

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Program: Zemědělské inženýrství
Obor: Rostlinné biotechnologie
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Možnosti techniky AFLP ve studiu genetické struktury populací *Beauveria bassiana*.

Vedoucí práce: Ing. Kateřina Šimáčková

Autor: Bc. Kristina Kotlanová

Konzultant DP: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice 2010

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Kateřině Šimáčkové za odborné vedení při práci v laboratoři, cenné rady a připomínky, dále děkuji prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za pomoc a rady při vypracování diplomové práce.

Nemalý dík patří mým kolegyním Bc. Martině Králové a Bc. Evě Vondráškové.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „**Možnosti techniky AFLP ve studiu genetické struktury populací *Beauveria bassiana***“ vypracovala sama za pomoci uvedené literatury.

České Budějovice, duben 2010

Kristina Kotlanová

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	10
2.1. Oddělení Houby (<i>Fungi</i>)	10
2.1.1. Význam hub	10
2.2. Pomocné oddělení <i>Deuteromycetes</i>	11
2.3. Entomopatogenní houby	12
2.3.1. Rod <i>Beauveria</i>	13
2.3.1.1. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. 1912	13
2.3.1.2. Biologická charakteristika	14
2.3.1.3. Morfologie mycelia	14
2.3.1.4. Produkce sekundárních metabolitů	17
2.3.1.5. Vývojový cyklus	18
2.3.1.6. Využití	19
2.4. Biopreparáty	20
2.5. Morfologické markery	20
2.6. Molekulární markery	21
2.7. Metoda AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	24
2.8. Separační techniky DNA	28
2.8.1. Elektroforéza nukleových kyselin	28
2.8.1.1. Gelová elektroforéza	28
2.8.1.2. Kapilární elektroforéza	29
2.8.1.3. Fragmentační analýza	30
3. Materiál a metodiky	32
3.1. Charakteristika vzorků	32
3.2. Složení a příprava kultivačního média PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>)	35
3.3. Kultivace a udržování kmenů <i>B. bassiana</i>	35
3.4. Izolace genomické DNA pomocí CTAB a SDS dle Williams et al. (1992)	36
3.5. Izolace DNA pomocí komerčního kitu DNeasy plant Mini Kit (Qiagen)	38
3.6. Stanovení koncentrace DNA pomocí fluorimetru	39
3.7. AFLP- podle originálního protokolu Suazo et al. (2000)	40

3.7.1. Příprava agarózového gelu pro gelovou elektroforézu	43
3.8. AFLP- podle originálního protokolu de Muro et al. (2003)	45
3.9. AFLP- podle originálního protokolu Vos et al. (1995)	49
3.10. Metody zpracování výsledků	53
3.10.1. Digitální obrazová analýza	53
3.10.2. Statistické zpracování dat	53
4. Výsledky a diskuze	54
5. Závěr	63
Použitá literatura	64

Abstrakt

Beauveria bassiana je hojně využívaná v biologické kontrole proti hospodářsky významným škůdcům. Detekce jak morfologického, tak genetického polymorfismu mezi jednotlivými izolovanými druhy a kmeny v přirozeném prostředí je důležitá ke studiu jejich šíření a působení v ekosystému. Cílem této studie bylo zjistit, v jakém vztahu jsou „lokální kmeny“ s ekologickými aspekty biologické kontroly v chráněné zóně a zhodnotit polymorfismus u populace sebrané v NP Šumava a exotických kmenů pomocí metod molekulárních markerů.

Bylo analyzováno 39 kmenů odebraných v Šumavském a Krkonošském Národním parku v České republice a 11 kmenů z různých zemí světa. Polymorfismus těchto kmenů byl zjišťován pomocí různých metod a přístupů molekulárních markerů na základě DNA. V této studii je genetická variabilita hodnocena pomocí AFLP markerů.

Z výsledků bylo zjištěno, že populace pocházející z NP Šumava je velmi uzavřená a „lokální kmeny“ lze díky těmto metodám velmi dobře charakterizovat i ve srovnání s jinými kmeny z odlišných částí České republiky i z jiných zemí. Díky těmto screeningovým analýzám byl ujednocen vzorek Bba I101. Na jehož základě byl použit preparát proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*), který se vyskytuje se v Národním parku Šumava v České republice.

Tato studie byla podporována granty GAČR 521/08/H042, MSM 60076658-06, MZP SP/2d1/41/08.

Klíčová slova: entomopatogenní houby, *Beauveria bassiana*, molekulární markery, AFLP, biologická ochrana.

Abstract

Beauveria bassiana is widely used in biological control against the economically significant pests. Detection of morphological and genetic polymorphism among single species and strains in natural environment is important to study of the distribution and the effects in the ecosystem. The aim of this study was to determine the links of "local strains" with ecological aspects of biological control in protected zone of National park and assess the polymorphism of the population monitored in NP Šumava and exotic strains using molecular markers.

There were analyzed 39 strains collected in the NP Šumava and the Krkonoše National Park in the Czech Republic and 11 strains from different countries and areas. The polymorphism of these strains was evaluated by different methods based on DNA analysis. In this study, the genetic variability is evaluated by AFLP markers.

The results reveal that population from NP Šumava is very closed and the "local strains" can be very well characterized thanks these methods and compared with other strains from different parts of the Czech Republic and other countries. Thanks to these screening analyses, the strain Bba I101 was determined for the preparation which will be used for bark beetle (*Ips typographus*) control in the National Park Šumava in the Czech Republic.

This study was supported by grants GACR 521/08/H042, MSM 60076658-06, MZP SP/2d1/41/08.

Key words: entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, molecular markers, AFLP, biological control.

1. Úvod

Tato práce se zabývá studiem genetické struktury populace *Beauveria bassiana* a vyhodnocením získaného polymorfismu DNA. *Beauveria bassiana* je entomopatogenní houba, která nabývá na významu v oblasti biologické ochrany rostlin v boji proti ekonomicky významným hmyzím škůdcům. V poslední době se výzkum zaměřuje na možnosti regulace populace lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) v Národním parku Šumava, který má na svědomí kalamitní škody ve smrčinách. V rámci projektu MZP SP/2d1/41/08 se zaměřuji na identifikaci a charakterizaci jednotlivých izolátů hub pomocí DNA fingerprintingu.

K analýze genetické struktury populace *B. bassiana* byly získány vzorky odebrané z různých míst NP Šumava a jako referenční vzorky z jiných zemí (Francie, Švédsko, Slovensko, Polsko, Rumunsko, Rusko, Indie, Kolumbie, USA).

Obecně nejpoužívanější metodou pro identifikaci houbových izolátů je hodnocení morfologických znaků (tzv. morfologických markerů). Vzhledem k vysoké variabilitě těchto znaků a jejich snadné ovlivnitelnosti např. pouhou změnou kultivačních podmínek, přinesly teprve molekulárně-biologické metody jako detekce DNA polymorfismu, který se stal zdrojem genetických DNA markerů (tzv. molekulárních markerů), nové možnosti při identifikaci jednotlivých kmenů hub.

Molekulárně biologické identifikační metody představují ideální nástroj ke studiu populační genetiky. Jako metoda vhodná pro analýzu genetické struktury pro tuto studii byla zvolena metoda AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* = polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů). AFLP je velice všestranná metoda, pomocí níž lze za velmi krátký čas zmapovat velké množství nových molekulárních markerů, které je možné využít při identifikaci a hodnocení genetických charakteristik. Originální protokol lze snadno modifikovat a optimalizovat v několika málo bodech vzhledem k zaměření výzkumu a povaze zkoumaného organismu. AFLP může být účinným nástrojem ve studiu molekulární ekologie a evoluce populací.

Cílem mé práce bylo posouzení vhodnosti techniky AFLP podle tří různých protokolů (Vos et al., 1995; Suazo et al., 2000; de Muro et al., 2003) pro použití při vyhodnocení genetického polymorfismu u entomopatogenních hub. Dále optimalizace a

zavedení techniky AFLP podle Suazo et al., (2000) pro celkové vyhodnocení získaného polymorfismu u vybraných izolátů *Beauveria bassiana*.

2. Literární přehled

2.1. Oddělení Houby (*Fungi*)

Houby představují početné oddělení rostlinné říše, které zahrnuje přes 100 000 druhů. Jsou to nižší eukaryotní organismy jak jednobuněčné, tak i mnohobuněčné, spojující znaky rostlin (nepohyblivost, syntéza vitamínů, vakuoly, buněčná stěna) a živočichů (heterotrofní způsob výživy, přítomnost chitinu a glykogenu). Nejstarší doklady o houbách pocházejí z prvohor, ačkoli vývojové začátky této říše sahají ještě dále do minulosti. Jejich studiem se zabývá *mykologie* (Carlile a Watkinson, 1994).

2.1.1. Význam hub

Mimořádný význam mají houby především pro svou schopnost rozkládat zbytky organické hmoty. Spolu s bakteriemi rozkládají organické látky na jednodušší, které se opět mohou zapojit do přírodního koloběhu. Této schopnosti hub je využíváno např. v zemědělství a lesnictví.

Důležitou úlohu hrají houby také v potravinářství. Na jejich činnosti je založen kvasný průmysl, mikroskopické kvasinky se podílí na výrobě piva, vína, jogurtů či chleba. Kromě toho člověk využívá přímo plodnice některých hub jako potravu. Jejich výživná hodnota se rovná výživové hodnotě zeleniny, obsahují nerostné soli, vitamíny A, B, C, D, PP a mnohé aromatické látky, které příznivě působí na trávení.

V oblasti biotechnologií mají některé houby význam díky produkci široké škály sekundárních metabolitů (antibiotika, vitamíny, toxiny atd.), což zásadně ovlivňuje rozvoj chemického i farmaceutického průmyslu. Některé chorošovitě houby obsahují cytostatické látky brzdící chorobné buněčné dělení tkání, čehož se lékaři snaží využít při léčbě rakoviny. Výzkum antibiotických látek v plodnicích hub představuje další perspektivy nejen pro lékařství, ale i pro ochranu rostlin, či konzervaci potravin.

Pro výrobu potravin, léčiv, průmyslových produktů aj. jsou využívány nejen konkrétní druhy, ale také speciální kmeny – uplatňuje se uchovávání vysoce výkonných kmenů v čisté kultuře a "šlechtění" za účelem ještě vyšší produkce nebo produkce dalších látek:

- mutageneze a následná selekce zmutovaných kmenů
- hybridizace (genetická rekombinace)
- genetické modifikace

Mezi negativní vlivy hub patří skutečnost, že některé z nich jsou původci chorob kulturních rostlin, zvířat i člověka (mohou být dokonce smrtelně jedovaté). Tyto vesměs cizopasně houby způsobují rozsáhlé škody v zemědělství a u člověka vyvolávají kožní onemocnění a různé alergie (Arora, 2004).

2.2. Pomocné oddělení *Deuteromycetes*- houby nedokonalé

Houby nedokonalé je označení pro stopkovýtrusé a vřeckovýtrusné houby, u kterých nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování. Do této kategorie patří druhy, které ztratily schopnost produkovat sexuální spory nebo je produkují jen výjimečně. Bývají označovány také jako anamorfní, konidiální či mitosporické houby. V dnešní době se již v systematice hub téměř nepoužívají, protože mykologická taxonomie se zakládá především na pohlavních znacích (morfologie fruktifikačního aparátu), a ty u skupiny *Deuteromycetes* chybí. Spory (výtrusy) vznikají u těchto hub pouze nepohlavní cestou.

Stélka *Deuteromycetů* je složena z přehrádkovaných a rozvětvených hyf s mnohjadernými buňkami. K rozmnožování jim slouží konidie, vznikající na volných hyfách, na povrchu a nebo uvnitř plodniček, tzv. konidioforů.

Pro fylogenetickou klasifikaci nepohlavně se rozmnožujících hub se nyní běžně používá metod molekulární biologie. K odvození vztahů mezi jednotlivými druhy jsou na základě sekvencí DNA sestavovány pomocí klastrové analýzy fylogenetické stromy.

Protože pro provedení molekulárně-biologické analýzy je zapotřebí dostatečné množství čistého biologického materiálu (spory, mycelium), dosud se mnoho druhů mitosporických hub nepodařilo fylogeneticky zařadit (Ambrožová, 2008).

Do této skupiny se řadí přibližně 25 000 druhů hub. Mezi nejznámější zástupce patří známé kulturní plísně, které jsou využívány v sýrašství jako např. rod *Penicillium* a významné entomopatogenní houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicium*, *Metarhizium*, *Nomurea*, *Paecilomyces* a *Tolipocladium* (Kubicek a Druzhinina, 2007).

2.3. Entomopatogenní houby

Houby patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované mikroorganismy asociované s hmyzem. Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stádií hmyzu, tzv. houby entomopatogenní. V současné době je známo více než 750 druhů nižších hub, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu.

Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu, mohou napadat všechna vývojová stadia hmyzu. Nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. Některé druhy entomopatogenních hub mohou parazitovat na širokém sortimentu hostitelů patřících do zcela odlišných řádů hmyzu a mohou infikovat i různá vývojová stadia téhož hostitele (např. *Isaria fumorosea*). Jiné druhy entomopatogenních hub naopak vykazují podstatně užší patogenitu s účinností omezenou na úroveň hmyzích řádů (např. houba *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně na larvách motýlů).

Z hlediska praktické biologické ochrany nepředstavuje takto rozmanitý potenciál žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů. V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v mnoha řádech různých oddělení. Nejvýznamnější zastoupení mají entomopatogenní houby v oddělení *Chytridiomycota* (*Blastocladales*), *Zygomycota* (*Zygomycetes*: *Entomophtorales*, *Mucorales*), *Ascomycota* (*Laboulbeniomycetes*, *Sordariomycetes*) a *Deuteromycota* (*Hyphomycetes*, *Moniliales*). Z hlediska praktické biologické ochrany mají největší význam vláknité *Deuteromycety* (*Deuteromycota*, *Hyphomycetes*, *Moniliales*). K nejvýznamnějším patří houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Mettrarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* a *Verticillium*.

Entomopatogenní houby byly zkoumány díky své účinnosti v boji proti širokému spektru hmyzích škůdců (Butt et al., 2001). Mnoho entomopatogenních hub je v přírodě relativně běžných. Často vyvolávají přirozené epizocie v populacích hmyzu, čímž se řadí mezi významné mikroorganismy regulující hmyzí populace (Butt a Goettel 2000).

Entomopatogenní houby jsou možnou alternativou k používání pesticidů. Nabízí řadu výhod jako je schopnost růstu na různých substrátech, vysoká virulence, široký okruh hostitelů, bezpečnost pro člověka, zvířata a životní prostředí (Kamp a Bidochka, 2002).

2.3.1. Rod *Beauveria*

Rod *Beauveria* reprezentují převážně široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která jsou na půdu vázána (např. při přezimování). Mezi nejvýznamnější zástupce patří druhy *B. bassiana*, *B. bronghiartii*, *B. tenella*. V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádů rovnokřídlí (např. krtonožky), brouci (např. larva a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoho dalších druhů), larvy a kukly motýlů a dvoukřídlého hmyzu (de Muro et al., 2003).

V poslední době byly izolovány i kmeny *B. bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejnokřídlého hmyzu (např. na molicích a mšicích) (Landa, 1998).

Druhy rodu *Beauveria* jsou klasifikovány podle morfologie konidií, konidiogenního aparátu a umístění spor (de Muro et al., 2003). Nedávné studie pomohly rozlišit podle morfologických a fyziologických testů nejméně šest druhů rodu *Beauveria*: *B. bronghiartii*, *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* a *B. caledonica* (Driver a Miller 1998).

2.3.1.1. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912

Beauveria bassiana (Bals.-Criv.) Vuill. je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby s velmi pestrým a širokým hostitelským spektrem. Byla objevena v roce 1835 jako příčina houbového onemocnění housenky bource morušového, italským entomologem Agostinem Bassi. Je typickým představitelem saprofytní mykoflóry půd. V České republice patří mezi nejčastěji se vyskytující druh mitosporických hub. Běžně je zaznamenávána jako původce chorob na mnoha druzích hmyzu, známé jako bílé muskardiny. Nejvíce potom na druzích herbivorních, protože jsou alespoň částí svého vývoje závislí na půdě (Landa, 1998).

Taxonomické zařazení

Taxonomické zařazení *B. bassiana* znázorňuje Tab. č. 1

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení

	Říše	<i>Fungi</i>
	Oddělení	<i>Eumycota</i>
	Pomocné oddělení	<i>Deuteromycota</i>
	Pomocná třída	<i>Hyphomycetes</i>
	Řád	<i>Moniliales</i>
	Rod	<i>Beauveria</i>

2.3.1.2. Biologická charakteristika

Druh *Beauveria bassiana* představuje nejasný komplex více morfologicky homogenních kmenů, zahrnující geneticky různorodé linie, které se významně liší svou virulencí, patogenitou a šíří hostitelského spektra (Uma Devi et al., 2002). Jako entomopatogenní houba má jedinečnou schopnost proniknout přes vnější ochranné bariéry hostitelského organismu a produkcí spor a sekundárních metabolitů jej usmrtit (Landa, 1998).

Rod *Beauveria* zahrnuje dva hlavní entomopatogenní druhy: *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii*. Jejich hostitelský okruh zaujímá přibližně 750 druhů hmyzu (de Muro et al., 2003), převážně hmyz z řádů *Lepidoptera* a *Coleoptera*. *Beauveria bassiana* je anamorfním stádiem (nepohlavní formou) druhu *Cordiceps bassiana*. Vzhledem k tomu, že je predominantně asexuální, nemohou být testy pohlavního rozmnožování aplikovány pro vymezení jednotlivých genotypů. Genotypizaci jednotlivých druhů umožňují genetické testy, založené například na AFLP DNA markerech (Uma Devi et al., 2006).

2.3.1.3. Morfologie mycelia

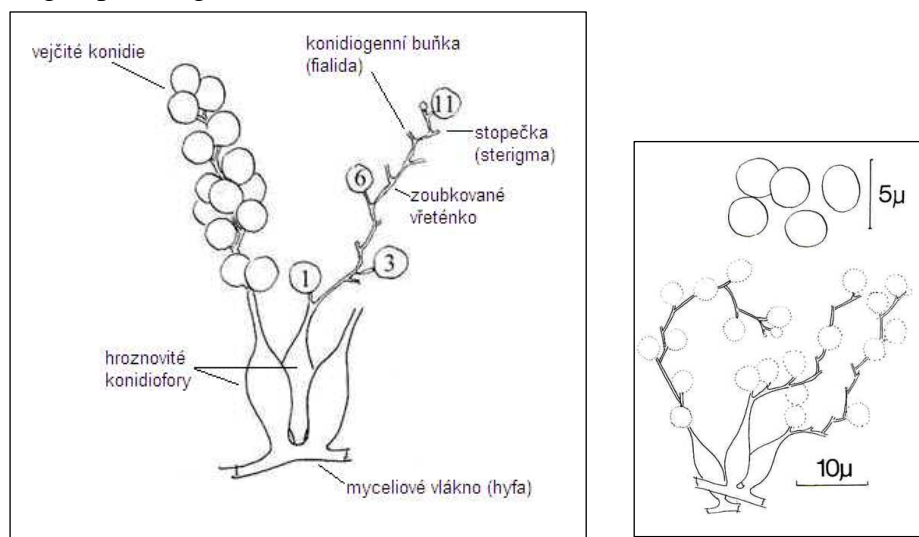
Tělo houby tvoří hyfa, nebo-li houbové vlákno. Z hyfy se vyvíjí mateřská konidiogenní buňka, která zajišťuje produkci nepohlavních spor–konidií. Na hroznovitých konidioforech se v hustých svazcích (přeslenech nebo samostatně) formují dlouhé, bezbarvé konidiogenní buňky s kulovitou nebo baňkovitou bází a vroubkovitým

(zubovitým) apikálním prodloužením, na kterých se tvoří jednotlivé konidie. Každá jednobuněčná kulovitá nepřehrádkovaná konidie se tvoří na samostatném zubu (Obr. č. 1) (Humber, 1997), konidie jsou malé, dosahují velikosti pouze několika mikrometrů. Mycelium je zdrojem milionů prášivých spor, které se velmi snadno roznáší za pomoci vzduchu a vzdušných proudů.

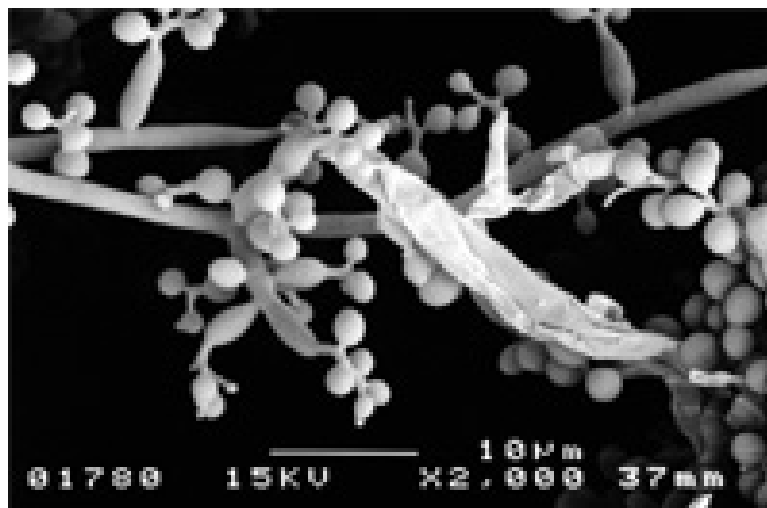
Konidie se vyvíjí sympodiálně, tzn. nejmladší buňka je na vrcholu (Obr. č. 2). Primární spora je produkována na vrcholu mateřské (konidiogenní) buňky. Sekundární spora je produkována na vyšším stupni. Pokaždé vyprodukované spoře je iniciována tvorba nového růstového vrcholu. Tímto způsobem růstu spor, vzniká tzv. cik-cak uspořádání. (Zimmermann a Gisbert, 2007).

Obr. č. 1 a č. 2: *Beauveria bassiana*- schéma uspořádání konidioforů, konidiogenních buněk a konidií

(www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm, 2010)



Obr. č. 3: Snímek mycelia *Beauveria bassiana* z elektronového mikroskopu.
(<http://bioprotection.org.nz/287/scanning-electron-micrograph-beauveria-bassiana-conidia-and-phialides>, 2010)



2.3.1.4. Produkce sekundárních metabolitů

Mikroorganismy a zvláště pak houby produkují široké spektrum sloučenin a metabolitů, nejvíce při jejich sekundárním metabolismu, který má obvykle různou aktivitu a funkce. Proto není překvapující, že entomopatogenní houby jsou také schopny produkovat různé metabolity.

Druhy rodu *Beauveria*. produkují *in vitro* a *in vivo* několik toxických látek. Většina z nich jsou sekundární metabolity o nízké molekulové hmotnosti, převážně cyklické peptidy, jako beauvericin a bassianolid a jejich pigmenty bassianin a tennelin. Hlavní sekundární metabolity druhů *B. bassiana* a *B. brongniartii* jsou uvedeny v Tab. č. 2. (Zimmermann a Gisbert, 2007).

Tab. č. 2: Hlavní metabolity produkované *Beauveria spp.*

Druh houby	Metabolit
<i>B. bassiana</i>	beauvericin, bassianin, bassianolid, beauverolides, beauveriolides, tenellin, oosporein kyselina šťavelová bassiacridin
<i>B. brongniartii</i>	oosporein kys. šťavelová

2.3.1.5. Vývojový cyklus

B. bassiana má oportunistický vývojový cyklus (Obr. č. 4), který zahrnuje patogenní i saprofytickou fázi. Tato plastičnost je zřejmě způsobena různou genovou expresí, jako následek reakce na okolní prostředí (Akbar et al., 2007).

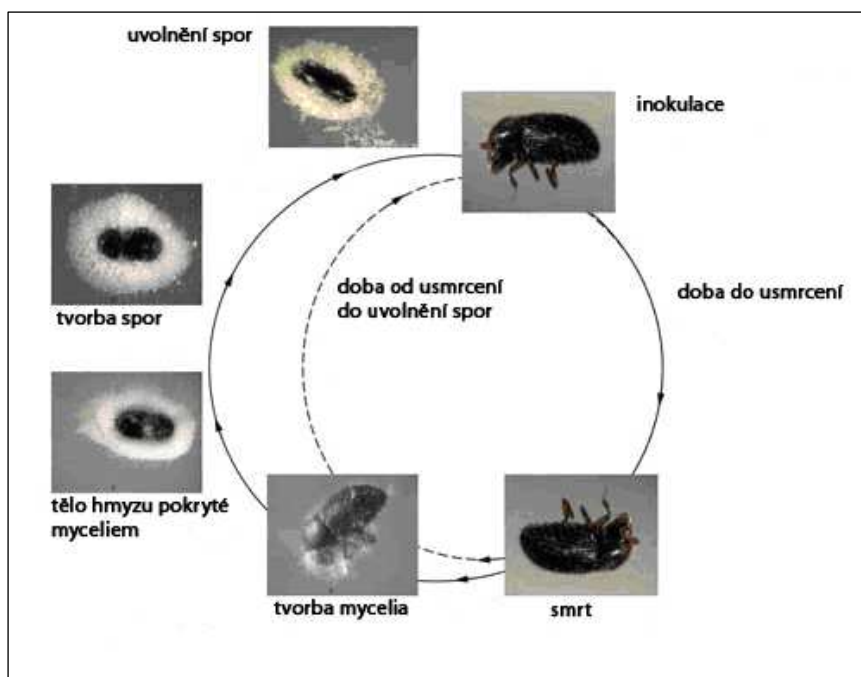
Hlavní fáze vývojového cyklu lze definovat následujícím způsobem:

- přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele
- pronikání patogena do tělní dutiny, interní proliferace a vytváření povrchové myceliální sítě (parazitická fáze vývojového cyklu)
- externí sporulace a tvorba konidií nové generace (saprofytická fáze vývojového cyklu)

Během patogenní fáze se spory přichytí na povrch těla hostitele. *B. bassiana* produkuje suché, silně hydrofobní konidie s rozmanitě strukturovaným povrchem. Primární adheze je zajištěna pomocí interakcí mezi povrchem kutikuly a konidií, nebo prostřednictvím elektrostatických sil. Následuje klíčení konidií a penetrace kutikulou do tělní dutiny za pomoci degradujících enzymů (lipázy, chitinázy, proteázy), nebo prostřednictvím přirozených otvorů (dýchací, ústní, řitní otvor). Po proniknutí patogena do těla dutiny, dojde k rychlé kolonizaci. Mycelium houby v napadeném organismu produkuje toxiny- u *B. bassiana* beauvericin, u *B. brongniartii* toxin beauvelide. Typický je přechod vláknité formy houby na rychle se množící blastospory (dělení pučením). Ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele. Mumifikací končí druhá fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze- tvorba povrchového mycelia a sporulace (saprofytická fáze na usmrceném hostiteli). Pro tuto fázi jsou opět typické vláknité struktury, patogen vytváří hustou síť mycelia, která porůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na kterých se v konečné fázi vývojového cyklu formují nové konidie.

Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s teplotou prostředí. Při optimálních podmínkách může celý cyklus proběhnout během 3-5 dnů, v běžných podmínkách mírného vegetačního pásma za 7-21 dní (Landa, 1998).

Obr. č. 4: Vývojový cyklus *B. bassiana* (www.insectscience.org/5.37/ref/figure1.html, 2010)



2.3.1.6. Využití

Jednou z cest k omezení negativních vlivů činnosti člověka na životní prostředí a zabránění nadměrné chemizaci zemědělství, je zavedení systému integrované ochrany rostlin. Podstatou tohoto systému je eliminace nebo omezení chemické ochrany a zavedení metod biologické ochrany (Dirlbeková et al., 1991). 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 mají nízkou nebo žádnou toxicitu k necílovým druhům. Tím zvyšují bohatost, diverzifikaci a stabilitu přírodních systémů v zemědělské krajině a umožňují kvalitní produkci (Zimmermann a Gisbert, 2007).

Efektivní a ekologicky šetrné metody biologické ochrany, které využívají biopreparátů na bázi entomopatogenních hub rodů *Beauveria*, *Metarhizium*

a *Paecilomyces*, jsou rozšířeny zejména v Německu, Rakousku a Švýcarsku. Na experimentální úrovni je tato houba zkoušena i v České republice a dalších zemích (Polsko, USA) (Landa, 1998).

2.4. Biopreparáty

Účinnou složkou většiny preparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospory. Konidie jsou produkovány formou povrchových kultur na tekutých živných půdách nebo na pevných přirozených substrátech a biotechnologie jejich produkce imituje přirozený cyklus, při kterém je zprvu vytvořena povrchová myceliální biomasa a na konci cyklu se na vzdušném myceliu tvoří konidie. Blastospory entomopatogenních hub jsou produkovány ve fermentačních biotechnologiích (submerzní kultivace v tekuté živné půdě) a využívají změny morfologické formy patogen po proniknutí do semi-aerobních podmínek tělní dutiny.

Biopreparáty na bázi konidií nebo blastospor mají společné to, že obsahují konkrétní počet vitálních, virulentních infekčních jednotek, schopných přímo vyvolat infekci, které jsou doplněny o inertní nebo nutritivní složky (Landa, 1998).

V ČR byly registrovány biopreparáty na bázi entomopatogenních hub *B. bassiana* Boverol a Boverosil, které jsou používány zejména v lesnictví a okrasném zahradnictví proti larvám brouků nebo proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin.

2.5. Morfologické markery

Mezi nejpoužívanější metody pro identifikaci izolátů hub patří hodnocení morfologických znaků (tvar a charakter mycelia, velikost a tvar konidií a fruktifikačních orgánů apod.), produkčních (zejména u farmaceuticky využívaných organismů) a biologických vlastností (klíčení spor a jeho dynamika, testy biologické účinnosti – FGDI (Fungus Growth Development Index) apod.) (Osbourne, 1994). Variabilita těchto znaků je však příliš vysoká, tyto vlastnosti jsou inducibilní a pouhá změna kultivačního média je vzhledem k rychlému generačnímu cyklu mikroorganismů může výrazně pozměnit. Ani

další fenotypové markery (jako např. detekce enzymatické aktivity) nepřinesly v celé problematice výraznější posun (Oborník, 1995).

Nedostatek morfologických charakteristik učinil molekulární markery neocenitelné pro studium aspektů ekologie, biologie a genetiky hub (Arora, Khachatourians, 2004).

2.6. Molekulární markery

Populační genetika stále více využívá při studiu variability DNA mezi a uvnitř populací metod molekulární biologie (Hoezel, 1992).

Nové možnosti v identifikaci izolátů hub přinesly teprve molekulárně-biologické metody, především detekce DNA polymorfismu jako potencionálního zdroje genetických DNA markerů. Metody molekulární biologie přinášejí nový pohled na taxonomii nejnižších jednotek (v rámci rodu či druhu), mohou nabídnout jediný možný způsob rozlišení a klasifikace kmenů hub (Bruns et al. 1991)

Pomocí DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy, populacemi, klony, jedinci i buňkami. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány například pro DNA fingerprinting při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, sledování určitých genů během šlechtitelských programů (např. SLG geny), genetické mapování, populační genetiku a populační genekologii a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek) (Cano et al., 1993). Molekulární markery jsou vyvinuty specificky pro každý druh hub. Mezi běžně užívané genetické markery hub patří mikrosatelity, minisatelity a polymorfismus nukleotidů (SNP) (Arora, Khachatourians, 2004).

DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, u kterých je zvládnutá technika izolace DNA.

Princip molekulárních markerů je založený na:

1. specifickém restrikčním štěpení analyzované DNA a následné hybridizaci se značenou sondou
2. amplifikaci specifických fragmentů v in vitro podmínkách
3. na různých kombinacích restrikčního štěpení, hybridizace a amplifikace.

Pro markerování diverzity, pro detekci polymorfismu nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik. Většina molekulárních markerů spadá do jedné z následujících tří kategorií:

1- techniky založené na hybridizaci bez PCR reakce

Tyto techniky představují historicky první skupinu molekulárních markerů, která byla používána v počátcích molekulární biologie od 70. let 20. století a v současné době je nahrazována technikami odvozenými od PCR.

RFLP analýza (*Restriction Fragment Length Polymorphism* = polymorfismus délky restrikčních fragmentů) je metoda založená na restrikčním štěpení DNA, elektroforetické separaci fragmentů DNA a hybridizaci se specifickou sondou (Southernův přenos). Mutace v restrikčním místě změny velikost restrikčních fragmentů a tedy i velikost proužků po hybridizaci (Grant a Shoemaker 1997).

2- techniky založené na PCR reakci (*multi-locus* PCR, a další techniky, založené na využívání náhodných primerů)

Do této kategorie amplifikačních metod můžeme zařadit všechny PCR techniky, které k amplifikaci DNA produktů používají náhodné primery. U všech těchto metod není nutné znát cílové sekvence DNA fragmentů. Metody se navzájem liší délkou a sekvencí použitých primerů, přísností PCR podmínek a detekcí fragmentů (Karp a Edwards 1997).

Do této první podskupiny řadíme techniky, při kterých jsou používány náhodné primery:

RAPD analýza (*Random Amplified Polymorphic DNA* = polymorfismus náhodně amplifikované DNA), při které jsou jako primery používány krátké náhodné hexamery až dekamery a amplifikované produkty jsou separovány na agarózovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu a vizualizovány pod UV světlem (Rafalski, 1997). Obdobou této techniky jsou metody AP-PCR (*Arbitrarily Primed PCR*) (Vogt et al., 1997). a DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (Caetano-Anollés, 1997), při nichž jsou k separaci amplifikovaných produktů používány polyakrylamidové gely.

Do druhé podskupiny patří tzv. semiarbitrární primery, které jsou komplementární k sekvencím rozpoznávaným restrikčními enzymy. Primery využívající sekvence rozpoznávané restrikčními endonukleázami jsou základem techniky **AFLP** (*Amplified*

Fragment Length Polymorphism = polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů). Podstatou metody je rozštěpení studované DNA dvěma restričními enzymy, naligování adaptorů k odpovídajícím koncům a provedení PCR reakce s primery, které mají sekvenci komplementární k adaptoru a navíc obsahují selektivní báze (Vos a Kuiper 1997).

3- Amplifikace cílových sekvencí (*single-locus* PCR)

Nevýhodou náhodně amplifikované DNA je nedostatek znalosti o charakteru markerů ve smyslu dominance a ve smyslu převodu alel do lokusu. Tyto problémy jsou překonány pomocí PCR zaměřené na specifické *single-locusy*, pro které je nezbytná znalost cílových sekvencí nebo sekvencí ohraničujících cílovou oblast. U rostlin a živočichů existují tři zdroje potenciálních sekvencí pro tento typ PCR: chloroplastové (cpDNA), mitochondriální (mtDNA) a jaderné (nDNA) genomy. Nukleotidové sekvence obsahují fylogenetické a frekvenční informace a jsou tedy neobyčejně důležitými markery pro ekologické a evoluční studie (O'Malley, Whetten, 1997).

Při analýze **PCR-RFLP** jsou pomocí PCR amplifikované fragmenty DNA štěpeny restričními enzymy k odhalení polymorfismu restričních míst (Karp a Edwards, 1997).

Jestliže jsou SSR lokusy klonovány a sekvenovány, pak mohou být navrženy primery pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů **STMS** (*Sequence Tagged Microsatelite Site*), které jsou častěji nazývány **SSR markery**. SSR markery jsou velmi zajímavé, protože každý pár primerů identifikuje *single-locus*, který díky vysoké proměnlivosti SSR lokusů může mít mnoho alel. Pro detekci SSR a detekci alel daného mikrosatelitu může být použito několika různých metod (Cregan a Quigley, 1997).

Vypovídací schopnost markerů

Techniky, které tvoří multilokusové profily (např. AFLP, MAAP) poskytují informaci na početných lokusech, zatímco informační obsah na *single-locusu* je nízký. Data odvozená od náhodně amplifikované DNA, AFLP *multi-locus* fingerprintingu jsou vhodná pro rozlišení jednotlivců. Hlavní aplikací této metody jsou tedy zjišťování identity, fingerprinting a rozlišování genotypů na poddruhové úrovni jako jsou odrůdy a klony (Karp a Edwards, 1997).

2.7. Metoda **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism* = polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů)

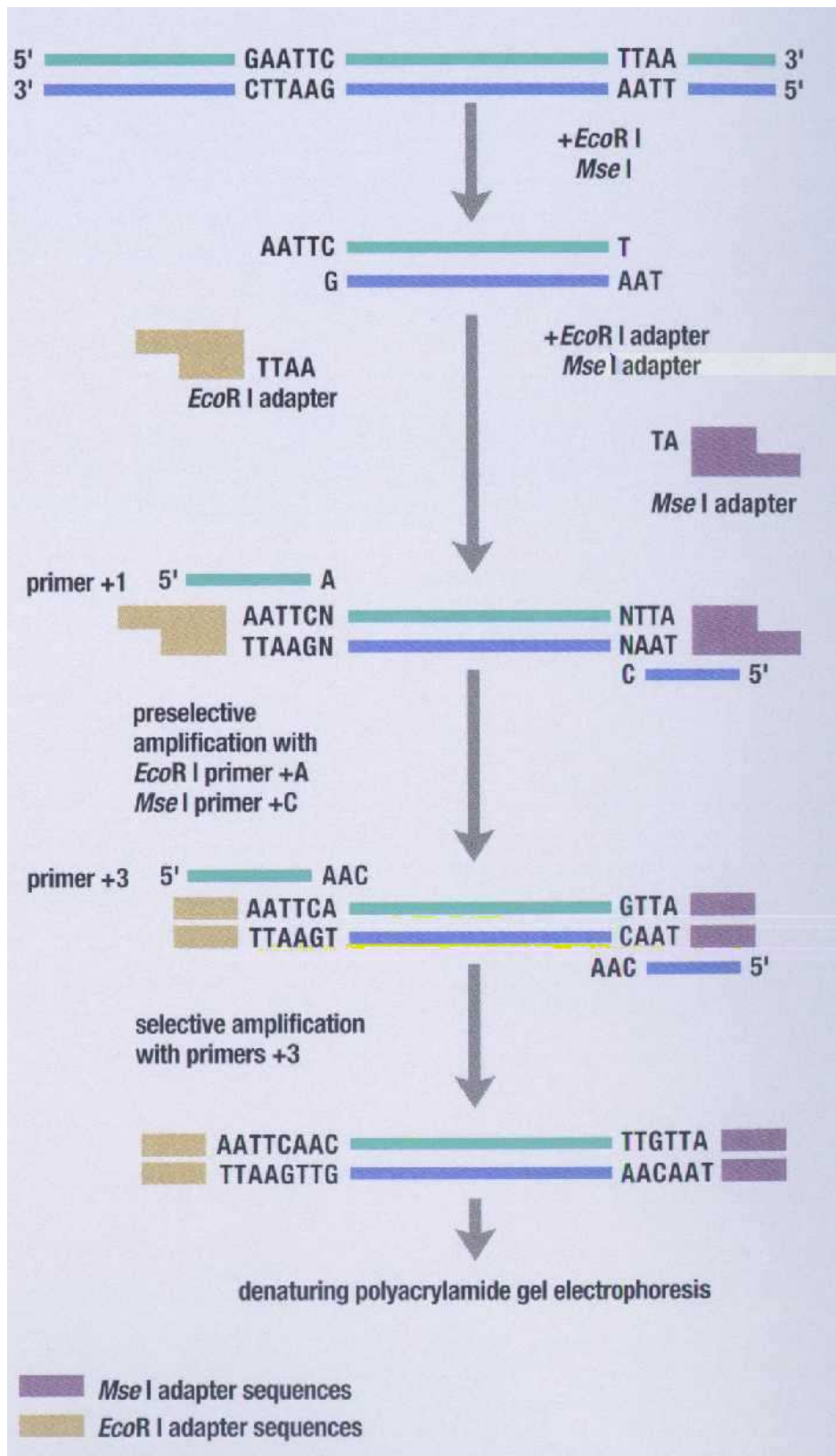
AFLP představuje fingerprintingovou techniku pro charakterizaci celkové genomové DNA, která poskytuje velké rozlišení a vysokou reprodukovatelnost. Označuje se rovněž jako amplifikace vzácných restrikčních míst (IRS-PCR) nebo selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA podmíněná primerem (SRFA) (Šmarda et al., 2005). Tuto techniku poprvé v roce 1995 popsal ve své studii Pieter Vos et al. AFLP je velice výkonná metoda, pomocí níž lze za velmi krátký čas zmapovat velké množství nových molekulárních markerů.

AFLP je kombinací dvou metod- RFLP a RAPD. Stejně jako u RFLP, je genomická DNA rozštěpena buď jedním, nebo dvěma restrikčními enzymy *EcoRI* (šestibázový palindrom) a *MseI* (čtyřbázový palindrom), z nichž jeden má méně cílových míst (Avisé, 2004). Častěji štěpící restrikτάza se používá pro získání krátkých fragmentů, které jsou snadno amplifikovány a jejich velikost je optimální pro separaci pomocí gelové elektroforézy. Méně často štěpící restrikτάza se pak používá pro omezení počtu amplifikovaných fragmentů, výsledný počet amplifikovaných fragmentů je tedy omezen dvěma různými konci fragmentů (Anollés a Gresshoff, 1997). Uměle připravené krátké fragmenty DNA- adaptory (adaptor je krátký úsek DNA se známou sekvencí, který má komplementární konec s koncem fragmentu po štěpení), které mají lepivé konce k restrikčním místům, otevřenými enzymy, jsou ligovány na tisíce neznámých fragmentů DNA. Adaptory používané podle originálního protokolu jsou sestaveny takovým způsobem, že jsou jednou ligovány na lepivé konce fragmentů, sekvence je změněna a restrikčními enzymy již znovu není rozeznána. Proto mohou restrikce a ligace probíhat ve stejnou dobu. V reakci jsou jak adaptory k *EcoRI*, tak k *MseI* (Šmarda et al., 2005).

Technika AFLP je založena na selektivní PCR amplifikaci restrikčních fragmentů z celkového obsahu DNA. Technika zahrnuje tři hlavní kroky (Obr. č. 5):

- 1- úplné rozštěpení DNA se dvěma restrikčními endonukleázami (nejčastěji *EcoRI* a *MseI*)
- 2- ligaci genomové DNA s oligonukleotidovými adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restrikčního místa. Ligace probíhá za přítomnosti restriktaáz, takže nedochází ke spojování restrikčních fragmentů
- 3- selektivní amplifikace sady restrikčních fragmentů pomocí jednoho nebo dvou selektivních AFLP-primerů
- 4- analýza amplifikovaných fragmentů gelovou elektroforézou

Obr. č. 5: Grafické znázornění jednotlivých kroků techniky AFLP
 (<http://www.msu.edu/course/mmg/835/DNAmarkers/aflp.jpg>, 2010)



Náhodně vybrané primery (obdobné u RAPD), používané při PCR reakci sníží komplexitu ve dvou krocích. Při preamplifikaci budou amplifikovány jenom fragmenty, které uvnitř obsahují vybrané báze. V prvním kroku mají primery, jinak kompatibilní se sekvencí adaptoru, navíc jeden libovolný tzv. selektivní nukleotid na konci. Takto se počet vhodných fragmentů 16 krát zredukuje. V druhém kroku použijeme stejné primery, pouze přidáme další dva nukleotidy. Tímto se počet produktů redukuje 256 krát. Celkem můžeme v druhém kroku použít 64 kombinací primerů (8 pro jeden, 8 pro druhý primer).

Výsledkem bývá obvykle získání přibližně sta fragmentů. Fragmenty jsou potom rozděleny podle velikosti a vizualizovány pomocí gelové elektroforézy na agaróze, polyakrylamidu, nebo automaticky na sekvenátoru.

AFLP fingerprint je často využíván jako zdroj DNA markerů. Molekulární základ polymorfismu AFLP je daný rozdíly v sekvencích na úrovni nukleotidů, které jsou způsobeny delecemi, inzercemi, adicemi nebo přeskupením nukleotidů (Anollés a Gresshoff, 1997). Stejně jako RAPD markery, je i většina AFLP markerů dominantní, ale na rozdíl od RAPD jediná reakce AFLP může zmapovat 100-200 lokusů (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

Technika AFLP má několik specifických výhod:

- je založená na PCR
- lze ji zautomatizovat
- je neradioaktivní
- dostupné jsou i komerční kity: AFLPTM Plant Mapping Kit a AFLPTM Microbial Fingerprinting Kit (Applied Biosystems, USA) (Bleas et al., 1998)
- lze aplikovat na DNA jakéhokoli původu bez prvotní znalosti o její sekvenci, syntézy primerů nebo konstrukce genové knihovny je možné získat velké množství markerů v jedné reakci (obvykle 50-100)
- AFLP markery mají kodominantní charakter, vykazují typicky Mendelistickou dědičnost, umožňující jejich využití pro typizaci, identifikaci a mapování genetických charakteristik
- restriční fragmenty jako takové jsou unikátní, vnitřní sekvence často obsahují repetitivní elementy
- výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé (Anollés a Gresshoff, 1997)

Aplikace AFLP

AFLP markery mohou být využity v jakékoli studii, která využívá DNA markerů (Anollés, Gresshoff, 1997). Nejčastěji při studiu genetické variability populací eukaryotních i prokaryotních organismů, konstrukce genetických map živočichů, charakterizace genotypů savců, analýza genotypů bakterií, epidemiologická identifikace bakterií, klasifikace hub na základě analýzy genotypu, RNA fingerprinting pomocí cDNA-AFLP a charakterizace a klasifikace patogenních organismů (Blears et al., 1998).

2.8. Separační techniky DNA

2.8.1. Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě- přímočaře od katody k anodě. Rychlost pohybu je úměrná jejich velikosti (Šmarda et al., 2005).

2.8.1.1. Gelová elektroforéza

Elektroforéza se z praktických důvodů provádí ve vhodném nosiči, kterým bývá obvykle gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 bp, polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul (10 až 1000 bp). Separace je podmíněna rychlejším průchodem menších molekul pórovitou strukturou gelu.

Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, které se označují jako standardy velikosti nebo

hmotnostní standardy. Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvenováním DNA.

Identifikace velikosti fragmentů po proběhlé elektroforéze je možná obarvením, protože pouhým okem nejsou viditelné. Molekuly DNA lze zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji se používá ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA.

Namísto ethidium bromidu může být pro barvení nukleových kyselin použita také skupina fluorescenčních kyaninových barviv s komerčním označením SYBR. K detekci poloh fragmentů lze použít rovněž hybridizaci se značenou sondou (Šmarda et al., 2005).

2.8.1.2. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza se běžně označuje jako CE (Capillary Electrophoresis) nebo HPCE (High Performance Capillary Electrophoresis).

Tato separační metoda využívá pohyb nabitých částic, ať už malých iontů či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v určitém nosném médiu, např. gelu. Celkový objem elektrolytu v kapiláře je proto minimální (jednotky μl) a objem nástřiku je v řádu desítek nl.

Dělení látek probíhá v kapiláře, která je většinou ze syntetického křemene (vnitřní průměr 25 – 75 μm) o délce několika desítek centimetrů (až 1 m). Je-li elektrolytem nebo médiem naplněna kapilára, říká se metodě kapilární elektroforéza. Podle způsobu separace se dělí na kapilární zónovou elektroforézu, kapilární izotachoforézu a další.

Transport analyzovaných iontů (analytů) a jejich separace probíhá v kapiláře. Kapilára naplněná elektrolytem je ponořena každým koncem do roztoku základního elektrolytu v oddělených nádobkách s elektrodami. Základní elektrolyt se plní do kapiláry přetlakem nad hladinou kapaliny v jedné nádobce. Předtím, než bude na elektrody vloženo napětí je nutné do kapiláry nadávkovat vzorek, tedy směs látek, které je nutno dělit. To se provádí tzv. nástřikem tak, že se jeden konec kapiláry ponoří do roztoku vzorku a buď tlakem nebo elektrickým napětím se vpraví část analyzované směsi do kapiláry. Po

nástřiku se zase oba konce kapiláry ponoří do nádobek s elektrolytem. Po vložení vysokého napětí na elektrody (dosahující hodnot jednotek až desítek tisíc voltů) se nabitě částice v kapiláře začnou pohybovat vlivem protékajícího elektrického proudu. V elektrickém poli se některé analyzované látky podle velikosti jejich elektrického náboje pohybují rychleji, jiné pomaleji, což způsobuje jejich separaci do určitých zón. Jednotlivé zóny putují k detektoru, který je umístěn na druhém konci kapiláry, kde je jejich průchod indikován a zaznamenáván. Signál z detektoru v okamžicích průchodu analyzovaných iontů změní svou hodnotu a na časovém záznamu se ukáže pík - neboli zóna (čím je vyšší a užší, tím větší je účinnost separace). Výsledkem analýzy je elektroforeogram (Gaš, 2001).

Jako detekční metodu lze využít např. absorpci tenkého svazku monochromatického světla, který prochází napříč kapilárou. Nejčastěji se indikace provádí fotometricky v oblasti UV spektra (Gaš, 2001).

Tato metoda nachází uplatnění při separaci organických kyselin, aminokyselin, proteinů, peptidů, cukrů, fenolů a mnoha dalších, zvláště organických sloučenin (Drbal, Křížek, 1999).

2.8.1.3. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza je založena na principu kapilární elektroforézy fluorescenčně značených DNA fragmentů. Je plně automatizovaná a provádí se pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Má využití jednak pro sekvenování DNA, jednak pro fragmentační analýzu. Jednotlivé DNA fragmenty jsou ve velmi tenké kapiláře, naplněné speciálním polymerem na bázi polyakrylamidu, po vložení napětí na okrajové elektrody rozděleny dle jejich velikosti a náboje a postupně detekovány laserovým detektorem.

Fragmenty DNA jsou pro fragmentační analýzu připraveny PCR reakcí s jedním nebo několika páry primerů, kdy jeden primer z každého páru je fluorescenčně značený (forward). Spolu s každým vzorkem je v analyzované směsi i velikostní standard, což je směs fragmentů o známé délce, který umožní přepočítání elektroforetické rychlosti na délku jednotlivých fragmentů. Jednotlivé fragmenty DNA jsou elektroforézou v kapiláře rozděleny podle délky a při průchodu laserovým paprskem dojde k vyzaření signálu, který

je zaznamenán detektorem. V průběhu jediného běhu jsme schopni současně analyzovat několik různých fragmentů za předpokladu, že se lokusy navzájem liší svou délkou nebo jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Spolu s každým vzorkem běží interní délkový standard. Je možné využít až pět různých fluorescenčních značek, přičemž pátá je pak vyhrazena pro délkový standard (Huang et al., 1992).

3. Materiál a metodika

3.1. Charakteristika vzorků

Entomopatogenní houby pro fylogenetickou analýzu byly získány ze sbírky entomopatogenních hub oddělení Rostlinolékařství, Katedry rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Tato sbírka je uložena ve formě alginátových pelet. Jako materiál byly použity vzorky *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii*. Houby byly izolovány z dospělců *Ips typographus* Šumavské kmeny byly odebrány z 1. zóny NP Šumava. Ostatní kmeny byly ze sbírek, pocházejících z oblastí: Krkonošského národního parku, Pěnčín (Morava), Čína, Francie, Indie, Kolumbie, Polsko, Rumunsko, Slovenská republika (dva vzorky), Švédsko, Spojené státy americké.

Přesný popis a označení vzorků je uveden v Tab. č 3 a č. 4.

Tab. č. 3: Seznam použitých kmenů *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* – odebrané kmeny v roce 2008 v NP ŠUMAVA

LABORATORNÍ OZNAČENÍ	OZNAČENÍ VE SBÍRCE	PŮVOD/LOKALITA
B5	Bba I 101	Prameny Vltavy
1	NP0001	Černá hora
12	NP0002	Černá hora
23	NP0003	Černá hora
34	NP0008	Jelení skok – Oblík
35	NP0007	I. zóna 19, odd.8 Zlatý stoleček
36	NP0005	Jelení cesta – U Mlýna
38	NP0009	Březová cesta
39	NP0010	Poledník
40	NP0100	Černá hora
41	NP0101	Černá hora
42	NP0102	Černá hora
43	NP0103	Černá hora
44	NP0104	Černá hora
45	NP0105	Černá hora
46	NP0106	Černá hora
47	A-Bba I 101-001	Černá hora
48	A-Bba I 101-002	Černá hora
49	A-Bba I 101-003	Černá hora
50	NP0004A	Styková lesní cesta
51	NP0004B	Styková lesní cesta
52	NP-0006	Borová Lada – Silniční slat'
53	NP0020	Staré dráty
54	NP0022	Zlatý stoleček
55	NP0026	Vltavský luh
56	NP0027	Rulandský potok
57	NP0028	Smrčina
58	NP0029	Pod studenou horou
59	NP0030	Studená horizont
60	NP0031	Zlatý stoleček
61	NP0051	Jelení skok – Dunkelbach
62	NP0052	Jelení skok – Bavorská cesta
63	NP0053	Hraniční chodník, Sřelecký průsmyk
64	NP0054	78C4/2 + GPS, Staré dráty
66	NP0083	Prameny Vltavy
67	NP0084	OVO – 8 – 20
68	NP0085	Zámecký les (1 C5)
69	NP0086	Skládka Žákova cesta
70	NP0091	OLE – 07, 65 A 04
Bbr	NP0155 <i>B. brongniartii</i>	Stožeček

Tab. č. 4: Seznam použitých kmenů *B. bassiana* a *B. brongniartii*, odebrané kmeny v r. 2008 **OSTATNÍ KMENY**

LAB. OZNAČENÍ	KMEN	PŮVOD/LOKALITA
Pk	Pk	ČR - Pěňčín (Morava)
Pm	Pm	ČR - Pěňčín (Morava)
KR 6	KR 0006	ČR – KRNAP, Pěnkavčí vrch
KR 7	KR 0007	ČR – KRNAP, Pěnkavčí vrch
Pol	A24	Polsko
USA	Bba 01	Spojené státy americké, FL
Rum	A32	Rumunsko
Kol	A133	Kolumbie
Fr	A135	Francie
Sk08	T08	Slovensko - Tatry
SSSR	A131	Rusko
Švé	A36	Švédsko
Č	A74	Čína

3.2. Složení a příprava kultivačního média PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Složení živného média PDA (Potato Dextrose Agar) od firmy HIMEDIA (Česká republika) a koncentrace jednotlivých složek je uvedena v Tab. č. 5.

Příprava PDA:

Navážit 39,0g PDA do kádinky a rozmíchat ve 1000ml destilované vody. Za stálého míchání a zahřívání nechat rozpustit. Sterilizace v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

Po sterilizaci rozlévat médium za sterilních podmínek ve flow boxu do Petriho misek a při pokojové teplotě necháme PDA ztuhnout.

Tab. č.5: Složení PDA

Složka	Koncentrace
	[g/l]
Bramborová infuse	200,0
Dextrosa	20,0
Agar	15,0

3.3. Kultivace a udržování kmenů *B. bassiana*

Kultivace jednotlivých kmenů *B. bassiana* probíhala na umělé živné půdě PDA (Potato Dextrose Agar) v termostatu při 25°C po dobu 14-21 dnů. Pro dlouhodobé uchování bylo mycelium homogenizováno sterilní kličkou ve flow-boxu v roztoku sterilního 20% glycerolu, odebráno pomocí mikropipety do centrifugačních mikrozkušavek a zmrazeno v 20°C.

Pro izolaci DNA bylo mycelium odebráno z Petriho misek pomocí skalpelu do mikrocentrifugačních zkumavek a uchováváno v mrazáku při -20°C.

Uchování zásoby mycelia

Pro dlouhodobé uchování mycelia bylo použito zmrazení v -80°C . Mycelium bylo před odebráním homogenizováno v Petriho miskách v roztoku 20% roztoku glycerolu, který slouží jako kryoprotektivum před poškozením buněk mrazem.

3.4. Izolace DNA *Beauveria bassiana* pomocí CTAB a SDS dle Williams et al. 1992

Nejvíce rozšířené metody izolace DNA, zvláště z malých vzorků, jsou založeny na kationtovém detergentu CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) (Hoelzel, 1992). Extrakce DNA je u hub velice problematická. Jejich buněčná stěna je složena z polysacharidů, chitinu, celulózy, linin-like struktury, tuků, vosků a barviv. Všechny tyto složky jsou rušivými elementy při izolaci a je složité je eliminovat. Dále je obtížné mechanicky narušit buněčnou stěnu a tím získat velké množství čisté genomické DNA.

DNA *B. bassiana* byla extrahována pomocí modifikovaného protokolu podle Williams et al. (1992). Je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson, 1980). CTAB zároveň působí jako degenerační činidlo, které uvolňuje DNA z membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

Pracovní postup:

- odebrat 100mg mycelia – rozdrtit homogenizátorem
- přidat 500µl lysis buffer + 1% merkptoethanol, zhomogenizovat
- 50 µl SDS – promíchat, 1 hodinu inkubovat při 37°C- promíchat
- 75 µl 5M NaCl- promíchat
- 60 µl CTAB 10% a 1 µl PVP- promíchat
- inkubace při 65°C, 30 min
- centrifugace 10 min na max (14 000 rpm)
- vodní fázi přepipetovat do nových mikrocentrifugačních zkumavek, přidat 500 µl chloroform + IAA 1:1
- třepat 10 min
- stočit 5 min na max, vodnou fázi přepipetovat do nových mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 5 µl RNasy, 30 min inkubovat při 37°C
- 0,6 vol izopropanolu, vložit do -20°C na dvě hodiny, nebo přes noc
- centrifugace 5 minut na max při 4°C, slít supernatant
- 1 µl 70% ethanol, promíchat, slít supernatant
- centrifugace 2 min na max
- slít supernatant, vysušit
- Přidat 100 µl H₂O a rozpustit při 37°C

3.5. Izolace DNA pomocí komerčního kitu DNeasy plant Mini Kit (Qiagen)

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Na první koloně dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé dochází k zachycení DNA a následnému vymytí elučním roztokem.

Pracovní Postup:

- odebrat 100 mg mycelia – rozdrtit homogenizátorem
- přidat 400 μ l AP₁ předehřátého na 65°C a 4 μ l RNasy A, důkladně promíchat na vortexu
- inkubace 10 min 65°C, 2-3 krát promíchat
- přidat 130 μ l AP₂, promíchat, inkubovat 5 min na ledu
- centrifugace 5 min, 14 000 rpm
- lyzát přepipetovat na QIAshredder mini spin kolonek v 2 ml mikrocentrifugačních kolonkách, centrifugovat 2 min, 14 000 rpm
- přefiltrovaný supernatant přenést do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek
- přidat 1,5x vol AP3/E a promíchat pomocí pipety
- celý objem mixu napipetovat do DNeasy mini spin kolonky v 2 ml mikrocentrifugačních zkumavkách
- centrifugace 1 min, 8000 rpm, předešlý krok ještě jednou zopakovat
- filtr vložit do nové mikrocentrifugační zkumavky, přidat 500 μ l AW, centrifugovat 1 min, 14000 rpm
- filtr vložit do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, přidat 100 μ l AE na membránu filtru, inkubace 5 min. při pokojové teplotě, centrifugace 1 min, 8000 rpm
- předchozí krok ještě jednou zopakovat

3.6. Stanovení koncentrace DNA pomocí fluorimetru

Princip měření fluorimetrem je následující. Každý přístroj má svůj zdroj excitačního záření, dále monochromátor, který nám vybere záření o určité vlnové délce. Dále zde bývá detektor, na který dopadá emisní záření a vyhodnocovací zařízení (obvykle PC).

Pro stanovení koncentrace DNA byl použit komerční kit od firmy Invitrogen (US). Součástí kitu jsou speciální tenkostěnné mikrocentrifugační zkumavky, reagent (fluorescenční barva), reakční pufr a roztoky standardů 1 a 2.

Všechna činidla musí být před měřením inkubována při pokojové teplotě a před použitím je nutné je řádně promíchat.

Nejprve připravíme pracovní roztok, namícháním reakčního pufru a reagentu následujícím postupem:

- $199 \mu\text{l} \times n \mu\text{l}^*$ reakčního pufru smícháme s $1 \times n \mu\text{l}$ reagentu

* kde n znamená počet vzorků

Poté připravíme roztoky standardů č. 1 a č. 2

- ke $190 \mu\text{l}$ pracovního roztoku přidáme $10 \mu\text{l}$ standardu č. 1 a č. 2 do druhé mikrocentrifugační zkumavky. Konečný objem je $200 \mu\text{l}$

Příprava jednotlivých vzorků:

- do mikrocentrifugační zkumavky odpipetujeme $197 \mu\text{l}$ pracovního roztoku a přidáme $3 \mu\text{l}$ roztoku DNA. Vzorky řádně promícháme a inkubujeme 2 minuty při pokojové teplotě. Konečný objem je $200 \mu\text{l}$

Na počátku měření provedeme kalibraci fluorimetru pomocí standardů č. 1 a č. 2. Po kalibraci můžeme postupně vkládat jednotlivé vzorky do fluorescenční cely přístroje. Po stanovení koncentrace DNA zvolíme v menu fluorimetru přepočítání koncentrace na pipetovaný objem vzorku, tedy na $3 \mu\text{l}$.

3.7. AFLP- podle originálního protokolu Suazo et al. (2000)

Podle Suazo a kol. (2000) lze restrikci genomické DNA a ligaci *EcoRI* adaptorů provést současně v jedné reakci. Toto je možné, protože adaptory jsou navrženy tak, že v rozpoznávací sekvenci restrikčního enzymu *EcoRI* je pozměněna jedna báze. AFLP primery a adaptory jsou uvedeny v Tab. č. 6.

Tab. č. 6: AFLP primery a adaptory

Primer	+3 selektivní báze*
1	<u>-AAG</u>
2	<u>-ACA</u>
3	<u>-ACG</u>
4	<u>-ATG</u>
5	<u>-GAC</u>
6	<u>-TCA</u>
7	<u>-TTG</u>
Adaptoty	Sekvence 5' - 3'
<i>EcoRI</i> adaptor	<u>CTCGTAGACTGCGTACC</u>
(upper)	
<i>EcoRI</i> adaptor	<u>AATTGGTAGGCAGTCTAG</u>
(lower)	

- tři selektivní koncové base k sekvenci *EcoRI* adaptoru
GACTGCGTACCAATTC+

Tab. č. 7: Restrikční místa a rozpoznávací sekvence *EcoRI* restriktázy

Restrikční místo <i>EcoR I</i>	Rozpoznávací sekvence
5'... G AATTC... 3'	GAATTC
3'... CTTAA G ... 5'	

Ligace adaptorů:

Adaptory *EcoRI* (upper, lower) je třeba naředit TE pufrem na koncentraci 250 pmol/μl a smíchat ekvimolární množství každého adaptoru (15 μl) v 0,4 ml centrifugační mikrozkuhavce.

Teplotní profil cyklu:

90°C 1min → každých 20 s se teplota sníží o 1°C, až do teploty 70°C

70°C 1min → každých 20 s se teplota sníží o 1°C, až do teploty 50°C

50°C 1min

30°C 10min

Produkty reakce se naředí na 50 pmol/μl → 10 μl produktu + 40 μl destilované vody.

1. Restrikční štěpení genomické DNA a ligace

komponenty	objem[μl]
DNA vzorku (0,3-2.0 μg)	2
reakční pufr (5x R/L)	5
5U <i>EcoRI</i> (20tisU/ml)	2
1U T4 DNA ligáza (1U/μl)	1
0,1M ATP	1
<i>EcoRI</i> adaptory (50 pmol/μl)	1
destilovaná voda	8
celkový objem	20

Všechny komponenty smícháme v 0,5 ml mikrocentrifugační zkuhavce krátce centrifugujeme. Vzorky necháme inkubovat 8 h při 37°C.

Po inkubaci zahřejeme vzorky na 15 min. na 70°C, aby došlo k inaktivaci restrikčních enzymů. Poté vzorky vložíme do lednice a necháme ochladit na 4°C.

2. Selektivní amplifikace

AFLP reakce probíhala v celkovém objemu 25 μ l v 0,5 ml mikrocentrifugační zkumavce. Složení reakční směsi na jednu reakci je následující:

komponenty	objem[μl]
templát DNA z restrikce a ligace	1
10x reakční pufr (ThermoPol Buffer, BioLabs)	2,5
50x každého z dNTP's (10mM)	1
primer (50 μ mol/ml)	2
50mM MgCl ₂	2
<i>Taq</i> polymeráza (5U/ μ l)	1
dH ₂ O	15,5
celkový objem	25

Teplotní profil Selektivní amplifikace:

Počáteční denaturace 95°C/60 s

35 cyklů denaturace 94°C/60 s

Nasednutí primeru (annealing) 56°C/60 s

Elongace 72°C/2,5 min

Finální elongace 72°C/5. min

Uchování 4°C - nekonečno

Následuje separace amplifikovaných produktů pomocí gelové elektroforézy na 2% agarózovém gelu.

3.7.1. Příprava agarózového gelu pro gelovou elektroforézu

Pro detekci AFLP produktů jsem použila agarózový gel o koncentraci agarózy 2%, který se připravuje následujícím postupem.

Do Erlenmayerovy baňky (250 ml) odvážíme 2 g agarózy od firmy SERVA, GmbH (Německo) pro elektroforézu nukleových kyselin a rozvaříme ve 100 ml 1x TBE pufru v mikrovlnné troubě. Promícháváme každé asi 2 minuty, dokud se agaróza úplně nerozvaří. Doba nutná pro dokonalé rozvaření agarózy záleží na její čistotě a kvalitě. Před rozlíváním do formy je nutné gel ochladit a přidat ethidium bromid (na 100 ml gelu 2 μ l EtBr).

Před nanášením vzorků na gel je nutné je pro zviditelnění obarvit nanášecím pufrům (LB). Na gel pouštíme 25 μ l AFLP produktu a 2 μ l loading pufru (cca 27 μ l). Pro možnost určení velikosti jednotlivých fragmentů přidáme na počátek a konec gelu 12 μ l velikostního markeru – DNA ladder (NEB).

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (TBE) (asi 2 mm nad úroveň gelu).

Elektroforéza probíhala při napětí 40-80 V, 1,5 – 2 hodiny. DNA je viditelná pod UV světlem na transiluminátoru, fotografické snímky byly pořízeny k tomu určeným digitálním fotoaparátem.

Nanášecí pufr- LB:

0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici.

Roztok ethidium bromidu- EtBr:

10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody.

Marker – DNA ladder:

100 pb DNA ladder (NEB) – 1 μ l markeru, 10 μ l vody, 2 μ l LB se promíchá a nanese na gel.

3.8. AFLP- podle originálního protokolu de Muro et al. (2003)

AFLP primery pro tuto metodu jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tab. č. 8: AFLP adaptory a primery

Název	Sekvence 5'- 3'	Aplikace
<i>EcoRI</i> -ad1	CTCGTAGACTGCGTACC (forward)	PCR preamplifikace
<i>EcoRI</i> -ad2	AATTGGTACGCAGTCTAC	
<i>EcoRI</i> adaptor	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC	
<i>HpaII</i> -ad1	GACGATGAGTCCTGAG (reverse)	PCR preamplifikace
<i>HpaII</i> -ad2	CGCTCAGGACTCATCGT	
<i>HpaII</i> adaptor	GACGATGAGTCCTGAG CGCTCAGGACTCATCGT	
<i>EcoRI</i> -GC	GACTGCGTACCAATTTCG(forward)	PCR selektivní amplifikace
<i>EcoRI</i> -AT	GACTGCGTACCAATTCAT (forward)	PCR selektivní amplifikace
<i>HpaII</i> -CTC	GATGAGTCCTGAGCGGCTC (reverse)	PCR selektivní amplifikace
<i>HpaII</i> -ACC	GATGAGTCCTGAGCGGACC (reverse)	PCR selektivní amplifikace

Tab. č. 9: Restrikční místa a rozpoznávací sekvence *EcoRI* a *HpaII* restriktáz

Restrikční místo <i>EcoRI</i>	Rozpoznávací sekvence
5'... G ^v AATTC... 3'	GAATTC
3'... CTTAA ^v G... 5'	
Restrikční místo <i>HpaII</i>	Rozpoznávací sekvence
5'... C ^v CGG... 3'	CCGG
3'... GGC ^v C... 5'	

1. Restrikční štěpení genomické DNA

komponenty	objem[μl]
5x reakční pufr (NEB)	4
5U <i>Hpa</i> II (10tisU/ml)	0,5
5U <i>Eco</i> R I (20tisU/ml)	0,25
Destilovaná voda	do 40
DNA vzorku (500 ng)	10-15
celkový objem	40

Všechny komponenty smícháme v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce a krátce centrifugujeme. Vzorky necháme inkubovat 1 h při 37°C.

2. Ligace

Ke vzorkům po restrikčním štěpení přidáme reakční mix:

komponenty	objem[μl]
10x reakční pufr (NEB)	1
50 pmol <i>Hpa</i> II adaptor3' (250pmol/ μ l)	0,2
50 pmol <i>Hpa</i> II adaptor5' (250pmol/ μ l)	0,2
pmol <i>Eco</i> R I adaptor3' (50pmol/ μ l)	0,1
5 pmol <i>Eco</i> R I adaptor5' (50pmol/ μ l)	0,1
1U T4 DNA ligáza (1U/ μ l)	1
1 mM ATP	1
destilovaná voda	6,4
celkový objem	10

10 μ l master mixu přidat ke vzorkům z restrikčního štěpení a krátce centrifugovat. Inkubovat 14 h při 37°C.

Po ligaci vzorky skladovat v lednici při teplotě 4°C.

3. Preamplifikační reakce

komponenty	objem[μl]
DNA z restrikce a ligace	1
10x reakční pufr (ThermoPol Buffer)	2
50 pmol <i>Hpa</i> II ad1 (ad2)*(500ng/ μ l)	1
50 pmol <i>Eco</i> RI ad1 (ad2) (500ng/ μ l)	1
500 μ M každého z dNTP's (10mM)	5
1U <i>Taq</i> poloymeráza (5U/ μ l)	0,2
2,5 mM MgCl ₂ (50 mM)	0,5
destilovaná voda	9,3
celkový objem	20

*Tento krok má dvě varianty. Primery s označením 1 nebo 2. Vždy se použijí stejná čísla do jedné reakce.

Pre selektivní amplifikace- teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 94°C/5 min

30 cyklů denaturace: 94°C/30 s

Nasednutí primeru (annealing) 56°C/1 min

Elongace 72°C/1,5 min

Finální elongace 72°C/5 min

Uchování: 4°C - nekonečno

4. Selektivní AFLP amplifikace

komponenty	objem[μl]
DNA z preamplifikace	5
primer <i>Hpa</i> II (30 ng)	0,1
primer <i>Eco</i> RI fluoro (značený 5ng)	0,087/0,09 (5x naředěný)
200 μ M každého z dNTP's (10mM)	0,4
0,5 U <i>Taq</i> poloymeráza (5U/ μ l)	0,1
10x reakční pufr (ThermoPol Buffer)	2
destilovaná voda	12,313
celkový objem	20

Selektivní amplifikace- teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 95°C/60 s

35 cyklů denaturace: 94°C/60 s

 Nasednutí primeru (annealing): 56°C/60 s

 Elongace: 72°C/2,5 min

Finální elongace: 72°C/5. min- konečná extenze

Uchování: 4°C - nekonečno

3.9. AFLP- podle originálního protokolu Vos et al. (1995)

AFLP primery a adaptory jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tab. č. 10: AFLP primery

Název	Sekvence 5'- 3'	Aplikace
<i>Eco</i> RI adaptor (upper)	CTCGTAGACTGCGTACC	PCR preamplifikace
<i>Eco</i> RI adaptor (lower)	AATTGGTACGCAGTCTAC	PCR preamplifikace
<i>Mse</i> I adaptor (upper)	GACGATGAGTCCTGAG	PCR preamplifikace
<i>Mse</i> I adaptor (lower)	TACTCAGGACTCAT	PCR preamplifikace
<i>Eco</i> RI primer	$\begin{array}{ccc} \text{CORE} & \text{ENZ} & \text{EXT} \\ \text{GACTGCGTACC} & \text{AATTC} & \text{NNN} \end{array}$	PCR selektivní amplifikace
<i>Mse</i> I primer	$\begin{array}{ccc} \text{CORE} & \text{ENZ} & \text{EXT} \\ \text{GATGAGTCCTGAG} & \text{TAA} & \text{NNN} \end{array}$	PCR selektivní amplifikace

AFLP primery se skládají ze tří částí:

základní sekvence (CORE), enzymově specifické sekvence (ENZ) a sekvence pro selektivní extenzi (EXT).

Tab. č. 11: Restrikční místa a rozpoznávací sekvence *Eco*RI a *Mse*I restriktáz

Restrikční místo <i>Eco</i> RI	Rozpoznávací sekvence
$\begin{array}{l} 5' \dots \text{G}^* \text{AATTC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CTTAA} \cdot \text{G}^* \dots 5' \end{array}$	GAATTC
Restrikční místo <i>Mse</i> I	Rozpoznávací sekvence
$\begin{array}{l} 5' \dots \text{T}^* \text{TAA} \dots 3' \\ 3' \dots \text{AAT} \cdot \text{T}^* \dots 5' \end{array}$	TTAA

1. Restrikční štěpení genomické DNA

komponenty	objem[μl]
1x reakční pufr (NEB)	5
5U <i>Mse</i> I (10U/ μ l)	0,5
5U <i>Eco</i> R I (20U/ μ l)	0,25
Destilovaná voda	do 50
DNA vzorku (50 ng)	10-15
celkový objem	50

Všechny komponenty smíchat v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce a krátce centrifugovat. Vzorky necháme inkubovat 16 h při 37°C.

2. Ligace

komponenty	objem[μl]
1x reakční pufr (NEB)	1
5 pmol <i>Eco</i> RI adaptor3' (50pmol/ μ l)	0,1
5 pmol <i>Eco</i> RI adaptor5' (50pmol/ μ l)	0,1
50 pmol <i>Mse</i> I adaptor3' (250pmol/ μ l)	0,2
5 pmol <i>Mse</i> I adaptor5' (250pmol/ μ l)	0,2
1U T4 DNA ligáza (1U/ μ l)	1
10 mM ATP	1,2
destilovaná voda	6,2
celkový objem	10

10 μ l master mixu přidat ke vzorkům z restrikčního štěpení a krátce centrifugovat. Celkový objem reakce je 60 μ l. Inkubovat 3 h při 37°C. Po inkubaci vzorky 10x naředit destilovanou vodou (přidat 540 μ l).

3. Preamplifikační reakce

komponenty	objem[μl]
DNA z restrikce a ligace	5
1x reakční pufr (ThermoPol Buffer)	5
4 mM MgCl ₂ (25 mM)	4
75 ng <i>Mse</i> I -A (500ng/ μ l)	0,15
75 ng <i>Eco</i> RI -A (500ng/ μ l)	0,15
200 μ M každého z dNTP's (10mM)	1
1U <i>Taq</i> poloymeráza (5U/ μ l)	0,2
destilovaná voda	34,5
celkový objem	50

Pre selektivní amplifikace- teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 94°C/5 min

30 cyklů denaturace: 94°C/30 s

 Nasednutí primeru (annealing): 56°C/1 min

 Elongace: 72°C/1,5 min

Finální elongace: 72°C/5 min

Uchování : 4°C - nekonečno

Z celkového objemu 50 μ l odpipetovat 40 μ l a 20x naředit destilovanou vodou (přidat 760 μ l). Zbylých 10 μ l z reakce pustit na 1,5% agarózovém gelu.

Po ligaci vzorky skladovat v lednici při teplotě 4°C.

4. Selektivní amplifikace

komponenty	objem[μl]
DNA z preamplifikace	2,5
30 ng primer <i>MseI</i> – NNN (300 ng/ μ l)	0,1
5 ng primer <i>EcoRI</i> –ACG (značený, 10.000 pmol)	0,087/0,09 (5x naředěný)
200 μ M každého z dNTP's (10mM)	0,2
0,5 U <i>Taq</i> poloymeráza (5U/ μ l)	0,1
1x reakční pufr (ThermoPol Buffer)	1
destilovaná voda	6,013
celkový objem	10

Selektivní amplifikace- teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 95°C/60 s

35 cyklů denaturace: 94°C/60 s

Nasednutí primeru (annealing): 56°C/60 s

Elongace: 72°C/2,5 min

Finální elongace: 72°C/5. min- konečná extenze

Uchování : 4°C - nekonečno

Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

Do 0,5 ml centrifugační mikrozskumavky napipetovat 11 μ l formamidu; 0,5 μ l standardu Gene Scan TM 500 Liz TM (Applied Biosystems, USA); 1,0 μ l vzorku (po selektivní amplifikaci).

Vzorky důkladně promíchat a krátce centrifugovat.

3.10. Metody zpracování výsledků

3.10.1. Digitální obrazová analýza

Komplexní počítačové zpracování gelu při využití digitálního fotoaparátu jako součásti Gel documentation systém. Po digitalizaci jsou gely zpracovány pomocí speciálního software Bioprofil 1D++ (Vilber Lourmat, France a nebo TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Velká Británie)).

3.10.2. Statistické zpracování dat

Pro účely hodnocení molekulárních markerů bylo využito statistické zpracování dat. Na základě digitální obrazové analýzy a takto zjištěných pruhů na gelu byly sestaveny matice přítomnosti/nepřítomnosti a provedeno statistické hodnocení (výpočet koeficientů genetické podobnosti/odlišnosti, clusterová /UPGMA – Unweighted Pair Group Method Averages/ a ordinační /PCO – Principal Coordinates Analysis/ analýza a sestavení dendrogramů a ordinačních diagramů). Pro tyto účely je využíván program Statistica 6.0 (Statsoft) a MVSP (Kovach Comp. Serv).

4. Výsledky a diskuze

Jsou zpracovávány do vědecké publikace a po jejím vydání budou vloženy a doplněny.

5. Závěr

Výsledky této studie potvrzují konzervativnost kmenů druhu *Beauveria bassiana*, izolovaných v NP Šumava. Jak shluková analýza, tak analýza PCO (Principal Co-ordinate Analysis) prokázaly, že analyzované kmeny *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii* vytvářely skupiny na základě geografického původu.

Na základě velikosti genomu *Beauveria bassiana* se jevila jako nejvhodnější metoda podle Suazo et al. (2000), metoda AFLP podle Vos et al. (1995) je vhodná na pro organismy s komplexnějším genomem. Metoda AFLP podle de Muro et al. (2003) je velmi náročná na optimalizaci a prvotní znalost o genomu zkoumaného organismu.

Tato populace je velmi uzavřená a stabilní. V přírodních podmínkách se druh *Beauveria bassiana* skládá z mnoha populací, které jsou specificky adaptovány na daný ekosystém a geografickou polohu. Metoda AFLP podle Suazo et al. (2000) poskytuje dostatečný polymorfismus pro determinaci entomopatogenní houby *Beauveria spp.* na úrovni druhu.

Použitá literatura

- Akbar Ali Khan Pathan, Koduru Uma Devi, Heiko Vogel, Annette Reineke, 2007: Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Baeuveria bassiana* (Blas.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs, *Fungal Genetics and Biology* 44 (2007) 1231-1241
- Ambrožová, J., 2008: Mikrobiologie v technologii vod, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
- Anollés, G. C., P. M. Gresshoff, 1997: DNA Markers, Protokols, Applications, and Overviews, 115-130, Willey-Liss, Inc, New York
- Arora, D. K., 2004: Handbook of Fungal Biotechnology, Marcel Dekker Inc, New York, Basel
- Arora, D., K., Khachatourians, G., G., 2004 : Applied Mycology and Biotechnology, Elsevier
- Avise, J. C, 2004: Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 94-95, ISBN 0-87893-041-8, printed in USA
- Biren, B., Green, E. D., Klapholz, S., Myers R. M., Roskams, J., 1997: Analyzing DNA a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Bruns, T.D., Whitw, T.J., Taylor, J.W., 1991: Fungal molecular systematic. ANNUAL reviews of Ecol. Syst-. 22: 525-564
- Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M., 1997: DNA markers, Protokols, Applications, and Overviews. –Wille-Liss, Inc., New York, pp. 364
- Cano R.J., Poinar H.N., Pieniasek N.J., Acra A. a Poinar Jr., G.O. (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363: 536-538
- Cregan, P.B. and Quigley, CH.V., 1997: Simple sequence repeat DNA marker analysis. In: Caetano-Anollés, G. and Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protokolas, Applications, and Overviews. –Wille-Liss, Inc., New York, pp. 75-83
- de Muro, M., A., Metha, S., Moore, D., 2003: The use of amplified fragment lenght polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya

and other countries, and their correlation with host and geographical origin, FEMS Microbiology Letters 229 (2003) 249-257

- Dirlbeková O., Nesrsta M., Dirlbek J., Jedlička M., 1991: Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (I. Deuteromyces, Beauveria bassiana [Bals.] Vuill.), 11, 5-7, ÚVTIZ Praha
- Drbal, K., Křížek, M., 1999: Analytická chemie, 180 – 182, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, DPT Č. Budějovice
- Gaš, B., 2001: Kapilární elektroforéza, Vesmír, 80/6, 370-373
- Grant, D. and Shoemaker, R., 1997: Molecular hybridization. In: Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protocols, Applications, and Overviews. Willey-Liss, Inc, New York, pp. 15-26
- Hoebel, A. R., 1992: Molecular Genetic Analysis of Populations, Oxford University Press
- Huang, X. C., Quesada, M. a., Mathies, R. A., 1992: DNA sequencing using capillary array electrophoresis, Analytic chemistry, 64, 2149-2154
- Humber R. A., 1997. fungi: identifikace. In Lacey L.A. (Ed). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, CA, 153 – 185. ISBN 0-12-432555-6
- K. Brunner, S. Zeilinger, R.L. Mach, Molecular Approaches for Studying Fungi in the Environment, Springer Berlin Heidelberg, 2007
- Kamp A. M., Bidochka M. J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology, 35, 74 – 77.
- Karp, A., Edwards, K.J., 1997: DNA markers: a global overview. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 1-13
- Kubátová, B., 2008: Application of different methodological approaches in plant population studies, PhD Thesis, Jihočeská univerzita, ZF, České Budějovice
- Kubicek, C. P., Druzhinia I. S., 2007: The Mycota, Springer Berlin Heidelberg New York
- Landa, Z., 1998: Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub, ZF JCU, České Budějovice, Agro, 4, 10: 7-12.
- Malvick D. K, Grunden E., 2005: Isolation of fungal DNA from plant tissues and removal of DNA amplification inhibitors. Mol. Ecol Notes 5:958-960

- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., 1994: The Fungi, Academic Press, London
- Blears, M. J., De Grandis, S. A., Lee, H., Trevors, J. T., 1998: Amplified fragment length polymorphism (AFPL): a review of the procedure and its application, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 21, 99-114
- Meyer J. M., Hoy M. A., Boucias D. G., 2008: Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida, Journal of Invertebrate Pathology, 99, 96-102
- Mueller, U. G., Wolfenbarger, L.L., 1999: AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in Ecology and Evolution 14: 389-393
- O'Malley, D.M. and Whetten, R., 1997: Molecular markers and forest trees. In: Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protokolas, Applications, and Overviews. –Wille-Liss, Inc., New York, pp. 237-257
- Oborník, M., 1995: Molecular characterization and phylogeny of entomopathogenic fungi. Doctoral thesis, Jihočeská univerzita, ZF, České Budějovice
- Osbourne, A. M., Smith, C. J., 2005: Molecular microbial ecology, Cromwell Press, UK
- Padmavathi, J., Uma Devi, K., Uma Maheswara RAO, C., Nageswara Rao REDDY, N., 2002: Telomere fingerprinting for assessing chromosome number, isolate typing and recombination in the entomopathogen *Beauveria bassiana*
- Rafalski, J. A., 1997: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protokolas, Applications, and Overviews. –Wille-Liss, Inc., New York, pp. 75-83
- Reineke, N. Nageswara Rao Reddy, C. Uma Maheswara Rao, J. Padmavathi, 2006: Genetic diversity, reproductive biology, and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, Genome, 49, 495-500
- Russell, D. W., Sambrook, J., 2001: Molecular cloning a laboratory manual, CSHL Press, USA
- Samina Mtha, David Moore, 2003: The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin, FEMS Microbiology Letters 229 (2003) 249-257

- Shimizu, S., Higashiyama, R., Matsumoto, T., 1993: Chromosome length polymorphism in *Beauveria bassiana*. J Seric Sci Jpn 62: 45-49
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., 2005: Metody molekulární biologie, 13-16, Masarykova univerzita v Brně, Vydavatelství MU, Brno-Kaví Hora
- Tiago-Milani, M. S., Samson, R. A., Martins, I. Sobral, B. W. S., 1995: DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*, Microbiology, 141, 239-245
- Tomkins, J. P., Wood, T. C., Barnes, L. S., Westman, A., Wing, R. A., 2000: Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis spp.*) using AFLP markers, Theor Appl Genet, 102:489-498
- Vogt, T., Mathieu-Daude, F., Kullmann, F., Welsh, J. and McClelland, M. (1997): Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrary primed PCR. In: Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protokolas, Applications, and Overviews. –Wille-Liss, Inc., New York, pp. 55-74
- Vos, P. and Kuiper, M. (1997): AFLP analysis. In: Caetano-Anollés, G. And Gresshoff, P. M. (eds.): DNA markers, Protokolas, Applications, and Overviews. – Wille-Liss, Inc., New York, pp. 115-131
- Watson RJ, Blackwell B., 2000: Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J Microbiol 46:633-642
- Zimmermann, Gisbert, 2007: Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, Biocontrol Science and Technology, 17:6, 553-596