

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní obor: Speciální produkce rostlinná

Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie

Téma disertační práce

**Polyfaktoriální hodnocení kmenů mitosporických hub
v systému řízených selekcí
(na modelu *Beauveria bassiana*)**

Autor:

Ing. Kateřina Šimáčková

Vedoucí práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

2011

Školitel: Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Grantová podpora: MSM a MZP60076658-06, MZP SP/2d1/41/08 a GACR 521/08/H042

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za pomoc a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu celého doktorandského studia. Stejně tak i celému týmu Biotechnologického centra, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za podporu a zázemí, které mi poskytli při řešení této práce.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 20.9.2011

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	3
2.1 Entomopatogenní houby	3
2.1.1 Obecná charakteristika	3
2.1.2 Klasifikace entomopatogenních hub	4
2.1.3 Vývojový cyklus vláknitých hub (<i>Deuteromycetes</i>).....	5
2.1.4 Rod <i>Beauveria</i> Vuillemin.....	6
2.1.4.1 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin.....	7
2.2 Morfologické markery (hodnocení fenotypu)	11
2.3 Molekulární markery	11
2.3.1 Techniky využívající restriční štěpení a hybridizaci.....	13
2.3.1.1 RFLP.....	13
2.3.2 Techniky založené na PCR reakci	13
2.3.2.1 I-PCR.....	16
2.3.2.2 Real Time – PCR (qRT PCR)	17
2.3.2.3 CAPS (PCR–RFLP).....	17
2.3.2.4 RAPD	17
2.3.2.5 Microsatellites (SSRs nebo VNTRs)	18
2.3.2.6 AFLP	19
2.3.3 Techniky sekvenování DNA.....	21
2.3.3.1 Chemická metoda sekvenování – Maxamovo-Gilbertovo sekvenování.....	22
2.3.3.2 Enzymová metoda sekvenování – Sangerovo sekvenování	22
2.3.3.3 Ribozomální RNA a její podjednotky	24

2.3.3.4 ITS regiony.....	25
2.3.4 Separační techniky	26
2.3.4.1 Gelová elektroforéza.....	26
2.3.4.2 Čipová elektroforéza	27
2.3.4.3 Kapilární elektroforéza v automatickém sekvenátoru	29
2.3.5 Molekulární markery u hub	29
2.3.5.1 RAPD.....	31
2.3.5.2 SSR.....	32
2.3.5.3 AFLP.....	33
2.3.5.4 Ribozomální RNA a její podjednotky.....	34
2.3.5.5 Analýza ITS regionů	35
2.4 Využití <i>Beauveria bassiana</i> v praxi – biologická ochrana rostlin	36
3. Cíle.....	41
4. Materiál a metody.....	43
4.1 Použitý materiál	43
4.2 Metody.....	48
4.2.1 Kultivace analyzovaných kmenů hub.....	48
4.2.2 Uchování kultur	48
4.2.3 Izolace DNA	49
4.2.3.1 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).....	50
4.2.3.2 Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK).....	50
4.2.3.3 Izolace DNA s použitím NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel).....	51
4.2.3.4 Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)	52
4.2.3.5 Izolace DNA s použitím CTAB-SDS.....	53
4.2.4 Analýzy molekulárních markerů	54

4.2.4.1 SSR (single sequence repeat), mikrosatelity.....	54
4.2.4.2 ITS – RFLP	56
4.2.4.3 PCR-RFLP rDNA (LSU – large subunit).....	58
4.2.4.4 Izolace fragmentů z gelu (JETQUICK Gel Extraction Kit (Genomed GmbH)	61
4.2.4.5 Příprava sekvenační reakce	61
4.2.4.6 AFLP (amplified fragment length polymorphism)	62
4.2.5 Separace a detekce PCR produktů.....	68
4.2.5.1 Separace.....	68
4.2.5.2 Detekce	75
4.2.6 Statistické hodnocení dat	76
5. Výsledky	77
5.1 Izolace DNA	77
5.2 Analýza mikrosatelitů	79
5.2.1 Optimalizace na základním souboru.....	79
5.2.2 Ověření funkčnosti metody SSR analýzy na modelovém souboru.....	83
5.2.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci.....	87
5.3 ITS-RFLP.....	89
5.3.1. Optimalizace na základním souboru.....	89
5.3.2 Ověření funkčnosti metody ITS-RFLP na modelovém souboru	91
5.4 Sekvenační analýza ITS regionu	92
5.4.1 Optimalizace na základním souboru.....	93
5.4.2 Ověření funkčnosti sekvenační analýzy ITS regionu na modelovém souboru ...	94
5.4.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci.....	95
5.5 LSU-RFLP	98
5.6 Sekvenační analýza LSU rDNA.....	98

5.6.1 Optimalizace na základním souboru	98
5.6.2 Ověření funkčnosti metody LSU rDNA na modelovém souboru	99
5.6.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci	101
5.7 AFLP	104
5.7.1 Optimalizace na základním souboru	104
5.7.2 Ověření funkčnosti metody AFLP na modelovém souboru	105
5.7.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci	107
6. Diskuze	109
7. Závěr	115
8. Citovaná literatura:	117
Seznam publikací.....	139

Summary

The morphological and biological characteristics are often used to determine the basic features of entomopathogenic fungi. These methods, however, have their limits, so the methods of molecular markers are being used to specify the strains precisely. Thanks to them, it is possible to support or to displace taxonomic classification of examined strains based only on the morphological characteristics. The combination of morphological, biological and molecular markers seems to be a suitable and powerful tool for taxonomic and evolutionary studies.

For using *Beauveria bassiana* as a biocontrol agent, it is very important to detect genetic polymorphism among the strains and the possibility to monitor their distribution and persistence in the environment.

The aims of this study were to develop the suitable molecular marker for precise characterization and determination of *Beauveria bassiana* strains, their identification and to get appropriate tool for evaluation of *Beauveria bassiana* populations. And finally to have the chance to support concept of “local strain” with connection to geographical origin and agro-ecological conditions.

There were tested four techniques of molecular markers – SSR, PCR-RFLP, AFLP and sequencing. Each technique was optimized at first for application in laboratories of Biotechnological centre, Faculty of Agriculture, USB České Budějovice. After that, functionality of particular marker system was tested on a wider set of samples. Finally, each of these techniques was applied to the *Beauveria bassiana* population from National Park Šumava, which was collected during MZP SP/2d1/41/08 project. Altogether 54 strains of different species were analyzed – strains of *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* and *Isaria fumosorosea*.

All molecular analyses proved the same character of a similarity of examined samples, such as absolute homogeneity of *Beauveria bassiana* population, collected in National Park Šumava, as well as the polyphyletic character of whole species – *Beauveria bassiana*. Further, it was demonstrated that all of the molecular markers used are suitable to determine unknown samples on the genus and the species level, as well as to confirm taxonomic classification after morphological analyses. Sequence analyses of LSU rDNA or ITS region appear to be the best for taxonomic determination.

1. Úvod

Houby představují velmi širokou, složitou heterogenní skupinu organismů, u níž došlo během evolučního procesu k vytvoření celé škály adaptačních mechanismů, umožňujících přizpůsobit se často velmi diverznímu prostředí. Z evolučního hlediska představují polyfyletickou skupinu organismů, jejíž členové ale plní podobné role v ekosystémech. Houby mimo jiné zajišťují primární dekompozici organického materiálu ve všech ekosystémech, vytváří důležité symbiotické vztahy s živočichy a cévnatými rostlinami a představují převážnou většinu patogenů hospodářsky využívaných rostlin. K fyziologické a biochemické přizpůsobivosti hub jejich prostředí, zejména různým nutričním zdrojům, patří i schopnost syntetizovat řadu primárních a sekundárních metabolitů. Tato vlastnost se stala klíčovou pro řadu průmyslových odvětví využívající biotechnologie (Bruns *et al.* 1991; Carlile a Watkinson 1994).

Přes důležitost hub je dodnes známo velmi málo o evolučních a fylogenetických vztazích v rámci této skupiny organismů. Mezi hlavní důvody patří nedostatek fosilních nálezů, jednoduchost morfologických znaků vzhledem ke konvergentnímu vývoji a vysoká úroveň diverzity, kdy v poměru k rozsáhlosti jednotlivých taxonů bylo prozkoumáno jen malé procento jejich zástupců (Bieliková 2001).

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 podpořit či vyvrátit taxonomické zařazení založené na morfologických charakteristikách (Driver a Milner 1998). Kombinace morfologických, biologických a molekulárních markerů je vhodným nástrojem pro fylogenetickou definici druhů nebo evolučně odlišitelných skupin (Volger a Desalle 1994).

2. Literární přehled

2.1 Entomopatogenní houby

Významnou skupinou hub, kterou jsem se zabývala (resp. jejími zástupci), jsou entomopatogenní houby. Jsou to organismy parazitující na hmyzu, pro který bývají často letální.

Předpokládá se, že potenciálně existují asi 10 milionů druhů hmyzu, z nichž je asi 5 % napadáno specifickou houbou (Hawksworth 1991). Ačkoli je popsáno více než 750 druhů hub jako hmyzích patogenů, intenzivně se studuje pouze malá část z nich, a to hlavně proto, že napadá hmyzí škůdce a tyto druhy jsou využívány v biologické ochraně rostlin (Glare a Milner 1991).

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. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na družích patřících do řádu *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Diptera* (Weiser 1966; Ferron 1975; Tanada a Kaya 1993). Mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, ovšem nejčastěji infikovaným vývojovým stádiem hmyzu jsou larvy. Méně často jsou infikovány kukly a dospělci hmyzu, vajíčka hmyzu jsou infikována velmi vzácně (Tanada a Kaya 1993). Některé druhy entomopatogenních hub mohou parazitovat na širokém sortimentu hostitelů, patřících do zcela odlišných řádů hmyzu, a mohou infikovat i různá vývojová stadia téhož hostitele (např. *Isaria fumosorosea*, dříve *Paecilomyces fumosoroseus*).

Většina druhů široce polyfágních entomopatogenních hub (např. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* a další) může

obecně parazitovat na velmi širokém spektru hostitelů. S širokou polyfagií je často spojena tvorba druhově identických, nicméně různorodých kmenů (izolátů), které mohou vykazovat i úzkou hostitelskou specializaci (McCoy *et al.* 1988). Typickým příkladem je tvorba velmi specifických patotypů u polyfágních hub *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, u kterých je hostitelské spektrum kmene výrazně prederminováno druhem hostitele, z něhož byl konkrétní patotyp izolován. Druhovými specifitami entomopatogenních hub ve vztahu k hostitelům je nejčastěji podmíněna fyziologickým stavem hostitele, vlastnostmi kutikuly hostitelského druhu a nutričními specializacemi (nároky) patogena (McCoy *et al.* 1988). A je nepřímo ovlivněna i abiotickými faktory, jež jsou typické pro ekologickou niku hostitele. V komplexu interakcí, které podmiňují šíři spektra hostitelských druhů, sehrávají významnou úlohu i obranné systémy hostitele (Charnley 1984).

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

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 těmi nejvýznamnějšími jsou houby z oddělení *Chytridiomycota* (*Blastocladales*); *Zygomycota* (*Zygomycetes*: *Entomophthorales*, *Mucorales*); a právě *Ascomycota* (*Laboulbeniomycetes*, *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).

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 (saprotrofní fáze vývojového cyklu) (Landa 1998).

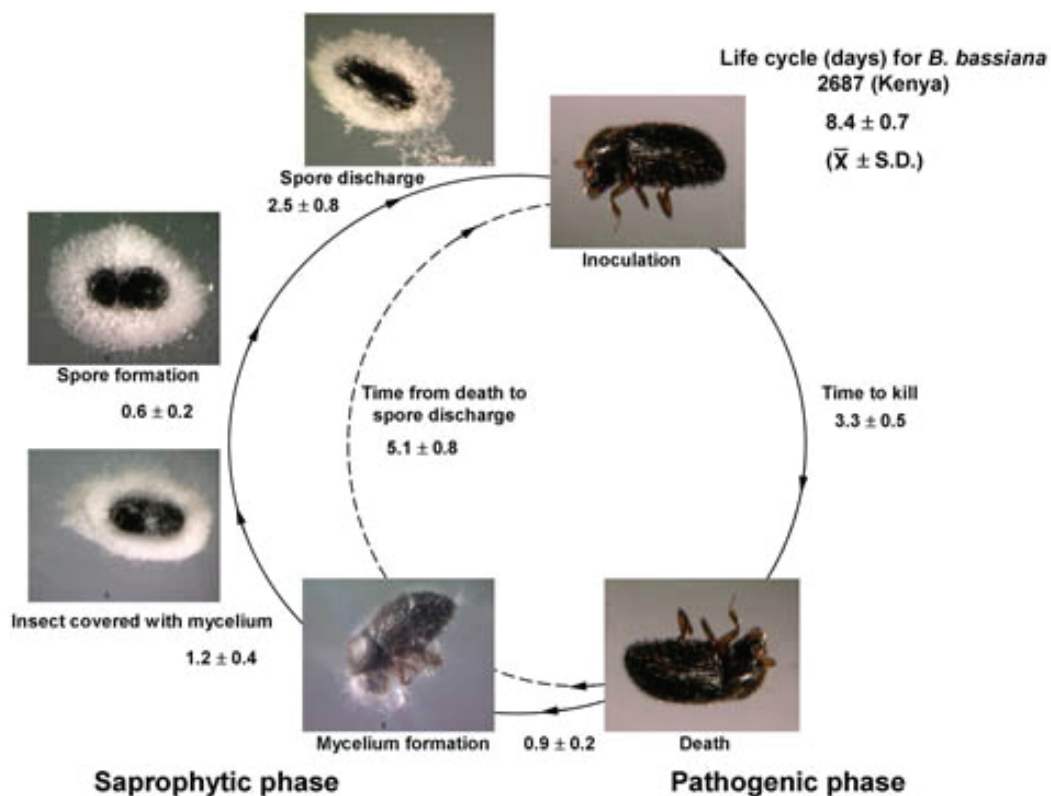
Houbovou nákazu zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé, zprostředkované abiotickými nebo biotickými faktory. Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu se 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. *Lecanicillium lecanii*). Konidie jsou suché, silně hydrofobní s rozmanitě strukturovaným povrchem (např. *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*).

Klíčení konidií představuje první aktivní fázi interakce patogena s hostitelem (Landa 1998). Konidie jsou dostatečně energeticky vybaveny k vyklíčení a jejich aktivitu značně ovlivňuje teplota a relativní vzdušná vlhkost. Fáze penetrace představuje pronikání hyf patogena přes kutikulu do těla hostitele a produkce degradujících enzymů. Houby k penetraci využívají i přirozených otvorů 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 usmrčen. Patogen prorůstá na povrch usmrčeného hostitele a postupně vytváří hustou myceliální síť, jež 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 (Šedrlová 2008).

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



2.1.4 Rod *Beauveria* Vuillemin

Rod *Beauveria* reprezentují převážně druhy, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, resp. na stádiích hmyzu, která se vyskytují v půdě

(např. při přezimování) (Vänninen *et al.* 2000; Keller *et al.* 2003). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeni zástupci z řádů rovnokřídlí (*Orthoptera*, např. krtonožky), brouci (*Coleoptera*, např. larvy a kukly chroustů a chroustků, mandelinky bramborové, lalokonosců a mnoha dalších druhů), larvy a kukly motýlů (*Lepidoptera*) a dvoukřídlého hmyzu (*Diptera*). Byly izolovány také kmeny vykazující vysokou virulenci na zástupcích stejnokřídlého hmyzu (*Homoptera*, např. na molicích a mšicích) (Bobková 2006; Humber 1997).

Mezi zástupce rodu *Beauveria* jsou řazeny *B. bassiana* (konidie globoidního až subgloboidního tvaru, konidiogenní struktury tvoří husté shluky - hrozny), *B. brongniartii* (konidie podlouhlé vejčité až cylindrické, konidiogenní struktury štíhlé, tvoří řídké hrozny), *B. globurifera*, *B. tenella* (vejčité konidie), *B. velata* (konidie kulovité až elipsoidní, lehce ornamentované, pokryté želatinovou vrstvou), *B. amorpha* (konidie cylindrické, často na jedné straně zploštělé nebo lehce prohnuté) (Samšiňáková 1963; Samson *et al.* 1988).

Je to pravděpodobně nejrozsáhleji studovaný rod entomopatogenních hub, vzhledem k jejich potenciálu v biologické ochraně rostlin. Všechny druhy jsou fakultativními patogeny hmyzu a řada testovaných kmenů vykazuje vysokou patogenitu vůči významným listovým hmyzím škůdcům a některému půdnímu hmyzu (Eyal *et al.* 1994). Způsobují onemocnění známé jako bílá muskardina, tvoří husté bílé vatové až práškové porosty na hmyzu i v kultuře (Weiser 1966; Kumar *et al.* 1999). Proto lze její potenciál využít k biologické ochraně proti více jak 70 druhům hmyzu (Aleshina 1980).

2.1.4.1 *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Taxonomie:

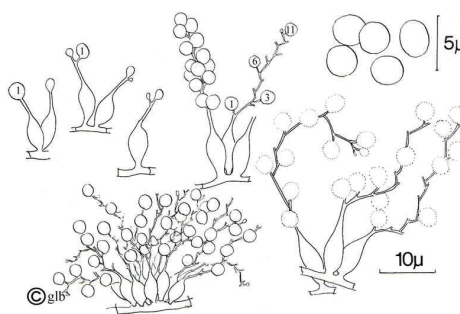
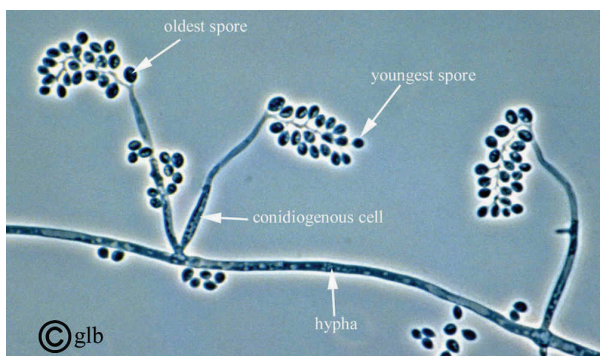
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Eumycota</i>
Pomocné oddělení:	<i>Deuteromycota</i>
Pomocná třída:	<i>Hyphomycetes</i>
Řád:	<i>Moniliales</i>
Rod:	<i>Beauveria</i>

Determinaci této entomopatogenní houby provedl v roce 1835 Giuseppe Balsamo Crivelli a zařadil ji do rodu *Botrytis* (*Botrytis paradoxa*), později změnil označení na *Botrytis bassiana* na počest jejího objevitele. V roce 1912 revidoval systematické zařazení Vuillemin a do dnešní doby je respektováno jeho zařazení do rodu *Beauveria* a označení druhu *bassiana* (Dirnbeková 1991). Vyskytuje se přirozeně v přírodě na všech kontinentech, s výjimkou Antarktidy. Byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu z devíti řádů, parazituje hlavně na zástupcích škůdců z řádů *Orthoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera* a *Diptera* (Inglis *et al.* 1996; Watson *et al.* 1995; Chikwenhere a Vestergaard 2001).

Houbu *Beauveria bassiana* je možno snadno kultivovat na pevných médiích i v tekutých živných půdách. Pro masovou produkci jsou využívány dvoufázové a submerzní technologie kultivace. Při submerzní kultivaci vzniká často směs blastospor a konidií (Feng *et al.* 1994).

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 a Milner 1998).

Obr. 2: Konidiofory s konidii *Beauveria bassiana* a vývojová stádia (<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>)



Morfologie

Vyznačuje se pomalu rostoucími koloniemi, které jsou bělavé, lanovní, 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 globoidního až subgloboidního tvaru, hladké,

2–3 x 2,0–2,5 µm v průměru. U starších kultur se fialidy stávají protáhlejší a vyrůstají častěji i jednotlivě (Kubátová 2006; Dirlbeková 1991).

Tvoří husté bílé mycelium mléčně bílé barvy překrývající exoskelet hostitele, občas tvořící synemata (vzpřímené svazky hyf). Konidiogenní buňky často bývají v hustých svazcích (nebo přeslenech či samostatně), jsou bezbarvé, s kulovitou nebo baňkovitou bází a vroubkovitým (zubovitým) apikálním prodloužením (rachis – páteř), nesoucí po jedné konidii na každém zubu, konidie nepřehrádkované (Humber 1997).

V přírodě přetrvává druh *Beauveria bassiana* v povrchových vrstvách půdy jako mycelium jednak v uhynulých hostitelích, ale i na organických zbytcích (saprofytní fáze). Navzdory velkému množství hostitelů byly pouze zřídka sledovány epizootie způsobené houbou *B. bassiana* u přirozených populací škůdců (Feng *et al.* 1994). Houba může též kolonizovat rostliny jako endofyt, čehož je možno využít při redukci zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) (Bing a Lewis 1992).

Optimální teplota růstu je 23–26 °C při relativní vlhkosti vzduchu nebo vlhkosti substrátu 80–100 %. *Beauveria bassiana* roste v teplotním optimu 5–35 °C, minimální teplota pro růst mycelia je 5–8 °C, maximální teplota pro růst mycelia je 28–31 °C, ale přežívá i za teploty 37 °C (Dirlbeková 1991; Fernandes *et al.* 2007).

Fyziologie a infekce (průběh patogeneze)

Nejčastější cestou penetrace houby *B. bassiana* do hostitele je povrch těla (Ferron 1978), přes kutikulu a stigmata. Kromě těchto hlavních způsobů infikuje hmyz též per os, zvláště druhy s kousavým ústním ústrojím (Feng *et al.* 1994), byly však zaznamenány také infekce přes dýchací systém (Clark *et al.* 1968) a řitní otvor (Siebeneicher *et al.* 1992).

K nákaze hmyzu dochází konidiemi, které ulpívají a klíčí na povrchu kutikuly a po krátkém růstu po povrchu vnikají vláknem kolmo do chitinového pokryvu kutikuly a pronikají do dutiny tělní. Rostoucí klíčící vlákno penetruje kutikulu pomocí enzymů (Smith a Gula 1981). Aby mohlo dojít k penetraci a následné infekci, musí *B. bassiana* produkovat nejméně dva typy enzymů v určitém pořadí. Jakmile pronikne houba dovnitř

těla hostitele, produkuje sekundární metabolit beauvericin pro oslabení imunitního systému hostitele. Po smrti hostitele umožňuje houbě produkované antibiotikum (oosporein) konkurovat intestinálním bakteriím (Mahr 1997).

Uvnitř těla vznikající válcovité konidie, endokonidie (blastospory), měří obvykle 2–3 x 7 µm. Na fruktifikujících vláknech vyrůstají porůznu po dvou i více na krátké stopce. Z endokonidií narůstají další hyfy a na těch se po určitém růstu tvoří opět endokonidie. Tímto dochází k nárůstu myceliární hmoty a úplnému vyplnění těla hmyzu (Weiser 1966) (Obr. 3). Při dostatku vlhkosti (92 a více %) prorůstají hyfy na povrch těla (Mahr 1997). Na povrchu mumifikovaného těla se zdvíhají vlákna, na kterých se vyvíjejí vzdušné konidie (Dirlbeková 1991).

Další cesta infekce je možná přijímáním potravy, na které ulpěly konidie. Infekce probíhá ve své podstatě stejně, s tím rozdílem, že začátek infekce je prorůstáním zažívacího traktu hmyzu a následném šíření v organismu.

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

Obr. 3: Konidiofory s konidiemi *Beauveria bassiana* a vývojová stádia (<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>)



2.2 Morfologické markery (hodnocení fenotypu)

Morfologické studie jsou základem klasifikace hub, nejčastěji používané morfologické znaky pro identifikaci jsou tvar a velikost konidií, tvar a velikost kolonií, produkční charakteristiky a biologické vlastnosti (klíčení spor a jeho dynamika, testy biologické účinnosti – FGDI–Fungus Growth Development Index apod.) (Osborne a Landa 1992). Variabilita těchto znaků je však příliš vysoká, tyto vlastnosti jsou inducibilní a pouhá změna kultivačního média je vzhledem k rychlému generačnímu cyklu mikroorganismů může výrazně pozměnit. Ani další fenotypové markery (jako např. detekce enzymatické aktivity) nepřinesly v celé problematice výraznější posun (Oborník 1995).

Morfologické markery nedovolují rozlišení na poddruhové úrovni, ale v mnoha studiích jsou důležitým a podpůrným systémem umožňujícím základní charakterizaci a rozlišení výchozího materiálu (Hall 1980; Vidal *et al.* 1998).

Nedostatek morfologických charakteristik učinil molekulární markery neocenitelné pro studium aspektů ekologie, biologie a genetiky hub (Carter *et al.* 2004).

2.3 Molekulární markery

Kvalitativní a kvantitativní informace o diverzitě jsou základním aspektem mnoha oborů v biologii, jak v klasické, tak i aplikované, jako je ekologie, evoluční biologie, taxonomie, zemědělství i šlechtění (Karp *et al.* 1997).

Molekulární analýzy odhalují nejen detailní vlastnosti DNA (nebo proteinů), ale také odlišné charaktery, jež jsou specifické v pořadí bází (Avisé 2004). Molekulární techniky lze také využít ke zjišťování rozdílnosti sekvencí DNA mezi jednotlivými druhy, ale také mezi jednotlivými jedinci téhož druhu. Díky molekulárním markerům lze určit i nové druhy (Korzun 2003).

Molekulární markery jsou markery na úrovni DNA, které jsou identifikovatelné sekvence DNA umístěné na konkrétních místech na chromozomech, v blízkosti genů nebo

přímo v genech (Korzun 2003). Umožňují detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markery se zakládají na polymorfismu sekvencí DNA. Pomocí DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy/populacemi/klony/jedinci/buňkami. 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, pro fylogenetické analýzy a řešení taxonomických otázek (Caetano-Anollés 1997).

DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA. Molekulární markery mají díky fyzikálním vlastnostem DNA několik výhod. A to takové, že 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 miliónů 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). DNA markery tedy lze mj. použít i u velmi raných ontogenetických stádií, což znamená zefektivnění rychlosti práce především ve šlechtitelské oblasti (Caetano-Anollés 1997).

Důležitou vlastností markerů je nezávislost na podmínkách prostředí. Odlišné úseky DNA jsou vystaveny různým selekčním tlakům. Většina sekvencí kódujících životně důležité proteiny podléhá silnému selekčnímu tlaku, a proto nejsou variabilní a pro analýzy nejsou většinou použitelné. Na druhé straně v nekódujících oblastech (introny a mezigenové regiony), u kterých lze předpokládat selekční neutralitu a jejichž míru polymorfismu může ovlivňovat pouze genetický drift, se snadno hromadí mutace, a proto jsou nekódující sekvence variabilní (Bergmann 1975).

Kvalitativní a kvantitativní informace týkající se úrovně diverzity jsou nesmírně důležitým faktorem v mnoha oblastech biologického výzkumu, ať již základního, nebo aplikovaného: v ekologii, taxonomii, šlechtění a ochraně genofondu. Pro „markerování“ diverzity, pro detekci polymorfismu na úrovni nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik.

Většina molekulárních markerů spadá do jedné ze tří kategorií technik, 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).

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 pomocí PCR, (3) sekvenčním polymorfismu.

2.3.1 Techniky využívající restriční štěpení a hybridizaci

2.3.1.1 RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfismus délky restričních fragmentů)

RFLP patří mezi historicky nejstarší DNA markery. Pro rozvoj této metody byl nutným předpokladem zaprvé objev restričních enzymů (Smith a Wilcox 1970) a zadruhé objev přenosu elektroforeticky separované DNA z gelu na membránu – metoda Southern blot, 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 1997).

2.3.2 Techniky založené na PCR reakci

PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) reakce byla vyvinuta v Cetus Corporation Emeryville v Kalifornii. Za objev principu PCR byla v roce 1993 Kary B. Mullisovi udělena Nobelova cena za chemii (Clark 2005). Tato metoda se v posledních letech stala velmi populárním prostředkem pro identifikaci rostlinných a živočišných druhů (Korzun 2003).

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). Podstatou PCR je cyklicky se opakující syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů (uměle nasyntetizovaných oligonukleotidů 10–30 bází dlouhých), 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 DNA 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. PCR je proces (Obr. 4), při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky (Šmarda *et al.* 2008).

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).

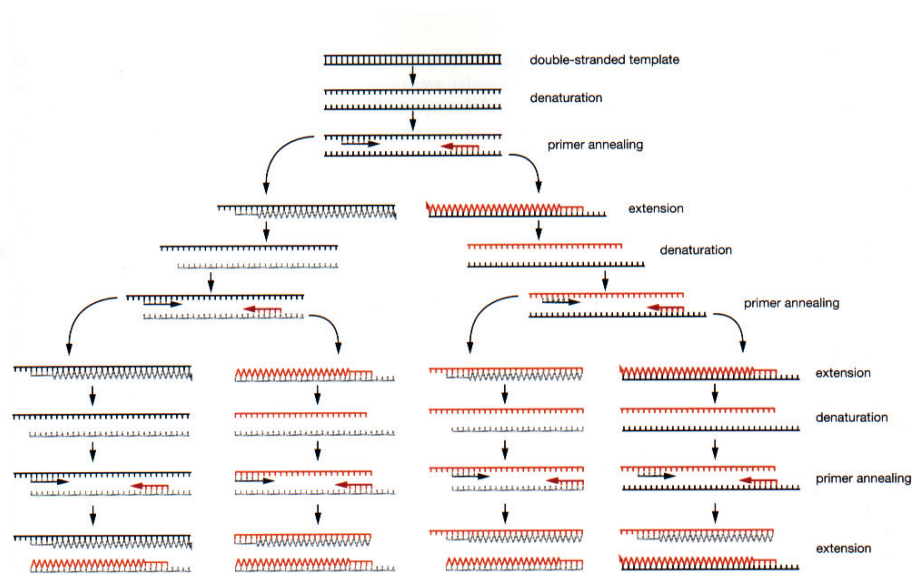
Mnoho moderních termocyclerů využívá Peltierův efekt, jenž umožňuje i vytápění a chlazení bloku PCR jednoduše tím, že obrátí směr toku elektrického proudu (Rychlik *et al.* 1990).

Jelikož výsledek PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA. Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části sekvence genomové DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu.

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je však třeba optimalizovat. Pro získání požadovaného produktu, jeho specifičnost a výtěžku je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi (Šmarda *et al.* 2005).

Obr. 4: Princip PCR

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



Složky PCR reakce

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 ovšem vést k chybám a vzniku nescifických 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 nescifických 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 nescifické vazbě primerů („self-priming“) a falešným výsledkům. Protože *Taq* DNA-polymeráza má při 95 °C poločas stability 40 min., volí se pro následnou denaturaci ampliconů 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).

Koncentrace $MgCl_2$ (optimum 1,5 mM) má vliv na specifitu a výkonnost PCR reakce. Vyšší koncentrace zvýší výnos, ale snižuje specifitu, menší koncentrace naopak (Edel 1998).

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 délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp analogické restričními fragmentům, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu či kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (Šmarda *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 a Stirling 2003).

2.3.2.1 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 restričním štěpení známé sekvence, jež 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 1997).

2.3.2.2 Real Time – PCR (qRT PCR)

Amplifikace probíhá obvyklým způsobem jako standartní PCR. Reakční směs obsahuje kromě dvojice primerů ještě specifickou vnitřní sondu (TaqMan sonda), která je fluorescenčně značená na 3' konci tzv. zhášecem a na 5' konci tzv. reportérem. Pokud amplifikace neprobíhá, je energie vyzařovaná reportérem pohlcována zhášecem. V případě amplifikace dojde k rozštěpení vnitřní sondy, reportér se dostane z dosahu zhášече a uvolněný fluorescenční signál je zaznamenán přístrojem.

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

2.3.2.3 CAPS (PCR–RFLP)

(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – 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 jsou fragmenty elektroforeticky separovány na gelu. Díky bodovým mutacím lze odlišit dominantní a recesivní alely studovaných genů/mezigenových regionů (Caetano-Anollés 1997).

2.3.2.4 RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA – polymorfismus náhodně amplifikované DNA)

Metoda RAPD detekuje malé převrácené nukleotidové sekvence roztroušené po celé genomické DNA (Welsh a McClelland 1990; Williams *et al.* 1990). Princip je založen na amplifikaci fragmentů DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru o náhodné nukleotidové sekvenci. 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 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 (Caetano-Anollés 1997). Principy RAPD jsou detailně uvedeny v pracích Hadrys *et al.* (1992) a Tingey a del Tufo (1993).

2.3.2.5 Microsatellites (SSRs nebo VNTRs)

(Simple Sequence Repeats – tandemová opakování krátkých motivů

Variable Number Tandem Repeats – variabilita v počtu tandemových opakování)

Analýza mikrosatelitních sekvencí nebo též jednoduchých repetitivních sekvencí (SSR) je další účinnou a značně rozvíjenou technikou. Mikrosatelity jsou tandemové repetice obvykle 2–4 párů bazí (GA, TCC a GATA) (Powell *et al.* 1996), které jsou rovnoměrně rozptýleny v eukaryotickém genomu (Cregan 1992; Morgante a Olivieri 1993). Frekvence výskytu mikrosatelitů je pětkrát častější u rostlin než u savců (Lagercrantz *et al.* 1993). Tyto sekvence s kodominantní dědičností se vyznačují hojností a polymorfismem, jenž spočívá ve variabilním opakování základního motivu (Ramel 1997). Tato metoda je založena na PCR reakci 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, jež jsou separovány. Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízké příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací (Šmarda *et al.* 2008).

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 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 nevýhodu představuje skutečnost, že je musíme nejprve nalézt a identifikovat vhodné primery pro jejich amplifikace, 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 nutné 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, 4. navržení primerů pro amplifikaci mikrosatelitových lokusů a 5. testování primerů (Tautz 1989).

2.3.2.6 AFLP

(Amplified Fragment Length Polymorphism – délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů)

Metoda založená na kombinaci restrikčního štěpení a PCR reakce spočívá v tom, že se studovaná DNA štěpí dvěma restrikčními enzymy, k odpovídajícím restrikčním koncům se ligují adaptory a poté je provedena PCR s primery, které mají sekvenci komplementární k adaptoru a navíc obsahují selektivní báze (Vos a Kuiper 1997) (Obr. 5). AFLP se označuje jako velice výkonná metoda, pomocí níž lze za velmi krátký čas zmapovat velké množství nových markerů. Má řadu dalších výhod: je založená na PCR, dá se zautomatizovat, je neradioaktivní, nemusíme znát žádné cílové sekvence studovaného organismu, výsledky jsou dobře reprodukovatelné a spolehlivé. Problémem je však jejich kodominantní charakter (Caetano-Anollés 1997). V důsledku rychlého rozvoje metod se technika AFLP

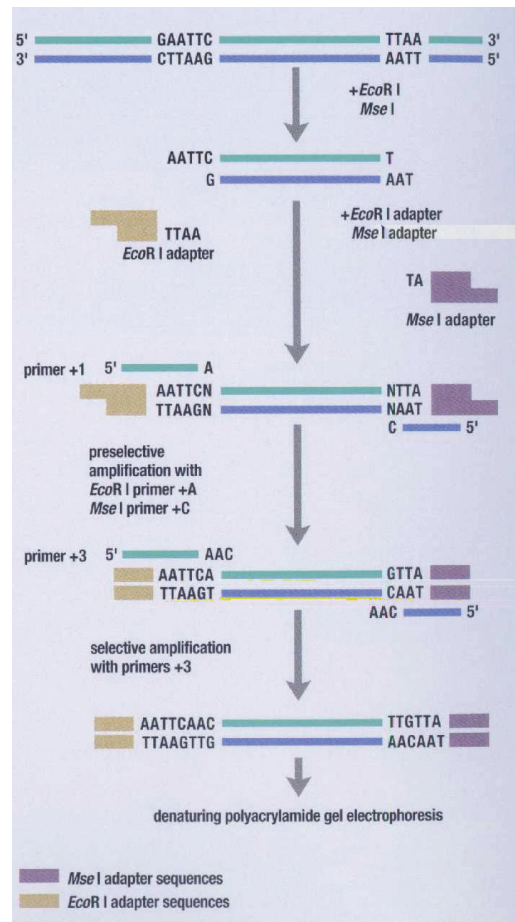
rozšiřuje i do této oblasti – studium diverzity a taxonomie vláknitých hub a AFLP markery začínají ve větší míře nahrazovat techniku RAPD (Leišová *et al.* 2002).

Základem polymorfismu mohou být mutace v restrikčních místech sekvence komplementární k adaptorovým a selektorovým nukleotidům (Matthes *et al.* 1998). AFLP je spolehlivější metoda než RAPD (Vos *et al.* 1995; Jones *et al.* 1997), ale zároveň je také náročnější finančně, technicky a časově (Milbourne *et al.* 1997; Powell *et al.* 1996). Tato technika je široce používána pro mapování (Mohan *et al.* 1997), DNA fingerprinting (Powell *et al.* 1996), analýzy genetických vztahů (Milbourne *et al.* 1997) a zjištění genetické diverzity (Russell *et al.* 1997). Metoda se používá u nejrůznějších plodin (Cooke a Reeves 1998). Podobně jako analýza RFLP je i analýza polymorfismu délky amplifikovaného fragmentu materiálově poměrně náročná.

AFLP markery mohou být využity pro jakýkoliv organismus, a to bez předešlé znalosti genomické struktury. Tyto markery jsou řazeny mezi velmi selektivní a přesné markery, což eliminuje falešné signály (méně než 2 %) (Tohme a Gonzalez 1996; Winfield *et al.* 1998), které poskytují např. RAPD markery. Výsledek získaný na základě AFLP metody je vysoce opakovatelný a reprodukovatelný i mezi různými pracovišti (chyba je menší než 0,6 %).

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

Obr. 5: Grafické znázornění jednotlivých kroků techniky AFLP (http://www.msu.edu/course/mmg/835/DNAMarkers/aflp.jpg)



2.3.3 Techniky sekvenování DNA

Na konci sedmdesátých let minulého století byly objeveny rychlé a jednoduché metody pro určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Patří sem několik technik. Nejpoužívanější z nich jsou založeny na DNA-polymeráze, jež syntetizuje částečné kopie sekvenovaného fragmentu. Princip těchto technik spočívá v produkci sady řetězců DNA *in vitro* za podmínek, které zajišťují, že nově vznikající řetězce DNA budou ukončeny po dosažení jednoho konkrétního nukleotidu (A, T, C, G). Ve čtyřech nezávislých reakcích tak vzniknou fragmenty DNA, které se liší svojí délkou o jediný nukleotid, přičemž z typu použité reakce je známo, kterým nukleotidem fragment končí. Tyto nově nasyntetizované fragmenty jsou elektroforeticky rozděleny podle velikosti sekvence původní DNA (Osborn a Smith 2005).

Dnes je známa kompletní nukleotidová sekvence desítek tisíc genů, několika bakteriálních genomů, několika genomů rostlin a živočichů. Množství sekvencí DNA uložených v počítačových databázích je už nyní tak ohromné, že pro práci s těmito údaji jsou potřebné speciální programy (Innis *et al.* 1990). Znalost sekvence DNA je používána k odvození informace o aminokyselinové sekvenci kódovaných proteinů a umožňuje tak detailně stanovit charakter mutací, které se mohou projevit vlivem genetických chorob (Alberts *et al.* 2004).

K sekvenování se používají dvě principiálně odlišné metody: chemická metoda (Maxamovo-Gilbertovo sekvenování) a enzymová metoda (Sangerovo sekvenování).

2.3.3.1 Chemická metoda sekvenování – Maxamovo-Gilbertovo sekvenování

Podstatou chemické metody sekvenování je specifické rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizována báze určitého typu. Výchozím materiálem je soubor identických fragmentů jednořetězcové DNA označených na jednom konci radioaktivní značkou. Každý ze čtyř typů bází v molekule DNA lze určitým způsobem modifikovat tak, aby bylo v tomto místě dosaženo přerušení řetězce DNA. Podmínky reakce se zvolí takové, aby byla poškozena v průměru pouze jedna báze v řetězci DNA, který je velice citlivý ke štěpení. Reakce se provádí ve velkém souboru molekul, proto je výsledkem štěpení soubor fragmentů DNA všech různých délek, které odpovídají vzdálenosti bází příslušného typu od značeného konce výchozí molekuly DNA (Šmarda *et al.* 2005).

2.3.3.2 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 nejpoužívanější molekulární technikou umožňující analýzu genů na úrovni nukleotidů (Canfield 1999). Je založena na použití dideoxyribonukleosid trifosfátů – derivátů normálních deoxyribonukleosidtrifosfátů postrádajících 3'-OH skupinu, tento analog je

začleněn do rostoucího řetězce DNA. V tomto případě však řetězci chybí 3'-OH skupina, což blokuje přidání dalšího nukleotidu, a syntéza tohoto vlákna je ukončena (Alberts *et al.* 2004). DNA je syntetizována *in vitro* ve směsi, která obsahuje: jednořetězcovou molekulu DNA, která má být sekvenována; enzym DNA-polymerázu; krátký primer DNA, který umožňuje DNA-polymeráze začít replikaci; čtyři deoxyribonucleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), které jsou DNA-polymerázou inkorporovány do rostoucího řetězce DNA podle pravidel o párování bází (Šmarda *et al.* 2005).

Pro zkrácení procesu sekvenování bylo vyvinuto automatické sekvenování, jež umožňuje stanovit sekvence mnohem rychleji než při standardních postupech. Využívá se zejména při sekvenování z genomových knihoven. Automatické sekvenování má některé odlišnosti od enzymové metody, např. syntéza DNA probíhá metodou asymetrické polymerázové řetězové reakce. K detekci reakčních produktů se používají čtyři různé fluorescenční značky, délka stanovené sekvence je obvykle mezi 500–1000 bázemi.

Automatické sekvenování využívá dva odlišné přístupy: barevně značené primery, nebo barevně značené terminátory. Detekce produktů sekvenačních reakcí probíhá v průběhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač. Ten díky speciálnímu softwaru z pořadí signálů v příslušných drahách přímo vyhodnocuje sekvenci DNA. U nejnovějších aparatur probíhá elektroforetická separace v kapilárách.

Pokud je třeba sekvenovat fragment delší než 1000 bází, využívají se v tomto případě dvě odlišné strategie: náhodné sekvenování, nebo uspořádané sekvenování sousedních úseků. Po úpravě konců se fragmenty nahodile zaklonují do vhodného vektoru (Innis *et al.* 1999).

V současné době se využívají obě metody, ale Sangerova zaznamenala rychlejší rozvoj. A to hlavně z důvodu masivního využití automatických kapilárních sekvenátorů a jejich vývoje. Další vývoj směřuje k technikám Next-Generation Sequencing (Illumina, Roche, Applied Biosystems) (Mardis 2008).

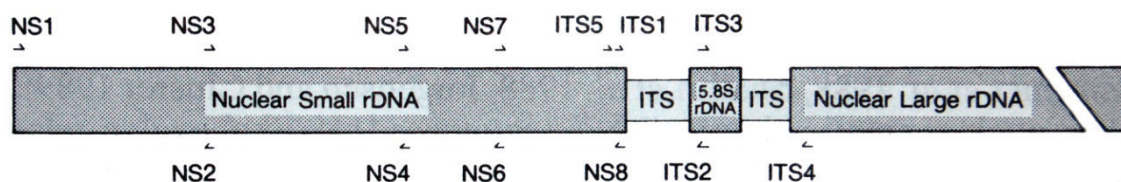
2.3.3.3 Ribozomální RNA a její podjednotky

Ribozomální 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). 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 ve Svedbergových jednotkách (sedimentační koeficient). Je to veličina, jež udává čas, za který proběhne v ultracentrifuze sedimentace ribozomu (Alberts *et al.* 2004).

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 ribozomy mají také dvě podjednotky, ovšem s velikostmi 60S a 40S. Velká podjednotka má tři rRNA (28S, 5,8S a 5S) a 49 polypeptidů. Malá podjednotka má také jedinou molekulu, a to 18S rRNA a 33 polypeptidů (Lewin 2000) (Obr. 6).

Obr. 6: Grafické zobrazení rRNA (White 1990)



Jaderné rRNA geny eukaryot jsou umístěny v opakujících se úsecích. Ty jsou spojeny geny pro malou podjednotku (SSU – z angl. small subunit) a velkou jadernou podjednotkou (LSU – z angl. large subunit) (Gerbi 1985). Tyto geny ukazují malé rozdíly

mezi sekvencemi u velmi podobných druhů, metoda je velmi úspěšná při fylogenetických studiích zdánlivě příbuzných druhů (Taylor a LoBuglio 1993).

Právě DNA sekvence odlišných domén velké jaderné podjednotky rDNA jsou vhodné pro určování fylogeneticky relativně podobných organismů (Schlötterer *et al.* 1994).

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. Početné 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 (Lane *et al.* 1985).

2.3.3.4 ITS regiony

V ITS regionu jsou zahrnuty dva variabilní nekódující úseky, kterými jsou ITS1 a ITS2. Tyto úseky jsou umístěny uvnitř repetice rDNA mezi velmi konzervativním genem pro 18S rRNA (obsaženým v malé podjednotce ribozomu), genem pro 5,8S rRNA a genem pro 28 rRNA (obsaženým ve velké podjednotce ribozomu) (Gerbi 1985). Výhodou ITS je vysoký mezidruhový polymorfismus, a proto jsou dobrými markery pro spolehlivou detekci jednotlivých druhů, nejen u hub (Edel 1998). Je to vhodná oblast pro molekulární charakteristiku hub, a to zejména proto, že je ITS region snadné amplifikovat i z malých, zředěných, nebo vysoce degradovaných vzorků; jedná se o relativně krátký úsek (500–800 bp) a může být snadno amplifikován pomocí univerzálních primerů – ITS1 a ITS4 nebo ITS5 a ITS4 (White *et al.* 1990; Gardes a Bruns 1996). Druhově specifické sondy pro ITS oblast mohou být navrženy rychle, a to bez potřeby vytvoření chromozomální knihovny (Sreenivasaprasad *et al.* 1996). Sekvence ITS používané pro vytvoření druhově specifických sond se vyskytují v mnoha kopiích a mají tendenci být mezi jednotlivými druhy hub různé a uvnitř jednotlivých druhů podobné (Bridge a Arora 1998).

Mezi morfologicky vzdálenými druhy může být ITS region velmi variabilní (Gardes a Bruns 1993), a tak mohou být následně PCR-RFLP restriční data založená na analýze ITS

použita pro odhad genetické vzdálenosti a zároveň poskytovat data pro systematické a fylogenetické analýzy (Bruns *et al.* 1991).

2.3.4 Separační techniky

Po PCR amplifikaci vznikají amplifikované fragmenty, jež jsou separovány nejčastěji pomocí gelových elektroforetických technik, ale hojně se používají i jiné techniky, jako je kapilární fragmentační analýza na automatickém sekvenátoru či nově čipová elektroforéza.

Tradiční agarózový gel a polyakrylamidový gel jsou široce využívány v analýze mikrosatelitů (SSR) (Wang *et al.* 2009), ale stále více vědců se přiklání k přesnějším technikám, i přes jejich finanční náročnost.

Kapilární elektroforéza se značně využívá v SSR a AFLP analýze. Tato technika v kombinaci s použitím fluorescenčně značených primerů poskytuje vysokou citlivost detekce amplifikovaných DNA fragmentů. Nicméně náklady na přístroje a čidla, fluorescenčně značené primery a příprava vzorků jsou mnohem vyšší než pro gelové analýzy (Wang *et al.* 2009).

2.3.4.1 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 agarózové a polyakrylamidové, 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 ethidumbromid, který se silně vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA, pohlcuje ultrafialové záření a červeně fluoreskuje (Lewis 2009).

Agarozový 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.

Agarózová elektroforéza se Synergelem

Synergel je označení pro aditivum, jež zlepšuje ve vazbě s agarózou zostřující vlastnosti celého gelu. Tato kombinace je ve srovnání s čistým agarosovým gelem mnohem účinnější při separaci fragmentů DNA. Fragменты bývají více zaostřeny a Synergel umožňuje i lepší fotodokumentaci (Perlman *et al.* 1987).

2.3.4.2 Čipová elektroforéza

Čipová elektroforéza (Obr. 7) využívá mikrofluidní (mikrokapalinovou) technologii k rozvoji proteomické a genomické expresní analýzy. Používá se k analýze proteinů, RNA a DNA. Centrem systému je mikrokapalinový čip, samotný 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 a Zima 2008).

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

Použitím komerčně dodávaného kitu (např. Experion DNA 1K kit, Bio-Rad), jenž v kombinaci s mikročipem a přesným DNA Ladderem (obsaženým v kitu), se zvýší rozlišovací schopnost separace a je umožněno přesné zjištění velikosti fragmentů DNA a přesná kvantifikace množství DNA ve vzorku.

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

Obr. 7: Experion Automated Electrophoresis Systém, Bio-Rad. (www.bio-rad.com)



2.3.4.3 Kapilární elektroforéza v automatickém sekvenátoru

Kapilární elektroforéza je vysokoúčinná analytická separační metoda, jež 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) (Massiaggia a Grattapaglia 2006). PCR fragmenty jsou analyzovány na určitém sekvenátoru (např. ABI3130, Applied Biosystems) a data jsou vyhodnocena pomocí speciálním softwaru (např. GeneMapper, Applied Biosystems), kdy je výstupem elektroforeogram, ve kterém lze zjistit délku fragmentů a v SSR analýze lze rozlišit homozygoty a heterozygoty (Bergem *et al.* 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 (Applied Biosystems 2005).

2.3.5 Molekulární markery u hub

Studium populací přirozených škůdců 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).

I když v mnoha studiích jsou morfologické studie základem klasifikace hub, kde mezi nejčastěji používané morfologické znaky patří tvar a velikost kolonií, tvar a velikost konidií, radiální růst, morfologie mycelia, tvar a typ konidioforů, míra sporulace a extracelulární a intracelulární pigmentace, nedovolují rozlišení na poddruhové úrovni. Ale v mnoha studiích jsou důležitým a podpurným systémem umožňujícím základní charakterizaci a rozlišení výchozího materiálu (Hall 1980; Vidal *et al.* 1998).

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

Zatímco většina morfologických markerů může být rozeznána na úrovni organismu (kolonie, kultury), molekulární markery umožňují určení na úrovni buněk i organismu v různé fázi vývojového cyklu. Počet morfologických markerů je limitován, zatímco molekulárních markerů je obrovské množství a nejsou ovlivněny vnějším prostředím (Hillis 1987).

Populační genetika stále více využívá při studiu variability DNA mezi a uvnitř populací metod molekulární biologie (Hoezel 1992). Charakterizace, ale hlavně spolehlivá identifikace blízce příbuzných organismů na druhové i poddruhové úrovni podle fenotypových markerů přináší určité těžkosti (Hillis 1987; Tigano-Milani *et al.* 1995). Pro účely přesného rozlišení jsou velmi vhodné metody přímého sledování struktury genomu prostřednictvím studia DNA polymorfismu (Mor *et al.* 1996).

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

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

Metody založené na PCR nabízejí mnoho nových nástrojů vhodných pro systematické studie u hub a pro vymezení druhu jako taxonomické jednotky. Tyto nástroje mohou být používány také pro vymezení a určení vztahů mezi druhy, a to buď bezprostředním porovnáním, nebo prostřednictvím fylogenetických analýz. PCR metody vedly k lepšímu pochopení molekulární variability hub a zdůraznily nutnost pečlivého posouzení strategie odbírání vzorku a jeho velikosti před taxonomickou klasifikací. To také ukazuje, že molekulární variabilita v rámci různých druhů hub není konstantní a úroveň jak homogenity, tak i heterogenity se bude měnit v závislosti na studovaném druhu. Možná je překvapující, že zavedení PCR technik nevedlo k hromadnému revidování názvů jednotlivých druhů hub, a v mnoha případech se již existující pojetí druhu dokonce posílilo. Nicméně široký rozsah molekulární heterogenity, který byl nalezen u některých druhů, vedl k závěru, že uvnitř skupiny již existujících druhů se může vyskytovat i mnohem více druhů „tajných“ a nepopsaných. U těchto technik je naděje, že budou moci v budoucnu poskytnout mnoho odpovědí na dosud nezodpovězené základní otázky systematiky a biodiverzity (Bridge a Arora 1998).

Jedna z prvních aplikací technologie PCR v mykologii byla popsána v práci White *et al.* (1990) a zabývala se amplifikací a sekvenováním rDNA. Cílem této studie bylo prokázání taxonomických a fylogenetických vztahů u hub.

2.3.5.1 RAPD

RAPD byla velmi hojně využívána k vytváření molekulárních markerů, jež jsou užitečné v taxonomii a pro charakteristiku populací hub. Hlavní výhodou této metody je to, že není potřeba znát sekvence DNA, takže jakýkoli primer může amplifikovat DNA (Edel 1998).

Na druhové úrovni jsou RAPD data využívána pro produkci druhově specifických sond a primerů, např. u *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Phytophthora cinnamoni*, *Tuber magnatum* a *Glomus mosseae* (Dobrowolski a O'Brien 1993; Lanfranco *et al.* 1998; Manulis *et al.* 1994). V některých studiích jsou RAPD profily používány pro rozlišení individuálních izolátů v rámci druhu i mezi druhy, např. u hub rodu *Metarhizium* a *Candida* (Lehmann *et al.* 1992; Bridge *et al.* 1997).

Metoda RAPD se často používá k determinaci odlišných vnitrodruhových skupin, jako jsou anastomózní skupiny hub u druhu *Rhizoctonia solani* (Duncans *et al.* 1993; Bidochka *et al.* 1994). Další aplikace RAPD jsou v determinaci jednotlivých kmenů uvnitř konkrétní populace, např. toxické kmeny *Aspergillus flavus* (Bayman a Cotty 1993) a kmeny rodu *Trichoderma* (Fujimori a Okuda 1994; Schlick *et al.* 1994).

Při technice RAPD se předpokládá, že „proužky“ se stejnou mobilitou i intenzitou zbarvení jsou stejné nebo velmi podobné sekvence. Obecně to ne vždy bývá pravda. Dalším problémem je nedostatek znalostí, zda se markerovací „proužky“ skládají z kódujících nebo nekódujících sekvencí a zda mohou reprezentovat geny, které by měly podléhat selekci. Existuje jistý důkaz, že RAPD profil nemusí být zcela náhodný a že různé „pruhy“ mohou být homologní (Riesberger 1996).

2.3.5.2 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 chromozom Y umožňují srovnání míry migrace samců a samic) a v ochraně přírody (Muclinger 2009).

V posledních deseti letech se výrazně zvýšil počet publikací, 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 a Uribe 2004). Začínají se objevovat články týkající se studia entomopatogenní houby *B. bassiana* a příbuzného patogena *B. brongniartii*: Molekulární výzkum genetické příbuznosti a populační struktury *B. bassiana* (Wang *et al.* 2003); Druhově specifické mikrosatelitní markery u entomopatogenních hub *B. brongniartii* (Enkerli *et al.* 2001); Izolace a charakterizace mikrosatelitových lokusů u entomopatogenních hub *B. bassiana* (Rehner a 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 diference pomocí RAPD, SSR a ITS markerů; nebo *Isaria fumosorosea*, na základě mikrosatelitové variability zjištění genetické diverzity a populační struktury (Gauthier *et al.* 2007).

I přes své široké využití mají mikrosatelity několik nevýhod. Jsou druhově specifickými markery a mikrosatelitové markery vyvinuté pro specifický druh vykazují u příbuzných druhů malou úspěšnost (Enkerli *et al.* 2001). Také jsou za účelem účinného poznání druhových hranic, stanovení relativního významu sexuálního vs. asexuálního rozmnožování vůči genetické struktuře populace a lepší pochopení jejich ekologie a potenciálních vlivů při jejich použití v biologické ochraně, potřeba citlivější molekulární markery nebo kombinace různých technik (Velásquez *et al.* 2007; Wang *et al.* 2004).

2.3.5.3 AFLP

V důsledku rychlého rozvoje metod v poslední dekádě se technika AFLP rozšiřuje i do této oblasti – studium diverzity a taxonomie vláknitých hub a AFLP markery začínají ve větší míře nahrazovat techniku RAPD (Leišová *et al.* 2002).

AFLP markery mohou být využity v jakékoli studii, jež využívá DNA markerů (Caetano-Anollés 1997), a to nejčastěji při studiu genetické variability populací eukaryotních i prokaryotních organismů, konstrukce genetických map živočichů, charakterizace genotypů savců, analýza genotypů bakterií, epidemiologická identifikace

bakterií, klasifikace hub na základě analýzy genotypu, RNA fingerprinting pomocí cDNA-AFLP a charakterizace a klasifikace patogenních organismů (Bleas *et al.* 1998).

Stejně jako všechny analýzy molekulárních markerů je i AFLP technika využívána v populační genetice u hub k ověřování geografického původu i interakce s hostitelem (de Muro *et al.* 2003; Fernandes *et al.* 2009). Avšak je většinou kombinována s dalšími technikami molekulárních markerů (Uma Devi *et al.* 2006).

2.3.5.4 Ribozomální RNA a její podjednotky

Analýzy hodnocení rDNA sekvencí jsou hlavně používány v taxonomických a fylogenetických studiích, protože se běžně nachází v buňkách, ve kterých mají důležitou funkci; tudíž jejich evoluce odráží evoluci celého genomu. Srovnání sekvencí malých podjednotek nebo jejich 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 fylogenetické analýzy v širokém rozsahu řady taxonomických stupňů (Jorgens a Cluster 1989). Tyto molekulární sekvence obsahují dostatečné evoluční informace umožňující posouzení fylogeneticky příbuzných organismů (Sogin a Gunderson 1987).

DNA sekvence, které kódují ribozomální RNA, jsou u hub poměrně široce využívány ke studiu taxonomických vztahů a rovněž tak i ke studiu genetických změn (Bruns *et al.* 1992; Hibbert 1992). Geny pro ribozomální RNA se nacházejí v jádře a mitochondriích a tyto geny se skládají jak z velmi konzervativních, tak i variabilních regionů (White *et al.* 1990).

Jaderné rRNA geny hub jsou uspořádány jako tandemové opakování několika stovek kopií na genom. Konzervativní sekvence genů velké podjednotky (Large Subunit = LSU) a malé podjednotky (Small Subunit = SSU) ribozómu se využívají ke studiu vztahů mezi vzdáleně příbuznými houbami (Gaudet *et al.* 1989; Bowman *et al.* 1992; Bruns *et al.* 1992).

SSU rDNA se vyvíjí poměrně pomalu, a proto je vhodný pro rekonstrukci evoluce taxonů větších než druh. Naopak pro vnitrodruhové studie a určení vztahů blízké příbuzných druhů jsou vhodné geny s vyšší substituční rychlostí nebo nekódující oblasti, tak jako ITS (Internal Transcribed Spacer) nebo IGS (Intergenic Spacer) (Edel 1998). Proto se dnes pro potřeby fylogeneze používá také řada dalších genů a výjimkou už nejsou ani vícegenové studie (Rehner a Buckley 2005; Tartar 2005).

2.3.5.5 Analýza ITS regionů

Studie týkající se struktury a polymorfismu ITS regionu vyústily i v praktické využití získaných poznatků pro účely identifikace a diagnostiky hub (houbových patogenů). Na základě těchto studií byly navrženy univerzální primery na podkladě sekvencí rDNA. Tyto primery jsou specifické pro hlavní skupiny hub. Gardes a Bruns (1993) navrhli dva selektivní primery (ITS1-F a ITS4-B), které byly specifické pro houby, respektive pro zástupce třídy *Basidiomycetes*. V případě, že se primer ITS4-B zkombinoval s univerzálním primerem ITS1 nebo specifickým primerem ITS1-F, odlišil *Basidiomycetes* od *Ascomycetes*. Primery ITS1-F/ITS4-B byly využity pro detekci rzí v infikovaných tkání (ektomykorhizní houby patřící do třídy *Basidiomycetes*=pododdělení *Basidiomycotina*) a mohly by být použity ke studiu šíření rzí na alternativní hostitele a ke studiu ektomykorhizních společenstev (Váňa 1998). Například pomocí analýzy ITS a porovnáním jejich sekvencí byl vytvořen postup pro jednoznačnou identifikaci fytopatogenních hub bez předchozí izolace a morfologické charakterizace (Moukhamedov *et al.* 1993; Beck a Ligon 1995). Obdobné aplikace jsou využívány pro identifikaci mykorhizních hub (Endrychová 2004; Lanfranco *et al.* 1998)

Na základě srovnání 5,8S rDNA a přilehlých ITS1 a ITS2 regionů byl u 16 druhů rodu *Claviceps* sestaven fylogenetický strom a restriční mapa ITS regionu. Všechny druhy byly rozděleny do dvou hlavních skupin a první z nich obsahovala také dva nejznámější druhy: *C. purpurea* a *C. paspali* (Pažoutová 2001). RFLP analýza jaderné rDNA byla použita také pro houby rodu *Rhizoctonia* a *Fusarium* (Bridge a Arora 1998).

Nazar *et al.* (1991) využili ITS sekvence pro popis, identifikaci a detekci na jimi vybraných druzích hub. Identifikace odlišných skupin nehomologických nukleotidů v regionech ITS1 a ITS2 umožnila navržení specifických primerů, které zajistily specifickou detekci těchto dvou významných rostlinných patogenů. Obdobný princip použili Moukhamedov *et al.* (1993), kteří použili sekvence z amplifikovaných úseků 5,8-28S rRNA k odlišení zástupců jednotlivých druhů rodu *Verticillium*. Bylo zjištěno, že sekvence 5,8S byly u uvedených druhů rodu *Verticillium* konzervativní, zatímco ITS oblast se u druhu *V. tricorpus* dostatečně odlišovala. To pomohlo vytvořit dvojici druhově specifických primerů, která umožnila detekci *V. tricorpus* v kultuře i v infikovaných stoncích bramboru. Použité PCR protokoly dovolily i kvantifikaci patogena u patogenních polních plodin.

V samostatné studii Hopfer *et al.* (1993) použili specifické primery odvozené ze sekvencí 18S rRNA pro rozpoznání hub z lidských klinických vzorků. Rozšiřující sekvenční databáze a přístupy zde uvedené v kombinaci s dostatečnými referenčními daty umožní hlubší pohled do populační struktury houbových společenstev a detekci hub z okolního prostředí (Bridge a Arora 1998).

2.4 Využití *Beauveria bassiana* v praxi – biologická ochrana rostlin

Biologické metody ochrany rostlin byly definovány několika způsoby:

Van Lenteren (1986) formuloval biologickou ochranu jako záměrné využívání přirozených nepřátel s cílem regulace populací škůdců, plevelů a původců onemocnění rostlin.

Van Driesche a Hoddle (1996) ji definovali jako redukci populace škodlivého hmyzu přirozenými nepřáteli, přičemž role člověka hraje významnou roli. Přirození nepřátelé škodlivého hmyzu jsou známí jako činitelé biologické ochrany rostlin a zahrnují parazity, predátory a entomopatogenní mikroorganismy (viry, bakterie, houby a háďata). Mezi mikroorganismy, které regulují původce rostlinných onemocnění, patří antagonistické houby a bakterie a mykoparazitické houby (Wagner a Lewis 2000).

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

Biologická ochrana se člení **na klasickou a na augmentativní**. Klasická 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 (Šedrllová 2008).

Může mít potenciálně pozitivní i negativní vliv na biodiverzitu. Biopreparát byl mnohokrát introdukován na plochu, kde měl ochraňovat přirozené druhy od druhů exotických, které se na této ploše vyskytovaly (Rehner a Buckley 2005). Ovšem zanesená kontrola nemusí mít vždy vliv pouze na zamýšlený cílový druh. Cílem mohou být také přirozené druhy (Tucker *et al.* 2004).

Registrované biopreparáty na bázi *Beauveria bassiana* jako BotaniGard ES®, BotaniGard®, Naturalis TNO, Mycotrol® jsou registrovány zejména proti molicím, mšicím, třásněnkám, červcům, kříśům, nosatcům škodícím na zemědělských plodinách a lesních porostech; v okrasném zahradnictví proti larvám vrubounovitých a nosatcovitých brouků nebo proti širokému sortimentu škůdců rychlené zeleniny a okrasných květin. Během posledních několika let se použití entomopatogenní houby v zemích s intenzivní zemědělskou činností těší velikému zájmu. Vzhledem k velkému potenciálu *Beauveria bassiana* v biologické ochraně rostlin proti zemědělským škůdcům získává studium pro genetické zlepšování houby stále větší význam (Paccola-Meirelles a Azevedo 1991).

V Evropě byly tyto preparáty prvotně použity k potlačení populace škůdců na kukuřici (Hafez *et al.* 1994). Ve Spojených státech byly prováděny testy proti škůdci mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Po ošetření pole přípravkem

na bázi *Beauveria bassiana* byl výnos hlíz vhodných k prodeji mnohem vyšší než v předchozích letech (Anderson *et al.* 1988).

Dalšími příklady je použití proti škůdcům na zelenině, zejména proti druhu *Orius insidiosus*, třásněnce škodící na paprikách. Třásněnky ovlivnily jak výnos, tak kvalitu zeleniny. Dále jako ochrany před škůdci působícími na kukuřici, a to zejména proti nosatci (*Sitophilus zeamais*) (Adane *et al.* 1996). Nebo se pro snížení regulace chrousta (*Melolontha melolontha*) v Evropě využil příbuzný druh *Beauveria brongniartii*, jež je jeho přirozeným patogenem (Schwarzenbach *et al.* 2009). Preparáty na bázi *Beauveria bassiana* se také používají pro kontrolu populace *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae), která je v Brazílii primárním zdrojem laischmaniózy, a proto vzniká snaha udržet dlouhodobou regulaci tohoto vektoru (Amóra *et al.* 2009). V jižní Číně se 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 a Feng 2004). Velké ekonomické ztráty v pěstování jahod způsobují škůdci *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* a *Otiorhynchus ovatus*, proti kterým se v Kanadě v Quebecu zkoušely a úspěšně aplikovaly také tyto preparáty (Sabbahi *et al.* 2008). V Kamerunu se zavedla aplikace těchto preparátů na bázi *Beauveria bassiana* na vektor malárie *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera, Culicidae), kde se aplikovala suchá kordialní směs na dospělé jedince (Achonduh a Tondje 2008).

Ovšem *Beauveria bassiana* nemusí být vždy pomocníkem v biologické kontrole. V Číně způsobuje velké škody na chovných populacích bource morušového (*Bombyx mori*), který se využívá pro získávání hedvábí, a způsobuje tak významné ekonomické ztráty. 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).

Vhodné kmeny hub pro průmyslové či biotechnologické aplikace jsou často vybírány na základě monitoringu vlastností přirozeně se vyskytujících kmenů. V rámci enormní přirozené variability většiny druhů lze selekcí získat kmeny, které mohou např. splňovat hlavní charakteristiky biopreparátu – vykazují dostatečnou supresi

patogena a mají vlastnosti vhodné z hlediska jejich masové produkce a finalizace (Bieliková 2001).

V České republice v rámci výzkumu prof. Landy se entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* využívá k ochraně v lesním hospodářství, zejména v boji proti lýkožroutu 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 se zabýval rozsáhlým monitoringem přirozeného výskytu entomopatogenních hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým, detailní charakteristikou kmenů hub zachycených v průběhu monitoringu a vývojem biotechnologií produkce biomasy hub umožňujících reintrodukcii vybraných kmenů do oblasti jejich původu, s cílem záměrně indukovat vznik epizootie v populacích lýkožrouta.

Využívání biopreparátů na bázi *Beauveria bassiana* proti *Ips typographus* se obdobně 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). Nejčastěji je preparát na bázi *Beauveria bassiana* aplikován formou vodní suspenze spor na povrch napadených stromů nebo stromových lapáků. Výsledky laboratorních studií a provozních aplikací dokazují, že v porovnání s většinou ostatních druhů entomopatogenních hub vykazuje *Beauveria bassiana* po aplikaci na dospělé *Ips typographus* nejen nejvyšší virulenci, ale zjevně i největší adaptaci na tohoto hostitele ve smyslu autodiseminace (samošíření), tj. schopnosti patogena šířit se prostřednictvím přirozených mechanismů odrážejících populační chování hostitele (Doberski *et al.* 1980).

3. Cíle

Cílem předkládané disertační práce bylo zhodnocení a využití technik molekulárních markerů u modelového druhu (*Beauveria bassiana*) entomopatogenních hub. Smyslem této práce bylo optimalizovat a otestovat některé z aplikací techniky PCR, neboť tyto techniky se stávají nedílnou součástí hodnotících metod v oblasti mykologie.

Hlavní cíle této disertační práce byly:

Zavedení, optimalizace a vývoj jednotlivých metod molekulární analýzy mikrosatelitů a genů pro ribozomální RNA a metody AFLP.

Ověření funkčnosti jednotlivých optimalizovaných molekulárních markerů na širším souboru vybraných kmenů entomopatogenních hub, zdali jsou systémy vhodné a výsledky využitelné pro populační analýzy.

Detailní zhodnocení genetické variability kmenů *Beauveria bassiana* z oblasti Národního parku Šumava pomocí jednotlivých metod a potvrzení či vyvrácení homogenity šumavské populace a hypotézy „lokálního kmene“.

4. Materiál a metody

4.1 Použitý materiál

V této práci byly použity kmeny entomopatogenních hub ze sbírky entomopatogenních hub oddělení Rostlinolékařství, Katedry rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Tato sbírka je uložena ve formě alginátových pelet a uchovávána při -20 °C. Všechny kmeny použité v této studii jsou navíc uloženy ve 20-ti procentním roztoku glycerolu při -80 °C.

Do studie byly zahrnuty kmeny následujících druhů entomopatogenních hub: *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea*.

Práce probíhala ve třech úrovních a s různými sadami kmenů:

Tab. 1: Základní soubor pro optimalizaci a vývoj metody molekulárního fingerprintingu – kmeny Bba I101, Pk, Pm, PFR97.

Druh	Označení ve sbírce	Označení pro genetickou analýzu	Původ - lokalita	Původ – zdroj
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba I 101	B5	Prameny Vltavy, NP Šumava, ČR	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	Pk	Pk	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Beauveria brongniartii</i>	Pm	Pm	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Isaria fumosorosea</i>	PFR97	PFR	Florida, USA	Biopreparát PREFERAL

Vysvětlivky: IT – *Ips typographus*, GBM – galleria bait method, TBM – tenebrio bait method, kůra dodine – selektivní živná půda na bázi dodine, což je účinná látka ve fungicidu Sylit.

Tab. 2: Modelový soubor pro zjištění funkčnosti metody molekulárního fingerprintingu – kmeny Bba I101, KRNAP, Pk, Pm, svět.

Druh	Označení ve sbírce	Označení pro genetickou analýzu	Původ - lokalita	Původ – zdroj
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba I 101	B5	Prameny Vltavy, NP Šumava, ČR	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	Pk	Pk	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Beauveria brongniartii</i>	Pm	Pm	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Isaria fumosorosea</i>	PFR97	PFR	Florida, USA	Biopreparát PREFERAL
<i>Beauveria bassiana</i>	KR0006	KR6	Pěnkavčí vrch, KRNAP, ČR	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	KR0007	KR7	Pěnkavčí vrch, KRNAP, ČR	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	A24	Pol	Polsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba 01	USA	Spojené státy americké	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A32	Rum	Rumunsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A133	Col	Kolumbie	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A135	Fr	Francie	-
<i>Beauveria bassiana</i>	T08	SK08	Slovensko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A131	SSSR	Rusko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A36	SVE	Švédsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	T01A	SK01	Slovensko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A74	C	Čína	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A52	Ind	Indie	-

Ostatní kmeny byly ze sbírky oddělení rostlinolékařství, katedry rostlinné výroby a agroekologie, ZF JU v ČB pocházejících z oblastí: Krkonošský národní park, Pěnčín

(Morava), Čína, Francie, Indie, Kolumbie, Polsko, Rumunsko, Slovenská republika, Švédsko, Spojené státy americké a Rusko, u těchto kmenů nebyl znám zdroj.

Tab. 3: Soubor kmenů, na které byl aplikován set molekulárních markerů pro identifikaci a charakterizaci.

Druh	Označení ve sbírce	Označení pro genetickou analýzu	Původ - lokalita	Původ – zdroj
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba I 101	B5	Prameny Vltavy, NP Šumava, ČR	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	Pk	Pk	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Beauveria brongniartii</i>	Pm	Pm	Pěnčín, ČR (Morava)	GBM
<i>Isaria fumosorosea</i>	PFR97	PFR	Florida, USA	Biopreparát PREFERAL
<i>Beauveria bassiana</i>	KR0006	KR6	Pěnkavčí vrch, KRNAP, ČR	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	KR0007	KR7	Pěnkavčí vrch, KRNAP, ČR	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	A24	Pol	Polsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	Bba 01	USA	Spojené státy americké	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A32	Rum	Rumunsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A133	Col	Kolumbie	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A135	Fr	Francie	-
<i>Beauveria bassiana</i>	T08	SK08	Slovensko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A131	SSSR	Rusko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A36	SVE	Švédsko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	T01A	SK01	Slovensko	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A74	C	Čína	-
<i>Beauveria bassiana</i>	A52	Ind	Indie	-

<i>Beauveria bassiana</i>	NP0001	1	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0002	12	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0003	23	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0008	34	Jelení skok - Oblík	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0007	35	I. zóna 19, odd.8 Zlatý stoleček	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0005	36	Jelení cesta – U Mlýna	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0009	38	Březová cesta	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0010	39	Poledník	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0100	40	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0101	41	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0102	42	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0103	43	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0104	44	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0105	45	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0106	46	Černá hora	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0004A	50	Styková lesní cesta	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0004B	51	Styková lesní cesta	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0006	52	Borová Lada – Silniční slať	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0020	53	Staré dráty	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0022	54	Zlatý stoleček	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0026	55	Vltavský luh	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0027	56	Rulandský potok	dospělec IT

<i>Beauveria bassiana</i>	NP0028	57	Smrčina	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0029	58	Pod studenou horou	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0030	59	Studená horizont	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0031	60	Zlatý stoleček	kůra GBM
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0051	61	Jelení skok – Dunkelbach	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0052	62	Jelení skok – Bavorská cesta	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0053	63	Hraniční chodník, Střelecký průsmyk	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0054	64	78C4/2 + GPS, Staré dráty	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0083	66	Prameny Vltavy	dospělec IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0084	67	OVO – 8 – 20	larva IT
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0085	68	Zámecký les (1 C5)	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0086	69	Skládka Žákova cesta	kůra dodine
<i>Beauveria bassiana</i>	NP0091	70	OLE – 07, 65 A 04	larva IT
<i>Beauveria brongniartii</i>	NP0155	Bbr	Stožeček	kůra TBM
<i>Isaria fumosorosea</i>	NP0056	IFR	V kotli	kůra dodine

Pro confirmaci výsledku zde byl použit set vzorků modelového souboru a populace *Beauveria bassiana* získaná během monitoringu kmene *B. bassiana* v Národním parku Šumava během projektu vedeným prof. Landou MZP SP/2d1/41/08 (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.

4.2 Metody

4.2.1 Kultivace analyzovaných kmenů hub

Kultivace jednotlivých kmenů probíhala na umělé živné půdě PDA (Potato Dextrose Agar) v termostatu při 25 °C po dobu 14 dnů a v tekuté živné půdě PDB (Potato Dextrose Broth) po dobu 3 dnů.

Použitá média

PDA (Potato Dextrose Agar) HIMEDIA (Česká republika)

Složení: bramborová infuze 200 g/l, dextrosa 20 g/l, agar 15 g/l.

Konečné pH při 20 °C je 5,6.

Příprava: 39 g PDA do 1 l destil. vody, sterilujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

PDB (Potato Dextrose Broth) HIMEDIA (Česká republika)

Složení: bramborová infuze 200 g/l, dextrosa 20 g/l.

Konečné pH při 25 °C je 5,1.

Příprava: 24 g PDA do 1l destil. vody, sterilujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

4.2.2 Uchování kultur

Pro dlouhodobé uchování bylo mycelium homogenizováno sterilní očkovací kličkou ve flow-boxu v roztoku sterilního 20% glycerolu a 5% Tween 80, odebráno pomocí mikropipety do kryozkumavek a zmraženo v -80 °C.

4.2.3 Izolace DNA

Pro optimalizaci množství a kvality extrahované DNA byly použity tři metody izolace komerčně dodávanými kity a dvě metody izolace pomocí CTAB v různých modifikacích podle standardních protokolů Biotechnologického centra Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Pro každou metodu byly použity dva typy vzorků, čerstvé mycelium z kultury kultivované dva týdny na pevném mediu PDA a lyofilizovaná submerzní kultura kultivovaná tři dny v tekutém médiu PDB.

Metody izolace DNA komerčními kity jsou založeny 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 a jejímu následnému vymytí elučním roztokem. Analyzovaný vzorek může být rozdrčen v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme vzorek homogenizátorkem přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství čerstvé biomasy, které můžeme použít, je 100 mg a maximální množství lyofilizované submerzní kultury je 20 mg.

Metody izolace DNA pomocí CTAB slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod a pro účely analýz molekulárních markerů, kde je na počátku potřeba vyšší množství DNA než u standardních PCR analýz. Metody jsou založeny na schopnosti CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, jež uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti komplexu CTAB-protein je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Modifikace jednotlivých metod spočívají v přidání různých aditiv jako je PVP (polyvinylpyrrolidon), který odstraňuje kontaminanty, nebo SDS (sodium dodecyl sulfates), který má schopnost narušit konformaci proteinů, a tím je vyvázat z komplexů membrán a umožnit tak získání čisté a kvalitnější DNA.

4.2.3.1 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

1. K homogenizovanému vzorku přidáme 400 µl pufru AP1 předehřátého na 65 °C a 4 µl RNázy A (20 mg/ml). Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při 65 °C, během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2–3x převrátíme.
2. Přidáme 130 µl pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu.
3. Lyzát přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme 2 min. při 8000 rpm. Při pipetování lyzátu do kolonek je nutné odstříhnout špičku pipety. Přes filtr projde do sběrné nádoby i malá část mrtvých buněčných pletiv a sraženin, kde vytvoří pelet.
4. Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450 µl supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.
5. Přidáme 0,5 dílu pufru AP3 a 1 díl etanolu (96–100%) a promícháme pomocí pipety. Př.: 450 µl supernatantu + 225 µl pufru AP3 + 450 µl etanolu.
6. 650 µl směsi z kroku 5 (včetně sraženin) přeneseme do DNeasy kolonek, centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
7. Opakujeme krok 6 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
8. DNeasy kolonky umístíme do nových centrifugačních zkumavek, přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
9. Přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 2 min. při maximálních otáčkách až do vysušení membrány v kolonce, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky. DNeasy kolonky vyndáme opatrně z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu.
10. DNeasy kolonky přeneseme do 1,5 ml (2 ml) mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 µl pufru AE (zahřátého na 65 °C) přímo na membrány kolonek a centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm. DNA uchovááme při -20 °C.

4.2.3.2 Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme stanovené množství vzorku. Homogenát přeneseme do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 400 µl Lysis Buffer P a 20 µl proteinázy K. Vortexujeme a necháme 30 min. inkubovat při 65 °C. Během inkubace 2–3x promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.

2. Vzorky přeneseme na Spin Filter. Centrifugujeme 10 min. při 12000 rpm. Pokud je to nutné přidáme 40 µl Rnázy A (10 mg/ml), vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
3. Přidáme 200 µl Binding Buffer P a vortexujeme.
4. Umístíme nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přeneseme vzorky a 1 min. inkubujeme. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
6. Přidáme 550 µl Wash Buffer I a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
7. Přidáme 550 µl Wash Buffer II a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok opakujeme. Nakonec centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.
8. Spin Filter umístíme do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidáme 100 µl Elution Buffer D přehřátého na 65 °C. Inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. DNA uchovááme při -20 °C.

4.2.3.3 Izolace DNA s použitím NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel)

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme stanovené množství vzorku. Přidáme 150 mg sterilního písku a 200 µl buffer PL1, zhomogenizujeme a vortexujeme. Přidáme 100 µl buffer PL1 a 10 µl RNázy A (10 mg/ml) a pokračujeme v homogenizaci.
2. Přidáme 100 µl chloroformu, vortexujeme 10 s a centrifugujeme 5 min. při 12000 rpm.
3. Do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi a inkubujeme 10 min. při 65 °C.
4. Umístíme nové NucleoSpin Filter (fialová) do nové 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube, přeneseme vzorky a centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtr a přidáme 450 µl Binding Buffer PC, min. 5x propipetujeme.
6. Umístíme NucleoSpin Plant II Column (zelená) do nové 2,0 ml NucleoSpin Collecting Tube a přeneseme vzorky. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm (maximální kapacita je 700 µl, pro větší objem opakujeme krok).

Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube.
7. Přidáme 400 µl Wash Buffer PW1 a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube.

8. Přidáme 700 µl Wash Buffer PW2 a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
9. Přidáme 200 µl Wash Buffer PW2 a centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.
10. NucleoSpin Plant II Column umístíme do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 µl Buffer PE předehřátého na 70 °C. Inkubujeme 5 min. při 70 °C a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. DNA uchováváme při -20 °C.

4.2.3.4 Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)

1. Připravíme si roztok 2x PVP–CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 µl roztoku. Připravený roztok dáme předehřát na 65 °C.
2. Analyzovaný vzorek můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme vzorek (cca 150 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 µl předehřátého pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 60 min. inkubovat při 65 °C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Po centrifugaci 14000 rpm 10 min. se převede supernatant (500 µl) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500 µl chloroformu s IAA, směs se 10 min. promíchává a následně centrifuguje 5 min. při 14000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 1/5 objemu 5% CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500 µl směsi chloroformu–IAA a 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 µl) a 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. (až na noc) do -20 °C. Centrifugujeme 5 min. při 4 °C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 300 µl 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37 °C.
8. Přidáme 2 objemy (600 µl) ledového abs. ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do -20 °C minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z -20 °C a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4 °C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.

10. Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle velikosti peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x TE pufru nebo sterilní vody (rozpustit 40 min. při 37 °C).
13. Přidáme 1 μ l Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37 °C. DNA uchováváme při -20 °C.

4.2.3.5 Izolace DNA s použitím CTAB-SDS

1. Připravíme si roztok Lysis pufru a 1% 2-merkapt ethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku.
2. Analyzovaný vzorek můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme vzorek, ze kterého chceme izolovat DNA a zhomogenizujeme. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l pufru, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Přidáme 50 μ l 10% SDS, zhomogenizujeme a necháme 60 min. inkubovat při 37 °C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 75 μ l 5M NaCl a promícháme. Přidáme 60 μ l 10% CTAB a 1 μ l 1% PVP, promícháme a necháme 30 min. inkubovat při 65 °C
5. Po centrifugaci 14000 rpm 10 min. se převede supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500 μ l chloroformu s IAA, směs se 10 min. promíchává a následně centrifuguje 5 min. při 14000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 5 μ l RNázy A (10 mg/ml) a necháme 30 min. inkubovat při 37 °C.
6. Přidáme 0,6 objemu isopropanolu a 2–3x lehce promícháme. Dáme na 20 min. (až na noc) do -20 °C. Centrifugujeme 10 min. při 4 °C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu, 2–3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny).
12. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x sterilní vody (rozpustit 40 min. při 37 °C). DNA uchováváme při -20°C.

4.2.4 Analýzy molekulárních markerů

4.2.4.1 SSR (single sequence repeat), mikrosatelity

Pro SSR analýzu byly použity primerové páry Ba01, Ba02, Ba03, Ba05, Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Bb1F4, Bb8D6, Bb6A8, Bb2F8, Bb10D4, Bb2A3, Bb5F4, Bb4H9, Bb8C11, Bb13A5 - sekvence primerů jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Sekvence primerů používaných pro SSR analýzu u entomopatogenních hub.

Primer	Sekvence '5–3'	Teplota nasedání
Ba01	5'–CCAACCCAATCAATCGTCAT– 3' 5'– GAGAGGCGGAGCTAAGCA– 3'	54°C
Ba02	5'– AACGCTATGCCTTGACGAC– 3' 5'–GACGCCGAGCAATGTAACA– 3'	54°C
Ba03	5'–GCATAGATATGTCTCGCACC– 3' 5'–ACTACCCTGTCCCCGCTGA– 3'	54°C
Ba05	5'–AGGCAATACCGAGGTTGGC– 3' 5'– ATCCATGGCGAGCCGTCC– 3'	58°C
Ba06	5'– GCGATTGACGAAAAGCTAGA– 3' 5'– ACTTGCTTTGCTGTTGCACA– 3'	54°C
Ba08	5'– TGTTGCCGACACGAATTGT– 3' 5'–GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA– 3'	56°C
Ba12	5'–GGGTCCATCATGTACGGC– 3' 5'–AGGCGTATACAGGTCGTG– 3'	56°C
Ba13	5'–CAGGCAACAACACGATTTCA– 3' 5'–ATGCCATCTACGACTTTATGA– 3'	56°C
Bb1F4	5'–GATCCTTCGTACCTGCTC– 3' 5'–CGGTGTTGGAGAGCTATTGT– 3'	58°C
Bb8D6	5'–TTTGTCCGAAGTTGTCTCAGT– 3' 5'–TGCATTGTGAAAGGTAATGC– 3'	58°C
Bb6A8	5'–GATGATGCGACCTCTGGAC– 3' 5'–TGCGACAGATTGCGAGAGTA– 3'	56°C
Bb2F8	5'–GCACACTTTCGCTGTGTCAT– 3' 5'–ATGATGTCTGCCACGTCTGA– 3'	58°C
Bb10D4	5'–TCTCCATTCCATATATCCAAGC– 3' 5'–ACGCTGTTGCCGTAGTAGTC– 3'	58°C
Bb2A3	5'–CACTTCAGTTATCATGCTCGAA– 3' 5'–ATCTGGCACGTCAAGTGTCT– 3'	58°C

Bb5F4	5'–CTCGATCACTTTTCCATCAA– 3' 5'–TGGTTGGGTCATGTTAGTCA– 3'	56°C
Bb4H9	5'–CTGCTCAGTGCTCATTGCTC– 3' 5'–ACAGCTCGGCATTGATGATT– 3'	54°C
Bb8C11	5'–TTGAATGGCCATGAGTTCTG– 3' 5'–TGCTATGGTATGGATGGGCT– 3'	58°C
Bb13A5	5'–CGACTTTGCGTGGAAGTATG– 3' 5'–GGTTAGCAAATGGCCCTCTA– 3'	58°C

Rehner (2003); Enkerli (2001)

Protokol SSR analýzy vychází z metodiky Williams *et al.* (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Nováková (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer F
- 0,5 µl primer R
- 10,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- | | | |
|------------------------|--------|----------------------------------|
| • počáteční denaturace | 45 s | 95°C |
| • 33 cyklů: | 40 s | 94°C |
| | 40 s | 54–58°C, dle příslušného primeru |
| | 30 s | 72°C |
| • konečná elongace | 5 min. | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

Pro separaci a detekci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza na 2% agarózovém gelu v 1x TBE pufru, elektroforéza na 3% Synergelu v 0,5x TBE pufru, čipová elektroforéza a fragmentační analýza. Jako marker při gelové elektroforéze byl použit 100 bp DNA Ladder (NEB), při čipové elektroforéze 1K Ladder (Bio-Rad) a při fragmentační analýze Size Standard Gene ScanTM – 500 LIZTM (Applied Biosystems, Life Technologies).

4.2.4.2 ITS – RFLP

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci ITS regionu a štěpení amplifikovaného produktu. Volbou primerů je možno amplifikovat úsek ITS1, ITS2 nebo celý region zahrnující ITS1+ITS2 a 5,8S rDNA.

Metoda se skládá ze dvou částí:

- I. Amplifikace specifického fragmentu z ITS regionu.
- II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restričních endonukleáz.

I. Protokol ITS-RFLP analýzy byl modifikován z metodiky práce Gardes a Bruns (1996) a Endrychová (2004). Pro účely PCR-RFLP analýzy byly použity univerzální primery ITS1 a ITS4, resp. ITS1F a ITS4; a ITS5 a ITS4 (Tab. 5).

Tab. 5: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci ITS regionu.

Primer	Sekvence '5—3'
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

White et al (1990)

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakční pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l PPP master mixu
- 1 μ l DNA
- 0,5 μ l primer ITS5 nebo ITS1 nebo ITS1F
- 0,5 μ l primer ITS4
- 10,5 μ l dH_2O (voda do objemu 25 μ l)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár ITS1F a ITS4:

• počáteční denaturace	5 min.	95°C
• 35 cyklů:	1 min.	95°C
	45 s	50°C
	2 min.	72°C
• konečná elongace	10 min.	72°C
• stop	–	4°C

Pro primerový pár ITS1 a ITS4, ITS5 a ITS4:

• počáteční denaturace	2 min.	94°C
• 10 cyklů (-1°C/1 cyklus):	30 s	94°C
	30 s	66°C
	1 min.	72°C
• 25 cyklů:	30 s	94°C
	30 s	56°C
	1 min.	72°C
• konečná elongace	10 min.	72°C
• stop	–	4°C

II. Po ukončení PCR se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu. K této části PCR reakce je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1 µl je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu. Štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz. Na štěpení produktů z PCR byly použity tyto restriční enzymy: *HhaI*, *AluI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI*, *HpaII*, *Clal*, *EcoRI*, *HindIII*, *SspI*, *MspI*, *HinfI*, *Taq^I*, *PstI* (NEB, USA).

Štěpící místa:

HhaI



AluI



MboI



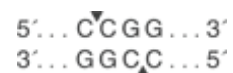
HaeIII



MseI



HpaII



*Cl*I



*Eco*RI



*Hind*III



*S*spl



*M*spl



*H*infl



Taq^αI



*P*stI



Příprava reakce pro restrikční analýzu:

- 15 μl PCR reakční směsi
- 2 μl 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s RE)
- 0,5-1 μl restrikční endonukleázy (≈ 5 U)
- ± 1 μl 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)
- voda do celkového objemu 20 μl

Štěpení probíhá při teplotě 37 °C po dobu 6-7 hodin v termostatu nebo lépe v termocykleru.

Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru nebo na 3 % Synergelu v 0,5x TBE pufru, kde je dosaženo kvalitnějšího rozdělení. Jako marker se používá 100 bp DNA Ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Na gel je nanášeno 10 μl neštěpených produktů a celý objem (20μl) štěpených fragmentů.

4.2.4.3 PCR-RFLP rDNA (LSU – large subunit)

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci části genů pro rRNA, která je součástí velké (LSU) podjednotky ribozómu a následném restrikčním štěpení získaných fragmentů. Volbou primerů je možno amplifikovat různé domény genů pro rRNA.

Metoda se skládá ze dvou částí:

- I. Amplifikace specifického fragmentu rDNA.
- II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restričních endonukleáz.

I. Protokol PCR-RFLP analýzy byl modifikován z metodiky práce Gardes a Bruns (1996). Pro účely PCR-RFLP analýzy byly použity primery NL1 a NL4 (Tab. 6).

Tab. 6: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci LSU.

Primer	Sekvence '5—3'
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Oborník et al. (2001)

PCR reakce probíhá v objemu 25 μ l, v 1x reakční pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μ M dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l PPP master mixu
- 1 μ l DNA
- 0,5 μ l primer NL1 / LS1
- 0,5 μ l primer NL4 / LS5
- 10,5 μ l dH_2O (voda do objemu 25 μ l)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cyclyer při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár NL1 a NL4:

- počáteční denaturace 5 min. 94°C
- 25 cyklů: 1 min. 94°C
1 min. 50°C
1,25 min. 72°C
- konečná elongace 5 min. 72°C
- stop – 4°C

II. Po ukončení PCR se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu. K této části PCR reakce je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1 μ l je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu. Štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz (*Mbol*, *Hinfl* a *EcoRI*).

Příprava reakce pro restriční analýzu:

- 15 μ l PCR reakční směsi
- 2 μ l 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s RE)
- 0,5-1 μ l restriční endonukleázy (\approx 5 U)
- \pm 1 μ l 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)
- voda do celkového objemu 20 μ l

Štěpení probíhá při teplotě 37 °C po dobu 6 hodin v termostatu nebo lépe v termocykleru.

Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Kvalitnějšího rozdělení může dosaženo i na 3 % Synergelu. Jako marker se používá 100 bp DNA Ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Na gel je nanášeno 10 μ l neštěpených produktů a celý objem (20 μ l) štěpených fragmentů.

Pro obě analýzy, jak pro ITS regiony, tak pro velkou podjednotku rDNA (LSU) bylo následně po PCR-RFLP provedeno sekvenování daného úseku, z důvodů vytvoření fylogenetických stromů příbuznosti.

4.2.4.4 Izolace fragmentů z gelu (JETQUICK Gel Extraction Kit (Genomed GmbH))

1. K 100 mg vyříznutého proužku z gelu přidáme 300 µl L1 pufru.
2. Inkubujeme při 50°C po dobu 15 minut (každé 3 minuty zvortexovat).
 - Pokud má agarosa vyšší koncentraci než 2% nebo má vyříznutý vzorek více jak 300 mg, přidáme na každých 100 mg gelu 600 µl L1 a v tomto případě inkubujeme 20-30 minut
 - Maximální velikost vzorku může být 400 mg
3. Mix přeneseme do JETQUICK column, maximální množství je 600 µl.
4. Centrifugujeme 1 min na max (14 000 rpm).
5. V případě většího množství mixu opakujeme předchozí dva kroky.
6. Přidáme 500 µl pufru L2 přímo na filtr.
7. Centrifugujeme 1 min na max.
8. Odstraníme filtrát a centrifugujeme 1 min na max.
9. Vložíme JETQUICK column do 1,5 ml mikrozkušavky a přidáme 50 µl předehřátého (65-70°C) TE bufferu.
10. Inkubujeme 1 min při pokojové teplotě.
11. Centrifugujeme 2 minuty na max. Uchovááme při -20 °C.

4.2.4.5 Příprava sekvenační reakce

Pro naše účely bylo sekvenování provedeno na pracovišti BC AV, v. v. i. – Ústav molekulární biologie rostlin na přístroji ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems za použití BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit.

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 H₂O do celkového objemu 7,5 µl

4.2.4.6 AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Byly použity 3 techniky AFLP analýzy – jedna dle originálního protokolu dle Vos *et al.* (1995) a dvě modifikované dle Suazo a Hall (1999) a de Muro *et al.* (2003).

AFLP (Vos *et al.* 1995):

Restrikce (50 µl celkový objem):

- 40 µl vzorku DNA (min 200ng DNA) + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *MseI*
- Na 1 vzorek: 4 µl H₂O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U
- 10 µl restrikčního master mixu se přidá k 40 µl templátu DNA, promíchá se a štěpí se 16 h při 37 °C

Ligace (60 µl celkový objem):

- 50 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol *EcoRI* 3' adaptor, 5 pmol *EcoRI* 5' adaptor, 50 pmol *MseI* 3' adaptor, 50 pmol *MseI* 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza
- Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl *EcoRI*-3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl *EcoRI*-5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl *Mse*-3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl *Mse*-5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 µl 10 mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,2 µl vody
- 10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37 °C
- R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E puforem (540 µl T0.1E pufru + 60 µl R/L směsi)

Preselektivní amplifikace (50 µl celkový objem):

- 5 µl vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 75 ng *EcoRI*-A primeru, 75 ng *MseI*-A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy
- Na 1 vzorek: 5 µl vzorku, 5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP's, 0,15 µl *EcoRI*-A primeru (500 ng/µl), 0,15 µl *MseI*-A primeru (500 ng/µl), 0,2 µl Taq (5 U/µl), 36,5 µl vody
- 45 µl PCR master mixu se přidá k 5 µl vzorku

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 2 min. | 94°C |
| • 30 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 60°C |

	1 min.	72°C
• konečná elongace	9 min.	72°C
• stop	–	4°C

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 µl reakční směsi 20x naředí (860 µl TE + 40 µl templátu).

10 µl nenaředeného PCR produktu se použije na elektroforézu (1,2% agarozový gel v 1x TBE/TAE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 0 – 400 bp.

Selektivní amplifikace (10 µl celkový objem):

- 2,5 µl vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 5 ng EcoRI–ANN–FAM primeru, 30 ng MseI–ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy
- Na 1 vzorek: 2,5 µl vzorku, 1 µl PCR pufru, 0,2 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl EcoRI–ANN–FAM primeru (10000 pmol), 0,095 µl MseI–ANN primeru (316 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl vody
- 7,5 µl PCR master mixu se přidá ke 2,5 µl vzorku

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

• počáteční denaturace	2 min.	94°C
• 10 cyklů:	30 s	94°C
	30 s	65°C (-1°C/cyklus)
	1 min.	72°C
• 25 cyklů:	30 s	94°C
	30 s	56°C
	1 min.	72°C
• konečná elongace	15 min.	72°C
• stop	–	4°C

Detekce a separace probíhala na automatickém genetickém analyzátoru – sekvenátoru, kde byl jako velikostní standard použit Size Standard Gene Scan™ – 500 LIZ™ (ABI).

AFLP (Suazo a Hall 1999)

Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí jednou restriční endonukleázou. Na vzniklou populaci restričních fragmentů se ligují adaptory o známé sekvenci a provádí se amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalšími třemi selektivními nukleotidy na 3'–konci.

Tab. 7: Sekvence adaptorů a primerů používaných pro ligaci a amplifikaci.

	Primer	Sekvence '5–3'
Ligace	EcoRI adaptor U	CTCGTAGACTGCGTACC
	EcoRI adaptor L	AATTGGTACGCAGTCTAC
Amplifikace	GAC primer	GACTGCGTACCAATTCGAC
	ACA primer	GACTGCGTACCAATTCACA
	ACG primer	GACTGCGTACCAATTCACG
	AAG primer	GACTGCGTACCAATTCAAG
	ATG primer	GACTGCGTACCAATTCATG
	TTG primer	GACTGCGTACCAATTCTTG
	TCA primer	GACTGCGTACCAATTCTCA
	GTA primer	GACTGCGTACCAATTCGTA
	AAA primer	GACTGCGTACCAATTCAAA
	ACC primer	GACTGCGTACCAATTCACC
	GGG primer	GACTGCGTACCAATTCGGG
	GAT primer	GACTGCGTACCAATTCGAT
	GTT primer	GACTGCGTACCAATTCGTT
	AGA primer	GACTGCGTACCAATTCAGA

Suazo a Hall (1999)

Restrikce (20 µl celkový objem):

- 500 ng DNA, 1x R/L pufr, 20 U *EcoRI*, 50 pmol *EcoRI* adaptor,
- 1 U T4 ligáza, 0,1M ATP, H₂O
- Na 1 vzorek: 8 µl H₂O, 2 µl 10x R/L pufru, 2 µl *EcoRI* = 20 U, 1 ul *EcoRI* adaptor, 1 ul T4 ligáza = 1U, 1ul ATP, 5 ul DNA
- Štěpení a ligace probíhá 8 h při 37 °C

Selektivní amplifikace (25 µl celkový objem):

- 1 µl vzorku (vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 100 pmol primeru, 5 U Taq DNA polymerázy
- Na 1 vzorek: 1 µl vzorku, 2,5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP's, 2 ul primeru, 1 µl Taq (5 U/µl), 15,5 µl vody

Teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů: 30 s 94°C
30 s 65°C (-1°C/cyklus)
1 min. 72°C
- 25 cyklů: 30 s 94°C
30 s 56°C
1 min. 72°C
- konečná elongace 15 min. 72°C
- stop – 4°C

Produkty (amplifikované fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru nebo na 3% agarózo-Synergelovém gelu v 0,5x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA Ladder (NEB).

AFLP (Muro *et al.* (2003))

Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restričními endonukleázami. Na rozdíl od protokolu dle Vos *et al.* (1995) je použita kombinace jiných restričních endonukleáz – *EcoRI* a *HpaII*.

Tab. 8: Sekvence adaptorů a primerů používaných pro ligaci a amplifikaci.

	Primer	Sekvence '5–3'
Ligace	EcoRI-adapters	CTC GTA GAC TGC GTA CC
		CAT CTG ACG CAT GGT TAA
	HpaII-adapters	GAC GAT GAG TCC TGA G
		TG CTA CTC AGG ACT C GC

Pre-amp	EcoRI-ad1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	HpaII-ad1	GAC GAT GAG TCC TGA G
Sel-amp	EcoRI-GC	GAC TGC GTA CCA ATT CGC
	EcoRI-AT	GAC TGC GTA CCA ATT CAT
	HpaII-CTC	GAT GAG TCC TGA GCG CCT C
	HpaII-ACC	GAT GAG TCC TGA GCG CACC

Muro et al. (2003)

Restrikce (40 µl celkový objem):

- 500 ng vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *HpaII*
- Na 1 vzorek: 20 µl H₂O, 4 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *HpaII* = 5 U
- Štěpení probíhá se 1 h při 37 °C.

Ligace (50 µl celkový objem):

- 40 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol *EcoRI* 3' adaptor, 5 pmol *EcoRI* 5' adaptor, 50 pmol *HpaII* 3' adaptor, 50 pmol *HpaII* 5' adaptor, 1 mM ATP, 1 U T4 DNA ligáza
- Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl *EcoRI*-3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl *EcoRI*-5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl *HpaII*-3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl *HpaII*-5' adaptoru = 50 pmol, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,4 µl vody
- 10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37 °C.

Preselektivní amplifikace (20 µl celkový objem):

- 1 µl vzorku (vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 2,5 mM MgCl₂, 500 µM dNTP's, 50 pmol *EcoRI*-ad1 primeru, 50 pmol *HpaII*-ad1 primeru, 1 U Taq DNA polymerázy
- Na 1 vzorek: 1 µl vzorku R/L, 2 µl PCR pufru, 0,5 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl 10 mM dNTP's, 1 µl *EcoRI*-ad1 primeru (500 ng/µl), 1 µl *HpaII*-ad1 primeru (500 ng/µl), 0,2 µl Taq (5 U/µl), 9,3 µl vody

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 5 min. 94°C
- 31 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 1 min. 56°C
 - 1,5 min. 72°C
- konečná elongace 5 min. 72°C
- stop – 4°C

Selektivní amplifikace (20 µl celkový objem):

- 5 µl vzorku (vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 5-30 ng EcoRI–GC nebo –AT primeru (dle detekčního systému neznačený nebo značený FAM), 30 ng HpaII–CTC neo -ACC primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy
- Na 1 vzorek: 5 µl vzorku, 2 µl PCR pufru, 0,4 µl 10 mM dNTP's, 0,087 µl EcoRI–NN–FAM primeru (10000 pmol), 0,1 µl HpaII–NN primeru (300 ng/µl), 0,1 µl Taq (5 U/µl), 6,018 µl vody

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 65°C (-1°C/cyklus)
 - 1 min. 72°C
- 25 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 56°C
 - 1 min. 72°C
- konečná elongace 15 min. 72°C
- stop – 4°C

Detekce a separace probíhala na automatickém genetickém analyzátoru – sekvenátoru, kde byl jako velikostní standard použit Size Standard Gene Scan™ – 500 LIZ™ (ABI).

4.2.5 Separace a detekce PCR produktů

4.2.5.1 Separace

Klasickou metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a vytvoří proužek.

Elektroforéza v 2% agarózovém gelu

Příprava gelu:

1. Agaróza se smíchá s vodou a pufrem v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozváří se v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max. výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozváření je nutné s Erlenmayerovou baňkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy je třeba zchladit cca na 55 °C, poté se přidá odpovídající množství ethidium bromidu, vše se důkladně promíchá a nalije se do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí eliminovat.
3. Po nalití agarózy se do vaničky umístí hřebínek a gel se nechá 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je umístěn do elektroforetické vany a pod hladinu pufru jsou do jamek vkládány vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 μ l) se přidá 4 μ l nanášecího pufru (LB), promíchá se špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně je možné nanést vzorky na gel a poté

opatrně vložit gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru. Při použití PPP Master Mixu (Top-Bio) se již nanášecí pufr nepřidává, tento mix již barvivo obsahuje.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (v digestoři je třeba pracovat s rouškou)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 40 V po dobu 20 min. a poté 80 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- Gel je položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelů a pufrů:

Tab. 9: Složení 0,7% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 0,7% agarózový gel [pufr 5x TBE] – využití pro detekci DNA po izolaci				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [µl]
50	0,35	40	10	4
100	0,7	80	20	5
150	1,05	120	30	6
200	1,4	160	40	7

Tab. 10: Složení 2% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 2% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
50	1	40	10	4
100	2	80	20	5
150	3	120	30	6
200	4	160	40	7

Tab. 11: Příprava pracovních roztoků TAE a TBE pufrů.

1x pufr TAE/TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 12: Složení zásobních roztoků TAE a TBE pufrů.

	50x TAE	5x TBE
Tris (Trizma)	242 g	54
0,5 M EDTA	100 ml	20 ml
led. kys. octová	57,1 ml	-
kys. boritá	-	27,5
dH ₂ O	voda do 1 L	voda do 1 L

Elektroforéza v 3% Synergelu

Synergel je přípravek, který po smíchání s agarózou vytváří gel a výrazně zvyšuje separační možnosti agarózového gelu. Separované fragmenty DNA vytváří ostré pruhy, dobře rozdělené. Synergel se používá zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE gelu je zachována jednoduchost přípravy a provedení gelu a jeho netoxičnost.

Výpočet množství synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci Synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

- kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku Synergelu, který chceme převést na Synergel/agarózový gel
- 0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

Např. v případě, kdy standardní 3% agarózový gel nahrazujeme gelem s přídavkem Synergelu je složení gelu následující:

- A = 3% množství Synergelu ve směsi: $(3 - 0,7) / 2 = 1,15\%$
- 1,15% Synergelu přidáme k 0,7% agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g Synergelu a 1,75 g agarózy

Příprava gelu:

1. Navážíme daná množství agarózy a synergelu do Erlenmayerovy baňky.
2. Přidáme abs. ethanol – rozmícháme (nesmí se tvořit hrudky).
3. Přidáme 0,5x TBE pufru a rozvaříme v mikrovlnné troubě.
4. Přidáme EtBr, důkladně promícháme.
5. Nalijeme do vany bez bublin a vložíme hřebínek, necháme tuhnout 60-90 minut.

Nanášení vzorků a elektroforéza:

Stejně jako u elektroforézy v agarózovém gelu až na jednu výjimku: do elektroforetické vany lijeme 0,5x TBE pufr.

Tab. 13: Složení 3% agarózo-synergelového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 3% agarózo-synergelový gel [pufr 0,5xTBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. Syngelů [g]	množ. pufru 0,5x TBE [ml]	množ. Et. Br. [μl]
100	0,7	1,15	100	5
200	1,4	2,3	200	7
250	1,75	2,9	250	8

Separace fragmentů DNA na „čipové“ elektroforéze

Analýza amplifikovaných, resp. restričních fragmentů DNA byla provedena na systému automatické čipové elektroforezy Experion (Bio-Rad, USA), která pracuje na principu mikrofluidní technologie, kdy se celá analýza odehrává v miniaturním prostředí speciálního čipu. Vlastní separace a detekce fragmentů DNA probíhá ve speciálních čipech založených na kombinaci mikrofluidní technologie LabChip (Caliper Life Sciences') a citlivé fluorescentní detekce. Pro analýzu DNA se používá analytický kit Experion DNA 1K/12K Analysis Kit, který obsahuje DNA standard (1k nebo 12k Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barvu, centrifugační filtry a mikrofluidní čipy; každý čip pojme 11 vzorků. Příprava vzorku pro analýzu spočívá ve smíchání 1 μl vzorku a 5 μl vzorkového pufru. Na čipy, do kterých jsou před vlastní analýzou zavedeny gelové roztoky pomocí přístroje "priming station" (dodávaného jako součást systému), jsou vzorky aplikovány v množství 6 μl po výše uvedené úpravě. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat je prováděno pomocí speciálního software Experion, version 3.1 (Bio-Rad, USA).

Protokol Experion™ DNA 1K Kit

1. Zapneme elektroforetickou stanici a spustíme software.
2. Všechny reagenty z kitu vytemperujeme na pokojovou teplotu, poté zvortexujeme a krátce stočíme. Jen DNA ladder uchováváme na ledu.
3. Příprava DNA barveného gelu: přidáme 12,5 µl DNA barviva do zkumavky s 250 µl gelu, důkladně zvortexujeme cca 10 s, krátce centrifugujeme, přeneseme obarvený gel na filtrační zkumavku, centrifugujeme při 2400 rpm 15 min., zkontrolujeme, zda gel prošel filtrem, filtr vyhodíme a obalíme zkumavku alobalem.
4. 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 nastříkovací stanice (priming station) a zapneme program C3. Po nástřiku čip vyjmeme a ze spodní strany zkontrolujeme, zda se mikrokanálky zaplnily gelem s barvivem, poté do zbývajících třech jamek označených GS na čipu napipetujeme 9 µl gelu s barvivem.
5. 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.
6. Čip vložíme opatrně do elektroforézní stanice, vybereme 1K DNA analýzu, označíme počet vzorků pro analýzu a zahájíme začátek analýzy (cca 40 min).
7. 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 pro zamezení kontaminace

Fragmentační analýza na genetickém analyzátoru

Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

- 11 µl formamidu
- 0,5 µl Size Standard Gene Scan™ – 500 LIZ™ (ABI)
- 1,0 µl vzorku (po selektivní amplifikaci)

Vzorky se důkladně promíchají, musí být bez bublinek, v cyklu jsou denaturovány – 4 min. při 95 °C. Ihned (!) po ukončení denaturace jsou položeny nejméně na 2 min. do cold bloku vychlazeného na -20 °C, poté je provedena fragmentační analýza (ABI – automatický genetický analyzátor – sekvenátor) dle manuálu k sekvenátoru.

Pro analýzu mikrosatelitů byly vybrány pouze čtyři primerové páry (Tab. 14) ze sady používaných pro analýzu SSR. Používají se F (forward) primery, které jsou fluorescenčně značené.

Tab. 14: Sekvence primerů používaných pro fragmentační analýzu SSR.

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

Pro AFLP analýzu jsou značeny primery použité v selektivní amplifikaci 6-FAM.

4.2.5.2 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.* 2005). Bylo použito i barvení pomocí barviva SYBR GREEN. Jedná se však o barvivo, které může ovlivnit 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. Fingerprinty se zaznamenávají pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System a následně se vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager, UltraQuant, UltraLum). Získaná primární data byla dále statisticky zpracována.

U čipové elektroforézy je součástí kitu DNA 1K pro vizualizaci DNA fragmentů "DNA stain gel", který obsahuje fluorescentní barvivo. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat jsou prováděny pomocí speciálního software Experion, version 3.1 (Bio-Rad, USA). Získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

U fragmentační analýzy byly pro vizualizaci DNA fragmentů použity značené primery fluorescenčními barvivy 6-FAM, VIC, NED a PET. Pro vyhodnocení získaných dat byl použit speciální software GeneMapper 4.0 (ABI). Získaná primární data byla statisticky vyhodnocena.

4.2.6 Statistické hodnocení dat

Hodnocení fingerprintů (PCR produktů)

Pro účely komplexního hodnocení molekulárních markerů je vhodné využít statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představuje prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu je možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení.

Pro tyto účely byl využit program Statistica 6.0 (Statsoft) a MVSP (Kovach Comp. Serv.), zejména z důvodu možnosti výpočtu genetické distance dle Nei-Li metriky koeficientů podobnosti. Tyto programy umožňují, výpočty genetických vzdáleností či podobností, clusterovou /UPGMA – unweighted pair group method averages/ a ordinační /PCO – Principal Coordinates Analysis/ analýzu a sestavení grafů.

Hodnocení sekvenačních dat

Obdržená data byla zpracována v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0 a následovně upravena v programech: CLUSTAL W, Bioedit a SplitsTree.

Bioedit, CLUSTAL W

Tyto programy jsou vhodné pro takzvaný „alignement“ – dochází k porovnání jednotlivých sekvencí. U programu CLUSTAL W je výhodou jeho dostupnost na webových stránkách (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) a kompatibilita s programem Bioedit. V tomto programu lze ručně upravit jednotlivé sekvence pro další fylogenetickou analýzu.

SplitsTree 4 (version 4.11.3)

V programu SplitsTree lze vytvořit fylogenetické stromy stejně jako v programu PAUP. Lze v něm upravovat stromy do tvaru fylogramu či kladogramu, přehazovat jednotlivé větve či upravovat text. A dále v tomto programu je možnost zakořenění fylogenetického stromu vybráním „kořene“.

5. Výsledky

Optimalizace a vývoj metod, jak izolace DNA, tak analýz molekulárních markerů, byly nejprve aplikovány na základním souborů čtyř kmenů (Tab. 1). Na rozšířeném modelovém souboru sedmnácti kmenů (Tab. 2) byla po optimalizaci metody testována její funkčnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost. A pro praktickou aplikaci jednotlivých molekulárních markerů byl využit soubor padesáti čtyř kmenů (Tab. 3), na jejichž základě byl tento soubor vyhodnocen a charakterizován.

5.1 Izolace DNA

Pro volbu vhodné techniky izolace DNA bylo testováno 5 izolačních technik: tři komerční kity od firmy Qiagen, Invitek a Macherey-Nagel, a dvě metody „klasické/standardní“ izolace využívající detergenty CTAB-PVP a CTAB-SDS.

Bylo sledováno osm popisných charakteristik a parametrů, dle nichž byla dále posuzována vhodnost a použitelnost daných izolačních technik. Jak finanční náročnost, ale tak i výtěžnost jsou parametry velmi sledované z hlediska počtu vzorků vstupující do studie, a proto je důležité při výběru izolační techniky mít představu o jejich konečném počtu a metodě analýzy. Protože ne všechny metody molekulárních markerů mají stejné nároky na kvalitu, množství a čistotu DNA.

Tab. 15: Porovnání metod izolace DNA

Metoda	Cena [Kč]	Doba izolace [h]	Počet vzorků na den **	Pracnost ***	Práce s fenolem	Výtěžek roztoku DNA [μl]	Koncentrace roztoku DNA [ug/ml]	Výtěžek DNA [ng]
CTAB+P VP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+S DS	12	8(2 dny)*	2 x 24	3	ne	10 - 200	100-400	2-40
INVITEK	72	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-10	0,5-0,1
QIAGEN	120	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-20	0,5-0,2
MN	71	1,5-2	4 x 24	2	ne	100	5-10	0,5-0,1

Vysvětlivky:

- * osm hodin, ale rozloženo do dvou dnů
- ** standardní laboratoř, 1 pracovní linka, 1 centrifuga s rotorem pro 24 mikrocentrifugačních zkumavek
- *** 1 – nejméně náročné, 4 – nejvíce náročný postup

Podle sledovaných charakteristik byla jako optimální metoda pro účely analýzy mikrosatelitů a ITS regionu vybrána izolace pomocí DNeasy Plant Mini Kitu - Qiagen, která nejlépe splňovala sledované vlastnosti. Tato metoda je srovnatelná s oběma kitovými izolacemi, které jsou oproti DNeasy Plant Mini Kitu (QIAGEN) sice cenově výhodnější, ale kvalita a množství extrahované DNA neodpovídá požadavkům pro analýzy molekulárních markerů. Vyšší cena „kitové“ izolace oproti standardním metodám izolace byla vyvážena faktem, že jsou získány standardní vzorky DNA, opakovatelně a reprodukovatelně u celé sady izolátů. DNA byla získána v kvalitě, která umožňovala bezproblémovou analýzu širokého spektra DNA markerů. V této metodě jsou spojeny požadavky na jednoduchou standardní a rychlou metodu, která bude moci být uplatněna v běžné praxi.

Pro optimalizaci metod a pro účely hodnocení LSU a AFLP markerů je ale pro izolaci DNA vhodnější CTAB–SDS metoda. U této metody lze modifikovat jednotlivé kroky, je dosahována vyšší výtěžnost a čistota DNA, není ale vhodná pro velkosériové izolace a pro případy jednoduchých screeningových analýz. Obě dvě metody izolace založené na použití CTAB (metoda CTAB-PVP a metoda CTAB-SDS) mají stejné parametry při základním porovnání (pracnost, množství izolované DNA). Odlišnost je zejména v kvalitě a čistotě DNA a spolehlivosti izolace. Tyto dva poslední parametry se projeví u náročnějších technik, jako jsou genově specifické LSU a AFLP markery. U méně náročných technik (analýzy ITS, mikrosatelity) jsou tyto techniky srovnatelné a poskytují stejné výsledky.

5.2 Analýza mikrosatelitů

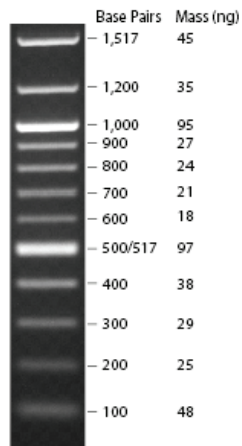
5.2.1 Optimalizace na základním souboru

Pro optimalizaci analýzy mikrosatelitů byla použita DNA extrahována pomocí izolačního kitu od firmy Qiagen, z důvodu rychlosti a následné použitelnosti při populačních analýzách, ke kterým analýza mikrosatelitů je hlavně využívána a dále z důvodu dostatečného množství kvalitní DNA pro tuto analýzu.

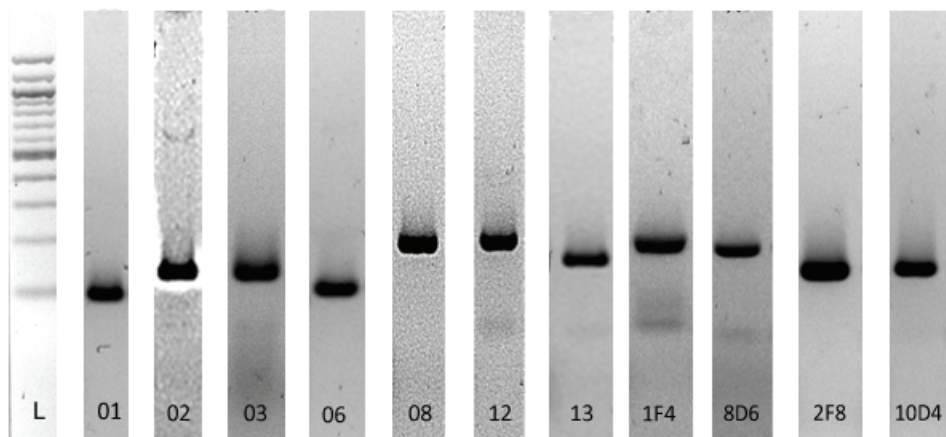
Byly provedeny optimalizace jednotlivých cyklů a nasedacích teplot v PCR reakci, vhodné koncentrace primerů, vyhodnocení použitelnosti jednotlivých primerových párů pro analýzu mikrosatelitů a separačních technik, jak z hlediska reprodukovatelnosti, tak z hlediska finanční náročnosti technik.

Pro podrobné testování zkoumaných vzorků byly ze sady primerů vybrány Ba01, Ba02, Ba03, Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Bb1F4, Bb8D6, Bb2F8, Bb10D4. Z důvodu bezproblémové amplifikace specifického mikrosatelitu bez pozadí – nespecifických produktů, bylo získáno dobře hodnotitelné spektrum a všechny poskytovaly reprodukovatelné výsledky.

Obr. 8: Velikostní marker, používaný ve všech gelových separačních technikách - 100 bp DNA Ladder (NEB) (L):



Obr. 9: Vzorové charakteristiky SSR u kmenu Bba I101.

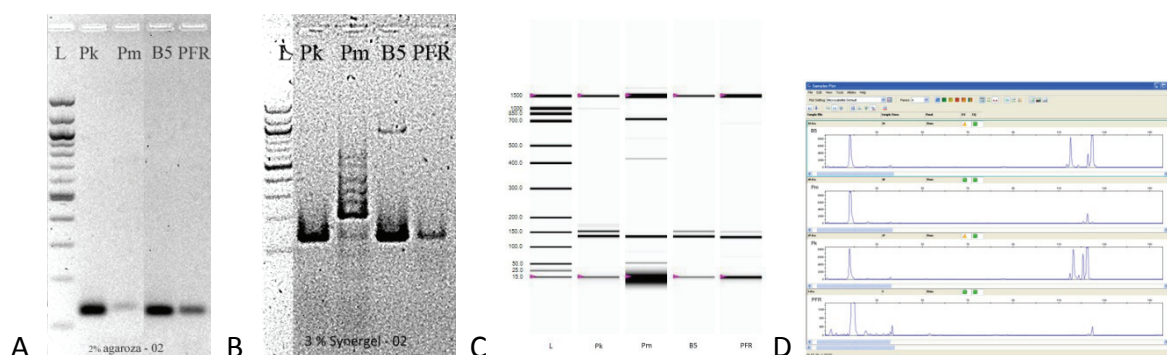


Tab. 16: Velikosti jednotlivých alel u vzorku B5, určené v programu UltraQuant na 3% Synergelu.

Primer	Ba01	Ba02	Ba03	Ba06	Ba08	Ba12	Ba13	Bb1F4	Bb8D6	Bb2F8	Bb10D4
velikost alely (u vz. B5)	100	125	125	105	195	200	165	185	170	140	135

Pro porovnání čtyř různých separačních technik byly vybrány čtyři primerové páry: Ba02, Ba03, Ba08 a Ba12. Obr. 10 představuje ukázkou primárních dat získaných po separaci SSR analýzy (primerový pár Ba02) za použití jednotlivých technik na základním souboru čtyř vzorků. Testovány byly čtyři metody separace - elektroforéza na 2% agarózovém gelu, elektroforéza na 3% synergelu, čipová elektroforéza a fragmentační analýza.

Obr. 10: Výstupy z testovaných separačních technik (primer Ba02): A - elektroforéza na 2% agarózovém gelu, B - elektroforéza na 3% synergelu, C - čipová elektroforéza, D - fragmentační analýza



Tab. 17: Porovnání metod separace mikrosatelitů (SSR)

Metoda	Cena/1vz. [Kč]	Časová náročnost [h]	Vstupní množství DNA z PCR [μl]	Pracnost	Citlivost rozlišení [bp]
2% agarózová elektroforéza	15	3	25	3	10-20
Elektroforéza v 3% synergelu	20	4	25	3	10-15
Čipová elektroforéza	69	1	1	1	2-10
Fragmentační analýza	220	2	1	2	1-2

Vysvětlivky: 1 – nejméně náročné, 4 – nejvíce náročný postup

Cena jednoho vzorku byla vypočítána z průměrných spotřeb chemikálií v Biotechnologickém centru ZF JU v ČB v běžném provozu a za fragmentační analýzu je zde uvedena cena služby, poskytované Laboratoří genomiky, BC AV ČR České Budějovice. Není zde zahrnuta pořizovací cena přístrojů potřebných pro jednotlivé techniky, což má také velký vliv na volbu separační techniky. Pro gelové elektroforézy elektroforetické vany a zdroje elektrického napětí, pro čipovou Experion Automated Electrophoresis System a pro fragmentační analýzu genetický analyzátor. Časová náročnost je nejvyšší u elektroforézy v 3% synergelu a to z toho důvodu, že pomalejší separace vzorků je způsobena vyšší hustotou gelu než u 2% agarózové elektroforézy. U fragmentační analýzy je v tomto případě tato charakteristika ovlivněna formou provedení, a to službou. I přesto je tato separační metoda velmi rychlá, provedení samotné separace na genetickém analyzátoru je zvýhodněno počtem kapilár, umožňující analýzu více vzorků najednou.

Elektroforéza na 2% agarózovém gelu je i přes svou největší nevýhodu, nejnižší rozlišovací schopnosti, relativně rychlá a nejlevnější metoda, hojně využívaná hlavně pro primární screeningy.

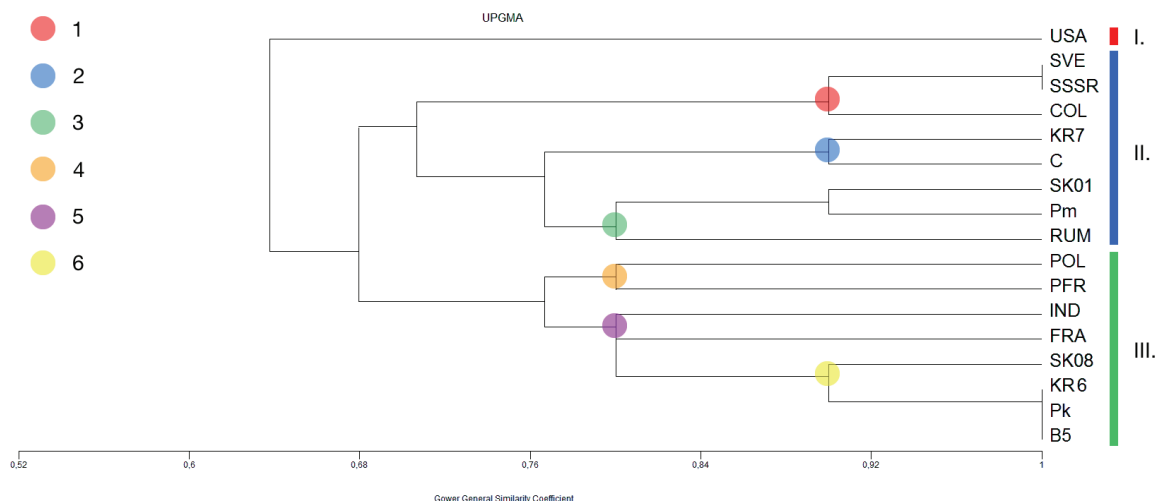
Technika využívající gel 3% synergelu je pracnější z důvodu použití aditiva, se kterým se hůře manipuluje v rozpuštěném stavu. Ale právě díky Synergelu se její rozlišovací schopnosti zlepšily oproti 2% agarózovém gelu.

Čipová elektroforéza je rychlá, elegantní technika, při které se eliminuje práce s barvivou, jejíž výsledky by bylo možno zpracovávat velmi rychle, z důvodu jejich okamžité digitalizace. Její asi největší nevýhodou je, že zatím jakožto technika vyvinuta pro analýzy proteinů, není ještě tak optimalizována pro potřeby DNA analýz, její separační schopnosti nejsou přesné a v jednotlivých opakováních se výsledky dost liší. Fragmentační analýza vyšla v porovnání těchto čtyř metod nejlépe z hlediska separačních schopností a přesnosti výsledků, pouze cena analýzy jednoho vzorku vychází finančně nehůře a primární investice do přístroje je nejvyšší.

5.2.2 Ověření funkčnosti metody SSR analýzy na modelovém souboru

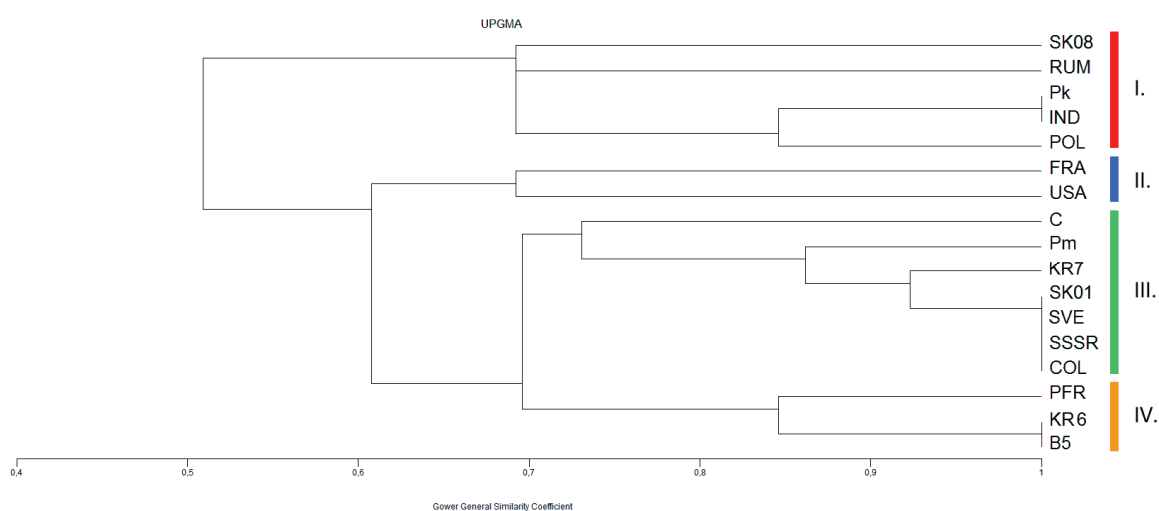
Analýza mikrosatelitů modelového souboru byla provedena na setu čtyř primerových párů Ba02, Ba03, Ba08, Ba12, kdy byl sledován polymorfismus u jednotlivých vzorků. Hodnocena využitelnost pro použití v populační studii a možnost aplikace na širokém souboru III. Byly otestovány všechny čtyři techniky separace, stejně tak jako u souboru pro optimalizaci, pro ověření citlivosti rozlišení.

Obr. 11: Dendrogram a graf PCO analýzy vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů pomocí 4 primerových páru – separace 2% agarózový gel



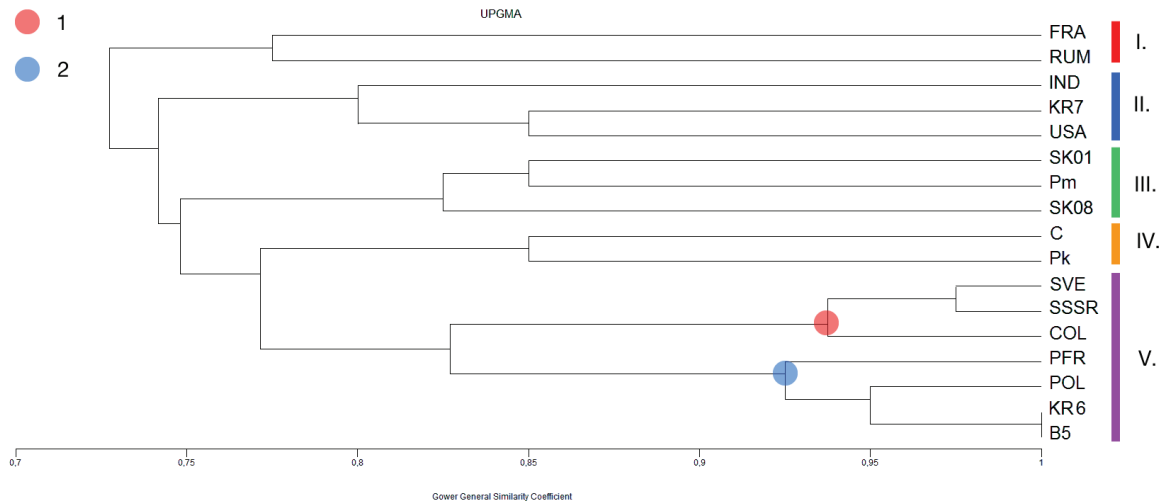
Při analýze dendrogramu se vzorky uspořádaly do tří hlavních skupin, kdy v první (I) je samostatně vzorek USA. Druhá skupina (II) sestává ze vzorků – SVE, SSSR, Col, KR7, C, SK01, Pm a Rum, kde byla většina morfologicky determinována jako *Beauveria bassiana* a pouze jeden vzorek (Pm) jako *Beauveria brongniartii*. Nicméně na základě molekulárních charakteristik je předpoklad, že celá tato skupina odpovídá druhu *Beauveria brongniartii*. Tato skupina se dále rozštěpuje na další 3 podskupiny (1,2,3), které v podstatě odpovídají jejich geografickému původu. Třetí skupina (III) obsahuje vzorky – Pol, PFR, Ind, Fra, SK08, KR6, Pk, B5, dále se rozděluje do dalších 3 podskupin (4,5,6), kde vzorky KR6, Pk a B5 vykazují mezi sebou 100 procentní podobnost a ve své podskupině zahrnují i vzorek SK08 a to pravděpodobně také v závislosti na geografickém původu.

Obr. 12: Dendrogram a graf PCO analýzy vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů pomocí 4 primerových páru – separace 3% Synegel



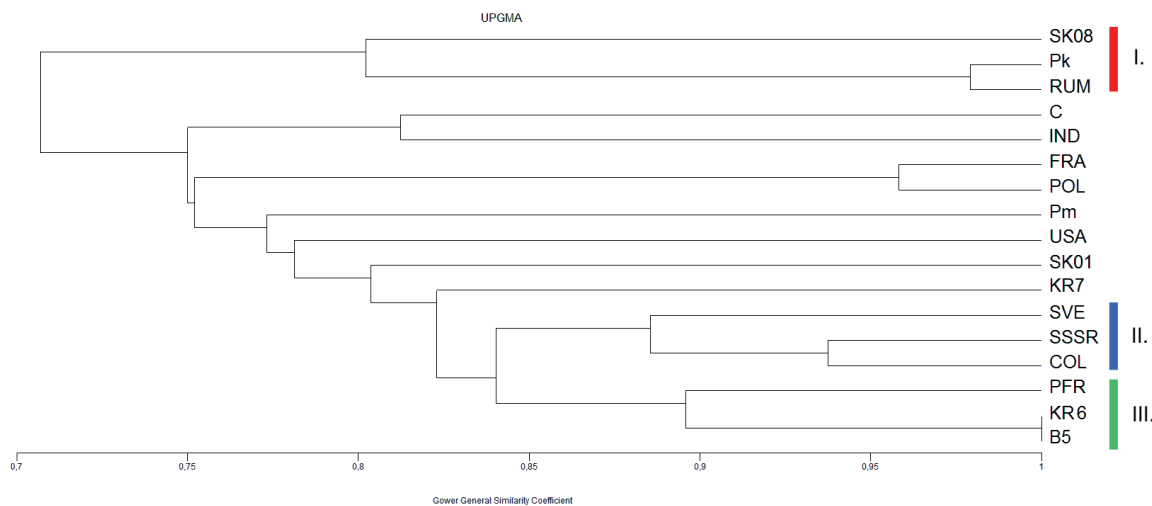
Na dendrogramu vytvořeného na základě separační techniky 3% Synergelu se odlišily čtyři hlavní skupiny. První (I) představují vzorky SK08, Rum, Pk, Ind a Pol, kde jsou Pk a Ind na základě této analýzy shodné. Druhá skupina (II) zahrnuje vzorky Fra a USA a třetí skupina (III) je tvořena vzorky C, Pm, KR7, SK01, SVE, SSSR a Col, i zde je zahrnut jeden vzorek determinovaný jako *Beauveria brongniartii* (Pm) a odpovídá skupině druhé z Obr. 11. Poslední čtvrtá (IV) skupina zahrnuje vzorky PFR, KR6 a B5.

Obr 13.: Dendrogram a graf PCO analýzy vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů pomocí 4 primerových páru – separace čipová elektroforéza



Na Obr. 13 vytvořeným pomocí separační techniky čipové elektroforézy všechny vzorky vykazují větší vzájemnou podobnost než na předešlých grafech. Ale i tak je zde patrný polymorfismus pěti hlavních skupin. Kde první skupina (I) jsou vzorky Fra a Rum, které mezi sebou vykazují odlišnost až 28%. Druhá skupina (II) sestává ze vzorků Ind, KR7 a USA, kde je vzájemná odlišnost jednotlivých vzorků na úrovni 15 až 20%. Podobnou odlišnost mezi vzorky vyazuje skupina třetí (III), která obsahuje SK01, Pm a SK08. Čtvrtá skupina (IV) zahrnuje vzorky C a Pk, které jsou si vzájemně podobné pouze z 15%. Jako poslední, pátá skupina (V) se objevily vzorky SVE, SSSR, Col, PFR, Pol, KR6 a B5. Tato skupina se na úrovni 85-ti procentní podobnosti rozděluje na dvě podskupiny (1,2). Kde vzorky B5 a KR6 také vykazují 100% podobnost jako na Obr. 11 a Obr. 12.

Obr. 14: Dendrogram a graf PCO analýzy vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů pomocí 4 primerových páru – separace fragmentační analýza



Na tomto dendrogramu (Obr. 14), získaného pomocí separační metody fragmentační analýzy, se jednoznačně odlišila pouze jedna skupina (I) vzorků, a to SK08, Pk a Rum. V porovnání s předchozími dendrogramy se v tomto grafu vytváří další skupiny na mnohem nižší úrovni podobnosti, a to hlavně z důvodu citlivosti metody separace. Jsou zde další dvě skupiny vzorků, které opakují trend z předešlých dendrogramů – KR6 a B5 spolu s PFR (III) a SVE, SSSR a Col (II). Ostatní vzorky souboru se přiřazují jednotlivě, z čehož vyplývá, že tato metoda, díky své citlivosti, by byla vhodná pro kmenovou charakteristiku a je možné hodnotit individualitu kmenu.

Konečným porovnáním všech testovaných separačních technik, byly zaznamenány rozdíly v jednotlivých podobnostech mezi vzorky, se některé trendy se opakovaly. Vzorky B5 a KR6 se ve všech čtyřech dendrogramech podobaly ze 100 procent. Dále skupina vzorků SSSR, Col, SVE si byly také ve všech dendrogramech velmi podobné a vždy vytvářely jednu skupinu. U tří z nich (kromě Obr. 14) se k nim připojily i další vzorky a to,

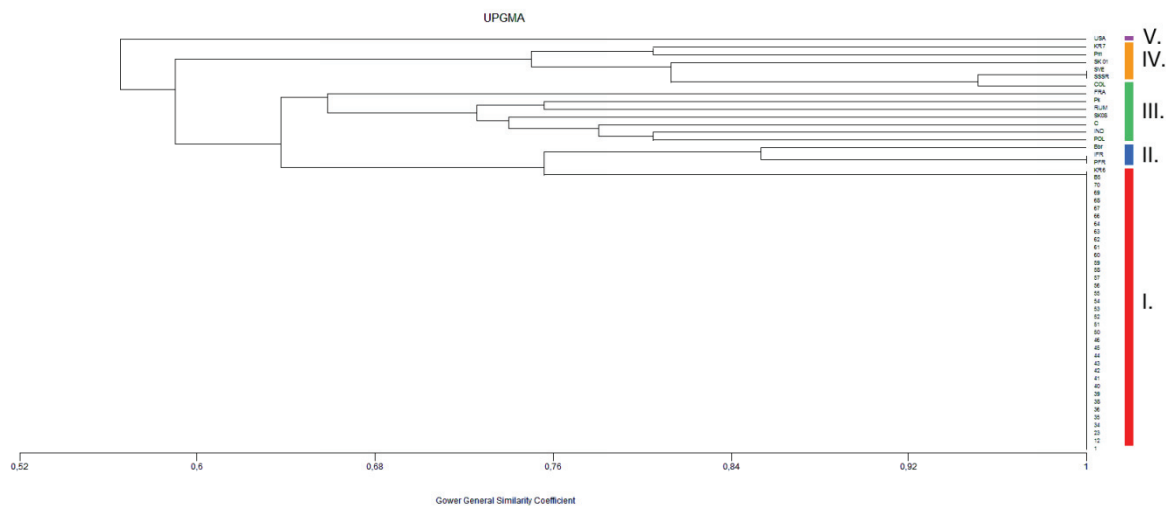
Pm a SK01 a u dvou (Obr. 11 a Obr. 12) také KR7 a C. Ostatní vzorky nevytvářely žádné pravidelně opakující se skupiny a jejich vzájemnou příbuznost není možno konstantně determinovat.

Díky těmto výsledkům jsem dospěla k závěru, že nevhodnější metodou je fragmentační analýza. A to hlavně díky citlivosti a časové nenáročnosti metody. Avšak finanční náročnost na vybavení pro fragmentační analýzu je obrovská a i analýzy je z testovaných finančně nejnáročnější a z tohoto důvodu byla pro další testování 3. aplikační sady vybrána metoda gelové elektroforézy na 3% Synergelu. Rozdíl výsledků těchto dvou metod nebyl nijak markantní, a protože se jedná o analýzu mikrosatelitů, kde je výsledkem jednoduchý fingerprint ke skórování, je elektroforéza na 3% Synergelu levnější alternativou fragmentační analýzy a také citlivější metodou než elektroforéza na 2% agarózovém gelu. Čipová elektroforéza, je sice metodou velmi rychlou oproti ostatním, ale nestabilita a nevyrovnanost vzorků po analýze je dosud největším nedostatkem.

5.2.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci

Analýza mikrosatelitů na aplikačním souboru byla provedena pomocí 11 primerových párů - Ba01, Ba02, Ba03, Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Bb1F4, Bb2F8, Bb10D4 a Bb8D6, na jejímž základě dále hodnocena genetická variabilita populace sebrané v NP Šumava (Obr. 15).

Obr. 15: Dendrogram a graf PCO analýzy vytvořený na základě analýzy mikrosatelitů pomocí 11 primerových páru – separace 3% Synegelel



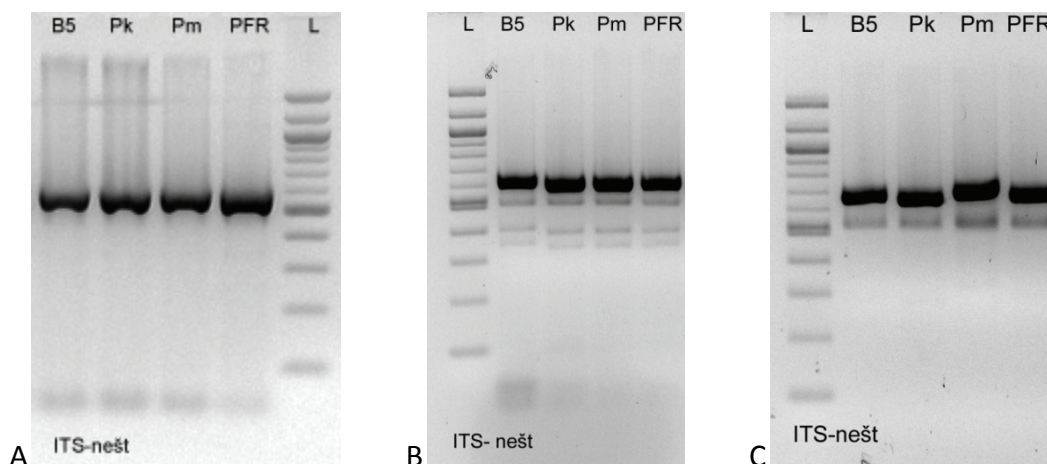
Dendrogram na Obr. 15 získaný analýzou souboru 54 vzorků aplikačního souboru pomocí mikrosatelitových markerů kopíruje trendy předchozích výsledků. Odlišilo se zde pět hlavních skupin. První (I) představují vzorky z NP Šumava a KR6, které na základě této analýzy vykazují naprostou shodu, a tím i homogenitu celé zkoumané populace. Druhá skupina (II) obsahuje vzorky Bbr, IFR a PFR, kde zástupci rodu *Isaria* vykazují také naprostou shodu. Třetí skupina (III) Pol, Ind, C, SK08, Rum, Pk a Fra vykazuje vysokou heterogenitu a podobnost těchto vzorků je nízká. Čtvrtá skupina (IV) zahrnuje vzorky Col, SVE, SSSR, Pm a KR7, i zde je zahrnut jeden vzorek determinovaný jako *Beauveria brongniartii* (Pm) a naznačuje, zda zařazení k druhu *Beauveria bassiana* je správné. Poslední, pátou skupinu (V) zastupuje pouze jeden vzorek – USA, který se vykazuje nejvyšší odlišností od ostatních.

5.3 ITS-RFLP

5.3.1. Optimalizace na základním souboru

Optimalizace metody, stejně jako u ostatních metod molekulárních markerů probíhala na základním souboru, kdy byly optimalizovány požadavky analýzy na genomickou zdrojovou DNA, podmínky PCR reakce, jak v jejím složení, tak v jejím průběhu a vhodné techniky separace. Dále byly upraveny podmínky restrikce, jak její délka, tak koncentrace restrikčních endonukleáz pro dobrou reprodukci restrikčního profilu.

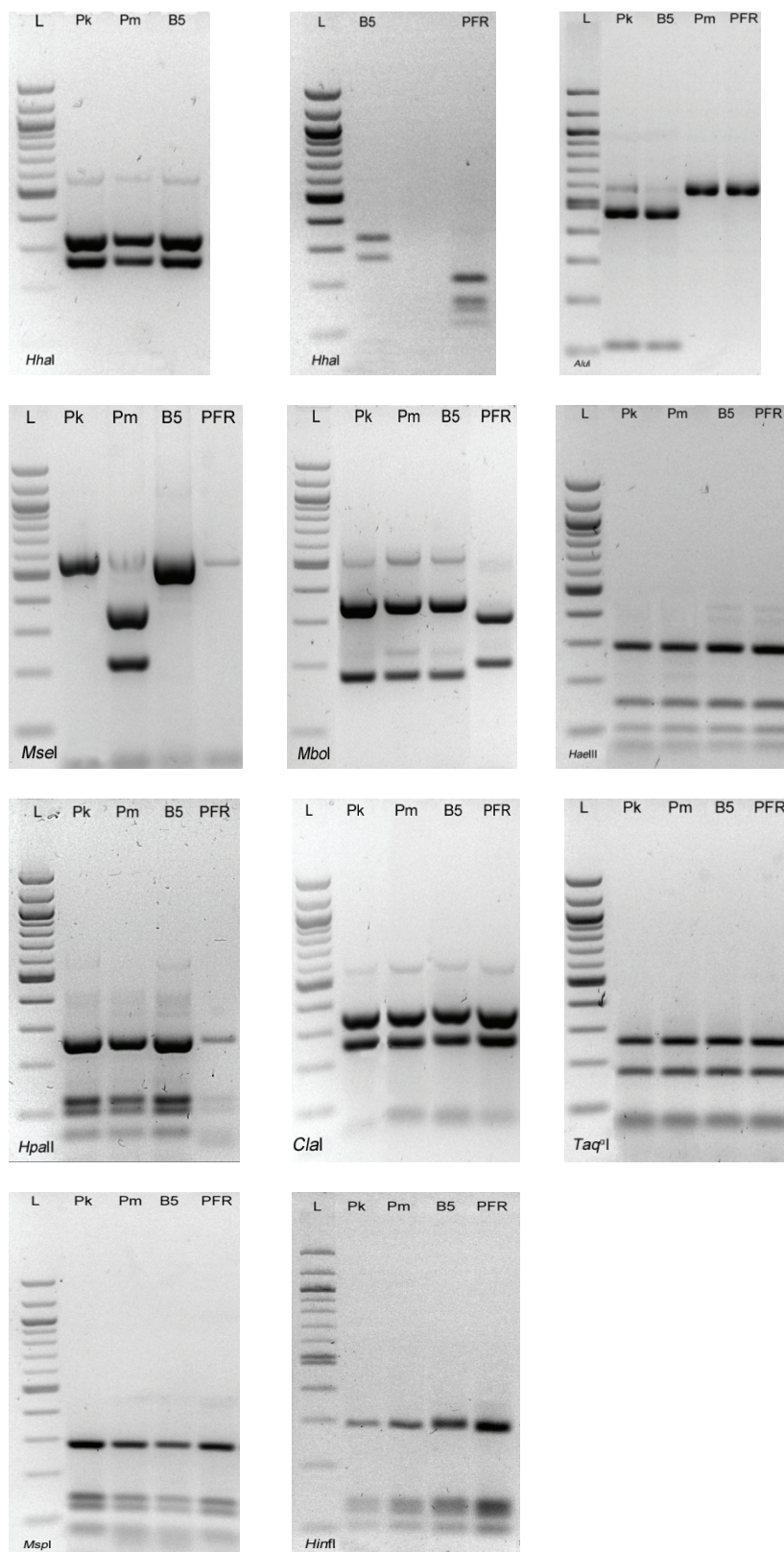
Obr. 16: Ukázka vizualizace neštěpeného cílového fragmentu ITS regionu po PCR, elektroforéza 2% agarózový gel; různé primerové kombinace A: ITS5-ITS4, B: ITS1-ITS4, C: ITS1F-ITS4



Na těchto cílových produktech bylo dále otestováno čtrnáct restrikčních endonukleáz a pro další analýzy vybrány pouze ty, které štěpily daný fragment.

Pouze jako ukázka jsou zde uvedeny vzorové charakteristiky pro primerový pár ITS5-ITS4 (Obr. 17 na základním souboru čtyř vzorků pro optimalizaci metod).

Obr. 17: Restriční profily cílového fragmentu ITS regionu po PCR, primerový pár ITS5-ITS4



Dle průběžných výsledků, kdy restriční profily všech testovaných primerových kombinací vyšly naprosto stejné, byla pro analýzy dalších souborů vybrána pouze jedna primerová kombinace a to 5-4. A to z důvodu nejlepších restričních profilů a také, že postihuje celý region ITS 1 i 2 a 5.8S.

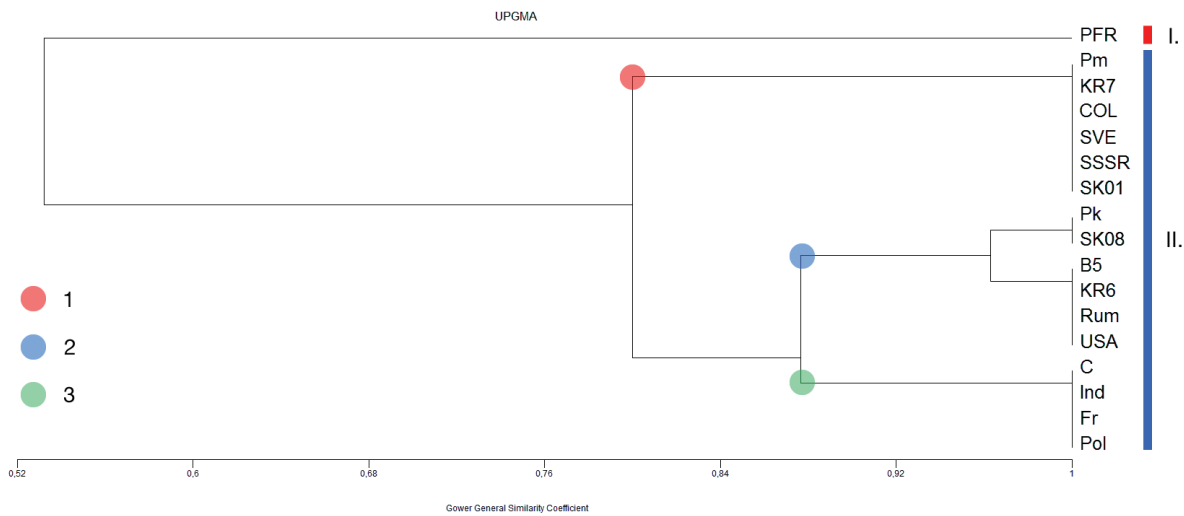
5.3.2 Ověření funkčnosti metody ITS-RFLP na modelovém souboru

Tab. 18 uvádí počty získaných fragmentů a polymorfní charakter jednotlivých restričních endonukleáz v modelovém souboru. Na jejímž základě byla z prvních pěti (*HhaI*, *AluI*, *MboI*, *HaeIII* a *MseI*) provedena klastrová analýza v programu MVSP a vytvořen podobnostní dendrogram (Obr. 18).

Tab. 18: Restriční polymorfismus testovaných endonukleáz.

RE	Počet fragmentů / polymorfní charakter
<i>HhaI</i>	2-4 fragmenty
<i>AluI</i>	0-2 fragmenty
<i>MboI</i>	2-3 fragmenty
<i>HaeIII</i>	4-5 fragmentů
<i>MseI</i>	0-2 fragmenty
<i>HpaII</i>	4 fragmenty/ není polymorfní
<i>Clal</i>	2 fragmenty/ není polymorfní
<i>MspI</i>	4 fragmenty/ není polymorfní
<i>HinfI</i>	4 fragmenty/ není polymorfní
<i>Taq^αI</i>	3 fragmenty/ není polymorfní
<i>EcoRI</i>	neštěpila
<i>SspI</i>	neštěpila
<i>PstI</i>	neštěpila
<i>HindIII</i>	neštěpila

Obr. 18: Dendrogram vytvořený na základě restričního štěpení 5 restričními endonukleázami *HhaI*, *AluI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI* fragmentu po PCR, primerová kombinace ITS5-ITS4.



Na úrovni 70-ti procentní podobnosti lze odlišit dvě skupiny vzorků, kdy první skupinu (I) představuje samostatný vzorek PFR, která se od druhé odlišuje z 50-ti procent. Druhá skupina (II) se na úrovni 87 procent rozštěpuje na další tři podskupiny, kde první (1) obsahuje vzorky Pm, KR7, Kol, SVE, SSSR, SK01 a zahrnuje jeden vzorek (Pm) určený jako *Beauveria brongniartii*. Druhá podskupina (2) obsahuje Pk a SK08, které vykazují na základě této analýzy shodu a vzorky B5, KR6, Rum a USA, které jsou si taktéž podobné ze 100 procent. A třetí podskupina (3) C, Ind, Fr a Pol.

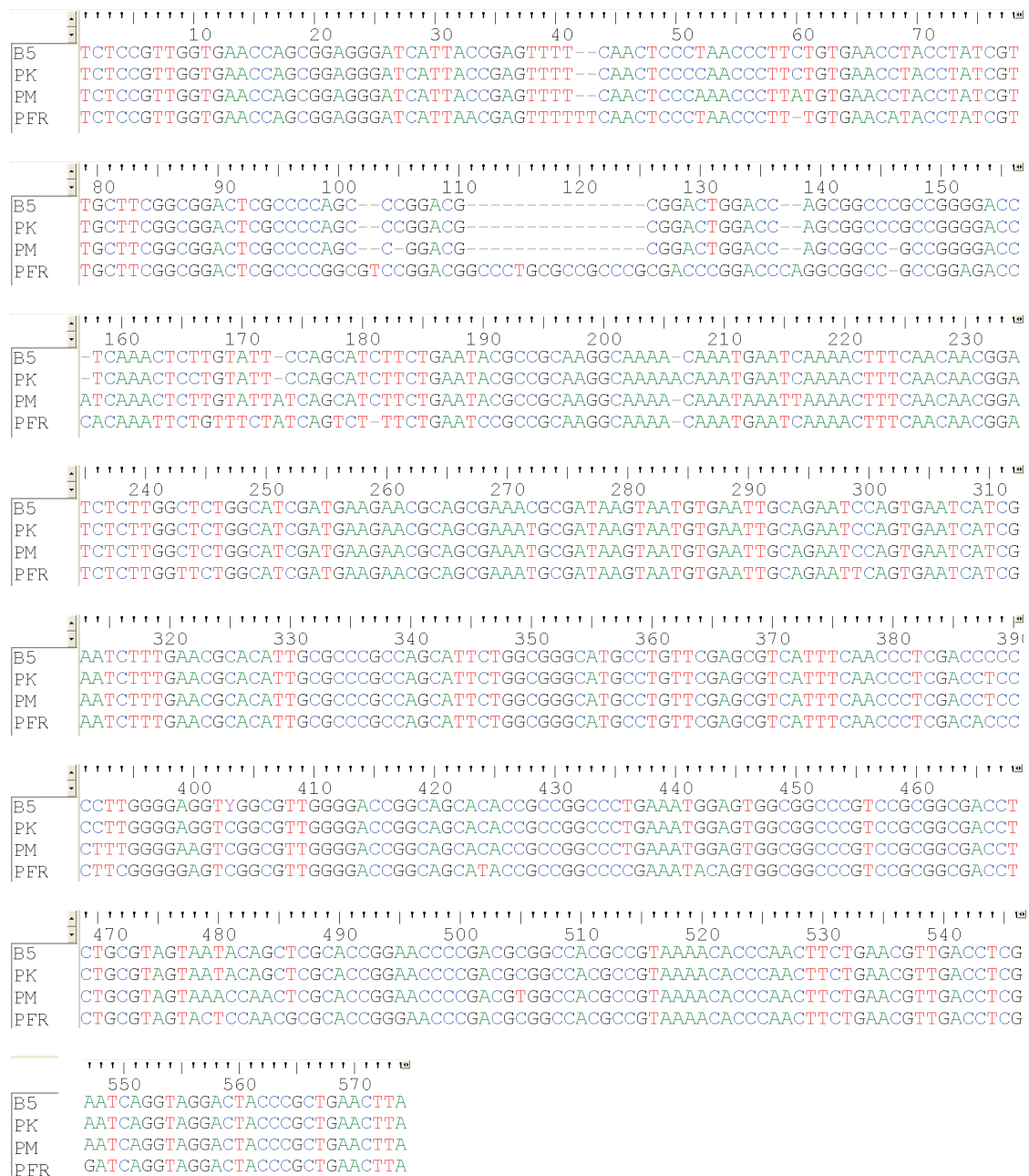
5.4 Sekvenační analýza ITS regionu

Pro detailnější porovnání všech vzorků byla provedena sekvenační analýza daného fragmentu – ITS5-ITS4. Pro vzorky ze základního souboru je zde zobrazen alignment získaných sekvencí ITS regionu. Fylogenetický strom pro tyto čtyři vzorky nebyl samostatně vytvářen, protože se všechny čtyři vzorky objevují i v sadě modelové. Pro tu již byl fylogenetický strom v programu SplitsTree4 vytvořen (Obr. 20).

5.4.1 Optimalizace na základním souboru

Porovnání sekvencí ITS5-ITS4 fragmentu čtyř vzorků základní sady (Pk, Pm, B5 a PFR) je zobrazeno na Obr. 19, kde jsou na první pohled patrné čtyři větší delece (pozice 42-43, 102-103, 111-125 a 137-139) u vzorků Pk, Pm a B5 oproti vzorku PFR. Objevuje se zde i mnoho bodových mutací, např. v rozmezí 160. a 180. báze nebo v okolí 480.

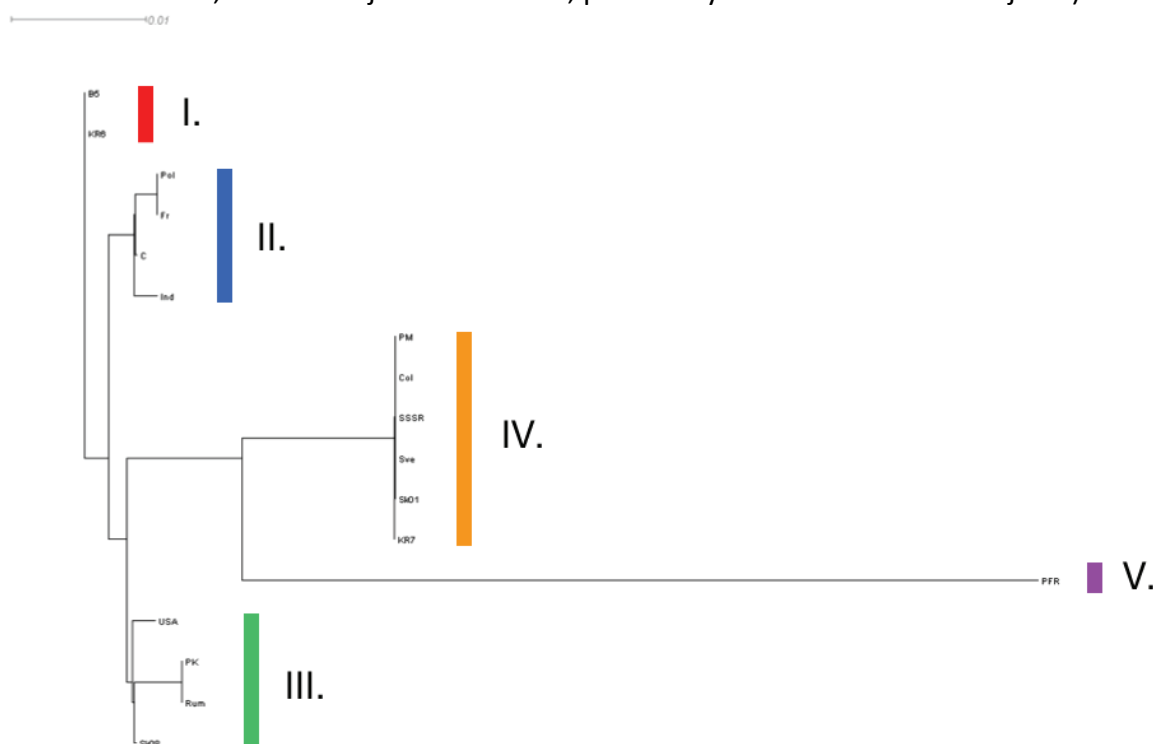
Obr. 19: Alignment vzorků základní sady, vytvořený v programu Bioedit.



5.4.2 Ověření funkčnosti sekvenační analýzy ITS regionu na modelovém souboru

Na základě zjištění, že je metoda v tomto provedení opakovatelná a reprodukovatelná, byla aplikována na modelový soubor kmenů (viz tab. x), kde byla ověřena její funkčnost a reprodukovatelnost.

Obr. 20: Phylogenetický strom modelového souboru vytvořený na základě sekvenační analýzy ITS regionu (ITS5-ITS4) – 17 taxonů, metoda NJ, nezakořeněný (sekvence obsahují 576 znaků, 497 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 16).

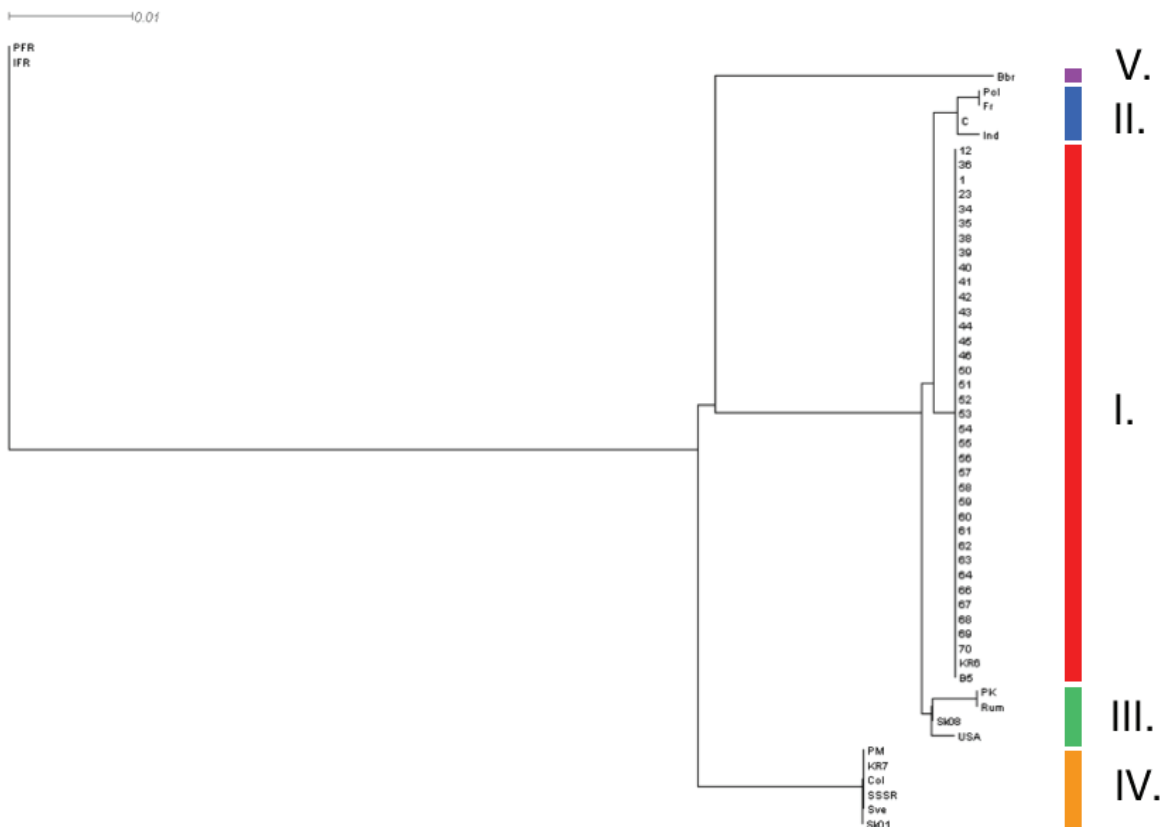


Na základě sekvenační analýzy ITS regionu byl vytvořen fylogenetický strom, ve kterém se objevilo pět základních shluků. První tři (I, II, III) představují druh *Beauveria bassiana*, čtvrtý (IV) *Beauveria brongniartii* a pátý (V) druh *Isaria fumosorosea* (*Paecilomyces*). Shluk I obsahuje vzorky B5 a KR6, které jsou na základě této analýzy shodné, shluk II zahrnuje vzorky Pol, Fr, C a Ind a shluk III USA, Pk, Rum a SK08. Čtvrtá skupina (IV) sestává ze vzorků Pm, Col, SSSR, SVE, SK01 a KR7 a pátá (V) pouze jeden vzorek a to PFR. Mezi jednotlivými druhovými skupinami nedochází k prolínání vzorků, a proto lze o tomto molekulárním markeru říci, že na rodové a druhové úrovni slouží velmi

dobře, ale na kmenové již nikoliv. I když se druh *Beauveria bassiana* rozpadl do tří skupin, což také určuje jeho polyfyletický charakter, je vidět, že je to stále kompaktní skupina vzorků. To také naznačuje, že primární určení vzorků Col, SSSR, SVE, SK01 a KR7 jako *Beauveria bassiana* bylo chybné. A jelikož již druhý molekulární marker tyto vzorky přiřazuje opakovaně k vzorku Pm, jakožto představiteli druhu *B. brongniartii*, lze toto druhové přiřazení brát jako směrodatné.

5.4.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci

Obr. 21: Fylogenetický strom aplikačního souboru vytvořený na základě sekvenční analýzy ITS regionu (ITS5-ITS4) – 54 taxonů, metoda NJ, zakořeněný vzorkem PFR (sekvence obsahují 583 znaků, 483 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 49)



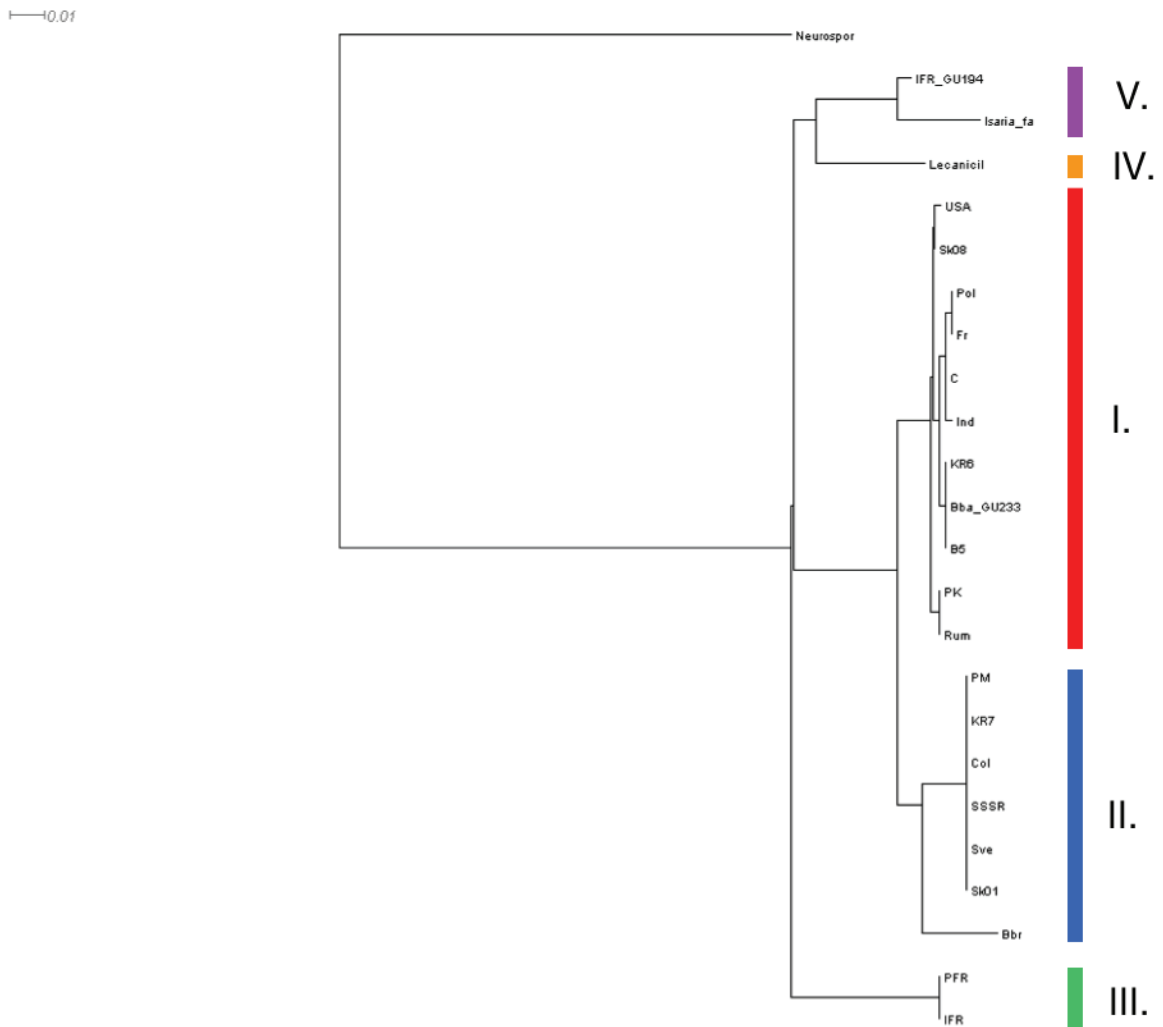
Stejně tak jako u předešlého fylogenetického stromu (Obr. 20) se i zde podařilo odlišit druh *Beauveria brongniartii* od *Beauveria bassiana*, jejíž skupina sestává ze tří shluků (I, II, III). Z nichž jeden představuje naprosto homogenní skupinu vzorků z NP Šumava a KR6 (I), všechny představující *B. bassiana*. Další dva shluky jsou z jiných geografických a agroekologických oblastí a tento fakt může znamenat jejich zařazení ve fylogenetickém stromě. I když původ vzorku Pk je ČR je zařazení do vzdálenější skupiny může být důvodem jiného typu odběrové lokality. Touto otázkou jsem se v této práci nezabývala, ale mohl by to být další námět pro pokračování tohoto projektu. Dále se zde vyčlenily vzorky Pm, KR7, Col, SSSR Sve a SK01 do samostatné skupiny (IV), která představuje druh *B. brongniartii*. V páté skupině (V) je pouze samostatný vzorek Bbr, příslušející druhu *B. brongniartii* také, stejně jako IV. skupina vzorků. Pouze jeho geografický původ odběru je odlišný, ale jeho podobnost se IV. skupinou je vyšší než se skupinami I, II, III.

Pro potvrzení získaných výsledků druhového zařazení jednotlivých skupin sekvenační analýzou ITS regionu, byl vytvořen ještě jeden fylogenetický strom, ve kterém jsou zařazeny vzorky, jejichž sekvence byly získány z databáze NCBI.

Tab. 19: Seznam vzorků z NCBI použitých pro analýzu ITS regionu

Druh (označení autora)	Accession number v NCBI	Označení v genetické analýze
<i>Beauveria bassiana</i>	GU233704	BbaGU233
<i>Beauveria brongniartii</i>	HM595509	Bbr_HM595
<i>Isaria fumosorosea</i>	GU194181	IFR_GU194
<i>Lecanicillium lecanii</i>	EU284720	Lecanicil
<i>Isaria farinosa</i>	JF718690	Isaria_fa
<i>Neurospora crassa</i>	FJ537097	Neurospor

Obr. 22: Fylogenetický strom vytvořený na základě sekvenční analýzy ITS regionu (ITS5-ITS4) – 25 taxonů, metoda NJ, zakořeněný vzorkem *Neurospor* (sekvence obsahuje 598 znaků, 308 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 51)



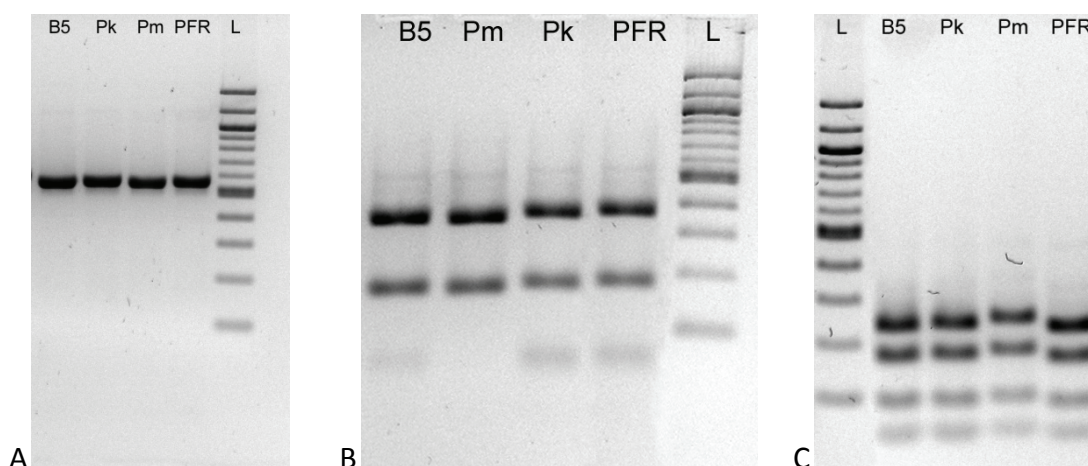
Po přiřazení sekvencí vzorků uvedených v Tab. 19 do analýzy ke vzorkům modelového souboru byl získán fylogenetický strom, který vykazuje stejný trend, jako je uvedeno na Obr. 22. Došlo k potvrzení druhového a rodového zařazení námi analyzovaných vzorků a jejich uspořádání do homogennějších skupin, kdy *Beauveria bassiana* je velmi polyfyletickou skupinou a pravděpodobně by analýza přesného původu odběru a typu odběrové lokality dodala lepší informační rozměr celé analýze.

5.5 LSU-RFLP

Postup testování vhodnosti LSU-RFLP probíhal stejně jako u všech testovaných metod molekulárních markerů, ale po testování na jak na základním, tak na modelovém souboru nebyl prokázán žádný restrikční polymorfismus, proto bylo přistoupeno k sekvenační analýze daného úseku velké podjednotky ribosomální DNA.

Pro demonstraci jsou zde uvedeny tři obrázky, kdy první představuje produkt cílového úseku LSU a druhé dva ukázkou restrikčního štěpení daného produktu.

Obr. 23: Vizualizace cílových produktů LSU po PCR (A) a restrikčních profilů *Mbol* (B) a *HinfI* (C) po elektroforéze na 2% agarózovém gelu.



5.6 Sekvenační analýza LSU rDNA

5.6.1 Optimalizace na základním souboru

Optimalizace metody, stejně jako u ostatních metod molekulárních markerů probíhala na základním souboru, kdy byly optimalizovány požadavky analýzy na genomickou zdrojovou DNA, podmínky PCR reakce, jak v jejím složení, tak v jejím průběhu a vhodné techniky separace.

Pro vzorky ze základního souboru je zde zobrazen alignment daných sekvencí úseku genu velké podjednotky ribosomální DNA. Phylogenetický strom pro tyto čtyři vzorky nebyl samostatně vytvářen, protože se všechny čtyři vzorky objevují i v sadě modelové. Pro tu již byl fylogenetický strom v programu SplitsTree4 vytvořen (Obr. 25).

Porovnání sekvencí získaných amplifikací pomocí primerového páru NL1-NL4 fragmentu čtyř vzorků základní sady (Pk, Pm, B5 a PFR) je zobrazeno na Obr. 24, kde nejsou na první pohled patrné žádné větší delece ani inserce, ale objevuje se zde i mnoho bodových mutací, např. na pozici 399, 462 a 463 nebo v rozmezí 480-482. Díky sekvenační analýze byly zjištěny přesné velikosti jednotlivých vzorků, které se lišily řádově v jednotkách bází.

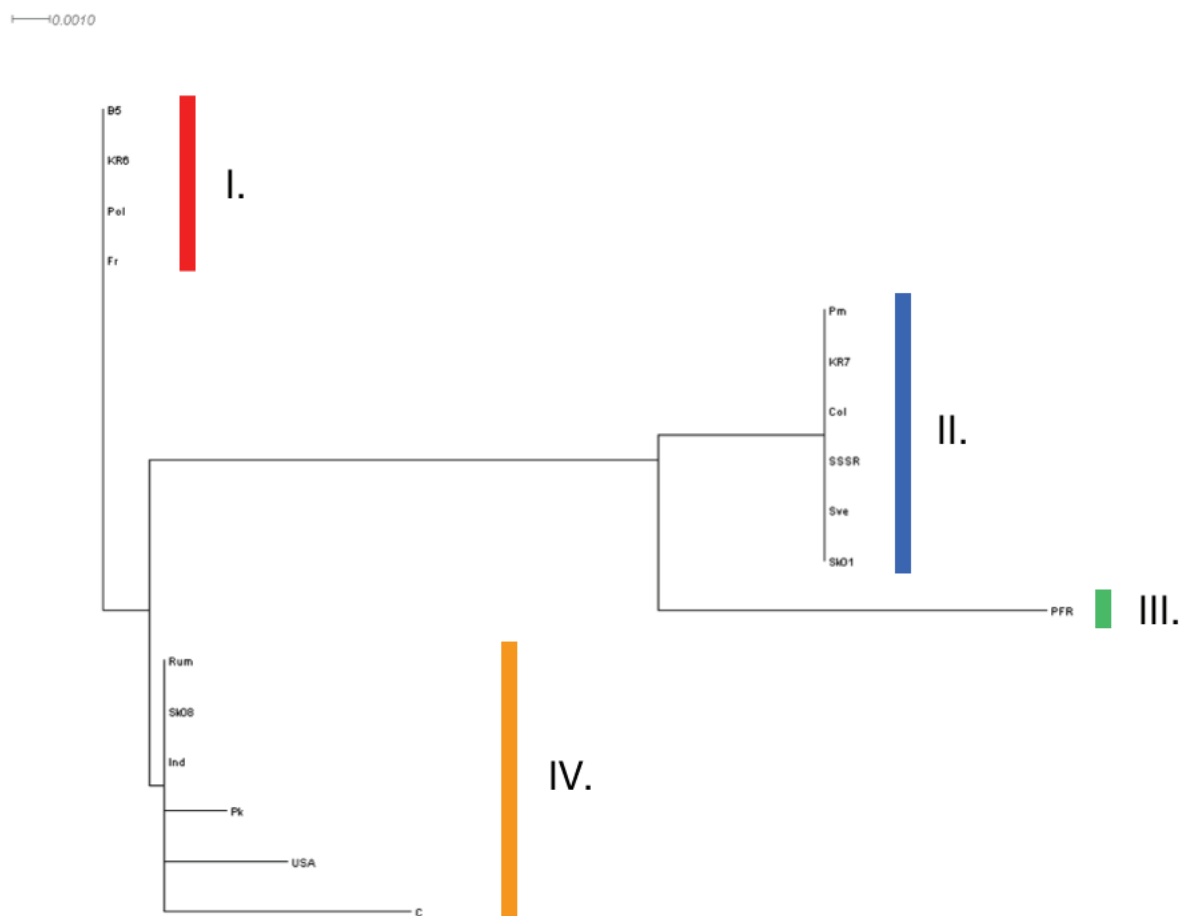
Obr. 24: Alignment vzorků základní sady, vytvořený v programu Bioedit.



5.6.2 Ověření funkčnosti metody LSU rDNA na modelovém souboru

Na základě zjištění, že je metoda v tomto provedení opakovatelná a reprodukovatelná, byla aplikována na modelový soubor kmenů (viz tab. x), kde byla ověřena její funkčnost a reprodukovatelnost.

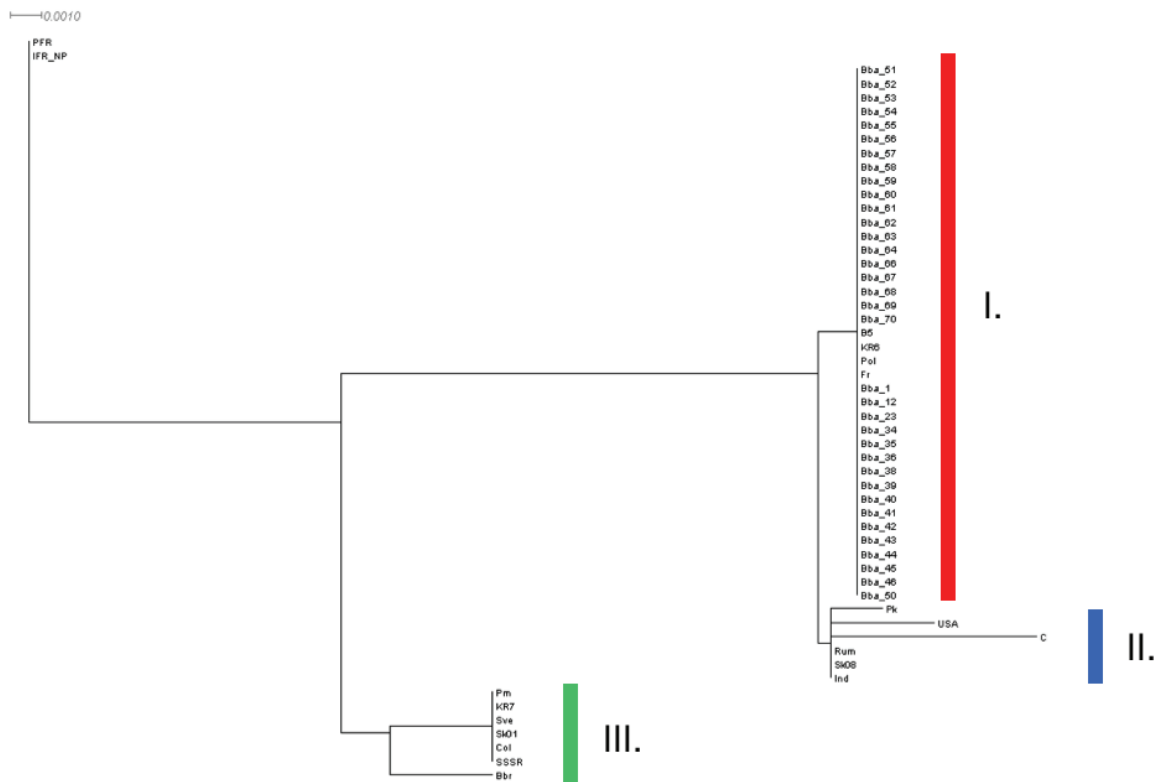
Obr. 25: Fylogenetický strom modelového souboru vytvořený na základě analýzy sekvencí LSU rDNA – 17 taxonů, metoda NJ, nezakořeněný (sekvence obsahují 607 znaků, 580 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 12)



Tento fylogenetický strom (Obr. 25) vykazuje obdobnou charakteristiku získaných dat jako sekvenční analýza ITS regionu (viz výše), vytvořily se zde čtyři hlavní skupiny. Shoda vzorků Pm, KR7, Col, SSSR, SVE a SK01 (II) potvrzuje původní určení *B. bassiana* jako chybné a potvrzuje výsledek z předchozích analýz, že druhové zařazení mezi *B. brongniartii* je správné. Vzorky B5, KR6, Pol, Fr (I) vykazují naprostou shodu v sekvenci daného úseku a pomocí jeho analýzy je nelze odlišit. Příčinou této podobnosti bude jejich geografický původ a pravděpodobně agroekologický typ lokality odběru, kterou se ostatní vzorky *B. bassiana* v této sadě liší nebo jsou si geograficky vzdálenější – Rum, SK08, Ind, USA, Pk, C (IV). Poslední skupinu zastupuje vzorek PFR (III), který představuje rodově vzdálenější skupinu.

5.6.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci

Obr. 26: Fylogenetický strom aplikačního souboru vytvořený na základě analýzy sekvencí LSU rDNA – 54 taxonů, metoda NJ, zakořeněný vzorkem PFR (sekvence obsahují 609 znaků, 577 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 18)



Na základě výsledků analýzy sekvencí LSU aplikačního souboru (Obr. 26) je homogenita populace NP Šumava potvrzena již třetím molekulárním markerem. Analýza úseku LSU rDNA, jakožto oblasti kódující oblasti, má stejný charakter výsledků jako oba předcházející molekulární markery (SSR a ITS).

Vytvořily se zde tři hlavní skupiny, kdy první (I) obsahující celou zkoumanou populaci z NP Šumava, KR6, Pol aFr jsou na základě těchto zcela shodné. Druhá skupina (II) zahrnuje vzorky Pk, USA, C, Rum, SK08 a Ind, které jsou první skupině velmi podobné a společně představují druh *Beauveria bassiana*. Třetí skupina (III) – vzorky Pm, KR7, SVE, SK01, Col, SSSR a Bbr se jednoznačně odlišila od předchozích skupin a představuje druh *Beauveria brongniartii*. Celý strom je zakořeněn vzorkem PFR, jakožto druhově

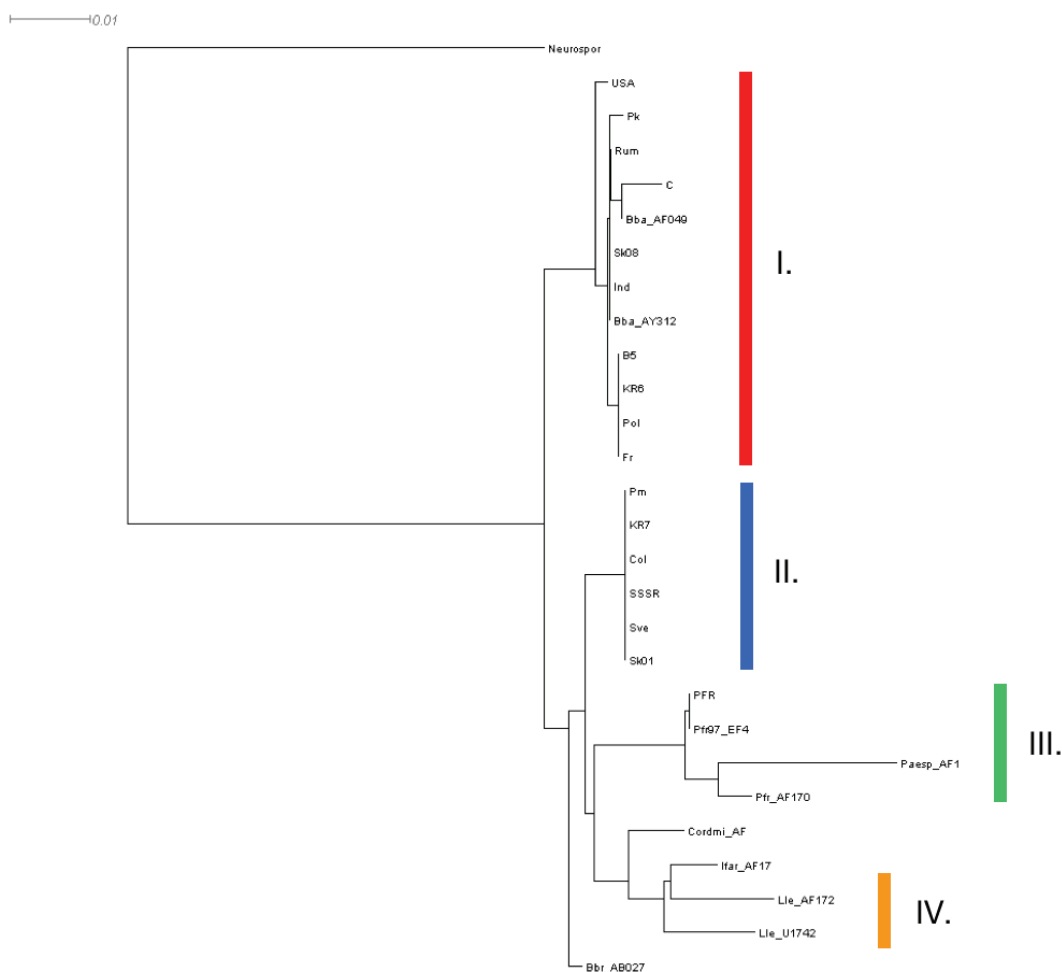
nevzdálenějším od všech ostatních, který spolu se vzorkem IFR představuje druh *Isaria fumosorosea*.

Pro potvrzení získaných výsledků druhového zařazení jednotlivých skupin sekvenační analýzou LSU, byl vytvořen ještě jeden fylogenetický strom, ve kterém jsou zařazeny vzorky, jejichž sekvence byly získány z databáze NCBI.

Tab. 20: Seznam vzorků z NCBI použitých v analýze

Druh (označení autora)	Accesion number v NCBI	Označení v genetické analýze
<i>Beauveria bassiana</i>	AY312602	Bba_AY312
<i>Beauveria bassiana</i>	AF049164	Bba_AF049
<i>Beauveria brongniartii</i>	AB027381	Bbr_AB027
<i>Isaria fumosorosea</i>	EF429304	Pfr97_EF4
<i>Isaria fumosorosea</i>	AF170081	Pfr_AF170
<i>Paecylomyces sp.</i>	AF173002	Paesp_AF1
<i>Lecanicillium lecanii</i>	AF172336	Lle_AF172
<i>Lecanicillium lecanii</i>	U17421	Lle_U1742
<i>Isaria farinosa</i>	AF172342	Ifar_AF17
<i>Cordyceps militaris</i>	AF049166	Cormi_AF
<i>Neurospora crassa</i>	U40124	Neurospor

Obr. 27: Fylogenetický strom aplikačního souboru vytvořený na základě analýzy sekvencí LSU rDNA – 28 taxonů, metoda NJ, zakořeněný vzorkem *Neurospor* (sekvence obsahují 614 znaků, 506 znaků je konstantních, parsimony informativních znaků je 30).



Charakter tohoto fylogenetického stromu (Obr. 27) je obdobný jako u předchozích, pouze v tomto jsou do analýzy zařazeny vzorky, jejichž sekvence byly získány z databáze NCBI. A i přes tyto přidané vzorky lze spolehlivě určit jak rod, tak druh a jako druhový marker je vhodný. Na poddruhové úrovni se geograficky příbuzné vzorky v sekvenci shodují a nelze je odlišit.

Lze zde spatřovat čtyři skupiny vzorků, jako první (I) *Beauveria bassiana*, rozpadající se skupina, druhá (II) *Beauveria brongniartii*, třetí (III) vzorky rodu *Isaria* a poslední (IV), kde jsou zařazeny vzorky *Lecanicillium lecanii*. Celý strom je zakořeněn vzorkem *Neurospora crassa*.

5.7 AFLP

Byly testovány tři metodiky, jedna dle originálního protokolu dle Vos (1999) a dvě modifikované dle Suazo (1999) a de Muro (2003). Od prvních dvou nebyly získány téměř žádné relevantní výsledky. Při použití standardního protokolu dle Vose používaného pro ostatní genomy úspěšně, se projevil v tomto případě malý genom hub jako nevýhoda v tom, že se generovalo příliš málo produktů a nebylo možno získat hodnotitelné výsledky.

U protokolu dle de Muro se objevil problém vhodnosti použité restriční endonukleázy. Tento protokol je jednoduchou modifikací protokolu dle Vose, jako hlavní změna je zde v použití jiného restričního enzymu a spojení dvou kroků – restrikce a ligace.

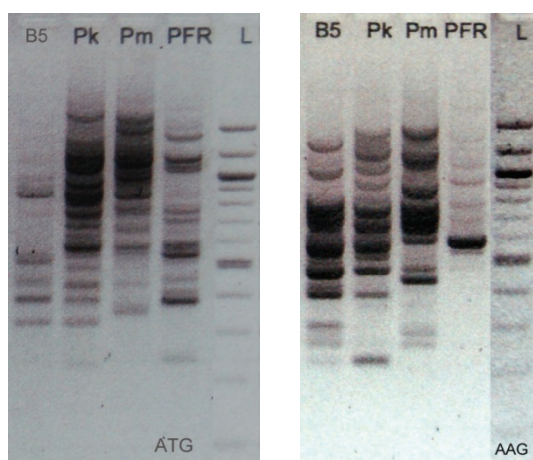
Ani jeden z těchto dvou protokolů nebyl pro účely AFLP analýzy u mnou zkoumaných entomopatogenních hub vhodný a proto byl po těchto zjištěních použit pro testování všech souborů třetí protokol – dle Suazo (2003).

5.7.1 Optimalizace na základním souboru

Pro optimalizaci AFLP analýzy byla použita DNA extrahována pomocí protokolu CTAB-SDS, jak z důvodu větší výtěžnosti vysokomolekulární DNA, kterou k této analýze potřebujeme. Byly provedeny optimalizace jednotlivých kroků protokolu, PCR cyklů a nasedacích teplot pro amplifikaci, vhodné koncentrace primerů a adaptorů, vyhodnocení použitelnosti jednotlivých primerů a výběr vhodné separační techniky, jak z hlediska reprodukovatelnosti, tak z hlediska finanční náročnosti.

Z celkového počtu 14-ti testovaných primerů (viz Tab.) bylo pro analýzy vybráno 7, z důvodu jejich reprodukovatelnosti, opakovatelnosti a možnosti dobrého hodnocení.

Obr. 28: Ukázka AFLP profilů selektivních primerů ATG, AAG po separaci na 2% agarózovém gelu.



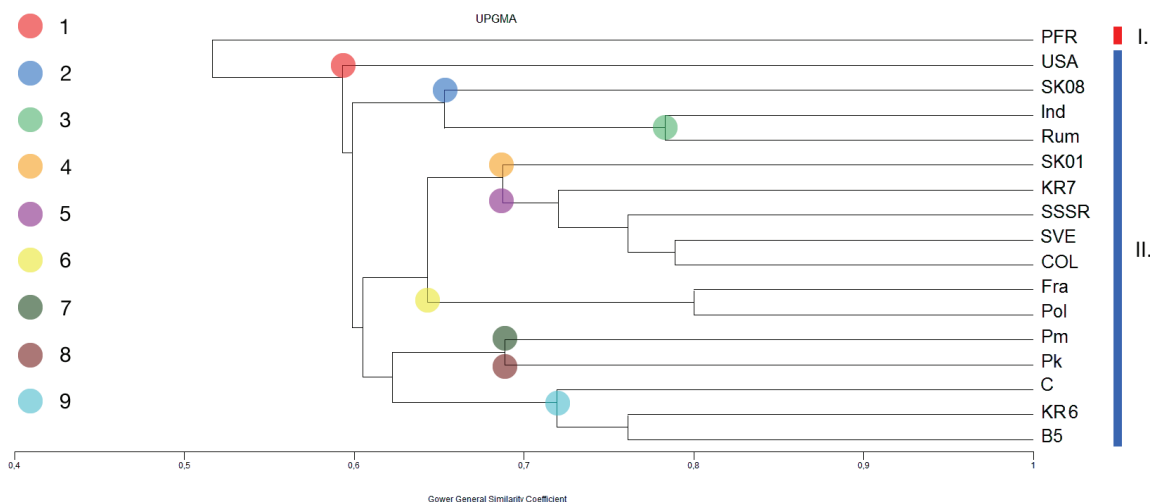
5.7.2 Ověření funkčnosti metody AFLP na modelovém souboru

Po otestování všech dostupných selektivních primerů, byly vybrány pro analýzu modelového souboru primery – GAC, ACA, ACG, AAG, ATG, TTG a TCA (viz Tab. 21) Na základě vyhodnocení získaných profilů, byl vytvořen dendrogram v programu MVSP, jež vypovídá o jejich příbuznosti.

Tab. 21: Počty generovaných pruhů u jednotlivých selektivních primerů použitých v analýze AFLP

Selektivní primer	Počet generovaných pruhů
GAC	25
ACA	26
ACG	30
AAG	27
ATG	27
TTG	21
TCA	24

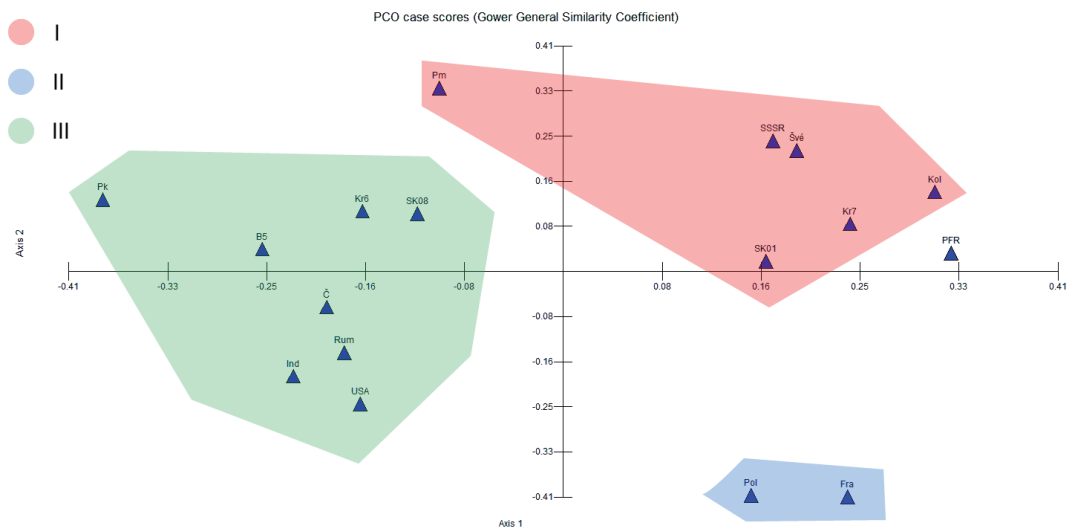
Obr. 29: Dendrogram analýzy vytvořený na základě AFLP analýzy pomocí 7 selektivních primerů.



Pomocí AFLP analýzy se podařilo odlišit jak jednotlivé rody, tak i druhy zkoumaných vzorků entomopatogenních hub. Je možné odlišit všechny individuální kmeny, které se formují do dvou hlavních skupin. První skupina (I) obsahující vzorek PFR se od druhé (II), která představuje druhy *Beauveria*, odlišuje na 50-ti procentní úrovni. Na úrovni 70-ti procentní podobnosti se druhá skupina rozděluje na devět podskupin.

První (1) a druhá (2) podskupina sestává z jednotlivých vzorků USA a SK08. Třetí (3) ze vzorků Ind a Rum. Čtvrtá podskupina (4) obsahuje vzorek SK01 a pátá (5) vzorky KR7, SSSR, SVE a Col, která téměř plně odpovídá skupinám z předchozích analýz – *Beauveria brongniartii*. Šestá podskupina (6), vzorky Fra a Pol, vykazuje nejvyšší míru podobnosti mezi těmito dvěma vzorky a to 80 procent. Sedmá (7) a osmá (8) podskupina obsahují vzorky Pk a Pm a devátá podskupina B5, KR6, C. Vzorky ve všech podskupinách kromě páté odpovídají druhu *Beauveria bassiana*, až na jeden jediný vzorek, a to Pm, který byl v předchozích analýzách zařazován do skupiny *Beauveria brongniartii*. Důvodem mohou být typ a počet použitých selektivních primerů. Nebo také stejný typ odběrové lokality mezi vzorky Pm a Pk.

Obr. 30: Graf PCO analýzy vytvořený na základě AFLP analýzy pomocí 7 selektivních primerů.

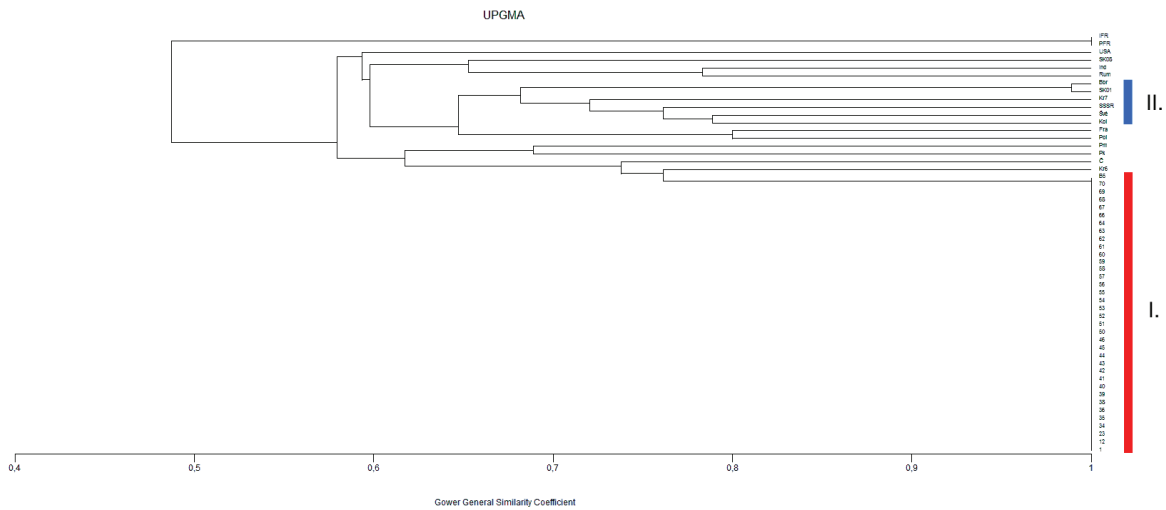


Po PCO analýze stejného souboru jako na Obr. 29 se seskupily tři hlavní skupiny, kdy první (I) a druhá (II) představují druh *Beauveria bassiana* a třetí (III) *Beauveria brongniartii*. I tato analýza potvrdila druhové zařazení vzorků SSSR, SVE, Col, KR7, SK01 *Beauveria brongniartii* jako správné.

5.7.3 Analýza souboru kmenů pro aplikaci

Pro analýzu aplikačního souboru pomocí metody AFLP byly použity stejné selektivní primery jako u modelového souboru a získán dendrogram Obr. 31.

Obr. 31: Dendrogram vytvořený na základě AFLP analýzy pomocí 7 selektivních primerů.



Po přidání do statistické analýzy celé zkoumané populace *Beauveria bassiana* z NP Šumava a dvou vzorků IFR a Bbr, taktéž odebraných v NP Šumava, byl získán tento dendrogram, které kopíruje výsledky předcházejícího obrázku (Obr. 29). Tak jako v analýze mikrosatelitů, ITS regionu i LSU rDNA i zde je populace *B. bassiana* z NP Šumava homogenní a jako nejpříbuznější vzorek je KR6. Ostatní vzorky *B. bassiana* pouze dokazují polyfyletický charakter tohoto druhu. Vzorek *B. brongniartii*, který byl již morfologicky determinován jako *B. brongniartii* potvrdil správnost všech analýz, na jejichž základě byly zařazeny vzorky SK01, KR7, SSSR, SVE a Col k tomuto druhu.

6. Diskuze

Úspěšnost a kvalita výsledků všech analýz molekulárních markerů závisí na mnoha technických i chemických aspektech. Stejně jako Lugert *et al.* (2006), Enkerli a Widmer (2009) a Myoung-Hwan Chi *et al.* (2009) zdůrazňovali, že dobrá extrakce vysoce kvalitní DNA je velice důležitou otázkou v případě molekulární a ekologické analýzy entomopatogenních hub, je i v této práci kladen velký důraz na vhodnou techniku izolace DNA pro jednotlivé metody analýzy DNA u entomopatogenních hub. Již Vega *et al.* (2008) se zmiňovali o problému extrakce DNA z mycelia hub *Beauveria bassiana*, kdy se zaměřili na význam mechanického rozrušení buněčné stěny hub, pomocí zirkoniových skleněných kuliček. V mém případě jsem využila tři komerční kity a dvě metody založené na přidání různých chemických aditiv, jež napomáhají k vyvázání DNA z komplexů membrán a lepšímu pročištění.

Z pěti testovaných metod extrakce DNA byly vybrány dvě – izolace pomocí DNeasy Plant Mini kitu (Qiagen), která se jevila v této studii vhodná pro dvě metody MM – analýzy mikrosatelitů a ITS regionu. Tento kit je využíván hlavně pro izolaci DNA z rostlinných tkání (např. Wang *et al.* (2009)), pro které je původně určen, ale v mykologii našel v mnoha případech využití také. Tuto metodu využili také Reay *et al.* (2008) pro izolaci DNA *Beauveria bassiana* a následnou amplifikaci fragmentu genu pro EF-1alfa, Castrillo *et al.* (2008), kteří pro analýzu mikrosatelitových markerů, na jejichž základě byla posuzována genetická variabilita mezi izoláty *Beauveria bassiana* nebo i Fernandes *et al.* (2009) při testování genetické variability populace *Beauveria bassiana* v Brazílii. A jako druhá metoda využívající CTAB-SDS byla pro analýzy velké podjednotky ribosomální RNA a AFLP vybrána z důvodu potřeby dostatečného množství vysokomolekulární DNA, která byla pro reprodukovatelný výsledek nutná. Zde se s názory některých autorů (např. Oborník *et al.* 2001), kteří tvrdí, že pro PCR a následnou sekvenční analýzu je dostačující množství DNA do 10ng, rozcháším, ale pro podmínky mých analýz vysoké množství počáteční DNA bylo nezbytné.

Výběr vhodné separační a detekční metody ze čtyř testovaných po analýze mikrosatelitů z pohledu nejcitlivější a nejpřesnější metody padl na metodu využívající sekvenátor – fragmentační analýza. Tuto metodu kladně hodnotil i Wang *et al.* (2009), kteří uvedli, že použitý sekvenátor ABI 3130xl byl schopen rozlišit velikost alel v rozmezí 1-2 bp. Při využití této techniky separace také hlavně odpadá nutnost náročného nalévání gelu a nanášení vzorků na gel (Trešlová 2008). Z hlediska nejpříjemnějšího finančního zatížení studie byla vyhodnocena pozitivně metoda elektroforézy na 3% Synergelu, který oproti elektroforéze na agarózovém gelu má lepší rozlišovací schopnosti.

Analýza mikrosatelitů představuje v současné době nejpoblárnější genetický marker, který se používá k hodnocení populační struktury a genetické variability u entomopatogenních hub (Enkerli a Widmer 2009). Rehner a Buckley (2003) uvádí, že mikrosatelitní markery jsou velmi výkonnými nástroji pro ekologické a epidemiologické studie, a pro přesnou genotypizaci kmenů *Beauveria bassiana*. V této studii byl použit pro analýzu mikrosatelitů soubor 54 kmenů, kde 36 z nich představovalo populaci *Beauveria bassiana* sebranou na území NP Šumava, ostatní kmeny druhu *B. bassiana* byly z jiných geografických oblastí a zbytek byly zástupci jiných druhů – *Beauveria brongniartii* a *Isaria fumosorosea*. Na základě analýzy mikrosatelitových markerů nebyla prokázána žádná genetická odlišnost u populace z NP Šumava a tím jsem dospěla k závěru, že tato populace je naprosto geneticky homogenním souborem. Což poukazuje na uzavřenou oblast a také na potvrzení hypotézy o „lokálním kmenu“. Také Enkerli *et al.* (2001) hodnotili úroveň polymorfismu mikrosatelitových markerů ve sbírce kmenů *Beauveria* pocházející z různých zemí, oblastí a z různého hmyzího hostitele, kdy potvrdili geografickou závislost jednotlivých populací i příbuznost na základě hostitele. Obdobnou studii provedli Castrillo *et al.* (2008), kteří pomocí mikrosatelitových markerů zkoumali (potvrdili) vztah mezi kmeny *Beauveria bassiana* odebraných z různých stádií i typu hostitele. Stejně tak Meyling *et al.* (2009) využili tuto metodu pro charakterizaci (genotypizaci) populace *Beauveria bassiana* v Dánsku spolu s dalšími typy molekulárních markerů.

Dalším testovaným molekulárním markerem v této práci je analýza ITS regionu, které jsou již dlouho využívány v populačních (Rehner a Buckley 2005) i taxonomických studiích (Liu *et al.* 1997). Mnoho studií prokázalo, že ITS region je často vysoce variabilním úsekem u morfologicky odlišných druhů hub, ale mohou se objevit i výjimky (Gardes a Bruns 1993). Výsledkem analýzy ITS regionu zkoumaného souboru v této studii bylo druhové i rodové odlišení vzorků a potvrzení homogenity populace z NP Šumava. Stejně jako Neugebäude *et al.* (1994) použili úspěšně jak ITS-RFLP tak sekvenační analýzu daného úseku pro determinaci 30 kmenů rodu *Beauveria* pocházejících z různých geografických oblastí a prokázali významný stupeň shody u vzorků pocházejících ze stejného hostitele, tak i Fernandes *et al.* (2009) potvrdili vztah mezi geografickým původem a variabilitou ITS regionu na druzích *Beauveria bassiana* pocházejících z Brazílie a USA. Tak jako Coates *et al.* (2002) rozdělil 90 kmenů *Beauveria bassiana* do osmi klastrů a tím naznačil polyfyletický charakter tohoto druhu, i v této práci došlo k potvrzení heterogenity druhu *Beauveria bassiana*.

Sekvenační analýza LSU rRNA v mykologii je poměrně častým a využívaným molekulárním nástrojem pro studium jejich biodiversity. A to z důvodu, že 28S rRNA je vysoce konzervativní opakující se sekvence, pro jejíž analýzu lze použít univerzální primery (White *et al.* 1990). To bylo potvrzeno při fylogenetické analýze na základě sekvenační analýzy úseku 28S rRNA, kdy byly pro srovnání použity různé druhy entomopatogenních hub a rozdílly v sekvencích vykazovali nižší variabilitu než u ITS analýzy. Van der Auwera *et al.* (1994) prováděli studie fylogenetických vztahů u druhů hub *Oomycetes*, *Hyphochytridiomycetes* a *Chytridiomycetes* na základě sekvencí 28S rRNA. Stejnou metodu použili Sherriff *et al.* (1994) u rodu *Colletotrichum* i Guaded *et al.* (1989) u rodu *Fusaria*. Všichni došli k jednomu závěru a to k takovému, že se jednotlivé kmeny ve fylogenetické analýze formovaly do shluku na základě taxonomické příbuznosti. Díky této hojně využívané vlastnosti tohoto molekulárního markeru – LSU rRNA, byla potvrzena domněnka, která byla naznačena již prvními dvěma technikami – SSR a ITS, a to že kmeny na základě morfologické charakteristiky determinované jako *Beauveria bassiana* měly profil na základě analýzy molekulárních markerů charakteristický pro druh *Beauveria brongniartii* a shlukovaly se do odlišného klastru. Všechny genotypy původem z NP

Šumava byly na základě i této analýzy LSU rRNA naprosto shodné, a to nám pouze znovu potvrzuje uzavřenou homogenní populaci.

Wang *et al.* (2003) provedli studii na 125 kmenech entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* sebraných zejména na území Číny a z různých hostitelů. Použili specifické primery pro analýzu specifického úseku LSU rRNA intronu I o velikosti 830 bp. A dospěl ve svém výzkumu k významnému výsledku. Totiž, že genetická příbuznost je více asociována s geografickým umístěním, než s druhem hostitele, z kterého byl kmen odebrán. V našem případě byl také prokázán vliv geografického původu a to hlavně u kmenů *Beauveria bassiana* pocházejících z odlišných lokalit než NP Šumava a tím opět také polyfyletický charakter celého druhu.

Stejně jako všechny analýzy molekulárních markerů je i AFLP technika využívána v populační genetice u hub k ověřování geografického původu i interakce s hostitelem (de Muro *et al.* 2003; Fernandes *et al.* 2009). Avšak je většinou kombinována s dalšími technikami molekulárních markerů (Uma Devi *et al.* 2006). Své výsledky jsem porovnála s prací Suazo a Hall (1999), kteří metodu AFLP aplikovali při genotypizaci kmenů entomopatogenní houby *Nomuraea rileyi*. Autorům se pomocí této metody podařilo vzorky rozdělit do tří klastrů v závislosti na jejich geografickém původu. Při použití stejných primerů jako Suazo a Hall (1999) jsem rozlišila kmeny *Beauveria bassiana* a *Beauveria brongniartii* odebrané z NP Šumava od ostatních vzorků, pocházejících z různých oblastí světa. Stejně jako autorovi, i mně se podařilo odlišit pomocí dendrogramu, založeném na AFLP polymorfismu tři klastry a vzorky tak rozdělit do skupin podle geografického původu.

Meyers *et al.* (2007) pomocí AFLP prováděné dle protokolu Suazo a Hall (2000) získal dva specifické molekulární markery, pomocí kterých je možno sledovat distribuci *Isaria fumosorosea* – lokálního kmene v oblasti Florida (USA) a odlišit ho od *Isaria fumosorosea* 97 Apopka.

Ačkoliv entomopatogenní druh houby *Beauveria bassiana* je u nás využívána jako součást biologické ochrany nejčastěji proti lýkožroutu smrkovém (*Ips typographus*), který způsobuje škody na smrkových porostech, v Číně je naopak výskyt tohoto druhu nežádoucí, jelikož způsobuje významné ztráty na bourci morušovém (*Bombyx mori*). Vyskytuje se na něm v podobě bílé muskardiny a způsobuje jeho smrt, a tedy i velké ekonomické ztráty při produkci hedvábí (Kumar *et al.* 1999). Jako významná biologická ochrana jsou preparáty na bázi *Beauveria bassiana* využívány po celém světě k regulaci např. termitů, molic anebo proti moskýtům způsobujícím malárii (Clark *et al.* 1968). Další využití je například biologická ochrana před třásněnkami u rychlené zeleniny pěstované ve sklenících (Ludwig *et al.* 2002).

V biologické ochraně by mohlo mít toto zjištění využití v aplikaci kmene *Beauveria bassiana* odebraného z NP Šumava zpátky do této oblasti pro ochranu proti lýkožroutu smrkovému, než aplikace komerčního biopreparátu, u něhož by nebyl znám původ.

7. Závěr

Pro hodnocení genetické variability všech zkoumaných souborů byly použity čtyři různé typy molekulárních markerů. SSR (analýza mikrosatelitů) jako druhově specifický marker nekódujících oblastí celým genomem, analýza ITS regionu – specificky amplifikovaného nekódujícího úseku, analýza LSU rDNA, jež postihuje specificky amplifikované části genů kódující velkou podjednotku ribosomální RNA, a AFLP jako nespecifický marker, jehož produkty zaujímají celý genom a mohou obsahovat jak kódující, tak nekódující oblasti.

Typy analýz byly vybrány takto účelově, aby došlo k zahrnutí všech typů molekulárních markerů, které se v populačních analýzách používají nejčastěji, a aby se tak získal co nejlepší výsledek v porovnání daných metod.

Všechny analýzy prokázaly stejný charakter příbuznosti zkoumaných vzorků. Jak naprostou homogenitu populace *Beauveria bassiana* sebranou v NP Šumava (s tím i související hypotézu „lokálního kmene“), tak polyfyletický charakter celého druhu *Beauveria bassiana*. V celém souboru je patrná geografická podobnost/závislost, která je pravděpodobně v některých případech narušena vlivem typu odběru nebo ekologických podmínek odběrové lokality. Tato charakteristika nebyla u všech analyzovaných vzorků sledována, proto není zahrnuta do charakteristik. Tento jev by měl být zkoumán v dalších studiích daného souboru entomopatogenních hub.

Dále bylo potvrzeno, že všechny použité molekulární markery jsou vhodným nástrojem pro rodové i druhové zařazení neznámých vzorků, stejně tak i pro potvrzení taxonomického zařazení po provedených morfologických charakteristikách. A právě vzorky KR7 (KRNAP, ČR), SSSR (Rusko), SVE (Švédsko), SK01 (Slovensko) a Col (Kolumbie), které byly prvotně po morfologických a biologických charakteristikách určeny jako *Beauveria bassiana*, byly na základě použitých molekulárních analýz zařazeny ke druhu *Beauveria brongniartii*.

Všechny metody analýzy genetické variability u entomopatogenních hub jsou vhodné, ale zaleží na úrovni hodnocení (mezirodové, mezidruhové nebo vnitrodruhové), na které se studie pohybuje, a tento fakt je nejdůležitější při volbě molekulárního markerů. Pro vnitrodruhovou variabilitu se zdá být nejvhodnějším markerem analýza AFLP, jež se jeví jako nejcitlivější, a právě to, že postihuje celý genom, bude důvodem nejvyšší variability mezi všemi testovanými vzorky.

Pro správnou taxonomickou determinaci se jeví jako nejvhodnější sekvenační analýza LSU rDNA nebo ITS regionu. Sekvenační analýza genů pro velkou podjednotku ribosomální RNA se již mnoho let využívá v jak populačních, tak v evolučních studiích. A to z důvodu, že se jedná o úsek velmi konzervativní a změny, které mohou v sekvenci nastat, se dějí s nízkou frekvencí. ITS region je o něco méně konzervativní, mnou zkoumaný úsek zahrnuje ITS 1 a 2 a 5.8S podjednotku rDNA, kde ITS 1 a 2 nejsou kódující oblasti, a změny v těchto částech nemusí být pro organismus letální, což je také důvodem vyšší druhové variability v těchto úsecích.

Všechny tři zmíněné analýzy jsou relativně časově náročné, i když vypovídací hodnota výsledku je velmi vysoká. Analýza mikrosatelitů je na rozdíl od ostatních technik testovaných v této práci velmi rychlá a výsledky získané touto metodou mají také vysokou reprodukovatelnost. Jediný výrazný rozdíl oproti ostatním je nutnost detekce mikrosatelitů ve zkoumaném organismu.

8. Citovaná literatura:

ACHONDUH, O.A. A TONDJE, P.R. (2008): First report of pathogenicity of *Beauveria bassiana* RBL1034 to the malaria vector, *Anopheles gambiae* s.l. (Diptera; Culicidae) in Cameroon. African Journal of Biotechnology 7: 931-935.

ADANE, K.; MOORE, D. A ARCHER, S. A. (1996): Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. Journal of Stored Product Research 32: 105-113.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. A WALTER, P. (2004): Základy buněčné biologie, 2. vydání, New York, Garland Science.

ALESHINA, O.A. (1980): Composition and prospects for study of the entomopathogenic fungi of the USSR. Review of Applied Entomology 68: 83-84.

AMÓRA, S.S.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; FEIJÓ, F.M.C.; ALVES, N.D. A MACIE, M.V. (2009): Control of *phlebotomine* (Diptera: Psychodidae) *leishmaniasis* vectors. Neotropical Entomology 38: 303-310.

ANDERSON, T. E.; ROBERTS, D. W. A SOPER, R. S.(1988): Use of *Beauveria bassiana* for Suppression of Colorado Potato Beetle Populations in New York State (Coleoptera: Chrysomelidae). Environmental Entomology 17:140-145.

AVISE, J.C. (2004): Molecular Markers, Natural History, and Evolution, Second Edition. Sinauer Associates Inc., Sutherland, USA.

BARTLETT, J. M. A STIRLING, D. (2003): A Short History of the Polymerase Chain Reaction. Methods in Molecular Biology 226: 3-6.

BAYMAN, P. A COTTY, P.J. (1993): Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. Canadian Journal of Botany 71: 23–31.

BECK, J.J. A LIGON, J.M. (1995): Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology* 85: 319–324.

BERGEM, M.; ROSETH, A.; LIEN, S. A 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.

BERGMANN, F. (1975): Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24: 175-177.

BIDOCHKA, M.J.; McDONALD, M.A.; ST LEGER, R.J. A ROBERTS, D.W. (1994): Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 25: 107–113.

BIELIKOVÁ, L. (2001): Genotypové a fenotypové změny houby *Paecilomyces fumosoroseus* související s adaptacemi na hostitele. Disertační práce, JU ZF České Budějovice.

BING, L.A. A LEWIS, L.C. (1992): Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: The influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* 2: 39-47.

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H. A TREVORS, J. T. (1998): Amplified fragment length polymorphism (AFPL): A review of the procedure and its application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21: 99-114

BOBKOVÁ, P. (2006): Využití entomopatogenních a akarifágních hub v biologické ochraně proti svlušce chmelové *Tetranychus urticae*. Disertační práce, JU ZF České Budějovice.

BOWMAN, B.H.; TAYLOR, J.W.; BROWILEE, A.G.; LEE, J.; LU, S. A WHITE, T.J. (1992): Molecular evolution of the fungi: relationship of *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* and *Chytridiomycetes*. *Molecular Biology and Evolution* 9: 285-296.

- BRIDGE, P.D. A ARORA, D.K. (1998): Applications of PCR in Mycology. CABI Publishing.
- BRIDGE, P.D.; PRIOR, C.; SAGBOHAN, J.; LOMER, C.J.; CAREY, M. A BUDDIE, A. (1997): Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation* 6: 177–189.
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J. A TAYLOR, J.W. (1991): Fungal Molecular Systematic. *Annual Reviews of Ecol. Syst.* 22: 525-564.
- BRUNS, T.D.; VILGALYS, R.; BARNES, S.M.; GONZALES, D.; HIBBERT, D.S.; LANE, D.J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T.M.; WEISBURG, W.G. A SOGIN, M.L. (1992): Evolutionary relationships within fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogeny and Evolution* 1: 231-241.
- CAETANO-ANOLLÉS, G. (1997): Nucleic acid scanning by amplification with mini-hairpin and microsatellite oligonucleotide primers. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. A GRESSHOFF, P.M. (eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 91-113.
- CANO, R. J.; POINAR, H. N.; PIENIAZEK, N. J.; ACRA, A. A POINAR, JR. G. O. (1993): Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363: 536-538.
- CARLILE, M.J. A WATKINSON, S.C. (1994): Genetic Variation and Evolution. In *The Fungi*, Academic Press, London, pp. 204-245.
- CARTER, D.A.; TRAN-DIHN, N.; MARRA, R.E. A VERA, R.A. (2004): The development of genetics markers from fungal genome initiatives. In: ARORA, D.K. A KHACHATOURIANS, G.G. (eds.): Applied mycology and biotechnology. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 1-29.
- CASTRILLO, L.A.; UGINE, T.A.; FILOTAS, M.J.; SANDERSON, J.P.; VANDENBERG, J.D. A 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.

CLARK, D.P. (2005): Molecular biology: Understanding the genetic revolution. Elsevier Academic Press.

CLARK, T.B.; KELLEN, W.R.; FUKUDA, T. A LINDEGREN, J.E. (1968): Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three generamosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology 11: 1-7.

COATES, B.; HELLMICH, R. A LEWIS, L. (2002): *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR–RFLP. Mycological Research 106: 40-50.

COOKE, R.J. A REEVES, J.C. (1998): Cultivar identification – a review of new methods. In: KELLY, A.F. A GEORGE, R.A.T. (eds.): Encyclopedia of Seed Production of World Crops. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

CREGAN, P.B. (1992): Simple sequence repeat DNA length polymorphisms. Probe 2: 18-22.

ČURN V. (2005): Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.

UMA DEVI, K.; REINEKE, A.; NAGESWARA RAO REDDY, N. A PADMAVATHI, J. (2006): Genetic diversity, reproductive biology and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as assessed from DNA fingerprint analysis and multiple gene genealogies of a sample of isolates of worldwide distribution and an epizootic population. Genome 49: 495-504.

DÍRLBEKOVÁ, O. (1991): Biologické zdroje pro mechanickou ochranu rostlin (I. *Deuteromycetes*, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). Studie VTR, ÚVTIZ, Ř. Rostl. Výr. 11: 10-21.

DOBERSKI, J. W. A TRIBE, H. T. (1980): Isolation of entomopatogenous fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Transactions of the British Mycologica Society 74: 95-100.

DOBROWOLSKI, M.P. A O'BRIEN, P.A. (1993): Use of RAPD-PCR to isolate a species specific DNA probe for *Phytophthora cinnamomi*. FEMS Microbiology Letters 113: 43-48.

DRIVER, F. A MILNER, R.J. (1998): PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A. A ELANDER, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, pp. 153-186.

VAN DRIESCHE, R.G. A HODDLE, M. (1996): Should arthropod parasitoids and predators be subject to host range testing when used as biological control agents?. Agriculture and human values 14: 211-226.

DUNCANS, S.; BARTON, J.E. A O'BRIEN, P.A. (1993): Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. Mycological Research 97: 1075-1082.

EDEL, V. (1998): Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A. A ELANDER, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, USA.

ENDRYCHOVÁ, V. (2004): Využití technik molekulárních markerů na modelových skupinách hub. Disertační práce, JU ZF České Budějovice.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C. A KELLER, S. (2001): Strain-specific microsatellites markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. Mycol. Research 105: 1079-1087.

ENKERLI, J. A WIDMER, F. (2009): Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. BioControl 55: 17-37.

EYAL, J.; MABUD, A.; FISCHBEIN, K.L.; OSBORNE, L.S. A LANDA, Z. (1994): Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 strain, which produces a red pigment for microbial control. Applied Biochemistry and Biotechnology 44: 65-80.

FENG, M.G.; POPRAWSKI, T.J. A KHACHATOURIANS, G.G. (1994): Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control. *Biocontrol Science and Technology* 4: 3-34.

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.

FERNANDES, E.K.K.; MORAES, A.M.L.; PACHCO, R.S.; RANGEL, D.E.N.; MILLER, M.P.; BITTENCOURT, V.R.E.P. A ROBERTS, D.W. (2009): Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *Journal of Applied Microbiology* 107: 760-774.

FERRON, P. (1975): Les champignons entomopathogenes: Evaluation des recherches au cours des dix dernieres anees. *Bull. Sci. Biol. Organ. Int. Lutte Biol. Bull. WPRS*.

FERRON, P. (1978): Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.

FUJIMORI, F. A OKUDA, T. (1994): Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. *Int. Fungi. Journal of Antibiotics (Tokyo)* 47: 173-182.

GARDES, M. A BRUNS, T.D. (1996): ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: CLAPP, J.P.: *Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Methods in molecular biology* Vol.50, Humana Press Inc., Totowa,NJ, pp.177-186.

GARDES, M. A BRUNS, T.D. (1993): ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.

GAUDET, J.; JULIEN, J.; LAFAY, J.F. A BRYGOO, Y. (1989): Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large subunits rRNA sequence comparison. *Molecular Biology and Evolution* 6: 227-242.

GAUTHIER, N.; DALLEAU-CLOUET, C.; FARGUES, J. A BON, M. (2007): Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. *Mycologia* 99: 693-704.

GERBI, S.A. (1985): Evolution of ribosomal RNA. In: MACINTYRE, R.J. (eds.): *Molecular evolutionary genetics*. Plenum Press, New York, pp. 419-518.

GLARE, T.R. A MILNER, R.J. (1991): Ecology of entomopathogenic fungi. In: ARORA, D.K; AJELLO, L. A MUKERJI, K.G. (eds.): *Handbook of Applied Mycology, Vol. 2 Humans, Animals and Insects*, Marcel Dekker, New York, pp. 547-612.

GRODEN E. (1999): Using *Beauveria bassiana* for Insect Management. New England Vegetable and Berry Growers Conference and Trade Show, Sturbridge, MA. Proceedings.

GUADET, J.; JULIEN, J.; LAFAY, J.F. A BRYGOO, Y. (1989): Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6: 227-242.

HAFEZ, M., ZAKI, F. N., MOURSY, A., SABBOUR, M. (1994): Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (seller). *Journal of Islamic Academy of Sciences* 7: 211-214.

HAWKSWORTH, D.L (1991): The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655.

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

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

HARDYS, H.; BALICK, M. A SCHIERWATER, M. (1992): Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.

HIBBERT, D.S. (1992): Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 33: 533-556.

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

HOEZEL, A. R. (1992): *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Oxford University Press.

HOPFER, R.L.; WALDEN, P.; SETTERQUIST, S. A HIGHSMITH, W.E. (1993): Detection and differentiation of Fungi in clinical specimen using polymerase chain reactions (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *Medical Mycology* 31: 65-75.

HUMBER, R. A. (1997): Fungi: Identification. In: LANCEY, L.A. (ed.): *Biological techniques, manual of techniques in insect pathology*, AP New York, pp. 155-185.

CHARNLEY, A.K. (1984): Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review, pp. 229-270, In: ANDERSON, J.M.; RAYNER, A.D.M.; WALTON, D.W.H. (eds.): *Invertebrate – Microbial Interactions*. Cambridge University Press, Cambridge.

CHI, M.H.; PARK, S.Y. A LEE, Y.H. (2009): A quick and safe method for fungal DNA extraction. *The Plant Pathology Journal* 25: 108-111.

CHIKWENHERE, G.P. A VESTERGAARD, S. (2001): Potential effects of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on *Neochetina bruchi* Hustache (*Coleoptera: Curculionidae*), a biological control agent of water hyacinth. *Biological Control* 21: 105-110.

INGLIS, G.D.; JOHNSON, D.L. A GOETTEL, M.S. (1996): Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology* 6: 35-50.

INNIS, A. M.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. A WHITE, T. J. (1990): PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, USA.

INNIS, A. M.; GELFAND, D. H. A SNINSKY, J. J. (1999): PCR Protocols, Protocols for Functional genomics. Academic Press a division of Harcourt Brace & Company, San Diego, USA.

JONES, C.J.; EDWARDS, K.J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M.O.; SALA, C.; VAN DE WIEL, C.; BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; MALCEVSKI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINAACERO, R.; VAZQUE, A. A KARP, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plant by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.

JORGENS, R. A. 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

KARP, A; EDWARDS, K.J.; BRUFORD, M.; FUNK, S.; VOSMAN, B.; MORGANTE, M.; SEBERG, O.; KREMER, A.; BOURSOT, P.; ARCTANDER, P.; TAUTZ, D. A HEWITT, G.M. (1997): Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature Biotechnology* 15: 625–628.

KELLER, S.; KESSLER, P. A SCHWEIZER C. (2003): Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol* 48: 307-319.

KHACHATOURIANS, G.G. A URIBE, D. (2004): Genomics of entomopathogenic fungi. In: ARORA, D.K. A KHACHATOURIANS, G.G. (eds.): *Applied mycology and biotechnology*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 353-379.

KORZUN, V. (2003): Molecular markers and their application in cereals breeding. In: *Marker Assisted Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding Session I: MAS in plants (FAO 2003)*.

KUBÁTOVÁ, A. (2006): *Hypocreales* – další anamorfy. Praha, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky.

KUMAR, V.; SINGH, G.P.; BABU, A.M.; AHSAN, M.M. A DATTA, R.K. (1999): Germination, penetration, and invasion of *Beauveria bassiana* on silkworm, *Bombyx mori*, causing white muscardine. Italian Journal of Zoology 66: 39-43.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H. A ANDERSON, L. (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. Nucleotic Acids Res 21: 1111-1115.

LANDA Z. (1998): Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. AGRO-ochrana rostlin, 10: 7 - 12.

LANDA, Z.; KŘENOVÁ, Z. A VOJTĚCH, O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. Lesnická práce 86 (10).

LANE, D.; PACE, J.B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L. A PACE, N.R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6955-6959.

LANFRANCO, L.; PEROTTO, S. A BONFANTE, P. (1998): Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A. A ELANDER, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, USA.

LEHMAN, P.F.; LIN, D. A LASKER, B.A. (1992): Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. Journal of Clinical Microbiology 30: 3249-3254.

LEIŠOVÁ, L.; MINAŘÍKOVÁ, V.; KUČERA, L. A OVESNÁ, L. (2002): DNA markery v diagnostice houbových patogenů. Využití molekulárních markerů v biologii, šlechtění a uchování genových zdrojů rostlin, Agritec Šumperk 4. – 6. 11. 2002: 181-190.

VAN LENTEREN, J.C. (1986): Parasitoids in the greenhouse: successes with seasonal inoculative release systems. In: WAAGE, J. AND GREATHEAD, D. (eds.): Insect Parasitoids. Academic Press, London, pp. 341–374.

LEWIN, B. (2000): Genes VII. Oxford University Press Inc., New York

LI, Z.; LI, C.; HUANG, B. A MEIZHEN, F. (2001): Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. Chinese Science Bulletin 46: 751–753.

LIU, Y.; ROGERS, S.O. A AMMIRATI, J.F. (1997): Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* species taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. Canadian Journal of Botany 75: 519-532.

LUDWIG, S. W., OETTING, R. (2002): Efficacy of *Beauveria bassiana* plus insect attractants for enhanced control of *Frankliniella occidentalis*, Florida Entomologist 85: 270-272

LUGERT, R.; SCHETTLER, C. A GROSS, U. (2006): Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. Mycoses. 49:298-304.

MAHR, S. (1997): Know your friends - The entomopathogen *Beauveria bassiana*. Midwest Biological Control Online, IV., 10.

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

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M. A BEN-YEPHET, Y. (1994): Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. Phytopathology 84: 98–101.

MARDIS E.R. (2008): The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in genetics* 24: 133-141.

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.

MATTHES, M.C.; DALY, A. A EDWARDS, K.J. (1998): Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: KARP, A.; ISAAC, P.G. A INGRAM, D.S. (eds.): *Molecular tools for screening biodiversity*, Chapman & Hall, London.

MCCOY, C.W.; SAMSON, R.A. A BOUCIAS D.H. (1988): Entomogenous fungi. In: IGNOFFO, C.M. (ed.): *CRC Handbook of Natural Pesticides*. CRC Press, Boca Raton.

MEYER, J.M.; HOY, M.A. A BOUCIAS, D.G. (2007): Morphological and molecular characterization of a *Hirsutella* species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (*Hemiptera: Psyllidae*), in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 95: 101-109.

MEYLING, N. V. (2008): PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi forecological studies. Department of Agriculture and Ecology. Faculty of Life Sciences. University of Copenhagen, Denmark.

MEYLING, N.V.; LÜBECK, M.; BUCKLEY, E.P.; EILENBERG, J. A REHNER, S.A. (2009): Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Molecular ecology* 18: 1282-1293.

MILBOURNE, D.; MEYER, R.C.; BRADSHAW, J.E.; BARID, E.; BONAR, N.; PROVAN, J.; POWELL, W. A WAUGH, R. (1997): Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3: 127-136.

MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R. A SASAKI, T. (1997): Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3: 87-103.

MOR, H.; GINDIN, G.; BEN-ZE'EV, I. S.; RACCAH, B.; GESCHTOVT, N. U.; AJTKHOZHINA, N. A BARASH, I. (1996): Diversity among isolates of *Verticillium lecanii* as expressed by DNA polymorphism and virulence towards *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica* 24(2): 111-118.

MORGANTE, M. A OLIVIERI, A.M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.

MOUKHAMEDOV, R.; HU, X.; NAZAR, R.N. A ROBB, J. (1993): Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal intergenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathology* 84: 256–259.

MUCLINGER, P. (2009): Molekulární markery. Studijní materiály. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta.

DE MURO, M. A.; METHA, S. A MOORE, D. (2003): The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters* 229: 249-257.

MURRAY M.G. A THOMPSON W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.

NAZAR, R.N.; HU, X.; SCHMIDT, J.; CULHAM, D. A ROBB, J. (1991): Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* with pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 1-11.

NEUVEGLISE C.; BRYGOO Y.; VERCAMBRE B. A RIBA G. (1994): Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research* 98 (3): 322-328.

NOVÁKOVÁ, A. (2008): Utilization of molecular markers in potato for variety identification and GMO detection and quantification. Disertační práce. JU ZF České Budějovice.

OBORNÍK, M. (1995): Molecular characterization and phylogeny of entomopathogenic fungi. Disertační práce. JU ZF České Budějovice.

OBORNÍK, M., JIRKU, M., DOLEZAL, D. (2001): Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecylomyces* polyphyletic?. Canadian Journal of Microbiology 47: 813-819.

OSBORNE, L.S. A LANDA, Z. (1992): Biological Control of Whiteflies with Entomopathogenic Fungi. Florida Entomologist 75: 456-471.

OSBORN, A. M. A SMITH, C. J. (2005): Molecular microbial ecology, Cromwell Press, UK.

PACCOLA-MEIRELLES, L. D. A AZEVEDO, J. L. (1991): Parasexuality in *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 57: 172–176.

PAVLOV, A. R.; PAVLOVA, N. V.; KOZYAVKIN, S. A. A SLESAREV, A. I. (2004): Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient application. Trends Biotechnol. 22: 253-260.

PAŽOUTOVÁ, S. (2001): The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. Mycological Research 105: 275-283.

PERLMAN, D.; CHIKARMANE, H. A HALVORSON, H.O. (1987): Improved Resolution of DNA Fragments in Polysaccharide-Supplemented Agarose Gels. Analytical Biochemistry 163: 247-254.

POSADA, F. J. A VEGA, F. E. (2005): A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. Journal of Insect Science 5: 1-10.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; LINGEY, S. A RAFALSKI, A. (1996): The unity of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.

RAMEL, C. (1997): Mini- and Microsatellites. *Environmental Health Perspectives* 105: 781.

REAY, S.D.; BROWNBIDGE, M.; CUMMINGS, N.J.; NELSON, T.L.; SOUFFRE, B.; LIGNON, C. A GLARE, T.R. (2008): Isolation and characterisation of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biological control* 46: 484-494.

REHNER, S.A. A BUCKLEY, E.P. (2003): Isolation and characterisation of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Molecular Ecology Notes* 3: 409-411.

REHNER, S.A. A BUCKLEY, E. (2005): A *Beauveria* phylogeny inferred from ITS and EF1- α sequences evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-98.

RIESBERG, L.H. (1996): Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99–105.

RUSSEL, J.R.; FULLER, J.D.; MACAULAY, M.; HATZ, B.G.; JAHOR, A.; POWEL, W. A WAUGH, R. (1997): Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J. A RHOADS, R. E. (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucl. Acids Res.* 18: 6409-6412.

SABBAHI, R.; MERZOUKI, A. 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. 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. A ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-polymerase. *Science* 239: 487-491.

SAMSON, R.A.; EVANS, H.C. A LATGE, J.P. (1988): Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Verlag, Berlin.

SAMŠIŇÁKOVÁ, A. (1963): Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* (Bals. - Criv.) Vuill. a její submerzní kultivace. Doktorská disertační práce, Entomologický ústav ČSAV, Praha.

SCHLICK, A.; KUHL, K.; MEYER, W.; LIECKFELDT, E.; BORNER, T. A MESSNER, K. (1994): Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 26: 74–78.

SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M.; VON HAESLER, A. A TAUTZ, D. (1994): Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 11(3): 513-522.

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.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M. A BAILEY, J.A. (1994): rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. *Mycological Research* 99: 475-478.

SHI, W. A 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 Control* 30: 165–173.

SIEBENEICHER, S.R.; VINSON, S.B. A KENERLEY, C.M. (1992): Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 280-285.

SMITH, R.J. A GRULA, E.A. (1981): Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37 (3): 222-230.

SMITH, R.J. A WILCOX, K.W. (1970): A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. 1. purification and general properties. *Journal of Molecular Biology* 51: 379-391.

SOGIN, M. L. A J. H. GUNDERSON (1987): Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs: evolutionary implications. *Endocytology III. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 503: 125-139.

SOGIN, M. L.; GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H. J.; ALFONSO, R. A. A PEATTIE D. A. (1989): Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243: 75-77.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; MEEHAN, B.M. A BROWN, A.E. (1996): Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39: 499-511.

SUAZO, A. A HALL, G. H. (1999): A modification of the ALFP protocol applied to honeybee (*Apis mellifera* L.). *Biotechniques* 26: 704–709.

SÝKOROVÁ, S. A 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.

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

ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R. A RŮŽIČKOVÁ, V. (2005): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně. Brno-Kraví Hora.

ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, R.; RŮŽIČKOVÁ, V. A KOPKTIKOVÁ J. (2008): Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně. Brno-Kraví Hora.

ŠTULÍK, K. A ZIMA T. (2008): Klinická a toxikologická analýza. Skripta VŠCHT Praha.

TANADA, Y. A KAYA, H.K. (1993): Fungal infections. In: TANADA Y., KAYA H.K. (eds.): Insect pathology. Academica Press Inc, California and Academica Press Limited London.

TARTAR, A.; SHAPIRO, A.M.; SCHARF, D.W. A BOUCIAS, D.G. (2005): Differential expression of chitin synthase (CHS) and glucan synthase (FKS) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in *in vivo*-produced *Beauveria bassiana* cells. Mycopathologia 160:303-314.

TAUTZ, D. (1989): Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acid Research 17: 6463-6471.

TAYLOR, J.W. A LOBUGLIO, K.F. (1993): Acoelomycete phylogenetics: Morphology and molecules. Mycoscience 35: 109-112.

TAYLOR, J.W.; JACOBSEN, D. J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GEISER, D.M.; HIBBETT, D. S.; FISHER M.C. (2000): Phylogenetics, species recognition and species concept fungi. Fungal Genet. Biol. 31: 21-32.

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

TINGEY, S.V. A DEL TUFO, J.P. (1993): Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiology 101: 349-352.

TOHME, J. A GONZALEZ, D.O. (1996): AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop.Sci.* 36: 1375-1384.

TREŠLOVÁ, H. (2008): Sekvenování nukleových kyselin. In: Sborník textů - Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Ústav dědičných metabolických poruch. Všeobecná fakultní nemocnice v Praze.

TUCKER, D.L.; BERESFORD, C.H.; SIGLER, L.A ROGERS, K. (2004): Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5412–5414.

VAN DER AUWERA, G.; CHAPELLE, S. A DE WACHTER,R. (1994): Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the *Oomycetes*. *FEBS Letters* 338: 133-136.

VÄNNINEN, I.; TYNI-JUSLIN, J. A HOKKANEN, H. (2000): Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *Biocontrol* 45 (2): 201-222.

VÁŇA, J. (1998): Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha.

VEGA, F.E.; POSADA, F.; AIME, M.C.; PAVA-RIPOLL, M.; INFANTE, F. A REHNER, S.A. (2008): Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.

VELÁSQUEZ, V.B.; CÁRCAMO, M.P.; MERINO, C.R.; IGLESIAS, A.F. A 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: 89-99.

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

VOLGER, A.P. A DESALLE, R. (1994): Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology* 8(2): 354–363.

VOS, P. A KUIPER, M. (1997): AFLP analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. AND GRESSHOFF, P.M. (eds.): *DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews*. Wiley-Liss, Inc., New York.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HOMES, M.; FREIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. A ZEBEAU, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414.

WAGNER, B.L. A LEWIS, L.C. (2000): Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3468–3473.

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

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

WATSON, D.W.; GEDEN, C.J.; LONG, S.J. A RUTZ, D.A. (1995): Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (*Diptera: Muscidae*). *Biological Control* 5: 405-411.

WEISER, J. (1966): *Nemoci hmyzu*. Academia Praha.

WELSH, J. A MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research* 18: 7213-7218.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. A TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. A WHITE, T.J. (eds): PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. A TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6535.

WINFIELD, M.O.; ARNOLD, G.M.; COOPER, F.; LE RAY, M.; WHITE, J.; KARP, A. A EDWARDS, K.J. (1998): A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of UK using AFLP markers. Mol Biol Evol 15: 3-10.

Internetové zdroje

Applied Biosystems (2005) - Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP®) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems - Application Note AFLP on the 3130/3730.

http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_042234.pdf

CANFIELD, E. (1999): Sanger Methods for DNA Sequencing.

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Bio111/seq.html>

LEWIS, M. (2009): Agarose gel electrophoresis (basic method). Department of Pathology University of Liverpool.

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

TURČÁNI, M.; HLÁSNY, T.; NAKLÁDAL, O.; SITKOVÁ, Z.; ZAJÍČKOVÁ, L.; DUBROVSKÝ, M.; HOLUŠA, J.; HAJNALA, M.; KULLA, L. A JAKUŠ, R. (2009): Bioregulační komplex (houby, hlístice, predátoři a parazitoidi). Přehled patogenů vyskytujících se u lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*). Lesy a klimatická změna.

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

Seznam publikací

NOVÁKOVÁ A., ŠIMÁČKOVÁ K., BÁRTA J., ČURN V. (2010): Utilization of molecular markers based on microsatellites polymorphism for potato variety identification cultivated in Czech Republic. *J. Central Europ. Agriculture* 11 (4): 415-422.

NOVÁKOVÁ, A.; ŠIMÁČKOVÁ, K.; BÁRTA, J. A ČURN, V. (2009): Potato variety identification by molecular markers based on retrotransposon analyses. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 45 (1): 1-10.

ČURN, V. A ŠIMÁČKOVÁ K. (2011): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub (Deuteromycetes), v tisku.

ČURN, V.; NOVÁKOVÁ, A.; ŠIMÁČKOVÁ, K.; ONDŘICHOVÁ, B. A BÁRTA J. (2008): Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. In: *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs*, Prohens J., Badenes M.L. (eds.). UP Valencia, Spain, pp. 699-703.