velmi variabilní ve tvaru i velikosti (Gäumann 1959). Rozměry: 20-25 × 15-20 μm (Urban 1966), 17-25 × 14-18 μm (Gäumann 1959), (18)20-28(32) × (14)18-22(24) μm (Cummins 1971), 20-28 × 18-22 μm (Majewski 1977). Stěna hladká, tlustá 1,5-2(2,5) μm, na temeni není ztlustlá, nebo jen málo (Gäumann 1959), Majewski (1977) ale uvádí stěnu na temeni až 4 μm tlustou. Stěna stejnoměrně ztlustlá, kaštanově hnědá, u většiny výtrusů opatřena tupými hranami (Urban 1966). Stopka tenkostěnná, do 30 μm dlouhá, obvykle se odlamující poblíž spory (Majewski 1977), kolabující (Cummins 1971), podle Urbana (1966) vytrvávající.

Mezihostitel: *Ranunculus montanus* Willd. Aecia vyskytující se na tomto hostiteli ale

mohou patřit i k druhu *Uromyces festucae*.

Hlavní hostitel: *Poa alpina* L.

Rozšíření: Alpy (Švýcarsko, Rakousko, Itálie), Velká Fatra (Urban 1966), polská část Tater (Majewski 1977). Až do výšky 2200 m n. m. (Guyot 1939).

Podle Gäumanna (1959) se liší *U. poae-alpinae* od *U. poae* mnohem většími urediosporami a zabarvením parafýz telií (ty jsou u *U. poae* hnědé). Urban (1966) přidává ještě odlišnost v počtu klíčních pórů urediospor, také teliospory lze snadno odlišit od teliospor jiných druhů, a to díky jejich stejnoměrnému hnědému zabarvení a většinou neztloustlému temeni. Podle Gäumana (1959) patří *U. poae-alpinae* do okruhu druhu *U. dactylidis*, ale Urban (1966) o tom pochybuje (z důvodu charakteru teliospor a jejich stopek).

Cummins (1971) uvádí *Uromyces poae-alpinae* jako synonymum *Uromyces dactylidis* var. *poae-alpinae*, za odlišující znak od ostatních variet považuje bezbarvé teliální parafýzy.

1.2. Izolace DNA ze spor rzí

1.2.1. Úvod

Izolaci DNA předchází nejprve mechanické, chemické nebo kombinované rozdrcení buněk (spor). Extrakční pufr musí obsahovat detergenty rozrušující buněčné stěny a membrány, důležitá je i přítomnost činidel schopných odstranit dvojmocné kationty, které by mohly aktivovat nežádoucí nukleázy. Takovým činidlem je např. EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid). Mnohdy se přidávají i detergenty schopné přímo denaturovat nukleázy např. SDS (sodium-dodecyl-sulphate). K získání čisté DNA je potřeba uvolnit ji z nadmolekulárních struktur a těchto nečistot se poté i zbavit. K těmto účelům se používá např. fenol-chloroform, aceton, či CTAB (cetyl-trimetyl-ammonium-bromide). CTAB se užívá zejména pro oddělení od polysacharidů. Pro odstranění RNA se používá enzym RNáza (Atkins et Clark 2004).

Izolovat DNA je možné z materiálu čerstvého, suchého, zmrazeného a dokonce z materiálu herbářového (Kropp et al. 1997), až 15 let starého (Abbasi et al. 2005). Někteří autoři (Kolmer et al. 1995) nechávají před izolací spory vyklíčit. Použít lze aeciospory, urediospory a teliospory. Kubisiak et al. (2005) uvádějí i izolaci z bazidiospor.

K izolaci DNA ze spor rzí se nejčastěji používají různě modifikované metody s použitím CTAB případně SDS pufru, mnohdy různě kombinované například s fenol-chloroformovými kroky. Kromě těchto metod je možné využít i komerčně vyráběných izolačních kitů, např. Plant DNeasy mini kit (Qiagen Inc., Valencia, California), který uvádějí ve své práci např. Smith et al. (2004) a Ritz et al. (2005). DNA mnoha druhů řádu *Uredinales* byla úspěšně izolována pomocí UltraClean Plant DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, CA, USA), jak uvádí Aime (2006).

1.2.2. Metody podle jednotlivých autorů

- **CTAB metoda - Kropp et al. (1997)**

Z napadeného listu byly odděleny asi 3 mm velké kousky nesoucí ložiska rzi. Materiál byl nejprve prudce zmrazen kapalným dusíkem. Materiál byl poté rozdrcen pomocí skleněné tyčinky v mikrozkumavce. Po přidání 500 µl extrakčního pufru (0,7 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, 1% β-merkaptoetanol a 1% CTAB) následovala inkubace při 60°C po dobu 30 min. Dále byly ze směsi odstraněny nečistoty přidáním chloroform-isoamylalkoholu (24:1), promícháním a následnou centrifugací (11750 rpm., 5 min). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkumavky a DNA vysrážena izopropanolem. Centrifugací (11750 rpm., 5 min) byla

získána DNA peleta, ta byla promyta 80% etanolem, usušena a následně rozpuštěna v TE (Tris – EDTA) pufru. Skladování při –20°C.

Pufr o stejném složení použili také Hamelin et al. (2000), další postup se ale mírně odlišuje (například drcení spor pomocí křemeliny, nebo přesrážení DNA za přítomnosti acetátu amonného).

- **CTAB metoda - Villaréal et al. (2002)**

Základem je modifikovaná CTAB metoda s přidáním PVP (poly-vinyl-pyrrolidon). Do epruvetky bylo vloženo 15 mg urediospor, k jejich rozdrcení posloužílo sedm skleněných kuliček o průměru 3 mm. Do každé epruvetky bylo přidáno 100 µl extrakčního pufru (0,1 M Tris-HCl, 140 mM D-sorbitol, 30 mM N-lauroyl-sacrosin, 0,8% CTAB, 0,8 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,1% PVP). Drcení spor proběhlo v extrakčním pufru během třepání na vortexu (2 min 45 s). Dalším krokem bylo přidání 400 µl extrakčního pufru obsahujícího 5 µl proteinasy K (10 mg/ml) a následná inkubace 1,5 hod. při 65°C. Směs byla poté extrahována pomocí 500 µl chloroformu za stálého třepání po dobu 5 minut a následně centrifugována (20 min, 17000x g při 4°C). Supernatant byl přenesen do nové epruvetky, DNA vysrážena 500 µl vymraženého izopropanolu (inkubace 40 min při -20°C). Následovala další centrifugace za stejných podmínek jako předchozí. Vzniklá peleta byla promyta 150 µl 70% etanolu, usušena a rozpuštěna ve 40 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA). Pro odstranění RNA byl přidán 1 µl RNázy, doba inkubace byla 1 hod. při 37°C.

- **2x CTAB metoda - Gardes et Bruns (1993)**

DNA byla extrahována z čerstvého nebo suchého materiálu ve 300 µl 2x CTAB pufru (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB a 0,2% mercaptoetanol). Suspenze byla zmražena a následně zahřáta na 65°C, celé opakováno 3x. Následně byl materiál rozdrcen malou paličkou a inkubován při 65°C 30 min až 1 hod. Pro odstranění nečistot bylo přidáno 300 µl chloroformu, vše promícháno a zcentrifugováno 15 min při pokojové teplotě. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a DNA vysrážena ledovým isopropanolem. Po 10 minutové centrifugaci vznikla peleta DNA, ta byla následně promyta 70% etanolem a poté rozpuštěna v 40-60 µl 0,1x TE (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA).

V podstatě stejný postup i velmi podobný extrakční pufr použili Kubisiak et al. (2005). 2x CTAB pufr se liší množstvím mercaptoetanolu, přidáním PVP a proteinasy K. Spory byly rozdrceny v mikrozkumavce s 250 µl pufru a 0,5 g (0,8 mm) zirkonových kuliček, 12,5 mg křemeliny a několika keramickými kuličkami.

- **2x CTAB metoda - Driessen et al. (2004)**

Jedná se o postup odvozený od metody, která byla původně vytvořena pro extrakci rostlinné DNA (Stewart 1997). Kousky listů s ložisky byly rozdrceny pomocí motorizované plastikové paličky v 500 µl extrakčního pufru (100 mM Tris-HCL, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1,42 M NaCl, 2% PVP, 5 mM kyselina askorbová, 4 mM diethyldithiocarbamová kyselina) + 3 µl β-mercaptoetanolu přidáno těsně před inkubací. Inkubace 30-60 min při 65°C. Přečištění přidáním 500 µl chloroform/isoamylalkoholu (24:1), po stočení (1500 g 15 min) DNA vysrážena izopropanolem (270 µl) a po následné centrifugaci (10 000 g 5 min) vzniklá peleta rozpuštěna v 50 µl sterilní destilované vody.

- **Kombinace SDS a CTAB - Chen et al. (1993)**

20 mg urediospor drceno s trochou sterilního písku pomocí hmoždíře a paličky. Extrakční pufr 1 ml (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA), po promíchání přidáno ještě 0,06 ml 20% SDS. Směs míchána 1 hod. 20°C. Dále bylo přidáno 0,15 ml 5 M NaCl a 0,13 ml CTAB/NaCl směsi (10% CTAB v 0,7 M NaCl) a inkubováno při 65°C 20 min. Extrakce chloroform/isoamyl alkoholem (24:1), DNA vysrážena izopropanolem (0,6 objemu), inkubace 20 min 4°C. Po centrifugaci 10 min 10 000 rpm, vzniklá peleta 2x promyta 70% etanolem, usušena a rozpuštěna v 0,5 ml TE pufru (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA). K odstranění RNA přidána RNáza (20 µg/ml) a ponecháno přes noc při 4°C. Poté DNA opět vysrážena isopropanolem a promyta 70% etanolem, usušena a rozpuštěna ve 40 µl TE.

- **Kombinace SDS a CTAB - Kolmer et al. (1995)**

Kolmer et al. (1995) k izolaci použili naklíčené urediospory. Spory byly drceny v tekutém dusíku stejnou metodou jakou uvádějí Chen et al. (1993). Rozdrcený materiál byl přenesen do 6 ml extrakčního pufru (150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM Tris) a přidáno 30 µg proteinasy K a 0,1 objemu 20% SDS. Inkubace 30 min při 65°C. Po centrifugaci (10 min) byl supernatant přenesen do nových zkumavek a přidáno 0,1 objemu CTAB pufru (10% CTAB, 500 mM Tris, 100 mM EDTA). Inkubace 65°C 10 min. 2x extrakce chloroform/isoamyl alkoholem (24:1), následovalo přidání 2,5 objemu 95% etanolu a inkubace přes noc -20°C. Po centrifugaci získaná peleta vysušena a poté rozpuštěna v 1 ml H_2O. Přidání RNázy 10 mg/µl a inkubace 1 hod při 37°C. Po inkubaci vzorky opět extrahovány fenol-chloroform-isoamylalkoholem (25:24:1), následovaným chloroform-isoamylalkoholem (24:1). DNA znovu vysrážena 95% etanolem (2,5 objemu) a acetátem amonným (0,5 objemu), inkubace znovu přes noc -20°C. Získaná peleta byla promyta 70% etanolem a usušena. Rozpuštěna v

500 µl H2O.

Autoři uvádějí, že ze 150 mg čerstvých urediospor je možné získat 500-1200 µg DNA.

V pozdější práci Kolmer (2001) metodu zjednodušil, po inkubaci v CTAB pufru vypustil kroky až k přidání RNázy.

- **Kombinace SDS a CTAB - Pei et al. (1997)**

Autoři uvádí, že se jedná o metodu odvozenou od té, kterou použili Chen et al. (1993), liší se ale způsobem rozbíjení spor, složením extrakčního pufru i dalšími kroky.

Rozbíjení spor: cca 10 mg spor vloženo do mikrozkumavky, přidány dvě 3 mm velké a 20-30 kusů 2 mm velkých skleněných kuliček. Do každé mikrozkumavky přidáno 200 µl SDS extrakčního pufru (0,5 M EDTA, 1 M Tris-HCl, 10% SDS, 2-merkaptoetanol a sterilní destilovaná voda v poměru 1:1:3:0,2:3) Následuje míchání 10 min na vortexu a poté inkubace 40 min při 65°C. Po inkubaci přidáno 400 µl CTAB pufru (5% CTAB v 0,35 M NaCl) a mícháno 20 min při pokojové teplotě. Směs poté extrahována přibližně 800 µl chloroform-isoamylalkoholu (24:1) za stálého míchání po dobu 30 min. Po centrifugaci (20 min, 13500rpm.) byl supernatant přenesen do nových mikrozkumavek a přidáno 0,1 dílu octanu sodného a 2 díly etanolu. Zamražení na 10 min při –15°C. Další centrifugací (20 min, 13500rpm.) byla získána peleta, ta byla následně usušena a pak rozpuštěna ve 400 µl sterilní destilované vody. Přidáním 1 µl RNázy a inkubací 20 min. při pokojové teplotě odstraněna RNA. Pak opět vysrážení etanolem, usušení a rozpuštění ve sterilní destilované vodě. Jako možné modifikace uvádějí autoři změny v koncentracích použitého SDS, vypuštění CTAB pufru či nepoužití RNázy a následného přečišťování.

- **CTAB s přidáním SDS - Anikster et al. (2004)**

Anikster et al. (2004), Szabo (2006), Barnes et Szabo (2007) použili jinou modifikaci CTAB metody. Jedná se o extrakci DNA z ložisek urediospor s možností použít celé ložisko včetně příměsi tkání hostitele. K rozmělnění materiálu byly do mikrozkumavek vloženy 1mm velké skleněné kuličky a křemelina (25 mg), poté přidán extrakční pufr 600 µl : 0,165 M Tris-HCl, 66 mM EDTA, 1,54 M NaCl, 1,1% CTAB a proteinasa K (50 µg/ml). Promícháno a poté do každé epruvetky přidáno ještě 66 µl 20% SDS. Po promíchání inkubováno 1,5 hod. při 65°C, během inkubace pravidelně každých 15-20 min promícháváno. Po inkubaci vzorky extrahovány fenol-chloroform-isoamylalkoholem (25:24:1), následovaným chloroform-isoamylalkoholem (24:1). Po vysrážení izopropanolem, DNA peleta promyta 70% etanolem a rozpuštěna ve 100 µl 0,1 TE pufru. RNA odstraněna přidáním RNázy A (40-100 µg/ml) a inkubací 1 hodinu při 37°C. Barnes et Szabo (2007) ještě DNA znovu přesráželi přidáním

0,1 dílu 3 M NaOAc a 2 dílů 95% etanolu s následnou inkubací 1 hod při -20°C. Peletu poté opět promyli 70% etanolem, usušili a rozpustili v TE pufru.

- **SDS metoda - Virtudazo et al. (2001)**

Velmi jednoduchou metodu izolace s použitím SDS pufru využili Virtudazo et al. (2001), Liang et al. (2006). Nejprve bylo rozdrceno 100-200 urediospor mezi dvěma sterilními sklíčky a poté následovala inkubace ve 20 µl extrakčního pufru (10 mM Tris-HCL, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCL, 0,01% Proteinase K, 0,01% SDS). Inkubace 60 min při 37°C následně 10 min při 95°C. Takto připravenou DNA rovnou použili pro PCR.

- **Izolační metoda - Zambino et Szabo (1993)**

Cca 0,02 mg spor (uredio či teliospor) rozdrceno mezi dvěma sklíčky. Sklíčka byla předtím ošetřena dimetyl-dichloro-silanem a omyta v 0,01 M HCl. Rozmělněné spory byly přeneseny do mikrozkumavek s 50 µl extrakčního pufru (0,089 M Tris base, 0,045 M kyselina boritá, 0,05 µM EDTA, 1% β-merkaptoetanol). Inkubováno 15 min při 75°C. Resuspendováno třepáním na vortexu a centrifugováno. Supernatant naředěn 1:1000 přidáním extrakčního pufru bez β-merkaptoetanolu.

V podstatě totožnou metodu použili při svých pokusech také Moricca et Ragazzi (1998) a Abbasi et al. (2005). Postup izolace podle autorů Abbasi et al. (2005) se odlišuje zejména způsobem drcení spor a to pomocí malé paličky, na elektrickém drtiči. Také Weber et al. (2003) použili stejný postup, ale ještě vložili krok s přidáním 1 µl Tween-20 (1%) a inkubaci 15 min při teplotě varu.

1.2.3. Shrnutí

Metody jednotlivých autorů se tedy nejčastěji liší co do použitého materiálu, způsobu drcení spor, složení extrakčního pufru, inkubace, následného přečišťování a dalších úprav.

Pro izolaci DNA je vhodné vypreparovat z ložisek pouze spory pro omezení nebezpečí kontaminace například jinými houbami při směsných infekcích (Maier et al. 2007). Lze však použít i celá ložiska, dokonce i části listu s ložiskem (Kropp et al. 1997, Barnes et Szabo 2007, Driessen et al. 2004).

Rozmělnit materiál a rozbít tak spory lze několika způsoby. Drcením mezi dvěma speciálně ošetřenými sklíčky, rozbíjením pomocí elektrického drtiče, vortexováním společně se skleněnými (keramickými nebo zirkonovými) kuličkami různých velikostí, obvykle 1-3 mm velkými. Alternativou drcení kuličkami je použití říčního písku nebo křemeliny nebo také

rozbíjení spor za použití hmoždíře a paličky.

Složení extrakčních pufrů je také u různých autorů značně variabilní. Obvykle se jedná o modifikované CTAB, případně SDS pufry.

Získanou DNA někteří dále extrahují chloroform-isoamylalkoholem, sráží izopropanolem, promývají etanolem, odstraňují RNA přidáním RNázy atd., jiní tyto kroky víceméně vypouštějí. Liší se to podle toho, k jakému účelu má získaná DNA sloužit, jak dlouho ji potřebujeme uchovat, apod.

1.3. Molekulární metody používané při studiu rzí (*Uredinales*)

Metody molekulární taxonomie klasifikují houby na základě jejich genomu, případně jeho translačních produktů (analýza izozymů). Protože umožňují nalézt velké množství polymorfních znaků, stávají se stále důležitějšími prostředky pro získávání informací o systematických a fylogenetických vztazích mezi houbami (Zambino et Szabo 1993). Výhodou je, že tyto metody studují skutečný polymorfismus a ne polymorfismus získaný prostředím. Navíc je možné použít i selekčně neutrální oblasti DNA.

Molekulární markery umožňují odhalovat a definovat fylogenetické druhy, mnohdy i druhy kryptické. Na základě molekulárních dat můžeme charakterizovat nejen druhy, ale i ostatní taxonomické jednotky, dokonce i jednotlivé jedince. Pro studium systematiky a populační biologie hub jsou takové informace velkým přínosem.

1.3.1. PCR

PCR (polymerase chain reaction) je pro svou nenáročnost snad nejrozšířenější technikou. Tato metoda slouží k amplifikaci vybraných sekvencí DNA. Díky PCR může být rychle a vysoce selektivně namnožen konkrétní úsek DNA. Výhodou je, že metoda funguje i s velmi malým vstupním množstvím DNA (už od 0,1-10 ng na jednu reakci), zatímco produktu reakce získáme poměrně velké množství. Metoda je založena na využití speciální termostabilní DNA polymerázy.

PCR směs musí obsahovat: DNA kterou chceme amplifikovat; DNA polymerázu; Mg^{2+}, což je katalyzátor polymerázy; volné nukleotidy (dATP, dGTP, dCTP a dTTP) na tvorbu nových řetězců a primery. Primery jsou krátké oligonukleotidy, které umožňují iniciaci polymerace tím, že nasedají na komplementární sekvence templátu. Primery přisedají k opačným řetězcům DNA tak, že požadovaný úsek leží mezi nimi, výslednou DNA tedy ohraničují.

Do reakce vstupuje dvouřetězcová DNA, a proto prvním krokem každého cyklu musí být nejprve oddělení obou řetězců od sebe krátkým zvýšením teploty, obvykle nad 90°C. Poté následuje ochlazení směsi na 44-60°C, to bývá optimální teplota pro nasedání většiny primerů na komplementární místa. Primery jsou ve směsi ve velkém nadbytku, proto nedochází znovu ke spojení původních řetězců DNA. Po mírném zvýšení teploty cca na 70°C probíhá syntéza nových řetězců, DNA polymeráza je syntetizuje z přítomných volných nukleotidů. V dalších cyklech slouží jako templáty i nově syntetizované řetězce DNA. Z toho plyne, že v každém cyklu se množství řetězců zdvojnásobí. Cyklus se obvykle opakuje 30-40x.

1.3.2. Analýza vybraných úseků DNA

rDNA

Pro účely molekulární taxonomie rzí je nejčastěji používána jaderná rDNA. Vyskytuje se v genomu repetitivně, několikrát za sebou. Celková délka repetice bývá v rozmezí 8-24 kb. Je snadno dosažitelná pomocí univerzálních primerů (White et al. 1990).

rDNA je složena z oblastí kódujících a nekódujících. Kódující oblasti jsou tři: 5,8S (cca 160 bp), 18S (SSU=small subunit, cca 1800 bp) a 28S (LSU=large subunit, cca 3400 bp). Vyznačují se výrazným konzervativismem, který je nutností pro zachování nezměněné podoby ribozomálních podjednotek. Mezi nimi jsou vmezeřené oblasti ITS 1 a ITS 2 (internal transcribed spacer). Úsek ITS1, 5,8S a ITS2 bývají studovány dohromady a označovány ITS. Oblasti zvané ETS (external transcribed spacer) ohraničují kódující oblasti, přiléhají tedy zepředu k 18S a zezadu k 28S rDNA. Všechny výše zmíněné úseky rDNA jsou transkribovány do pre-rRNA, ITS a EGS jsou poté odstraněny při sestřihu. Oblasti NTS (nontranscribed spacer) a IGS (intergenetic spacer) nejsou transkribovány, v podstatě jen oddělují jednotlivé repetice rDNA.

Kódující oblasti jsou velmi konzervativní, a proto bývají použitelné spíše při studiu rozdílů na vyšší taxonomické úrovni. Nekódující oblasti mají větší variabilitu, a jsou proto použitelné pro rozlišování blízce příbuzných druhů, druhových variant či populací (White et al. 1990).

Amplifikace ITS a LSU oblastí

K amplifikaci ITS se používají univerzální primery ITS1-ITS5 (White et al. 1990) a některé další, specifické vždy pro určitou skupinu hub. Takovými jsou například ITS4-u a ITS5-u, specifické primery pro rod Uromyces (Pfunder et al. 2001). Přehled primerů používaných pro amplifikaci ITS a LSU oblastí rzí viz. tab. 1. Optimální teplota pro nasedání primerů bývá okolo 50°C. Primery nasedají ve specifických místech v oblastech konzervativních úseků. Např. ITS1 a ITS5 v oblasti 18S, ITS4 a Rust1 v oblasti 28S a Rust2 i Rust3 v oblasti 5,8S.

Nejčastěji používané kombinace primerů pro amplifikaci ITS oblastí rzí jsou: ITS4 + ITS5 (Zambino et Szabo 1993, Kropp et al. 1997, Weber et al. 2003, Abbasi et al. 2005), ITS1-F + ITS4-b (Smith et al. 2004, Anikster et al. 2004), ITS4 + ITS1-F (Virtudazo et al. 2001, Liang et al. 2006), ITS5 + ITS4-b (Pfunder et al. 2001).

Nejvíce používané primery k amplifikaci D1/D2 domény LSU rzí jsou NL1 + NL4, např. Liang et al. (2006), Virtudazo et al. (2001), Chung et al. (2004) a LR0R + LR6, např. Maier

et al. (2003).

Někdy se používají kombinace primerů, které amplifikují ITS a zároveň část 5' konce LSU. Jsou to např. Rust1 + ITS1-F (Kropp et al. 1997, Anikster et al. 2004, Szabo 2006), Rust1 + ITS5 (Littlefield et al. 2005).

PRIMER	SEKVENCE 5' - 3'	NAVRHL
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al. 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes et Bruns 1993
ITS4-b	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes et Bruns 1993
Rust1	GCTTACTGCCTTCCTCAATC	Kropp et al. 1995
Rust2	TTTCACTGTGTTCTTCATC	Kropp et al. 1997
Rust3	GAATCTTTGAACGCACCTTG	Kropp et al. 1997
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	O'Donnell 1993
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	O'Donnell 1993
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	Moncalvo et al. 1995
LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC	Vilgalys a Hester 1990

Tabulka 1: primery používané při studiu rzí

Celkový objem reakční směsi bývá v rozmezí 10 µl (Driessen et al. 2004) – 100 µl (Kropp et al. 1997, Weber et al. 2003).

Obvykle používaná koncentrace primerů (každého) je 0,2 – 0,5 µM (Pfunder et al. 2001, Chung et al. 2004, Driessen et al. 2004). Rozsah používaných koncentrací je však mnohem větší: 25 pM (Anikster et al. 2004) - 2 µM (Chatasiri et al. 2006).

Koncentrace každého z dNTP bývá v rozmezí: 200 nM (Zambino et Szabo 1993) – 2,5 mM (Chung et al. 2004), obvykle ale 0,2 mM (Kropp 1997, Driessen 2004).

Množství polymerázy nejčastěji 2,5 U na 100 µl směsi, jen Driessen et al. (2004) použili v přepočtu 5 U na 100 µl směsi.

Množství použité DNA většina autorů neuvádí přesně, uvádějí pouze množství použitého extraktu získaného izolací (bez informace o koncentraci DNA). Výjimkou jsou Nakamura et al. (1998) uvádějící 10-20 ng (cca 2 µl extraktu) na 100 µl směsi, Moricca et Ragazzi (1998) 100 ng DNA ve 100 µl reakční směsi, Zambino et Szabo (1993) a Anikster et al. (2004) 25 µl DNA (2 ng/µl) + 25 µl PCR směsi.

Modifikace teplotního cyklu používaného při amplifikaci ITS a LSU oblastí rzí. Liší se zejména teplotami a časem inkubace v jednotlivých fází cyklu, vždy ale v níže uvedeném rozsahu. Počáteční denaturace 3-5 min 94-95°C. V dalších cyklech denaturace 30-60 s při 93-95°C, annealing 45-75 s při 44-60°C , polymerace 45 s - 3 min 72°C, celý cyklus zopakován 35-40x. Závěrečná inkubace 4-10 min při 70-72°C, uchování při 4°C. Modifikace cyklů dle

prací: Zambino et Szabo 1993, Kropp et al. 1997, Littlefield et al. 2005, Smith et al. 2004, Weber et al. 2003, Virtudazo et al. 2001, Anikster et al. 2004, Edwards et al. 1999.

Použití

LSU oblast může být u rzí použita k odlišení rodů a druhů. Maier et al. (2003) použili LSU rDNA pro studium vztahů mezi druhy z různých skupin řádu *Uredinales* a později (Maier et al. 2007) pro rozsáhlejší studii rodů *Uromyces* a *Puccinia*. Ritz et al. (2005) použili LSU pro rozlišení a studium evoluce dvou druhů rodu *Phragmidium* na planých růžích.

Na úrovni rodů je u rzí možné použít také oblast SSU. Wingfield et al. (2004) studovali fylogenetické vztahy uvnitř řádu *Uredinales*. Aime (2006) řeší členění řádu *Uredinales* založené na analýze LSU a SSU oblastí.

Při studiu blízce příbuzných druhů či odlišování vnitrodruhových taxonomických jednotek je vhodné použít sekvence ITS (Zambino et Szabo 1993) případně IGS oblastí (Moricca et Ragazzi 1998).

Jako příklad použití ITS pro studium blízce příbuzných druhů je možné uvést práci zabývající se komplexem druhů okolo *Uromyces pisi* na *Euphorbia cyparissias* (Pfunder 2001). Dalším příkladem může být fylogenetická studie dvou blízce příbuzných druhů - *Puccinia distincta* a *P. lagenophorae* (Weber et al. 2003), ale v ITS těchto druhů bylo nalezeno jen velmi málo mezidruhových odlišností.

Že může být na základě ITS studována i vnitrodruhová variabilita, je dokázáno v práci Abbasi et al. (2005) při studiu vnitrodruhové variability druhu *Puccinia graminis*. Také Szabo (2006) použil ITS pro studium komplexu druhů *Puccinia andropogonis* a *P. coronata* a také jejich vnitrodruhové variability.

Poměrně často bývají studovány oblasti ITS a zároveň i LSU (Virtudazo et al. 2001, Chung et al. 2004, Anikster et al. 2004), nebo je studium ITS oblastí kombinováno s metodou RAPD (Edwards et al. 1999).

Kromě jaderné rDNA jsou při studiu taxonomie rzí používány i další geny, například gen pro β-tubulin a gen pro translační elongační faktor 1-α (TEF1α). Takových prací ale bylo dosud publikováno relativně málo.

Van Der Merwe et al. (2007) použili ve své studii geny pro β-tubulin a TEF1α. Jednalo se o studii vyšších fylogenetických vztahů mezi druhy rodů *Puccinia* a *Uromyces*.

1.3.3. RFLP

Ke srovnání dvou genomů lze použít metodu porovnávání DNA fragmentů získaných restrikcí endonukleázami, čili metoda RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Postup využívá restrikční endonukleázy, které štěpí DNA ve specifických místech. Endonukleázy rozpoznávají specifická, asi 4-8 nukleotidů dlouhá místa. U takových je velká pravděpodobnost, že budou v genomu opakovaně. Po štěpení vznikne sada specifických fragmentů. Platí vztah: čím kratší místo rozpoznání, tím častější štěpení, tedy více fragmentů.

RFLP je metoda, při níž je studován polymorfismus délky restrikčních fragmentů. Jednou z nevýhod metody je potřeba velkého množství čisté DNA, proto je v současnosti tato metoda na ústupu.

Porovnávat lze celý genom (klasická RFLP), nebo jen jeho části (PCR-RFLP).

Klasickou RFLP analýzu zkoušeli využít v kombinaci s RAPD a izozymovou analýzou Kinloch et al. (1998) pro studium populační struktury druhu *Cronartium ribicola.* Použité metody ale odhalili jen velmi málo polymorfních lokusů.

PCR-RFLP

Podstatou metody je nejprve PCR amplifikace konkrétního úseku DNA. Poté následuje restrikční štěpení. Většinou se studují relativně krátké úseky, ve kterých nemusí být pro většinu enzymů vhodné restrikční místo. Jsou v podstatě dvě možnosti jak najít vhodné restrikční enzymy. Buď vyzkoušet velké množství enzymů, nebo vhodné enzymy vybrat na základě sekvencí. K tomuto účelu je možné použít speciální programy pro vyhledávání restrikčních míst (pDRAW32, NEBCUTTER, apod.). Pokud nemáme k dispozici sekvence příslušného druhu, je možné vhodné enzymy vytipovat i na základě sekvencí druhů příbuzných (Driessen et al. 2004).

Složení reakční směsi a teplota inkubace je závislá na konkrétním enzymu. Obvyklá teplota inkubace pro většinu enzymů je 37°C. Doba inkubace bývá také zvolena podle použitého enzymu. Restrikční enzym se nechává působit minimálně 4 hod., většinou ale inkubace probíhá přes noc.

Pro ilustraci uvádím složení směši použité v práci Driessen et al. (2004). Použili 20 μl směsi složené ze 3 μl nečištěného produktu PCR, 2 μl bovine serum albumine a 5-10 units restrikčního enzymu v příslušném pufru dle pokynů výrobce.

U rzí se pro PCR-RFLP většinou používají nekódující oblasti jaderné rDNA. Moricca et Ragazzi (1998) použili PCR-RFLP analýzu IGS oblastí k odlišení rzí *Cronartium flaccidum* a *Peridermium pini.* Štěpení provedli 10 různými restrikčními enzymy, případně jejich kombinacemi.

PCR-RFLP metodu použili při studiu diverzity druhu *Puccinia boroniae* také Driessen et al. (2004). Amplifikovaný ITS fragment štěpili za použití sedmi endonukleáz vybraných na základě restrikčních map publikovaných sekvencí různých druhů rodu *Puccinia*. Pouze na produktech dvou restrikčních enzymů se projevila variabilita uvnitř ITS oblastí.

Nakamura et al. (1998) zkoušeli použití této metody k odlišení druhů rodu *Melampsora* na vrbách v Japonsku na základě analýzy ITS oblastí 4 restrikčními enzymy. Některé druhy RFLP nerozlišila a jeden druh měl více RFLP typů.

1.3.4. RAPD

Druhou možností srovnání genomů je metoda náhodně zmnožených fragmentů DNA, neboli RAPD (random amplified polymorphic DNA). Tuto metodu vytvořili Williams et al. (1990).

Metoda založená na PCR využívá jeden či více primerů, přibližně 10 bazí dlouhých (Chen et al. 1993), které mají nízkou teplotu nasedání. Předpokládá se, že vhodná místa pro nasednutí jsou v genomu náhodně rozmístěna. K amplifikaci dojde tehdy, ohraničují-li primery úsek 200-2000 bp dlouhý. Protože se různé DNA liší polohou sekvencí vhodných pro nasednutí primeru, vznikne po amplifikaci soubor různě dlouhých řetězců, charakteristický pro danou DNA. Zmnožené úseky DNA jsou po rozdělení na elektroforéze viditelné jako proužky. Soubor těchto proužků se nazývá fingerprint.

Nevýhodou je poměrně velká citlivost metody na reakční podmínky (koncentrace Mg^{2+}, použité chemikálie, způsob izolace a kvalita DNA, ale i použitý thermocykler). Vysoká citlivost na reakční podmínky se odvíjí zejména od nízké teploty annealingu, která je i příčinou nízké reprodukovatelnosti této metody (Pei et al. 1997). Zachováním standardních podmínek pro všechny vzorky lze tento problém částečně vyřešit.

Metoda si vyžaduje optimalizaci vždy pro každou skupinu organizmů, zejména nalezení optimální koncentrace DNA, koncentrace Mg^{2+}, výběr vhodných primerů a jejich množství.

Další problém mohou být nepravé homologie (dva nehomologní proužky mají velmi podobnou rychlost migrace). Zejména použití na vyšší taxonomické úrovni zvyšuje riziko nepravých homologií.

Z důvodu nízké reprodukovatelnosti je tato metoda při taxonomických studiích na ústupu, stále se ale často používá pro účely identifikace na úrovni druhové i vnitrodruhové. RAPD je stále velmi rozšířenou metodou zejména pro svou finanční a technickou nenáročnost.

Použití RAPD u rzí je možné i na nejnižší taxonomické úrovni, což je odlišování populací i jedinců.

Na základě RAPD je možné rozlišovat druhy i různé variety jednotlivých druhů. Pei et al. (1997) použili RAPD k odlišení dvou forem druhu *Melampsora epitea* na *Salix viminalis*. Edwards et al. (1999) na základě RAPD rozdělili izoláty druhu *Puccinia menthae* do dvou skupin. Otestovali 113 primerů, ale pouze 6 přineslo reprodukovatelné výsledky. Každý amplifikoval 9-18 silných fragmentů o velikosti 100-3000 bp, 70% polymorfních.

RAPD slouží také k rozlišování jedinců například u druhu *Hemileia vastatrix* (Gouveia et al. 2005), používá se i pro populační studie (Hamelin et al. 2000).

Ojedinělé nejsou ani studie zabývající se vztahem míry virulence jednotlivých izolátů s RAPD polymorfismem (Kolmer et al. 1995, Chen et al. 1993).

Metoda je schopna pracovat s DNA z jednoho jarního ložiska i s příměsí cizorodé DNA (Edwards et al. 1999, Villaréal et al. 2002).

Reakční směs bývá obvykle o celkovém objemu 25 µl. Obvykle používaná koncentrace primerů 0,1 (Edwards et al. 1999) - 0,5 µM (Pei et al. 1997). Koncentrace každého z dNTP bývá v rozmezí 0,2 µM (Hamelin et al. 2000) – 0,1 mM (Araya et al. 2004). Množství polymerázy nejčastěji 0,75 (Pei et al. 1997) – 1,25 U na 25 µl směsi (Kolmer et al. 1995). Množství použité DNA bývá cca 40 – 50 ng na 25 µl směsi (Edwards et al. 1999).

Teplotní cyklus pro RAPD analýzu u rzí. Počáteční denaturace 94°C 2-8 min. V dalších cyklech denaturace 94°C 10 s - 1 min, annealing 35-40°C 30 s - 2 min, polymerace 72°C 1-2,5 min, celý cyklus zopakován 35 – 45x. Na závěr inkubace 72°C 5 – 10 min. Hodnoty převzaty z prací: Kolmer et al. 1995, Pei et al. 1997, Edwards et al. 1999 a Hamelin et al. 2000.

Velmi odlišný cyklus použili ve své práci Araya et al. (2004): denaturace při 91°C 1 s (v prvních dvou cyklech 60 s), annealing 42°C 7 s, elongace 72°C 70 s.

Vizualizace výsledku nejčastěji na 1,2 – 2% agarózovém gelu v TBE nebo TAE pufru.

1.3.5. AFLP (amplified fragment length polymorphism)

V současnosti často používaná metoda zavedená v roce 1995 (Vos et al. 1995). Tato metoda je založena na selektivní amplifikaci restrikčních fragmentů získaných štěpením pomocí dvou restrikčních enzymů, obvykle Eco RI a Mse I. Metoda podává informace o polymorfismu studovaných organismů nejčastěji na druhové a nižší úrovni. AFLP je vhodná i ke studiu populací s malou genetickou diversitou, protože produkuje velké množství reprodukovatelných markerů (Vos et al. 1995).

Technika zahrnuje tyto tři základní kroky: štěpení DNA restrikčními enzymy a ligace adaptorů, preselektivní amplifikace restrikčních fragmentů a amplifikace selektivní. Při

amplifikaci preselektivní i selektivní dochází k redukci počtu získaných fragmentů na optimální počet, který je možné vyhodnocovat.

Dnes jsou AFLP markery úspěšně používány v mykologii a fytopatologii pro odlišování různých druhů jednoho rodu (Keiper et al. 2003) ale i jednotlivých izolátů (Mebrate et al. 2006).

U rzí je tato metoda využívána zejména při populačních studiích. Hovmoller et al. (2002) na základě AFLP prokázali existenci jediné klonální populace *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* v několika státech západní Evropy. Při studiu genetické variability populací druhu *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* tuto metodu využili Villaréal et al. (2002).

1.4. Další techniky používané u hub pro rozlišování druhů

V této kapitole jsou zpracovány dvě metody multilokusového PCR – fingerprintingu, které se u rzí dosud téměř nepoužívají. Podle studií na jiných skupinách hub ale mají potenciál i k použití u rzí. Svou podstatou se podobají analýze RAPD. Výhodou obou těchto metod je stejně jako u RAPD jejich relativní nenáročnost, rychlost i cena. Oproti klasické metodě RAPD mají ale ještě další výhodu. Tou je vyšší teplota annealingu používaných primerů, která umožňuje jejich více specifické nasednutí na templát. Získané fingerprinty proto bývají lépe reprodukovatelné (Grűnig et al. 2001). Také tyto metody jsou citlivé na dodržení reakčních podmínek, ale ne v takové míře jak je tomu u RAPD.

1.4.1. rep-PCR (repetitive-elements-based PCR)

Pod metody rep-PCR se mimo jiné řadí metody PCR fingerprintingu s primery M13 a ERIC.

Primery M13 byly odvozeny od fága M13. Původně byl pro fingerprinting použit celý značený fág M13 (Vassart et al. 1987). Ryskov et al. (1988) dokázali použitelnost tohoto fága pro získání hypervariabilních polymorfních pattern v různých taxonomických skupinách včetně zvířat, rostlin a mikroorganismů. Později byly z celého fága vybrány dvě sekvence vhodné k fingerprintingu, M13 (5'-TTATGTAAAACGACGGCCAGT-3') a M13 core (5'-GAGGGTGGCGGT TCT-3').

Primery M13 bývají mnohdy používané také při ISSR, i amplifikace probíhá při shodných reakčních podmínkách (Zhou et al. 2001, Kerrigan et al. 2003).

ERIC primery byly vytvořeny komplementárně ke konservativním repetitivním oblastem původně popsaných z prokaryot; k sekvencím ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus).

Tuto metodu zavedli Versalovic et al (1991), kteří dokázali použitelnost ERIC sekvencí jako primerů pro PCR u bakterií. Použili primery ERIC1R a ERIC2 a následující reakční cyklus: 95°C 7 min a 30 cyklů 90°C 30 s + 52°C 60 s + 65°C for 8 min, závěrečná inkubace při 65°C 16 min.

Přesto, že primery byly navrženy podle repetitivních sekvencí prokaryot, vyskytují se tyto sekvence i v genomu eukaryot, včetně hub (Edel et al. 1995, Arora et al. 1996).

ERIC-PCR se u hub nejčastěji používá pro studium vnitrodruhové variability (Edel et al. 1995). Arora et al. (1996) použili ERIC pro odlišení izolátů druhu *Verticillium chlamydosporium*. Morton et al. (2003) odlišili na základě ERIC fingerprintu hostitelsky specifické varianty druhu *Pochonia chlamydosporia.*

1.4.2. ISSR

ISSR (Inter-simple sequence repeat) je další z metod, které je možné použít pro rozlišování druhů, včetně druhů hub (Grünig et al. 2001). Někdy označovaná také jako MP-PCR (microsatellite primed-PCR) (Weising et al. 1995).

Je to metoda využívající mikrosatelitní (SSR) sekvence v DNA fingerprintingu. SSR oblasti tvoří 1-5 bazové sekvence několikrát opakované za sebou, tyto repetice jsou rozmístěny po celém genomu a vyskytují se v něm relativně často.

ISSR metoda využívá PCR amplifikaci úseků DNA, které leží mezi jednotlivými mikrosatelitními oblastmi. K jejich amplifikaci slouží ISSR primery, ty jsou navrženy komplementárně k SSR oblastem. Primery jsou obvykle 16-18 bazí dlouhé, složené z repetitivních sekvencí a případně nekolika dalších bazí, které umožní ukotvení primeru na 3' nebo 5' konci SSR (Zietkiewicz et al. 1994). Varianta s použitím ukotvených primerů se nazývá anchored-ISSR. Tyto primery nasedají na konkrétním místě repetice a u výsledných fragmentů se nevyskytuje polymorfismus v jejich délce.

Primery se používají jak samostatně, tak i v kombinaci. Teplota annealingu primerů je závislá na poměru GC k AT a také zda se jedná o repetici di, tri, či tetranukleotidů. Pro primery s 50% a více GC bývá vhodná teplota mírně nad 50°C, pro ostatní teplota o něco nižší (Weising et al. 1995). K namnožení fragmentů dojde, pokud primery ohraničí úsek 150-2500 bp dlouhý (Bornet et Branchard 2001)..

ISSR je v podstatě kombinací RAPD analýzy a mikrosatelitů (Meyer et al. 1993). Od mikrosatelitů přejímá vyšší teplotu annealingu vedoucí k lepší reprodukovatelnosti výsledků. Stejně jako u RAPD je výhodou, že nemusíme znát sekvenci studovaných organismů. Avšak také ISSR metoda je poměrně citlivá k reakčním podmínkám (Weising et al. 1995).

Bornet et Branchard (2001) ve své studii testovali vliv změny různých parametrů reakce na výsledky ISSR. Zjistili, že změna reakčních podmínek mnohdy nezpůsobí výraznou změnu výsledku, největší vliv má zvolená teplota nasedání primerů.

Výhodou metody je, že je schopna produkovat dostatečné množství polymorfních lokusů, které jsou reprodukovatelné (Zietkiewicz et al. 1994). Metoda je schopna pracovat s širokým rozmezím koncentrace vstupní DNA a to 5-150 ng na reakci (Bornet et Branchard 2001).

Výsledek bývá vizualizován na 1,5-2,5% agarózovém gelu v TBE, nebo na gelu polyakrylamidovém.

U hub je možné ISSR použít ke studiu genetické variability na úrovni mezidruhové i vnitrodruhové (Zhou et al. 1999, Tuthill 2004, Wang et al. 2005). S úspěchem byla použita k rozlišení blízce příbuzných druhů hub, kde variabilita ITS sekvencí k tomuto účelu nepostačovala (Zhou et al. 2001).

U rzí bylo dosud publikováno velmi málo studií založených na analýze ISSR. Využita byla např. pro populační studii u druhu *Melampsora larici-populina* (Zhong-dong et al. 2006).

2. MATERIÁL A METODIKA

2.1. Sběry

Během let 2005-2008 byly sbírány napadené rostliny, zejména se zaměřením na sběr jarních a zimních stádií rzí. Materiál byl usušen a v tomto stavu uchováván.

Hostitelské rostliny byly určovány podle Klíče ke květeně České republiky (Kubát et al. 2002).

Celkem bylo sebráno 69 položek aecií (14 na rodu *Ficaria* a 55 na rodu *Ranunculus*) a 18 položek příslušných uredií či telií. Sběry uredií a telií byly velmi problematické, některé druhy nebylo možné v terénu makroskopicky odlišit. Mnoho sběrů uredií a telií bylo po mikroskopické determinaci vyloučeno, protože nepatřily k námi studovaným druhům.

Pro další práci byly vybrány pouze některé sběry. Přednostně byly zpracovávány sběry obsahující větší množství ložisek rzi a sběry z různých lokalit. Některé položky obsahovaly jen velmi málo materiálu, ty nebyly pro další práci využity. Pokud bylo na jedné lokalitě sebráno více položek náležejících ke stejnému druhu hostitele, obvykle byly použity jen některé. Z důvodu menší četnosti sběrů uredií a telií některých druhů, bylo nutné pro další práci připojit ke sběrům za uplynulé tři roky i několik starších herbářových položek.

Použitý materiál je uveden v tabulkách 2 a 3. Pokud není uvedeno jinak, sebrala jsem materiál sama.

Hostitel	Označení položky	Stadium	Lokalita	Datum	Sebral
Alopecurus	07/T4	II	Jižní Čechy: Dobronice u Bechyně	7.VI.2007	
Alopecurus	07/T1	II	Slovensko: Bratislava - louka u ř. Moravy	7.V.2007	
Alopecurus pratensis	H/2	III	Šumava: Nad Uhlíkovem	17.IX.1992	Marková
Alopecurus pratensis	H/3	III	Šumava: Černý kříž	15.IX.1992	Marková
Dactylis	06/T4	III	Podkrkonoší: Stupná	XI.2006	
Dactylis	06/T5	III	Šumava: Srní	18.X.2006	
Dactylis	06/T6	III	Šumava: Srní	18.X.2006	
Dactylis	07/T10	III	Praha východ: Mirošovice	26.VIII.2007	Marková
Dactylis	H/1	II, III	Šumava: Nová pec	28.VI.2001	Marková
Dactylis	H/5	III	České Švýcarsko: Srbská Kamenice	10.IX.2002	Marková
Dactylis	H/7	III	Šumava: rašeliniště Houska	25.VI.2002	Marková
Dactylis	07/T2	II, III	Údolí Záhořanského potoka	26.V.2007	
Festuca	07/T6	II	Jižní Čechy: Křída	5.VI.2007	
Festuca	H/12	II	Šumava: Mlynářská slať	24.VII.1996	Marková
Phragmites	07/T11	III	Berounsko: Vatina	13.X.2007	
Ficaria verna	07/2	III	Praha východ: Mirošovice	8.IV.2007	Marková
Ficaria verna	07/18	III	Praha: Šárka	13.V.2007	
Ficaria verna	08/3	III	České středohoří: Milešovka	5.V.2008	
Poa	08/4	II	České středohoří: Milešovka	5.V.2008	
Poa	08/5	III	České středohoří: Velemín	4.V.2008	
Poa palustris	H/4	III	Jižní Čechy: Dobronice	7.VI.2002	Marková

Tab. 2: Použitý materiál, položky uredií a telií (Stadium II-uredia, III-telia)

Hostitel	Označení položky	Lokalita	Datum	Sebral
Ficaria verna	H/6	Praha: Botanická PřF UK	26.IV.2005	Marková
Ficaria verna	05/3	Stará Boleslav: Houštka	18.IV.2005	Rejzlová
Ficaria verna	05/4	Berounsko: Vatina	5.V.2005	
Ficaria verna	06/1	Berounsko: Vatina	8.V.2006	
Ficaria verna	06/8	Praha západ: Karlické údolí	18.V.2006	
Ficaria verna	07/1	Okres Benešov: Velký Chvojínek	IV. 2007	Kolařík
Ficaria verna	07/7	Posázaví: Utěchvosty	30.IV.2007	
Ficaria verna	07/8	Posázaví: Utěchvosty	30.IV.2007	
Ficaria verna	07/10	České středohoří: Oparenské údolí	13.IV.2007	Marková
Ficaria verna	07/36	Okres Náchod: Adršpach	4.V.2007	Marková
Ficaria verna	08/3	České středohoří: Milešovka	5.V.2008	
Ranunculus acris	05/1	Šumava: Zhůří	VI.2005	Voženílková
Ranunculus acris	06/2	Posázaví: Utěchvosty	3.VI.2006	
Ranunculus acris	06/3	Krkonoše: Vítkovice	19.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	06/4	Šumava: Zhůří	30.V.2006	Voženílková
Ranunculus acris	06/5	Šumava: Zhůří	26.VI.2006	Voženílková
Ranunculus acris	06/6	Okres Jindřichův hradec: Albeř	7.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	06/7	Krkonoše: Vítkovice	18.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	06/12	Krkonoše: Vítkovice	19.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	06/15	Kozí hory	3.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	06/16	Kozí hory	3.VI.2006	Marková
Ranunculus acris	07/12	Slovensko: Bratislava - louka u ř. Moravy	7.V.2007	
Ranunculus acris	07/15	Slovensko: Bratislava - louka u ř. Moravy	7.V.2007	
Ranunculus acris	07/16	Slovensko: Bratislava - louka u ř. Moravy	7.V.2007	
Ranunculus acris	07/20	Praha západ: Petrov u Davle	17.V.2007	
Ranunculus acris	07/23	Příbramsko: Třemšín u Příbrami	30.V.2007	
Ranunculus acris	07/26	Jižní Čechy: Dobronice u Bechyně	4.VI.2007	
Ranunculus acris	07/28	Jižní Čechy: Křída	5.VI.2007	
Ranunculus acris	07/31	Jižní Čechy: Stádlec	5.VI.2007	
Ranunculus acris	07/32	Jižní Čechy: Dobronice u Bechyně	7.VI.2007	
Ranunculus acris	07/33	Jižní Čechy: Dobronice u Bechyně	7.VI.2007	
Ranunculus acris	07/37	Jižní Čechy: Dobronice u Bechyně	4.VI.2007	
Ranunculus acris	07/40	Jižní Čechy: Křída	5.VI.2007	
Ranunculus acris	07/41	Jižní Čechy: Křída	5.VI.2007	
Ranunculus acris	07/43	Šumava: Zhůří	8.VI.2007	Voženílková
Ranunculus acris	07/44	Šumava: Zhůří	8.VI.2007	Voženílková
Ranunculus acris	07/48	Krkonoše: Dvoračky	16.VI.2007	Marková
Ranunculus acris	08/2	Podkrkonoší: Stupná	14.V.2008	
Ranunculus acris	08/6	České středohoří: Velemín	4.V.2008	
Ranunculus acris	H/8	Střední Čechy: Příbramsko	28.V.1985	Skalický
Ranunculus auricomus	07/5	Posázaví: Utěchvosty	1.V.2007	
Ranunculus cassubicus	H/9	Slovensko: Budča u Zvolena	19.V.1980	Lepšová
Ranunculus repens	05/2	Berounsko: Vatina	12.VI.2005	
Ranunculus repens	06/9	Berounsko: Vatina	1.VII.2006	
Ranunculus repens	06/10	Berounsko: Vatina	30.VI.2006	
Ranunculus repens	07/22	Údolí Záhořanského potoka	26.V.2007	
Ranunculus repens	07/24	Berounsko: Vatina	2.VI.2007	
Ranunculus repens	07/25	Berounsko: Vatina	2.VI.2007	
Ranunculus cf. repens	07/6	Posázaví: Utěchvosty	1.V.2007	
Ranunculus cf. repens	07/35	Okres Náchod: Adršpach	4.V.2007	Marková
Ranunculus sp.	08/1	Jižní Morava: CHKO Pavlovské vrchy	16.V.2008	Koukol
Ranunculus sp.	H/10	Slovensko: Pohanský vrch	26.V.1981	Marková
Ranunculus sp.	H/11	Slovensko: Malá Fatra	30.V.1982	Marková

Tab. Použitý materiál, položky aecií

Protože na základě morfologie nelze aecia přiřadit k určitému druhu, zůstávají zatím neurčená a přiřazována budou až po srovnání jejich DNA s DNA ze spolehlivě určených telií.

2.2. Izolace DNA

K izolaci byl použit suchý materiál. Materiál pro izolaci byl odebírán pod stereomikroskopem. Pro izolaci z aecií byly vždy pomocí jehly vypreparovány spory z jednoho ložiska, případně bylo použito ložisko vcelku. Pro izolaci z telií a uredií bylo odebráno vždy několik ložisek, která se vyskytovala na jednom listu cca do 0,5 cm od sebe. DNA byla izolována alternativně dvěmi metodami.

2.2.1. Vlastní metoda izolace

Tato metoda izolace DNA z různých typů spor rzí byla vytvořena během mé bakalářské práce. Základ tvoří několik metod. Z práce Zambino et Szabo (1993) bylo převzato složení extrakčního pufru; způsob drcení byl převzat z práce Anikster et al. (2004).

Materiál byl vložen do 1,5 ml zkumavek se 100µl extrakčního pufru (0,089 M Tris, 0,045 M kyselina boritá, 0,05 µM EDTA, 1% β-merkaptoetanol). Následně bylo přidáno cca 20 skleněných kuliček 1 mm velkých a mikrozkumavky třepány na vortexu (Vortex genie 2) ve vodorovné poloze 10 min. Poté následovala inkubace 20 min. při 90-95°C.

Takto připravená DNA byla, bez dalších úprav, použita k PCR amplifikaci.

2.2.2. Izolace DNA komerční sadou na izolaci

Druhým způsobem byla izolace komerční sadou UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA). Izolace přesně podle protokolu přiloženého k izolační soupravě nebyla úspěšná, bylo nutné zvolit odlišný způsob drcení materiálu. Materiál byl drcen třepáním na vortexu v pufru Bead Solution od kitu spolu s několika 1 mm velkými skleněnými kuličkami po dobu 10 min. Teplota následné inkubace byla oproti protokolu zvýšena na 95°C. Dále bylo postupováno podle návodu přiloženého k soupravě.

2.2.3. Měření koncentrace získané DNA

U vybraných vzorků byla změřena koncentrace získané DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop ND1000 (*NanoDrop* Technologies). Hodnoty posloužily jako orientační pro další práci.

2.3. Gelová elektroforéza

Agarózový gel byl připraven rozvařením agarózy (Invitrogen, Live Technologies) v roztoku v 1x TBE (Tris-borate-EDTA, v 1 L: 10,8 g Tris base, 5,5 g Boric acid, 0,93 g EDTA) pufru, poté byl přidán etidium bromid (150 ng/ml). U jednotlivých metod byla použita různá koncentrace gelu (1%-1,5%). Nejčastěji byly používány gely o velikosti 10x11 cm o objemu 70 ml a 11 studničkami na šíři gelu. Po ztuhnutí gelu následovalo nanesení vzorků spolu s kapkou nanášecího roztoku (0.25% bromfenolová modř, 30% glycerol). Množství nanášeného PCR produktu je uvedeno u jednotlivých metod. Jako standard byl nanesen λ Bgl I.

Elektroforéza probíhala při napětí 100-130 V po dobu cca 30 min až 3 hod, podle potřeby pro rozdělení získaných fragmentů. Tyto parametry jsou blíže specifikovány u jednotlivých metod.

Výsledky elektroforézy byly zviditelněny transluminátorem a zaznamenány pomocí CHEMI GENIUS^2 BIO IMAGING SYSTEM (Syngene, Cambridge, UK) a programu GeneSnap verze 6.08 (Syngene, Cambridge, UK).

2.4. PCR amplifikace

Všechny PCR reakce (amplifikace rDNA, RAPD, rep-PCR i ISSR) byly prováděny v 0,2 ml plastových mikrozkumavkách. Reakční směs byla vždy připravována jako premix pro všechny vzorky najednou a až následně rozpipetována. Z důvodu ztrát při pipetování bylo premixu připravováno vždy o cca 10% víc, než bylo pro vzorky potřeba. Příprava vzorků pro amplifikaci probíhala v laminárním boxu pro omezení možnosti kontaminace. Zásobní roztoky chemikálií byly uchovávány při -15°C.

Před vložením vzorků do termocykleru byla směs promíchána a krátce zcentrifugována aby se odstranily případné bubliny. Všechny PCR reakce byly provedeny v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Cologne Hamburg, Germany).

2.4.1. Amplifikace rDNA oblastí a zpracování sekvencí

Pro PCR amplifikaci ITS oblastí byly použity kombinace primerů ITS4 + ITS5, případně ITS 4 + ITS 1-F. Pro amplifikaci LSU kombinace primerů NL1 + NL4. Dále také kombinace Rust 3 + NL4, která amplifikuje oblast ITS2 a současně LSU.

Obvykle používané množství směsi bylo 25-30 μl, ke kterému bylo přidáno 2,5-3,5 μl

DNA.

Pro srovnání byla připravována pozitivní kontrola s DNA různých vláknitých hub a negativní kontrola bez DNA.

Složení reakční směsi, celkový objem 25 µl:

DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy).....2,5 µl

2 mM dNTP's.....2,5 µl

Primery (10 pM/µl).....2 µl (každý)

DynaZyme polymeráza (Finnzymes Oy).....0,5 µl

Sterilní H_2O.....15 µl

\+ DNA.....2,5 µl

Teplotní cyklus byl obvykle používán následující:

1x	95°C 2 min 30 s	55°C 30 s	72°C 1 min
30x	95°C 30 s	55°C 30 s	72°C 1 min
1x	95°C 30 s	55°C 30 s	72°C 10 min

V několika případech byl použit modifikovaný cyklus s prodloužením doby denaturace a annealingu na 1 min (Edwards et al. (1999).

U vzorků s opakovaně velmi slabým výsledkem PCR byla provedena reamplifikace. Namíchána byla reakční směs, ve které byl použit jako templát produkt předchozí PCR. Byla použita směs o objemu 25 µl + 1 µl PCR produktu.

U některých vzorků, které produkovaly na elektroforéze dvojité proužky, byla provedena reamplifikace z gelu. Byla použita směs o objemu 25 µl + DNA v množství, které ulpělo po zanoření špičky pipety do gelu v místě proužku. Pro reamplifikaci byly použity primery stejné jako v předcházející PCR, nebo primery vnitřní.

PCR obvykle bývá potřeba optimalizovat zvlášť pro každou skupinu organismů. Bylo nutné zjistit nejvhodnější koncentraci vstupní DNA, vybrat vhodné primery, popřípadě zjistit optimální teplotu jejich nasedání. Vyzkoušeny byly i různé teplotní cykly. Viz. výsledky; kapitola optimalizace PCR.

Získané PCR produkty byly elektroforeticky zviditelněny na 1% agarózovém gelu. Nanášeno bylo 3-7 µl PCR produktu. Elektroforéza probíhala 30 - 60 min při 130 V.

Amplifikovaný fragment ITS a LSU oblastí byl přečištěn pomocí soupravy Wizard™ DNA Clean Up, dle návodu přiloženého k soupravě. DNA byla servisně osekvenovaná firmou Macrogen Inc. (Soul, Jižní Korea). Případně bylo i přečištění PCR produktů provedeno

firmou Macrogen.

K sekvenování ITS oblastí bylo nezbytné použít oba primery a sekvenovat tedy oba komplementární řetězce. Důvodem jsou motivy v ITS oblastech složené z úseku cca deseti cytosinů a deseti thyminů v ITS1 a úsek v ITS2 oblasti bohatý na adenin a thymin. Tyto oblasti patrně tvoří smyčku a výsledky sekvenační reakce se dále stávají nekvalitními.

Získané sekvence byly čteny a zpracovány v programu BioEdit verze 7.0.9.0 (Hall 1999), jednalo se zejména o vytvoření konsensuálních sekvencí z obou komplementárních řetězců. Alignment, což je přiřazování homologních pozic jednotlivých sekvencí, byl proveden v programu ClustalX (Thompson et al. 1997), případně ručně upraven v BioEdit.

Výpočet genetických vzdáleností a tvorba fylogenetických stromů proběhla v programu Mega 4 (Tamura et al. 2007).

Pro odhad genetických vzdáleností byl použit koeficient LogDet (Tamura et Kumar 2002). Pro tvorbu fylogenetických stromů byly využity metody neighbor-joining a maximum-parsimony s přednastavenými promněnnými výpočtu.

Nejprve byly vytvořeny stromy pouze s použitím sekvencí vlastních. Do dalších analýz byly začleněny i vybrané publikované sekvence a to takové, které byly nejblíže podobné získaným sekvencím. Z vlastních sekvencí byly dále použity jenom ty, které se od ostatních lišily alespoň v jediné bázi.

2.4.2. RAPD metoda

Pro RAPD reakci byly na základě zkušeností v laboratoři vybrány primery OPA 02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA 20 (5'-GTTGCGATCC-3'), 10R (5'-GGCCAGTGTGAATATGC-3') a 8F (5'-GCTCTGAGATTGTTCCGGCT-3') a OPA 09 (5'-GGGTAACGCC-3').

K reakci byla použita DNA neředěná, případně 50x ředěná.

PCR směs o objemu 18 µl: sterilní H_2O.....10 µl
DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy) .....2 µl
$MgCl_2$ (25 mM).....1 µl
dNTP (2 mM).....2 µl
primer (10 pM).....2 µl
DynaZyme polymeráza (Finnzymes Oy) .....0,5 µl
+ DNA (různá koncentrace).....4 µl

Teplotní cyklus:

1x	94°C 3 min	38°C 1 min	72°C 20 s
33x	93°C 20 s	38°C 1 min	72°C 20 s
1x	93°C 20 s	38°C 1 min	72°C 6 min

Získané produkty RAPD reakce byly naneseny na 1-1,2% agarózový gel. Produktu bylo nanášeno 8-10 µl. Elektroforéza probíhala cca 45 min při 130V.

2.4.3. PCR s primery ERIC a M13 core

Byly použity následující primery: ERIC II (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3'), ERIC IR (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA-3') a M13 core (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3').

Reakční směs o objemu 16,5 µl:

DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy) ..... 2 µl

2 mM dNTP's.....2 µl

primer (10 pM/µl).....2 µl

DynaZyme polymeráty (Finnzymes Oy) .....0,5 µl

sterilní H_2O.....10 µl

+DNA.....4 µl

Teplotní cyklus:

1x	94°C 2 min 30 s	52°C 1 min 30 s	68°C 3 min
33x	94°C 30 s	52°C 1 min 30 s	68°C 3 min
1x	94°C 30 s	52°C 1 min 30 s	68°C 8 min

Výsledek byl zviditelněn na gelové elektroforéze na 1,3% agarózovém gelu. Naneseno bylo 8 µl produktu reakce. Elektroforéza probíhala při 130 V cca 1,5 hod.

2.4.4. ISSR

Použity byly primery 834t (5'-$(AG)_8$CG-3'), 834c (5'-$(AG)_8$ TG-3') a jejich kombinace.

Reakční směs o celkovém objemu 15 µl:

DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy) ..... 2 µl

$MgCl_2$.....2 µl

Betain (1,5 M, Sigma)..... 2 µl

BSA (20 mg/ml, MBI Fermentas).....0,5 µl

2 mM dNTP's.....3 µl

primer (10 pM/µl).....0,5 µl (každý)

DynaZyme polymeráza (Finnzymes Oy) .....0,5 µl

sterilní H_2O.....4,5 µl

\+ DNA.....5 µl

Teplotní cyklus reakce:

1x	96°C 2 min	44°C 45 s	72°C 90 s
38x	96°C 30 s	44°C 45 s	72°C 90 s
1x	96°C 30 s	44°C 45 s	72°C 10 min

Výsledek byl zviditelněn na gelové elektroforéze na 1,3-1,5% agarózovém gelu. Naneseno bylo 8 µl produktu reakce. Elektroforéza probíhala při 100-130V po dobu 1,5-3 hod.

2.5. PCR – RFLP

Před samotnou restrikcí byly sekvence ITS i LSU jednotlivých druhů nejprve analyzovány v programu pDRAW32 (www.acaclone.com). Tento program vygeneruje k jednotlivým sekvencím mapu restrikčních míst a seznam příslušných enzymů. Porovnáním restrikčních map jednotlivých druhů byla vytipována druhově specifická restrikční místa. Bylo ale nutné brát v úvahu délky fragmentů, které po restrikci vzniknou. Fragmenty s podobnou délkou by se na elektroforéze nemusely odlišit.

Metoda byla vyzkoušena s použitím primerů Hpa I (MBI, Fermentas) a Dde I (New England BioLabs). Štěpeny byly LSU oblasti celkem 8 vzorků, vždy 2 vzorků od každého druhu. Fragment byl nejprve namnožen PCR s kombinací primerů NL 1+4 ve směsi

o celkovém objemu 50 µl. Složení směsi je uvedeno v kapitole 4.1.

Výsledek amplifikace byl ověřen na elektroforéze. Byl použit 1% agarózový gel, naneseny byly 4 µl PCR produktu.

Poté následovala restrikce s následující reakční směsí o celkovém objemu 20µl.

Složení reakční směsi : PCR produkt.....15 µl,
restrikční enzym.....0,5 µl
příslušný pufr.....2 µl
H_2O.....2,5 µl

Vzorky byly inkubovány přes noc při 37°C v thermocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Cologne Hamburg, Germany).

Fragmenty získané restrikcí byly zviditelněny na elektroforéze na 1,3% agarózovém gelu, naneseno bylo 10 µl produktu restrikce. Elektroforéza probíhala cca 1,5 hodiny při 130V.

2.6. Studium morfologie aeciospor

Poté co byla jednotlivá aecia na základě sekvencí identifikována, byly hledány morfologické diferenciační znaky, s pomocí kterých by bylo možné aecia jednotlivých druhů rozlišovat. Takovými znaky by mohly být rozměry aeciospor, případně ornamentika jejich povrchu (Sato et Sato 1982).

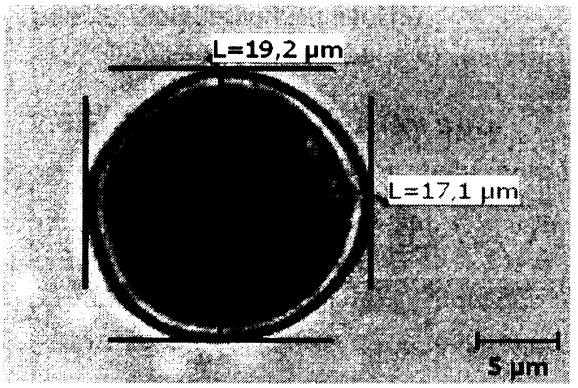
2.6.1. Studium ornamentiky

Ke studiu ornamentiky buněčné stěny byl použit skenovací elektronový mikroskop SEM JEOL 6380 LV v laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK. Pozorován byl suchý materiál (Lee et Kakishima 1999, Edwards et al. 1999, Chung et al. 2004), který byl nanesen na oboustrannou lepenku a pokovený vrstvičkou zlata. Byly hledány mezidruhové diferenciační znaky ornamentiky, které byly vytipovány na základě údajů z literatury. Odlišovacími znaky by mohly být například velikosti bradavek (část spory hrubě a část jemně bradavčitá), přítomnost lysých oblastí či přítomnost větších, silně světlolomných bradavek (viz. kapitola literární úvod, popisy aeciospor jednotlivých druhů).

2.6.2. Měření délky a šířky spor

U vybraných položek aecií proběhlo měření délky a šířky spor, vždy cca 50 spor od jednoho vzorku. Pro měření byly vybrány dva vzorky od druhu *Uromyces dactylidis* a více vzorků od ostatních druhů. Spory byly měřeny s použitím světelného mikroskopu JENAVAL (Zeiss, Jena), zaznamenány fotoaparátem Camedia C-5060 WZ camera (Olympus, Hamburg) při zvětšení 25x a proměřeny v programu QuickPhoto Camera 2.2.

K mikroskopickému zpracování byly použity aeciospory, které byly ze suchého materiálu vypreparovány pomocí jehly. Spory byly přeneseny do kapky kyseliny mléčné, případně obarvené bavlníkovou modří. Před pozorováním byly spory krátce zahřáty nad plamenem, aby došlo k vypnutí buněčných stěn a tím nabytí spor do původní velikosti.



Obr. 1 Měření délky a šířky spor v programu QuickPhoto Camera 2.2.

2.6.3. Zpracování naměřených hodnot

Získaná data byla zaznamenána do tabulky v programu MS Excel (Microsoft Corp., USA). Pro statistické zpracování byl využit program PAST (Hammer et al. 2001).

Techniky popisné statistiky mi umožnili popsat základní strukturu dat. Jednotlivě pro délku a šířku bylo testováno, zda jsou hodnoty naměřené u jednotlivých druhů statisticky odlišné. K testování normality byl použit Shapiro-Wilkův test. Protože nebyla u všech souborů dat splněna podmínka normálního rozdělení, použila jsem k porovnání hodnot délky a šířky jednotlivých druhů Kruskal-Wallisův test (naparametrická analýza variance).

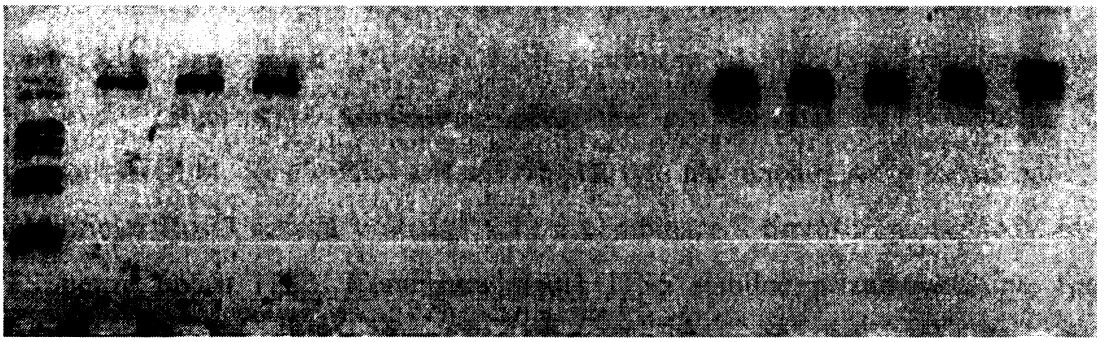
3. VÝSLEDKY

3.1. Izolace DNA

Během bakalářské práce (Hejná 2006) byla vytvořena metoda vhodná k izolaci DNA z aecií, uredií i telií. Pokus k ověření kvality uchovávané DNA (zamražené při -20°C) ale ukázal, že takto připravená DNA poměrně rychle ztrácí svou kvalitu. V pokusu byly porovnávány amplifikované ITS fragmenty osmi vzorků. Šest vzorků čerstvě připravené DNA se dvěma vzorky starými dva a půl měsíce. Ve všech případech se jedná o DNA získanou vlastní metodou izolace (viz. kapitola 2.2.). Bylo zjištěno, že PCR s déle uchovávanou DNA má mnohem nižší výtěžky než reakce s čerstvou DNA (výjimkou byl pouze první vzorek čerstvé DNA). Viz. obrázek č. 2. Z tohoto důvodu bylo v průběhu diplomové práce testováno použití izolačního kitu MoBio.

Obr. 2: Výsledek PCR. Zleva šest vzorků čerstvých, dva starší a na konci kontrolní DNA.

V případě izolace komerčním kitem bylo nutné pozměnit protokol izolace (viz kapitola 2.2.). Izolace přesně podle protokolu nebyla úspěšná a dobré výsledky dávala až po pozměnění metodiky rozbíjení buněk. Na obrázku č. 3 je znázorněn výsledek amplifikace ITS oblastí s DNA (primery ITS4+5) připravenou třemi různými postupy. K izolaci všemi metodami byly použity stejné čtyři položky aecií. Nevyšel žádný ze vzorků izolovaných přesně podle protokolu izolační sady a jeden vzorek izolovaný vlastní metodou. PCR s DNA izolovanou komerčním kitem, ale pozměněným protokolem, dávala vyší výtěžky než vlastní postup izolace.



Obr. 3: Porovnání metod izolace. Vlastní metoda, izolace kitem a pozměněný postup izolace.

Celkem byla provedena izoloace DNA od 74 vzorků, která ale nebyla vždy úspěšná. Zejména z herbářových položek a položek uredií a telií byla izolace problematická. Nejstarší materiál, ze kterého se podařilo izolovat DNA a také ji amplifikovat byly dvě položky telií (H-2 a H-3) z roku 1992. Pro PCR byla použitelná DNA izolovaná z 65 vzorků. Při použití DNA z čerstvých aecií se PCR amplifikace zdařila u všech vzorků. U osmi položek uredií, telií nebo herbářového materiálu se PCR nezdařila a u šesti byl výtěžek PCR opakovaně velmi slabý. V pěti případech byla izolace i PCR amplifikace úspěšná, ale osekvenovaný fragment nepatřil rzím, případně patřil hostitelské rostlině. Získané sekvence byly zařazeny na základě srovnání s publikovanými sekvencemi v GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) do rodů Eudarluca, Nectria a Cryptoccocus.

Získaná koncentrace DNA se nejčastěji pohybovala v rozmezí 2-5 ng/µl.

3.2. PCR amplifikace rDNA

3.2.1. Optimalizace PCR reakce

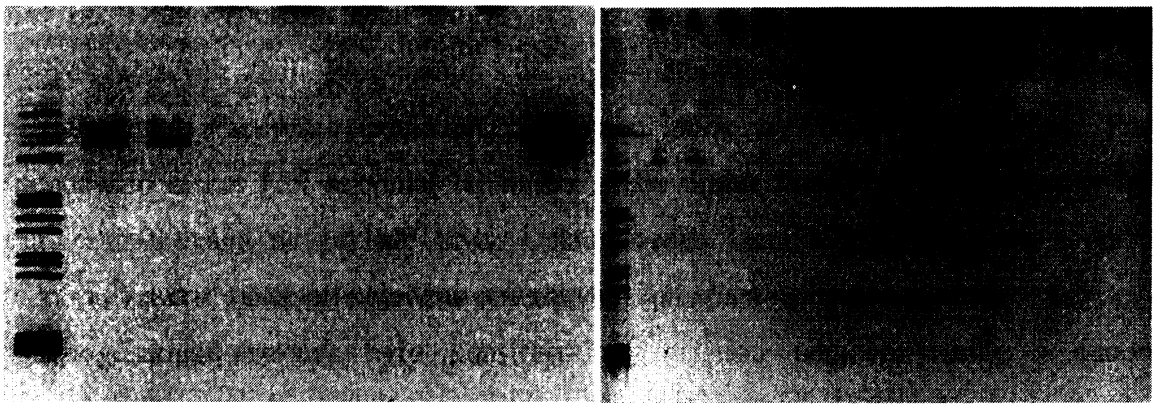
Optimalizace se týkaly zejména amplifikace ITS oblasti, kde se často PCR produkt neamplifikoval, či byly produkty o velmi slabé koncentraci nebo dvojité. Pro účely optimalizace byl použit jednotný postup PCR amplifikace (složení reakční směsi, teplotní cyklus). Je uveden v kapitole materiál a metodika.

Nejprve byly hledány vhodné primery k amplifikaci ITS i LSU oblastí. Vždy na několika vzorcích byly postupně testovány tyto kombinace primerů: ITS1+4, ITS4+5, ITS1+4s, Rust1+ITS5, Rust1+Rust3, Rust3+NL4, ITS1-F +ITS4, ITS1-F + Rust1 a NL1+4.

Bylo zjištěno, že pro amplifikaci ITS jsou vhodné zejména kombinace ITS4+5 a ITS4+ITS1-F, pro oblast LSU jsou vhodné primery NL1+4. Tyto kombinace pravidelně produkovaly fragmenty o koncentraci použitelné pro sekvenování. Použitelné jsou dále kombinace ITS1+4, Rust3+NL4 a Rust1+Rust3, tyto ale mnohdy měly velmi slabé výtěžky. Navíc primer Rust3 nasedá v oblasti 5,8S a kombinace s tímto primerem tedy amplifikují z ITS pouze oblast ITS2. Kombinace Rust1+ITS5 stabilně produkovala dva fragmenty. Ostatní kombinace nepřinášely dobré výsledky, nebo fragment vůbec neamplifikovaly.

Dále bylo optimalizováno množství templátové DNA. Pro tyto účely byla vybrána kombinace primerů ITS4+5. Bylo testováno ředění 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 a 1: 10000. K pokusu byla použita DNA tří vzorků (05/1, 05/3 a 05/4).

Výsledky ukázaly, že koncentrace DNA vstupující do reakce musí být poměrně velká. Při použití 30 µl reakční směsi a 3 µl DNA (koncentrace 2-5 ng/µl) jsou vhodná ředění 1:50 až 1:100, nebo DNA neředěná. Ostatní ředění nepřinesla žádné výsledky. Výsledky jsou znázorněny na obrázku č. 4.



Obr. 4: Výsledky testování sedmi různých ředění na třech vzorcích DNA. Zleva postupně u všech tří vzorků ředění 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000. Za první sérií je navíc nanesena kontrolní DNA.

Protože PCR reakce produkovala často kromě proužku hlavního ještě proužky přídatné, byla hledána nejvhodnější teplota pro nasedání primerů (annealing) pomocí naprogramovaného gradientu teplot. Na 12 shodných vzorcích byla vyzkoušena teplota nasedání primerů ITS 4+5 v rozmezí 50-65°C (gradient 1,3°C). PCR reakce proběhla ve všech vzorcích téměř bez rozdílu. Pouze vzorky s teplotou annealingu vyšší než 60°C produkovaly mírně silnější proužky, ale včetně proužků přídatných.

Pro zvýšení výtěžku PCR bylo vyzkoušeno také přidání albuminu (BSA) do reakční směsi. Ke 30 µl směsi a 3 µl DNA bylo přidáno 1,5 µl BSA. Byly testovány dvě sady osmi shodných vzorků, jedna s BSA a druhá bez něj. Amplifikace s primery ITS4+5. BSA u některých vzorků neměl vliv žádný, u jiných výtěžek PCR dokonce snížil.

Testované postupy optimalizace nepřinesly u nekvalitních vzorků (málo meteriálu, starý vzorek) zlepšení, zatímco kvalitní vzorky šlo amplifikovat i standardním postupem.

3.2.2. Analýza sekvencí ITS oblastí

Celkem byly získány sekvence ITS rDNA oblastí (ITS1-5,8s-ITS2) od 42 vzorků v délce 580-620 bp. V případě vzorků 06/10, 07/24 a 07/25 byly získány pouze sekvence oblasti ITS 2 cca 280 bp dlouhé. Porovnávány byly sekvence 280-610 bp dlouhé. V nukleotidovém složení sekvencí jednotlivých druhů nebyl nalezen žádný rozdíl. Sekvence přibližně obsahovaly 32% A, 36% T, 16,5% C a 14,5% G. Variabilní pozice byly nalezeny v oblasti ITS1 i ITS2, zatímco sekvence oblasti 5,8S byly u všech vzorků shodné.

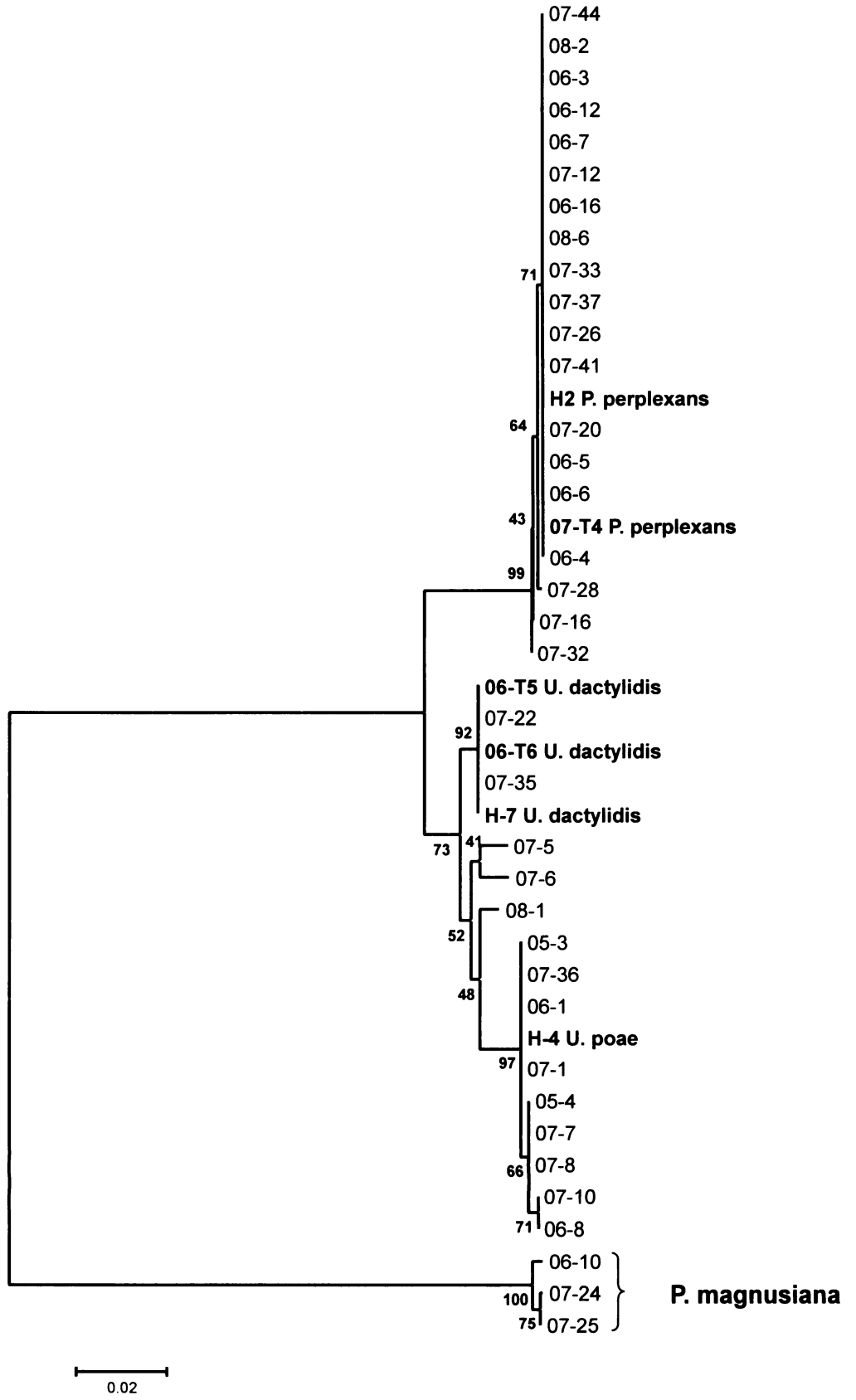
Dle podobnosti k sekvencím z databáze GenBank se jednalo o zatím nesekvenované druhy rzí. Druhové určení aecií tedy bylo možné až srovnáním se sekvencemi spolehlivě určených teliových stadií. Porovnáním s určeným materiálem se podařil identifikovat aeciální materiál druhů *Puccinia perplexans*, *Uromyces poae a Uromyces dactylidis*. Protože se nepodařilo získat ITS sekvenci teliálního stádia druhu *Puccinia magnusiana*, byla tato aecia identifikována na základě LSU. Ostatní aecia, která nebyla přiřazena k žádnému teliálnímu vzorku, zůstávají neurčena pod názvem *Aecidium ranunculacearum*.

Fylogenetické stromy byly konstruovány metodou neighbor-joining i maximum parsimony. Porovnáváno bylo 607 pozic (včetně gapů), z toho bylo 89 pozic variabilních a 77 parsimoně informativních. V prvním kroku byly pomocí fylogenetických metod porovnány sekvence získané během vlastní práce. Topologie a podpora jednotlivých kladů získaných různými metodami se výrazně neodlišovala, proto uvádím pouze strom zkonstruovaný metodou neighbor-joining (Obr. 5).

Dobře podpořenou skupinu s vnitroskupinouvou variabilitou (1,1 %) představuje druh *P. magnusiana*. Od ostatních druhů výrazně geneticky odlišná (viz. tab. 4).

Ostatní vzorky se dále rozčlenily do dvou výrazně podpřených skupin (bootsrap 73, 99). Do první skupiny se seskupily vzorky druhu *P. perplexans*, tvořící tři podskupiny (variabilta skupiny 1,2%). Druhou skupinu utvořily vzorky druhů *U. dactylidis, U. poae* tvoříci dobře vymezené klady (bootstrap 92, 97) a vzorky aecií, které nebyly přiřazeny k žádnému z teliálních vzorků. Variabilita sekvencí této skupiny činila cca 5%. V rámci druhé skupiny se výrazně odčlenily vzorky druhu *U. dactylidis*. U druhu *U. dactylidis* nebyla zachycena žádná variabilita v ITS oblasti, druh *U. poae* s celkouvou variabilitou 0,4% tvoří tři podskupiny.

Všechny vzorky aecií, které byly na základě sekvencí přiřazeny k druhu *U. poae,* pocházely z *Ficaria verna*. Všechny vzorky přiřazené k druhu *P. perplexans* pocházely z *Ranunculus acris*. Aecia z *Ranunculus repens* byla přiřazena buď k *U. poae, P. magnusiana*, nebo zůstala nepřiřazena. K žádnému z teliálních vzorků nebyly přiřazeny 3 položky aecií (07-5, 07-6 a 08-1).



Obr. 5: Fylogenetický strom ITS oblastí 42 vzorků vytvořený metodou neighbor-joining v programu Mega 4 na základě LogDet modelu. Zvolením možnosti *pairwaise deletion* bylo k jeho konstrukci využito všech pozic. Hodnoty *bootstrapu* vypočítány 1000 replikacemi, zobrazeny jsou pouze hodnoty vyšší než 40.

Dále byla studovaná skupina začleněna mezi nejblíže příbuzné druhy. Nejblíší publikované sekvence byly vyhledány pomocí programu BLAST v databázi Genbank. A dále bylo použito i několik napublikovaných sekvencí náležející ke studovaným druhům, které poskytl L. J. Szabo (University of Minnesota, USA). Tyto sekvence byly získány z materiálu pocházejícího z ČR (sběry J. Markové) a jsou označeny HSZxxxx. Celkem bylo použito 55 sekvencí: 18 sekvencí vlastních (z vlastních dat byly použity pouze unikátní sekvence*), 4 sekvence od Szaba a 33 sekvencí z GenBank. Jako outgroup byla použita sekvence druhu *Melampsora laricis-populina* (rod *Melampsora* vybrán podle prací Chatasiri et al. (2006) a Maier et al. (2007). Byly zkonstruovány fylogenetické stromy opět metodami neighbor-joining (obr. 6) i maximum-parsimony (obr. 7).

Všechny vzorky druhů *P. perplexans*, *U. poae* a *U. dactylidis* utvořily jednu skupinu s bootstrapovou podporou vyšší než 70 (u obou použitých metod). Jako nejbližší k této skupině se vyčlenila společná skupina druhů *P. persistens* a *P. triticina.*

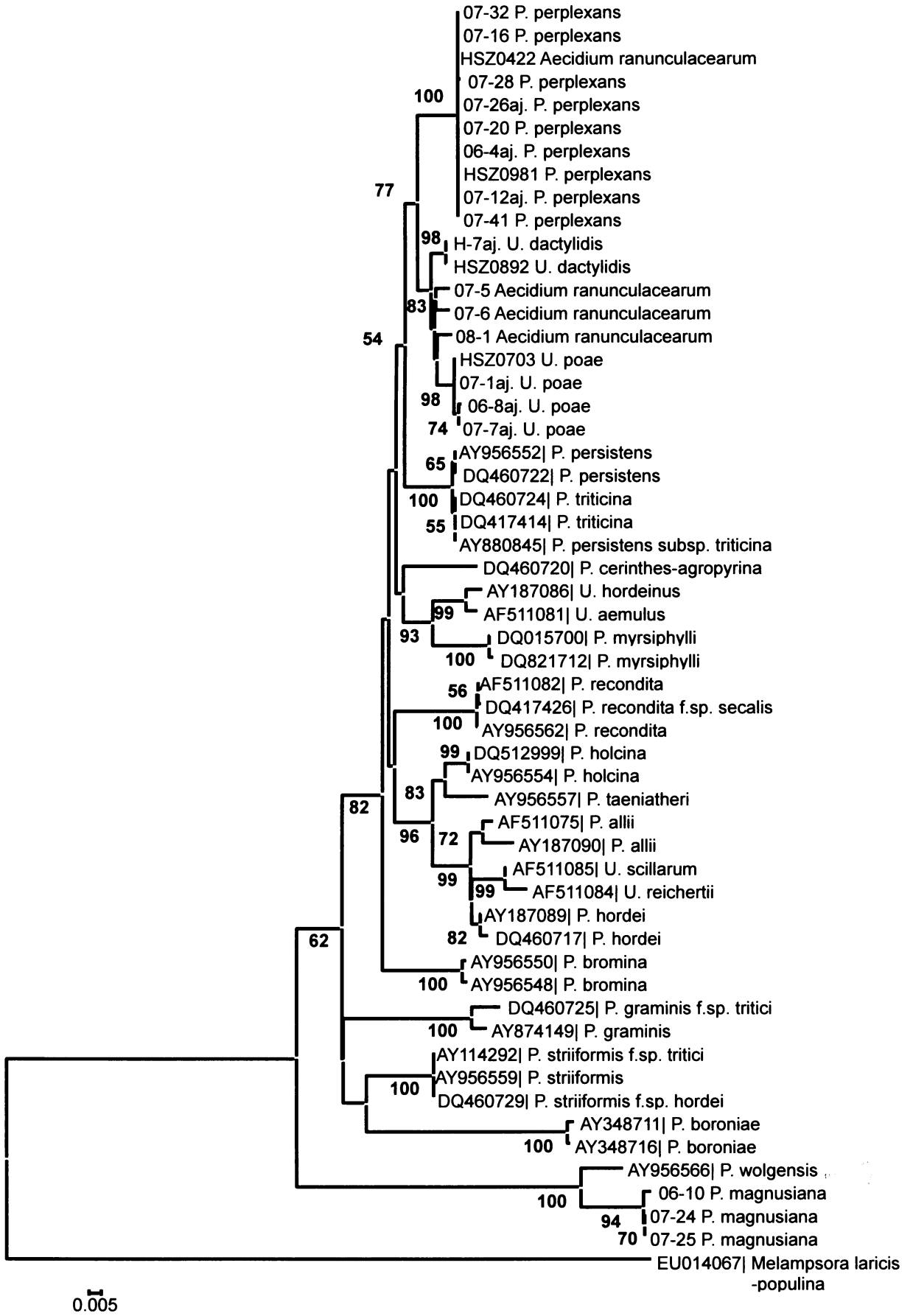
Vzorky druhu *P. magnusiana* se seskupily s druhem *P. wolgensis* a společně utvořily sesterskou skupinu ke všem ostatním vzorkům začleněným do analýzy.

Sekvence, které poskytl Szabo se začlenily odpovídajícím způsobem podle druhové příslušnosti. Vzorek *Aecidium ranunculacearum* (HSZ0422) z *Ranunculus acris* se přiřadil podle očekávání k druhu *P. perplexans*.

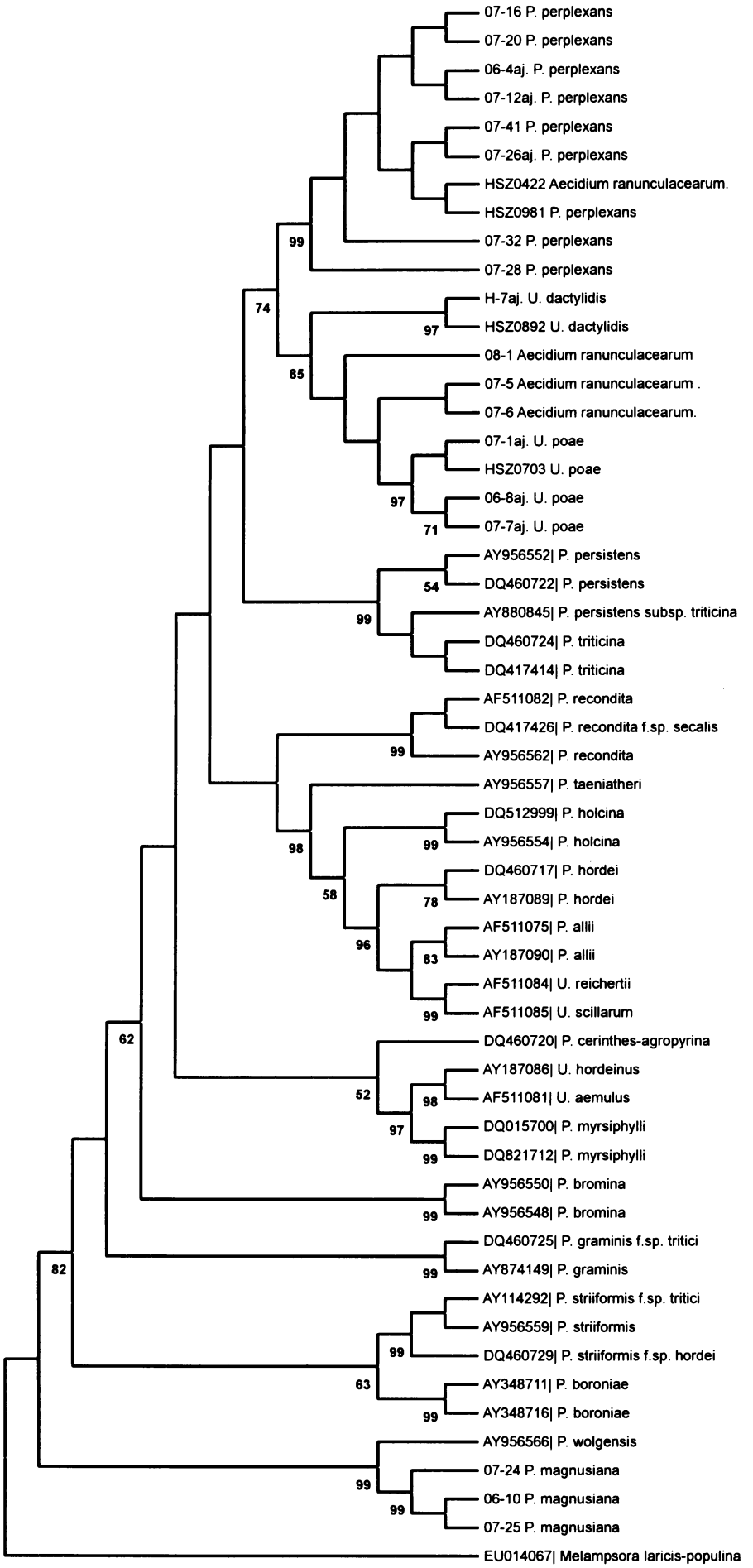
07-32	[1]																	
07-16	[2]	0.000																
07-20	[3]	0.000	0.000															
06-4aj.	[4]	0.000	0.000	0.000														
07-12aj.	[5]	0.000	0.000	0.000	0.000													
07-41	[6]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
07-26aj.	[7]	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
07-28	[8]	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002										
07-1aj.	[9]	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034									
06-8aj.	[10]	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.038	0.004								
07-7aj.	[11]	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.036	0.002	0.002							
H-7aj.	[12]	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.032	0.018	0.022	0.020						
07-5	[13]	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.015	0.019	0.017	0.017					
07-6	[14]	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.033	0.015	0.019	0.017	0.017	0.013				
08-1	[15]	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032	0.034	0.014	0.018	0.016	0.016	0.016	0.017			
06-10	[16]	0.216	0.216	0.216	0.217	0.217	0.217	0.217	0.217	0.232	0.237	0.232	0.208	0.239	0.217	0.210		
07-24	[17]	0.211	0.211	0.211	0.212	0.212	0.212	0.212	0.212	0.226	0.231	0.226	0.202	0.234	0.212	0.205	0.004	
07-25	[18]	0.211	0.211	0.211	0.212	0.212	0.212	0.212	0.212	0.226	0.231	0.226	0.202	0.234	0.212	0.205	0.004	0.000
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Tab. 4: Genetické distance získaných ITS sekvencí spočítané na základě LogDet modelu.

*Zastoupení shodných sekvencí: 06-4 aj. (06-4, 06-5, 06-6, 07-T4), 07-12 aj. (07-12, 06-3, 06-7, 06-12, 06-16, 07-33, 07-44, 08-2, 08-6, H-2), 07-26 aj. (07-26, 07-37), 07-1 aj. (07-1, 05-3, 06-1, 07-36, H-4), 06-8aj. (06-8, 07-10), 07-7 aj. (07-7, 07-8, 05-4), H-7 aj. (H-7, 06-T5, 06-T6, 07-22, 07-35).



Obr. 6: Fylogenetický strom ITS oblastí 55 vzorků vytvořený metodou neighbor-joining v programu Mega 4 na základě LogDet modelu. Zvolením možnosti *pairwaise deletion* bylo k jeho konstrukci využito všech pozic. Hodnoty *bootstrapu* vypočítány 1000 replikacemi, pro přehlednost jsou zobrazeny pouze hodnoty vyšší než 50.



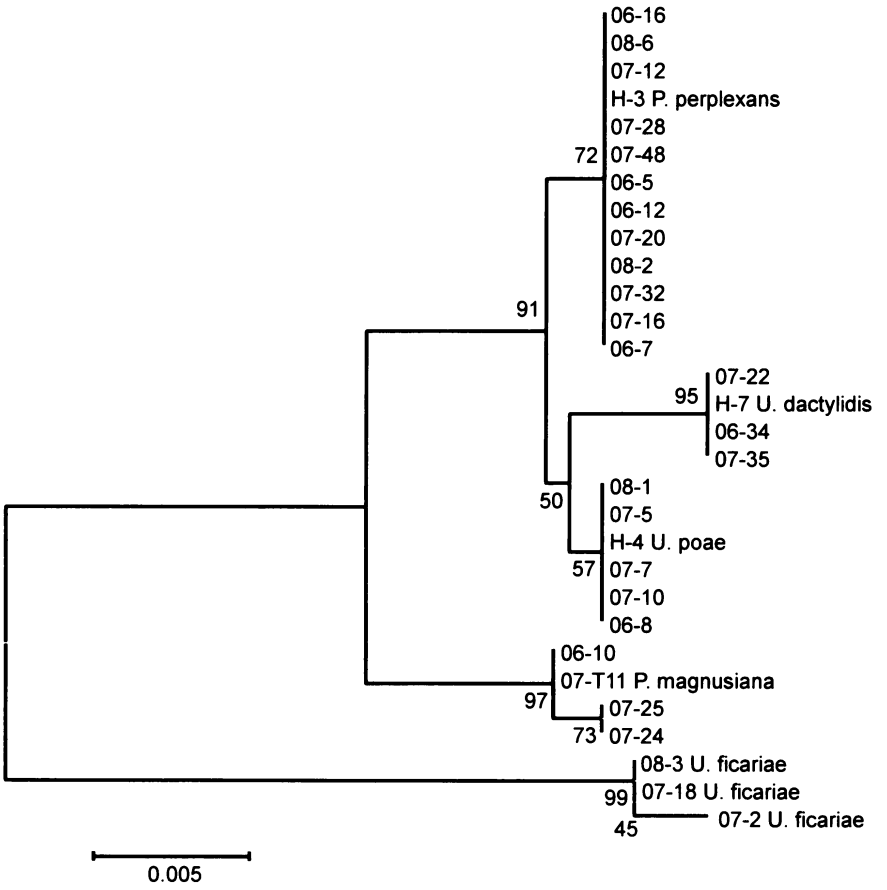
Obr. 7: Consensuální strom vytvořený metodou maximal-parsimony v programu Mega 4. kladogram ITS oblastí 55 vzorků. K jeho konstrukci bylo využito všech pozic. Hodnoty *bootstrapu* vypočítány 500 replikacemi, zobrazeny jsou pouze hodnoty vyšší než 50.

3.2.3. Analýza sekvencí LSU oblastí

Byly získány sekvence D1/D2 podjednotky LSU oblasti od 30 vzorků, dlouhé 550-580 bp. Kromě sekvencí druhů, které jsou hlavním předmětem práce, byly získány také sekvence LSU sekvence tří vzorků druhu *Uromyces ficariae. U. ficariae* je mikrocyklická rez tvořící telia na *Ficaria verna.* Do analýz byla začleněna pro ověření teorie tzv. *correlated species* (Tranšelova pravidla) o evoluci druhů (Cummins et Hiratsuka 2003). Cílem bylo zjistit, zda jsou *U. poae* a *U. ficarie* příbuzné druhy.

Při konstrukci fylogenetického stromu bylo porovnáváno 557 pozic, 29 variabilních a 28 parsimoně informativních.

Podle informací publikovaných ve studii Maier et al. (2007) nejsou druhy *U. ficariae* a *U. poae* blízce příbuzné, Tranšelovo pravidlo zde tedy neplatí. Získané sekvence druhu *U. ficariae* byly porovnány se sekvencemi publikovanými v uvedené studii, poté byla větev druhu *U. ficariae* použita pro zakořenění získaného stromu.



Obr. 8: Fylogenetický strom LSU oblastí 30 vzorků vytvořený metodou neighbor-joining v programu Mega 4 na základě LogDet modelu. Zvolením možnosti *pairwaise deletion* bylo k jeho konstrukci využito všech pozic. Hodnoty *bootstrapu* vypočítány 1000 replikacemi, zobrazeny jsou pouze hodnoty vyšší než 40.

Sekvence LSU posloužily pro podpoření rozčlenění druhů na základě ITS a pro identifikaci druhu *P. magnusiana.* Všechny studované druhy jsou dobře odlišitelné i za použití této konzervativní pojdenotky.

.Aecidium ranunculacearum (vzorky 08-1 a 07-5), které měly ITS sekvence stojící mimo ostatní druhy jsou ve sledovaném úseku LSU rDNA identické se sekvencemi *U. poae.*

3.3. Hledání vhodné metody identifikace aecií

3.3.1. RAPD

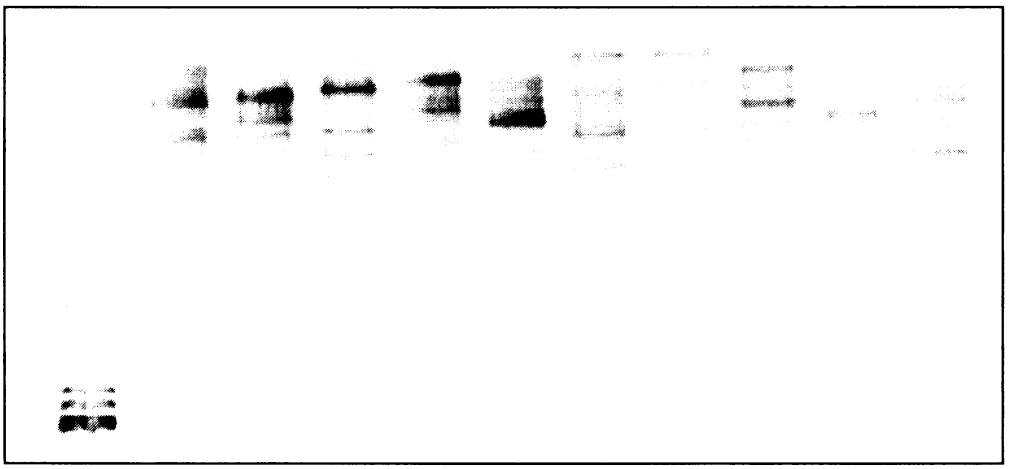
Během optimalizace metody bylo testováno použití pěti primerů (OPA 02, OPA 9, OPA 20, 8F, a 10R) a různá ředění DNA (neředěná a ředěná 50x a 100x).

Reakce s primerem OPA 20 vůbec neproběhla, s OPA 02 proběhla jen velmi slabě. Přesto, že reakce se zbylými primery proběhla poměrně silně, výsledkem bylo jen několik nezřetelných proužků.

Jako vhodná se ukázala DNA neředěná, případně 50x ředěná. Reakce se 100x ředěnou DNA neproběhla. Původně bylo použito 18 μl PCR směsi a 1 μl DNA, toto množství bylo z důvodu slabého výsledku postupně navýšeno až na 4 μl.

Stále byl ale výsledek reakce dosti nevýrazný, proto bylo testováno různé množství $MgCl_2$ vstupujícího do reakce, ale u žádné z variant nebylo zaznamenáno významné zlepšení RAPD fingerprintu.

Přes veškeré optimalizace většinou nebyl výsledek RAPD reakce zřetelný. Navíc fingerprinty získané od vzorků stejných druhů si nebyly příliš podobné (obr. 9). Proto byla tato metoda opuštěna.



Obr. 9: Jeden ze zřetelnějších výsledků RAPD reakce. S primerem 8F (5 vzorků vlevo) a 10R (5 vzorků vpravo). Vždy 2 vzorky druhu *U. poae*, 2 vzorky *U. dactylidis* a jeden *P. magnusiana.*

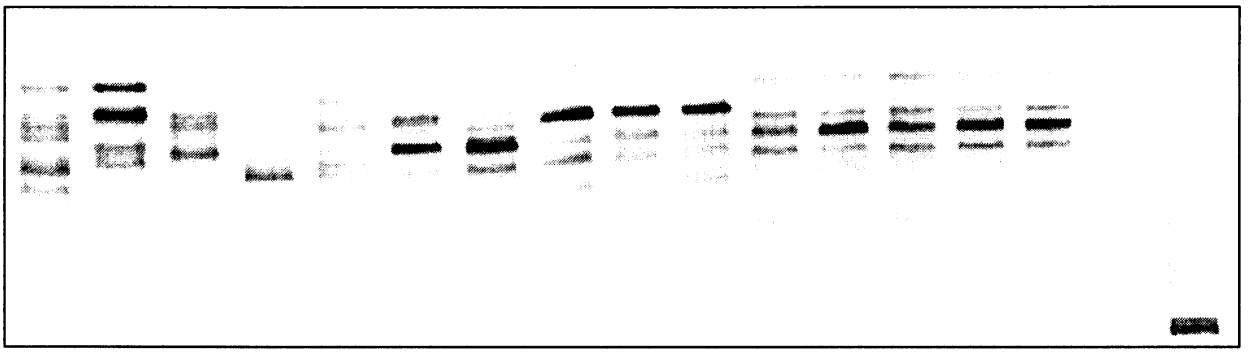
3.3.2. PCR s primery ERIC a M13

Pro testování použitelnosti těchto primerů pro odlišení druhů byly s jednotlivými primery amplifikovány vždy alespoň tři vzorky od každého druhu.

PCR s primerem ERIC 1R u všech vzorků produkovala pattern s jedním velmi výrazným fragmentem shodné, nebo velmi podobné délky a s několika proužky nevýraznými.

Výsledkem PCR s primerem ERIC 2 byly u některých vzorků jednotlivých druhů (např. 07-7 a 07-8 druhu *U. poae*) shodné fingerprinty, ale u dalšího vzorku (07-10) téhož druhu byl získaný fingerprint odlišný. U vzorků druhu *P. magnusiana* byly fingerprinty všech vzorků velmi odlišné.

Fingerprinty získané PCR s primerem M13 core vykazovaly v rámci jednotlivých druhů různou míru variability. Viz obr. 10. Druhově specifické fragmenty společné pro všechny testované vzorky příslušného druhu se podařilo získat pouze u *U. poae* a *P. perplexans*.



Obr. 10: Výsledek rep-PCR s primerem M13 core
Zleva: tři vzorky *P. magnusiana*, tři vzorky *U. dactylidis*, vzorek 07-5, tři vzorky *U. poae* a 5 vzorků *P. perplexans*.

3.3.3. ISSR

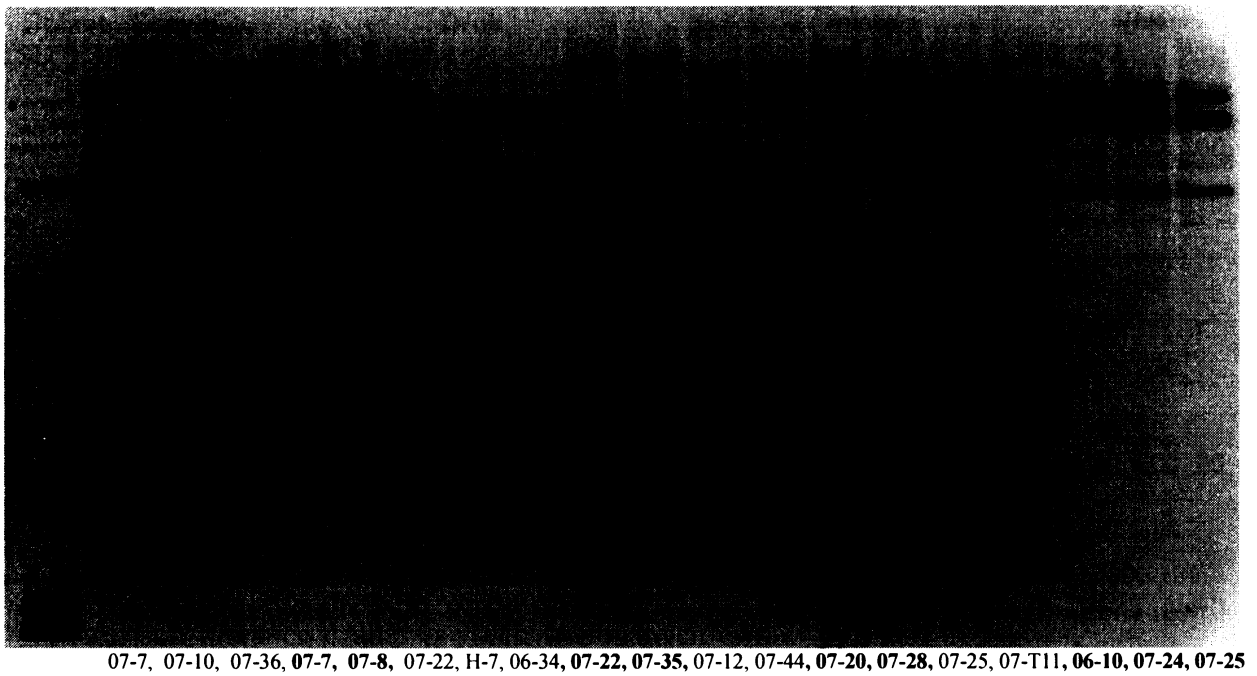
Touto metodou bylo zpracováno celkem 23 vzorků. Vždy 4 vzorky od každého druhu, a několik vzorků neurčených.

Byly vyzkoušeny primery 834c, 834t a jejich kombinace. Ve všech případech byly nalezeny druhově specifické proužky, ale fingerprinty získané s použitím primeru 834c byly nejvýraznější.

Pokus byl několikrát zopakován. I při zopakování pokusu byly fingerprinty jednotlivých druhů velmi podobné.

Na obrázku č. 11 jsou naneseny produkty získané při dvou ISSR reakcích, které byly

uskutečněny s časovým odstupem 14 dnů. Z první reakce pocházejí vzorky označené tučně, ostatní jsou z reakce druhé. U všech studovaných druhů byly nalezeny druhově specifické fragmenty, jejich porovnáním bylo možné jednotlivé druhy rozlišit.



07-7, 07-10, 07-36, **07-7**, **07-8**, 07-22, H-7, 06-34, **07-22**, **07-35**, 07-12, 07-44, **07-20**, **07-28**, 07-25, 07-T11, **06-10**, **07-24**, **07-25**

Obr. 11: Výsledek ISSR s primerem 834c Zleva 5 vzorků *U. poae*, 5 vzorků *U. dactylidis*, 4 vzorky *P. perplexans* a 5 vzorků *P. magnusiana*.

3.3.4. PCR-RFLP

Nejprve byly zkonstruovány restrikční mapy ITS i LSU oblastí jednotlivých druhů, ty byly následně porovnány. V každé z oblastí byly vytipovány enzymy, které rozliší jednotlivé druhy. A dále enzymy pro všechny druhy shodné, které poslouží pro ověření, že amplifikovaný fragment byl skutečně od rzi.

Pro restrikci LSU byly vytipovány takové 3 enzymy, aby bylo možné identifikovat jednotlivé druhy.

Pro oblasti ITS byl nejprve vytipován enzym pro odlišení druhu *P. magnusiana*. Důvodem bylo, že od tohoto druhu byla získána pouze sekvence ITS2 oblasti. Poté byly porovnávány restrikční mapy ITS oblastí zbylých 3 druhů a k jejich restrikci vytipovány opět 3 enzymy.

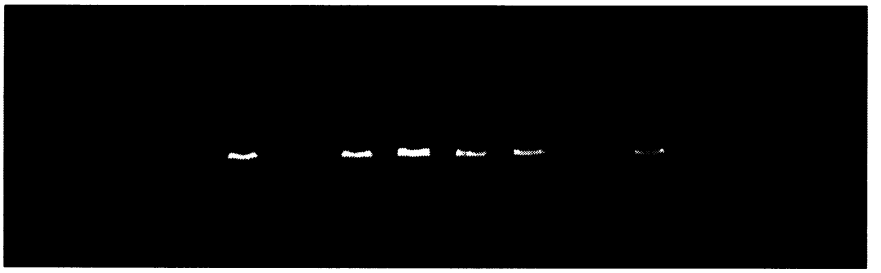
V tabulce č. 5 jsou shrnuty informace o počtu a místech štěpení ITS i LSU oblastí jednotlivých druhů rzí při použití vytipovaných enzymů. Tyto informace byly získány na základě porovnání restrikčních map jednotlivých druhů. Pro účely mapování nebyly použity okrajové nečitelné části sekvencí, proto informace o místě štěpení a délky prvního a posledního fragmentu jsou pouze relativní, vztažené k délce porovnávaných úseků.

Oblast	Enzym	Druh	Počet štěpení a místo	Předpokládané velikosti fragmentů (bp)
LSU	Hpa I	Všechny 4 druhy	1 (320)	320, 230
	Dde I	P. magnusiana	2 (190, 240)	190, 50, 300
		U. poae a P. perplexans	3 (190, 240, 490)	190, 50, 240, 60
		U. dactylidis	4 (190, 240, 390, 490)	190, 50, 150, 100, 60
	EcoN I	U. poae a U. dactylidis	1 (390)	390, 160
		P. perplexans a P. magnusiana	0	
ITS	Bcl I	P. magnusiana	1 (v ITS2 oblasti)	
		P. perplexans, U. dactylidis, U. poae	0	
	Cla I	P. perplexans, U. dactylidis, U. poae	1 (240)	240, 350
	Mbo II	U. poae	2 (260, 380)	260, 120, 230
		U. dactylidis, P. perplexans	1 (260)	260, 340
	Mnl I	P. perplexans, U. poae	2 (390, 590)	390, 200, 20
		U. dactylidis	3 (160, 390, 590)	160, 230, 200, 20

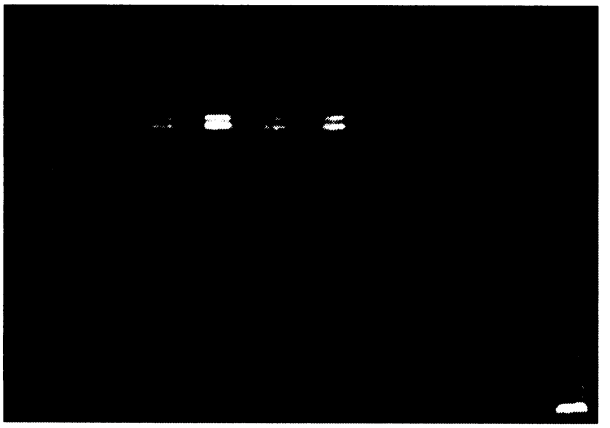
Tab. 5: Přehled vytipovaných enzymů

Použitelnost metody PCR-RFLP byla ověřena na oblasti LSU. Byla vyzkoušena restrikce enzymy Hpa I a Dde I.

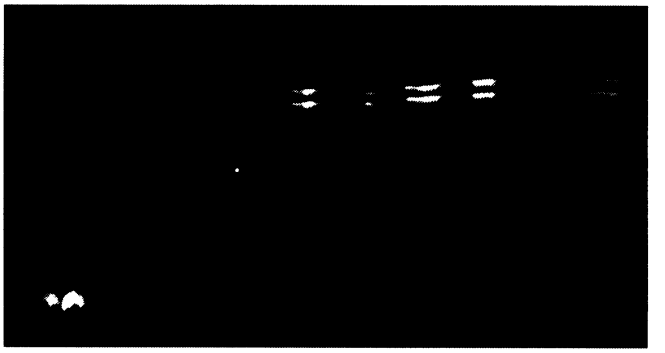
Amplifikované oblasti LSU a výsledky restrikce jsou na obrázcích č 12-14. Restrikce proběhla úspěšně oběma restrikčními enzymy u všech vzorků. Získané fragmenty svou délkou odpovídaly fragmentům očekávaným. Fragmenty o délce menší než 100 bp byly velmi nezřetelné.



Obr. 12: Amplifikované fragmenty LSU.



Obr. 13: Fragmenty získané HpaI.



Obr. 14: Fragmenty získané DdeI.

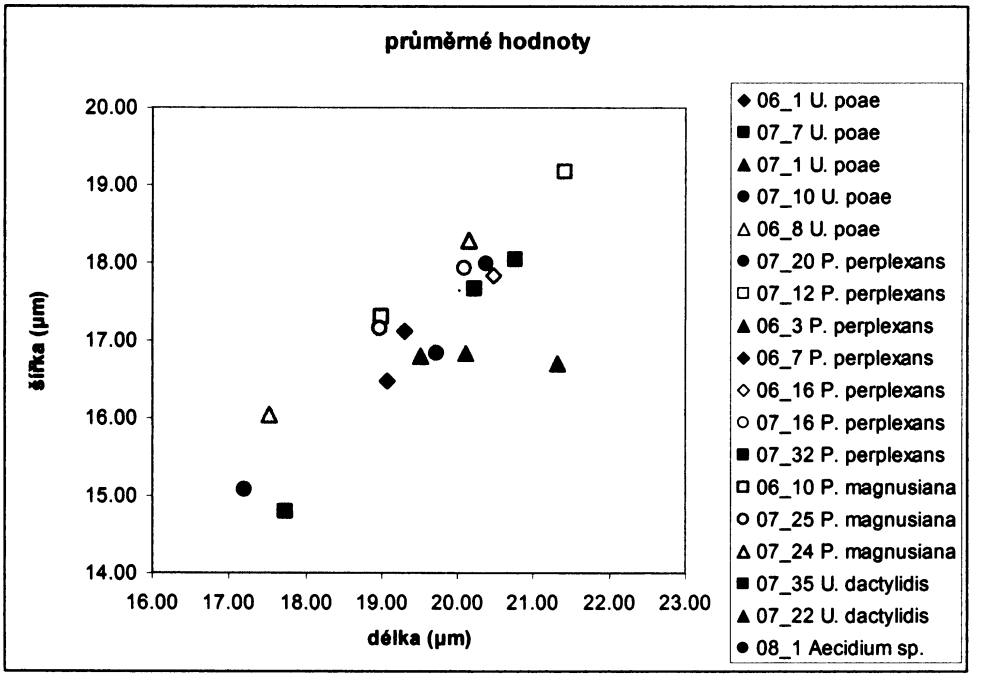
3.4. Studium morfologie aeciospor

3.4.1. Měření délky a šířky aeciospor

Celkem byly proměřeny aeciospory 18 vzorků. Od každého vzorku bylo měřeno 45-59 spor z jednoho ložiska.

Druh	Vzorek	Počet měření	Délka min-max	Délka průměr ± směrodatná odchylka	Šířka min-max	Šířka průměr ± směrodatná odchylka
U. dactylidis	07_35	56	17,7 – 25,0	20,76 ± 1,51	16,0 – 21,5	18,04 ± 1,26
U. dactylidis	07_22	59	17,2 – 25,3	20,12 ± 1,68	14,0 – 19,2	16,83 ± 1,20
U. poae	06_1	54	16,1 – 23,2	19,08 ± 1,65	13,0 – 20,4	16,46 ± 1,65
U. poae	07_7	56	14,3 – 21,1	17,74 ± 1,40	11,8 – 17,1	14,79 ± 1,17
U. poae	07_1	50	14,9 – 25,0	19,52 ± 1,97	13,2 – 20,5	16,79 ± 1,48
U. poae	07_10	56	14,4 – 20,6	17,21 ± 1,39	12,6 – 18,1	15,08 ± 1,14
U. poae	06_8	53	14,8 – 20,5	17,53 ± 1,30	13,8 – 18,8	16,04 ± 1,23
P. perplexans	07_20	55	16,8 – 23,9	19,72 ± 1,38	14,3 – 22,0	16,82 ± 1,60
P. perplexans	07_12	55	18,4 – 23,9	21,42 ± 1,38	15,6 – 22,5	19,16 ± 1,33
P. perplexans	06_3	54	17,0 – 25,8	21,31 ± 1,80	14,0 – 20,3	16,70 ± 1,53
P. perplexans	06_7	56	16,7 – 23,2	19,31 ± 1,45	15,2 – 20,2	17,11 ± 0,95
P. perplexans	06_16	45	18,1 – 23,8	20,47 ± 1,27	15,5 – 20,4	17,83 ± 1,04
P. perplexans	07_16	51	16,7 – 22,8	20,09 ± 1,33	13,8 – 22,0	17,93 ± 1,43
P. perplexans	07_32	50	18,0 – 24,7	20,24 ± 1,26	14,6 – 19,6	17,66 ± 1,23
P. magnusiana	06_10	54	17,2 – 22,1	19,00 ± 0,89	15,9 – 19,3	17,31 ± 0,81
P. magnusiana	07_25	55	16,5 – 23,5	18,99 ± 1,50	14,6 – 19,3	17,14 ± 0,97
P. magnusiana	07_24	52	17,5 – 22,6	20,14 ± 1,31	14,1 – 21,2	18,28 ± 1,78
08_1		48	17,9 – 23,4	20,39 ± 1,23	15,5 – 20,3	17,99 ± 1,11
U. dactylidis	vše	115	17,2 – 25,3	20,36 ± 1,62	14,0 – 21,5	17,42 ± 1,37
U. poae	vše	269	14,3 – 25,0	18,19 ± 1,79	11,8 – 20,5	15,80 ± 1,55
P. perplexans	vše	366	16,7 – 25,8	20,36 ± 1,60	13,8 – 22,5	17,59 ± 1,54
P. magnusiana	vše	161	16,5 – 23,5	19,37 ± 1,36	14,1 – 21,2	17,57 ± 1,34

Tab. 6: Tabulka získaných hodnot [μm]



Obr. 15: Graf znázorňující průměry naměřených hodnot.

Statistickým vyhodnocením délky a šířky spor jednotlivých druhů (všech proměřených vzorků dohromady) byl odhalen rozdíl v šířce spor druhu *U. poae* od šířky spor všech ostatních druhů, které se od sebe statisticky nelišily. V délce se odlišovaly navzájem všechny druhy, kromě dvojice *U. dactylidis* a *P. perplexans*.

3.4.2. Studium ornamentiky aeciospor

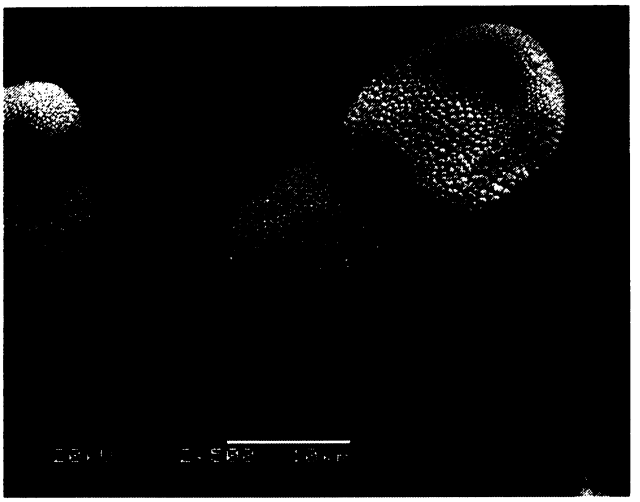
Pomocí SEM byly pozorovány vždy dvě položky od každého druhu 07-22 a 07-35 (*U. dactylidis*), 06-1 a 07-7 (*U. poae*), 06-10 a 07-24 (*P. magnusiana*), 07-28 a 07-12 (*P. perplexans*).

V první fázi byla snaha postihnout celkovou ornamentiku ve vztahu k orientaci spory, zejména z důvodu ověření informací o možné odlišné velikosti bradavek na různých místech spory. Pro tyto účely bylo nutné zaznamenat spory, které byly dosud spojené v řetízcích.

Bylo zjištěno, že na buněčné stěně aeciospor všech studovaných druhů jsou přítomny zóny pokryté hrubšími bradavkami a zóny s jemnějšími bradavkami. Proto bylo prohlédnuto od každého vzorku více spor se záměrem zjistit, zda je způsob zonace druhově specifický.

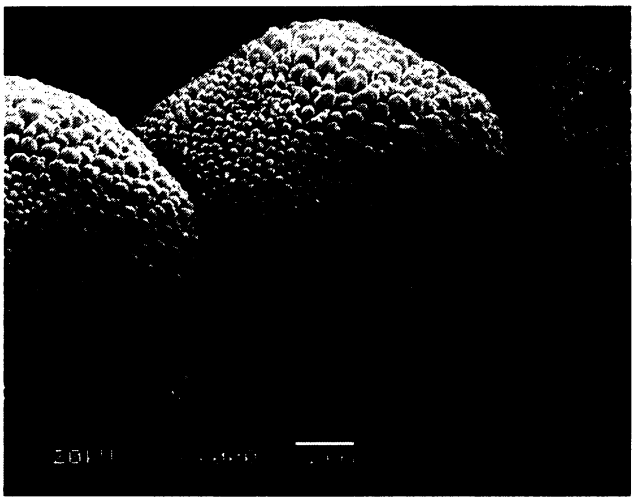
Byly nalezeny různé způsoby zonace (obr. 16). Nejčastější byly tyto dva způsoby: Polovina spory jemně a polovina hrubě bradavčitá, s různou orientací těchto zón vzhledem ke spoře. Často byly zaznamenány jemně bradavčité spory s pásem hrubých bradavek uprostřed, probíhajícím pravděpodobně okolo celé spory.

Bradavky spor byly velmi variabilní ve velikosti i tvaru (obr. 17). Velmi variabilní byly také odstupy bradavek. Tyto znaky byly odlišné i v rámci jedné spory. Nepodařilo se najít žádné specifické mezidruhové odlišnosti. Pouze u druhu *P. magnusiana* se zdály být bradavky drobnější a s většími odstupy. Byly zaznamenány různé tvary bradavek, které ale nebyly u všech spor daného vzorku shodné.

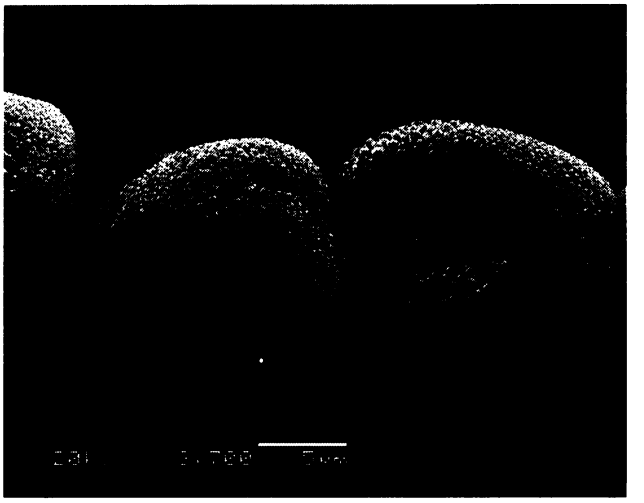


07-35 *U. dactylidis*

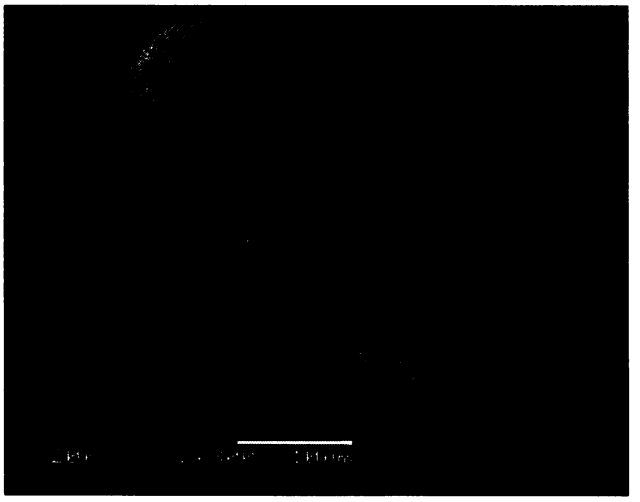
06-1 *U. poae*



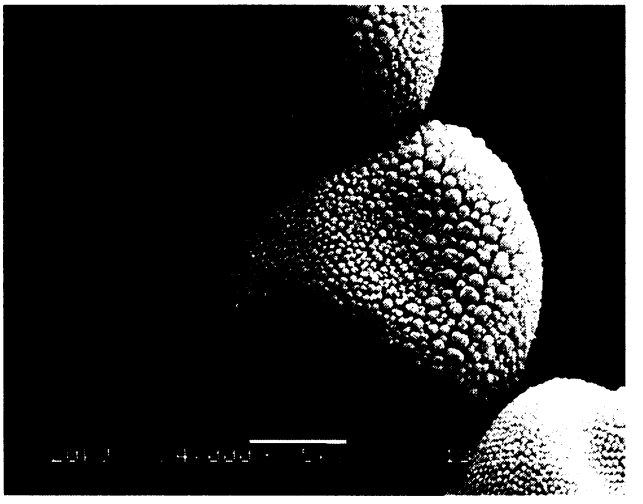
07-7 *U. poae*



07-7 *U. poae*

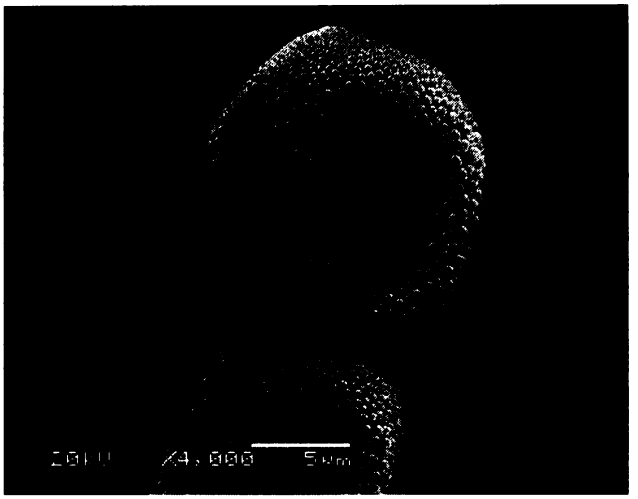


06-10 *P. magnusiana*

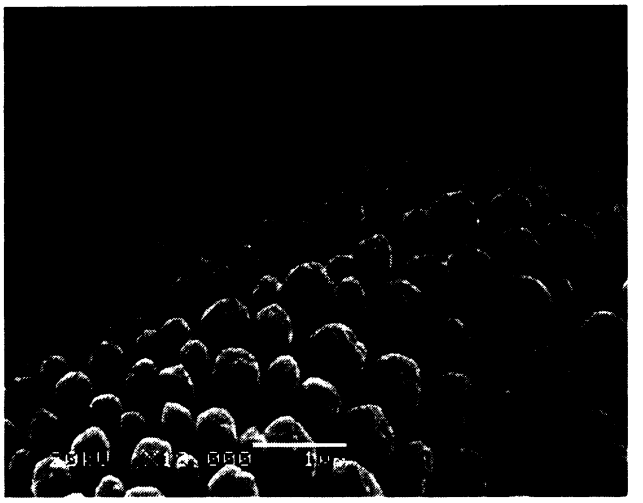


07-28 *P. perplexans*

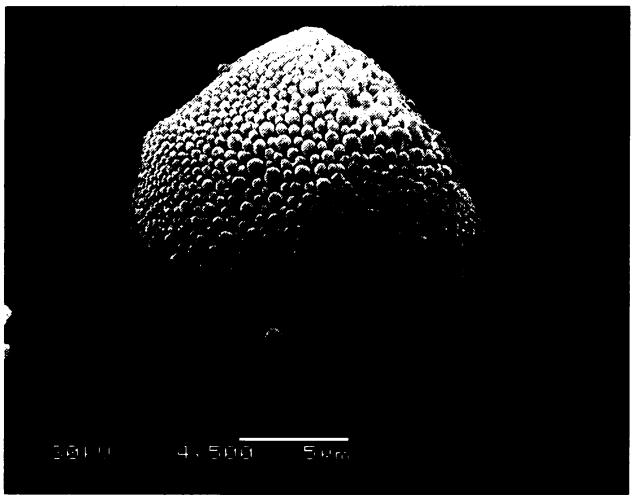
Obr. 16: Řetízky aeciospor, různé způsoby zonace.



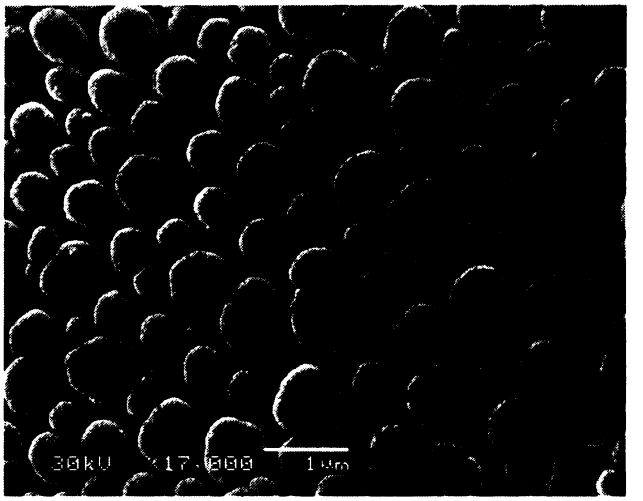
06-10 *P. magnusiana*



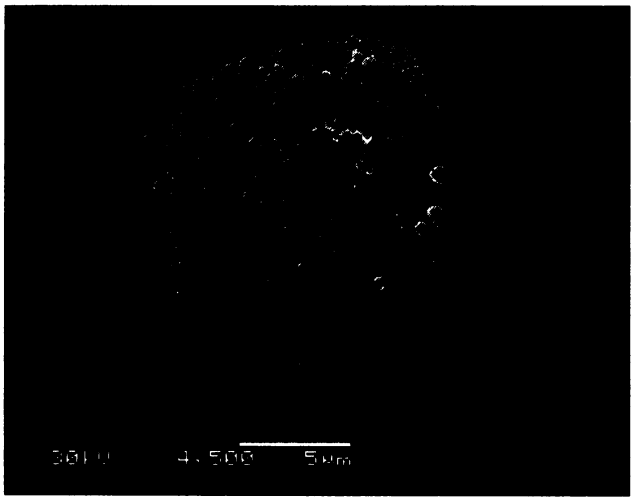
06-10 *P. magnusiana*



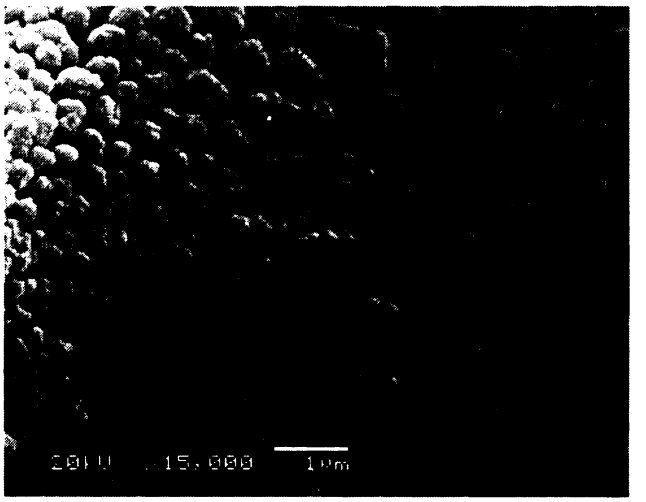
06-1 *U. poae*



07-12 *P. perplexans*



07-12 *P. perplexans*



07-22 *U. dactylidis*

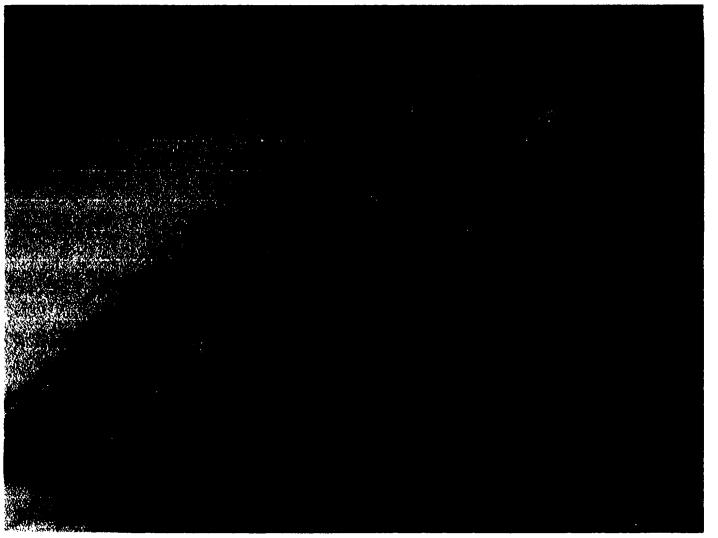
Obr.17: Detaily povrchu aeciospor

3.4.3. Morfologická odlišnost aecií vzorku 08-1

Aecia vzorku 08-1 se výrazně odlišují od všech ostatních aecií. Jsou spíše tvaru lahvicovitého, s okraji roztřepenými, ale neohrnutými (obr. 18 a 19).

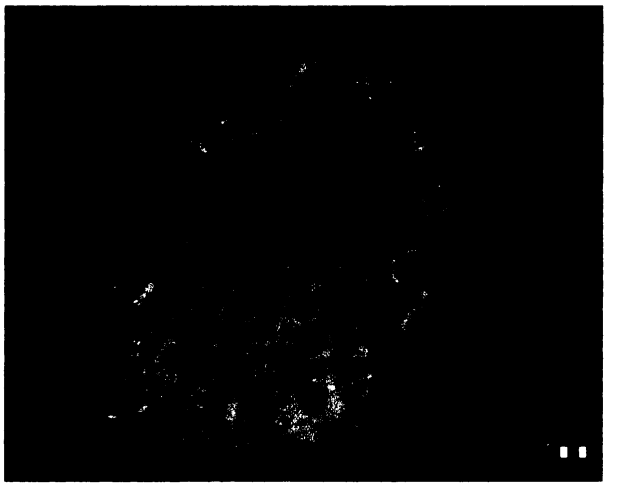
Typická aecia studovaných druhů jsou vyobrazena na obrázcích 20 a 21. Jsou pohárkovitého tvaru s ohrnutými, roztřepenými okraji peridie.

Obr. 18: Aecia, vzorek 08-1



Obr. 19: Aecia, vzorek 08-1

Obr. 20: Aecia na *Ranunculus repens*



Obr. 21: Aecia na *Ficaria verna*

4. DISKUSE

4.1. Metodika

Izolace

Přesto že vlastní metoda izolace byla v porovnání s jinými metodami izolace uváděné u rzí (viz. kapitola 1.2.) jedna z jednodušších, s vynecháním čištění DNA, podařilo se takto izolovanou DNA úspěšně amplifikovat i získat její sekvence. Z důvodu omezené doby její použitelnosti a z důvodu předpokládaného negativního vlivu nečistot při metodách PCR fingerprintingu nebyla tato metoda dále používána. Pro metody PCR fingerprintingu byla proto používána pouze DNA získaná komerční izolační sadou.

U rzí se k izolaci DNA používá většinou čerstvý materiál, případně materiál starý cca 2-5 let (Weber et al. 2003). Nám se podařilo úspěšně izolovat DNA ze dvou položek pocházejících z roku 1992. Úspěšnou izolaci z materiálu herbářového, starého až 15 let, uvádí ve své práci také Abassi et al. (2005).

PCR amplifikace rDNA a sekvenování

Získávání sekvencí LSU oblastí většinou nebylo problematické, pokud byly získány nekvalitní sekvence, byla důvodem pravděpodobně kontaminace jinou DNA. Při zopakování PCR, případně s nově izolovanou DNA byla již sekvenace úspěšná.

PCR amplifikace a sekvenování ITS oblastí bylo ve srovnání s LSU problematické. Důvodem jsou pravděpodobně motivy v ITS oblastech složené z úseku cca deseti cytosinů a deseti thyminů v ITS1 a úsek v ITS2 oblasti bohatý na adenin a thymin. Tyto oblasti patrně tvoří smyčku a výsledky sekvenační reakce se dále stávají nekvalitními. Jedná se o velmi variabilní oblasti. U některých vzorků byla sekvenace bez problémů. U jiných byl, i přes opakované pokusy, chromatogram od začátku této oblasti nečitelný. Ani sekvenování obou komplementárních řetězců nebylo v těchto případech úspěšné.

Problematické získávání ITS sekvencí z důvodu přítomnosti oblasti bohaté na cytosin uvádějí i Littlefield et al. (2005) u druhu *P. lagenophorae*.

Při práci s přírodními sběry bývá vždy i vysoké riziko kontaminace, například houbami žijícími v ložiscích rzí, případně dalšími parazity na tomtéž hostiteli, nebo i DNA hostitelské rostliny.

Z výše uvedených důvodů bylo až 35% získaných ITS sekvencí nečitelných či napatřilo rzím.

Posouzení použitelnosti studovaných oblastí rDNA.

ITS a LSU oblasti byly vybrány na základě předchozích studií na rzích, ve kterých se tyto geny používají mnohem častěji, než jakékoli jiné. Výhodou byl proto i dostatek dostupných publikovaných sekvencí od mnoha druhů rzí.

ITS oblasti byly studovány u všech významných rodů rzí, například u rodů *Uromyces* (Pfunder et al. 2001, Chung et al. 2004)), *Melampsora* (Nakamura et al. 1998, Smith et al. 2004),*Phragmidium* a nespočet studií u rodu *Puccinia* (Anikster et al. 2004, Abbasi et al. 2005, Szabo 2006).

V případě LSU oblastí velké množství sekvencí napříč řádem *Uredinales* pochází ze studií Aime et al. (2006) a Maier et al. (2007).

LSU

Velká podjednotka rDNA je poměrně konzervativní úsek, který se často využívá při studiích na vyšší taxonomické úrovni. Nicméně i v této podjednotce, konkrétně v D1/D2 doméně, se nachází velmi variabilní úseky, ve kterých lze najít odlišnosti mezi jednotlivými velmi příbuznými druhy (Maier et al. 2003).

Během mé práce byla nalezena, v sekvencích LSU oblastí studované skupiny rzí, velmi malá mezidruhová variabilita (10 variabilních pozic). Vnitrodruhová variabilita byla odhalena pouze u druhu *U. ficariae*.

Původně bylo v plánu využít LSU sekvencí k zařazení studovaných druhů do fylogenetické souvislosti s dalšími druhy. Ale po srovnání sekvencí s publikovanými sekvencemi blízce příbuzných druhů byla nalezena jen velmi malá variabilita.

Pro orientaci byl zkonstruován fylogenetický strom, který není v práci publikován. LSU se ukázala být pro zařazení druhů mezi nejblíže studované druhy nevhodná. Klady jednotlivých druhů měly sice bootstrapovou podporu relativně vysokou, kdežto vyšší skupiny nikoliv.

Na omezenou použitelnost LSU, na úrovni druhu a nižší ve studované skupině rzí, ukazuje zařazení vzorku 08-1 ke vzorkům *U. poae*. Vzorek 08-1 lze považovat dle analýzy ITS, morfologie i hostitele za unikátní skupinu stojící mimo ostatní druhy (viz. dále).

ITS

Oblasti ITS mají větší variabilitu a liší se i mezi sesterskými druhy a měly by odlišit i vnitrodruhové taxonomické jednotky. (Zambino et Szabo 1993, Anikster et al. 2004, Szabo 2006).

U studovaných druhů byla odhalena variabilita v oblastech ITS1 i ITS2, sekvence oblasti

5,8S byla u všech vzorků druhů *U. dactylidis, U. poae* a *P. perplexans* shodná. Od druhu *P. magnusiana* byla získána pouze sekvence ITS2, proto nebylo u tohoto druhu možné posoudit variabilitu ITS1 a 5,8S.

V sekvencích ITS byla kromě variability mezidruhové nalezena i variabilita vnitrodruhová. Variabilita sekvencí v rámci druhu se pohybovala od 0% (*U. dactylidis*) do 1,2% (P. *perplexans*). V rámci skupiny *U. dactylidis* a *U. poae* byla nalezena variabilita cca 5%, což není příliš vysoká hodnota. Například Abbasi et al. (2005) odhalili u druhu *P. graminis* podobnou míru variability (6%), ale na úrovni vnitrodruhové.

Analýza sekvencí ITS oblastí se ukázala být vhodnou pro odlišení jednotlivých druhů i pro zařazení studované skupiny mezi nejblíže příbuzné rzi.

4.2. Vyčlenění skupin a posouzení jejich taxonomické hodnoty

Na základě analýzy sekvencí a jejich porovnání se sekvencemi z determinovaného teliálního materiálu byly vzorky rozčleněny do statisticky dobře podpořených skupin, s minimální variabilitou uvnitř skupiny a větší genetickou distancí od skupin sousedních (tzv. fylogenetické druhy, Taylor et al. 2000) Pojetí druhu je u rzí všeobecně velmi problematické (Poelt et Zwetko 1997).

Molekulární metody vnáší do systematiky další poznatky, které je nutné interpretovat v návaznosti na ostatní znalosti (morfologie, ekologie).

Níže uvedené skupiny byly považovány za odlišné druhy. Ale aby bylo možné druhy jednoznačně definovat, bylo by nutné zpracovat mnohem více materiálu z různých hostitelů a různých geografických oblastí. Nutné by bylo také studovat více genů.

Skupina *P. magnusiana*

Velmi výrazně od ostatních odčleněna na základě ITS i LSU rDNA. Z mezihostitelů byla nalezena pouze na *Ranunculus repens*, který je uváděn jako nejběžnější mezihostitel (Urban 1966).

Ze studovaných morfologických znaků byla odhalena poněkud odlišná ornamentika aeciospor. Bradavky byly v porovnání s aeciosporami ostatních druhů jemnější a s většími odstupy. Majewski (1979) uvádí aeciospory hustě pokryté jemnými bradavkami s rozestupy okolo 0,5 μm.

Zjištěné průměrné velikosti aeciospor 14,1 – 21,2 x 16,5 – 23,5 μm zcela neodpovídaly žádným z uváděných údajů (Azbukina 1974, Urban 1966, Gäumann 1959, Majewski 1979).

Skupina *P. perplexans*

Na základě analýzy ITS se jedná o sesterský druh ke skupině *U. poae/U. dactylidis*. Od ostatních dobře oddělená na základě ITS i LSU.

Jako mezihostitel nalezen a prokázán pouze *Ranunculus acris*. V literatuře je právě *R. acris* uváděn jako nejčastější mezihostitel. Dále jsou jako mezihostitelé uváděny ještě druhy *R. lanuginosus* či *R. serbicus*, na nich ale nebyla během studie nalezena žádná ložiska.

Buněčná stěna aeciospor je pokrytá jemnými bradavkami, na horní části spory by měly být bradavky hrubší (Majewski 1979). Určitá zonace aeciospor sice odhalena byla, ale nejednalo se vždy o horní část spory.

Uváděné rozměry aeciospor 18-26 × 15-20 µm (Urban 1966, Majewski 1979, Gäumann 1959) se výrazně neodlišovaly od rozměrů zjištěných (16,7 – 25,8 x 13,8 – 22,5 µm).

Skupina *U. dactylidis*

Nebyla nalezena žádná vnitrodruhová variabilita sekvencí, přestože se jednalo o položky z různých míst republiky.

Byly nalezeny pouze dvě položky aecií, obě na *Ranunculus repens*. Jejich sekvence se shodovaly se sekvencemi z telií. Přesto, že je tento druh uváděn také na *Ranunculus acris* (Gäumann 1959), nebyla žádná z aecií nalezených na tomto hostiteli přiřazena ke druhu *U. dactylidis*.

Uváděné velikosti aeciospor jsou mírně odlišné od hodnot naměřených. Naměřené hodnoty byly 17,2 – 25,3 x 14,0 – 21,5 µm, těmto hodnotám se nejvíce blíží hodnoty uváděné v práci Azbukina (1974) 17,8-24 × 13-20 µm,

Buněčná stěna aeciospor je uváděna s drobnými, ale výraznými bradavkami (Urban 1966). U některých pozorovaných aeciospor byla zjištěna určitá hrubší struktura bradavek (viz. obr. 17, kapitola 3.4.).

Skupina *U. poae*

Tato skupina byla dobře podpořena na základě analýzy ITS oblastí. Na základě LSU oblastí byly k této skupině přiřazeny i vzorky 08-1 a 07-5.

Informace o velikosti aeciospor se v literatuře mírně rozchází, ale naměřené hodnoty 14,3 – 25 x 11,8 – 20,5 µm se výrazně neodlišují od hodnot uváděných v pracích Urban (1966) a Gäumann (1959). Spory jsou v porovnání s ostatními druhy menší, byla nalezena statisticky průkazná odlišnost v šířce spor od všech ostatních druhů. Velikost je tedy dalším znakem podporujícím samostatnost tohoto druhu.

Urban (1966) uvádí nápadné, v menším počtu se vyskytující, silně světlolomné ploché bradavky, které se snadno odlamují a zanechávají holé místo (Urban 1966). Tyto byly hledány pomocí SEM, nebylo tedy možné posoudit jejich světlolomné vlastnosti. U některých aeciospor byly nalezeny větší vyčnívající bradavky, ale nejen u tohoto druhu.

Jako mezihostitelé jsou uváděny druhy *Ficaria verna*, *Ranunculus auricomus* a *R. bulbosus*. Všechny analyzované položky aecií přiřazené do této skupiny, ale pocházely z *Ficaria verna*.

Samostatnost druhu *Uromyces poae* je dosud nejistá, Urban (1966) ho považuje za samostatný, ale například Cummins (1971) považuje tento druh pouze za součást *Uromyces dactylidis*, uvádí ho jako *U. dactylidis* var. *poae*. Fyziologicky se *U. poae* liší od *U. dactylidis* v tom, že nepřechází na *Dactylis glomerata* a opačně *U. dactylidis* je specifickou pro *Dactylis*.

Na základě informací zjištěných během této práce se přikláním k samostatnému pojetí druhu *U. poae*. Svědčí o tom sekvence ITS, velikosti aeciospor i druhově specifické fingerprinty získané metodou ISSR (viz. dále).

Nezařazené vzorky v rámci skupiny U.poae/U. dactylidis

08-1

Aecia od ostatních zřetelně odlišná, peridie protáhlá až lahvicovitá (viz. kapitola 3.4.3.). Spory výrazně zbarvené, žlutooranžové. Hostitel *Ranunculus* sp., bližší určení hostitele nebylo možné, protože rostlina nebyla sebrána v určitelném stavu.

Na základě analýzy ITS nebyl vzorek přiřazen k žádnému z teliálních vzorků. Na základě LSU byl vzorek přiřazen ke druhu *U. poae*. Ale variabilita sekvencí ITS mezi *U. poae* a vzorkem 08-1 byla cca 3%.

Mohlo by se jednat o aecia náležející druhu *U. festucae*. Gäumann (1959) uvádí u tohoto druhu prodlouženou vyčnívající peridii aecií. I rozměry aeciospor se shodují s informacemi z literatury (Majewski 1977, Urban 1966, aj.). Bohužel nebyla k dispozici sekvence z teliálního materiálu *U. festucae*, která by tuto teorii mohla podpořit.

07-5, 07-6

Aecia morfologicky od ostatních druhů neodlišitelná. Hostitel *Ranunculus auricomus* (07-5), *Ranunculus* cf. *repens* (07-6).

Obě položky pochází ze stejné lokality z Posázaví (vlhký úvoz lesní cesty). Nebyly

přiřazeny k žádnému z teliáních vzorků. Stejně jako vzorek 08-1 byly na základě sekvencí ITS začleněny do skupiny druhů *U. poae* a *U. dactylidis*. Vzorek 07-5 byl na základě LSU přiřazen k druhu *U. poae*, LSU sekvence vzorku 07-6 nebyla získána.

Jednou z možností je, že by se mohlo jednat o *U. poae* f.sp. *ranunculi.* Podle Urbana (1966) existují dvě formy druhu *U. poae* a to f. sp. *ranunculi* a f. sp. *ficariae*. Všechny ostatní položky aecií pocházející z *Ficaria verna*, které byly přiřazené k druhu *U. poae,* by pak náležely k *U. poae* f. sp. *ficariae.*

4.3. Zhodnocení použitelnosti testovaných metod k identifikaci druhů

RAPD

Tato metoda se převážně používá ke studiu diversity vnitrodruhové (Kolmer et al. 1995Pei et al. 1997, Kolmer et Liu 2000), ale tito autoři uvádí i přítomnost druhově specifických fragmentů. Studované druhy se mi touto metodou nepodařilo rozlišit.

Metodu jsem vyzkoušela opakovaně. Přes snahu optimalizovat reakci byly získané fragmenty vždy velmi nezřetelné. Po porovnání fingerprintů vzorků stejných druhů, identifikovaných na základě analýzy ITS, nebyly nalezeny žádné spolehlivé druhově specifické fragmenty. Velký vliv mělo pravděpodobně malé spektrum testovaných primerů, kontaminace jinými houbami, nebo i bakteriemi (Dyer et Leonard 2000) a také patrně nedostatečná kvalita DNA.

Edwards et. al. (1999) testovali pro RAPD použití 113 primerů, pouze šest z nich bylo reprodukovatelných. Odhalili 70% polymorfních proužků v rámci druhu *P. menthae*. Tedy relativně velkou vnitrodruhovou variabilitu. Ta mohla být důvodem, proč jsem při použití pouze pěti primerů nenašla druhově specifické fragmenty.

PCR-RFLP

ITS oblast je dostatečně variabilní na úrovni mezidruhové, ale vykazuje i variabilitu v rámci druhů. Protože enzymy vhodné k rozlišení druhů byly vybrány pouze na základě sekvencí omezeného množství vzorků, výsledek nemusí být u dalších vzorků spolehlivý.

LSU oblast je naopak velmi málo variabilní. Výhodou je, že pozice, které variabilitu vykazují jsou více konzervované než je tomu v ITS oblasti. Z těchto důvodů jsem možnost použití PCR-RFLP vyzkoušela na oblastech LSU.

Bylo nutné vzít v úvahu možnost kontaminace a proto byl pro restrikci použit také enzym, který štěpí sekvence všech studovaných druhů stejným způsobem. Tak bylo možné

ověřit, že amplifikovaný fragment patřil opravdu rzi.

Pro spolehlivé odlišování druhů je možné tuto metodu doporučit pouze v kombinaci se sekvenováním studovaného genu, případně kombinované použití několika enzymů.

Vhodné by bylo vytipovat ještě jiné geny. Vhodné by mohly být geny pro β-tubulin či TEF1-α, ve kterých byla u rzí nalezena variabilita srovnatelná s ITS (Van der Merče et al. 2007) .

PCR s primery ERIC a M13

Pomocí metody s primery ERIC se nepodařilo jednotlivé druhy odlišit. Nevýhoda použití ERIC primerů vyplývá již z jejich podstaty, jsou založeny na sekvencích konservativních oblastí, které se běžně vyskytují u bakterií (Versalovic et al 1991). Z toho důvodu případná bakteriální kontaminace ložisek mohla mít na výsledky této metody velmi významný vliv.

S použitím primeru M13 core byly spolehlivě odlišeny dva druhy (*U. poae a P. perplexans*), druhé dva vykazovaly u jednotlivých vzorků velmi variabilní pattern.

Primery ERIC a M13 mohou postihnout jak variabilitu mezidruhovou, tak i vnitrodruhovou (Edel et al. 1995, Morton et al. 2003), u dvou studovaných druhů byla pravděpodobně zachycena právě variabilita vnitrodruhová.

ISSR

Přestože jsem při této metodě vyzkoušela použití pouze dvou primerů, byly získány druhově specifické fragmenty s malou vnitrodruhovou variabilitou.

Výhodou této metody je, že produkuje reprodukovatelné pattern i při změnách reakčních podmínek (Bornet et Branchard 2001).

Metoda je uváděna jako vhodná k odlišování druhů (Zhou et al. 1999, Wang et al. 2005), což se potvrdilo.

Menzies et al. (2003) uvádí u různých druhů rodu *Ustilago* jen 10-25% vnitrodruhově polymorfních proužků. U jednotlivých studovaných druhů byl při analýze ISSR odhalen velmi malý polymorfismus.

4.4. Morfologická pozorování

Měření délky a šířky spor

Byly proměřeny aeciospory několika vzorků všech studovaných druhů. Podle očekávání byly spory druhu *U. poae* menší. Naměřené hodnoty šířky aeciospor byly prokazatelně odlišné od hodnot naměřených u ostatních druhů.

Nebyla posuzována vnitrodruhová variabilita, ani variabilita v rámci položek. Proto není možné tento znak považovat za spolehlivý.

SEM

Pro pozorování spor ve skenovacím el. mikroskopu byl použit suchý materiál, který se běžně u rzí používá (Lee et Kakishima 1999, Edwards et al. 1999, Chung et al. 2004). Většinou ale bývají pozorovány teliospory, což jsou výtrusy, které mají pevnější buněčnou stěnu. Protože některé pozorované aeciospory měly velmi zborcené buněčné stěny, bylo by vhodnější použít jiný způsob přípravy materiálu.

U spor všech pozorovaných vzorků byly nalezeny zóny s hrubšími a jemnějšími bradavkami. Takto výrazná zonace ale nebyla nalezena u všech spor. Zonace bradavek je zřejmě znak nestálý, navíc nelze pozorovat povrch celé spory, ale pouze cca její polovinu.

Podle dosavadního šetření se nezdá, že by zonace ornamentiky byla druhově specifická. U aeciospor druhu *U. poae* byly nalezeny v podstatě všechny pozorované způsoby uspořádání bradavek na buněčné stěně.

V morfologii bradavek byly nalezeny určité odlišnosti, ale v současné době není možné některé z nich považovat za druhově specifické.

.

5. ZÁVĚR

Během diplomové práce byla úspěšně izolována DNA z čerstvých aecií, uredií i telií a také z několika položek herbářových. Získaná DNA byla použitelná pro PCR amplifikaci rDNA oblastí i další PCR metody.

Byly amplifikovány ITS a LSU oblasti rDNA. Celkem byly získány ITS sekvence 42 vzorků a LSU sekvence 30 vzorků.

Na základě analýzy ITS sekvencí byly vzorky aecií na *Ranunculus* a *Ficaria* rozčleněny do skupin a srovnáním se sekvencemi z materiálu teliálního přiřazeny k jednotlivým druhům.

Velmi výrazně se od ostatních odčlenil druh *P. magnusiana.* Ostatní vzorky si byly více příbuzné, přesto se s vysokou bootstrapovou podporou rozčlenily do druhů *P. perplexans, U. dactylidis* a *U. poae.* Tři vzorky aecií zůstaly nepřiřazené.

Všechny vzorky aecií z *Ficaria verna* byly na základě sekvencí přiřazeny k druhu *U. poae* a všechny vzorky z *Ranunculus acris* byly přiřazeny k druhu *P. perplexans.* Aecia z *Ranunculus repens* byla přiřazena buď k *U. poae, P. magnusiana*, nebo zůstala nepřiřazena.

Sekvence ITS oblastí studovaných druhů byly porovnány s publikovanými sekvencemi blízce příbuzných druhů. Potvrdilo se, že druhy *U. dactylidis*, *U. poae* a *P. perplexans* patří do skupiny hnědých rzí. *P. magnusiana* není zbylým druhům příbuzná, což odpovídá dosavadnímu taxonomickému hodnocení

Sekvence LSU oblasti byly využity pro podporu rozdělení vzorků pomocí ITS. Také byly použity k ověření příbuznosti druhů *U. poae* a *U. ficariae* (teorie tzv. *correlated species*). Bylo potvrzeno, že druhy nejsou blízce příbuzné.

V morfologii aeciospor byly nalezeny určité morfologické odlišnosti ve velikosti. Od ostatních se odlišovaly zejména aeciospory druhu *U. poae*, které byly menší.

V ornamentice povrchu aeciospor nebyla nalezena žádná charakteristická mezidruhová odlišnost.

Byla hledána další vhodná metoda k identifikaci jednotlivých druhů. Vyzkoušeny byly metody RAPD, rep-PCR, PCR-RFLP a metoda ISSR. Jako nejvhodnější pro tyto účely byla vybrána metoda ISSR, která u jednotlivých druhů produkovala specifické pattern.

SUMMARY

Key words: Rust fungi, Puccinia, Uromyces, Ranunculus, Ficaria verna, molecular identification, rDNA

The usability of morphological and molecular markers for the identification of rusts (*Uredinales*) with the aecial stage on *Ranunculus* spp. and *Ficaria verna* was studied. The next aim was to evaluate the taxonomic status of these rust species. Fresh and herbarium material of aecia together with uredia and telia on specific grass hosts were used for analysis.

Phylogenetic analysis of nuclear ribosomal DNA sequences from 42 (ITS) and 30 (LSU) collections grouped into distinct clades supporting separation of aecial collections into distinct species: *Puccinia perplexans, P. magnusiana, Uromyces dactylidis* and *U. poae.*

All aecia collected on *Ficaria verna* belong to *U. poae* and aecia collected on *Ranunculus acris* belong to *Puccinia perplexans.* Aecia from *R. repens* were more diversified.

Some other molecular methods (RAPD, rep-PCR, PCR-RFLP, ISSR) were proved for identification of rust species. The best results gave ISSR method.

Moreover the morphological variation in aeciospores ornamentation and dimension was studied using the scanning electron and optical microscopy. No special features were found in spore ornamentation. Only *U. poae* differs significantly from aecispores of other species. The molecular characters are more useful and precise for the determination of the aecial stages belonging to studied rust species.

POUŽITÁ LITERATURA

Abbasi M., Goodwin S. B., Scholler M. (2005): Taxonomy, phylogeny, and distribution of *Puccinia graminis*, the black stem rust: new insights based on rDNA sequence data. Mycoscience 46: 241-247.

Aime C. M. (2006): Toward resolwing family-level relationships in rust fungi (Uredinales). Mycoscience 47: 112-122.

Anikster Y., Szabo L. J., Eilam T., Manisterski J., Koike S. T., Bushnell W. R. (2004): Morphology, life cycle biology, and DNA sequence analysis of rust fungi on garlic and chives from California. Phytopathology 94: 569-577.

Araya C. M., Alleyne A. T., Steadman J. R. (2004): Phenotypic and genotypic characterization of *Uromyces appendiculatus* from *Phaseolus vulgaris.* Americas. Plant Dis. 88: 830-836.

Arora D. K., Hirsch P. R. & Kerry B. R. (1996): PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporium* isolates. Mycol. Res. 100: 801–809.

Atkins S. D., Clark I. M. (2004): Fungal molecular diagnostic: a mini review. J. Appl. Genet. 45 (1): 3-15.

Azbukina Z. M. (1974): Ržavčinnyje griby Dalnego Vostoka. Moskva. 527 p.

Barnes C. W. And Szabo L. J. (2007): Detection and identification of four common rust pathogens of cereal and grasses using real-time polymerase chain reaction. Phytopathology 97: 717-727.

Blechtová A. (1990): Příspěvek ke studiu variability rzi psárkové, *Puccinia perplexans* Plowr. v Československu. [Dipl. pr., depon. in: knih. odd. bot. PřF UK v Praze]. 39 p.

Bornet B., Branchard M. (2001): Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.

Brandenburger W. (1994): Die Verbreitung der in den westlichen Ländern der Bundesrepublik Deutschland beobachteten Rostpilze (Uredinales). Regensburger Mykologische Schriften 3: 1-381.

Cummins G.. B. (1971): The rust fungi of cereals, grasses and bamboos. New York, Heidelberg, Berlin. 570 p.

Cummins G.. B., Hiratsuka Y. (2003): Illustrated genera of rust fungi. American Phytopathological Society, St Paul. 225 p.

Driessen S. A., O'Brien P. A., Hardy J. (2004): Diversity of *Puccinia boroniae* assessed by teliospore morphology and restriction fragment patterns of ribosomal DNA. Australasian Plant Pathology 33: 77-82.

Edel V., Steinberg C., Avelange I., Laguerre G., Alabouvette C. (1995): Comparison of three

molecular methods for the characterisation of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathology 85: 579–585.

Edwards J., Ades P. K., Parbery D. G., Halloran G. M., Taylor P. N. J. (1999): Morphological and molecular variation between Australasian isolates of *Puccinia menthae*. Mycol. Res. 103: 1505-1514.

Gardes M., Burns T. D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113-118.

Gäumann E. (1959): Die Rostpilze Mitteleuropas. Bern. 1407 p.

Gouveia M. M. C., Ribeiro A., Várzea V. M. P., Rodrigues C. J. (2005): Genetic diversity in *Hemileia vastatrix* based on RAPD markers. Mycologia 97 (2): 396-404.

Grunig C. R., Sieber T. N., Holdenrieder O. (2001): Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simplesequence- repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. Mycol. Res. 105: 24–32.

Guyot A. L. (1939): Les urédinées (1), Genre Uromyces. Paris. 439 p.

Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hamelin R. C., Hunt R. S., Geils B. W., Jensen G. D., Jacobi V., Lecours N. (2000): Barrier to gene flow between eastern and western populations of *Cronartium ribicola* in North America. Phytopathology 90: 1073-1078.

Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001: PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica 4(1): 9pp.

Hejná M. (2006): Příslušnost aecií na rodu Ranunculus k travním druhům rzí. [Bc. pr., depon in: knih. odd. bot. PřF UK v Praze].

Hovmøller M. S., Justesen A. F., Brown J. K. M. (2002): Clonality and long-distance migration of *Puccinia striiformis* in NW-Europe. Plant Pathol. 51:24–32.

Chatasiri S., Kitade O., Zoshitaka O. (2006): Phylogenetic relationship among *Puccinia hemerocallidis, P. funkiae* and *P. patriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. Mycoscience 47: 123-129.

Chen X., Roland F. L., Leung H. (1995): Virulence and polymorphic DNArelationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to other rusts. *Phytopathology* 85, 1335-1342.

Chung W. H., Tsukiboshi T., Ono Y., Kakishima M. (2004) Morphological and phylogenetic analyses of *Uromyces appendiculatus* and *U. vignae* on legumes in Japan. Mycoscience 45:233–244.

Jørstad I. (1951): The graminicolous rust fungi of Norway. Skrift. Norske vidensk.- Akad. Oslo, Kl. mat. nat. 1950 (3): 92 p.

Keiper F. J., Hayden M. J., Park R. F., Wellings C. R. (2003): Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens. Mycol. Res. 107:545–556.

Kerrigan J., Smith M. T., Rogers J. D., Poot G. A., Douhan G. W. (2003): *Ascobotryozoma cognata* sp. nov., a new ascomycetous yeast associated with nematodes from wood-boring beetle galleries. Mycol. Res. 107 (9): 1110-1120.

Kinloch B. B., Westfall R. D., White E. E., Gitzendanner M. A., Dupper G. E., Foord B. M., Hodgskiss P. D. (1998): Genetics of *Cronartium ribicola*. IV. Population structure in western North America. Can. J. Bot. 76: 91-98.

Kolmer J. A. (2001): Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada. Can. J. Bot. 79: 917-926.

Kolmer J. A., Liu J. Q., Sies M. (1995): Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in Canada. Phytopathology 85:276–285.

Kropp B. R., Hansen D. R., Wolf P. G., Flint K. M., Thompson S. V. (1997): A study on the phylogeny of the Dyer's woad rust fungus and other species of *Puccinia* from crucifers. Phytopathology 87: 565-571.

Kubát K., Hrouda L., Chrtek J., Kaplan Z., Kirschner J., Štěpánek J. (2002): Klíč ke květeně České republiky. Academia, Praha.

Kubisiak T. L., Amerson H. V., Nelson C. D. (2005): Genetic interaction of the fusiform rust fungus with resistance gene *Fr1* in loblolly pine. Phytopathology 95: 376-380.

Lee S. K., Kakishima M. (1999): Aeciospore surface structures of *Gymnosporangium* and *Rostelia* (Uredinales). Mycoscience 40: 109-120.

Liang Y., Tian Ch., Kakishima M. (2006): Phylogenetic relationships on 14 morphologically similar species of *Pucciniastrum* in Japan based on rDNA sequence data. Mycoscience 47: 137-144.

Littlefield L. J., Marek S. M., Tyrl R. J., Winkelman K. S. (2005): Morphological and molecular characterisation of *Puccinia lagenophorae*, now present in central North America. Ann. Appl. Biol. 147: 35-42.

Maier W., Begerow D., Weiβ M., Oberwinkler F. (2003): Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Can. J. Bot. 81: 12-23.

Maier W., Wingfield B. D., Mennicken M., Wingfield M. J. (2007): Polyphyly and two emerging lineages in the rust genera *Puccinia* and *Uromyces*. Mycol. Res. 111: 176-185.

Majewski T. (1977): Flora Polska. Grzyby (mycota) IX. Warszawa, Kraków. 396 p.

Majewski T. (1979): Flora Polska. Grzyby (mycota) XI. Warszawa, Kraków. 463 p.

Marková J., Urban Z. (1997): The rust fungi of grasses in Europe. 6. *Puccinia persistens* Plow., *P. perplexans* Plow., and *P. elmi* Westend. Acta Univ. Carol. Biol. 41: 329-402.

Mebrate S. A., Dehne H. W., Pillen K., Oerke E. C. (2006): Molecular diversity in *Puccinia*

triticina isolates from Ethiopia and Germany. J. Phytopathology 154: 701-710.

Menzies J. G., Bakkeren G., Metheson F., Procunier J. D., Woods S. (2003): Use of Inter-simple sequence repets and amplified fragment length polymorphism to analyze genetic relationships aminy small braun-infecting species of *Ustilago*. Phytopathology 93: 167-175.

Meyer W., Michell T.G., Freedman E.Z., Vilgalys R. (1993): Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Biol. 31: 2274-2280.

Moncalvo J. M., Wang H. H., Hseu R. S. (1995): Phylogenetic relationships on *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. Mycologia 87: 223–238.

Moricca S., Ragazzi A. (1998): Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rusts *Coronartium flaccidum* and *Peridermium pini.* Mycol. Res. 102: 666-670.

Morton C. O., Mauchline T. H., Kerry B. R., Hirsch P. R. (2003): PCR based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus Pochonia chlamydosporia. Mycol. Res. 107: 198–205.

Nakamura H., Kaneko S., Yamaoka Y., Kakishima M. (1998): Differentiation of *Melampsora* rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. Mycoscience 39 : 105-113.

O'Donnell K. L. (1993): *Fusarium* and its near relatives. In The Fungal Holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics (eds. D. Reynolds , J. W. Taylor,): CAB International, Wallingford. p.225–233.

Pei M. H., Whelan M. J., Halford N. G., Royle D. J. (1997): Distinction between stem- and leaf- infecting forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis* using RAPD markers. Mycol. Res. 101: 7-10.

Pfunder M., Schürch S., Roy B. A. (2001): Sequence variation and geographic distribution of pseudoflower-forming rust fungi (*Uromyces pisi* s. lat.) on *Euphorbia cyparissias*. Mycol. Res. 105: 57-66.

Poelt J., Zwetko P. (1997): Die Rostpilze Österreichs. 2., revidierte und erweiterte Auflage des Catalogus Florae Austriae, III Teil, Heft 1, Uredinales. Osterreichische Akademie der Wissenschaft, Wien, 365 p.

Ritz Ch. M., Maier W., Oberwinkler F., Wissemann V. (2005): Different evolutionary histories of two Phragmidium species infecting the same dog rose hosts. Mycol. Res. 109: 603-609.

Ryskov A. P. , Jincharadze A. G. , Prosnyak M. I. , Ivanov P. L., Limborska S. A.(1988): M13 phage DNA as a universal marker for DNA fingerprinting of animals, plants and microorganisms. FEBS Letters 233/2: 388-392.

Sato T., Sato S. (1982): Aeciospore surface structure of the Uredinales. Trans. Mycol. Soc. Japan 23: 51-63.

Săvulescu T. (1953): Monografia uredinalelor din Republica Populara Romana. Bucuresti. 1166 p.

Smith J. A., Blanchette R. A., Newcombe G. (2004): Molecular and morphological characterisation of the willow rust fungus, *Melampsora epitea*, from arctic and temperate hosts in North America. Mycologia 96: 1330-1338.

Stewart C. N. (1997): Rapid DNA extraction from plants. In Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. (Eds. Micheli M. R., Bova R.) Springer Verlag, Berlin. p. 25-28.

Szabo L. J. (2006): Deciphering species complexes *Puccinia andropogonis* and *Puccinia coronata*, examples of differing modes of speciation. Mycoscience 47: 130-136.

Tamura K., Kumar S.(2002) Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages *Molecular Biology and Evolution* 19:1727-1736.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007: MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24(8): 1596-1599.

Taylor J. W., Jacobson D. J., Kroken S., Kašuba t., Geiser D. M., Hibbett D. S., Fischer M. C. (2000): Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. Fungl Genetics and Biology 31: 21-32.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882.

Turečková A. (1986): Rzi a sněti „mokrých luk" na Třeboňsku. [Dipl. pr., depon. in: knih. pdd. bot. PřF UK v Praze]. 105 p.

Tuthill D. E. (2004): Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and *Eupenicillium* species. Mycological Progress 3(1): 3-12.

Urban Z. (1966): Československé travní rzi, I.-III. [MS, depon. in: pdd. bot. PřF UK v Praze]. 702 p.

Van der Merwe M., Ericson L., Walker J., Thrall P. H., Burdon J. J. (2007): Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (Pucciniaceae, Uredinales) inferred from partial protein coding gene phylogenies. Mycol. Res. 111: 163-175.

Vassart G, Georges M, Monsieur R, Brocas H, Lequarre AS, Christophe D. A. (1987): Sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science. 235: 683–684

Versalovic J., Koeuth T., Lupski R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerpriting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19, 6823-6831.

Vilgalys R., Hester M. (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 172: 4238–4246.

Villaréal L. M. M. A., Lannou Ch., C. de Vallavieille- Pope, Neema C. (2002): Genetic variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. Apl. Environ. Microbiol. 68: 6138-6145.

Virtudazo E. V., Nakamura H., Kakishima M. (2001): Phylogenetic analysis of sugarcarne rusts based on sequences of ITS, 5.8 S and D1/D2 regions of LSU rDNA. J. Gen. Plant Pathol. 67: 28-36.

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.

Wang S., Miao X, Zhao W., Huang B., Fan M., Li Z., Huang Y. (2005): Genetic diversity and population structure among strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR). Mycol. Res. 109 (12): 1364-1372.

Weber RWS, Webster J, Engel G (2003). Phylogenetic analysis of *Puccinia distincta* and *P. lagenophorae*, two closely related rust fungi causing epidemics on Asteraceae in Europe. Mycol. Res. 107:15–24.

Weising, K., Atkinson, R. G., Gardner, R. C. (1995): Genomic fingerngerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. PCR Methods and Applications 4: 249-255.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA. p. 315-322.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Yu Z., Liu X. Cao Z. (2006): ISSR marker and ITS sequence study of Melampsora larici-populina. Agricultural Sciences in China 5: 847-854.

Zambino P. J. a Szabo L. J. (1993): Phylogenetic relationships of selected cereal and grass rusts based on rDNA sequence analysis. Mycologia 85: 401-414.

Zhou S., Smith D. R., Stanosz G. R. (2001): Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. Mycol. Res. 105: 919–926.

Zhou Z., Miwa M., Hogetsu T. (1999): Analysis of genetic structure of *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). New. Phytol. 144: 55-63.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183.

Citované www adresy:

GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank
pDRAW32 http://www.acaclone.com