PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ČESKÁ UNIVERZITA

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

České Budějovice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Analýza low-copy sekvencí a její využití pro hodnocení polymorfismu kmenů/izolátů *Beauveria bassiana*

Bc. Eva Vondrášková

Vedoucí DP: **Ing. Kateřina Šimáňková** Konzultant DP: **prof. Ing. Vladislav Čurn Ph.D.**

České Budějovice

2010

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: **„Analýza low-copy sekvencí a její využití pro hodnocení polymorfismu kmenů / izolátů *Beauveria bassiana*“** vypracovala samostatně na základě svých výsledků a použila jen materiály, které uvádím v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích
duben 2010

---

podpis

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

POD'nKOVÁNÍ

Dĺkuji vedoucí diplomové práce Ing. KateŚinĺ Ġimáļkové za trpĺivost a za odborné vedení bĺhem vypracování mé diplomové práce. Rovnĺġ dĺkuji prof. Ing. Vladislavu Ļurnovi, Ph.D. za prŢbĺġné konzultace bĺhem práce.

Nemalý dík patŚí mým kolegyním Bc. KristinĺKotlanové a Bc. MartinĺKrálové za pomoc v laboratoŚi. Také dĺkuji vġem pracovníkŢm Biotechnologické centra Zemĺdĺlské fakulty.

Nejvĺtġí dík patŚí mým blízkým, kteŚí mĺpo celou dobu studia významnou mĺrou podporovali.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Anotace

Beauveria bassiana je využívaná v biologické kontrole proti hospodářsky významným škůdcům. Detekce morfologického i genetického polymorfismu mezi jednotlivými izolovanými druhy a kmeny v přírozeném prostředí je důležitá ke studiu jejich šíření a působení v ekosystému.

Cílem této studie bylo zjistit, v jakém propojení jsou „lokální kmeny" s ekologickými aspekty biologické kontroly v chráněné zóně a zhodnotit polymorfismus jednotlivých úseků pomocí metod molekulárních markerů.

Bylo analyzováno 36 kmenů odebraných v Národním parku Šumava v České republice. Polymorfismus těchto kmenů byl zjišťován podle sekvencí LSU (28S velká podjednotka ribosomální DNA).

Vypozorovali jsme, že populace pocházející z Národního parku Šumava je velmi uzavřená. „Lokální kmeny" lze díky těmto metodám velmi dobře charakterizovat i ve srovnání s jinými kmeny z odlišných částí České republiky i z jiných zemí. Populace z Národního parku Šumava nevykazuje žádné rozdíly v polymorfismu. Díky této analýze byl ujednocen vzorek Bba I101. Tento preparát je opětovně používán na lýkožrouta smrkového, vyskytujícího 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.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Summary

Beauveria bassiana is used in biological control against the economically significant pests. Detection of morphological and genetic polymorphism between different species and strains isolated in the natural environment is important to study the distribution and effects in the ecosystem.

The aim of this study was to determine in which links are "local tribes" with ecological aspects of biological control in protected zone and assess the polymorphism of the sections by using molecular markers.

Were analyzed 36 strains collected in the National Park Ġumava in the Czech Republic. Polymorphism of these strains was determined according to a sequence of LSU (28S Large Subunit Ribosomal DNA).

It is observed that the populations from National Park is closed, "the local tribes" because these methods can be very well characterized and compared with other strains from different parts of the Czech Republic and other countries. Populations from National Park showed no differences in polymorphism. Through this analysis, the sample Bba I101 was aligned. This preparation is re-used for bark beetle occurring in the National Park Ġumava in the Czech Republic.

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

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

1. Úvod 1
2. Literární pŚehled 2
2.1. Entomopatogenní houby a jejich vyuğití 2
2.1.1. Skupiny entomopatogenních hub 2
2.2. Biologická kontrola 2
2.2.1. Pouğití entomopatogenních hub v biologické kontrole 3
2.3. Charakteristika *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912) 4
2.3.1. Vývojový cyklus *Beauveria bassiana* 5
2.3.2. Biologie *Beauveria bassiana* 6
2.3.3. Taxonomické zaŚazení *Beauveria bassiana* 7
2.3.4. Vyuğití *Beauveria bassiana* 8
2.4. Molekulární markery 9
2.4.1. Molekulární metody 9
2.4.2. Vyuğití molekulární markerŢ pŚi studiu entomopatogenních hub 11
2.4.3. Elektroforéza 12
2.4.4. Polymerázová ŚetĚzová reakce (PCR) 13
2.4.5. Sekvenování DNA 16
2.4.6. Ribozomální RNA a její podjednotky 19
3. Cíl 23
4. Materiál a metodika 24
4.1. Pouğitý materiál 24
4.2. KultivaceVzorkŢ 26
4.3. Izolace DNA 26
4.3.1. Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB dle Williamse ï modifikováno pro houby 26
4.3.2. Izolace DNA pomocí komerļního kitu - DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 27
4.4. MĚŚení koncentrace DNA 28
4.5. PCR reakce 29
4.6. PŚíprava agarosového gelu a elektroforéza 30
4.7. Izolace z fragmentŢ z gelu 31

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

..... 32
5. Výsledky .....**Chyba! Záloka není definována.**
6. Diskuze 33
7. Závr 33
8. Pouitá literatura..... 35
Pílohy 41

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

1. Úvod

Již v druhé polovině 19. století byly zaznamenány snahy o rozvoj biologické ochrany rostlin proti škodlivým organismům. Hlavním důvodem, proč začít s biologickou ochranou, byla především snaha omezit používání chemických látek a chránit životní prostředí. Některé chemické metody mohly být pro savce toxické a způsobovaly tak vysokou mortalitu necílových organismů.

Entomopatogenní houby parazitují na téměř všech zástupcích hmyzích řádů. Nejčastěji infikovanými stádii hmyzu bývají larvy, v některých případech i kukly. Méně často jsou houbami infikováni dospělci nebo vajíčka hmyzu. Nejznámější jsou entomopatogenní houby rodů *Beauveria, Hirsutella, Lecanicillium, Metarhizium, Nomuraea, Isaria* a *Tolypocladium*. Tyto rody entomopatogenních hub lze nalézt po celém světě. Hlavně druhy rodu *Beauveria* jsou vhodné jako modelové organismy pro studium entomopatogenů použitelných pro biologickou kontrolu škůdců hmyzu. V zahraničí je registrována řada biopreparátů na bázi *Beauveria bassiana*.

Druh *Beauveria bassiana* je v České republice typickým představitelem entomopatogenní mikroflóry. Nyní je v ČR využívána zejména pro regulaci škůdce lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*, Linnaeus, 1758), který způsobuje velké škody na smrkových porostech na celém území republiky.

U entomopatogenních hub jsou používány morfologické znaky na celkové posouzení makroskopické a mikroskopické struktury. Zejména se posuzují kritéria jako tvar a velikost konidií. Tyto metody jsou ovšem nepřesné a k jejich upřesnění se používají metody molekulárních markerů. Díky nim lze určit přesné taxonomické zařazení.

Tato studie je zaměřena na posouzení vhodnosti analýzy rRNA pro hodnocení genetické variability entomopatogenních hub získaných během monitoringu přirozené populace *Beauveria bassiana* v Národním parku Šumava. Zde se během projektu MZP SP/2d1/41/08 začal využívat biopreparát na bázi *Beauveria bassiana* a vyvstala otázka použití lokálního kmene a zachování přirozeně se vyskytujícího genotypu nebo zda je možno použít již registrovaný biopreparát, u něhož neznáme původ a hrozí možnost změny v druhové diversitě populace *Beauveria bassiana* v Národník parku Šumava.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

2. Literární přehled

2.1. Entomopatogenní houby a jejich využití

Entomopatogenní houby jsou organismy parazitující na hmyzu, pro který bývají často letální. Tyto houby obvykle přilnou k povrchu hmyzu ve formě mikrosporických výtrusů (obvykle ve formě nepohlavní, nazývané konidie).

Při vhodných podmínkách jako je teplota a obvykle vysoká vlhkost začnou tyto výtrusy klíčit. Začnou růst hyfy, které kolonizují celou kutikulu hmyzu. Poté se houbové buňky rozrůstají v hostitelském těle obezděné hyfami, nebo ve formě protoplastu nemajícího stěnu. Po nějakém čase je hmyz obvykle usmrcen. Někdy mohou být příčinou usmrcení sekundární metabolity (Shah et al., 2003).

2.1.1. Skupiny entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby zahrnují taxony z několika hlavních houbových skupin. Tyto taxony netvoří monofyletické skupiny. Mnoho běžných a/nebo důležitých hub je řazeno do skupiny *Hypocreales*, oddělení *Ascomycota*, do které se dají zařadit nepohlavní formy (anamorfa) hub *Beauveria, Metarhizium, Nomuraea, Isaria, Hirsutella* a pohlavní formy (telomorfa), kterými u rodu *Beauveria* je rod *Cordyceps*. Ostatní druhy patřící do čeledi *Entomophthorales* z oddělení *Zygomycota* jsou: *Entomophtora, Zoophtora, Pandora, Entomophaga*.

Příbuzné houby zabíjejí i jiné druhy bezobratlých, například hlístice (Humber, online 2009).

2.2. Biologická kontrola

Klasická biologická kontrola je uvedení přírozených nepřátel do nové lokality tam, kde nevznikají a kde se nevyskytují přírozeně. V mnoha případech komplex přírozených nepřátel, kteří jsou asociováni se škodlivým hmyzem, může být nedostatečný. To je zvláště patrné u hmyzích škůdců náhodně vlečených do nových geografických oblastí. Zavedení škůdci jsou označováni jako exotičtí škůdci (Hafez et al., 1994). Podle většiny vědců zabývajících se biologickou kontrolou, se tato liší od „přírozené kontroly". Klasická

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

biologické ļasovŋ nároļ nŋġí. Na druhé stranŋ biologická kontrola vyġaduje zásah a nemŢġe se ponechat pŚirozenému vývoji. Biologická kontrola je pŚístup, který se dá zaŚadit do celkové ochrany pŚed ġkŢdci. PŚedstavuje tak alternativu v pouġívání pesticidŢ (Wiedenmann, 2000).

2.2.1. Pouġití entomopatogenních hub v biologické kontrole

Biologická kontrola je definována jako redukce populace ġkodlivého hmyzu pŚirozenými nepŚáteli, pŚiļemġ zde hraje významnou roli i ļlovŋk. PŚirození nepŚátelé ġkodlivého hmyzu, jsou známí jako ļinitelé biologické kontroly, toto zahrnuje parazity a patogeny. Ļinitelé biologické kontroly rostlinných onemocnŋní jsou ļastŋji uvádŋni jako antagonisté (Driesche et al., 1996).

Patogeni, kteŚí zpŢsobují onemocnŋní, jsou typu bakterie, houby a viry. Zabíjejí anebo oslabují svoje hostitele a jsou pomŋrnŋ specifické na hostitelskou skupinu hmyzu. Existují tŚi základní strategie biologické kontroly: ochrana, klasická biologická ochrana a rozġiŚování (Wagner, 2000).

Biologická kontrola mŢġe mít potenciálnŋ positivní i negativní vliv na biodiversitu. Biopreparát byl mnohokrát introdukován na plochu, kde mŋl ochraŔovat pŚirozené druhy od druhŢ exotických, které se na této ploġe vyskytovaly (Rehner, 2005). Biologická kontrola je charakterizována jako sniġování konkurence mezi pŚirozenými a invazivními druhy. Ovġem zanesená kontrola nemusí mít vġdy vliv pouze na zamýġlený cílový druh. Cílem mohou být také pŚirozené druhy (Tucker et al., 2005).

Polyfágové mají malou schopnost biologické kontroly a mohou být pouġívání spíġe jako testovací organismy. Pokud vļlenŋný druh zaļne napadat pŚirozený druh, biodiversita se v tomto prostŚedí mŢġe dramaticky zmŋnit. Obratlovci jsou ve vŋtġinŋ pŚípadŢ polyfágní hostitelé (Posada, et al., 2004).

Pro vnesení pŚirozeného nepŚítele proti ġkŢdcŢm je nutné urļit hlavního ġkŢdce a pak vybrat vhodného nepŚítele nebo jeho blízký druh. PŚirozený nepŚítel pak prochází karanténou, aby se zjistilo, jestli nepŢsobí neġádoucím zpŢsobem na uġiteļné organismy, pak jsou tito nepŚátelé namnoġeni a vneseni do prostŚedí. V nŋkterých pŚípadech mŢġe mít biologická ochrana i nepŚedvídané negativní výsledky, které by mohly pŚeváġit nad vġemi výhodami (en.wikipedie.org, online 2009).

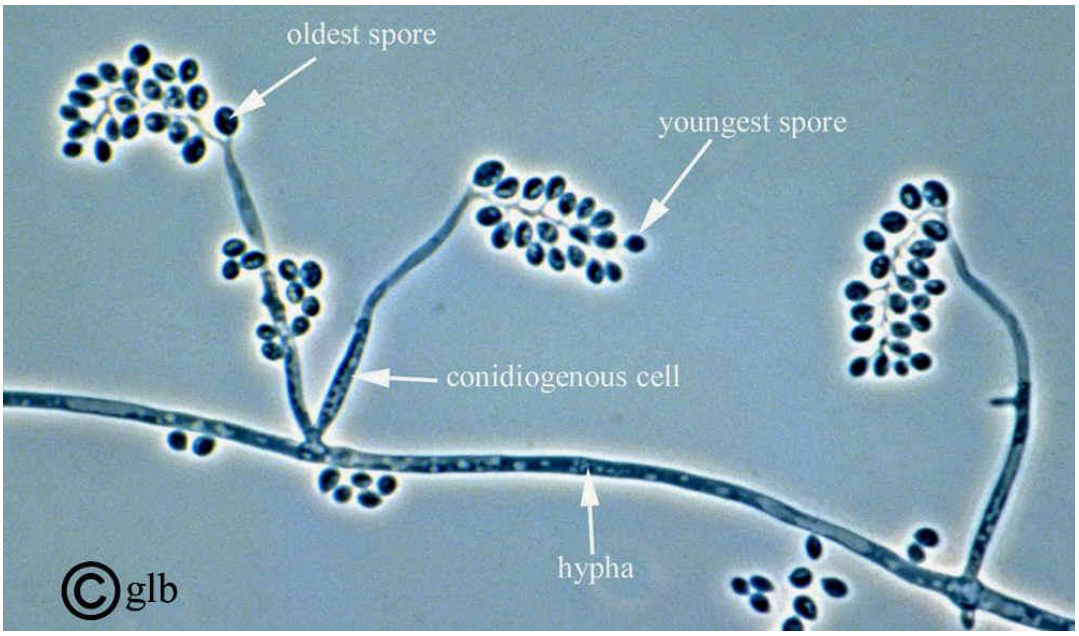
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

nismŢ pro biologickou kontrolu pŚed nŊkterými hmyzími druhy se zvýġilo bŊhem nŊkolika minulých let, kdy bylo testováno více jak 30 druhŢ entomopatogenních hub s vyuġitím pro biologickou kontrolu na rŢzných druzích hmyzu (Hafez et al., 1994).

2.3. Charakteristika *Beauveria bassiana* (Vuillemin, 1912)

Tento druh byl pojmenován po italském entomologovi Agostino Bassiim, který *Beauverii* objevil v roce 1835 na domestifikovaném bourci moruġovém (*Bombyx mori* (Linnaeus, 1758)) v podobŊ bílé muskardiny. V tu dobu byla pojmenována jako *Tritirachium shiotae* (en.wikipedia.org, online 2009).

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Criv.) Vuillemin 1912 je bŊġnŊ zaznamenávána jako pŢvodce onemocnŊní na mnoha druzích hmyzu, zejména pak na herbivorních druzích, které jsou alespoŔļ ástí svého vývoje vázány na pŢdu (Landa et al., 2007). *Beauveria bassiana* je entomopatogenní houba vhodná jako modelový systém pro studium entomopatogenŢ pouġitelných pro biologickou kontrolu hmyzích ġkŢdcŢ. Parazituje na rŢzných druzích hmyzu (Fiala, 2009).



Obr. 1 Zobrazení houby *Beauveria bassiana* pod mikroskopem

(http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm&ei=0mfLSrqOII6C_Abl95SjBQ&sa=X&oi=translate&resnum=3&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dusing%2Bof%2Bbeauveria%2Bbassiana%26hl%3Dcs%26lr%3D, 2010)

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

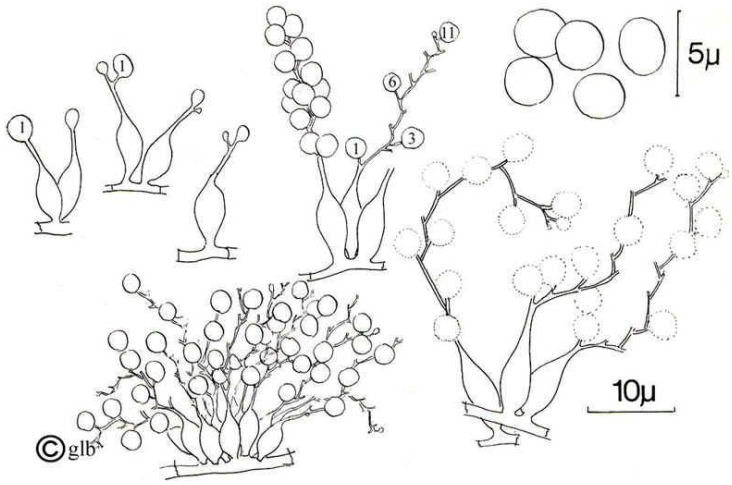
anamorfním stadiem druhu *Cordyceps bassiana*. Teleomorfní stádia byla nalezena pouze v západní Asii (Li et al., 2001). Konidie jsou u tohoto druhu krátké a ovoidní, zakončené úzkým apikálním vrcholem, jsou jednobuněčné, haploidní a hydrofobní (en.wikipedia.org, online 2009).

Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je typickým představitelem nejen entomopatogenní, ale saprotrofní mykoflóry půd a na celém území ČR patří k nejčastěji zaznamenávaným druhům mitosporických hub (druhy, u kterých není známo pohlavní stádium, dříve *Deuteromycetes*) (Landa et al., 2007).

2.3.1. Vývojový cyklus *Beauveria bassiana*

Infekce hostitele je iniciována konidiemi, které po přichycení na povrch kutikuly klíčí a pronikají do tělní dutiny, nejčastěji pomocí aktivní penetrace povrchem kutikuly. Vegetativní struktury se ve hmyzím hostiteli namnožují za příznivých podmínek, často ve formě subjektů, které se množí pučením. Jakmile je hostitel naplněn hyfami, hmyz obvykle zemře (Fan et al., 2001). V konečné fázi vývoje prorůstají hyfová vlákna na povrch usmrceného jedince a na povrchu se formuje vzdušné mycelium, na kterém se tvoří nové konidie, které mohou iniciovat nový vývojový cyklus patogena (Landa et al., 2007).

Na rozdíl od ostatních skupin hmyzích patogenů, které obvykle infikují hostitele po požití, entomopatogenní houby témě vždy napadnout hmyzí hostitele tím, že pronikají přímo přes kutikulu (Groden, 1999).



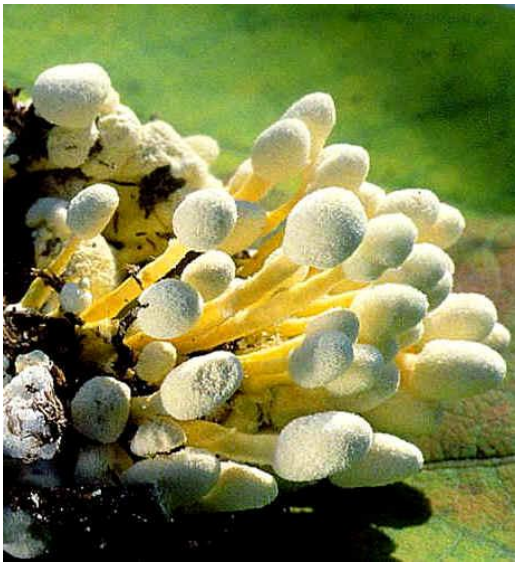
Obr. 2 Vývojová stádia houby *Beauveria bassiana*

(http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm&ei=0mfLSrqOII6C_Abl95SjBQ&sa=X&oi=translate&resnum=3&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dusing%2Bof%2Bbeauveria%2Bbassiana%26hl%3Dcs%26lr%3D, 2010)

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

veria bassiana

Beauveria bassiana je agresivní parazit pŢsobící na mnoha rŢzných druzích hmyzu. Nejen ǵe mají ǵiroké spektrum hostitelŢ, ale hmyz napadá jak larvy, tak i dospĺce. Výtrusy jsou miniaturní, mĺŚicí jen nĺkolik mikrometrŢ. Hyfy a spory nejsou pigmentované (hyalinní), ale objevují se v kultuŚe jako bílé kolonie.



Obr. 3 Zobrazení napadeného hmyzu houbou *Beauveria bassiana*

(http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm&ei=0mfLSrqOII6C_Abl95SjBQ&sa=X&oi=translate&resnum=3&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dusing%2Bof%2Bbeauveria%2Bbassiana%26hl%3Dcs%26lr%3D, 2010)

U *Beauveria bassiana* nebyly doposud zjiǵtĺny ǵádné neǵádoucí úļinky na lidské zdraví. Kromĺtoho laboratorní studie ukazují, ǵe úļinná látka není toxická nebo infekļní

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ımaci nebo vdechnutí. Houba roste pouze při teplotách nižších než teplota lidského těla, takže se neočekává ani žádná infekce. Doposud nebyly prokázány ani žádné škodlivé účinky na životní prostředí, ovšem i nadále probíhají další testy (Li et al., 2001).

2.3.3. Taxonomické zařazení *Beauveria bassiana*

Tanada a Kaya (1993) roztřídili entomopatogenní houby do 8 tříd, 13 druhů a 57 rodů. Mnoho z těchto rodů jsou velmi specializované a nejsou v souladu s všeobecným životním cyklem entomopatogeních hub. Existuje pět hlavních skupin hub: *Chytridiomycetes*, *Oomycetes* (neboli nepravé houby), *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, a *Basidiomycota*. Dvěma z těchto skupin *Zygomycota* a *Ascomycota* obsahují společné hmyzí patogeny, které jsou využívaní v biologické ochraně (Tanada et al., 1993).

Zařazení *Beauveria Bassiana*:

	latinský název	český název
soustava	*Vitae*	živé organismy
doména	*Eukaryota* (Whittaker & Margulis,1978)	jaderní
	Opisthokonta (Cavalier-Smith, 1987)	
nadříše	*Unikonta*	
říše	*Fungi* (Whittaker, 1959)	houby
oddělení	*Ascomycota*	houby vřeckovýtrusné
podkmen	*Pezizomycotina* (O.E. Eriks & Winka 1997)	
třída	*Sordariomycetes*	
podtřída	*Hypocreomycetidae*	
řád	*Hypocreales*	masenkotvaré
čeleď	*Cordycipitaceae*	paličkovité
rod	*Beauveria*	
druh	***Beauveria bassiana*** (Balsamo.-Criv.) Vuillemin 1912	

(www.biolib.cz/cz/taxonposition/id340556/, online 2009)

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ria bassiana

Biopreparáty na bázi *Beauveria bassiana* zpravidla nejsou toxické pro užitečný hmyz, ale přesto je třeba se vyhnout oblastem, kde se vyskytují včely. Biopreparáty *Beauveria* by se neměly používat v okolí vody, protože jsou potenciálně toxické pro ryby (Groden, 1999).

Beauveria bassiana je používána k biologické kontrole například proti termitům, molicím a různým druhům brouků. Lze jí použít také jako biologickou kontrolu proti moskytům, které přenášejí malárii (Donald et al., 2005). V zahraničí je registrována řada biopreparátů na bázi konidií nebo blastospor *Beauveria bassiana* a využívaných v praktické biologické ochraně rychlené zeleniny a okrasných květin. Biopreparáty na bázi *Beauveria bassiana* jsou využívány i v ochraně lesních porostů proti některým druhům škůdců, včetně lýkožrouta smrkového (Landa et al., 2007). Všechny preparáty na bázi *Beauveria bassiana* jsou nanášeny přímo na list.

Příklady některých registrovaných preparátů na principu *Beauveria bassiana*:

BotaniGard ES ®, BotaniGard ®, Naturalis TNO, Mycotrol ®, tyto preparáty jsou registrovány zejména proti molicím, můrám, třásněnkám, červcům, křísům, nosatcům, a hmyzu škodícím na zemědělských plodinách a lesních porostech.

V Evropě byla *Beauveria bassiana* prvotně použita jako entomopatogenní houba k potlačení populace škůdců na kukuřici (Hafez et al., 1994).

Ve spojených státech byly prováděny testy proti škůdci mandelince bramborové *(Leptinotarsa decemlineata* (Say). Po ošetření pole přípravkem *Beauveria bassiana* byl výnos hlíz vhodných k prodeji mnohem vyšší než v předchozích letech (Anderson et al., 1988).

Dalším příkladem je použití *Beauveria bassiana* jako biologické kontroly proti škůdcům na zelenině, zejména proti druhu *Orius insidiosus* (Say), třásněnce škodící na paprikách. Potenciální účinnost této houby je doposud diskutována. Třásněnky ovlivnily výnos a kvalitu pro pěstitele zeleniny (Quaintance, 1998).

Jiný příklad lze uvést použití *Beauveria bassiana* jako ochrany před škůdci přísobících na kukuřici, a to zejména proti nosatci (*Sitophilus zeamais*) (Adane et al., 1999).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

na nemusí být vǵdy pomocníkem v biologické kontrole. V Ļínŋ zpŢsobuje velké ġkody na chovných populacích bource moruġového (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758), který je vyuġíván pro získávání hedvábí. *Beauveria bassiana* tak zpŢsobuje významné ekonomické ztráty.

V Ļeské republice je entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* vyuġívána k ochranŋ v lesním hospodáŚství, zejména proti ġkŢdci lýkoġroutu smrkovém *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) (Landa et al., 2007).

Vyuġívání biopreparátŢ na bázi *Beauveria bassiana* proti *Ips typographus* je rozġíŚeno hlavnŋ v Nŋmecku, Ġvýcarsku a Rakousku. Na experimentální úrovni je tato houba zkouġena i v dalġích zemích (napŚ. USA, Austrálie, Finsko, Polsko). Nejļ astŋji je *Beauveria bassiana* aplikována formou vodní suspenze spor na povrch napadených stromŢ nebo stromových lapákŢ. Výsledky laboratorních studií a provozních aplikací dokazují, ġe v porovnání s vŋtġinou ostatních druhŢ entomopatogenních hub vykazuje *Beauveria bassiana* po aplikaci na dospŋlce *Ips typographus* nejen nejvyġġí virulenci, ale i zjevnŋ nejvŋtġí adaptaci na tohoto hostitele ve smyslu autodiseminace (samoġíŚení), tj. schopnosti patogena ġíŚit se prostŚednictvím pŚirozených mechanismŢ odráġejících populaļ ní chování hostitele (Doberski et al., 1980).

2.4. Molekulární markery

V roce 1985 Saiki se spolupracovníky publikovali metodu, pomocí níġ je moġné amplifikovat konkrétní úseky DNA. Tato metoda je zaloġena na polymerázové Śetŋzové reakci (PCR ï Polymerase Chain Reaction). Po objevu termostabilní polymerázy bylo moġné celý postup zautomatizovat. Objevily se nové pŚístroje tzv. termocyclery a sady chemikálií (kity), které postup zrychlily a zlevnily (Soliva et al., 1999).

2.4.1. Molekulární metody

Kvalitativní a kvantitativní informace o diversitŋ jsou základním aspektem mnoha oborŢ v biologii, jak v klasické, tak i aplikované jako je ekologie, evoluļ ní biologie, taxonomie, zemŋdŋlství i ġlechtŋní (Karp et al., 1997).

Molekulární analýzy odhalují nejen detailní vlastnosti DNA (nebo proteinŢ), ale také odliġné charaktery, které jsou specifické v poŚadí bází (Avise, 2004). Molekulární

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

ání rozdílnosti sekvencí DNA mezi jednotlivými druhy, ale také mezi jednotlivými jedinci téhoġ druhu. Díky molekulárním markerŢm lze urļit i nové druhy (Korzun, 2003).

Molekulární markery nacházejí aplikace mimo jiné i ve ġlechtĎní a semenáŚství z toho dŢvodu, ġe mnoho ekonomicky významných rostlinných druhŢ zahrnuje velký poļet odrŢd, z nichġ mnohé jsou blízce pŚíbuzné. V pŚípadĎ agronomicky cenĎných druhŢ mŢġe mít znaļný ekonomický význam moġnost rozliġení odrŢd. V mnoha zemích platí v rŢzné úpravĎ Ăġlechtitelská právañ a omezení pro povolení nové odrŢdy na trhu. Jedno z tĎchto omezení je jasná charakteristika, která mŢġe odliġit odrŢdu ode vġech ostatních povolených odrŢd (Nielsen, 1985; Horváth, 1993).

Tyto metody jsou vyuġívány napŚ. pro DNA fingerprinting, pŚi zjiġŠování genetické ļistoty osiva, ale i pro testování otcovství nebo sledování urļitých genŢ bĎhem ġlechtitelských programŢ (Cano, 1993). PŚi nových studiích je snahou získat co nejvíce informací a identifikovat geny nebo chromozomy (Avise et al., 2004).

DNA markery jsou aplikovatelné u vġech organismŢ, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA nĎkolik výhod. A to takové, ġe DNA mŢġeme získat nejenom ze ġivých, ale i z mrtvých tkání. Molekula DNA je dostateļnĎ stabilní, proto mŢġe být pŚi vhodných podmínkách zachována i po dobu nĎkolika miliónŢ let (Cano et al. 1993). Dalġí výhodou mŢġe být malé mnoġství DNA, jeġ je vĎtġinou k analýze zapotŚebí. DNA markery lze mj. pouġít i u velmi raných ontogenetických stádií, coġ znamená zefektivnĎní rychlosti práce pŚedevġím ve ġlechtitelské oblasti.

DŢleġitým pŚedpokladem pro pouġití DNA markerŢ je nezávislost na podmínkách prostŚedí. Odliġné úseky DNA jsou vystaveny rŢzným selekļním tlakŢm. VĎtġina sekvencí kódujících ġivotnĎ dŢleġité proteiny podléhá silnému selekļnímu tlaku, a proto nejsou variabilní a pro analýzy nejsou vĎtġinou pouġitelné. Na druhé stranĎ v nekódujících oblastech (introny a mezigenové regiony), u kterých lze pŚedpokládat selekļní neutralitu, a jejichġ míru polymorfismu mŢġe ovlivŔovat pouze genetický drift, se snadno hromadí mutace, a proto jsou nekódující sekvence variabilní (Bergmann, 1975).

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

- Techniky molekulárních markerů založené na restrikčním štěpení a hybridizaci
- Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR
- Techniky molekulárních markerů založené na různých kombinacích restrikčního štěpení, hybridizaci a amplifikaci

Genetické markery se musí vyznačovat dostatečnou genetickou a jí odpovídající fenotypovou variabilitou, vysokou expresivitou a penetrancí a rovněž vysokou heritabilitou, tj. nezávislostí na podmínkách prostředí (Čaček et al., 1983, Sozinov, 1985).

Molekulární markery jsou identifikovatelné sekvence DNA, které jsou umístěny na konkrétních místech na chromozomech. Markery mohou být umístěny v blízkosti genů nebo přímo v genech (Korzun, 2003).

Existují různé druhy molekulárních markerů, jako jsou RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorhic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) a SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Jejich použití se liší například technickými požadavky, časovou a finanční náročností, množstvím genetických markerů, které mohou být detekovány v celém genomu nebo v jeho určité části. Každý z nich má samozřejmě své výhody, ale i nevýhody (Korzun, 2003).

2.4.2. Využití molekulární markerů při studiu entomopatogenních hub

Studium populací přírodních kmenů vyžaduje nástroje pro spolehlivou identifikaci příslušných druhů. U entomopatogenních hub vědci používají morfologické znaky na celkové posouzení makro a mikroskopické struktury. Nedávné důkazy naznačují, že tyto metody jsou často nepřesné. Umístění jednotlivých rodů entomopatogenních hub v samostatných fylogenetických větvích je proto mnohem přesnější díky kombinaci morfologických a molekulárních markerů, která poskytuje významné informace pro ekologii těchto druhů hub (Meyling, 2008).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Elektroforéza by se dala charakterizovat jako soubor separaļních metod, které vyuġívají k dĺlení látek jejich odliġnou pohyblivost ve stejnosmĺrném elektrickém poli. Na principu rozdílných elektroforetických mobilit se pŚí ní dĺlí nabité molekuly (ionty). Dostupnost této metodologie vzápĺtí významnĺ zasáhla do studia fylogenetických, taxonomických, sociobiologických a populaļnĺ genetických otázek (May, 1992).

Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativnĺ nabité fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opaļnĺ nabité elektrodĺ ï anodĺ (Ġmarda et al., 2005). Elektroforetické separaļní techniky patŚí k nejdŢleġitĺjġím metodám biochemické analýzy (Andrews, 1993; Robyt et al., 1990).

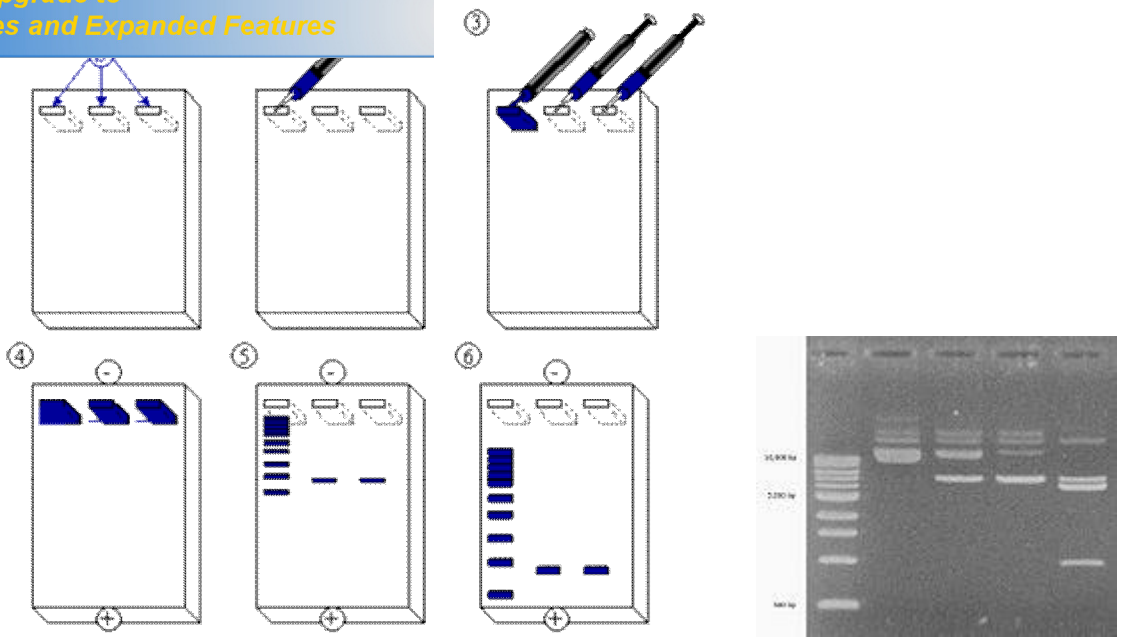
Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda pouġívaná k separaci DNA, RNA nebo bílkovinných molekul (Freeman et al., 2002). Sloġení a poréznost gelu je volena s ohledem na specifickou váhu a sloġení analyzovaného vzorku. Pouġité gely, nejļastĺji akrylamidové nebo agarózové, se mohou liġit v koncentracích podle toho, jaký typ molekul chceme oddĺlit (Robyt et al., 1990).

Gelová elektroforéza DNA se obvykle provádí pro analytické úļely, ļasto po amplifikaci DNA pomocí PCR. Je moġné ji pouġít jako metodu separativní napŚ. pŚed hmotnostní spektrometrií, klonováním, sekvenováním DNA, nebo metodou Southern Blot (Freeman et al., 2002).

Po probĺhnutí elektroforézy je tŚeba identifikovat polohu separovaných molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejļastĺji je pouġíván ethidium bromid, který se vmezeŚuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváŚí s ní komplex. Namísto ethidium bromidu mŢġe být pro barvení pouġita skupina fluorescenļních barviv - SYBR (Ġmarda et al., 2005). Pokud jsou vzorky oznaļené fluorescenļnĺ, lze je na gelu vyfotografovat pod ultrafialovým svĺtlem. Jsou-li separované molekuly oznaļeny radioaktivní znaļkou, bývají zaznamenány v podobĺ autoradiogramu (Freeman et al., 2002).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



Obr.4 Princip gelové elektroforézy a ukázka vizualizace DNA fragmentŢ pomocí gelové elektroforézy (http://cs.wikipedia.org/wiki/Elektrofor%C3%A9za,2010)

2.4.4. Polymerázová ŚetŊzová reakce (PCR)

Za objev principu PCR byla v roce 1993 Kary B. Mullisovi udŊlena Nobelova cena za chemii (Clark, 2005). Tato metoda se v posledních letech stala velmi populárním prostŚedkem pro identifikaci rostlinných a ǵivoļ iǵných druhŢ (Korzun, 2003).

PCR je metoda rychlého a snadného zmnoǵení úseku DNA zaloǵena na principu replikace nukleových kyselin (Bartlett et al., 2003). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových ŚetŊzcŢ vybraných úsekŢ dvouŚetŊzcové DNA ve smŊru 5´->3´ prostŚednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen pŚipojením dvou primerŢ, které se váǵou na protilehlé ŚetŊzce DNA tak, ǵe jejich 3´- konce smŊŚují proti sobŊ. Po pŚidání DNA-polymerázy a nukleotidŢ pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových ŚetŊzcích protismŊrnŊ. K syntéze DNA se pouǵívají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganizmŢ, napŚ. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, pŚi nichǵ DNA denaturuje. To umoǵŔuje, aby syntéza DNA probíhala opakovanŊ formou cyklŢ. PCR je proces pŚi nŊmǵ se v závislosti na teplotŊ reakļní smŊsi pravidelnŊ stŚídají tŚi kroky (Ġmarda et al., 2005).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Základní kroky PCR

1. denaturace dvouŚetŇzcových molekul DNA
2. pŚipojení primerŢ k oddŇeným ŚetŇzcŢm DNA
3. syntéza nových ŚetŇzcŢ DNA prostŚednictvím DNA-polymerázy

(Sharkey et al., 1994)

Reakce se provádŇjí v zaŚízení nazývaném termocycler, v nŇmž se teplota mŇní automaticky v naprogramovaných ļasových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálnŇ vytváŚí až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly (Ġmarda et al., 2005).

Mnoho moderních termocyclerŢ využívá PeltierŢv efekt, který umožŔuje i vytápŇní a chlazení bloku PCR jednoduše tím, že obrátí smŇr toku elektrického proudu (Rychlik et al., 1990).

Jelikož výsledek PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji oznaļit za zpŢsob klonování DNA. PŚesnost a úspŇšnost PCR pŚi amplifikaci urļitého genu nebo ļásti sekvence genomové DNA je závislá na peļlivém návrhu obou primerŢ, pŚi nŇmž je tŚeba pŚihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu.

Zásady navrhování primerŢ

Délka by mŇla být zpravidla 18-25 nukleotidŢ; obsah G+C 40% až 60%, rovnomŇrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry; teplota T_m primeru alespoŔ 50 °C, u obou primerŢ by mŇla být podobná teplota T_m; specifiļnost primerŢ ï na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa; absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbŇ duplexŢ; absence vnitŚních sekundárních struktur (vlásenek); zaŚazení 1 až 2 zbytkŢ G nebo C v sekvenci na 3´ koncích primerŢ pro zajištŇní pŚesné vazby na templát.

PŚesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých krokŢ je však tŚeba optimalizovat. Pro získání požadovaného produktu, jeho specifiļnost a výtŇžku je dŢležitá koncentrace jednotlivých složek reakļní smŇsi (Ġmarda et al., 2005).

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

DNA sekvence, které mají být zmnoženy; dva primery, které jsou komplementární k 3' konci každého řetězce; *Taq* polymeráza nebo jiná DNA polymeráza s optimální teplotou nad 70 °C; 2´-deoxyribonukleotid-5´-trifosfáty (dNTPs); reakční roztok, který poskytuje vhodné chemické prostředí pro optimální činnost a stabilitu DNA polymerázy; jako kofaktor se nejčastěji používají hořečnaté ionty Mg^{2+}, nebo Mn^{2+} (Pavlov et al., 2004).

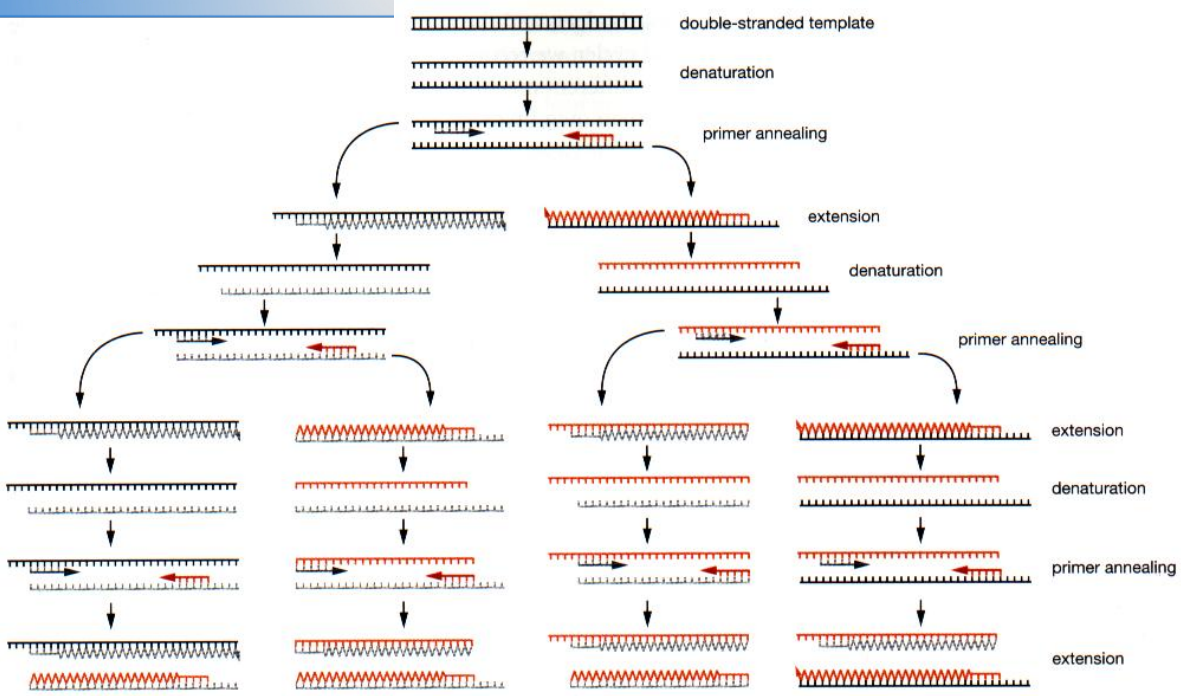
Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů PCR. Pro PCR je důležitá úplná počáteční denaturace templátu a obvykle k tomuto účelu postačuje zahřátí směsi na 94-97°C po dobu 2-5 min. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nespecifické vazbě primerů („self-priming") a falešným výsledkům. Protože *Taq* DNA-polymeráza má při 95 °C poločas stability 40 min, volí se pro následnou denaturaci amplikonů během reakce doba pouze 15-45 s. Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m produktu (Innis et al., 1999).

Pro PCR jsou často používány jako zdroj DNA různé biologické materiály, např. hrubé extrakty z krve, tělní tekutiny, kultury mikroorganismů, buňky z tkáňových kultur, atd. U těchto materiálů by měla být věnována pozornost možným nečistotám, které mohou inhibovat *Taq* DNA-polymerázu. Pro PCR je třeba pouze malé množství templátové DNA, proto mohou být tyto nečistoty ve většině případů odstraněny dostatečným naředěním vzorku.

Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délky o velikosti obvykle desítky až tisíce bp analogické restrikčním fragmentům, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (Čmarda et al., 2005).

Tato metoda se využívá nejenom k vědeckým potřebám, ale například i ke kontrole potravin a pro zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek (Bartlett et al., 2003).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



Obr. 5 Princip PCR

(http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/01jeklotz/methods.html, 2010)

2.4.5. Sekvenování DNA

Na konci sedmdesátých let minulého století byly objeveny rychlé a jednoduché metody pro urļení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Je vyvinuto nŊkolik technik. NejpouģívanŊjģí z nich jsou zaloģeny na DNA-polymeráze, která syntetizuje ļásteļné kopie sekvenovaného fragmentu. Princip tŊchto technik spoļívá v produkci sady ŚetŊzcŢ DNA *in vitro* za podmínek, které zajiģŠují, ģe novŊ vznikající ŚetŊzce DNA budou ukonļeny po dosaģení jednoho konkrétního nukleotidu (A,T,C,G). Ve ļtyŚech nezávislých reakcích tak vzniknou fragmenty DNA, které se liģí svojí délkou o jediný nukleotid, pŚiļemģ z typu pouģité reakce je známo, kterým nukleotidem fragment konļí. Tyto novŊ nasyntetizované fragmenty jsou elektroforeticky rozdŊleny podle velikosti sekvence pŢvodní DNA (Osborne et al., 2005).

Dnes je známa kompletní nukleotidová sekvence desítek tisíc genŢ, nŊkolika bakteriálních genomŢ, nŊkolika genomŢ rostlin a ģivoļichŢ. Mnoģství sekvencí DNA uloģených v poļítaļových databázích je uģ nyní tak ohromné, ģe pro práci s tŊmito údaji jsou potŚebné speciální programy (Innis et al., 1990)

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

e pouģívána k odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinŢ a umoģĎuje tak detailnŃ stanovit charakter mutací, které se mohou projevit vlivem genetických chorob (Alberts et al., 2004).

K sekvenování se pouģívají dvŃ principiálnŃ odliģné metody: chemická metoda (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování) a enzymová metoda (Sangerovo sekvenování).

Chemická metoda sekvenování - Maxamovo-Gilbertovo sekvenování

Podstatou chemické metody sekvenování je specifické rozģtŃpení molekuly DNA chemickými ļinidly v místech, kde je lokalizována báze urļitého typu. Výchozím materiálem je soubor identických fragmentŢ jednoŚetŃzcové DNA oznaļených na jednom konci radioaktivní znaļkou. KaģdÝ se ļtyŚ typŢ bází v molekule DNA lze urļitým zpŢsobem modifikovat tak, aby bylo v tomto místŃ dosáhnuto pŚeruģení ŚetŃzce DNA. Podmínky reakce se zvolí takové, aby byla poģkozena v prŢmŃru pouze jedna báze v ŚetŃzci DNA, které jsou velice citlivé ke ģtŃpení. Reakce je provádŃna ve velkém souboru molekul, proto je výsledkem ģtŃpení soubor fragmentŢ DNA vģech rŢzných délek, které odpovídají vzdálenosti bází pŚíslušného typu od znaļeného konce výchozí molekuly DNA (Ģmarda et al., 2005).

Enzymová metoda sekvenování - Sangerovo sekvenování

Tato metoda byla objevena v roce 1975 britským biochemikem a dvojnásobným nositelem Nobelovy ceny Frederickem Sangerem. Sangerovo sekvenování se stalo nejpouģívanŃjģí molekulární technikou umoģĎující analýzu genŢ na úrovni nukleotidŢ (Canfield, 1999).

PŚi sekvenování enzymovou metodou je DNA, jejíģ sekvence má být stanovena, pouģita jako matrice pro syntézu komplementárních ŚetŃzcŢ rŢzné délky prostŚednictvím DNA-polymerázy (Ģmarda et al., 2005).

Enzymová metoda sekvenování DNA je zaloģena na pouģití dideoxyribonukleosid trifosfátŢ ï derivátŢ normálních deoxyribonukleosidtrifosfátŢ postrádajících 3´-OH skupinu. DNA je syntetizována *in vitro* ve smŃsi, která obsahuje: jednoŚetŃzcovou molekulu DNA, která má být sekvenována; enzym DNA-polymerázu; krátký primer DNA, který umoģĎuje DNA-polymeráze zaļít replikaci; ļtyŚi deoxyribonuleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

kce pŚidán dideoxyribonukleosidový analog jednoho z nukleotidŢ, je tento analog zaļlenŊn do rostoucího ŚetŊzce DNA. V tomto pŚípadŊ vġak ŚetŊzci chybí 3´-OH skupina, coġ blokuje pŚidání dalġího nukleotidu a syntéza tohoto vlákna je ukonļena (Alberts et al., 2007). ddNTP jsou DNA-polymerázou inkorporovány do rostoucího ŚetŊzce DNA podle pravidel o párování bází (Ġmarda et al., 2005).

Reakce jsou provádŊny ve ļtyŚech oddŊlených vzorcích. Kaġdá reakce je urļena ke stanovení relativní pozice specifické báze na konci analyzovaného ŚetŊzce.

Reakļní smŊs obsahuje

Purifikovanou molekulu DNA, jejíġ sekvence má být stanovena; primer, pŚipojující se k ļásti molekuly DNA nebo k místu pŚipojení na vektoru v pŚípadŊ, ġe se jedná o klonovanou DNA, smŊs obsahující 4 normální nukleotidy; jeden ze ļtyŚ ddNTP; DNA-polymerázu (Ġmarda et al., 2005).

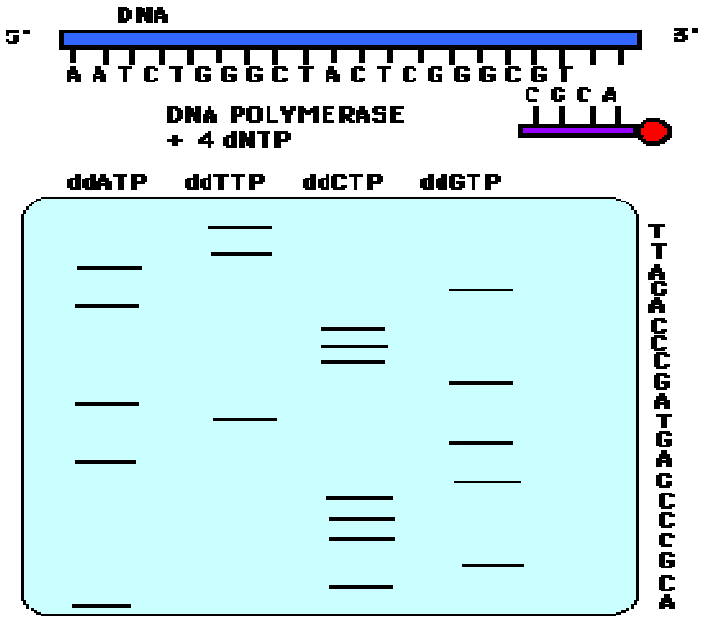
Jako primery lze pouġít krátké restrikļní fragmenty nebo synteticky pŚipravené oligonukleotidy o délce zhruba 18 bází. V pŚípadŊ sekvenování produktŢ PCR je moġné pouġít stejné primery, se kterými byl fragment DNA amplifikován. Pro umoġnŊní detekce novŊ syntetizovaných ŚetŊzcŢ je primer, ddNTP nebo jeden ze ļtyŚ dNTP radioaktivnŊ anebo neradioaktivnŊ oznaļen. Po probŊhnutí polymerizaļní reakce se vytvoŚené produkty denaturují a separují na polyakrylamidovém denaturujícím gelu podobnŊ jako pŚi chemické metodŊ.

Pro zkrácení procesu sekvenování bylo vyvinuto automatické sekvenování, které umoġŔuje stanovit sekvence mnohem rychleji neġ pŚi standardních postupech. Vyuġívá se zejména pŚi sekvenování z genomových knihoven. Automatické sekvenování má nŊkteré odliġnosti od enzymové metody, napŚ. syntéza DNA probíhá metodou asymetrické polymerázové ŚetŊzové reakce. K detekci reakļních produktŢ se pouġívají ļtyŚi rŢzné fluorescenļní znaļky, délka stanovené sekvence je obvykle mezi 500-1000 bázemi.

Automatické sekvenování vyuġívá dva odliġné pŚístupy, barevnŊ znaļené primery nebo barevnŊ znaļené terminátory. Detekce produktŢ sekvenaļních reakcí probíhá v prŢbŊhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na poļítaļ. Ten díky speciálnímu softwaru z poŚadí signálŢ v pŚísluġných drahách pŚímo vyhodnocuje sekvenci DNA. U nejnovŊjġích aparatur probíhá elektroforetická separace v kapilárách.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

at fragment delší než 1000 bází, využívají se v tomto případě dvě odlišné strategie, náhodné sekvenování nebo uspořádané sekvenování sousedních úseků. Po úpravě konce se fragmenty nahodile zaklonují do vhodného vektoru (Innis, 1999).



Obr.6 Princip sekvenování

(http://www.bio.davidson.edu/Courses/Bio111/seq.html, 2010)

2.4.6. Ribozomální RNA a její podjednotky

Ribosomální RNA je základní složkou ribozomu a tvoří asi 80% z celkové RNA v buňce. Je to druh nekódující ribonukleové kyseliny. Ribozom se skládá ze dvou hlavních částí: z ribonukleové kyseliny a z ribozomálních proteinů. Všechny organismy mají stavbu ribozomů podobnou. Ovšem jsou rozdíly mezi eukaryoty a prokaryoty (Schlötterer et al., 1994).

V prokaryotech je rRNA molekula tvořena z části DNA zvané ribozomální DNA (rDNA). Molekuly ribozomových RNA podobně jako molekuly mRNA vznikají transkripcí DNA-templátu. U eukaryot probíhá syntéza rRNA v jadérku a je katalyzována RNA-polymerázou I. Jadérko je vysoce specializovanou složkou jádra, která se výlučně zaměřuje na syntézu molekul rRNA a jejich sestavování do podoby ribozómů. Geny pro ribozomové RNA se nacházejí v tandemově uspořádaných řadách oddělených

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

blastmi. Transkripci těchto tandemových sestav genů pro rRNA lze pozorovat elektronovou mikroskopií. Transkripcí genů pro rRNA vznikají prekurzory, které jsou mnohem vyšší než molekuly RNA v ribozomech. Tyto prekurzory rRNA procházejí posttranskripčními úpravami za vzniku zralých molekul rRNA (Lewin, 2000).

Kromě posttranskripčního štěpení prekurzorů rRNA podléhá mnoho nukleotidů rRNA posttranskripčním metylacím. Metylace jsou pravděpodobně způsobem ochrany molekul rRNA před degradací ribonukleázami.

V genomech všech dosud studovaných organizmů byly nalezeny mnohonásobné kopie genů pro rRNA. Redundance rRNA genů není překvapivá, vezmeme-li v úvahu velký počet ribozomů přítomných v buňce. U *E.coli* je sedm genů rRNA (rrnA, rrnB, rrnC, rrnD, rrnE, rrnG, rrnH) ve těsných odlišných místech chromozomu (Stundsat et al., 2009). U Eukaryot jsou geny pro rRNA lokalizovány ve dvou mnohonásobně se opakujících transkripčních jednotkách (Darnel et al., 1990).

Základní rozdělení části ribozomu je vždy na malou a velkou podjednotku, které se po dokončení translace oddělují a znovu se sestavují při iniciaci translace. Každá podjednotka obsahuje velké složené molekuly RNA, na kterých se sestávají ribozomové proteiny. Velikost ribozomů se nejčastěji vyjadřuje se Svedbergových jednotkách (sedimentační koeficient). Je to veličina, která udává čas, za který proběhne v ultracentrifuze sedimentace ribozomu (Alberts et al., 2002).

Prokaryotické ribozomy se skládají ze dvou podjednotek se sedimentačním koeficientem 50S a 30S. Velká podjednotka obsahuje dvě molekuly: 23S rRNA a 5S rRNA, dále obsahuje 34 různých polypeptidů. Malá podjednotka má jednu molekulu s velikostí 16S rRNA a 81 polypeptidů.

Eukaryotické ribosomy mají také dvě podjednotky ovšem s velikostmi 60S a 40S. Velká podjednotka má tři rRNA (28S, 5,8S a 5S) a 49 polypeptidů. Mála podjednotka má také jedinou molekulu a to 18S rRNA a 33 polypeptidů (Lewin, 2000).

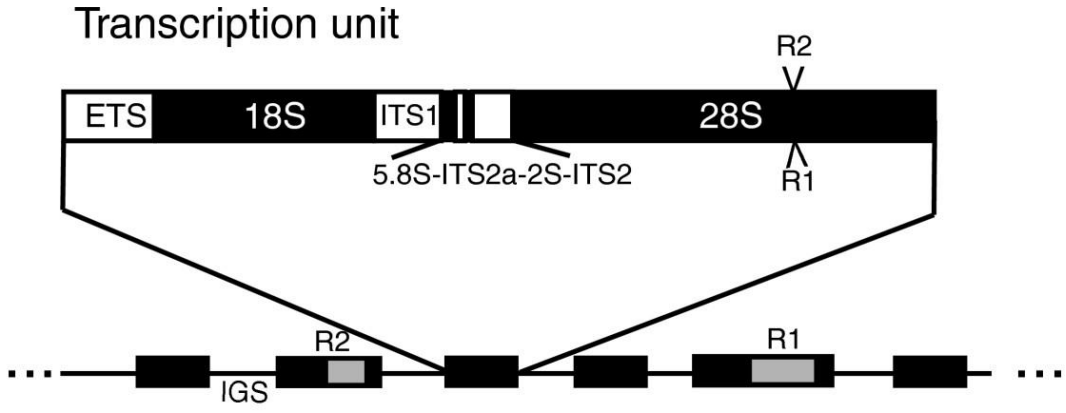
Masayasu Nomáda se svými kolegy dokázal rozložit ribozomovou podjednotku *E.coli* 30S na jednotlivé makromolekuly a pak z těchto složek rekonstruovat funkční podjednotky 30S. Tímto způsobem prostudoval funkci jednotlivých molekul rRNA a ribozomových proteinů (Stundsat et al., 2009).

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

funkční nost ribozomu a hraje důležitou roli v syntéze proteinů. Jako nekódující rRNA není sama o sobě přeložena do proteinu, ale poskytuje mechanismus pro dekódování messenger RNA na aminokyseliny (Smit et al., 2007). Z toho důvodu je ribozomální RNA v podstatě enzym, kterému se říká ribozym. Je to z toho důvodu, že ribozomální RNA tvoří prostorové struktury podobné aktivním místům proteinů mající funkci jako enzymy. Je díky tomu schopná správně navázat tRNA a také zajišťuje vznik peptidových vazeb mezi aminokyselinami vznikajícího řetězce (Alberts et al., 2004).

Jaderné rRNA geny eukaryot jsou umístěny v opakujících se úsecích. Úseky jsou spojeny geny pro malou podjednotku (SSU – z angl. small subunit) a velkou jadernou podjednotkou (LSU z angl. large subunit) (Gerbi, 1985; Takamasu, 1998). Tyto geny ukazují malé rozdíly mezi sekvencemi u velmi podobných druhů, metoda je velmi úspěšná při stanovování fylogenetických studiích zdánlivě příbuzných druhů (Taylor et al., 1993).

Studium sekundárních struktur rRNA ukazují, že eukaryotická velká podjednotka je složená z pevných částí na rozdíl od velké podjednotky u prokaryot, které jsou odlišné (Hillis et al., 1987). Právě DNA sekvence odlišných domén velké jaderné podjednotky rDNA jsou vhodné pro určování fylogeneticky relativně podobných organismů (Schlötterer et al., 1994).



Obr. 7 Grafické zobrazení rRNA
(www.absoluteastronomy.com/topics/Ribosomal_DNA, 2010)

Srovnání sekvencí malých podjednotek nebo jejích genů mělo doslova revoluční význam pro rozvoj v molekulární a buněčné evoluci (Sogin et al., 1989; Taylor et al., 2000). Studie nukleotidových sekvencí genů ribozomální RNA poskytuje významné

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

n rozsahu šady taxonomických stupňů (Jorgens et al., 1989). Tyto molekulární sekvence obsahují dostatečné evoluční informace umožňující posouzení fylogeneticky příbuzných organismů (Sogin et al., 1987).

Jaderné podjednotky rRNA sekvence se vyvíjejí poměrně pomalu a mohou být proto použity pro studium relativně vzdálených organismů, zatímco geny mitochondriální rRNA se vyvíjejí mnohem rychleji a mohou být použity pouze na úrovni genomových rodin. Potřebné sekvence rRNA genů mohou být získány prvotně z izolace a sekvenování jednotlivých genů. Přímým sekvenováním rRNA mohou být obvykle rychle získána sekvenční data. Tato metoda vyžaduje relativně velké množství RNA. Je ovšem náchylná na chyby (Lane et al. 1985).

Důležitým krokem při zjišťování příbuznosti je konstrukce genomické knihovny a identifikace rekombinantních klonů obsahující kódující úseky. Klonování se neobejde bez metody PCR, která napomáhá k velmi rychlé amplifikaci rRNA kódujících sekvencí pro sekvenační analýzu (Medlin, 1988).

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

3. Cíl

Cílem této diplomové práce bylo provedení PCR analýz 28S rRNA, optimalizace metody sekvenování, a zhodnocení její vhodnosti pro zavedení jako rutinního hodnocení molekulárních dat entomopatogeních hub. Analýza získaných sekvencí a vyhodnocení sekvenačního polymorfismu. Využití těchto dat pro hodnocení genetické variability kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*, které byly izolovány ze vzorků odebraných v Národním parku Šumava, a dále ze souboru ostatních kmenů.

Vyvstala otázka, zda je možné na základě získaných dat determinovat tzv. „lokální kmeny", respektive zda je populace sebraná v Národním parku Šumava homo- nebo heterogenní a následně jaké jsou důsledky zpětné aplikace biologického preparátu na základě *Beauveria bassiana*. Je-li možné použití komerčního preparátu, který je již prodáván, nebo je-li třeba použití preparátu na základě kmenů *Beauveria bassiana* odebraných na lokalitě Národní park Šumava, kdy je znám původ kmene, který je použit, a tím zachovat přirozenou diversitu v lokalitě.

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

4.1. Pouġitý materiál

Entomopatogenní houby pouġité pro fylogenetickou analýzu byly získány ze sbírky entomopatogenních hub oddĎlení RostlinolékaŚství, Katedry rostlinné výroby a agroekologie, ZemĎdĎlské fakulty Jihoļeské univerzity v Ļeských BudĎjovicích. Tato sbírka je uloġena ve formĎalginátových pelet. Jako materiál byly pouġity entomopatogenní houby *Beauveria bassiana*, *Beauveria brogniartii* a *Isaria fumosorosea*. Byly pouġity dva typy tĎchto hub: ġumavské a soubor ostatní kmenŢ. Ġumavské kmeny byly odebrány z 1. zóny Národního parku Ġumava. Ostatní kmeny byly ze sbírek pocházejících z oblastí: Krkonoġský národní park, PĎnļín (Morava), Ļína, Francie, Indie, Kolumbie, Polsko, Rumunsko, Slovenská republika, Ġvédsko, Spojené státy americké a Rusko.

PŚesný popis a oznaļení vzorkŢ je uveden v následující tabulce.

Tab. 1: **Ġumavské kmeny**

LAB. OZNAĻENÍ	KMEN	Pš VOD/LOKALITA
Bba I 101	Bba I 101	Prameny Vltavy
Bba 1	NP0001	Ļerná hora
Bba 12	NP0002	Ļerná hora
Bba 23	NP0003	Ļerná hora
Bba 34	NP0008	Jelení skok (Oblík)
Bba 35	NP0007	Zlatý stoleļek
Bba 36	NP0005	Jelení cesta ï U Mlýna
Bba 38	NP0009	BŚezová cesta
Bba 39	NP0010	Poledník
Bba 40	NP0100	Ļerná hora
Bba 41	NP0101	Ļerná hora
Bba 42	NP0102	Ļerná hora
Bba 43	NP0103	Ļerná hora
Bba 44	NP0104	Ļerná hora
Bba 45	NP0105	Ļerná hora
Bba 46	NP0106	Ļerná hora
Bba 50	NP0004A	Styková lesní cesta
Bba 51	NP0004B	Styková lesní cesta
Bba 52	NP0006	Borová Lada ï Silniļní slaŠ
Bba 53	NP0020	Staré dráty
Bba 54	NP0022	Zlatý stoleļek
Bba 55	NP0026	Vltavský luh
Bba 56	NP0027	Rulandský potok

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

		Smrļina
Bba 58	NP0029	Pod Studenou horou
Bba 59	NP0030	Studená horizont
Bba 60	NP0031	Zlatý stoleļek
Bba 63	NP0053	Hraniļní chodník, StŚelecký prŢsmyk
Bba 66	NP0083	Prameny Vltavy
Bba 67	NP0084	OVO ï 8 ï 20
Bba 68	NP0085	Zámecký les (1 C5)
Bba 69	NP0086	Skládka Ģákova cesta
Bba 70	NP0091	OLE ï 07, 65 A 04
Bbr NP S	NP0155 *Beauveria brongniartii*	Stoģeļek
IFR NP S	NP0056 *Isaria fumosorosea*	V kotli

Tab. 2.: **Izoláty z lokality Ļerná Hora, kde byl aplikován kmen Bba I 101**

Bba 47	A-Bba I 101-001	Ļerná hora
Bba 48	A-Bba I 101-002	Ļerná hora
Bba 49	A-Bba I 101-003	Ļerná hora

Tab. 3: **Soubor ostatních kmenŢ**

LAB. OZNAĻENÍ	KMEN	Pš VOD/LOKALITA
PREFERAL	PFR 97 Florida	Biopreparát PREFERAL
Bba M Pk	Pk	ĻR - PĐhļín (Morava)
Bbr M_ m	Pm	ĻR - PĐhļín (Morava)
Bba KR 6	KR 0006	ĻR ï KRNAP, PĐnkavļí vrch
Bba KR 9	KR 0009	ĻR ï KRNAP, PĐnkavļí vrch
Bba KR 14	KR 0014	ĻR ï KRNAP, Na Kouli
Bba KR 16	KR 0016	ĻR ï KRNAP, Ļervená hora
Bab KR 19	KR 0019	ĻR ï KRNAP, Na Kouli
Bba Pol	A24	Polsko
Bba USA	01	Spojené státy americké, FL
Bba Rum	A32	Rumunsko
Bbr Col	A133	Kolumbie
Bba Fr	A135	Francie
Bba Sk08	T08	Slovensko - Tatry
Bbr SSSR	A131	Rusko
Bbr Sve	A36	Ġvédsko
Bbr Sk01	T01A	Slovensko - Tatry
Bba Cina	A74	Ļína
Bba Indie	A52	Indie

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

rkŢ

PŚijaté vzorky byly kultivovány na pevném médiu na Petriho miskách. Pouģité médium bylo PDA (Potato Dextrose Agar). Jeho sloģení je: bramborová infuse 200g/l, dextrosa 20g/l, agar 15g/l. Koneļné pH pŚi 20 °C je 5,6. PŚíprava: pŚidat 39g PDA do 1000ml destilované vody. Sterilujeme v autoklávu pŚi 121 °C po dobu 15 minut.

Vzorky pŚepasáģujeme na médium pomocí oļkovací kliļky a vģdy musíme bezpodmíneļnŊ dodrģet naprosto sterilní prostŚedí a dávat pozor na to, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorkŢ jinými kmeny anebo jinými cizími mikroorganismy. Pouģíváme buŅ jednorázové sterilní ļi kovové kliļky, které je nutné po kaģdém vzorku oģehnout. Práce se provádí ve Flowboxu VBH Compact (STERIL).

Takto rozpasáģované vzorky vloģíme do termostatu a necháme 14 dní kultivovat pŚi 25°C. Po uplynulé dobŊ narostlé mycelium pŚevedeme do mikrocentrifugaļních zkumavek v mnoģství potŚebném pro izolaci. Mikrozkumavky ŚádnŊ popíģeme a uloģíme do mrazicího boxu.

4.3. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena dvŊma zpŢsoby: pomocí CTAB (Williams et al. 1992) a pomocí sady od firmy QIAGEN. Dva zpŢsoby izolace byly zvoleny z dŢvodu porovnání metod. Bylo tŚeba izolovat co nejvŊtģí mnoģství DNA.

4.3.1. Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB dle Williamse ï modifikováno pro houby

- pŚevést 50-200 mg mycelia do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugaļních zkumavek, zhomogenizovat pomocí homogenizaļní tyļinky
- pŚidat 500 εl extrakļního pufru (2% CTAB + ß-merkaptoethanol), tkáŔ zhomogenizovat a promíchat s pufrem
- nechat 45-60 min inkubovat pŚi 65 °C ve vodní lázni, bŊhem inkubace jednou lehce promíchat
- centrifugovat na 14 000 rpm (maximum) 10 minut
- pŚevést supernatant do nových mikrocentrifugaļních zkumavek
- pŚidat 500 εl chloroformu:IAA (24:1) a 10 min nechat protŚepávat

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

x

- pŚepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugaļních zkumavek
- pŚidat 1/5 (cca 100 εl) 5% CTAB a promíchat
- pŚidat 500 εl chloroformu:IAA (24:1) a 10 minut protŚepávat
- centrifugovat 5 min na max
- pŚepipetovat vodnou fázi do nových mikrocentrifugaļních zkumavek
- pŚidat 2/3 izopropanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20 ^{o}C pŚes noc
- centrifugovat 5 minut na max pŚi 4 ^{o}C
- odstranit supernatant
- pŚidat 300 εl dH_2O a nechat 30-60 minut rozpouġtĮt na tŚepaļce pŚi 37 ^{o}C
- pŚidat 2 objemy (600 εl) 100% studeného ethanolu, 2-3x promíchat
- nechat v -20 ^{o}C 12 hod
- centrifugovat 10 minut na max pŚi 4 ^{o}C
- odstranit supernatant
- pŚidat 1000 εl 70-80% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na max
- odstranit supernatant
- pŚidat 1000 εl 70-80% studeného etanolu a promíchat
- centrifugovat 2 min na max
- vysuġit ve vakuové centrifuze cca 20 min
- pŚidat 100-200 εl vody a cca 40 minut nechat rozpouġtĮt pŚi 37 ^{o}C
- skladovat v -20 ^{o}C

4.3.2. Izolace DNA pomocí komerļního kitu - DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

- odváġit 100 mg vzorku
- zhomogenizovat pomocí homogenizaļní tyļinky
- pŚidat 400 ml AP1 + 4 εl RNasa A a dŢkladnĮ zvortexovat
- inkubovat 10 min pŚi 65 ^{o}C, 2-3x promíchat pŚevrácením

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

hat

- inkubovat 5 minut na ledu
- centrifugovat 5 min na max (14 000 rpm)
- pŚepipetovat lyzát na QIAShedder Mini Spin Column v 2 ml Collection Tubes ï centrifugovat 2 min na max
- pŚenést supernatant do nové mikrocentrifugaļní zkumavky o objemu 1,5 ml, cca 450 εl
- pŚidat 1,5x objemu (cca 675 εl) AP3/E a pipetováním promíchat
- pŚidat 650 εl mixu do DNeasy Mini Spin Column v 2 ml Collection Tube
- centrifugovat 1 min Ó8 000 rpm, odstranit supernatant a filtr vloġit zpĦt
- opakovat pŚedchozí krok se zbytkem mixu ï Collection Tube odstranit
- vloġit filtr do nové Collection Tube, pŚidat 500 εl AW, centrifugovat 1 min Ó8 000 rpm, odstranit supernatant a filtr vloġit zpĦt
- pŚidat 500 εl AW, centrifugovat 2 min na max, odstranit Collection Tube
- vloġit filtr do nové 1,5 ml mikrocentrifugaļní zkumavky, pŚímo na membránu pŚidat 100 ml AE

4.4. MĦŚení koncentrace DNA

U izolované DNA je potŚeba zmĦŚit koncentraci. V naġem pŚípadĦ se provádĦlo pomocí Fluorimetru od firmy INVITROGEN. Tato firma dodává také pouġitý kit Quant-iT™ Assays i s mikrozkumavkami a roztoky. Tento pŚístroj pracuje na principu prŢchodu paprskŢ vzorkem a zachycuje prŢchozí svĦtlo. Na základĦ standard obsaġených v kitu vypoļítá koncentraci.

PŚíprava vzorkŢ:

- udĦlat mix ze 199 x n εl Quant-iT™ Buffer a 1 x n εl Quant-iT™ Reagent (kdy n je poļet stanovovaných vzorkŢ), reagent je tŚeba uchovávat mimo svĦtlo
- rozpipetovat z mixu 197 εl do kaġdé mikrozkumavky a 190 εl do mikrozkumavek pro standardy
- pŚidat k mixu 3 εl stanovované DNA, a 10 εl standardu 1 a 2
- zvortexovat kaġdou mikrozkumavku 2-3 vteŚiny

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

kojové teplotě)

- vloģit do pŚístroje nejprve standard 1, poté standard 2 a pak vkládat jednotlivé vzorky
- pro pŚesné stanovení je nutný pŚepoļet

4.5. PCR reakce

Celkové mnoģství jedné reakce je 25 ęl.

- sloģení:
  - 12,5 ęl 2x PPP Master Mix
  - 10,5 ęl PCR H_2O
  - 0,5 ęl primeru NL1
  - 0,5 ęl primeru NL4
  - 1 ęl DNA
- cyklus:

	počáteční denaturace	94 °C	5 min
	▪ denaturace	94 °C	1 min
25x	▪ annealing	50 °C	1 min
	▪ elongace	72 °C	1min 15s
	finální elongace	72 °C	5 min
	uchování	4 °C	∞

- pouģité primery
  - NL1: 5´- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG - 3´
  - NL4: 5´- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G - 3´

Reakce probíhala v termocycleru XP cycler od firmy BIOER.

Sloģení Master Mixu dodávaného od firmy Top-Bio s.r.o.: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,02% Tween 20, 5 mM $MgCl_2$, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

osového gelu a elektroforéza

Příprava 2% agarosového gelu o objemu 200 ml

- navážit 4 g agarosy
- přidat 200 ml 1x TBE a promíchat
- rozvařit roztok agarosy a TBE v mikrovlnné troubě tak, aby nebyla zřetelná žádná vlákna, přidat 4 µl ethidium bromidu
- zchladit a nalít rozvařenou agarosu do připravené vany s hřebínkem, který vytvoří oddělené jamky, nalitá agarosa nesmí obsahovat žádné vzduchové bubliny
- nechat agarosu úplně zatuhnout, vyjmout hřebínek
- napipetovat do jamek jednotlivé vzorky, obarvené pomocí LB
- vložit agarosový gel pomalu a opatrně do elektroforetické vany ve které je roztok 1x TBE
- připojit k napájecímu zařízení a napětí nastavit na 40V, cca po 10-ti minutách, zvýšit napětí na 70V
- doba průběhu elektroforézy trvá cca 3-4 hodiny
- vyjmout gel z pufru po uplynutí této doby a vyfotografovat pod UV světlem v zařízení upraveném pro tyto účely
- vyhodnotit foto speciálním softwarem

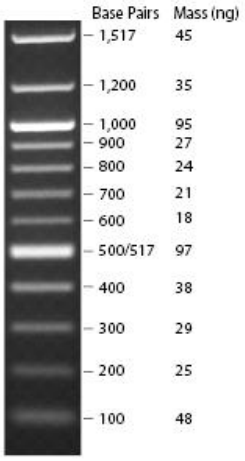
Při manipulace s agarosou je třeba dodržovat bezpečnostní opatření. Kvůli obsahu ethidium bromidu je nutné mít bezpečnostní rukavice a pracovní plášť. Při používání UV světla je třeba chránit zrak a fotografie pořizovat jen v přístroji k tomu určeném.

Složení 1x TBE: 54 g Tris, 27,5g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 4l destilované vody. Vše se promíchá dohromady.

Složení barvy LB: 0,025g bromfenolové modře (Bromphenol Blue), 4 ml glycerolu, doplnit dH_2O do 10 ml. Rozpipetovat do alikvót. Pro obarvení jednoho vzorku se používají 2µl barvy.

Složení 100 bp Ladderu (New England BioLabs inc.): 2,5% Ficoll-400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,0017% SDS, 0,015% bromophenol blue. Uchovávat při -20 ^{o}C .

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



podle kterých lze urļovat délku fragmentu vzorku, jsou uvedeny na obrázku. (http://www.neb.com/nebecomm/products/productN3231.asp).

4.7. Izolace fragmentŢ z gelu

PŚed provedením samotného sekvenování je tŚeba DNA izolovat z gelu. V naġem pŚípadĎ byl pouġit JETQUICK Gel Extraction Kit (Genomed GmbH).

Postup je následující:

- odmĎŚit 300 ε l L1 na kaġdých 100 mg vyŚíznutého prouġku z gelu
- inkubovat pŚi 50°C po dobu 15-ti minut (kaġdé 3 minuty zvortexovat)
  - pokud má agarosa vyġġí koncentraci neġ 2% nebo má více jak 300 mg, pŚidá se na kaġdých 100 mg gelu 600 ε l L1 a v tomto pŚípadĎ se inkubuje cca 20-30 minut
  - maximální velikost gelu je 400 mg
- napipetovat mix do JETQUICK column, maximální mnoġství je 600 ε l, nesmí se pŚeplnit
- centrifugovat 1 min na max (14 000 rpm)
- opakovat pŚedchozí dva kroky v pŚípadĎ vĎtġího mnoġství mixu
- napipetovat 500 ε l bufferu L2 pŚímo na filtr
- centrifugovat 1 min na max
- odstranit filtrát
- centrifugovat 1 min na max
- vloġit JETQUICK column do klasické 1,5 ml mikrozkumavky a pŚidat 50 ε l pŚedehŚátého (65-70°C) TE bufferu
- nechat stát 1 minutu
- centrifugovat 2 minuty na max
- uchovávat pŚi -20 °C

Takto izolované a upravené vzorky bylo tŚeba pŚipravit na sekvenování. Pro naġe úļely bylo sekvenování provedeno na pracoviġti BC AV, v. v. i. ï Ústav molekulární biologie rostlin na pŚístroji ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems, a firmou

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

použití BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Tyto přístroje jsou založeny na Sangerově metodě (princip viz. literární přehled).

Požadované množství pro pracoviště BC AV, v. v. i. – Ústav molekulární biologie rostlin:

- 2,5-10 ng DNA (dle koncentrace fragmentu)
- 0,5 µl primeru
- PCR H_2O do celkového objemu 7,5 µl

Požadované množství pro firmu INVITEK:

- DNA 1 ng/ µl na 100 bp
- primeru 5 pmol/ µl na reakci

4.8. Statistické hodnocení dat

Obdržená data byla dále zpracována v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0 a následovně upraveny v programech: CLUSTAL W, Bioedit, PAUP* executable a TreeView (Win32).

Bioedit, CLUSTAL W

Tyto programy jsou vhodné pro takzvaný „aligment“ – porovnávají se jednotlivé sekvence mezi sebou. U programu CLUSTAL W je výhodou dostupnost na webových stránkách:(http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html), a kompatibilita s programem Bioedit. V tomto programu lze ruční upravit jednotlivé sekvence pro další fylogenetickou analýzu. Je zde možnost odstranění „gap“, tedy prázdných míst ve stanovované sekvenci.

PAUP* executable

Program PAUP vyhodnocuje data získaná v programu CLUSTAL W a Bioedit. Pomocí jednotlivých příkazů v příkazovém řádku lze vytvořit fylogenetické stromy.

TreeView (Win32)

V programu TreeView lze zobrazit fylogenetické stromy jako výstup z programu PAUP. Lze v něm upravovat stromy do tvaru fylogramu či kladogramu, přehazovat jednotlivé větve, či upravovat text. Nejdůležitějším úkonem v tomto programu je možnost zakořenění fylogenetického stromu vybráním „kořene“. Většinou to bývá takový druh, který je fylogeneticky nejvzdálenější.

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

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

6. Diskuze

Bude vložena a doplněna po vydání vědecké publikace.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provedení PCR analýz 28S rRNA a optimalizace metody sekvenování, a zhodnocení její vhodnosti pro zavedení jako rutinního hodnocení molekulárních dat entomopatogeních hub. Z výsledků mojí diplomové práce vyplývají tyto závěry:

- Pro izolaci bylo vhodnější použití CTAB metody, ze které byla kvalitnější DNA o vyšší koncentraci.
- Byly analyzovány dva typy vzorků: vzorky „lokální" pocházející z Národního parku Šumava, přesněji z první zóny národního parku, které byly hlavním zdrojem zkoumání a kmeny ostatní, které pocházely z Krkonošského národního parku, oblasti Moravy a kmenů pocházejících ze sbírek rozmístěných po celém světě
- Pro PCR metodu byla použita reakce se specifickými primery NL1 a NL4, podle níž jsme amplifikovali část o velikosti 605 bp u *Beauveria bassiana*, 604 bp u *Beauveria brogniartii* a *Isaria fumosorosea* a 606 bp u vzorku *Beauveria bassiana*, který byl odebrán na území Moravy.
- Můžeme potvrdit, že LSU rRNA je velmi konzervativní repetitivní úsek DNA, ve kterém u zkoumaných vzorků rozdílných druhů nebyly zjištěny velké rozdíly.
- Nepodařila se prokázat odlišnost v sekvenovaných částech genotypu LSU rRNA podle typu hostitele u odebraného vzorku.
- Kmeny označované jako lokální, tedy vzorky z Národního parku Šumava, byly podle sekvencí LSU rRNA naprosto shodné a nepotvrdila se diversita mezi jednotlivými místy sběru. Tyto vzorky odpovídaly kmeni s označením Bba I 101, který byl prvním odebraným kmenem z území Černá hora.

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

kazovaly i analyzované kmeny pŧvodem z Krkonošského národního parku. Ačkoliv by se po těchto analýzách dalo předpokládat, že shodu budou mít i vzorky pocházející z Moravy, toto se nepotvrdilo.

- Důvodem rozdílnosti mohl být typ odebrané lokality, kde byly odlišné ekologické podmínky než u vzorků z Národního parku Šumava a Krkonošského národního parku. Toto by mohlo být zájmem jiného zkoumání.
- Některé kmeny považované za *Beauveria bassiana* byly díky sekvenační analýze označeny jako druh *Beauveria brogniartii*. Bylo to pouze u souboru ostatních kmenů a to u jednoho kmene pocházejícího z Moravy a dále u kmenů pocházejících z Kolumbie, Švédska, Slovenska a Ruska. Tyto kmeny mezi sebou vykazovaly shodu.
- Původní myšlenka, tedy že Národní park Šumava je velká oblast, která by mohla vykazovat diversitu, se neprojevila. Nebyla zjištěna ani diversita v rámci celé České republiky.

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

8. Použitá literatura

- Adane, K., Moore, D., Archer, S. A., 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curcilionidae) in the laboratory. Journal of Stored Product Reasearch 32:105-113
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2004, Základy buněčné biologie, 2. vydání, New York, Garland Science
- Anderson, T. E., Roberts, D. W., Soper, R. S., 1988, Use of Beaquveria bassiana for Suppression of Colorado Potato Beetle Populations in New York State (Coleoptera: Chrysomelidae), Environmental Entomology, 17:140-145
- Bartlett, J. M., Stirling, D., 2003, A short Historyof the Polymerase Chain Reaction, Methods in Molecular Biology, 226:3-6
- Bergmann, F., 1975. Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica*, 24: 175-177.
- Bruns, T. D., Fogel, R., Taylor, J.W., 1990 Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia 82, 175-184
- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A., Poinar, Jr. G. O., 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*, 363: 536-538.
- Clark, D. P., 2005. Molecular biology: Understanding the genetic revolution. Elsevier Academic Press
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren, J. E., 1968, Filed and laboratory sstudies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes, Journal of Invertebrate Pathology, June 1968: 11, 1:1-7
- Darnel, J. E., Lodish, H., Baltimore, D, 1990. Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc., New York, USA
- Doberski, J. W., Tribe, H. T., 1980. Isolation of entomopatogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of Beauvaria bassiana and Metarhizium anisopliae, Transactions of the British Mycologicla Society, 74: (1): 95-100
- Hafez, M., Zaki, F. N., Moursy, A., Sabbour, 1994. M., Biological effects of the enthomopatogenic fungus, *Beauvera bassiana* on the potato tuber moth

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Seller), Journal of Islamic Academy of Sciences 7:4, 211-214

- Hafez, M., Zaki, F. N., Moursy, A., Sabbour, M., 1994. Biological effects of the enthomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth phthorimaea operculella (seller), Journal of Islamic Academy of Sciences, 7:4, 211-214
- Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., 1990. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Acedemic Press, Inc., San Diego, Calirofnia 92101. USA
- Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., 1999. PCR Protocols, Protocols for Functional genomics. Acedemic Press a division of Harcourt Brace & Company, San Diego, Calirofnia 92101, USA
- Jorgens, R. A., Cluster, P. D., 1989. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetics and population studies. Ann. Mo. Bot. Gard. 75:1238-1247
- Kumar, V., Singh, G. P., Babu, A. M., Ahsan, M. M., Datta, R. K., 1999, Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine. Italian journal of Zoology. 1999: 66, 1: 39-43
- Lane, D., Pace, J. B.,. Olsen, G. J, Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R.. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl Acad. Sci. USA 82:6955-6959
- Lewin, B., 2000. Genes VII. Oxford University Press Inc., New York
- Li, Z. Z., Li, C. R., Huang B, Fan M. Z., 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus, Chinese Science Bulletin 46: 751ï 3.
- Ludwig, S. W., Oetting, R., 2002, Efficacy of *Beauveria bassiana* plus insect attractants for enhanced control of *Frankliniella occidentalis*, Florida Entomologist March 2002: 85, 1: 270-272
- Maurer, P., Couteaudier, Y., Girard., P. A., Bridge, P. D., Riba, G. (1997) Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. Myclo. Res. 101, 2: 159-164

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Stickel, S., Sogin, M. L., 1988. Tha characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71: 491-499

- Mullis, B., 1987. U.S. patent 4, 683, 195, July 1987 and U.S. patent 4, 683, 202, July 1987.
- Oborník, M., Jirku, M., Dolezal, D.,2001, Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus Pacyomyces polyphyletic? Canadian Journal of Microbiology: Sep 2001: 47,9:813-819
- Osborn, A. M., Smith, C. J., 2005. Molecular Microbial Ecology. Cromwell Press, Triwbridge, Wilts, UK
- Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., Slesarev, A. I., 2004. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient application, Trends Biotechnol., 22: 253-260
- Posada, F., Vega, F. E., Rehner S. A., 2004. *Syspastospora parasitica*, a mycoparasite of the fungus *Beauveria bassiana* attacking the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: a tritrophic association. J. Insect Sci. 4: 24
- Rehner, S. A., Buckley, E., 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-{alpha} sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. Mycologia 97: 84ï 98.
- Robyt, J., F., White, B., J., 1990. Biochemical Techniques Theory and Practice. Illinois, Waeland Press
- Rychlik, W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E., 1990, Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, Nucl Acids Res, 18: 6409-6412
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharft, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985. Enzymatics amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
- Sanger, F., Coulson, A. R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerace. J.Mol. Biol. 94: 441-448

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

03. Entomopathogenic fungi as biological kontrol agents, Appl. Mecrobiol Biotechnol, 61: 413-423

- Sharkey, D. J., Scalice, E. R., Christy Jr., Atwood, S. M., Daiss, J. L., 1994. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction, Bio/Technology, 12:506-509
- Smit, S., Widmann, J., Knight, R., 2007, Evolutionary rates vary among rRNA structural elements, Nucleic Acids Res. 35:3339-3354
- Sogin, M. L., and J. H. Gunderson, 1987. Structural diversity of eukaryotis small subunit ribosomola RNAs: evolutionary implications. Endocyto biology III. Ann. N. Y. Acad. Sci. 503:125-139
- Sogin, M. L., Gunderson, J. H., Elwood, H. J., Alfonso, R. A., Peattie D. A., 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from Giardia lamblia. Science 243:75-77
- Snustad, D. P., Michael J. Simmons, M. J., 2009, GENETIKA, Nakladatelství Masarykova univerzita, Brno
- Tanada, Y., Kaya, H. K., 1993, Insect pathology, Academic Press, San Diego, 666 st.
- Tautz, D., 1989. Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17: 6463-6471.
- Tailor, J.W, Jacobsen, D. J, Kroken, S., Kasuga, T. , Geiser, D. M., Hibbett, D. S., Fisher MC, 2000, Phylogenetics, species recognition and species concept fungi, Fungal Genet Biol 31:21-32
- Tucker, D. L., Beresford, C. H., Sigler, L., Rogers, K., 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Microbiol. 42 (11): 5412ï 4.
- Wagner, B. L., Lewis, L. C., 2000. Colonization of corn, Zea mays, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. **66** (8): 3468ï 73.
- Wang, Ch., Li, Z., Typas, M. A., Butt, T. M., 2003. Nuclear large subunit rDNA group I intron dirtribution in a population of *Beauveria bassiana* strain : phylogenetic implications. Mycol. Res. 107 (10) : 1189-1200

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

atel, N., Li, Z., Butt, M. T, 2003. Molecular investigation on strain genetic reletedness and population structure of *Beauveria bassiana*. Environmental Microbiology 5 (10) : 908-915

- Williams, G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. L., Rafalski. J. A., Tingey, S., V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18: 6531-6535

Internetové odkazy

- Canfield, E., 1990, Sanger Methods for DNA Sequencing http://www.bio.davidson.edu/Courses/Bio111/seq.html [online 02.12.2009]
- Encyclopaedia Britannica, 2010, ribosomal RNA, http://www.britannica.com/EBchecked/topic/502158/ribosomal-RNA [online 06.01.2010]
- Frantz, G., Mellinger, H. C., 1998, Use of *Beauveria bassiana* for Biological Control of Thrips in Peppers, http://www.gladescropcare.com/potential_use_of_Bb.pdf [online 25.11.2009]
- Freeman, W. H., Molecular cell biology: Identiying, Analyig and Sequencing Cloned DNA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A1637#A1648 [online 18.12.2009]
- Freeman, W. H., Molecular cell biology: The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function , 2002, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A438#A455 [online 13.01.2010]
- Groden, E., http://www.hort.uconn.edu/IPM/general/htms/bassiana.htm [online 16.01.2010]
- http://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana [online 12.8.2009]
- http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Vyuit%20hub%20v%20biologick%20ochran%20rostlin%20proti%20kdcm.pdf
- http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_128815.htm [online 08.10.2009]

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

research/biocontrol/introduction/basicdef.html [online 17.10.2009]

- http://www.microbiologyprocedure.com/ribose-nucleic-acid/ribosomal-RNA-rRNA.htm [online 06.01.2010]
- http://www.molecular-plant-biotechnology.info/genetic-material/ribosomal-RNA.htm [online 06.01.2010]
- http://www.newworldencyclopedia.org/entry/RRNA [online 06.01.2010]
- http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm [online 28.01.2010]
- Humber, Richard, A. http://www.absoluteastronomy.com/topics/Entomopathogenic_fungus [online 12.8.2009]
- Korzun, V.,2003. Molecular markers and their application in cereals breeding, http://www.abneta.org/site/pages/terminologies/mas.php#marker3 [online 11.02.2010]
- Landa, Z., KŠenová, Z., VojtDch, O., 2007. Využití houby *Beauveria bassiana* v ochranDproti lýkožroutu smrkovému http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1988/133/ [online 10.12.2009]
- Meyling, N. V., PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies, 2008. http://orgprints.org/14345/1/D5_2_final.pdf [online 02.09.2009]
- Shae, P. C., 2002. Molecular markers in Chinese Medicnal Materials, http://www.worldscibooks.com/etextbook/4700/4700_chap1_2.pdf [online 18.01.2010]
- Wiedenmann. R.,2000. Intofudction to Biological Control http://www.inhs.uiuc.edu/research/biocontrol [online 12.03.2010]

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

PSlohy

Budou vloženy a doplněny po vydání vědecké publikace.