

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA ROSTLINNÉ VÝROBY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hodnocení genetického polymorfismu kmenů *Beauveria bassiana* na
základě analýzy mikrosatelitů

Vedoucí diplomové práce:

Prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.

Autor:

Jiří Pudil

České Budějovice
2009

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Hodnocení genetického polymorfismu kmenů *Beauveria bassiana* na základě analýzy mikrosatelitů vypracoval sám na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích

Jiří Pudil

Děkuji svému vedoucímu práce prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc., prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, PhD., Ing. Kateřině Šimáčkové a Ing. Andree Bohaté PhD. za metodické a odborné vedení a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Jiří Pudil

OBSAH:

1	Úvod	1
2	Literární přehled	2
2.1	Biologická ochrana	2
2.1.1	Definice biologické ochrany.....	2
2.1.2	Strategie užívané v biologické ochraně.....	2
2.2	Charakteristika <i>Beauveria bassiana</i>	3
2.2.1	Obecná charakteristika, rozšíření a využití.....	3
2.2.2	Vývojový cyklus patogena	5
2.2.3	Vliv na necílové organismy.....	7
2.3	Lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i>).....	8
2.3.1	Obecný popis	8
2.3.2	Vývojový cyklus.....	9
2.4	Molekulární markery.....	10
2.5	Porovnání morfologických a molekulárních markerů.....	12
2.6	Analýza mikrosatelitů	13
2.6.1	Struktura a aplikace mikrosatelitů	13
2.6.2	Hledání vhodného mikrosatelitu	16
2.7	Analýza mikrosatelitů v mykologii.....	17
3	Materiál a metody	19
3.1	Materiál	19
3.1.1	Použité kmeny.....	19
3.2	Metody	22
3.2.1	Sterilace a sterilní práce.....	22
3.2.2	Příprava středových kultur a monosporových izolátů	22
3.2.3	Izolace templátové DNA.....	23
3.2.4	Výběr primerů.....	24
3.2.5	Analýza mikrosatelitů	26
3.2.6	Zpracování dat	27
3.2.7	Clusterová analýza.....	27
3.2.8	Statistické zpracování dat	28

4	Výsledky	29
5	Diskuze	38
6	Závěr	41
7	Seznam použité literatury	42

Přílohy	49
----------------------	-----------

Obrázek 11: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 01)

Obrázek 12: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 1F4)

Obrázek 13: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 8D6)

Obrázek 14: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 13)

1 Úvod

Biologická ochrana je systém, který využívá přirozených antagonistů škodlivých organismů nebo produktů připravených za využití živých organismů. Moderní prostředky biologické ochrany jsou vysoce a dlouhodobě účinné a zároveň jsou šetrné k lidskému zdraví a životnímu prostředí a zpravidla mají nízkou nebo žádnou toxicitu k necílovým druhům. Tím udržují bohatost, diverzifikaci a stabilitu přírodních systémů v zemědělské krajině a umožňují kvalitní produkci. Pokud se ale rozhodneme introdukovat nějaký organismus, jako prostředek biologické ochrany, do prostředí je nutné předem znát jeho detailní charakteristiky aby bylo možné vyhodnotit jeho účinnost ale i jeho případné negativní vlivy na životní prostředí a druhovou diverzitu. Jedna z možných aplikací biologické ochrany je použití entomopatogenní houby *B. bassiana* v ochraně proti lesním škůdcům. Na území Národního parku Šumava bylo v loňském roce zpracováno 119 603 m³ dřeva napadeného lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) a z toho 27 980 m³ bylo v I. zóně národního parku. Vzhledem k charakteru oblasti je nutné omezit chemickou ochranu proti tomuto škůdci a biologickou ochranu aplikovat pouze po pečlivém zvážení. Jedním z přístupů, který lze aplikovat v takovéto oblasti, je izolace původního kmenu entomopatogenní houby, její namnožení, a následná reintrodukce.

Pro charakterizování organismů slouží, díky své jednoduchosti a často dostačující vypočítací schopnosti, morfologické markery. Pokud však potřebujeme charakteristiky detailnější, například identifikace jednotlivých kmenů či jedinců, je nutné použít markery, které mají lepší rozlišovací schopnost, jako jsou například molekulární markery včetně mikrosatelitů.

Ve své práci se zabývám hodnocením genetického polymorfismu kmenů *B. bassiana* odebraných při monitoringu v lokalitě Černá Hora na Šumavě. Cílem diplomové práce je provést analýzu mikrosatelitů a popsat genetické závislosti mezi jednotlivými kmeny a monosporovými izoláty, které z nich byly odvozeny.

2 Literární přehled

2.1 *Biologická ochrana*

2.1.1 Definice biologické ochrany

Populace všech žijících organismů jsou, do určitého stupně, redukovány přirozenou činností predátorů, parazitů, antagonistů a patogenů. O těchto interakcích resp. procesech se mluví jako o „přirozené regulaci“. Pokud však mluvíme o cílené regulaci škůdců, při které využíváme právě těchto procesů je vhodné mluvit o „biologické ochraně“ (Hayek, 2004). Biologická ochrana je tedy jednou z několika strategií, které jsou používány k regulování populací škůdců (Eilenberg et Hokkaken, 2006). Biologická ochrana byla definována mnohokrát a mnohými způsoby, já zde uvádím obecně uznávanou definici:

Biologická ochrana je využívání živých organismů k potlačení populace specifického škodlivého organismu což vyústí ve snížení jeho četnosti nebo škodlivosti.

(Eilenberg et al., 2001)

Je nutné podotknout, že tato definice jasně zahrnuje použití žijících organismů (predátorů, parazitoidů, hlístic, hub, bakterií, prvoků a virů) a naopak z biologické ochrany vyřazuje použití samotných metabolitů, které spíše považuje za bioracionální ochranu. Tato definice rovněž přímo nespojuje termíny „přirozený nepřítel“ a „biologická ochrana“ jak to bylo běžné v předcházejících definicích (Eilenberg et Hokkaken, 2006).

2.1.2 Strategie užívané v biologické ochraně

Vzhledem k existenci různých škůdců s odlišnými vlastnostmi, vytvářející rozmanité ekosystémy musíme volit strategie pro jejich regulaci tak abychom se vždy vhodně přizpůsobili daným podmínkám. Eilenberg et al. (2001) definuje následující strategie.

Klasická strategie

Záměrná introdukce nepůvodního organismu (prostředek biologické ochrany) za účelem trvalého zabudování do ekosystému a dlouhodobé regulace populace škůdce.

Augmentativní - inundativní strategie

Využití žijících organismů pro regulaci populace škůdce. Introdukce je zpravidla jednorázová a je dosaženo okamžité regulace četnosti cílového organismu.

Augmentativní – inokulativní strategie

Záměrné vypuštění živého organismu do ekosystému s očekáváním že se v ekosystému bude množit a regulovat četnosti cílového organismu po určité době, ne však trvale.

Strategie konzervace a podpory přirozených nepřátel

Modifikace prostředí, nebo zavedených postupů za účelem ochrany a podpory specifických přirozených nepřátel nebo jiných organismů regulujících četnosti cílových organismů

Právě díky existenci těchto strategií, můžeme volit formu biologické ochrany tak, abychom v co největší míře zachovali přirozenou diverzitu agroekosystémů a podpořili tak jejich stabilitu.

2.2 Charakteristika *Beauveria bassiana*

2.2.1 Obecná charakteristika, rozšíření a využití

Rod *Beauveria* zahrnuje několik entomopatogenních druhů. Jeden z nejvýznamnějších je *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin (Boucias et Pendland, 2008). Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh, který je běžně zaznamenáván jako původce onemocnění na mnoha druzích hmyzu, zejména pak na herbivorních druzích, které jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu (Landa et al., 2007). *B. bassiana* způsobuje u hmyzu nákazu která bývá označována jako „white muscardine“. Tato nákaza byla popsána na larvách Bource morušového již

kolem roku 900 p.n.l. v Japonsku. Hmyz mumifikovaný *B. bassiana* byl používán v medicíně například jako antiseptikum. Seriózní záznamy o tomto onemocnění a jeho původci uveřejnil až A. Bassi v roce 1834. Později se stejným původcem onemocnění zabýval také Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, který ho v roce 1935 popsal a po svém objeviteli pojmenoval *Botritis bassiana* (Boucias et Pendland, 2008).

B. bassiana je dimorfní organismus, rostoucí jednak jako mycelium, nebo jako kvasinkový organismus v závislosti na dosud nspecifikovaných faktorech (Burge, 1988). Kolonie *B. bassiana* jsou bílé až krémové, příležitostně růžové. Co se týče konzistence jsou kypré až práškovité. Spodní strana kolonie je bílá až nažloutlá. Hyfy jsou dělené septy, jsou přímé a křehké. Konidiofory jsou protáhlé, baňkovitého tvaru v charakteristickém „Zig-zag“ uspořádání (sympodiální kolínkaté větvení), přičemž v každém ohybu je uložena jedna konidie. Konidie jsou malé (2-4 μm v průměru), jednobuněčné, kulaté nebo oválné, tvořící se po jednom na tenkém zoubku. Nejlépe je tato struktura pozorovatelná na mladých koloniích, dříve než se vytvoří husté shluky konidií, které zhoršují pozorovatelnost tohoto uspořádání (Davise, 2002).

Široce polyfágní entomopatogenní houba *B. bassiana*, která může napadat až 700 druhů například z řádů *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hemiptera* a *Orthoptera*, je typickým představitelem nejen entomopatogenní, ale i saprotrofní mykoflóry půd a na celém území ČR patří k nejčastěji zaznamenávaným druhům mitosporických hub. Infikuje jak vývojová stadia, tak i dospělé hmyzu. V zahraničí je registrována řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *B. bassiana* a využívaných v praktické biologické ochraně proti různým škůdcům polních plodin a v ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin. Biopreparáty na bázi *B. bassiana* jsou využívány i v ochraně lesních porostů proti některým druhům škůdců, včetně lýkožrouta smrkového. (Landa et al., 2007). V Číně bylo vyvinuto velké množství programů, pro využití *B. bassiana* v ochraně lesních porostů například proti rodu *Dendrolimus* spp a v ochraně porostů kukuřice proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia hubinalis*). Přípravky na bázi *B. bassiana* jsou v těchto programech často ekonomicky

výhodnější než klasické metody ochrany rostlina ročně se využívají na ploše o výměře přibližně 1 milionu hektarů (Hajek, 2004).

2.2.2 Vývojový cyklus patogena

Stejně tak jako v případě ostatních entomopatogenních hub, tak i houby z rodu *Beauveria* napadají svého hostitele obecně přes kutikulu (Roy et al., 2008). Infekční cyklus se skládá z následujících fází:

- přichycení spor na kutikulu hostitel
- klíčení spor
- penetrace kutikuly
- překonání imunitních obraných reakcí hostitele
- proliferace uvnitř těla hostitele
- externí růst a produkce konidií (Zimmerman, 2007).

Infekce hostitele je iniciována konidiami, které po přichycení na povrch kutikuly klíčí a pronikají do tělní dutiny (Landa, 2007). Toto prvotní spojení je vytvářeno nespecifickými adhezními silami mezi hydrofobním povrchem konidií a epikutikulou hmyzu nebo prostřednictvím elektrostatických sil. Bylo také prokázáno, že látky jako hemaglutiny, glykoproteiny či N-acetylglucosamin, jenž byly zjištěny v povrchové vrstvě konidií a kutikule hostitele, se podílejí na adhezi konidií k povrchu těla hostitele (Boucias et al., 1988).

Pokud dojde k uchycení konidií na povrch kutikuly vnímavého hostitele, konidie mohou začít klíčit. Schopnost klíčení je ovlivněna následujícími faktory. Optimální teplota pro klíčení konidii *B. bassiana* se pohybuje mezi 25 – 30 °C a optimální relativní vzdušná vlhkost mezi 95 – 100 %. Při zachování těchto podmínek klíčení začíná po 10 hodinách a končí zhruba po 20 hodinách. Tato doba se však může prodloužit až na 72 hodin (Luz et Fargues, 1997). Schopnost klíčit je ovlivněna nejenom vnějšími podmínkami, ale i dalšími faktory, jako je například kmen patogena, hostitel, jeho vývojové stádium a přítomnost některých látek (kutikulární proteiny a lipidy, aldehydy a ketony) (James et al., 2003).

Do těla napadeného jedince proniká *B. bassiana* nejčastěji kombinací aktivní penetrace povrchem kutikuly (Landa et al., 2007) ke které dochází pomocí penetrující hyfy a enzymatické penetrace (Yang et al., 2007). Hmyzí kutikula se skládá z chitinového základu který je obklopen proteiny. Entomopatogenní houby produkují extracelulární proteázy a chitinázy, které degradují tyto proteinové a chitinové složky kutikuly a umožňují tak hyfám proniknout skrz kutikulu a dostat se tak k nutričně bohaté hemolymfě. Aktivita proteáz a chitináz je důležitým faktorem při posuzování virulence jednotlivých kmenů *B. bassiana* (Yang et al., 2007).

Odpověď hostitelského organismu na invazi *B. bassiana* samozřejmě závisí na konkrétním druhu hostitele a jeho náchylnosti k použitému kmenu patogena. V oblastech kde dojde k penetraci kutikuly se objevují melanizované skvrny (projevují se jako tmavší kruhy s průměrem 0,1 – 0,5 mm), což indikuje zvýšenou tvorbu fenoloxidázy v napadeném organismu (Boucias et Pendland, 1998). Lze pozorovat i tvorbu dalších látek fungicidního charakteru jako například nasycené i nenasycené mastné kyseliny převážně s krátkým, ale i dlouhým řetězcem (Boucias et Pendland, 2008). Po napadení organismu je patogen vystaven sérii specifických a nespecifických imunitních reakcí. Proti těmto reakcím si *B. bassiana* vypěstovala různé druhy obrany. Pokud jsou například blastospory pohlceny fagocytujícími buňkami, zůstávají v těchto buňkách životaschopné, jako forma intracelulárního parazita, a posléze hostitelskou buňku penetrují a dále mohou infikovat hostitele (Boucias et Pendland, 1998). *B. bassiana* rovněž produkuje širokou škálu sekundárních metabolitů, které jí usnadňují manifestování v hostiteli (antifungální látky, inhibitory proteáz a obrané proteiny; Whips et Lunsden, 1990).

Jakmile klíčící hyfa pronikne přes kutikulu a epidermální vrstvy, roste směrem k hemocélu, kde se po 48 hodinách začínají objevovat první blastospory, které jsou pasivně roznášeny hemolymfou po těle patogena (Boucias et Pendland, 1998). Uvnitř tělní dutiny hostitele oválné blastospory klíčí a vytváří hustou myceliální masu, která posléze hostitele mumifikuje (Landa et al., 2007). První viditelné známky poškození hostitele se mohou objevit již po 60 – 80 hodinách od napadení patogenem. Střevo a malpighiho trubice jsou napadeny po 6-8

dnech. Tracheje, snovací žlázy, svalstvo a zřídka střevo zůstává během infekce zpravidla nedotčené. Smrt hostitele je pravděpodobně způsobena vyčerpáním energetických rezerv, dehydratací a/nebo intoxikací toxiny, které produkuje patogen (Boucias et Pendland, 1998).

V konečné fázi vývoje prorůstají hyfová vlákna na povrch usmrčeného jedince a na povrchu se formuje vzdušné mycelium, na kterém se tvoří nové konidie (nepohlavní spory mikroskopických hub), které mohou iniciovat nový vývojový cyklus patogena (Landa et al., 2007). Při nepříznivých vnějších podmínkách, zejména při nízké relativní vzdušné vlhkosti, nedochází ke konidiogenezi a patogen perzistuje v těle usmrčeného hostitele v podobě mycelia (Boucias et Pendland, 1998). Konidie jsou do prostředí uvolňovány pasivně a jsou přenášeny především větrem, ale roli mohou hrát i další faktory jako například déšť. Konidie *B. bassiana* jsou díky proteinům (tzv. hydrofobinům) bohatým na cystein silně hydrofobní, což je velmi významný faktor při volbě výrobního procesu během produkce přípravku a jeho následné aplikaci v zájmovém území (Butt et al., 2001)

2.2.3 Vliv na necílové organismy

Vliv biopreparátů na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* a biopreparátů obecně, v sobě nese nejen aspekt účinnosti vůči organismům, proti nimž je cíleně aplikován, ale také to, jakým způsobem účinkuje na necílové organismy. *B. bassiana* je přirozeně se vyskytujícím druhem jak v půdním prostředí, tak v prostředí vzdušném. Je rovněž známo, že *B. bassiana* je široce polyfágní druh a proto je vhodné se ptát, jaký s sebou ponese dopad aplikace preparátů na bázi tohoto organismu.

Specifický kmen *B.bassiana* byl opakovaně aplikován na 110 ha plantáže určené k produkci bource morušového (*Bombix mori*). Účelem této aplikace bylo omezení výskytu bourovce sp. (*Dendrolimus spp*). Kmen, který byl aplikován, byl izolován v dané lokalitě z bourovce. Přestože bylo dosaženo dobrých výsledků v ochraně proti bourovci, nákaza u bource morušového byla prokázána pouze u 4% jedinců (Georgie, 2004). Pro porovnání fyziologického a ekologického spektra hostitelů lze uvést následující příklad. Kmen izolovaný

z mšice chmelové byl v laboratorních podmínkách aplikován na populaci tohoto druhu, která se ukázala být vysoce vnímavá. Naproti tomu polní aplikace tohoto kmene nevyústila v nákazu. Autoři této studie předpokládají, že snížená účinnost aplikovaného přípravku byla způsobena povětrnostními vlivy (Follet et Duan, 2000). Na základě těchto a dalších studií lze tvrdit, že pokud je přípravek aplikován s ohledem na prostorové a místní poměry a zároveň pokud budeme brát v úvahu výběr konkrétního kmene (resp. izolátu) můžeme omezit dopad na necílové organismy na minimum (Hajek, 2004).

I přes obecné tvrzení, že *B. bassiana* je netoxická k teplokrevným organismům, byly zřídka pozorovány případy napadení tímto patogenem. Byl popsán případ pulmonálního onemocnění u mladého pacienta, z jeho plicní tkáně byl vyzolován vzorek *B. bassiana*. Později byl zveřejněn případ osteoartritidy způsobené rodem *Beauveria* sp. (Georgiev, 2003). Dále byly potvrzeny některé případy otravy ryb a vodních živočichů. Tyto nákazy se však projevují velmi zřídka a především při oslabení organismu. Vliv na teplokrevné i ostatní organismy není velký, ale je nutné ho nadále sledovat (Hajek, 2004).

2.3 Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)

Říše *Animalia* - živočichové

- » kmen *Arthropoda* - členovci
- » třída *Insecta* - hmyz
- » řád *Coleoptera* - brouci
- » čeleď *Curculionidae* – nosatcovití

2.3.1 Obecný popis

Lýkožrout smrkový je vázán úzce na smrk (*Picea abies*), jehož původní oblasti rozšíření ležely do doby před 150 - 200 lety na severu Evropy v severských (boreálních) lesích a ve středu Evropy v lesích hercynských s jejich prodloužením do karpatské a transylvánské oblasti a v lesích alpských s jejich prodloužením jihovýchodním směrem do ilyrské oblasti západního Balkánu. Lýkožrout pak směrem na východ navazoval na několik druhů rodu *Picea* od Uralu přes střední Sibiř až k jihu Kamčatky, do Koreje a Japonska. V Japonsku se vyskytuje *Ips typographus* forma *japonica*. Ve střední Evropě byl tedy

kůrovec druhem vyskytujícím se na smrku obvykle v nadmořských výškách nad 800 m (Skuhravý, 2001).

Před 150-200 lety došlo v Evropě k přeměně původních, většinou listnatých a smíšených lesů v porosty smrkové, které se snáze pěstovaly, rychle rostly a dávaly daleko větší výnos dřeva žádaného v dřevařství a v průmyslu. Tím se posunulo pěstování smrku do nižších poloh a v současné době je smrk hlavní dřevinou v polohách již od 200 do 800 m n.m. Na posun výskytu smrku do nižších poloh reagoval i lýkožrout smrkový. Měl k tomu výborné předpoklady tím, že není broukem monovoltinním, tedy s jednou generací ročně, ale je podle teplotních podmínek přizpůsoben k vývoji dvou, či dokonce tří generací během jednoho roku. Domněnka o tom, že lýkožrout smrkový se vyskytoval v nižších polohách vedla v letech 1984 - 1990 ke zcela chybnému závěru, že lýkožrout se ve vyšších polohách nad 1000 m n. m. nebude šířit. (Skuhravý, 2001)

Tělo kůrovce je válcovité, černohnědě zbarvené, lesklé, se světle žlutými chloupky. Tykadla jsou paličkovitá s lomeným švem. Dorůstá velikosti 4 - 5,5 mm. Štít je v přední části hrbolkatý, v zadní části jemně tečkovaný. Mezery mezi řádkami teček má hladké. Prohlubeň sklonu na krovkách je vroubená na každé straně čtyřmi zuby, z nichž třetí odshora je největší. Dospělá larva je dlouhá 4-5 mm, bílá, se žlutohnědou hlavou. Kukla je bílá a měří asi 4 mm. Vajíčka jsou také bílá, oválná a lesklá (Benz et Zuber, 2007).

2.3.2 Vývojový cyklus

Rojení probíhá v podhorských oblastech zpravidla koncem dubna až začátkem května, v horách koncem května až začátkem června. Brouci vylétají ze svých zimovišť po oteplení kůry a hrabanky nad 14 °C. Ti, kteří nedokončili dospělostní žír na podzim, vylétají o 1-2 týdny dříve a dokončují jej v čerstvé kůře kmenů nebo odříznutých vrcholků stromů. Podle podmínek se může během roku vyvinout jedna až dvě a za velmi příznivých podmínek (v nižších polohách) i tři generace. Přezimují brouci, kukly i larvy. (Watt et al., 1997).

Rojící se brouci nejraději obsazují chřadnoucí nebo čerstvě poražené stromy a polomové dříví, při přemnožení i zdravé, popř. mladší stromy. (Lieutier et al.,

2004). Se závrtem začíná sameček, který vyhlodává v kůře snubní komůrku a vyhazuje z ní drť. Přirozený poměr pohlaví je 1:1, ale jelikož mnoho samečků zahyne vytékající pryskyřicí, upravuje se poměr pohlaví ve prospěch samiček. (Lobinger, 1995). Snubní komůrka není po odloupení kůry většinou viditelná. Po oplození samička vyhlodává pod kůrou rovnou matečnou chodbu, probíhající rovnoběžně s podélnou osou kmene. Bývá 6-12 cm dlouhá, 3-3,5 mm široká a může mít několik větracích otvorů. Samička v matečné chodbě vyhlubuje střídavě na obě strany jamky vzdálené od sebe 1-10 mm, do nichž naklade po 1 vajíčku a obkládá je drť (je jich asi 50). U více než dvouramenného požerku se počítá s vývojem asi 100-140 larev (Boucias et Pendland, 2008). Po skončeném kladení vajíček prodlužuje samička matečnou chodbu. Jde o tzv. regenerační (obrodný) žír, protože za 2-3 týdny může ještě založit (a asi v 80 % i zakládá) sesterské pokolení, jehož matečné chodby jsou kratší, s menším počtem vajíček. Celkem naklade samička průměrně 60 vajíček (může až 100) po opakovaném oplození (Frost et al., 1985).

Celý vývoj za normálních podmínek trvá asi 10 týdnů (stadium vajíčka 12 dní, larvy 24 dní, kukly 12 dní, dospívání 24 dní, což je dohromady 72 dní). Při příznivých podmínkách (teplo) to může být 6 týdnů, naopak při nepříznivých podmínkách až 12 týdnů i více. Imago žije 2-3 měsíce, výjimečně až 20 měsíců (Frost et al., 1985).

2.4 Molekulární markery

Genetický marker je jakákoliv vlastnost kterou je možno u organismu změřit a která podává informace o genotypu organismu. Genetický marker může být (1) fenotypový znak (výška, barva, odpověď na infekční tlak určitého patogena), (2) biochemický znak (isozym) a nebo (3) molekulární znak (znaky založené na analýze DNA). Zatímco fenotypové analýzy poskytují markery, které záleží na expresi genu a jsou omezené na vlastnosti které se formují různě, v závislosti na čase či vnějších podmínkách, molekulární analýzy poskytují nespočet markerů, tvořených specifickými sekvencemi napříč genomem (Talbot, 2001). Výhody molekulárních markerů jsou především (1) nezávislost na vývojovém stádiu nebo expresi, (2) markery je možné nalézt v nekódujících

(konzervativních) sekvencích (3) neměnnost sekvence v závislosti na prostředí (Walker et Rapley, 2000).

U genetických markerů jsou vysoce žádané následující vlastnosti

1. Vysoký polymorfismus
2. Kodominantní dědičnost (která nám umožní odlišit homo- a heterozygoty u diploidních organismů)
3. Častý výskyt v genomu
4. Rovnoměrný výskyt v genomu
5. Nezávislost na podmínkách prostředí
6. Jednoduché provedení analýzy
7. Vysoká reprodukovatelnost
8. Snadný zápis výstupních dat a možnost jejich výměny mezi pracovišti

V současné době nejsou dostupné žádné molekulární markery které by splňovali všechna kritéria. Je proto nutné pro konkrétní studii zvolit ten molekulární marker, který splňuje alespoň ta nejdůležitější (Weising et al., 2005).

Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na (1) markery založené na hybridizaci DNA a (2) markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). V první skupině markerů se DNA profily vizualizují prostřednictvím hybridizace fragmentů DNA štěpené restriční enzymem se značenou sondou. DNA sonda je fragment DNA známého původu a sekvence. Ve druhé skupině jsou markery založené na in vitro amplifikaci určitých sekvencí DNA nebo lokusů prostřednictvím specifických i nespecifických primerů (nukleotidových sekvencí) za účasti termostabilního enzymu DNA (Talbot, 2001). Amplifikované fragmenty se separují elektroforeticky a spektra jsou detekována po obarvení (např. ethidiumbromidem) nebo autoradiograficky. Další metody jsou techniky molekulárních markerů založené na různých kombinacích restričního štěpení, hybridizace a amplifikace (Walker et Rapley, 2000).

Využití molekulárních markerů je velmi rozmanité. Za všechny uvádím některé příklady. Molekulární markery lze využít v diagnostice rostlinných patogenů (viry, houby, háďátka, bakterie a hmyz), ve zkoumání struktury a variability populací patogenů, při zjišťování přítomnosti transgenů v potravinách a další (Talbot, 2001).

Genetické charakterizování původních kmenů hub, používaných pro biologickou ochranu pomocí molekulárních markerů nám poskytuje detailní informace o přirozené variabilitě a populační struktuře v zájmovém území. Pomocí těchto metod je také možné stanovit a dále sledovat určité genetické charakteristiky a díky nim charakterizovat jednotlivé izoláty, které jsou k ochraně použity, a pozorovat tak osud organismů použitých v biologické ochraně po jejich vypuštění (Kinghorn et Turner, 1992).

2.5 Porovnání morfologických a molekulárních markerů

Morfologické studie jsou základem klasifikace hub, nejčastěji používané morfologické znaky jsou tvar a velikost kolonií, tvar a velikost konidií, radiální růst, morfologie mycelia, tvar a typ konidioforů, míra sporulace a extracelulární a intracelulární pigmentace. Morfologické markery nedovolují rozlišení na podruhové úrovni, ale v mnoha studiích jsou důležitým a podpůrným systémem umožňujícím základní charakterizaci a rozlišení výchozího materiálu (Hall, 1980; Vidal et al., 1998).

Charakterizace, ale hlavně spolehlivá identifikace blízce příbuzných organismů na druhové i podruhové úrovni podle fenotypových markerů přináší určité těžkosti (Hillis, 1987; Tigano-Milani et al., 1994). Pro účely přesného rozlišení jsou velmi vhodné metody přímého sledování struktury genomu prostřednictvím studia DNA polymorfismu (Mor et al., 1996). Zatímco většina morfologických markerů může být rozeznána na úrovni organismu (kolonie, kultury), molekulární markery umožňují určení na úrovni buněk i organismu v různé fázi vývojového cyklu. Počet morfologických markerů je limitován, zatímco molekulárních markerů je obrovské množství a nejsou ovlivněny vnějším prostředím (Hillis, 1987).

Molekulární markery jsou oproti morfologickým více nezávislé na vnějších podmínkách prostředí. Další výhodou molekulárních i biochemických markerů bývá možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, tento proces je nedestruktivní, tj. pro analýzu se používá jen malá část tkáně. Použití molekulárních markerů má oproti morfologickým klasickým znakům výhody i v možnosti sledování většího počtu žádaných znaků.

Molekulární metody zahrnující PCR techniky jsou v současnosti klíčovým prvkem výzkumu entomopatogenních hub, nicméně jsou to technologie stále ještě v počátečním stádiu jejich aplikací. Existují i techniky, které u entomopatogenních hub nebyly ještě použity nebo byly aplikovány pouze v omezeném rozsahu, a to RAMS (Hantula et Muller, 1997) a AFLP (Majer et al., 1996).

Analýzou mikrosatelitů - SSR (Simple Sequence Repeats) Rehner et al. (2003) spolehlivě odlišil 24 kmenů *B. bassiana* a dá se říci, že SSR poskytuje nové možnosti při ekologických a epidemiologických studiích a významnou metodu pro přesnou genotypizaci kmenů.

2.6 Analýza mikrosatelitů

2.6.1 Struktura a využití mikrosatelitů

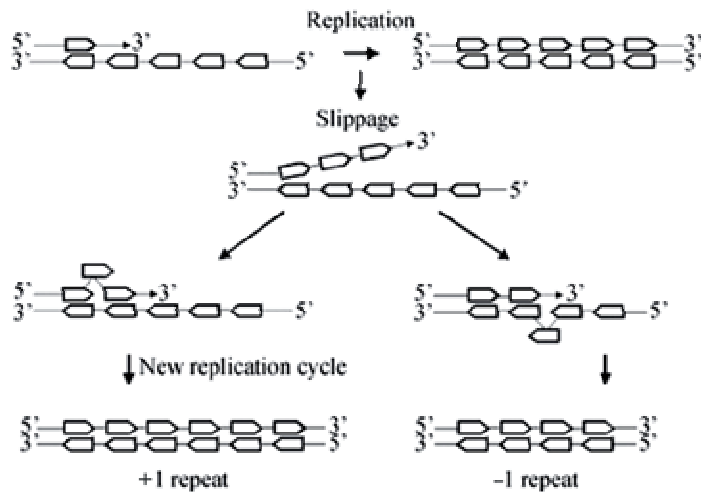
Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní DNA markery, s oddělenými lokusy a kodominantními alelami, které mají široké spektrum aplikací. Mikrosatelity jsou téměř rovnoměrně rozprostřeny po celém genomu, což je činní velice vhodným nástrojem pro mapování genomu, evoluční biologii, ověřování paternity a nebo příbuznosti (Goldstein et Schlotterer, 1999). V poslední době nabývají mikrosatelity i na významu v souvislosti se zkoumáním struktury přírodních populací (Hoelzel, 2008).

Mikrosatelity (angl. Microsatellites či Simple Sequence Repeats - SSR) jsou tandemově se opakující sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů o délce 2-6 párů bazí DNA. Celková délka lokusu obvykle nepřesahuje 100 bp, ale může dosáhnout délky až 300 bp (Hoelzel, 2008). Jsou vysoce

frekventované především v eukaryotním genomu, ale vyskytují se rovněž v genomu prokaryot, ale v nižší frekvenci. Zřídka obsahují více než 70 opakujících se jednotek a jsou roztroušené po celém genomu. Například v savčím genomu se odhaduje, že nejčastěji se opakující motiv (GT/AC) se objevuje až každých 30 kb (Goldstein et Schlotterer, 1999).

Počet opakování základního motivu v mikrosatelitovém lokusu je mezi jedinci velmi variabilní. Odhaduje se, že mutační poměry v mikrosatelitovém lokusu se pohybují mezi 10^{-2} a 10^{-6} (Nielsen and Palsboll, 1999). Tato vrozená nestabilita mikrosatelitů může být způsobena následujícími faktory. (1) „Klouzáním“ DNA polymerázy během replikace (tzv. replication slippage – viz. **Obrázek 1**) a nebo (2) nerovnoměrnou rekombinací. V případě „klouzání“ DNA polymerázy, dočasné rozvolnění replikované DNA v polymerázovém komplexu může být následováno chybným znovunasednutím rozvolněných vláken. Toto může vyústit buď ve zvýšení či snížení počtu opakování základního motivu v lokusu v závislosti na tom jestli chybné nasednutí proběhlo na novém vlákně či na vlákně templátovém (Japupciak et Wells, 1999). Frekvence těchto mutací není známa, ale u prokaryotních organismů se objevuje častěji než spontánní mutace. U prokaryot není tento výskyt tak častý, ale na základě nepřímých důkazů lze tvrdit, že odlišnosti nejsou až tak velké. Odlišnosti v opakujících se sekvencích mohou být rovněž způsobeny nesprávným průběhem crossing-overu během rekombinace, ale tzv. replication slippage je obecně považován za primární mechanismus vzniku odlišností na mikrosatelitových lokusech (Khachatourians et Arora, 2004).

Obrázek 1: Replication slippage (Goldsteind et Schlötterer, 1999)



Původní DNA molekula je složena z 5 opakování jednoho motivu (znázorněno rámečky). Sklouznutím pak vznikají dvě nové alely o délce 6 a 4 repetice. Délka nově vzniklých repetice závisí na vlákně na kterém došlo k chybě polymerázy.

Mikrosatelity byly poprvé použity jako polymorfní molekulární markery v roce 1989 třemi na sebe nezávislými skupinami. Od té doby se mikrosatelity uplatnily v mnoha studiích včetně DNA fingerprintingu, mapování genomu, ověřování otcovství a příbuznosti, měření genetických vzdáleností, forenzní vědě, identifikaci pohřešovaných jedinců a populační či vývojové genetiky. Studie, využívající mikrosatelity, se zabývali širokou škálou organismů včetně lidí, zvířat, hmyzu, rostlin, hub, bakterií atd. (Khachatourians et Arora, 2004).

Nejčastější metoda detekce mikrosatelitů spočívá v nalezení PCR primerů, které mají jedinečnou sekvenci, která je plně kompatibilní s úseky ohraničujícími samotný mikrosatelit (flanking regions; Hoelzel, 2008). Díky tomu, jeden pár PCR primerů produkuje u jedinců stejného druhu produkty o různé délce (viz. Obrázek 2).

Obrázek 2: Detekce mikrosatelitu (Hoelzel, 2008)



Dva PCR primery (šedá šipka dopředu a zpět) jsou navrženy tak aby obklopily oblast mikrosatelitu. Kdyby tedy daná oblast neobsahovala žádné sekvence mikrosatelitu produkt by měl délku 100 bp, protože každý z primeru má délku 50 bp. V našem případě bude produkt dlouhý 116 bp, samotný mikrosatelit 16 bp a obsahuje osmkrát se opakující sekvenci CA.

Vizualizace a separace produktů PCR probíhá pomocí gelové, nebo kapilární elektroforézy. Pro gelovou elektroforézu existují různé složení gelů a při každé analýze je nutné zvolit správný typ, složení a hustotu gelu. Obecně lze tvrdit, že detekce pomocí kapilární elektroforézy je náročnější jak na vybavení laboratoře tak finančně, poskytuje ale přesnější výsledky. Z obou výstupů je však možné vyčíst velikost produktu (Bridge et al., 1998).

2.6.2 Hledání vhodného mikrosatelitu

V současnosti existují v podstatě čtyři možnosti jak nalézt vhodný mikrosatelitový lokus pro prováděnou analýzu. (1) Hledání v molekulárních databázích, (2) užití heterologních PCR primerů, (3) klonování nových primerů (Baker, 2000) a (4) využití projektů sekvenování genomu. Rozrůstající se velikost a přístupnost informací o DNA sekvencích přes molekulární databáze jako je například GENE BANK (National center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nebo EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) umožňuje vědecké veřejnosti snadnější přístup k informacím, které se týkají nejenom mikrosatelitových sekvencí (Sharma et al., 2007). Pro organismy, které byly v minulosti intenzivně studovány (např. *Drosophila*, člověk nebo hospodářská zvířata) jsou již na internetu dostupné detailní informace o sekvencích mikrosatelitů, resp. DNA (Goldstein et Schlotterer, 1999). Pokud není možné najít sekvence sledovaného organismu v databázích je nutné tyto nalézt experimentálně.

První metoda, která se nazývá „cross-species primery“ spočívá v užití již známého primeru, jehož sekvence byla testována u jiného organismu. Při užití této metody platí, že čím větší je taxonomická vzdálenost mezi organismy, tím menší je šance že se bude daný motiv vyskytovat v obou organismech (Baker, 2000). Pokud nejsou dostupné mikrosatelitové lokusy, mohou být vygenerovány nové použitím standardních klonovacích metod (Dracopoli et al., 2005). Poslední uvedenou možností jsou projekty sekvenování genomu. Tyto projekty jsou slibným zdrojem mikrosatelitových markerů, jelikož poskytují nespočet genetických informací, což nám poskytuje možnost zkoumat mikrosatelitové motivy napříč celým genomem, včetně jeho nekódujících částí, kde je jejich výskyt nejčastější. Další výhodou je, že nám tyto projekty poskytují informace i o tzv. flanking areas, které nám umožní navrhnout vhodný primer pro mikrosatelitovou analýzu (Khachatourians et Arora, 2004).

2.7 Analýza mikrosatelitů v mykologii

Jedna z prvních aplikací PCR v mykologii byla popsána v roce 1990 a zabývala se stanovením taxonomických vztahů pomocí amplifikace a přímého sekvenování rDNA. Přibližně do roku 1997 byly mikrosatelity v mykologii využívány pouze zřídka. Což bylo pravděpodobně způsobeno tím že nové molekulární techniky bývají nejdříve aplikovány ve studiích člověka, zvířat a rostlin a až později v mykologii, bakteriologii nebo virologii (Bridge et al., 1998). Na druhou stranu, velké množství druhů hub má význam například v medicíně, zemědělství a v potravinářském průmyslu a zároveň je genom hub relativně malý. Tyto vlastnosti dělají z hub ideální kandidáty pro projekty sekvenování genomu a genomika hub se tak v současnosti stává intenzivně se rozvíjejícím odvětvím. Jedním z výstupů těchto programů by měl být vývoj spolehlivých, robustních a informativních markerů (Lim et al., 2004). Do této kategorie samozřejmě spadají i mikrosatelity.

Mikrosatelity byly používány především pro objasnění vztahů mezi úzce příbuznými jedinci, identifikaci jednotlivých kmenů a v epidemiologických studiích lidských patogenů *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* a *Candida albicans* (Field et al. 1996; Bretagne et al., 1997; Fisher et al., 2000).

Dále byly mikrosatelity použity při studiu ekologie a diverzity travního endofyta *Epichloë* (Moon et al., 1999; Groppe et Boler, 1997). Bucheli et al. v roce 2000 pomocí mikrosatelitových lokusů analyzoval populační strukturu sněti pšeničné.

Po roce 2000 se rapidně zvyšuje počet publikovaných prací, které se týkají aplikace mikrosatelitů v mykologii. Práce už nejsou zaměřeny pouze na identifikaci jedinců a jejich záběr se rozšiřuje i na genetické studie populací, mapování genomu jednotlivých druhů hub apod. (Khachatourians et Arora, 2004). V této době se rovněž začínají objevovat články týkající se studia patogenní houby *B. bassiana* a příbuzného patogena *B. brogniarti*. Zpočátku byly tyto studie zaměřeny na nalezení vhodných mikrosatelitových lokusů (Enkerli et al., 2001; Rehner et Buckley, 2004). Z těch pozdějších lze jmenovat například studie zaměřené na sledování patogena po vypuštění do dočasných agroekosystémů (Meyling et Eilenberg; 2007; Wang et al., 2004), na studium genetické příbuznosti v závislosti na geografické poloze (Wang et al., 2003) a na studie popisující úzké vztahy mezi patogenem a hostitelem (Cravanzola et al., 1997; Castrillo et al., 2008; Lord, 2008).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité kmeny

V této studii byli použity následující kmeny entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* (viz. Tabulka 1). Všechny kmeny použité v této studii byly poskytnuty oddělením rostlinolékařství, katedra rostlinné výroby na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Stáří použitých kmenů bylo při izolaci DNA 21 dní. Jednotlivé vzorky byly odebrány v lokalitě Černá hora na Šumavě z dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips Typographus*).

Tabulka 1: Seznam použitých kmenů

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	datum izolace	lokalita	Zdroj	izolace		Historie	Odběr
						Dodine	PDA+Anti		
1	NP 0001	monitoring původní kmen	11.6.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S1	1. strom, 1. odběr
2	NP 00011	monosporový izolát z NP 0001							
3	NP 00012	monosporový izolát z NP 0001							
4	NP 00013	monosporový izolát z NP 0001							
5	NP 00014	monosporový izolát z NP 0001							
6	NP 00015	monosporový izolát z NP 0001							
7	NP 00016	monosporový izolát z NP 0001							
8	NP 00017	monosporový izolát z NP 0001							
9	NP 00018	monosporový izolát z NP 0001							
10	NP 00019	monosporový izolát z NP 0001							
11	NP 000110	monosporový izolát z NP 0001							
12	NP 0002	monitoring původní kmen	11.6.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S1	1.strom, 2.odběr
13	NP 00021	monosporový izolát z NP 0002							
14	NP 00022	monosporový izolát z NP 0002							
15	NP 00023	monosporový izolát z NP 0002							
16	NP 00024	monosporový izolát z NP 0002							
17	NP 00025	monosporový izolát z NP 0002							
18	NP 00026	monosporový izolát z NP 0002							
19	NP 00027	monosporový izolát z NP 0002							
20	NP 00028	monosporový izolát z NP 0002							
21	NP 00029	monosporový izolát z NP 0002							

č. vz.	Kmen	Specifikace kmene	datum izolace	lokalita	zdroj	izolace		Historie	Odběr
						Dodine	PDA+Anti		
22	NP 000210	monosporový izolát z NP 0002	11.6.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S1	2. strom, 1. odběr
23	NP 0003	monitoring původní kmen							
24	NP 00031	monosporový izolát z NP 0003							
25	NP 00032	monosporový izolát z NP 0003							
26	NP 00033	monosporový izolát z NP 0003							
27	NP 00034	monosporový izolát z NP 0003							
28	NP 00035	monosporový izolát z NP 0003							
29	NP 00036	monosporový izolát z NP 0003							
30	NP 00037	monosporový izolát z NP 0003							
31	NP 00038	monosporový izolát z NP 0003							
32	NP 00039	monosporový izolát z NP 0003							
33	NP 000310	monosporový izolát z NP 0003							
40	NP 0100	monitoring původní kmen							
41	NP 0101	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
42	NP 0102	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
43	NP 0103	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
44	NP 0104	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
45	NP 0105	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
46	NP 0106	monitoring původní kmen	4.9.2008	Č. Hora	dospělec	Bba	Bba	S2	
47	NPA 0001	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101	4.9.2008						
48	NPA 0002	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101	4.9.2008						
49	NPA 0003	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101	4.9.2008						
	B05	monitoring původní kmen	2004	Pr. Vltavy	dospělec	-	Bba	S1	

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace a sterilní práce

Média, sklo a veškeré nástroje byly sterilovány v autoklávu (120 °C, 0,1 MPa, 30 min). Veškeré sterilní operace byly prováděny v laminárním boxu.

3.2.2 Příprava středových kultur a monosporových izolátů

V pokusech byly použity kmeny získané v rámci monitoringu na lokalitách NP Šumava. Kmeny byly izolovány z dospělců lýkožrouta smrkového a po přečištění byly čisté kultury kultivovány na PDA plotnách.

Konidiové suspenze jednotlivých kmenů entomopatogenní houby *B. bassiana* byly získány smytím sterilním roztokem 0,05% Tween[®] 80 z plně vysporulovaných 14 denních kultur. Získaná suspenze každého kmene byla filtrována přes sterilní gázu a v suspenzi byla pomocí počítačící komůrky (Neubauer Improved Chamber, Sigma) stanovena koncentrace konidií. Pro založení středových kultur byla základní suspenze konidií následně adjustována ředěním na titer $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml. Takto připravená suspenze byla nanesena kultivační kličkou (1 μ l) ve formě kapky na střed PDA plotny. Z každého kmene bylo založeno 10 opakování. Po vsáknutí kapek do živného média byly misky v sáčcích umístěny do termostatu ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) a kultivovány po dobu 21 dní.

Z kmenů NP 0001 – NP 0003 byly dále připraveny monosporové izoláty, které byly získány pomocí metody ředění (CFU – colony forming units). Adjustovaná suspenze $1,00 \times 10^7$ konidií v 1 ml byla důkladně promíchána na vortexu. Ze suspenze byl odebrán 1 ml a převeden do 9 ml sterilní destilované vody Tween 80. Vzniklá suspenze byla promíchána a tento postup byl opakován až do fáze získání suspenze o koncentraci $1,00 \times 10^1$ konidií v 1 ml. Na PDA plotnu byla nainokulována suspenze o objemu 0,5 ml. Pomocí sterilní spatuly bylo inokulum rozetřeno po celém povrchu PDA plotny. Z každého kmene bylo založeno 10 opakování. Po zaschnutí suspenze byly Petriho misky umístěny v sáčku do termostatu a kultivovány po dobu 7 dnů. Po 7 dnech byly na miskách z

původního kmene narostlé kultury. Každá kultura kmene *B. bassiana* byla namnožena z jedné konidie. Z každého opakování byla získána jedna monosporová kultura, celkem 10 monosporových kultur.

3.2.3 Izolace templátové DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí metody CTAB dle Williams et al. 1992

Protokol:

1. Do sterilních 1,5 ml centrifugačních mikrozkušavek dáme 200 mg mycelia, ze kterého chceme izolovat DNA; Vzorek důkladně zhomogenizujeme třením v mikrozkušavce
2. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l extrakčního pufru (2% CTAB-PVP + β -merkaptoethanol), tkáň opět zhomogenizujeme a promícháme s pufrem
3. Inkubujeme 45 minut při 65°C ve vodní lázni, během inkubace lehce promícháme
4. Následuje centrifugace po dobu 10 minut na maximum (14000 rpm), při pokojové teplotě, supernatant přeneseme do nových 1,5 ml mikrozkušavek
5. Přidáme 500 μ l směsi chloroformu-IAA a následně 10 minut protřepáváme
6. Centrifugujeme 5 minut na maximum (14000 rpm) při pokojové teplotě
7. Do nových 1,5 ml mikrozkušavek opatrně přepipetujeme pouze vodnou fázi
8. Přidáme 1/5 5% CTAB
9. Opakujeme kroky 5-7.
10. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (cca 350 μ l), 2-3x lehce promícháme
11. Uložíme na 12 hodin do mrazícího boxu (-20°C)
12. Centrifugujeme 5 minut při 4°C na maximum (14000 rpm), DNA by se měla zachytit na dně eppendorfky (bílý - světle žlutý pelet); supernatant odstraníme
13. Přidáme 1ml ledového 70% ethanolu, centrifugujeme 5 minut na maximum (14000 rpm) při 4°C, slijeme, dle pigmentu peletu opakovat kolikrát bude třeba
14. Sušíme 3-4 hodiny

15. Dle množství peletu přidáme 20-200 µl sterilní vody
16. Uzavřené mikrozkušavky necháme při 37°C lehce třepat, aby došlo k rozpuštění DNA
17. Dle množství RNA přidáme 2-4µl Rázy, necháme inkubovat 30 minut při 37°C
18. DNA uchováváme při -20°C

3.2.4 Výběr primerů

Pro screening primerů byly vybrány primery, které jsou uvedeny v následující tabulce (viz. Tabulka 2). Primery byly zvoleny na základě publikovaných prací Rehner et Buckley (2003) a Enkerli et al. (2001). Práce, kterou publikoval Enkerli et al. (2001) se vztahovala na entomopatogenní houbu *B. brogniartii*, ale Wang et al. (2003; 2004) tyto primery použil i pro molekulární monitoring *B. bassiana*. Některé primery byly již použity v jiných studiích prováděných na biologickém centru Zemědělské fakulty JCU. Při těchto studiích byly optimalizovány jejich nasedací teploty a celkový průběh PCR. U primerů kde nebyly teploty dosud známé byla provedena PCR s teplotním gradientem aby mohl být stanoven optimální teplotní průběh PCR.

Tabulka 2: Sekvence a annealingové teploty primerů

Název primeru	Sekvence	Teplota nasedání primerů
01	F: CCAACCCAATCAATCGTCAT	54 °C
	R: GAGAGGCGGAGCTAAGCA	
02	F: AACGCTATGCCTTGACGAC	54 °C
	R: GACGCCGAGCAATGTAACA	
03	F: GCATAGATATGTCTCGCACC	54 °C
	R: ACTACCCCTGTCCCGCTGA	
06	F: GCGATTGACGAAAAGCTAGA	54 °C
	R: ACTTGCTTTGCTGTTGCACA	
08	F: TGTTGCCGACACGAATTGT	54 °C
	R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	
13	F: CAGGCAACAACACGATTTCA	56°C

	R: ATGCCATCTACGACTTTATGA	
12	F: GGGTCCATCATGTACGGC	56 °C
	R: AGGCGTATACAGGTCGTG	
05	F: AGGCAATACCGAGGTTGGC	58 °C
	R: ATCCATGGCGAGCCGTCC	
1F4	F: GATCCTTCGTCACCTGCTC	58 °C
	R: CGGTGTTGGAGAGCTATTGT	
2F8	F: GCACACTTTCGCGTGTCAT	58 °C
	R: ATGATGTCTGCCACGTCTGA	
5F4	F: CTCGATCACTTTTCCATCAA	58 °C
	R: TGGTTGGGTCATGTTAGTCA	
6A8	F: GATGATGCGACCTCTTGGAC	58 °C
	R: TGCGACAGATTCGGAGAGTA	
2A3	F: CACTTCAGTTATCATGCTCGAA	58 °C
	R: ATCTGGCACGTCAAGTGTCT	
8D6	F: TTTGTCCGAAGTTGTCTCAGT	58 °C
	R: TGCATTGTGAAAGGTAATGC	

Pomocí primerů, které jsou uvedeny výše byla provedena PCR. Tato reakce byla provedena na vzorcích 01, 12, 23 z analyzované sady vzorků a dále na vzorcích Pk a Pm. Tyto vzorky (Pk, Pm) pocházejí ze sbírky KRV Zemědělské fakulty JČU. Byly použity především kvůli znalosti produktů, které při PCR vytvářejí. Tímto screeningem jsem ověřil vhodnost primerů a vybral jsem tak nejvhodnější kombinaci primerů pro provedení analýzy.

3.2.5 Analýza mikrosatelitů

Pro přípravu vzorků na analýzu byl použit *qPCR 2xSYBR Master Mix* (Top-Bio s.r.o.). Tento Master Mix se dodává 2 x koncentrovaný a má následující složení: 20 mM Tris-HCL, pH 8,8, 100 mM KCL, 0,2% Triton X-100, 3 mM MgCl₂, 400 μM dATP, 400 μM dCTP, 400 μM dGTP, 400 μM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální anti-Taq DNA polymerázy (38 nM), SYBR Green, stabilizátory a aditiva. Každá šarže *qPCR 2x SYBR Master Mixu* byla u výrobce testována na amplifikaci genu o jedné kopii v genomové DNA pomocí přístroje pro real-time PCR. Tento Master Mix byl po delší dobu skladován při teplotě -20 °C.

1. Nejdříve napipetujeme Master Mix, oba primery, templátovou DNA a PCR H₂O dle následujícího schématu (viz. Tabulka 3)

Tabulka 3: Schéma pipetování

Objem	Reagens	Finální koncentrace
12,5 μl	qPCR 2x SYBR Master Mix	10 mM Tris-HCL, pH 8,8, 50 mM KCL, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl ₂ , 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP, 200 μM dTTP, 25 U/ml Taq DNA polymerázy, monoklonální anti-Taq DNA polymerázy (19 nM)
0,5 μl	5' primer	1 μM (~ 20 bazí)
0,5 μl	3' primer	1 μM (~ 20 bazí)
1 μl	Templátová DNA	25 ng
10,5 μl	PCR H ₂ O	Do finálního objemu 25 μl

2. Po napipetování vzorek zamícháme na vortexu a krátce centrifugujeme
3. Provedeme PCR za podmínek optimalizovaných pro konkrétní dvojici primerů.

PCR reakce probíhala v termocykleru BIOER XP cycler. Byly použity následující teplotní profily reakcí.

1. Pro primery s teplotou nasedání 54 °C:

Počáteční denaturace po dobu 2 minut (95 °C). 35 PCR cyklů – 30s denaturace 94°C, 30s annealing (54 °C), 1 minuta elongace 72°C. 5 minut (72 °C) závěrečné zchlazení na teplotu vhodnou k uchování (4 °C)

2. Pro primery s teplotou nasedání 56 °C:

Počáteční denaturace po dobu 2 minut (95 °C). 35 PCR cyklů – 30s denaturace 94°C, 30s annealing (56 °C), 1 minuta elongace 72°C. 5 minut (72 °C) závěrečné zchlazení na teplotu vhodnou k uchování (4 °C)

3. Pro primery s teplotou nasedání 58 °C:

Počáteční denaturace po dobu 2 minut (95 °C). 35 PCR cyklů – 30s denaturace 94°C, 30s annealing (58 °C), 1 minuta elongace 72°C. 5 minut (72 °C) závěrečné zchlazení na teplotu vhodnou k uchování (4 °C)

PCR produkty byly vizualizovány barvením pomocí SYBR GREEN, po elektroforéze na 3% Synergel-agarózovém gelu v TBE pufru.

3.2.6 Zpracování dat

Získané výsledky – molekulární data byla ručně naskórována. Posléze byla sestavena binární matice přítomnosti/nepřítomnosti „pruhů“ na gelu a byla provedena analýza těchto dat pomocí specializovaného softwaru. Korekce fotografií gelů byly prováděny za použití speciálního grafického software *Adobe photoshop CS2*.

3.2.7 Clusterová analýza

Pro zpřehlednění primárních výsledků ze skórování a získání ilustrativního výsledku je možnost seskupení (sgrupování) podobných spekter na základě výpočtu *podobnostní matice* - koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice pak byly podrobeny clusterové

analýze (UPGMA – *Unweighted Pair Group Method Using Averages*) a výsledky zobrazeny jako *dendrogram*. Dále byla provedena PCO analýza a výsledky jsou zobrazeny ve formě ordinačního diagramu.

Pro výpočet koeficientů podobnosti byl použit Gowerův obecný koeficient podobnosti (*Gower general similarity coefficient; GOWER*).

Vzorec 1: Výpočet Gower general similarity coefficient

$$GGSc_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^n (w_{ijk} s_{ijk})}{\sum_{k=1}^n w_{ijk}}$$

Kde:

$$s_{ijk} = 1 - \frac{|x_{ik} - x_{jk}|}{rozsah(k)} \quad \text{pro kvantitativní data}$$

= 1 pro shodu binárních deskriptorů

= 0 pro neshodu

$$w_{ijk} = 0 \text{ pro neshodu binárních deskriptorů}$$

= 1 pro všechny ostatní

3.2.8 Statistické zpracování dat

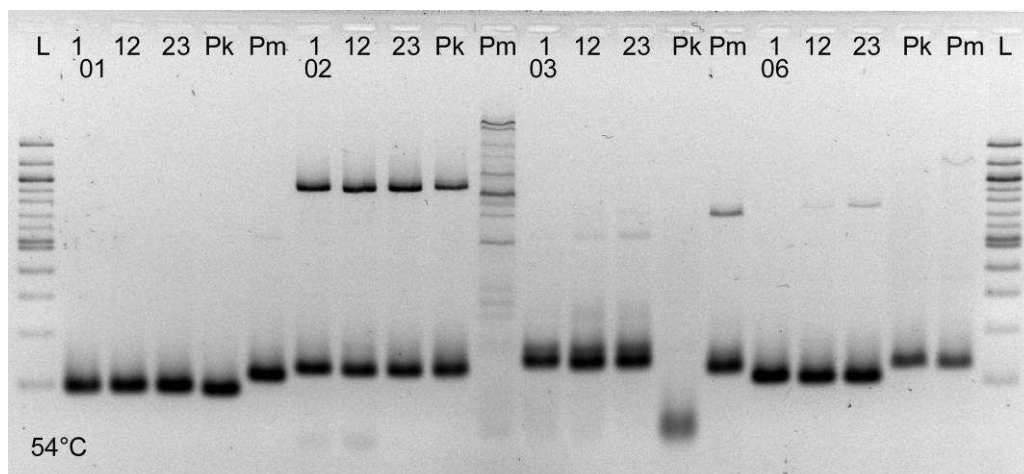
Pro účely komplexního hodnocení mikrosatelitových pruhů bylo využito statistického zpracování dat. Na základě zpracování primárních dat bylo možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení. Výstupem zpracovaných dat jsou popsány profily molekulárních markerů jednotlivých kmenů, vzájemné vztahy mezi kmeny jsou vyjádřeny podobnostními koeficienty, dendrogramy a ordinačními diagramy. Pro tyto účely byl využit program *MVSP (MultiVariate Statistical Package; Kovach Comp.Serv)*.

4 Výsledky

V této práci jsem hodnotil míru genetického polymorfismu jednotlivých kmenů *B. bassiana* odebraných v lokalitě Černá hora z dospělců lýkožrouta smrkového (*Ips Typographus*).

V první fázi práce jsem se pomocí screeningu primerů snažil nalézt nejvhodnější kombinaci primerů pro analýzu mikrosatelitů. Na následujících snímcích (viz. Obrázek 3; Obrázek 4; Obrázek 5) jsou zobrazeny výsledky screeningu, uvádím pouze ty elektroforeogramy, kde jsou primery, které jsem vybral pro analýzu.

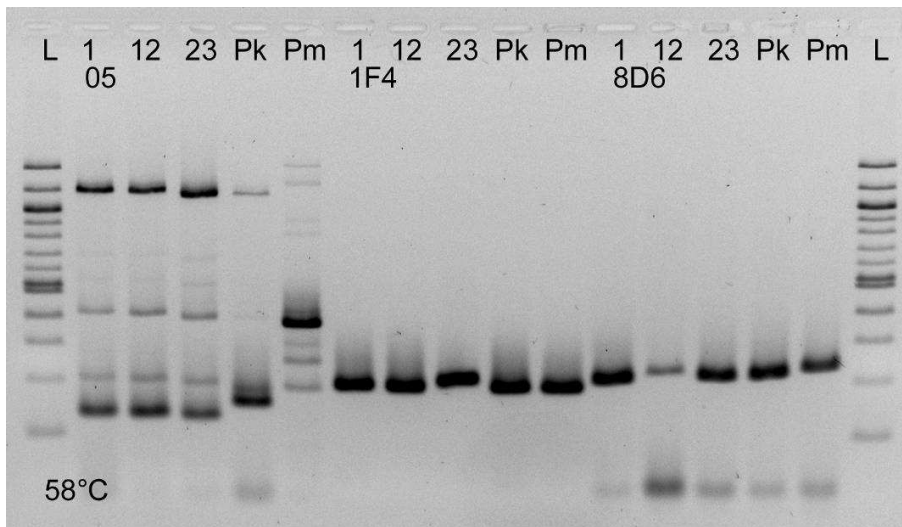
Obrázek 3: Screening, primery 01, 02, 03, 06



Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	Zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
Pk	Pk	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	
Pm	Pm	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	

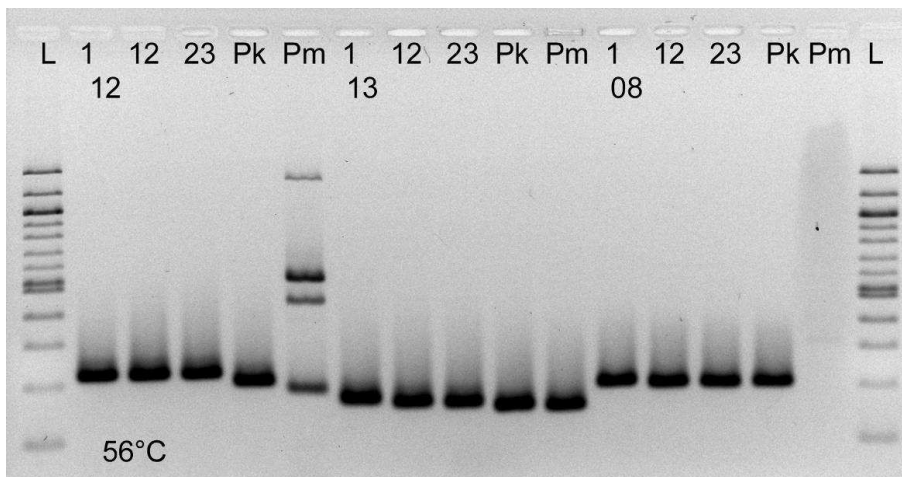
Obrázek 4: Screening, primery 05, 1F4, 8D6



Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	Zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
Pk	Pk	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	
Pm	Pm	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	

Obrázek 5: Screening, primery 12, 13, 08



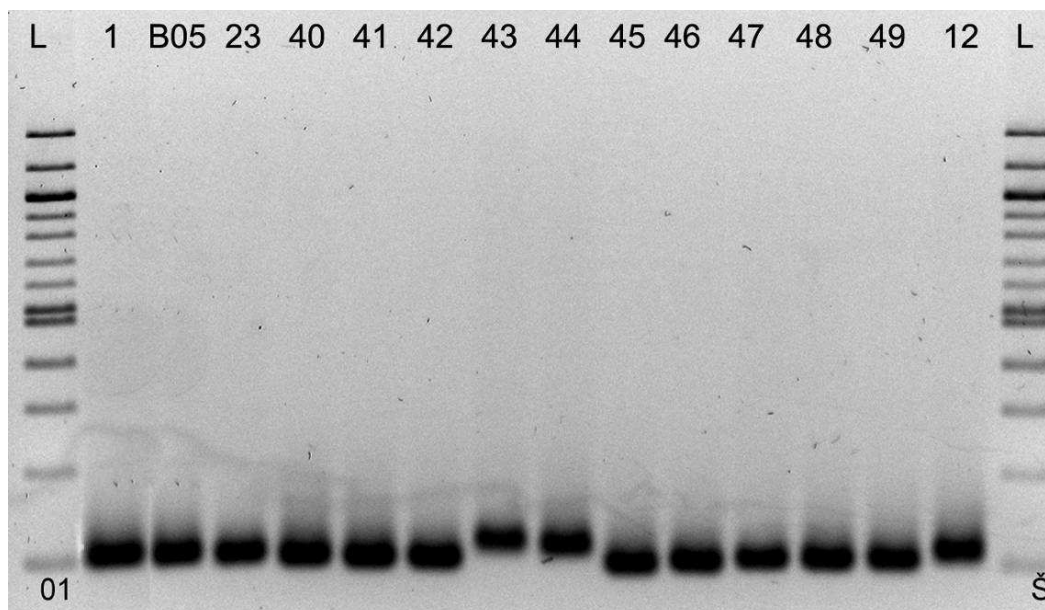
Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	Zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
Pk	Pk	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	
Pm	Pm	Kmen ze sbírky KRV = referenční kmen	Morava	

Na základě těchto zjištění jsem pro analýzu vybral primery 01, 13, 1F4 a 8D6. Pomocí těchto primerů jsem na všech vzorcích analyzované sady provedl PCR.

Pomocí primeru 01 se podařilo od ostatních odlišit pouze vzorky 43 a 44 (viz. Obrázek 6).

Obrázek 6: Vizualizace gelu, primer 01



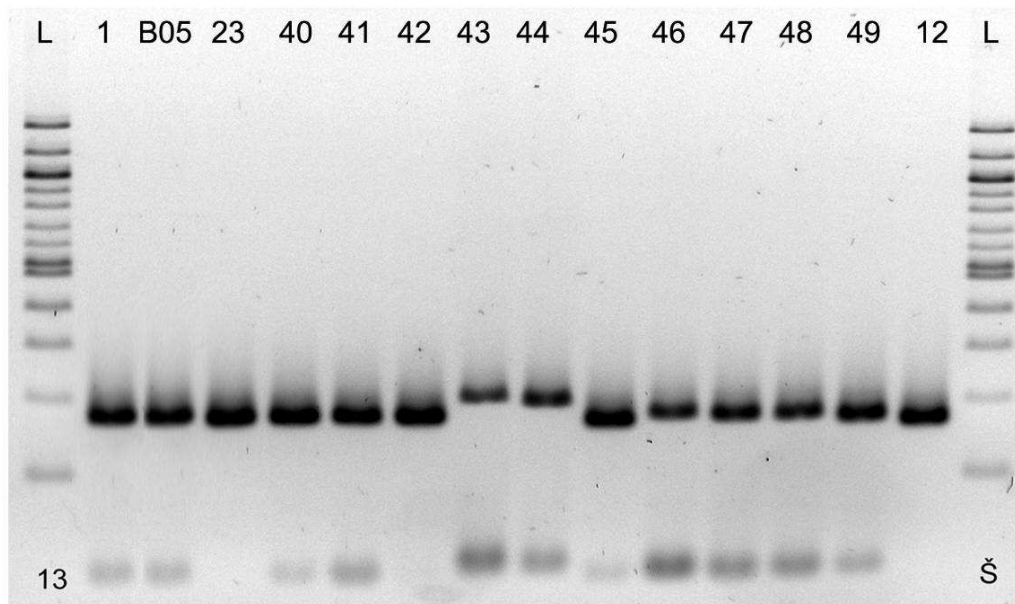
Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
	B05	Monitoring (2004) původní kmen	Pr. Vltavy	Dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
40	NP 0100	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
41	NP 0101	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
42	NP 0102	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
43	NP 0103	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
44	NP 0104	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
45	NP 0105	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
46	NP 0106	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
47	NPA 0001	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
48	NPA 0002	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
49	NPA 0003	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec

Na základě primeru 13 se v dané sadě vzorků odlišily 3 haplotypy. Kmeny NP0001 – P0003 a jejich monosporové izoláty současně s kmeny NP0100, NP0101, NP0102 a NP0105, což jsou kmeny odebrané při monitoringu zformovaly jednu skupinu, kmeny NP0103 a NP0104, též kmeny z monitoringu, zformovali druhou skupinu a kmen B05, použitý při aplikaci a kmeny NPA0001,

NPA0002 a NPA0003, což jsou kmeny které byly reizolovány z prostředí po aplikaci proti lýkožroutovi, zformovaly třetí skupinu (viz. Obrázek 7).

Obrázek 7: Vizualizace gelu, primer 13

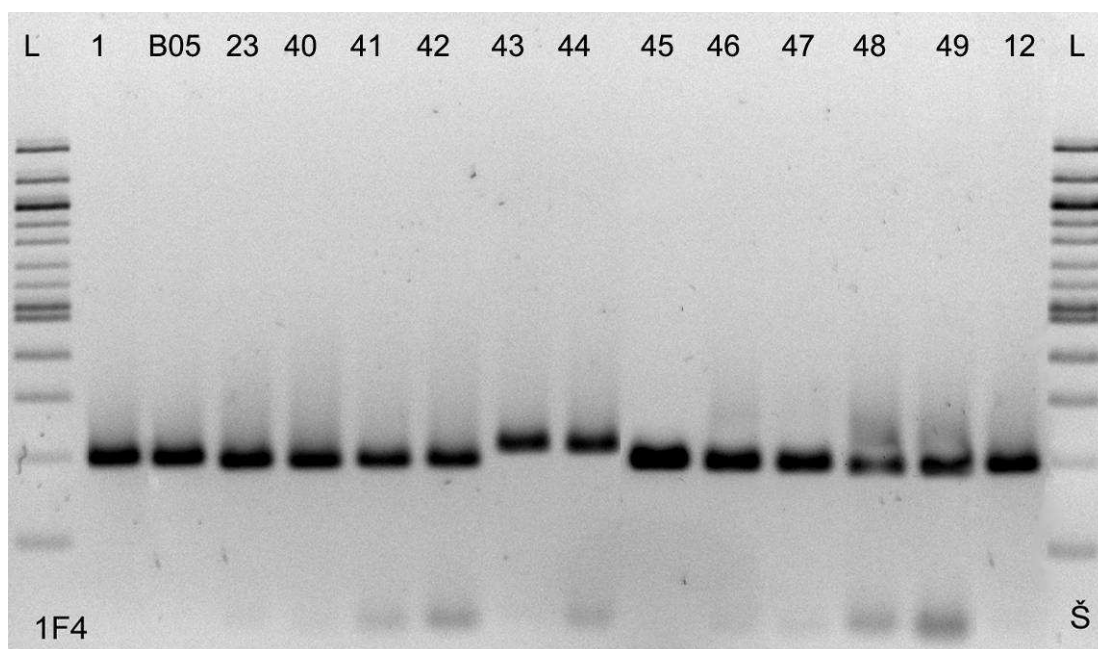


Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
	B05	Monitoring (2004) původní kmen	Pr. Vltavy	Dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
40	NP 0100	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
41	NP 0101	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
42	NP 0102	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
43	NP 0103	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
44	NP 0104	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
45	NP 0105	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
46	NP 0106	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
47	NPA 0001	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
48	NPA 0002	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
49	NPA 0003	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec

Za pomoci primerů 1F4 a 8D6 se odlišily stejné haplotypy jako u primeru 01 (Viz. Obrázek 8).

Obrázek 8: Vizualizace gelu, primer 1F4



Legenda:

č. vz.	Kmen	specifikace kmene	Lokalita	zdroj
1	NP 0001	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
	B05	Monitoring (2004) původní kmen	Pr. Vltavy	Dospělec
23	NP 0003	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
40	NP 0100	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
41	NP 0101	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
42	NP 0102	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
43	NP 0103	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec
44	NP 0104	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
45	NP 0105	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
46	NP 0106	monitoring původní kmen	Č. Hora	Dospělec
47	NPA 0001	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
48	NPA 0002	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
49	NPA 0003	reizolovaný kmen po aplikaci Bba I101		
12	NP 0002	monitoring původní kmen	Č. Hora	dospělec

Elektroforeogramy monosporových izolátů jsou uvedeny v přílohách. Po provedení analýz jsem vizualizované gely ručně naskóroval (viz. Tabulka 4) a určil haplotypy (viz. Tabulka 5).

Tabulka 4: Matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1F4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8D6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	B05	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
13	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
1F4	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
8D6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1

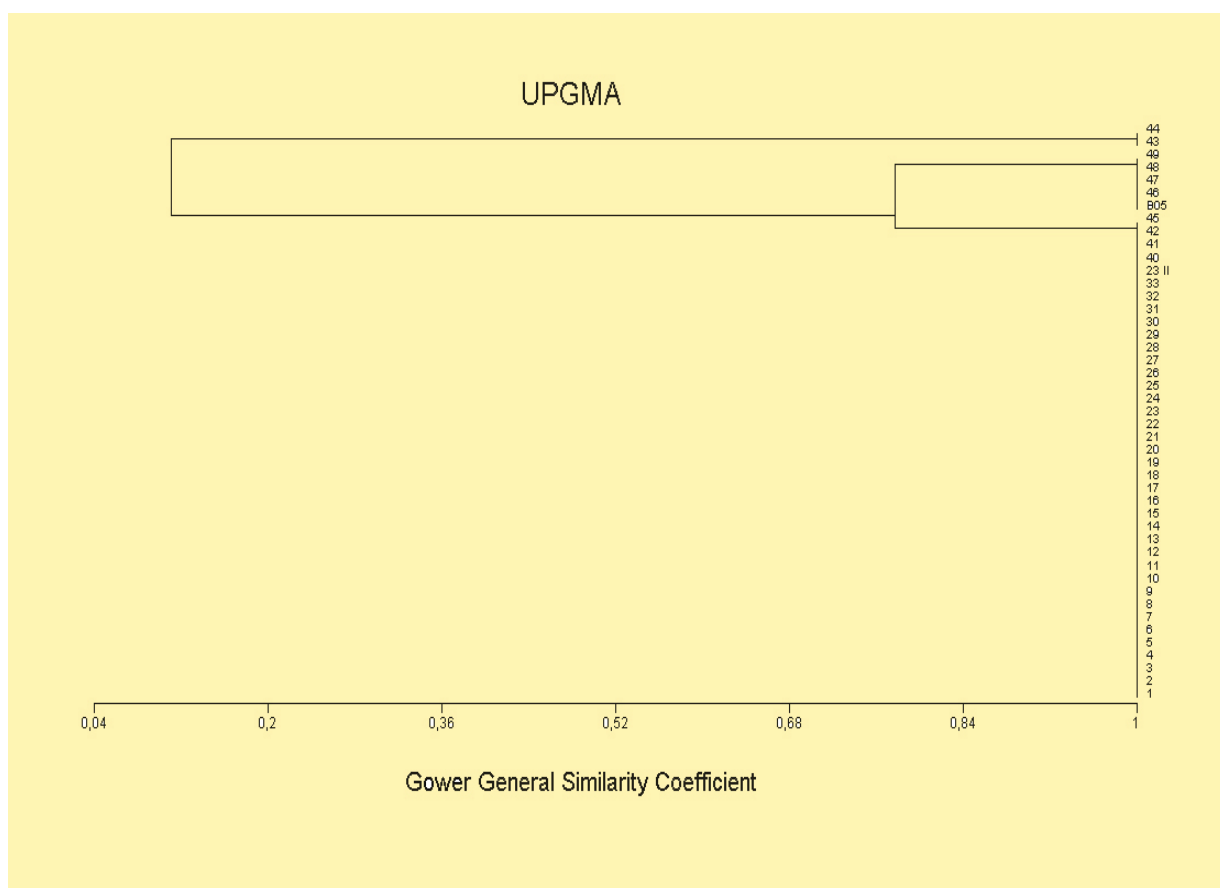
Tabulka 5: Matice haplotypů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
1F4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
8D6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

	B05	23 II	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
1	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A
13	B	A	A	A	A	C	C	A	B	B	B	B
1F4	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A
8D6	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A

Na základě matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhů byla vytvořena matice podobnosti (similarity matrix). Koeficienty podobnosti v této matici byly spočteny pomocí Gowerova obecného koeficientu podobnosti (*Gower general similarity coefficient; GOWER*). Na základě této matice byla provedena shluková analýza (UPGMA; viz. Obrázek 9) a analýza PCO.

Obrázek 9: Dendrogram získaný pomocí shlukové analýzy (UPGMA)



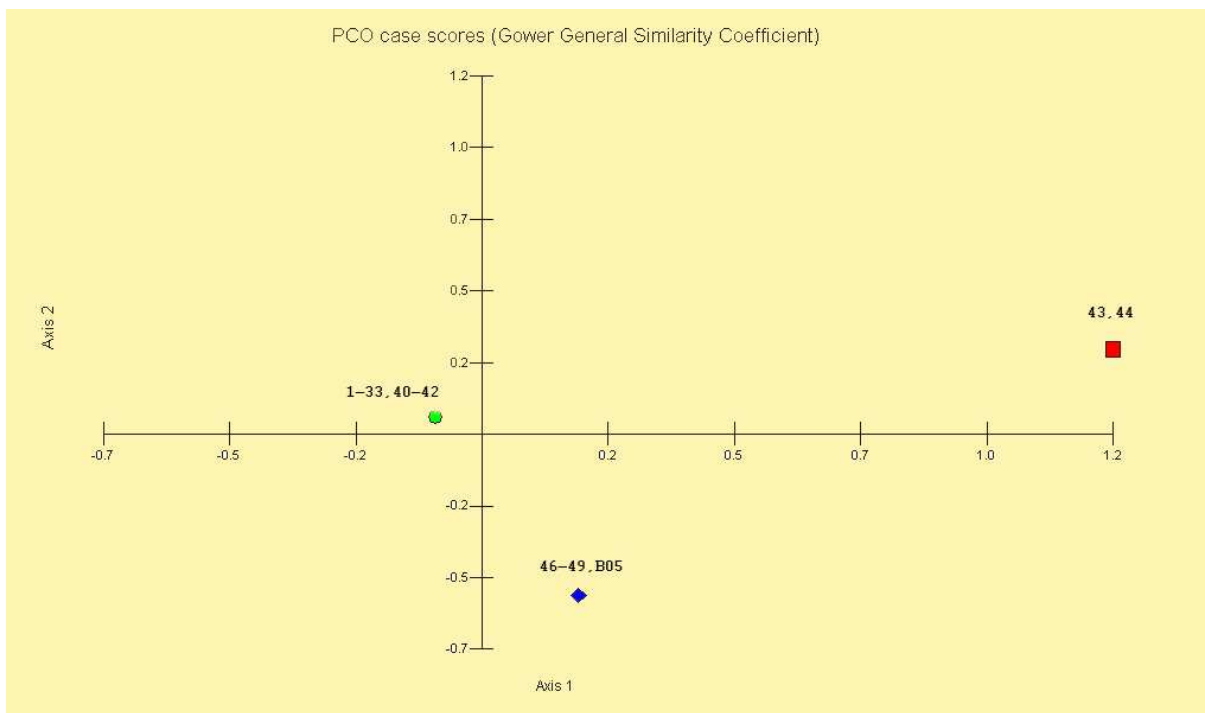
Legenda:

Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003, 40-46 = NP0100-NP0106 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003, 47-49 = reisolované kmeny po aplikaci Bba I101 NPA0001-NPA0003, B05 – monitoring původní kmen.

Jak je z dendrogramu patrné v daném souboru se vytvořili tři clustery. První skupina zahrnuje vzorky 1-33 (kmeny NP0001-NP0003 a jejich monosporové izoláty) a vzorky 40, 41, 42 a 45 (kmeny NP0100, NP0101, NP0102 a NP0105). Od této skupiny se odlišila skupina vzorků 46 – 49 (kmeny B05, NP0106,

NP0107, NP0108 a NP0109). Tyto dvě skupiny se sobě podobají ze 70 %. Třetí skupina se dvěma zbývajícím podobá asi z 0,5 – 1 %. Tato skupina obsahuje vzorky 43 a 44 (kmeny NP0103 a NP0104). Totožné informace jsou patrné i z dendrogramu získaného pomocí algoritmu PCO (viz. Obrázek 10).

Obrázek 10: Dendrogram získaný pomocí PCO



Legenda:

Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003, 40-46 = NP0100-NP0106 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003, 47-49 = reisolované kmeny po aplikaci Bba I101 NPA0001-NPA0003, B05 – monitoring původní kmen.

5 Diskuze

K dispozici jsem měl celkem 44 vzorků. 10 vzorků byly kmeny vyizolované při monitoringu, 30 vzorků byly monosporové izoláty z kmenů NP0001, NP0002 a NP0003, kmen B05 a tři kmeny reizolované z postředí po aplikaci *B. bassiana*. U těchto kmenů jsem provedl analýzu mikrosatelitů abych mohl zhodnotit genetický polymorfismus v rámci této sady. K těmto účelům byla analýza mikrosatelitů použita již mnohokrát (viz. 2.7). a vhodnost této analýzy k identifikaci kmenů v mykologii potvrzují ve svých studiích například Wang et al. (2003; 2004) nebo Castrillo et al. (2008).

Výsledky analýzy ukazují na to, že ve studované skupině monosporových izolátů je téměř nulová hladina genetického polymorfismu. Již na základě morfologických charakteristik se dalo předpokládat, že monosporové izoláty se nebudou lišit od kmenů z kterých byly odvozeny. Mikrosatelitová analýza tento předpoklad potvrdila, jak je patrné z výsledného dendrogramu (viz. Obrázek 9). Genetická podobnost mezi kmeny, které byly získány při monitoringu oblasti je rovněž velmi vysoká. Pouze dva vzorky (43 a 44) vykázaly odlišnost od ostatních vzorků. Toto si lze vysvětlit tím, že vzorky které jsem analyzoval byly odebrány na malé lokalitě a vzorky, které jsem analyzoval byly odebrány pouze z imága.

K podobným výsledkům došli Wang et al. (2003), kteří pomocí molekulárních markerů, včetně mikrosatelitů, popisovali populační strukturu a genetickou příbuznost mezi kmeny *Beauveria bassiana*. Wang et al. (2003) porovnávali 56 kmenů z různých geografických oblastí a z různých vývojových stádií a hostitelů. Vzorky byly odebrány v pěti rozsáhlých lesních lokalitách v Číně. Dalších pět kmenů pocházelo z USA a tři z Japonska. Zjištění ukázala, že index průměrné genetické diverzity byl u geografických populací o poznání menší, než u populací odvozených od hostitelského organismu, což poukazuje na to, že genetická příbuznost kmenů *B. bassiana* je vysoce závislá na geografické lokalitě a naopak méně závisí na hostitelském organismu. V rámci jednotlivých odběrových míst byla diverzita nižší, než v rámci celé zkoumané populace.

Mikrosatelity byly použity i ve studii Enkerliho et al. (2001), kteří se věnovali hledání vhodných mikrosatelitových markerů pro hodnocení vztahů mezi kmeny entomopatogenní houby *Beauveria brogniartii*. V této studii byly použity kmeny, které byly odebrány po celém Švýcarsku. Mezi těmito kmeny se podařilo zjistit vysokou variabilitu až na dva kmeny, které byly naprosto identické a pocházeli z dvou polí, která byla od sebe vzdálená cca. 500 m. V dané populaci se vytvořilo několik clusterů. Všechny kmeny, pocházející z larev *Melolontha melolontha*, stejně jako ty z *Melolontha hippocastani* a *Amphimallon solstitiale* utvořili jeden cluster. Tyto kmeny se oddělily od clusteru tvořeného dospělci *Melolontha melolontha*. Pro další práci by tedy mohlo být zajímavé zkoumat genetickou diverzitu mezi kmeny izolovanými z různých vývojových stádií hostitelských organismů.

Ke stejným závěrům dospěli i Castrillo et al. (2008), kteří se pomocí molekulárních markerů snažili charakterizovat izoláty *B. bassiana* izolované z různých instarů *Scatella tenuicosta*. Pomocí osmi mikrosatelitových markerů našli mezi 41 kmeny 14 haplotypů. Clustery se vytvářely především podle toho z jakého vývojového stádia hostitelského organismu byl daný kmen izolován.

Wang et al. (2004) a Nicolai et al. (2007) se věnovali využití molekulárních markerů v ekologii *B. bassiana*. Wang et al. (2004) navázali na předchozí studii a sledovali genetickou strukturu kmenů před a po aplikaci přípravku na bázi *B. bassiana*. Ve své studii uvádí, že struktura genetické populace se nijak výrazně nezměnila a domnívá se že polní aplikace přípravků na bázi *B. bassiana* nepřinášejí žádná větší rizika pro životní prostředí. Nicolai et al. (2007) uvádí, že nebyl nalezen žádný důkaz toho, že aplikace nepůvodních kmenů *B. bassiana* způsobí snížení diverzity původních kmenů.

Carvanzola et al. (1997) naopak uvádí, že na základě mikrosatelitové analýzy bylo prokázáno že aplikace přípravků genetickou strukturu populace mění. Analyzoval strukturu populace v letech 2003 před aplikací a v roce 2004 po aplikaci. Celkem bylo odebráno 73 kmenů v každém roce a byla provedena analýza mikrosatelitů a RAPD analýza. Pomocí statistické analýzy bylo

prokázáno, že se populace významně změnila. Původní kmeny byly přibližně z 54% nahrazeny kmenem který byl do prostředí aplikován.

6 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zhodnocení genetického polymorfismu kmenů *Beauveria bassiana* na základě analýzy mikrosatelitů. Byla provedena analýza 44 kmenů *B. bassiana*, které byly odebrány při monitoringu v oblasti Černá Hora na Šumavě. Během řešení diplomové práce byla optimalizována metoda izolace DNA z entomopatogenních hub a metoda analýzy mikrosatelitů. Výsledky analýzy mikrosatelitů byly použity pro účely hodnocení genetického polymorfismu ve zkoumané populaci. Na základě provedených analýz je patrné, že genetická diverzita hodnocených kmenů je poměrně malá. Kromě dvou kmenů NP0103 a NP0104 vykazovaly analyzované kmeny stejné spektrum mikrosatelitových markerů, odlišné ale od kontrolních kmenů z Jižní Moravy. Jednou z příčin takto malého polymorfismu může být velikost lokality, ze které vzorky pocházely. Pro podobné studie, by pravděpodobně bylo lepší vybrat rozsáhlejší lokalitu, kde je předpoklad větší variability. Tato studie však může bez problému sloužit jako model pro další práci a obdobné studie. Pozitivním výsledkem a zjištěním diplomové práce je, že skupina monosporových izolátů vykazuje nulový polymorfismus, a že monosporové izoláty jsou totožné s původním kmenem, ze kterého byly odvozeny, což demonstruje stabilitu odebraného kmene. Celkově lze říci, že výsledky, které jsem získal při řešení diplomové práce ukazují na vysokou podobnost hodnocených kmenů a tedy nízkou hladinu polymorfismu. Pro další práci by bylo vhodné zvětšit lokalitu, ze které budou vzorky odebírány a zařadit do analyzované sady kmeny, které byly získány z různých vývojových stádií hostitele, stejně tak jako další referenční kmeny entomopatogenních hub získané z jiných lokalit s podobnými podmínkami. Pro detailnější vnitropopulační studii by bylo vhodné využít analýzu ribosomální DNA. Takto vybraná a hodnocená populace pravděpodobně poskytne věrnější obraz kmenové diverzity na daném území.

7 Seznam použité literatury

BENZ, G., ZUBER, M. *Die wichtigsten Forstinsekten der Schweiz und des angrenzenden Auslands.* [s.l.] : 2007, 121 s.

BOUCIAS, D., PENDLAND, J.C. *Principles of insect pathology.* : Springer, 1998, 568 s. ISBN 041203591X.

BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J. C., LATGE, J. P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology.* 1988, vol. 54, no. 7, s. 1795-1805.

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.L. *Beauveria*, in Capinera, J.L (ed). *Encyclopedia of Entomology.* 2nd edition, Springer, 2008, s. 401-404.

BRETAGNE, A., COSTA , J-M., BRESMOND, C. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for typing system . *Journal of clinical microbiology.* 1994, no. 368, s. 455-457.

BRIDGE, P. D., REDDY, C. A., ELANDER, R. P. *Application of PCR in mycology.* [s.l.] : CABI, 1998, 376 s.

BURGE, M.N. *Fungi in Biological Control Systems.* [s.l.] : Manchester university press, 1988,. 269 s. ISBN 0719019796.

BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N. *Fungi as biocontrol agents.* [s.l.] : CABI, 2001, 390 s. ISBN 0851993567.

CASTRILLO, L. A., UGINE, T. A., FILOTAS, M. J. Molecular characterization and comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates (Ascomycota: Hypocreales) associated with the greenhouse shore fly, *Scatella tenuicosta* (Diptera: Ephydriidae). *Biological control.* 2008, no. 45, s. 154-162.

CARVANZOLA, F., PIATTI, P., BRIDGE, P. D., Ozino, O. I. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beuveria brogniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha spp.*). *Letters in Applied Microbiology* . 1997, no. 25, s. 289-294.

DAVISE, J. H. *Medically Important Fungi : A Guide to Identification*. 4th edition. [s.l.] : ASM Press, 2002, 409 s. ISBN 1555811728.

DEVI, K. U., REINEKE, A., PADMAVATHI, J. Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogen.... *Genome*. 2006, vol. 49, no. 5, s. 495-504.

EILENBERG, J., HOKKAKEN, H.M.T. *An ecological and societal approach to biological control*. [s.l.] : Springer, 2006, 322 s. ISBN 1402043201.

EILENBERG, J., HAJEK, A., LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*. 2001, no. 46, s. 387-400.

ENKERLI, J., WIDMER, F., GESSLER, C. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beuveria brogniartii*. *Mycological research*. 2001, vol. 105, no. 9, s. 1079-1087.

European Molecular Biology Laboratory. *EMBL Nucleotide Sequence Database* [online]. 2009 [cit. 2009-04-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.ebi.ac.uk/embl/>>.

FAN Y., FANG W., GUO S., YONGJUN Z., YUEHUA X., DEMOU L. KAI J., BIDOCHKA M. J. Increased Insect Virulence in *Beuveria bassiana* Strains Overexpressing an Engineered Chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, no. 1, s. 292-302.

FIELD, D., EGGERT, L., METZGAR, D. ROSE, R., WILLS, C., TAYLOR J.W. Use of polymorphic short and clustered coding-region microsatellites to

distinguish strains of *Candida albicans*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1996, no. 15, s. 73-79.

FISHER, M.C., KOENIG, G., WHITE, T.J. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Molecular biology and evolution*. 2000, no. 17, s. 1164-1174.

FOLLET, P.A., DUAN, J. J. *Nontarget effect of biological control*. [s.l.]: Springer, 2000, 316 s. ISBN 0792377257.

FROST, P., HENDRYCH, V., ZEZULA, A., CABAN, J., MICHALIK, P. *Ochrana lesů a přírodního prostředí*. [s.l.]: Státní zemědělské nakladatelství, 1985, 409 s.

GEORGIEV, V. *Opportunistic infections*. [s.l.]: Humana press, 2003, 545 s. ISBN 1588290093.

GOLDSTEIN, D. B., SCHLOTTERER, Ch. *Microsatellites: Evolution and Applications*. [s.l.]: Oxford University Press, 1999, 352 s.

GROPE, K., BOLLER, T. PCR assay based on microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloë* endophytes in grass tissue. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997, no. 63, s. 1543-1550.

HAJEK, A.: *Natural enemies: an introduction to biological control*. [s.l.]: Cambridge University Press, 2004, 378 s.

HALL, R. A.: Effect of repeated subculturing on agar and passaging through an insect host on pathogenicity, morphology, and growth rate of *Verticillium lecanii*. *Journal of invertebrate pathology*. 1980, 36, s. 216-222.

HANTULA, J., MULLER, M. M. Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS). *Mycological Research*. 1997, 101, s. 169-175.

HILLIS, D. M. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1987, 18, s. 23-42.

HITCHCOCK, J., CHAMBERS, S. M., ANDERSON, I. C. Development of markers for simple sequence repeat-rich regions that discriminate between *Pisolithus albus* and *P. microcarpus*. *Mycological research*. 2003, vol. 107, no. 6, s. 699-706.

HOELZEL, A. R. *Molecular genetic analysis of populations*. [s.l.] : [s.n.], 2008, 445 s.

CHEN, W., SHI, X., CHEN, Y. Microsatellite markers and clonal genetic structure of the fungal pathogen *Phialophora gregata*. *Mycological research*. 2002, vol. 106, no. 2, s. 194-202.

JAMES, R.R., BUCKNER, J.S., FREEMAN, T.P. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of invertebral pathology*. 2003, roč. 84, č. 2, s. 67-74.

JAPUPCIAK, J. P., WELLS, R. D. Genetic instabilities in repeats occur by recombination. *Journal of biological chemistry*. 1999, no. 274, s. 23468-23479.

KHACHATOURIANS, G. G., ARORA, D. K. *Fungal Genomics*. [s.l.] : Elsevier, 2004, 432 s.

KINGHORN, J.R., TURNER, J. *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. [s.l.] : [s.n.], 1992, 259 s.

KOHN, M. H., MURPHY, W. J., OSTRANDERS, E. A. Genomics and conservation genetics. *Trends in ecology and evolution*. 2007, vol. 21, no. 11, s. 629-637.

LANDA, Z, KOŘENOVÁ, Z, OLDŘIV, V. Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*. 2007, roč. 86, č. 10, s. 20-23

LIEUTIER, F., DAY, K.R., BATTISTI, A. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe*. [s.l.] : 2004, 569 s.

LIM, S., NOTLEY-MCROBB, L., LIM, M. A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal genetics and biology*. 2004, no. 41, s. 1025-1036.

LORD, J. C. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. *Journal of applied entomology*. 2009, no. 133, s. 101-107.

LUZ, C., FARGUES, J. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*. *Mycopathologia*. 1997, vol. 37, no. 2, s. 117-125.

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

MEYLING, N. V., EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems : Potential for conservation biological control. *Biological control*. 2007, no. 43, s. 145-155.

MOON, C .D., TAPPER B. A., SCOTT B. Length variation of CAG/CAA trinucleotide repeats in natural populations of *Drosophila melanogaster* and its relation to the recombination rate. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, no. 65, 1268-1279.

National Center for Biotechnology Information. *NCBI HomePage* [online]. 2009, [cit. 2009-04-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

NIELSEN, R., PALSROLL, P.J. Single locus test of microsatellite evolution : Multi-step mutations and constrains on allele size . *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1999, no. 11, s. 477-484.

REHNER, S. A., BUCKLEY, E. P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the enthomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomyta: Hypocreales). *Molecular ecology notes*. 2003, no. 3, s. 409-411.

ROY, H. E., BROWN, P. M. J, ROTHERY, P. Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *BioControl*. 2008, vol. 53, no. 1, s. 265-276.

SHARMA, P. C., GROVER , A., KAHL, G. Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in biotechnology*. 2007, vol. 25, no. 11, s. 490-498.

SKUHRAVÝ, V. Lýkožrout smrkový : Škůdce horských lesů. *Lesnická práce*. 2001, roč. 80, č. 7, s. 1.

TALBOT, N. J. *Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi: A Practical Approach*. [s.l.] : Oxford university press, 2001, 267 s.

TIGANO-MILANI, M. S.; SAMSON, R. A.; MARTINS, I.; SOBRAL, B. W. S. DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology*. 1995, 141: 239-245.

VIDAL, C.; FARGUES, J.; LACEY, L. A.; JACKSON, M. A. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*. 1998, 143: 33-46.

WANG, C., FAN, M., LI, Z., Butt, T. M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, no. 96, s. 861-870.

WANG, Ch., SHAH, F. A., PATEL, N., Li, Z., Butt, T. M. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*. 2003, vol. 10, no. 5, s. 908-915.

WALKER, J. M., RAPLEY, R. *Molecular biology and biotechnology*. [s.l.] : Royal Society of Chemistry, 2000, 529 s.

WALSER, J., SPERISEN, Ch., SOLVIA, M. Fungus-specific microsatellite primers of lichens: application for the assessment of genetic variation on different spatial scales in *Lobaria pulmonaria*. *Fungal genetics and biology*. 2003, no. 40, s. 72-82.

WATT, A. D., STROCK, N. W., HUNTER, M. D. *Forests and insects*. [s.l.] : 1997, 406 s.

WEISING, K., NYBOM, H., WOLF, K. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. [s.l.] : [s.n.], 2005, 322 s.

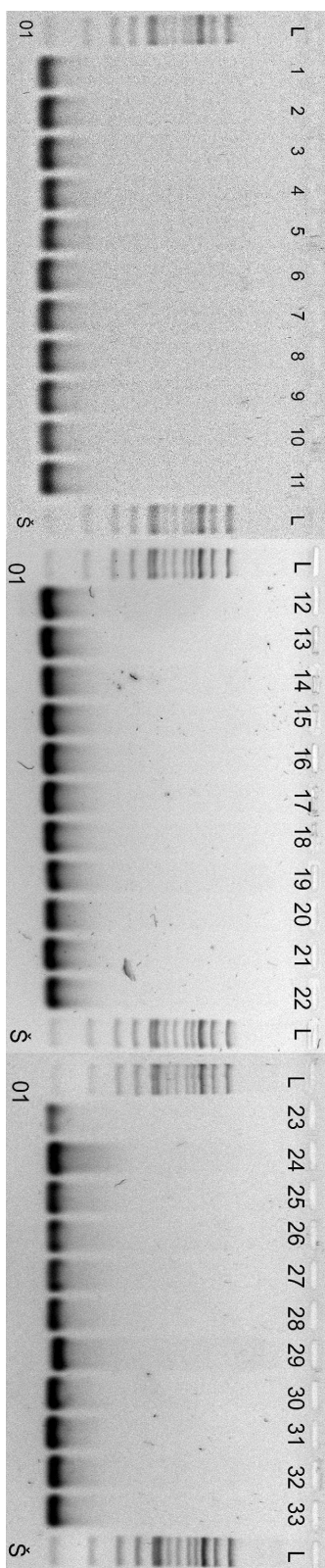
WHIPPS, J. M. , LUMSDEN, R. D. *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. [s.l.] : Cambridge University Press, 1990, 303 s.

Přílohy

Obrázek 11: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 01)

Legenda:

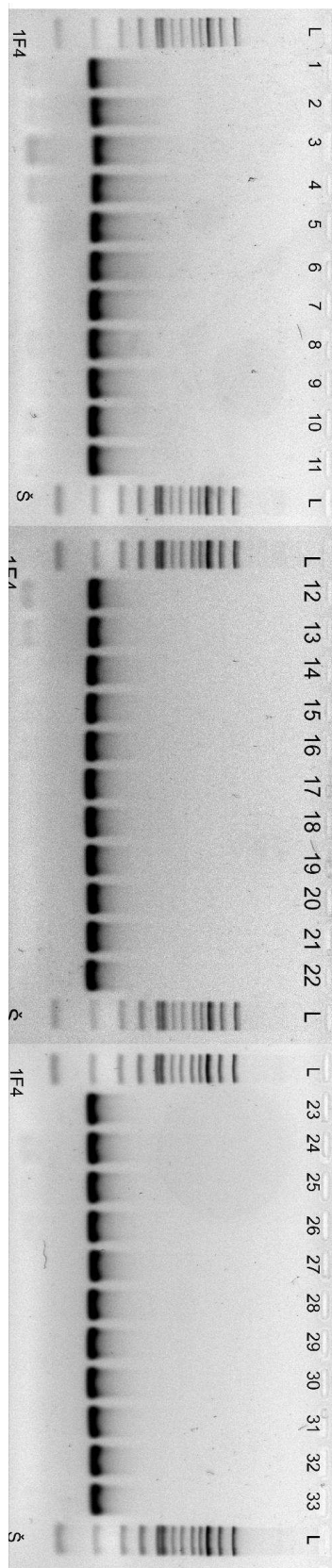
Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003.



Obrázek 12: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 1F4)

Legenda:

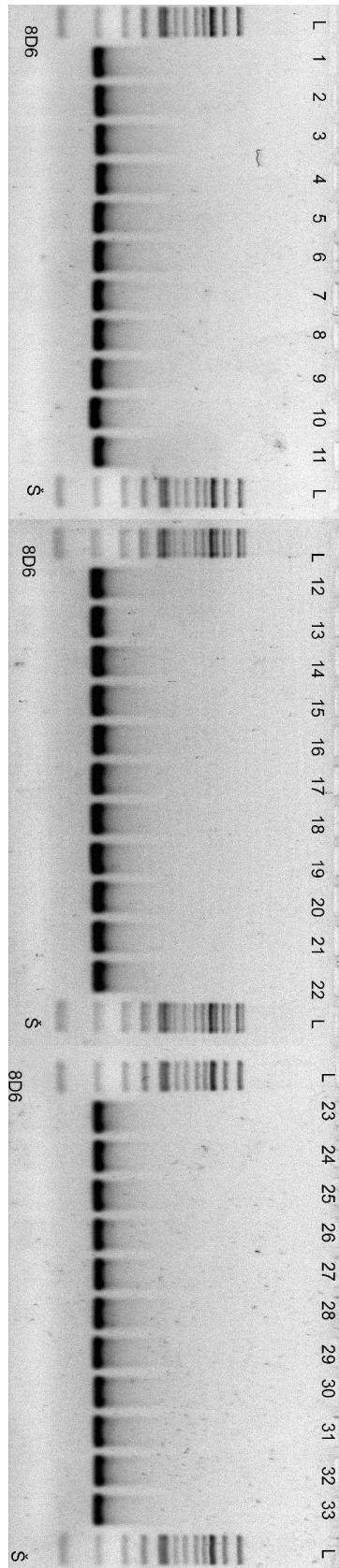
Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003.



Obrázek 13: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 8D6)

Legenda:

Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003.



Obrázek 14: Elektroforeogram monosporových izolátů (Primer 13)

Legenda:

Vzorky 1 = NP0001, 12 = NP0002, 23 = NP0003 - původní kmeny odebrané při monitoringu, 2-11 = monosporové izoláty z NP001, 13-22 = monosporové izoláty z NP0002, 24-33 = monosporové izoláty z NP0003.

