

Obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra rostlinné výroby

Diplomová práce

Polymorfismus mikrosatelitových markerů u kmenů *Beauveria bassiana*

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Kateřina Šimáčková

Konzultant diplomové práce:

Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:

Bc. Martina Králová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Polymorfismus mikrosatelitových markerů u kmenů *Beauveria bassiana*„ vypracovala samostatně a použila jsem literaturu a studijní materiály, které uvádím v seznamu použité literatury.

České Budějovice, 2010

.....
Podpis

Poděkování:

Poděkování především patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Kateřině Šimáčkové za metodické vedení, cenné rady a nekonečnou trpělivost. S poděkováním se obracím i na konzultanta prof. Ing. Vladislava Čurna, Ph.D., za ochotu a poskytnuté rady.

Mé díky patří za vzájemnou výpomoc a spolupráci v laboratoři kolegyním Bc. Kristině Kotlanové a Bc. Evě Vondráškové.

Nemohu ani opomenout poděkovat Mgr. Simoně Králové za její věnovaný čas nad jazykovou korekturou mé diplomové práce.

Abstrakt

Beauveria bassiana je entomopatogenní polyfágní houba, která se běžně vyskytuje v půdě a parazituje na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, jež se vyskytují v půdě. Dnes se používá při ochraně rostlin proti více jak 70 druhům hmyzu.

V České republice má *Beauveria bassiana* nyní největší význam v boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) v Národním parku Šumava.

Tato práce byla zaměřena na hodnocení genetické variability kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na základě analýzy mikrosatelitů a porovnání čtyř separačních metod elektroforézy na 2% agarózovém gelu, elektroforézy na 3% syngelu, čipové elektroforézy a fragmentační analýzy z hlediska nejpřesnější separace PCR produktů. V této studii bylo použito 41 kmenů z NP Šumava a 20 kmenů ze sbírky, označených jako ostatní, kde kromě kmenů odebraných z celého světa, byly zahrnuty i kmeny odebrané z NP Krkonoše a jižní Moravy.

Pro analýzu mikrosatelitů bylo použito 11 primerových párů a pro vzájemné porovnání metod byly vybrány pouze 4.

Populace kmenů *Beauveria bassiana* odebrána z NP Šumava byla vyhodnocena na základě analýzy mikrosatelitů jako plně konzervativní a uzavřená bez ohledu na zdroj a lokalitu. U kmenů, které byly odebrány z celého světa, se projevila značná genetická variabilita.

Z hlediska separace se jako nejlepší a nejvhodnější metoda pro detekci mikrosatelitů osvědčila fragmentační analýza. I přes její náročnou finanční stránku, se ukázala tato metoda jako nejpřesnější a nejcitlivější. Její výhoda spočívá v možnosti detekovat minimální rozdíly ve velikosti jednotlivých alel mikrosatelitů v rozmezí 1-2 bp, což je u gelové elektroforézy nemožné.

Klíčová slova: *Beauveria bassiana*; entomopatogenní houba; mikrosatelitové markery; biologická kontrola; gelová elektroforéza; čipová elektroforéza; fragmentační analýza.

Abstract

Beauveria bassiana is an entomopathogenic polyphagous fungus commonly found in soil and it is a parasite of soil insects, mainly of the stages of insect that occur in soil. At the present time it is used in plant protection against more than 70 species of insects.

In the Czech Republic *Beauveria bassiana* has the greatest importance in the fight against bark beetle (*Ips typographus*) in the NP Šumava in these days.

This study was focused on the evaluation of genetic variability *Beauveria bassiana* strains on the basis of microsatellite analysis and the comparison of four separation methods: electrophoresis in 2% agarose gel, electrophoresis in 3% synergel, chip electrophoresis and fluorescent capillary electrophoresis in terms of the most precise separation of PCR products. We used 41 strains which were collected in the NP Šumava and 20 strains from long-term collection determined as an exotic in this study. This large geographical scale group contains the strains from the whole world and in addition it was upgraded by the strains collected from the NP Krkonoše and South Moravia. For the microsatellite analysis there were used 11 pairs of primers but for inter-comparison of separative methods were chosen only 4 pairs of primers.

The population of *Beauveria bassiana* strains collected from the NP Šumava were evaluated by analysis of microsatellites as a conservative and fully closed regardless of the source and the location. The strains from the large geographical scale group showed the great genetic variability. In terms of separation, the best and most suitable separation method was proved, the fluorescent capillary electrophoresis. Despite of its difficult financial aspect, this method was evaluated as the most precise and the most sensitive. Its advantage is in possibility to detect the smallest differences in the length of single allele in the range 1-2bp, which is for the gel electrophoresis impossible.

Key words: *Beauveria bassiana*: entomopathogenic fungus; microsatellite markers; biological control; gel electrophoresis; chip electrophoresis; fluorescent capillary electrophoresis.

Obsah

1. Úvod	3
Cíle práce	4
2. Literární přehled	5
2.1. Entomopatogenní houby	5
2.1.1. Obecná charakteristika	5
2.1.2. Klasifikace entomopatogenních hub	5
2.1.3. Vývojový cyklus vláknitých hub (<i>Deuteromycety</i>)	6
2.2. <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo.-Criv.) Vuillemin 1912	8
2.2.1. Taxonomie a charakteristika	8
2.2.2. Biologická kontrola, význam a využití <i>Beauveria bassiana</i>	9
2.3. Molekulární markery	11
2.3.1. Charakteristika a typy molekulárních markerů	11
2.3.1.1. Techniky molekulárních markerů založené na restrikčním štěpení a hybridizaci.....	12
2.3.1.2. Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR	12
2.3.1.3. Techniky molekulárních markerů založené na kombinacích restrikčního štěpení, hybridizace a amplifikace	15
2.3.1.3.1 Microsatellites (SSRs nebo STRs)	17
2.4 Aplikace a využití mikrosatelitů (SSR)	18
2.5 Separační techniky	19
2.5.1 Gelová elektroforéza	19
2.5.2 Čipová elektroforéza	20
2.5.3 Kapilární elektroforéza v automatickém sekvenátoru (fragmentační analýza)	22
3. Materiál a metodika	23
3.1 Materiál	23
3.1.1 Použité kmeny	23
3.2 Metody	26
3.2.1 Sterilizace a sterilní práce	26
3.2.2 Příprava středových kultur a příprava zásoby materiálu pro metodiku	26
3.2.3 Izolace genomové DNA	27
3.2.4 Měření koncentrace vyizolované genomické DNA	29
3.2.5 Analýza mikrosatelitů SSR	30
3.2.6 Detekce a separace PCR produktů (SSR)	32
Detekce	32

Separace	33
Elektroforéza v 2% agarózovém gelu	33
Elektroforéza v 3% Synergelu	33
Čipová elektroforéza Experion™ DNA 1K Kit	34
Fragmentační analýza	36
3.2.7 Digitální obrazová analýza a statistické hodnocení dat	37
4. Výsledky a diskuze	38
5. Závěr	58
6. Literatura	59
7. Přílohy	66

1. Úvod

V poslední době se velmi často hovoří o houbě *Beauveria bassiana*. Má široké spektrum využití v biologické ochraně po celém světě. Tato houba byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu z devíti řádů. Nejvíce hostitelů se nachází mezi *Lepidoptera* a *Coleoptera*, má vysoký potenciál využití k ochraně proti více jak 70 druhům hmyzu.

V České republice má *Beauveria bassiana* nyní největší význam v boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) v lokalitách CHKO Šumava a NP Šumava.

V ČR byly registrovány biopreparáty Boverol a Boverosil. V zahraničí se využívá celá řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii*, které našly své uplatnění zejména v lesnictví a okrasném zahradnictví proti larvám vrubounovitých a nosatcovitých brouků nebo proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin.

V této studii se zaměřuji na hodnocení genetické variability kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na základě analýzy mikrosatelitů (SSR – Simple Sequence Repeat). Polymorfismus mikrosatelitových markerů se hodnotí na kmenech odebraných v NP Šumava a Národním parku Krkonoše. Včetně kmenů z ČR byly do analýzy zahrnuty i kmeny ostatní (z celého světa).

SSR jsou molekulární markery, jež jsou pro daný kmen či druh charakteristické a umožňují jejich přesnou identifikaci. Jedná se o sekvence DNA mnohokrát se opakující v genomu, v eukaryotickém genomu až v 80 kopiích.

Studie zahrnuje právě porovnání čtyř vybraných separačních technik, které byly vybrány za účelem nejúčinnější, nejcitlivější a i z pohledu finanční stránky nejvhodnější detekce a separace pro SSR.

Aplikační možnosti mikrosatelitů jsou obrovské a spektrum jejich využití se stále rozšiřuje: mapování genomu, určení paternity, genetické struktury populace, genetické variability atd.

Cíle diplomové práce:

Porovnání čtyř separačních technik – gelová elektroforéza na 2% agarózovém gelu, gelová elektroforéza na 3% Synergelu, čipová elektroforéza a fragmentační analýza; s cílem vybrat techniku, která umožňuje nejlepší, nejpřesnější a nejcitlivější separaci pro detekci mikrosatelitů a je i po finanční a časové stránce nejvhodnější technikou.

Hodnocení polymorfismu odebraných kmenů *Beauveria bassiana* z celého NP Šumava a Národního parku Krkonoše, včetně exotických kmenů (*Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea*) pomocí analýzy mikrosatelitů vybranou nejvhodnější detekční technikou.

2. Literární přehled

2.1. Entomopatogenní houby

2.1.1. Obecná charakteristika

Entomopatogenní houby patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované mikroorganismy asociované s hmyzem, regulující jejich populace (Landa, 1998).

Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Mohou napadat všechna vývojová stadia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často houby infikují dospělé 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. *Paecilomyces fumosoroseus*).

Z přibližně 100 známých entomopatogenních druhů hub mají jen druhy rodů *Beauveria*, *Metarhizium* a *Verticillium* úzký komerční vývoj. Jejich zvláštní mechanismus působení (pro infekci vývojových stadií hmyzích škůdců požadují vlhké a teplé podmínky prostředí) způsobuje snížení rychlosti jejich působení, což reprezentuje hlavní překážky jejich vývoje (Šedrlová, 2008).

2.1.2. Klasifikace entomopatogenních hub

Z hlediska praktické biologické ochrany nepředstavuje takto rozmanitý potenciál žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů.

V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v několika řádech a různých odděleních, kde nejvýznamnějšími jsou houby z oddělení *Chytridiomycota* (*Blastocladales*); *Zygomycota* (*Zygomycetes*: *Entomophthorales*, *Mucorales*); a právě *Ascomycota* (*Laboulbeniomyces*, *Sordariomycetes*) a *Deuteromycota* (*Hyphomycetes*; *Moniliales*). Velmi významnou a poměrně dobře známou skupinu entomopatogenních hub představují houby z řádu *Entomophthorales* (*Zygomycota*: *Zygomycetes*). Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu (např. houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další) reprezentují převážně obligátně parazitické druhy, jejichž vývojový cyklus je vázán výhradně na živého hostitele (Landa, 1998).

Z hlediska praktické biologické ochrany mají největší význam vláknité *Deuteromycetes* (*Deuteromycota*, *Hyphomycetes*, *Moniliales*). K neznámějším patří houby rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* a *Verticillium* (Turčáni *et al.*, 2009).

V poslední době se často věnuje pozornost houbě rodu *Beauveria*. Má široké spektrum využití v biologické ochraně po celém světě, o němž se zmiňuji v dalších kapitolách.

V České republice se využívá nejčastěji *Beauveria bassiana* v boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) v lokalitách CHKO Šumava a NP Šumava v rámci projektu MZP SP/2d1/41/08.

2.1.3. Vývojový cyklus vláknitých hub (*Deuteromycetes*)

Hlavní fáze generalizovaného vývojového cyklu entomopatogenních hub lze definovat následujícím způsobem (obr. 1):

- Přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele.
- Pronikání patogena do tělní dutiny, interní proliferace a vytváření povrchové a myceliální sítě (**parazitická fáze** vývojového cyklu).
- Externí sporulace a tvorba konidií nové generace (**saprofytická fáze** vývojového cyklu) (Landa, 1998).

Houbovou nákazu zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé, zprostředkované abiotickými nebo biotickými faktory.

Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu se stává kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodisseminace, při níž dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček) (Landa, 1998).

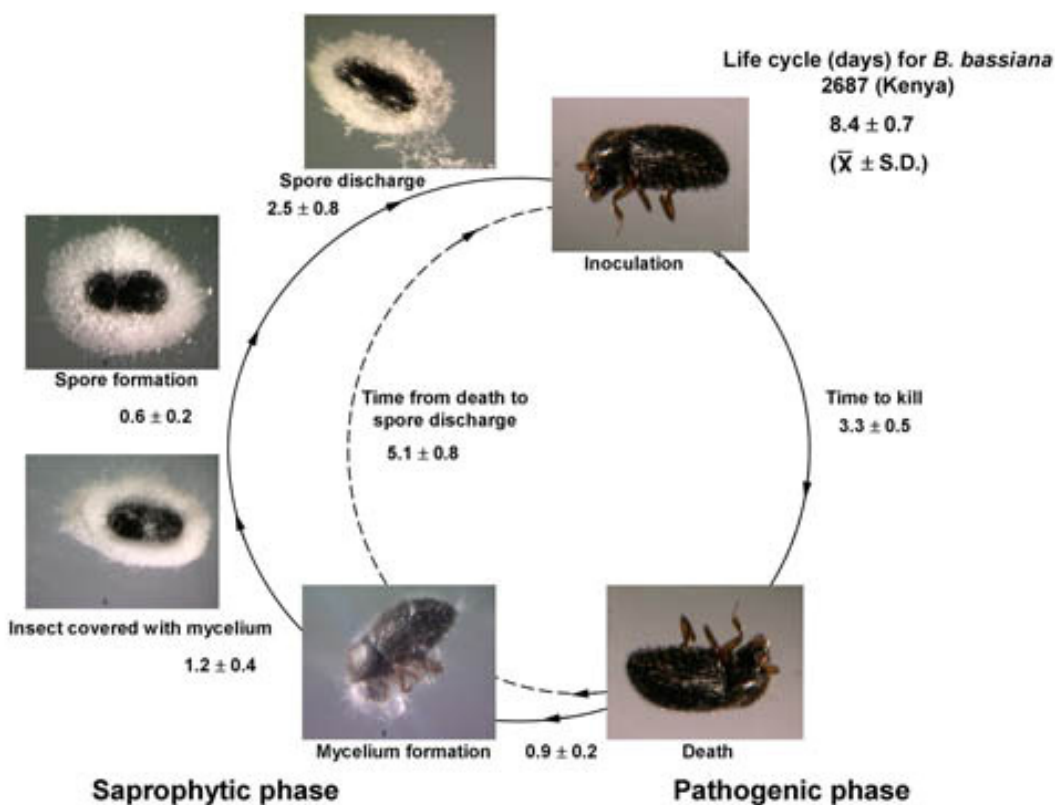
Konidie hub jsou opatřeny různými mechanismy pro adhezi: **lepivý mucilagenní povrch** (vytváření pevné vazby s kutikulou hostitele již při prvním kontaktu např. *Verticillium lecanii*). **Konidie jsou suché, silně hydrofobní s rozmanitě strukturovaným povrchem** např. *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus*).

Klíčení konidií představuje první aktivní fázi interakce patogena s hostitelem (Landa, 1998). Konidie jsou dostatečně energeticky vybaveny k vyklíčení. Klíčení značně ovlivňuje

teplota a relativní vzdušná vlhkost (optimální je teplota 20-30°C a relativní vzdušná vlhkost 90%).

Fáze penetrace představuje pronikání hyf patogena přes kutikulu do těla hostitele a produkce degradujících enzymů. Houby k penetraci využívají i přirozených otvorů a nebo i méně sklerotizovaná místa či místa poškozená.

Uvnitř těla hostitele dochází ke kolonizaci jednotlivých orgánů a k přechodu vláknitých forem hub na rychle se dělící a pomnožující tělíska - blastospory. Tato tělíska se rychle namnožují, ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele, který je v této fázi vývoje mykózy již usmrcen. Patogen prorůstá na povrch usmrceného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, která porůstá celý povrch těla. Na vzdušném myceliu se postupně vytváří konidiofory, na nichž se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidie. Konidie si v přirozeně dormantním stavu udržují vitalitu po dobu několika týdnů až měsíců. Jejich dočasná dormance končí šířením a adhezí konidií na povrchu těla nového vhodného hostitele (Landa, 1998).



Obr. 1: Životní cyklus *Beauveria bassiana* (Posada, Vega, 2005).

2.2. *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Criv.) Vuillemin 1912

2.2.1. Taxonomie a charakteristika

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>

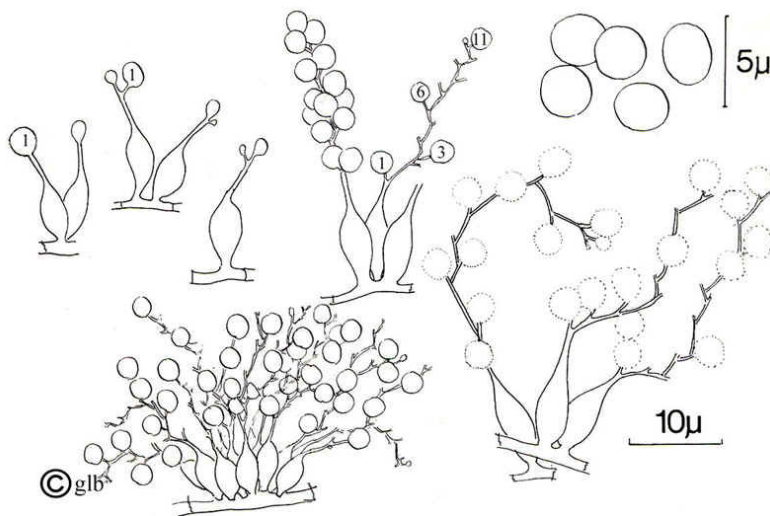
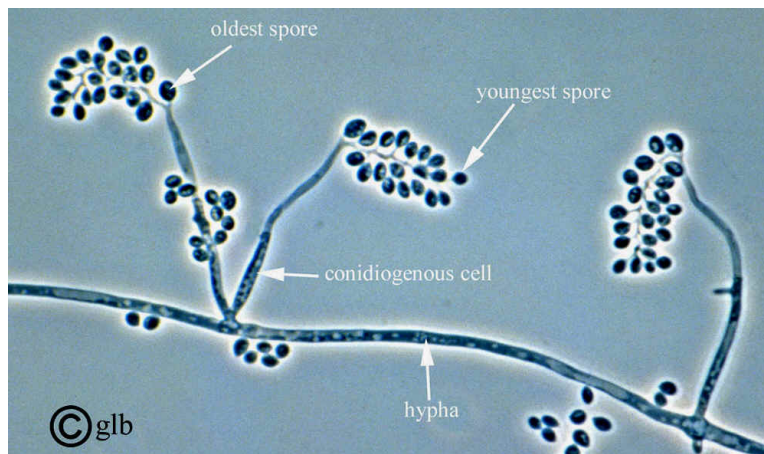
Beauveria bassiana se přirozeně vyskytuje v půdě po celém světě. Rozmnožuje se pohlavně i nepohlavně. Má mnoho kmenů vykazujících značné rozdíly ve virulenci, patogenitě a spektru hostitelů. Za velmi unikátní považujeme schopnost způsobit onemocnění hostitele po pouhém kontaktu, na rozdíl od mnoha jiných patogenů, které potřebují pro činnost již vyvolanou infekci. Onemocnění, které způsobuje se často nazývá „white muscardine, (Herrington, 2006).

Beauveria bassiana je polyfágní houba běžně se vyskytující v půdě, parazituje na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu vyskytující se v půdě (např. při přezimování). V sortimentu hostitelů se objevují 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. V poslední době byly izolovány i kmeny *Beauveria bassiana*, které vykazují vysokou virulenci na různých druzích stejnokřídlého hmyzu (např. na molicích a mšicích) (Landa, 1998).

Vyznačuje se pomalu rostoucími koloniemi, které jsou bělavé, lanozní, později nažloutlé. Konidiogenní buňky vyrůstají nejčastěji ve shlucích, mají charakteristicky zduřelou bázi cca 3-6 x 2,5-3,5 μm a tenký „cik-cak“ krček (rachis) dlouhý až 25 μm (obr.2). Konidie jsou hyalinní, téměř kulovité, hladké, 2-3 μm v průměru. U starších kultur se fialidy stávají protáhlejší a vyrůstají častěji i jednotlivě (Kubátová, 2006).

Beauveria bassiana roste v teplotním optimu 8-35°C, přežívá i teploty 37°C (Fernandes *et al.*, 2007).

Vedle druhu *Beauveria bassiana* bylo popsáno dalších šest druhů hub rodu *Beauveria*, a to *B. brongniartii*, *B. tenella*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* a *B. caledonica* (Driver, Milner, 1998).



Obr. 2: Konidiofory s konidiami *Beauveria bassiana* (on-line zdroj, 2009).

2.2.2. Biologická kontrola, význam a využití *Beauveria bassiana*

Biologická kontrola byla definována několika způsoby:

Baker a Cook v roce 1974 definovali biologickou kontrolu jako: Snížení hustoty inokula nebo činnosti patogena nebo parazita v aktivním stavu nebo spícího, jedním nebo více organismy, působícím přirozeně nebo prostřednictvím manipulace s prostředím, hostitelem, nebo protivníkem, nebo masové zavádění jednoho nebo více protivníků (Charnley, Collins, 2007).

Záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulace populací škůdců, plevelů a původců onemocnění rostlin (Lenteren, 1986 in Landa, 2000) je jedna z dalších možností definic biologické kontroly.

Použití určitého druhu organismu k redukci hustoty populace jiného cílového organismu, je nejúspěšnější, cenově nejpříznivější a environmentálně nejbezpečnější způsob likvidace škodlivého hmyzu. Je to nejpřirozenější způsob jak udržet množství škodlivých organismů na co nejnižší úrovni (Šedrlová, 2008).

Biologická kontrola se člení na klasickou a na augmentativní. Klasická biologická ochrana je záměrná introdukce nepůvodního organismu, růst jeho populace do té doby než obsadí všechny zdroje škůdců, jedná se o dlouhodobou regulaci populace škůdce. Augmentativní biologická ochrana používá přirozených nepřátel v sezónních dávkách. Využívá k potlačení škůdců během sezóny nebo během růstového cyklu plodin jednu nebo několik aplikací přirozených nepřátel do prostředí (Šedrlová, 2008).

Během posledních několika let, použití entomopatogenní houby v zemích s intenzivní zemědělskou činností se těší velikému zájmu. Vzhledem k velkému potenciálu *Beauveria bassiana* v biologické kontrole zemědělských škůdců, získává studium pro genetické zlepšování houby stále větší význam (Paccola-Meirelles, Azevedo, 1990).

Beauveria bassiana byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu z devíti řádů, nejvíce hostitelů se nachází mezi *Lepidoptera* a *Coleoptera*, má potenciál využití k ochraně proti více jak 70 druhům hmyzu.

V ČR byly registrovány biopreparáty Boverol a Boverosil. V zahraničí je k dispozici řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii*, které jsou používány zejména v lesnictví a okrasném zahradnictví proti larvám vrubounovitých a nosatcovitých brouků nebo proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin (např. přípravek MYCOTROL firmy Mycotek) (Landa, 1998).

V ČR v lesnictví je nejvíce *Beauveria bassiana* využívána v boji proti kůrovci smrkovému (*Ips typographus*) a to v lokalitách NP Šumava a CHKO Šumava, kde na vybranou lokalitu NP Šumava byla aplikována *Beauveria bassiana* s cílem záměrně indukovat houbovou infekci v populaci lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Projekt zahrnuje rozsáhlý monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub asociovaných s lýkožroutem, detailní charakteristiku kmenů hub zachycených v průběhu monitoringu a vývoj biotechnologií produkce biomasy hub umožňujících reintrodukci vybraných kmenů do oblastí jejich původu, s cílem záměrně indukovat vznik epizootie v populacích lýkožrouta. Využívání biopreparátů na bázi *Beauveria bassiana* proti *Ips typographus* se stejně používá

v Německu, Švýcarsku a Rakousku, na experimentální úrovni je tato houba zkoušena i v dalších zemích (např. USA, Francie, Austrálie, Finsko, Polsko) (Landa *et al.*, 2007).

Rod *Beauveria* se používá pro snížení regulace chrousta (*Melolontha melolontha*) v Evropě, využívá se hlavně *Beauveria brongniartii*, jež je jeho přírodním patogenem (Schwarzenbach *et al.*, 2009). *Beauveria bassiana* se používá pro kontrolu populace *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae), která je v Brazílii primárním zdrojem laischmaniózy, snaha je udržet dlouhodobou regulaci tohoto vektoru (Amóra *et al.*, 2009). V jižní Číně se tato houba úspěšně aplikuje ke kontrole housenky (*Dendrolimus punctatus*) vyskytující se na borovici (Wang *et al.*, 2009). Smrtící účinek má *Beauveria bassiana* na vajíčka roztoče *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) (Shi, Feng, 2004). Velké ekonomické ztráty v pěstování jahod způsobují škůdci *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* a *Otiiorhynchus ovatus*, proti kterým se v Kanadě v Quebecu zkoušela a úspěšně aplikovala *Beauveria bassiana* (Sabbahi *et al.*, 2007).

V Cameróonu (stát ve střední Africe) se zavedla aplikace *Beauveria bassiana* na vektor malárie *Anopheles gambiae* s.l.(Diptera; Culicidae), kde se aplikovala suchá kordialní směs na dospělé jedince (Achonduh, Tondje, 2008).

Tato entomopatogenní houba má kromě pozitivních účinků, i účinky nežádoucí, týkají se snižování populace bource morušového. Ve Francii a Itálii, kde výroba hedvábí byla důležitá

v 16. a 17. století, byly zaznamenány každý rok těžké ztráty larev bource morušového způsobené onemocněním zvané „white muscardine“, jehož původcem je právě *Beauveria bassiana* (Mahr, 1997).

2.3. Molekulární markery

2.3.1. Charakteristika a typy molekulárních markerů

DNA markery jsou markery na úrovni DNA. Umožňují detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markery se zakládají na polymorfismu sekvencí DNA. Využívají se např. 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) (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA několik výhod. Zaprvé, DNA můžeme získat nejenom ze živých, ale i z mrtvých tkání (v případě rostlin z herbářových položek). Molekula DNA je natolik stabilní, že může být zachována i po dobu několika milionů let (Cano *et al.*, 1993). Další výhodou jsou malá množství DNA, jež jsou většinou k analýzám zapotřebí (DNA z 1 cm² nám postačí na cca 100 PCR reakcí, viz níže). DNA markery tedy lze mj. použít i u velmi raných ontogenetických stádií, což znamená zefektivnění rychlosti práce především ve šlechtitelské oblasti (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

Obecně je princip molekulárních markerů založený na 1) specifickém restričním štěpení analyzované DNA a následné hybridizaci se značenou sondou 2) amplifikaci specifických fragmentů v *in vitro* podmínkách 3) různých kombinacích restričního štěpení, hybridizaci a amplifikaci:

2.3.1.1. Techniky molekulárních markerů založené na restričním štěpení a hybridizaci

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů

RFLP patří mezi historicky nejstarší DNA markery. Pro rozvoj této metody byl nutným předpokladem 1. objev restričních enzymů (Smith, Wilcox, 1970) a 2. objev přenosu elektroforeticky separované DNA z gelu na membránu – metoda Southern blot (Southern, 1975), pojmenovaná po svém objeviteli.

Metoda RFLP využívá délkového polymorfismu restričních fragmentů analyzované DNA, který je, po provedení elektroforetické separace a přenosu fragmentů z gelu na pevný nosič (nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu), detekován pomocí hybridizace s homologním fragmentem DNA – specifickou sondou (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

2.3.1.2. Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR

PCR

Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce

PCR reakce byla vyvinuta v Cetus Corporation Emeryville v Kalifornii. Jde o enzymatickou amplifikaci DNA, *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA

v cyklické reakci o třech teplotních fázích (Saiki *et al.*, 1985, Saiki *et al.*, 1988). Princip je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů (Šmarda *et al.*, 2008).

PCR reakce umožňuje selektivně naamplifikovat určité oblasti genomu, pokud známe sekvence ležící u této cílové oblasti – flanking sequences - tzv. primery. Primery jsou uměle nasyntetizované oligonukleotidy (10-30 bází dlouhé), které jsou komplementární k sekvencím na obou vláknech dubletu DNA.

Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů např. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů (Šmarda *et al.*, 2008).

PCR je proces (obr. 3), při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

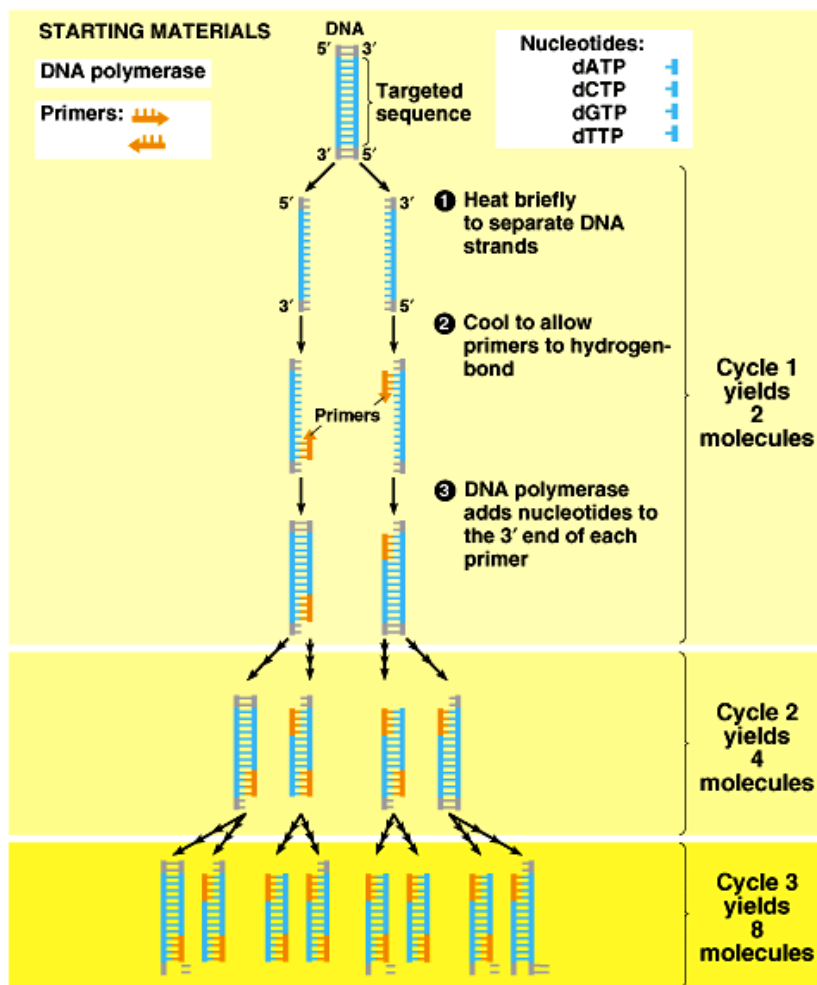
- DENATURACE dvouřetězcových molekul DNA (92-95°C)
- NASEDNUTÍ (ANNEALING) primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C)
- SYNTÉZA (ELONGACE) nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C)

Obvykle PCR probíhá v rozmezí 30-40 cyklů (Edel, 1998). Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocycler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech (Šmarda *et al.*, 2005).

Podmínky: GC:AT poměr v sekvenci primeru by měl být ~ 1:1. Primery by neměly být mezi s sebou komplementární, zejména na 3' konci, kde může překrytí dvou nebo tří bází způsobit vznik oligodimerů (tzv. primer misspairing), zejména při nadbytku primeru.

Koncentrace MgCl₂ (optimum 1,5 mM) má vliv na specifitu a výkonnost PCR reakce. Vyšší koncentrace zvýší výnos, ale snižuje specifitu, menší koncentrace naopak (Edel, 1998).

Používá se mix, který obsahuje jednotlivé složky reakce, aby se eliminovala chyba pipetování a nepřesnosti (Edel, 1998).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Obr. 3: **Princip PCR**

PCR-SPLAT (PCR-STS)

Specific Polymorphic Locus Amplification Test – amplifikace specific. polymorfního lokusu
(Single Tagged Site – amplifikace jednoho cílového místa)

Jde o standartní PCR, kdy pomocí dvojice specifických primerů je nareplikován určitý fragment – lokus (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

RT-PCR

Reverse Transcription PCR – reverzní (zpětná) polymerázová reakce

Jde o modifikovaný postup PCR, určený pro amplifikaci molekul RNA. V prvním kroku je molekula RNA přepsána – reverzně transkribována pomocí enzymu reverzní transkriptázy na molekulu cDNA. Molekula cDNA je poté použita jako templát následné PCR (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997)

Real Time – PCR (qRT PCR)

Amplifikace probíhá obvyklým způsobem jako standardní PCR. Reakční směs obsahuje kromě dvojice primerů ještě specifickou vnitřní sondu (*TaqMan* sonda), která je fluorescenčně značená na 3' konci tzv. zhášečem a na 5' konci tzv. reportérem (Ovesná, Drašnarová, 2001). Pokud amplifikace neprobíhá, je energie vyzařovaná reportérem pohlcována zhášečem.

V případě amplifikace dojde k rozštěpení vnitřní sondy, reportér se dostane z dosahu zhášeče a uvolněný fluorescenční signál je zaznamenán přístrojem.

Tato metoda se využívá zejména ke kvantitativnímu PCR pro zjištění množství transgenu v biologickém materiálu nebo pro posouzení stupně napadení hostitele patogenem (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

RAPD

Randomly Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA

RAPD metodu použil jako jeden z prvních Williams *et al.*, (1990). Princip je založen na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru. Primery mají obvykle délku 10 bazí (náhodně vybraných s ohledem na zastoupení jednotlivých bazí – vyrovnaný poměr C:G). Krátká délka motivu a výrazně nižší teplota annealingu (35-38 °C) zvyšují pravděpodobnost nasednutí primeru na mnoha místech molekuly DNA (primery jsou tzv. nespecifické). Produkty amplifikace mohou odpovídat oblastem geneticky aktivní templátové DNA, stejně tak mohou odpovídat opakujícím se motivům. Pro výběr primeru nepotřebujeme žádnou znalost konkrétních sekvencí, můžeme použít jakýkoliv primer a zajímá nás jen to, který z nich vykazuje u studovaných vzorků polymorfní pattern. V současnosti je na trhu k dostání více než 400 různých primerů (Firma Operon Technologies) (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

2.3.1.3. Techniky molekulárních markerů založené na různých kombinacích restrikčního štěpení, hybridizace a amplifikace

I-PCR

Inverse PCR – inverzní PCR.

Tento postup se používá pro amplifikaci fragmentů DNA o neznámé sekvenci, která je ohraničena známými sekvencemi. Metoda je založena na restrikčním štěpení známé sekvence, jenž umožní tvorbu kohézních konců. Druhý krok představuje vytvoření cirkulární molekuly.

Amplifikace se zahájí protisměrným připojením primerů ke známé sekvenci v cirkulární molekule. Tímto způsobem je zajištěna amplifikace vnitřního úseku cirkulární molekuly (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

***In situ* – PCR**

Amplifikace DNA probíhá přímo v buňkách nebo cytologických preparátech. Produkt amplifikace se následně detekuje hybridizací se specifickou sondou nebo s využitím imunochemických metod. Oproti standardně používané hybridizaci *in situ* je tento postup mnohonásobně citlivější. Na principu *in situ*-PCR jsou obvykle založeny tzv. bio-chipy (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

CAPS (PCR-RFLP)

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences – délkový polymorfismus restriktivně štěpené amplifikované DNA

Metoda CAPS v sobě zahrnuje spojení dvou metod: PCR a RFLP. Úvodní krok představuje amplifikace PCR markeru (např. ITS oblasti). Po následném rozštěpení restriktivní endonukleázou se fragmenty elektroforeticky separovány na gelu. Díky bodovým mutacím lze odlišit dominantní a recesivní alely studovaných genů/mezigenových regionů (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů

Princip se zakládá na selektivní amplifikaci restriktivních fragmentů celého genomu. Postup se skládá ze tří základních kroků: 1. rozštěpení genomické DNA na fragmenty, na něž se nalignují adaptory (krátký úsek DNA se známou sekvencí, který má komplementární konec s koncem fragmentu po štěpení) 2. selektivní amplifikace fragmentů pomocí speciálních primerů a 3. elektroforéza produktů a počítačová analýza (Perkin, Elmer, 1995).

AFLP se označuje jako velice výkonná metoda, pomocí níž lze za velmi krátký čas zmapovat velké množství nových markerů. Má mnoho výhod: je založená na PCR, dá se zautomatizovat, je neradioaktivní, nemusíme znát žádné cílové sekvence studovaného organismu, výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé. Problémem však působí jejich kodominantní charakter (Caetano-Anollés, Gresshoff, 1997).

2.3.1.3.1 Microsatellites (SSRs nebo STRs nebo VNTRs)

Simple Sequence Repeats = Short Tandem Repeats – tandemová opakování krátkých motivů
Variable Number Tandem Repeats – variabilita v počtu tandemových opakování

Charakteristika a struktura

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů. Délka motivu je 2-, 3-, 4- nebo 6-bazí (např. motivy (CA)_n, (CAA)_n). Jsou přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80 kopií. V důsledku mutací nebo rekombinací se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit (Šmarda *et al.*, 2008).

Celková délka lokusu obvykle nepřesahuje 100 bp. Mikrosatelitové lokusy patří mezi nejvariabilnější oblasti genomu: polymorfismus je dán zejména rozdílem v počtu opakování základního motivu (n), což je patrně způsobeno „klouzáním“ DNA polymerázy během replikace (tzv. replication slippage), ale také změnami sekvencí v okolí mikrosatelitového lokusu.

Mikrosatelitové markery, získáme PCR reakcí s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly k oblastem ohraničující SSR – „flanking regions“. Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu a proto je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů. Jelikož je mezi jedinci počet repeticí značně variabilní, výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých PCR produktů, které jsou separovány. Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda *et al.*, 2008).

Sekvence primerů se získávají prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích (např. EMBL nebo GenBank, ty však obsahují především sekvence modelových organismů, kulturních plodin a hospodářských zvířat), nebo z již opublikovaných prací (např. v časopise *Molecular Ecology, Primer notes*) a nebo *de novo* izolací z genomových knihoven (Tautz, 1989).

Možností elektroforetické separace PCR produktů je několik: nejhorší rozlišení dostaneme na agarózovém gelu barveném etidium bromidem, polyakrylamidový gel barvený etidium bromidem má rozlišení lepší a sekvenační polyakrylamidový gel barvený stříbrem, nebo jsou stále častěji využívány k tomuto účelu automatické sekvenátory – v tomto případě se používají značené primery, které analýzy prodraží. Výhodou je však přesná separace a identifikace a rozlišení alel (velikost produktů se, např. u dinukleotidových motivů, může lišit třeba jen o 2 báze) (Wang *et al.*, 2009)

Mezi nesporné výhody, díky kterým mikrosatelity získávají stále větší oblibu, patří vysoká druhová proměnlivost, a to i u druhů prakticky monomorfních pro alozymové lokusy; velká početnost a rozmístění po celém genomu; kodominantnost alel a možnost jejich přesné identifikace a jednoduchost analýzy (studie pomocí PCR při znalosti primerů). Bohužel pro většinu organismů žijících v přírodních populacích jsou sekvence primerů zatím neznámé. Některé mikrosatelitové lokusy však leží v těsné blízkosti kódujících oblastí nebo jsou přímo jejich součástí, a proto jsou velmi konzervované. Podle mnoha současných prací (např. Primmer *et al.*, 1999) se zdá, že takovýchto konzervativních mikrosatelitových lokusů existuje mnohem více, než se původně myslelo. Logika věci však napovídá, že čím bude daná oblast konzervativnější, tím menší polymorfismus bude vykazovat. Když se rozhodneme studovat nový druh, můžeme tedy nejprve vyzkoušet tzv. cross-taxa/species amplifikaci, kdy použijeme známé primery z jiného, již známého druhu (samozřejmě fylogeneticky co nejpříbuznějšího).

Naopak jejich hlavní nevýhodou je, že je musíme nejprve nalézt a identifikovat vhodné primery pro jejich amplifikaci, což je pracné a časově i finančně náročné. Vzhledem k tomu, že většina mikrosatelitů se nachází v nekódujících oblastech genomu, který je charakteristický vysokou frekvencí nukleotidových substitucí, je zpravidla jednotlivé lokusy izolovat *de novo* pro druh, které jsou zkoumány poprvé (Muclinger, 2009). Provádí se izolací mikrosatelitů z genomových knihoven a zahrnuje tyto kroky: 1. konstrukce genomové knihovny, 2. detekce pozitivních klonů pomocí hybridizace s mikrosatelitovou sondou, 3. sekvenování pozitivních klonů a 4. návrh primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů a 5. testování primerů.

2.4 Aplikace a využití mikrosatelitů (SSR)

Aplikační možnosti mikrosatelitů jsou obrovské a spektrum jejich využití se stále rozšiřuje. Díky vysoké početnosti a celogenomové distribuci nacházejí široké uplatnění především v mapování genomu, jejich vysoká proměnlivost z nich činí účinný nástroj forenzních analýz, individuálního typování jedinců v populaci, určování paternity, velikosti a struktury populace, genetické proměnlivosti, toku genů (mikrosatelity specifické pro chromosom Y umožňují srovnání míry migrace samců a samic) a i v ochraně přírody (Muclinger, 2009).

Po roce 2000 se rapidně zvyšuje počet publikovaných prací, které se týkají aplikace mikrosatelitů v mykologii. Práce už nejsou zaměřeny pouze na identifikaci jedinců a jejich záběr se rozšiřuje i na genetické studie populací, mapování genomu jednotlivých druhů hub apod. (Khachatourians et Arora, 2004). V této době se rovněž začínají objevovat články týkající se studia patogenní houby *B. bassiana* a příbuzného patogena *B. brogniarti*: Molekulární výzkum genetické příbuznosti a populační struktury *B. bassiana* (Wang et al, 2003). Druhově specifické mikrosatelitní markery u entomopatogenních hub *B. brogniarti* (Enkerli et al, 2001). Izolace a charakterizace mikrosatelitových lokusů u entomopatogenních hub *B. bassiana* (Rehner, Buckley, 2003). Charakterizace entomopatogenních hub založených na PCR pro ekologické studie s využitím mikrosatelitových markerů pro biologickou ochranu (Meyling, 2008). Aplikace mikrosatelitů je však popisována i u jiných patogenních hub jako *Metarhizium anisopliae*, zjištění vnitrodruhové diferenciaci pomocí RAPD, SSR a ITS markerů (Velásquez et al, 2007), nebo *Paecilomyces fumosoroseus*, na základě mikrosatelitové variability zjištění genetické diverzity a populační struktury (Gauthier et al, 2007).

2.5 Separační techniky

Po PCR amplifikaci vznikají amplifikované fragmenty, jež jsou separovány nejčastěji pomocí gelových elektroforetických technik, ale jak už bylo zmíněno začínají se používat čím dál více jiné techniky, jako automatické sekvenátory či nově čipová elektroforéza.

Tradiční agarózový gel a polyakrylamidový gel jsou široce využívány v analýze mikrosatelitů (SSR) (Wang et al., 2009).

Kapilární elektroforéza se velice používá v SSR a AFLP analýze ((Wang et al., 2009). Nejvíce využívaná kapilární elektroforéza je CEQTM 8000 (CEQ 8000: Genetic Analysis System, Beckman Coulter, USA) a ABI 3100xl DNA sekvenátor (ABI 3100xl: Applied Biosystems, USA).

Kapilární elektroforézy v kombinaci s použitím fluorescenčně značených primerů poskytují vysokou citlivost detekce amplifikovaných DNA fragmentů. Nicméně náklady na přístroje a činidla, fluorescenčně značené primery a příprava vzorků jsou mnohem vyšší než pro rutinní analýzu mikrosatelitů (Wang et al., 2009).

2.5.1 Gelová elektroforéza

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 – anodě (Šmarda *et al.*, 2008).

Vhodným nosičem je zde právě gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji agaróza a polyakrylamid, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru (Šmarda *et al.*, 2008).

Agarózová elektroforéza

Jedná se o nejjednodušší a nejběžnější způsob, jak oddělit molekuly nukleových kyselin. DNA je vizualizovaná v gelu přidáním ethidiumbromid, který se silně vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA, pohlcuje ultrafialové záření a červeně fluoreskuje (Lewis, 2009).

Agarózový gel je vhodný pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kb (Šmarda *et al.*, 2008). Výhoda tohoto gelu spočívá v jeho netoxičnosti a jednoduché přípravě.

Pro elektroforézu nukleových kyselin se používají gely obsahující 0,8 až 4 % agarosy. Čím je obsah polysacharidu vyšší, tím je lepší rozlišovací schopnost gelu, ale tím také probíhá elektroforéza pomaleji a příprava gelu se stává technicky náročnější.

Elektroforéza se synergelem

Jako synergel se označuje typ gelu, který se velice dobře váže na agarosu a vytváří kombinaci synergel-agarosový gel. Tato kombinace je ve srovnání s čistým agarosovým gelem mnohem účinnější při separaci fragmentů DNA. Bandy bývají více zaostřeny, a synergel umožňuje i lepší fotodokumentaci.

2.5.2 Čipová elektroforéza

Čipová elektroforéza (obr. 4) využívá mikrofluidní (mikrokapalinovou) technologii k rozvoji proteomické a genomické expresní analýzy. Používá se k analýze proteinů, RNA

a DNA. Centrem systému je mikrokapalinový čip a systém se skládá ze separace, detekce a analýzy dat.

Čipová elektroforéza se vyznačuje velmi dobrou reprodukovatelností výsledků. Přínosem metody je minimalizace vlivu subjektivního lidského faktoru a rovněž minimalizace rizika kontaktu obsluhy s rizikovými toxickými chemikáliemi (Štulík, Zima, 2008).

Všechny operace (kromě nanesení gelů a vzorků do jamek čipu) probíhají automatizovaně včetně vyhodnocení výsledků ve formě virtuálních gelů nebo elektroforetogramů, včetně kvantitativního stanovení a uvedení molekulové hmotnosti (Sýkorová, Bradová, 1996,2002).

Používáme kit od Bio-Rad Experion DNA 1K kit, jenž v kombinaci čipu a přesného DNA laddaru obsaženého v kitu, zvyšují rozlišovací schopnost separace, přesné zjištění velikosti DNA a přesné zjištění množství DNA ve vzorku.

Ekonomicky tato metoda samozřejmě představuje dosti vysoké pořizovací náklady na aparaturu i na nutný spotřební materiál (čipy a chemikálie), jedná se však o kvalitativně vyšší úroveň, jak z hlediska úspory času a pracnosti, objektivnosti výsledků, tak i bezpečnosti práce (Sýkorová, Bradová, 1996, 2002).



Obr. 4: Experion Automated Electrophoresis Systém, Bio-Rad.

2.5.3 Kapilární elektroforéza v automatickém sekvenátoru (fragmentační analýza)

Kapilární elektroforéza (CE) je vysokoúčinná analytická separační metoda, která umožňuje separaci, identifikaci a kvantifikaci nabitých iontů i neutrálních molekul, neboť zahrnuje několik elektroforetických technik lišících se svým separačním mechanismem a je doplněna fluorescenčním detektorem. Je založena na získání DNA fragmentů PCR reakcí s jedním nebo více páry primerů, kdy jeden primer z páru je fluorescenčně značený. Na 5' konci jsou „forward“ primery značené fluorescenčním barvivem (NED, 6-FAM, HEX, ROX) (Missiaggia, Grattapaglia, 2006). PCR fragmenty jsou analyzovány na určitém sekvenátoru (v našem případě ABI 3130, Applied Biosystems) a data jsou vyhodnoceny pomocí softwaru GeneMapper, kdy výstupem je elektroforeogram, ve kterém lze zjistit délku fragmentů a v SSR analýze lze rozlišit homozygoty a heterozygoty (Bergem, 2005).

Jednotlivé fragmenty DNA jsou elektroforézou v kapiláře rozděleny podle délky a při průchodu laserovým paprskem dojde k vyzáření signálu, jenž je zaznamenán detektorem. Pokud se jednotlivé lokusy výrazně liší délkou nebo typem fluorescenčního značení, můžeme jich analyzovat několik současně. Spolu s každým vzorkem je v analyzované směsi i velikostní standard. Jedná se o směs fragmentů o známé délce, jež umožní přepočítání elektroforetické rychlosti na délku jednotlivých fragmentů.

Příprava vzorku na fragmentační analýzu probíhá následujícím způsobem. PCR produkty jsou smíchány s 11 μ l formamidu a 0,5 μ l velikostního standardu (Fornůsková, 2007).

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

3.1.1 Použité kmeny

V této studii byly použity kmeny *Beauveria bassiana* odebrané z oblasti NP Šumava (tab. 1) a kmeny *B. bassiana* z KRNAP a z celého světa (tab. 2).

Tyto kmeny byly poskytnuty oddělením rostlinolékařství, katedra rostlinné výroby na Zemědělské fakultě v Českých Budějovicích. Do studie byly zahrnuty i kmeny *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosoroseus* a kmeny Pk a Pm pocházející z jižní Moravy. Všechny kmeny byly dodány ze sbírky katedry rostlinné výroby Zemědělské fakulty JU. Tyto kmeny posloužily, vzhledem kvůli jejich znalosti produktů, které při PCR vytvářejí, ke srovnání a vzájemnému odlišení. Některé vzorky do studie vstupovaly jako *B. bassiana* a na základě analýzy SSR a r DNA došlo k správnému zařazení.

Jednotlivé vzorky z NP Šumava byly izolovány převážně z dospělce lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*), pouze malý zlomek, z jeho larev, z půdy a z kůry stromů. U vzorků patřící do skupiny ostatní kmeny, nebyl znám zdroj.

Tab. 1: Seznam použitých kmenů *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* – odebrané kmeny v roce 2008 v NP ŠUMAVA

OZNAČENÍ PRO GENETICKOU ANALÝZU	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
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, Střelecký 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>Beauveria brongniartii</i>	Stožeček
IFR	NP0056 <i>Isaria fumosorosea</i>	V kotli

Izoláty reizolované z lokality Černá Hora, kde byl aplikován kmen Bba I 101		
47	A-Bba I 101-001	Černá hora
48	A-Bba I 101-002	Černá hora
49	A-Bba I 101-003	Černá hora

Tab. 2: **OSTATNÍ KMENY**

OZNAČENÍ PRO GENETICKOU ANALÝZU	OZNAČENÍ VE SBÍRCE	PŮVOD/LOKALITA
PFR	PFR 97 Florida	Biopreparát PREFERAL
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
KR 9	KR 0009	ČR – KRNAP, Na Kouli
KR 14	KR 0014	ČR – KRNAP, Lví důl
KR 16	KR 0016	ČR – KRNAP, Červená Hora
KR 19	KR 0019	ČR – KRNAP, Na Kouli
Pol	A24	Polsko
USA	Bba 01	Spojené státy americké, FL
Rum	A32	Rumunsko
Col	A133	Kolumbie
Fr	A135	Francie
Sk08	T08	Slovensko - Tatry
SSSR	A131	Rusko
Švéd	A36	Švédsko
Sk01	T01A	Slovensko - Tatry
Č	A74	Čína
Ind	A52	Indie

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace a sterilní práce

Živná média, mikrobiologické sklo a nástroje byly sterilizovány v autoklávu při 120°C, 0,1 MPa, 30min. Sterilní práce byly prováděny v laminárním boxu.

3.2.2 Příprava středových kultur a příprava zásoby materiálu pro metodiku

Z oddělení rostlinolékařství KRA ZF JČU byly obdrženy povrchové čisté kultury kultivovány na PDA plotnách, staré 21 dní.

Příprava pro dlouhodobé uchování mycelia

V první řadě byl namíchán roztok 20% glycerolu s 5% Tween 80 a poté byl zautoklávován. Podle příslušného postupu bylo připraveno živné médium PDA. Po zautoklávování bylo živné médium rozlito na plotny. Dodané kmene byly rozočkovány paralelně (2 plotny od každého kmene): očkovací kličkou bylo přeneseno inokulum na střed plotny a plotny byly zabezpečeny parafilmem proti kontaminaci. Naočkované plotny byly kultivovány při 25°C po dobu 21 dní.

Výchozí kultura byla přelita roztokem glycerolu a Tweenu a za pomoci očkovací kličky bylo mycelium a spory smyto z povrchu plotny. Smyté mycelium bylo přeneseno pipetou do předem označených kryoprezervačních zkumavek, které byly umístěny pro uchování v mrazáku při -80°C.

Příprava zásoby mycelia pro izolaci DNA

Z nakultivovaných ploten od každého kmene bylo pomocí skalpelu odebráno mycelium do mikrocentrifugačních zkumavek o navážce 100-150mg (pro každý kmen byly naváženy 2-3 zkumavky). Tyto myceliální zásoby byly umístěny do mrazáku a uchovávány při -20°C.

Složení a příprava živného média PDA (Potato-Dextrose Agar)

- § Bramborová infuze 200g/l
- § Dextrosa 20g/l
- § Agar 15g/l

Konečné pH (při 25°C) 5,6 ± 0,2

Příprava: Do objemu 300ml destilované vody bylo naváženo 11,7 g PDA a tato směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Sterilizace viz. výše.

Chemikálie

- § PDA, výrobce: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd
- § Glycerin bezvodý p.a., výrobce: Lach-Ner
- § Tween 80

Přístroje

- § Laminární box Biohazard box ST VBH, autokláv, termostat, předvážky
- § Petriho misky, jednorázové očkovací kličky, skalpel, buničina, Erlenmayerovy baňky, parafilm, 2 ml kryoprezervační zkumavky, 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, sada automatických pipet, špičky

3.2.3 Izolace genomové DNA

Izolace byla provedena pomocí DNeasy Plant mini Kitu (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 koloně dochází k zachycení DNA jejím následnému vymytí elučním roztokem (Čurn *et al.*, 2008).

Protokol:

1. Do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek odvážíme z myceliálních zásob 100 mg mycelia. Mycelium rozdrtíme přímo v centrifugačních zkumavkách pomocí homogenizátorek.
2. K homogenizovanému vzorku přidáme 400 µl pufru AP1 předeštěného na 65°C a 4 µl RNázy A. Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při 65°C, během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2-3x převrátíme.
3. Přidáme 130 µl pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu.
4. Lyzát přepipetujeme do QIAshredder mini spin kolonek v 2 ml mikrocentrifugačních zkumavkách a centrifugujeme 2 min. při max. 14000 rpm.
5. Přefiltrovaný supernatant přeneseme do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450 µl supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.

6. Přidáme 1,5 x dílu AP3/E, tedy při objemu supernatantu 450 μ l přidáme 675 μ l AP3/E, promícháme pomocí pipety.
7. 650 μ l směsi z kroku 6 přepipetujeme do DNeasy mini spin kolonek v 2 ml mikrocentrifugačních zkumavkách, centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
8. Opakujeme krok 7 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i s mikrocentrifugačními zkumavkami.
9. DNeasy mini spin kolonky z kroku 8 umístíme do nových 2 ml mikrocentrifugačních zkumavek, přidáme 500 μ l pufru AW, centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
10. Přidáme 500 μ l pufru AW opět do DNeasy mini spin kolonek, centrifugujeme 2 min. při max. 14000 rpm, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační kolonky. DNeasy mini spin kolonky opatrně vyndáme z mikrocentrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku pufrem obsaženým ve filtrátu.
11. Ty samé DNeasy mini spin kolonky přeneseme do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 μ l pufru AE zahřátého na 65°C přímo na membrány kolonek, necháme inkubovat 5 min. při RT a poté centrifugujeme 1 min. při 14000 rpm.
12. Eluci můžeme zopakovat do nových mikrocentrifugačních zkumavek.

Chemikálie

- § Kit DNeasy Plant mini QIAGEN (roztoky a kolonky)
- § Ledová tříšť
- § Ethanol
- § dH₂O

Přístroje

- § Chlazená centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátorky, vortex, třepací vodní lázeň, termostatický blok, analytické váhy

Včetně této metody byly testovány i jiné, jako izolace DNA pomocí kitu INVITEK, izolace DNA pomocí CTAB, nebo i CTAB-SDS izolace, ale následným měřením koncentrace a čistoty genomické DNA, byla metoda izolace pomocí kitu QIAGEN zvolena jako nejvhodnější, a vyizolované množství DNA jako dostačující pro analýzu SSR.

Extrakce DNA je a byla u hub velice problematická, vyplývá to z jejich chemického složení. Buněčná stěna se skládá z polysacharidů, chitinu, celulózy, linin-like struktury, tuků, vosků a barviv. Pigmenty je chrání před účinkem UV záření. Všechny tyto složky působí jako rušivé elementy při izolaci a je složité je eliminovat. Dále je obtížné mechanicky narušit buněčnou stěnu a tím získat velké množství čisté genomické DNA.

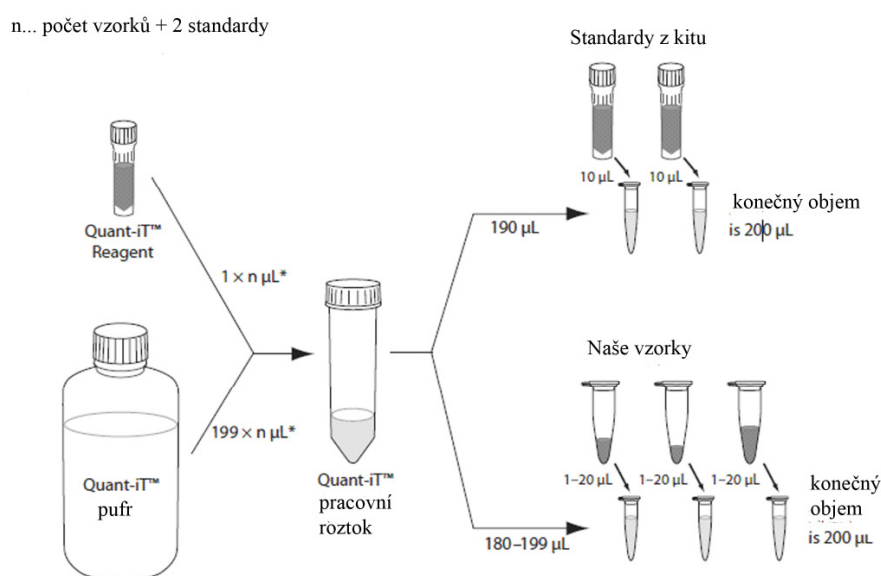
3.2.4 Měření koncentrace vyizolované genomické DNA

Koncentrace genomické DNA byla měřena pomocí fluorimetru kitem Quant-iT™ dsDNA HS Assays Kit, 500 assays

Čistota a koncentrace DNA se zjistí spektrofotometricky na fluorimetru. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm (ideální poměr $260/280 = 1,8$). Při znečištění vzorku proteiny bude vypočtený poměr výrazně nižší (Vlášková, Trešlová, 2008).

Protokol

- § Pufr, reagent a dva standardy důkladně vortexujeme a dále postupujeme přesně podle schématu (obr. 5), pipetujeme 5 μ l DNA podle toho se volí další objemy:



Obr. 5: Postup přípravy vzorků na měření koncentrace DNA

- § Po napipetování, 2-3 s vortexujeme, necháme inkubovat 2 min. při pokojové teplotě.
- § Zkalibrujeme fluorimetr pomocí standardu 1 a 2 a měříme koncentrace u jednotlivých vzorků.

Chemikálie

§ Quant-iT™ dsDNA HS Assays Kit, 500 assays (reagent, pufr, standardy)

Přístroje

§ Fluorometr Qubit™ Invitrogen, vortex

§ Sada automatických pipet, mikrocentrifugační zkumavky

3.2.5 Analýza mikrosatelitů SSR

Pro SSR analýzu u *Beauveria bassiana* byly použity následující primerové páry (tab. 3). Tyto primery byly již použity v jiných studiích prováděných na Biotechnologickém centru Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, při nichž byly optimalizovány jejich nasedací teploty a celkový průběh PCR reakce.

Tab. 3: Sekvence primerů používaných v SSR analýze u *Beauveria bassiana*

Primer	Sekvence	Teplota nasedací
01	F: CCAACCCAATCAATCGTCAT R: GAGAGGCGGAGCTAAGCA	54 °C
02	F: AACGCTATGCCTTGACGAC R: GACGCCGAGCAATGTAACA	54 °C
03	F: GCATAGATATGTCTCGCACC R: ACTACCCCTGTCCCGCTGA	54 °C
06	F: GCGATTGACGAAAAGCTAGA R: ACTTGCTTTGCTGTTGCACA	54 °C
08	F: TGTTGCCGACACGAATTGT R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	56 °C
12	F: GGGTCCATCATGTACGGC R: AGGCGTATACAGGTCGTG	56 °C
13	F: CAGGCAACAACACGATTTCA R: ATGCCATCTACGACTTTATGA	56 °C
1F4	F: GATCCTTCGTCACCTGCTC R: CGGTGTTGGAGAGCTATTGT	58 °C

2F8	F: GCACACTTTCGCGTGTCAT R: ATGATGTCTGCCACGTCTGA	58 °C
10D4	F: TCTCCATTCCATATATCCAAGC R: ACGCTGTTGCCGTAGTAGTAGTC	58 °C
8D6	F: TTTGTCCGAAGTTGTCTCAGT R: TGCATTGTGAAAGGTAATGC	58 °C

PCR reakce probíhá v objemu 25µl za použití pro analýzu PPP Master Mixu (Top-Bio s.r.o.). PPP Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, µM dGTP, 400 µM dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

Schéma pipetování

- § 12,5 µl PPP Master Mixu
- § 10,5 µl dH₂O (do objemu 25 µl)
- § 0,5 µl primer F
- § 0,5 µl primer R
- § 1 µl DNA

1. Všechny chemikálie promícháme na vortexu.
2. Napipetujeme PPP Master mix, dH₂O, oba primery a nakonec templátovou DNA podle schéma pipetování.
3. Po napipetování směsi krátce centrifugujeme.
4. Provedeme PCR s teplotním profilem dle daného primeru.

Amplifikace probíhala v termocykleru BIOER XP CYCLER při následujícím teplotním profilu:

- § Počáteční denaturace 2 min. 95°C
- 35 x
- § Denaturace 30 s 94°C
 - § Annealing 30 s 54, 56, 58°C dle příslušného primeru
 - § Elongace 1 min. 72°C
-
- § Konečná elongace 5 min. 72°C
 - § Závěrečné zchlazení na ∞ 4°C

Chemikálie

- § PPP Master mix
- § PCR dH₂O
- § primery
- § templátová DNA

Přístroje

- § Termocykler BIOER XP CYCLER
- § Vortex
- § Centrifuga
- § Chladnička

3.2.6 Detekce a separace PCR produktů (SSR)

DETEKCE

U **gelové elektroforézy** byly DNA fragmenty vizualizovány barvením pomocí ethidium bromid (EtBr). Váže se dovnitř dvoušroubovice DNA a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje (Čurn *et al.*, 2008). Bylo použito i barvení pomocí SYBR GREEN. Jedná se však o barvivo, které ovlivňuje mobilitu DNA v gelu v závislosti na její koncentraci. Tudíž při analýze vzorků s různou koncentrací DNA ovlivňuje toto barvivo možnost detekce správné velikosti fragmentů. Z tohoto hlediska bylo upřednostněno barvení pomocí EtBr.

U **čipové elektroforézy** je součástí kitu DNA 1K pro vizualizaci DNA fragmentů “DNA stain gel“, který obsahuje fluorescentní barvivo.

U **fragmentační analýzy** byly pro vizualizaci DNA fragmentů (SSR) použity značené primery fluorescenčními barvivy 6-FAM, VIC, NED a PET.

SEPARACE

Elektroforéza v 2% agarózovém gelu

Příprava gelu

1. Připravíme si vanu s hřebínkem, vyvážíme, vana musí být dokonale vyrovnaná.
2. Gel o objemu 200ml: 4 g agarózy se smíchá s 200 ml 1xTBE pufru v Erlenmayerově baňce, zamícháme a rozvaříme v mikrovlnné troubě na max. výkon (doba podle potřeby – nesmí se vytvářet vlákna, agaróza musí být dokonale rozvařena), během rozvaření několikrát s Erlenmayerovou baňkou zamícháme.
3. Roztok agarózy zchladíme, přidáme 4 μ l EtBr, důkladně promícháme.
4. Agarózu lijeme do vaničky opatrně a hlavně bez bublin (bubliny se musí eliminovat). Po nalití do vaničky umístíme hřebínek a gel necháme tuhnout cca 30 min.
5. Poté vyndáme hřebínek a nanášíme vzorky do jamek v gelu.

Nanášení vzorků a elektroforéza

1. Vzorky nemusíme barvit nanášecím pufrem (LB), protože PPP Master Mix obsahuje barvivo.
2. Elektroforetickou vanu naplníme dostatečným množstvím pufru 1x TBE.
3. Vzorky nanášíme postupně do jamek v gelu, po stranách nanese marker DNA ladder 12 μ l, gel se vzorky poté opatrně vložíme pod hladinu pufru do elektroforetické vany.
4. Elektroforéza běží nejdříve při 40V cca 10 min a pak zvýšíme na 70 V po dobu 2,5 hodiny.

Elektroforéza v 3% Synergelu

Příprava gelu

1. Připravíme si vanu s hřebínkem, vyvážíme, vana musí být dokonale vyrovnaná.
2. Gel o objemu 200 ml: navážíme si 2,3 g Synergelu a 1,4 g agarózy do Erlenmayerovy baňky, přidáme abs. ethanol – rozmícháme (nesmí se tvořit hrudky), přidáme 200 ml 0,5x TBE pufru a rozvaříme v mikrovlnné troubě na mírnější výkon než agaróza.
3. Roztok Synergelu nezchlazujeme, přidáme 4 μ l EtBr, důkladně promícháme.
4. Nalijeme do vany bez bublin a vložíme hřebínek, necháme tuhnout tak cca 60 min.
5. Poté vyndáme hřebínek a nanášíme vzorky do jamek v gelu.

Nanášení vzorků a elektroforéza

- § Stejně jako u elektroforézy v agarózovém gelu, pouze výjimka: do elektroforetické vany lijeme 0,5x TBE pufr

Chemikálie pro obě elektroforézy

- § Agarosa SERVA Electrophoresis GmbH
- § Synergel DIVERSIFIED BIOTECH
- § 1x,0,5x TBE (TRIS, kyselina boritá, 0,5M EDTA pH 8, dH₂O)
- § Absolutní ethanol MERK
- § Marker DNA ladder (10μl dH₂O + 2μl LB + 1μl ladder) NEB
- § EtBr (10mg Ethidium bromidu rozpuštěn v 1 ml dH₂O) SERVA

Přístroje pro obě elektroforézy

- § Předvážky, horizontální elektroforéza, zdroj napětí, mikrovlnná trouba, vortex
- § Sada automatických pipet, Erlenmayerovy baňky

Čipová elektroforéza Experion™ DNA 1K Kit

Protokol

1. Zapneme elektroforézní stanici a spustíme software.
2. Před použitím všechny používané reagenty v kitu vytemperujeme na pokojovou teplotu (cca 15-20 min.), poté vortexujeme a krátce centrifugujeme. DNA barvivo udržujeme v alobalu proti vypařování a přesvědčíme se, že je zcela rozmrazeno.
3. DNA ladder umístíme na led.
4. Příprava DNA barveného gelu (stain gelu): přidáme 12,5 μl DNA barviva do zkumavky s 250 μl gelu, důkladně vortexujeme cca 10 s, krátce centrifugujeme, přelijeme barvený gel do rotačně filtrovací zkumavky, centrifugujeme při 2400 rpm 15 min, zkontrolujeme zda gel prošel filtrem, filtr vyhodíme a obalíme zkumavku alobalem.
5. Příprava čipu: čip vyjmeme z balení a umístíme na dokonale čistou a rovnou plochu, napipetujeme 9 μl gelu s barvivem do tmavě zelené jamky GS, čip umístíme do nastřikovací stanice a zapneme program C3, cca 60 s, po nástřiku čip vyjmeme a ze spodní strany zkontrolujeme, zda se mikrokanálky zaplnily gelem s barvivem (jeví se jako matné), poté do zbývajících třech jamek označených GS na čipu napipetujeme 9 μl gelu s barvivem.

6. Nanášení vzorků na čip: připravíme si premixy pro vzorky: do každé z 12 mikrocentrifugačních zkumavek napipetujeme 6 μl LB a do 11 zkumavek 1,2 μl každého PCR vzorku a do poslední 1,2 μl DNA ladderu, tyto mixy napipetujeme do jamek na čipu označených čísly pro vzorky a do jamky označené L napipetujeme mix s DNA ladderem.
7. Napipetovaný čip vložíme opatrně do elektroforézní stanice, vybereme 1K DNA analýzu, označíme počet vzorků pro analýzu a zahájíme začátek analýzy (cca 40 min).
8. Po proběhnutí analýzy čip vyndáme, vložíme čistící čip s 800 μl dH₂O a necháme elektrody elektroforézní stanice čistit cca 60 s.

Podmínky pipetování čipové elektroforézy

- § dodržujeme kolmé a opatrné pipetování
- § kontrolujeme nepřítomnost bublin
- § dodržujeme správnou manipulaci s čipem k zamezení kontaminace
- § práce v rukavicích

Chemikálie

- § ExperionTM DNA 1K kit (DNA ladder, DNA barvivo, DNA gel, LB)
- § dH₂O
- § ledová tříšť

Přístroje a vybavení

- § Elektroforézní stanice, nastříkovací stanice, vortex stanice, software, mikrocentrifuga, vortex
- § DNA čipy, čistící čip
- § Sada automatických pipet, sterilní špičky, alobal

Fragmentační analýza

Pro tuto analýzu byly vybrány pouze čtyři primerové páry (tab. 4) ze sady používaných pro analýzu SSR. Používají se F primery, které jsou fluorescentně značené.

Tab. 4: **Sekvence primerů používaných pro fragmentační analýzu SSR u *Beauveria bassiana***

Primer	Sekvence	Teplota nasedací
02 žlutá	F: AACGCTATGCCTTGACGAC 6-FAM R: GACGCCGAGCAATGTAACA	54 °C
03 oranžová	F: GCATAGATATGTCTCGCACC VIC R: ACTACCCCTGTCCCGCTGA	54 °C
08 červená	F: TGTTGCCGACACGAATTGT NED R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA	56 °C
12 fialová	F: GGGTCCATCATGTACGGC PET R: AGGCGTATACAGGTCGTG	56 °C

Schéma pipetování a postup plně odpovídá analýze SSR.

Výjimka nastává v použití v Master Mixu, kdy u FA byl použit Plain Master Mix, který neobsahuje detekční barvivo pro separaci fragmentů na gelu.

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l za použití Plain Master Mixu (Top-Bio s.r.o.). Plain Master Mix se dodává 2x koncentrovaný: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva . Plain Master Mix je vhodný pro rutinní analýzu produktů PCR reakcí pomocí automatických detektorů (kapilární chromatografie, real-time PCR, atd.)

Amplifikace probíhala v termocykleru BIOER XP CYCLER při stejném teplotním profilu s výjimkou použitých počtu cyklů, který byl na základě testů optimalizace snížen z 35 na 30 cyklů.

Testy optimalizace PCR reakce probíhali v několika kombinacích se zvyšováním a snižováním objemu DMSO, BSA a MgCl₂ v kombinaci se snižováním cyklů.

Za nejlepší optimalizaci bylo zvoleno snížení cyklů z 35 na 30 na základě separace PCR produktů na gelu.

Příprava PCR produktů pro fragmentační analýzu ABI 3130, Applied Biosystems

- § 1 µl PCR produktu se značeným primerem
- § 0,5 µl standard
- § 11 µl formamid

Chemikálie

- § Plain Master Mix
- § F značené primery (Ba 02, 03, 08, 12) a R primery
- § Templátová DNA
- § PCR dH₂O
- § Formamid
- § Size Standard Gene ScanTM – 500 LIZTM

Přístroje

- § Termocykler BIOER XP CYCLER
- § Vortex
- § Centrifuga
- § Chladnička
- § ABI 3130, Applied Biosystems

3.2.7 Digitální obrazová analýza a statistické hodnocení dat

Komplexní počítačové zpracování gelu při využití digitálního fotoaparátu jako součásti Gel documentation systém. Po digitalizaci zpracováváme gely pomocí speciálního software Bioprofil 1D++ (Vilber Lourmat, France), TotalLab TL100 (Nonlinear Dynamics, Velká Británie), GeneMapper (Applied Biosystems, USA) a Experion Software 2.1.

Pro účely hodnocení molekulárních markerů bylo využito statistické zpracování dat. Na základě digitální obrazové analýzy takto zjištěných pruhů na gelu a detekcí profilů v histogramech byly sestaveny matice přítomnosti/nepřítomnosti a bylo 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

Tato kapitola bude vložena po vydání vědecké publikace.

5. Závěr

Pro volbu vhodné metody izolace DNA pro následnou analýzu mikrosatelitových markerů byla zvolena metoda pomocí kitu od firmy QIAGEN. Tato metoda se prokázala jako velmi optimální pro izolaci kvalitní a čisté DNA a její množství bylo dostačené a reprodukovatelné pro analýzu mikrosatelitů.

Na základě porovnání 4 separačních metod: elektroforézy na 2% agarózovém gelu, elektroforézy na 3% synergelu, čipové elektroforézy a fragmentační analýzy, byla jako nejlepší, nejpřesnější a nejcitlivější metoda pro separaci a detekci mikrosatelitových markerů vyhodnocena fragmentační analýza. Jedinou menší překážkou byla vyšší finanční stránka. Vyplynulo doporučení, že pro podobné studie, u kterých by bylo vhodné se do budoucna zaměřit na ekonomickou stránku fragmentační analýzy, protože z hlediska přesnosti a citlivosti separace SSR nemá tato metoda konkurenci.

Z tohoto důvodu byla pro hodnocení genetické variability mikrosatelitních markerů celé populace kmenů *Beauveria bassiana* zvolena elektroforéza na 3% synergelu. I přes horší rozlišovací schopnost 3% synergelu byly získány obdobné výsledky jako na základě fragmentační analýzy.

V této studii na základě mikrosatelitových markerů nebyla prokázána genetická odlišnost kmenů *B. bassiana* pocházejících z NP Šumava. Poukázalo to na to, že kmen byl homogenní a že by bylo možné ho označit jako „lokální kmen“. Úspěšně byly kmeny z této oblasti odlišeny od kmenů odebraných z jiných zemích.

V biologické ochraně proti lýkožrotu smrkovému (*Ips typographus*) v lokalitách CHKO Šumava a NP Šumava v rámci projektu MZP SP/2d1/41/08 by mohlo mít toto zjištění velké využití v aplikaci kmene *Beauveria bassiana* odebraného z NP Šumava zpátky do této oblasti, než případná aplikace komerčního biopreparátu, u něhož by nebyl znám původ.

6. Literatura

BERGEM, M., ROSETH, A., LIEN, S., AAMODT, R., (2005): Quantitative Fluorescent PCR (QF-PCR) on microsatellites, a fast and quantitative method to assay chimeric DNA samples in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 37: 556- 563.

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.

CHAMBERS, G. K., MACAVOY, E. S., (2000): Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 126: 455-476.

CHARNLEY, A. K., COLLINS, S. A., (2007): Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. *Environmental and Microbial Relationships*.

CHEN, Y., CHEN, S., (2000): Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methylmethacrylate) substrates using a wire-imprinting method. *Electrophoresis* 21: 165-170.

CASTRILLO, L. A., UGINE, T. A., FILOTAS, M. J., SANDERSON, J. P., VANDENBERG, J. D., WRAIGHT, S. P., (2008): Molecular characterization and comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates (Ascomycota: Hypocreales) associated with the greenhouse shore fly, *Scatella tenuicosta* (Diptera: Ephydriidae). *Biological control* 45: 154-162.

ČURN, V., NOVÁKOVÁ, A., ŠIMÁČKOVÁ, K., KUBÁTOVÁ, B., (2008): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.), Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2008: 52 s.

DIRLBEKOVÁ, O., NESRSTA, M., DIRLBEK, J., (1991): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (*I.Deuteromycetes, Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Praha, 1991: 51s.

- EDEL, V., (1998): Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. *Laboratoire de Recherche sur la Flore Pathogène dans le Sol*: 1-20.
- ENKERLI, J., WIDMER, F., (2009): Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *BioControl*, (2010), 55: 17-37.
- ENKERLI, J., WIDMER, F., GESSLER, C., KELLER, S., (2001): Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycological Research* 105 (9): 1079-1087.
- FERNANDES, E. K. K., RANGEL, D. E. N., MORAES, A. M. L., BITTENCOURT, V. R. E. P., ROBERTS, D. W., (2007): Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 69-78.
- FORNŮSKOVÁ, A., (2007): Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopýrů. [Bakalářská práce]. Brno, 43 s. Masarykova Univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie.
- GAUTHIER, N., DALLEAU-CLOUET, C., FARGUES, J., BON, M., (2007): Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. *Mycologia*, 99 (5): 693-704.
- KATAOKA, M., INOUE, S., KAJIMOTO, K., SINOHARA, Y., BABA, Y., (2004): Usefulness of microchip electrophoresis for reliable analyses of nonstandard DNA samples and subsequent on-chip enzymatic digestion. *European Journal of Biochemistry* 271: 2241-2247.
- MASSIAGGIA, A., GRATTAPAGLIA, D., (2006): Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genetics and Molecular Research* 5 (1): 72-78.
- MEYLING, N. V., (2008): PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies. Department of Agriculture and Ecology. Faculty of Life Sciences. University of Copenhagen, Denmark.

- OVESNÁ, J., DRAŠNAROVÁ, Z., (2001): Identifikace transgenů v rostlinách, semenech a odvozených produktech. Osivo a sadba – V. odborný a vědecký seminář, Praha.
- ODENTHAL, M., BARTA, N., LOHFINK, D., DREBBER, U., SCHULZE, F., DIENES, H. P., BALDUS, S. E.,(2009): Analysis of microsatellite instability in colorectal carcinoma by microfluidic-based chip electrophoresis. *Journal of Clinical Pathology* 62: 850-852.
- PACCOLO-MEIRELLES, L. D., AZEVEDO, J. L., (1990): Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 57, 1991: 172-176.
- PERIKN, ELMER, (1995): AFLP™ Plant mapping kit protokol (P/N 402083).
- REAY, S. D., BROWNBRIDGE, M., CUMMINGS, N. J., NELSON, T. L., SOUFFRE, B., LIGNON, C., GLARE, T. R., (2008): Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biological control* 46: 484 – 494.
- REHNER, S. A., BUCKLEY, E. P., (2003): Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes* 3: 409-411.
- SABBAHI, R., MERZOUKI, A., GUERTIN, C., (2008): Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiorhynchus ovatus*. *Journal Applied Entomology* 132: 151–160.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N., (1985): Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAIKI, R. K., GEFFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, 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.

- SCHWARZENBACH, K., ENKERLI, J., WIDMER, F., (2009): Effects of biological and chemical insect control agents on fungal community structures in soil microcosms. *Applied Soil Ecology* 42: 54–62.
- SHI, W., FENG, M., (2004): Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Kontrol* 30: 165–173.
- SMITH, H.H., WILCOX, K., (1970): Restriction endonuclease from *Haemophilus influenzae*. *Journal of Molecular Biology* 51: 379-391.
- SOUTHERN, E. M., (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 503-517.
- ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně. Brno-Kraví Hora: 188s.
- TAUTZ, D., (1989): Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.
- VEGA, F. E., POSADA, F., AIME, M. C., PAVA-RIPOLL, M., INFANTE, F., REHNER, S. A., (2008): Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.
- VELÁSQUEZ, V. B., CÁRCAMO, M. P., MERINO, C. R., IGLESIAS, A. F., DURÁN, J.F., (2007): Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and molecular biology* 30, 1: 89-99.
- VLÁŠKOVÁ, H., TREŠLOVÁ, H., (2008): Izolace DNA. Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Sborník textů, Praha, 2008: 8-9.
- WANG, C., FAN, M., LI, Z., BUTT, T. M., (2004): Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology* 96: 861–870.

WANG, C., SHAH, F. A., PATEL, N., LI, Z., BUTT, T. M., (2003): Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structures of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology* 5 (10): 908-915.

WANG, X., RINEHART, T. A., WADL, P. A., SPIERS, J. M., HADZIABDIC, D., WINDHAM, M. T., TRIGIANO, R. N., (2009): A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *African Journal of Biotechnology* 8(11): 2432- 2436.

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 zdroje

BIOLOGICAL LIBRARY, (2009): *Beauveria bassiana* (Balsamo.-Criv.) Vuillemin 1912 [on-line], [cit. dle 6.9.2009].

Dostupné na <<http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id340556/>>

HERRINGTON, K., (2006): *Beauveria bassiana*. Missouri University of Science and Technology [on-line], [cit. dle 10.9.2009].

Dostupné na <http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2006/B_bassiana.htm>

KUBÁTOVÁ, A., (2006): *Hypocreales* –další anamorfy. Praha, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, [on-line], [cit. dle 21.9.2009].

Dostupné na <http://botany.natur.cuni.cz/system/files/atlas-mikroskop-saprofytnich-hub/3.14_hypocreales-ostatni.pdf>

LANDA Z., (1998): Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. AGRO-ochrana rostlin, 10:7 - 12. [on-lin], [cit. dle 21.3.2009]

Dostupné na

<<http://home.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/vyuka/clanky/agro.htm>>

LANDA, Z., (2000): Biologická ochrana rostlin [on-line][cit.dle 1.3.09].

Dostupné na

<<http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/vyuka/pp/biologochrostrl/>>

LANDA, Z., KŘENOVÁ, Z., VOJTĚCH, O., (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 86, 10, [on-line] [cit. dle 1.3.2009].

Dostupné na <<http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1988/133/>>

TURČÁNI, M., HLÁSNÝ, T., NAKLÁDAL, O., SITKOVÁ, Z., ZAJÍČKOVÁ, L., DUBROVSKÝ, M., HOLUŠA, J., HAJNALA, M., KULLA, L., JAKUŠ, R., (2009): Bioregulační komplex (houby, hlístice, predátoři a parazitoidi). Přehled patogenů vyskytujících se u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). *Lesy a klimatická změna*, [on-line], [cit. dle 21.9.2009]

Dostupné na

<http://www.climips.cz/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=95&limitstart=2>

LEWIS, M., (2009): Agarose gel electrophoresis (basic method). Department of Pathology University of Liverpool. [on-line], [cit. dle 15.2.2010].

Dostupné na <<http://www.methodbook.net/dna/agarogel.html>>

MAHR, S., (1997): The Entomopathogen *Beauveria bassiana*. Midwest Biological Control News. University of Wisconsin- Madison. VI, 10, [on-line], [cit. dle 6.9.2009].

Dostupné na <<http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf410.html>>

MUCLINGER, P., (2009): Molekulární markery. Studijní materiály. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta, [on-line], [cit. dle 14.2.2010].

Dostupné na <<http://web.natur.cuni.cz/~muncling/MOLE.DOC.>>

ON-LINE ZDROJ, (2009): Obrázek konidioforů s konidii *Beauveria bassiana*. University of Guelph [on-line], [cit. dle 24.9.2009].

Dostupné na <<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>>

POSADA, F. J., VEGA, F. E., (2005): A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Insect Biocontrol Laboratory*, [on-line], [cit. dle 24.9.09].

Dostupné na <<http://insectscience.org/5.37/>>

PRŮŠA, R., LÁNY, J., VEJVALKA, J., KARGER, V., KOTAŠKA, K., (1998): Elektroforetické metody. Multimediální učebnice DNA diagnostiky. 2. lékařská fakulta v Praze.

Dostupné na <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa7.htm>>

SÝKOROVÁ, S., BRADOVÁ, J., (1996,2002): Zhodnocení použitých metod identifikace odrůd bramboru, pšenice a ječmene z hlediska ekonomického a praktického využití ke kontrole odrůdové pravosti a odrůdové čistoty. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha. [on-line], [cit. dle 15.2.2010].

Dostupné na <<http://www.vurv.cz/files/Publications/Zhodnocenimetod.pdf>>

ŠEDRLOVÁ, A., (2008): Hmyzí biopesticidy. [Diplomová práce]. Brno, 85s. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, [on-line], [cit. dle 6.9.2009].

Dostupné na <http://is.muni.cz/th/124014/prif_m/Hmyzi_biopesticidy.txt>

7. Přílohy

Grafický list 1. *Beauveria bassiana* a lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)

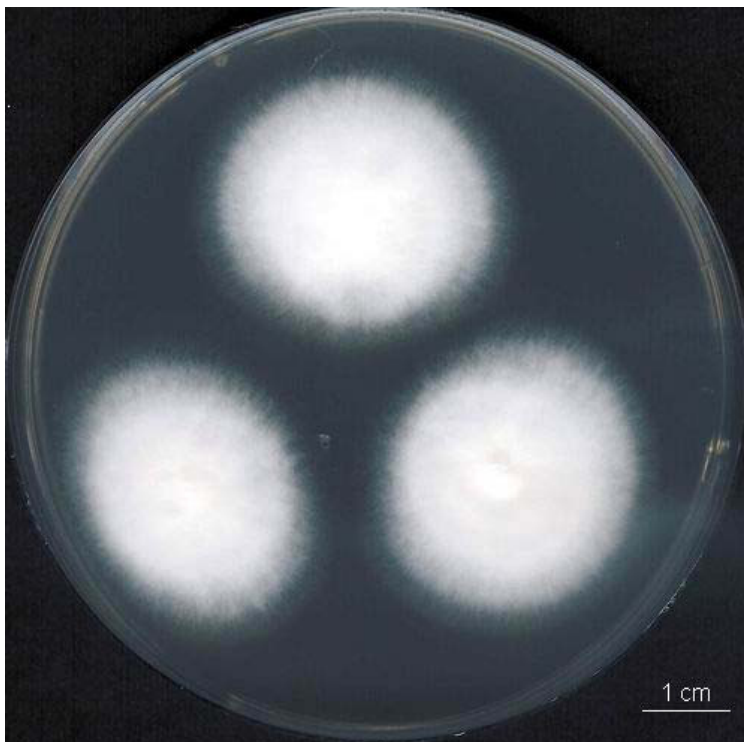
§ *Beauveria bassiana* – kolonie

§ Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) napaden houbou *Beauveria brongniartii*

Grafický list 2. Matice přítomnosti/nepřítomnosti „pruhů” pro vzorky na 3% synergelu
pro 4 primerové páry

Grafický list 3. Výstup z GeneMapperu, primer 02

Grafický list 1. *Beauveria bassiana* a lýkožrout smrkový (*Ips typographus*)



Obr. 1: *Beauveria bassiana* – kolonie na PCA 10 dní, kultivace při 25°C, Kubátová (2006).



Obr. 2: Lýkožrout smrkový (*Ips typographus*) napaden houbou *Beauveria brongniartii*

Grafický list 2. Matice přítomnosti/nepřítomnosti „pruhů” pro vzorky na 3% synergelu pro 4 primerové páry

	1	12	23	34	35	36	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	66	67	68	69	70	B5						
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

PFR	POL	USA	RUM	COL	FRA	SK08	SSSR	ŠVED	IND	Bbr	Pk	Pm	SK 01	Čína	IFR	KR 6	KR 7	KR 9	KR 14	KR 16	KR 19	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

Grafický list 3. Výstup z GeneMapperu, primer 02

Vzorek B5 jako zástupce kmenů *Beauveria bassiana* odebraných z NP Šumava a 3 kmény ze skupiny , označené jako ostatní kmény.

