

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Potvrzení výskytu *Beauveria caledonica* v NP
Šumava pomocí metod molekulárních markerů**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina Šimáčková, Ph.D.

ENTÚ BC AV ČR

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

KSPR ZF JU v ČB

Autor: Bc. Richard Binder

České Budějovice, duben 2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Richard BINDER**
Osobní číslo: **Z13756**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Potvrzení výskytu *Beauveria caledonica* v NP Šumava pomocí metod molekulárních markerů**
Zadávající katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl práce:

Porovnání výsledků morfologických charakteristik a molekulárních analýz vzorků entomopatogenních hub na monitorovaném území NP Šumava. Analýza sbírkových kmenů pro validaci taxonomického zařazení. Potvrzení vlastních výsledků po sekvenční analýze zkoumaných úseků porovnáním s výsledky uvedených v databázi NCBI a jejich statistické vyhodnocení.


1. Stručný úvod do problematiky a nástin jejího současného významu.
2. Literární přehled - charakteristika entomopatogenních hub použitých v práci, principy technik molekulárních markerů a jejich význam v taxonomii hub.
3. Metodika - charakteristika analyzovaných kmenů, kultivace jednotlivých kmenů hub, izolace DNA, výběr vhodných lokusů, metodika PCR, sekvenování a statistického hodnocení.
4. Výsledková část - porovnání jednotlivých výsledných sekvencí s výsledky v databázi NCBI a taxonomické zařazení zkoumaných a sbírkových kmenů pomocí fylogenetické analýzy pro jednotlivé testované lokusy.
5. Diskuze - porovnání a posouzení významu vlastních výsledků s literárními údaji, zhodnocení použití dosažených dat a doporučení.
6. Závěr - přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení vyplývajících z řešené problematiky
7. Seznam literatury - v abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:


Caetano-Anolles G. a kol. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss NY, 1997, 364 s.
Arora D. K. a kol. Applied mycology and biotechnology: Volume 4 Fungal genomics. Elsevier B.V., 2004, 415 s.
Stock S.P. a kol. Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques. CABI UK, 2009, 417 s.
Arora D. K. a kol. Handbook of Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., 2004, 592 s.
Innis, M.A. a kol. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990, 482 s.
Butt T.M. a kol. Fungi as Biocontrol agents. CABI UK, 2001, 390 s.
Váňa, J. a kol. Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 1998, 164 s.
Šmarda J. a kol. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188 s.
Retrospektivní rešerše z databází: Web of Science, Biological abstracts, NCBI.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Kateřina ŠIMÁČKOVÁ, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Datum zadání diplomové práce: 11. února 2014
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2015

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13 ④
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 11. února 2014

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské - diplomové -rigorózní- disertační práce, a to- v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2015

.....
Bc. Richard Binder

PODĚKOVÁNÍ:

V první řadě bych chtěl poděkovat vedoucí mé DP Ing. Kateřině Šimáčkové, Ph.D. za odborné rady, cenné náměty a připomínky, a hlavně za trpělivost, která ji provázela během vypracovávání mé DP, ať již v průběhu řešení laboratorního pokusu nebo při konzultacích DP jako takové. Dále bych chtěl poděkovat panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. a Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za finální korekce. Děkuji Bc. Anetě Čákové za čas strávený nad podnětnými debatami, řešícími danou problematiku. Nakonec bych rád poděkoval rodině a přátelům za podporu jak morální tak materiální, která mne provázela celým studiem.

Abstrakt:

Biologická ochrana rostlin proti hmyzím škůdcům představuje významnou alternativu vůči ochraně chemické. Jedna z velmi významných skupin, použitelných v biologické ochraně rostlin proti hmyzím škůdcům jsou entomopatogenní houby. Entomopatogenní houby jsou mikroskopické houby, které jsou schopny vyvolávat primární onemocnění hmyzích škůdců. Je to druhově velmi heterogenní skupina a celosvětově bylo izolováno a popsáno více než 750 druhů entomopatogenních hub. Mezi nejvýznamnější rody entomopatogenních hub patří rod *Beauveria*. V České republice byl zaznamenán výskyt rodů *B. bassiana*, *B. brongniartii* a nově, na základě této práce, *B. caledonica*.

Tato studie je zaměřena na potvrzení výskytu *B. caledonica* v NP Šumava. K potvrzení výskytu byly využity analýzy založené na metodách molekulárních markerů. Molekulární markery jsou nepostradatelnou součástí vědy v oblasti mykologie zahrnující například popis kmenů, populační genetiku, detekci a identifikaci hub, fylogenetické studie a evoluční biologii. Pro tuto studii byly použity sekvenční analýzy regionů ITS, EF1- α a LSU. Výstupní data těchto analýz byla použita na vytvoření fylogenetických stromů. Výsledkem je druhové zařazení zkoumaných izolátů.

Klíčová slova: *Ascomycota*, *Beauveria*, *B. caledonica*, entomopatogenní houby, biologická kontrola, molekulární markery

Abstract:

Biological plant protection against insect pests is an important alternative to chemical protection. One of the most important group used in the biological plant protection against insect pests are the entomopathogenic fungi. Entomopathogenic fungi are microscopic fungi that are able to induce a primary disease to insect pests. It is a very heterogeneous group of species. Worldwide there were isolated and described more than 750 species of entomopathogenic fungi. Genus *Beauveria* is considered one of the most important genera of entomopathogenic fungi. In the Czech Republic there has been confirmed species *B. bassiana*, *B. brongniartii* and now, on the basis of this work, *B. caledonica*.

This study is aimed to confirm the occurrence of *B. caledonica* in National Park Šumava. To confirm this occurrence, I used analyzes based on the methods of molecular markers. Molecular markers are an indispensable part of science in the field of mycology, for example the strain characterization, population genetics, detection and identification of fungi, phylogenetic studies and evolutionary biology. For this study there were used sequence analysis of ITS, EF1- α and LSU regions. The output data of these analyzes were used to create phylogenetic trees. The result of my thesis is taxonomical classification of studied isolates on species level.

Key words: *Ascomycota*, *Beauveria*, *B. caledonica*, entomopathogenic fungi, biological control, molecular markers

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY	3
2.1.1 Úvod.....	3
2.1.2 Klasifikace entomopatogenních hub	3
2.1.3 Geografické a ekologické rozšíření.....	5
2.2 BIOLOGICKÁ OCHRANA	6
2.3 ROD BEAUVERIA VUILLEMIN (1912).....	7
2.3.1 Obecná charakteristika	7
2.3.2 Taxonomie.....	8
2.3.3 Životní cyklus.....	8
2.3.4 Využití	11
2.3.5 Důležití zástupci	12
2.4 MOLEKULÁRNÍ MARKERY A POPULAČNÍ STUDIE	15
2.4.1 Úvod.....	15
2.4.2 Techniky molekulárních markerů založené na restrikčním štěpení a hybridizaci.....	17
2.4.3 Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR.....	17
2.4.4 Sekvenování DNA	23
2.4.5 Populační studie	24
2.5 ELEKTROFORETICKÉ SEPARAČNÍ METODY.....	24
3. CÍLE PRÁCE	26
4. MATERIÁL A METODIKA	27
4.1 MATERIÁL.....	27
4.2 IZOLACE ENTOMOPATOGENNÍCH HUB.....	28
4.3 KULTIVACE A UCHOVÁNÍ	29
4.4 IZOLACE DNA ZE VZORKŮ.....	29
4.5 PCR	29
4.6 SEPARACE A DETEKCE VZORKŮ.....	33
4.7 ÚPRAVA VZORKŮ PŘED SEKVENOVÁNÍM.....	33
4.8 SEKVENOVÁNÍ.....	33
4.9 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	34
5. VÝSLEDKY	35
5.1 IZOLACE DNA.....	35

5.2	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	35
5.3	FYLOGENETICKÁ ANALÝZA	38
6.	DISKUSE.....	43
7.	ZÁVĚR.....	46
8.	ZDROJE.....	47
9.	PŘÍLOHY.....	54

1. ÚVOD

Biologická ochrana rostlin proti hmyzím škůdcům představuje významnou alternativu vůči, v současnosti stále ještě dominující, ochraně chemické.

Jedna z velmi významných skupin, použitelných v biologické ochraně rostlin proti hmyzím škůdcům jsou entomopatogenní houby. Entomopatogenní houby jsou mikroskopické houby, schopné vyvolávat primární onemocnění hmyzích škůdců vyskytujících se jak v půdě tak ve fytoplánu kulturních rostlin. Mezi nejvýznamnější rody entomopatogenních hub patří houby rodu *Beauveria* Vuillemin, hlavně pak druh *B. bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin. Houba *B. bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh, jehož kmeny lze izolovat z půd na všech kontinentech.

B. bassiana infikuje hospodářsky významné škůdce: např. zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) a obaleče jablečného (*Laspeyresia pomonella*). Byly izolovány kmeny *B. bassiana* vykazující vysokou virulenci na druzích stejnokřídlého hmyzu (molice a mšice). Jako perspektivní se jeví možnost využití *B. bassiana* v ochraně řepky proti blýskáčku řepkovému (*Meligethes aeneus*), další možnost použití je také v ochraně proti svilušce chmelové (*Tetranychus urticae*).

V České republice byl v rámci rozsáhlého projektu, ve spolupráci Zemědělské fakulty JU a Správy NP a CHKO Šumava, v NP Šumava realizován rozsáhlý monitoring přirozeného výskytu entomopatogenních hub asociovaných s lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*).

V rámci území České republiky byl zaznamenán výskyt druhů *B. bassiana*, *B. brongniartii* (Saccardo) Petch.

Jako hlavní charakteristika k určování druhů entomopatogenních hub se využívá jejich morfologických znaků, vyhodnocujících se na makroskopické a mikroskopické úrovni. K této druhové charakteristice se využívá zejména posouzení tvaru a velikosti konidií. Tyto metody ovšem nejsou vždy úplně přesné a k jejich upřesnění se používají metody molekulárních markerů.

Molekulární marker je molekula bílkoviny nebo určitý úsek DNA, který může být porovnáván u jednotlivých zkoumaných druhů organismů. Molekulární markery jsou nepostradatelnou součástí vědy v oblasti mykologie, zahrnující například popis kmenů, populační genetiku, detekci a identifikaci hub, fylogenetické studie a evoluční biologii. Díky technikám molekulárních markerů lze podpořit či vyvrátit

taxonomické zařazení založené na morfologických charakteristikách. Pro tuto studii byly použity sekvenační analýzy regionů ITS, EF1- α a LSU.

Kombinace morfologických vlastností a metod založených na molekulárních markerech se jeví jako vhodný nástroj k nesnadnému a často jinak ne příliš přesnému druhovému určení houbových izolátů napříč jednotlivými rody.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Entomopatogenní houby

2.1.1 Úvod

Entomopatogenní houby jsou druhově velmi heterogenní skupina. Celosvětově bylo izolováno a popsáno více než 750 druhů hub, které působí jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha živočišných druhů (Nielsen *et al.*, 2008).

Entomopatogenní houby patří do různých systematických skupin a jejich biologické vlastnosti jsou často velmi odlišné. V rámci patogenity všichni zástupci využívají jako své hostitele různé představitele kmene členovců (*Arthropoda*), zejména pak podkmene šestinozí (*Hexapoda*), do které spadá velmi početná a významná třída hmyz (*Insecta*). Parazitické mykózy mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (Lo, 2012).

Zástupci entomopatogenních druhů, zejména pak *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosoroseus* (= *Paecilomyces fumosoroseus*), *I. farinosa* (= *P. farinosus*) a *Lecanicillium lecanii* se těší velkému zájmu v oblasti komerční biologické ochrany hmyzu (Ekesi *et al.*, 2007). Do roku 2007 bylo uvedeno na trh zhruba 150 komerčních přípravků založených na entomopatogenních houbách (Faria & Wraight, 2007), počet každým rokem dále stoupá. Mezi cílové hmyzí hostitele patří: lalokonosec vejčitý, ponravy chroustů, bázlivec kukuřičný, drátovci, octomilky, háďátka, lýkožrout smrkový a další (Ekesi *et al.*, 2007).

2.1.2 Klasifikace entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby jsou klasifikovány do odlišných oddělení, konkrétně: *Ascomycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota* a *Basidiomycota* (Gul *et al.*, 2014).

Oddělení *Chytridiomycota*

Je to skupina hub obsahující ve svých buněčných stěnách chitin a neobsahující celulózu (Gul *et al.*, 2014). Většina entomopatogenních druhů je zastoupena řádem *Blastocladales* a rodem *Coelomomyces*, který obsahuje přibližně 70 druhů popsaných hmyzích patogenů (Barr, 2001).

Zástupci kmene *Chytridiomycota* se množí nepohlavně produkcí spor v rozmanitých sporangiích. Bylo u nich však nalezeno i mnoho druhů pohlavního rozmnožování. Zoospory se totiž mohou za určitých podmínek chovat jako gamety a fúzovat spolu za vzniku nového jedince. Jindy jsou gamety již plně odlišené na základě velikosti či barvy; nejvyšším stupněm vývoje je zřejmě oogamie, kdy samičí gameta (oosféra) zůstává na svém místě v gametangiu a je oplodněna pohyblivými samčími gametami (Kalina & Váňa, 2005).

Oddělení *Zygomycota*

Zygomycota neboli také spájkivé houby jsou polyfyletická skupina organismů, zahrnující organismy charakterizované kopulací gametangií, vzácně i somatogamií během pohlavního rozmnožování. Výsledkem gametangiogamie i somatogamie je vznik tzv. zygosporangia. Nepohlavní rozmnožování je charakterizováno přítomností endogenně vznikajících spor obvykle ve sporangiích (Kalina & Váňa, 2005).

Hyfy jsou mnohobuněčné a většinou netvoří přehrádky (cenocytické) (Gul *et al.*, 2014). S hmyzem nejvíce spojované druhy, jako například patogeny komárů, můžeme najít ve třídě *Trichomyces* (Cooper & Sweeney, 1986).

Oddělení *Ascomycota* a *Deuteromycota*

Do oddělení *Ascomycota* neboli vřeckovýtrusých hub spadají houby s haploidním přehrádkovitým myceliem a tvorbou pohlavních spor tzv. askospor v asku na plodnicích zvaných askomata. V jednom asku se vytváří nejčastěji osm askospor. Zástupci tohoto oddělení neprodukují zoospory (Shah & Pell, 2003).

Taxonomie konidiálních stádií se dělí na pohlavní (teleomorfní) a nepohlavní (anamorfní) (Gul *et al.*, 2014). U většiny druhů jsou teleomorfní stádia spíše vzácností. U velkého množství, především parazitických druhů, je časově převažujícím stádiem stádium anamorfa.

Druhy, u kterých není známo teleomorfní stádium, jsou zařazeny do pomocné skupiny *Deuteromycota* (Kalina & Váňa, 2005). Výtrusy (spory) vznikají u těchto hub jen nepohlavní cestou.

V tomto oddělení se nachází mnoho zástupců entomopatogenních hub, z nichž nejvýznamnější jsou rody *Aspergillus*, *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Culicinomyces*, *Lecanicillium*, *Isaria*, *Tolypocladium* and *Sorospora* (Gul *et al.*, 2014).

Oddělení *Basidiomycota*

Do oddělení *Basidiomycota*, známého také jako stopkovýtrusné houby náleží zástupci charakterističtí způsobem svého pohlavního rozmnožování. Karyogamie i meióza probíhají v buňce zvané bazidie (odpovídající meiosporangiu). Haploidní bazidiospory (meiospory) se tvoří exogenně na sterigmatech (stopečkách), vyrůstajících na bazidii nejčastěji po čtyřech (Kalina & Váňa, 2005).

Do tohoto oddělení spadá velmi malý počet entomopatogenních zástupců (Samson *et al.*, 1988).

2.1.3 Geografické a ekologické rozšíření

Entomopatogenní houby jsou důležitou a rozšířenou složkou většiny suchozemských ekosystémů. Nacházejí se i v místech, kde je snížený výskyt hostitelských organismů - hmyzu a jiných členovců. Zástupce entomopatogenních hub lze nalézt prakticky po celém světě. Příkladem takového druhu může být *Beauveria bassiana*, jejíž výskyt byl potvrzen jak v tropickém deštném pralese (Aung *et al.*, 2008), tak například v Severní Kanadě v 75° zeměpisné šířky (Widden & Parkinson, 1979). Druhy entomopatogenních hub konkrétně *Tolypocladium cylindrosporum*, *B. bassiana* a *Metarhizium anisopliae* byly rovněž zaznamenány v oblasti Severního polárního kruhu v Norsku (Klingen *et al.*, 2002), *B. bassiana*, *M. anisopliae* a *Isaria farinosa* ve Finsku (Vänninen, 1995). Výskyt entomopatogenních druhů byl potvrzen dokonce i na arktickém Grónsku (Eilenberg *et al.*, 2007) a Antarktidě (Bridge *et al.*, 2005).

Entomopatogenní houby jsou převážně půdní mikroorganismy, které napadají organismy žijící v půdě z důvodů vyhnutí se UV záření, které může v krátkém

časovém intervalu působit na povrch listu, dále mohou dešťové srážky smýt konidie pryč z povrchu rostliny. Půdní teplota a vlhkost je pro mikroorganismy příznivá díky izolační schopnosti půdy a spory tak mohou v půdě setrvávat delší dobu (Ekesi *et al.*, 2007).

2.2 Biologická ochrana

Jako biologickou ochranu obecně chápeme využívání živých organismů za účelem potlačení či snížení populačního výskytu či negativního vlivu škodlivých organismů na cílové organizmy neškodlivé. Četnost či škodlivost těchto organismů je pak v nižší míře, než kdyby biologická ochrana nebyla použita (Eilenberg *et al.*, 2001).

Základní metody, které jsou v rámci biologické ochrany rostlin využívány, jsou členěny s ohledem na způsob a podmínky, za jakých je přirozený nepřítel introdukovan do zájmového agroekosystému. Jsou popisovány čtyři hlavní strategie.

- Klasická biologická ochrana – Zajišťuje dlouhodobý efekt účinku introdukovaného druhu v oblastech adaptace, namnožení a rozšíření. Trvalé zavedení biologického kontrolního agens za účelem dlouhodobé ochrany rostlin proti škůdcům.
- Inokulativní biologická ochrana – Vysazení přirozeného autochtonního organismu jako biologického kontrolního agens. Cílem je okamžitý efekt, který působí v delším časovém horizontu.
- Inundativní biologická ochrana – Jednorázové či opakované uvolňování živých organismů (a virů) v ochraně rostlin proti původcům onemocnění a škůdcům.
- Podpora a konzervace přirozených antagonistů – Využívání šetrných změn životního prostředí k negativnímu působení na původce onemocnění a škůdce rostlin (Eilenberg *et al.*, 2001).

V rámci biologické ochrany rostlin mohou být preparáty na bázi entomopatogenních hub využity ve všech čtyřech strategiích biologické ochrany rostlin (Shah & Pell 2003).

2.3 Rod *Beauveria* Vuillemin (1912)

2.3.1 Obecná charakteristika

Rod *Beauveria* byl popsán v roce 1912 francouzským mykologem Vuilleminem jako nový rod na počest vědce J. Beauvarie, který se zkoumáním houby dlouhá léta zabýval (Vuillemin, 1912).

Beauveria patří mezi nepohlavně se rozmnožující houby spadající do oddělení *Ascomycota* do čeledi *Cordycipitaceae* (Sung *et al.*, 2007). Je to kosmopolitní rod v půdě se vyskytující entomopatogenních hub. Byla jednou z prvních objevených entomopatogenních hub a její působení bylo pozorováno na projevech plísňové choroby bource morušového v 18. a 19. století, které zapříčinilo začátek studií patologie zabývající se interakcí zástupců hmyzu a hub (Vega & Blackwell, 2005).

Druhy rodu *Beauveria* reprezentují široce polyfágní houby, které se běžně vyskytují v půdě a parazitují na půdním hmyzu, případně na stádiích hmyzu, která se v půdě vyskytují pouze příležitostně (během hibernace). V sortimentu hostitelů jsou zastoupeny i fytofágní druhy z řádů rovnokřídlí (*Orthoptera*), brouci (*Coleoptera*), larvy a kukly motýlů (*Lepidoptera*, např. zavíječ kukuřičný) a dvoukřídlého hmyzu (*Diptera*). V současnosti jsou k dispozici i kmeny *B. bassiana* vysoce virulentní vůči některým druhům stejnokřídlého hmyzu (*Homoptera*). Nákazy vyvolané těmito houbami jsou označovány jako „bílé muskardiny“, protože infikovaný jedinec zpravidla porůstá hustým, bílým myceliem (Vey *et al.*, 2001).

Rod *Beauveria* vytváří rozmanité spektrum biologicky aktivních sekundárních metabolitů, které obsahují nepeptidové pigmenty a polyketidy, neribozomálně syntetizovaná peptidová antibiotika a další vylučované metabolity, hrající významnou roli v patogenezi a virulenci hmyzu (Vey *et al.*, 2001).

Mezi dva nejdůležitější zástupce se počítá *B. bassiana* a *B. brongniartii*, které se vyznačují snadnou kultivací a zároveň vysokou virulentní schopností, což z nich dělá příznivé kandidáty pro biologickou regulaci hmyzu (Li *et al.*, 2001).

Rod *Beauveria* je charakterizován kulovitými do baňky tvarovanými konidiogenními buňkami, ze kterých vyúsťují jednobuněčné, terminální holoblastické konidie v úzké apikální prodloužení zvané rachis. Druhy *Beauveria* se z morfologického hlediska rozlišují hlavně podle charakteristik konidií, které jsou

typicky tenkostěnné a hyalinní. Velikost je v rozmezí 1,5-5,5 μm a mají kulovitý, cylindrický nebo červovitý tvar (Rehner *et al.*, 2011).

V umělé kultuře tvoří *Beauveria* bílé až slabě narůžovělé mycelium. Optimální iniciační pH na produkci spor v laboratorních podmínkách při použití PDB (Potato Dextrose Broth) je 5,2. a optimální teplota je 25°C (Pham *et al.*, 2009).

2.3.2 Taxonomie

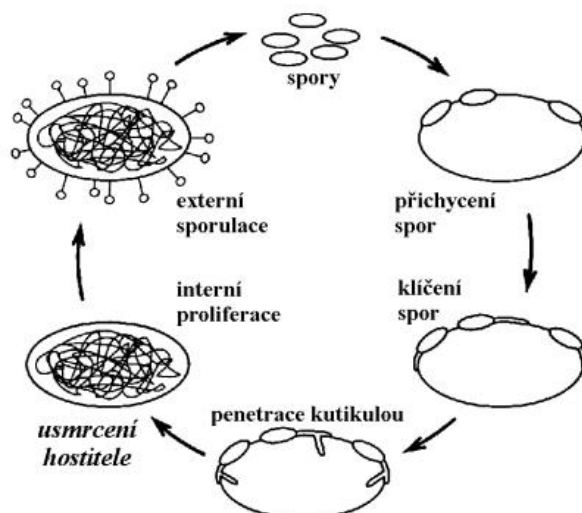
Říše: *Fungi*
Oddělení: *Ascomycota*
Třída: *Sordariomycetes*
Podtřída: *Hypocreomycetidae*
Řád: *Hypocreales*
Čeleď: *Cordycipitaceae*
Rod: *Beauveria*

(Vuillemin, 1912)

2.3.3 Životní cyklus

Životní cyklus entomopatogenních hub se skládá ze dvou hlavních fází: parazitické fáze, kdy dochází k napadení a usmrcení hostitele a saprofytické fáze, která následuje po hostitelově smrti.

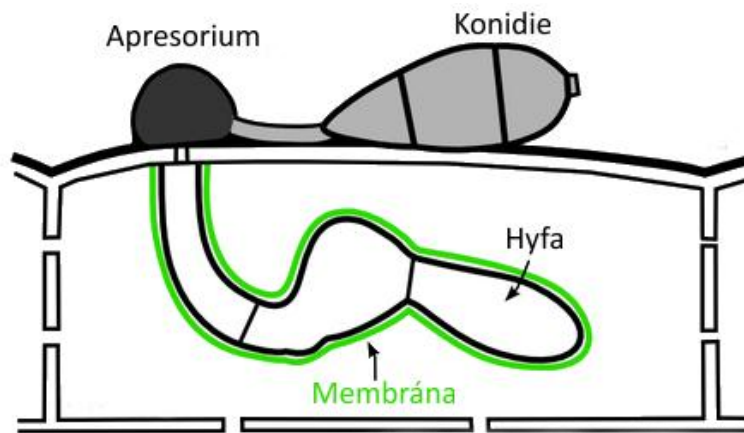
Entomopatogenní houby rodu *Beauveria* jsou známy jako původci onemocnění mnoha druhů hmyzu, zejména pak jedinců, kteří jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu (Landa *et al.*, 2007). Ve srovnání s ostatními entomopatogeny (bakterie, viry), kteří vstupují do těla hmyzu buď díky vnějšímu poranění exoskeletu, nebo jsou přijímány spolu s potravou, jsou entomopatogenní houby schopny samostatně narušit externí kutikulu a způsobit infekci hostitele. Průběh infekce zahrnuje přichycení spory na hostitelské kutikule a její vyklíčení, penetraci vyklíčené spory do hostitele a nakonec vývoj spory uvnitř hostitele s následnou kolonizací tělní dutiny (Obr. 1) (Lo, 2012).



Obr. 1: Životní cyklus entomopatogenních hub (Landa *et al.*, 2008)

Přichycení a klíčení spory

Infekce hostitele je iniciována konidii, které po přichycení na povrch kutikuly klíčí. Prvním krokem patogenního procesu je adheze propagulí na povrch hostitele. Zatímco iniciální adheze na povrch hostitele je pasivní proces, následné připevnění a klíčení spory je aktivní proces, který by nemohl probíhat bez přítomnosti důležitých enzymů. Hydrofobní konidie mnoha patogenů se vážou nespecifickým způsobem na epikutikulu jak citlivých, tak rezistentních hmyzích hostitelů. Nicméně produkce penetračních klíčících hyf se objeví pouze u citlivých hostitelských druhů. Proces klíčení započne pouze v dobrých podmínkách, kterými jsou hlavně optimální vlhkost a dostatek živin (Edwards, 2002). Klíčivé spory entomopatogenních hub rodu *Beauveria* dále produkují apresoriální buňky, které vytváří hlenem pokrytý útvar zvaný apresorium (Obr. 2), zodpovědný za přichycení vláknů k hostiteli v místě penetrace (Samson *et al.*, 1998).



Obr. 2: Průnik buněčnou stěnou a klíčení hyfy uvnitř cytoplazmy hostitele (Khang & Valent, 2010). Upraveno R. Binder

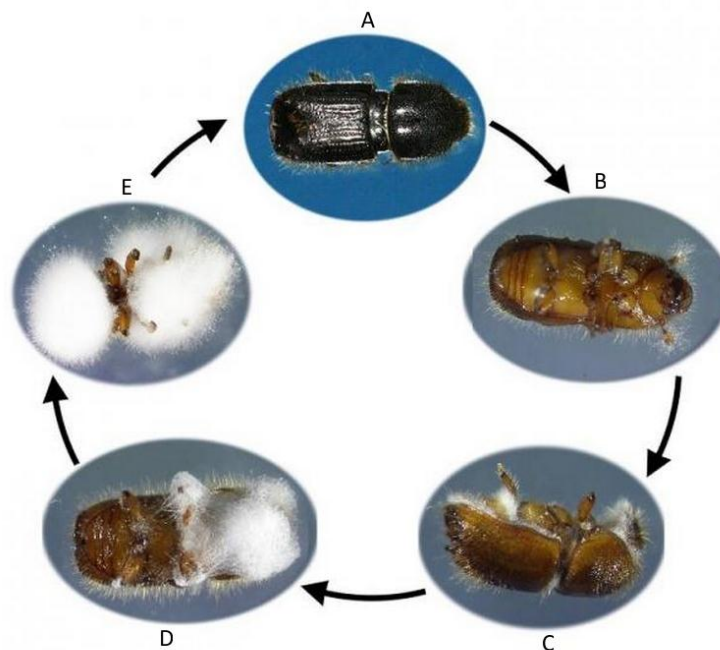
Proniknutí do hostitele

K infekci hostitele dochází proniknutím výtrusu houby povrchem do tělní dutiny hostitele. V tělní dutině hmyzu se po proniknutí výtrusu houby začnou tvořit nepohlavní buňky (Landa *et al.*, 2007).

Veškeré druhy entomopatogenních hub využívají k proniknutí kutikulou do hostitele kombinaci mechanických sil a kutikulu-degradujících enzymů. Kutikulu degradující enzymy využívané houbami rodu *Beauveria* jsou například proteázy, esterázy, lipázy a chitinázy, z nichž nejvýznamnější roli hrají právě proteázy (Edwards, 2002).

Vývoj houby uvnitř hostitele

Uvnitř tělní dutiny se tvoří oválné blastospory, klíčící v hustou myceliální masu, která hostitele mumifikuje. V konečné fázi vývoje prorůstají hyfová vlákna na povrch usmrceného jedince, kde se pak formuje vzdušné mycelium, na kterém se tvoří nové konidie, které mohou iniciovat nový vývojový cyklus patogena (Obr. 3) (Landa *et al.*, 2007).



Obr. 3: Životní cyklus *Beauveria bassiana*: A-inokulace, B-zabití hostitele, C-začátek růstu mycelia, D-pokrytí hostitele myceliem, E-uvolnění spor.

<http://www.npsumava.cz/cz/1598/2184/clanek/entomopatogenni-houba-beauveria-bassiana/> staženo dne 10. 4. 2015)

2.3.4 Využití

Entomopatogenní houby rodu *Beauveria* se poměrně hojně využívají v biologické ochraně.

B. bassiana infikuje hospodářsky významné škůdce: např. zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) a obaleče jablečného (*Laspeyresia pomonella*). Byly izolovány kmeny *B. bassiana* vykazující vysokou virulenci na druzích stejnokřídlého hmyzu (molice a mšice). Jako perspektivní se jeví možnost využití *B. bassiana* v ochraně řepky proti blýskáčku řepkovému (*Meligethes aeneus*), další možnost použití je také v ochraně proti svilušce chmelové (*Tetranychus urticae*). *B. brongniartii* je považována za specifického patogena chroustů a je využívána k potlačení výskytu ponrav například v ovocnářství. Využívá se též v ochraně révy vinné (Koubová, 2009).

2.3.5 Důležití zástupci

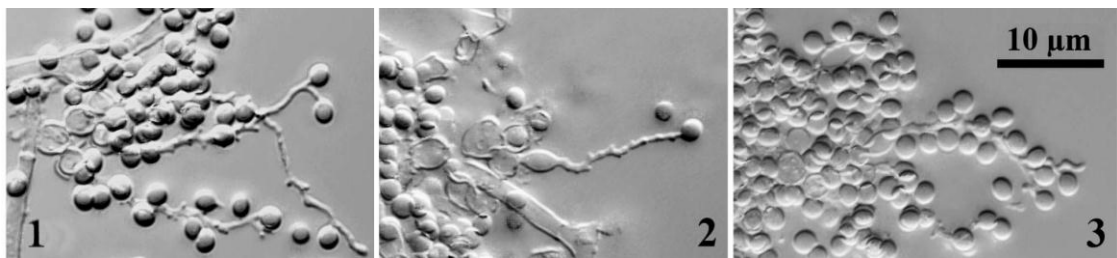
***Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin**

B. bassiana je druh celosvětově rozšířené entomopatogenní houby, která bývá spojována s napadáním mnoha hmyzích druhů, zejména pak těch, které jsou alespoň částí svého vývojového cyklu vázány na půdu (Landa *et al.*, 2007). *B. bassiana* byla však nečistota nalezena také na infikovaných jedincích mimo půdní niku (Meyling *et al.*, 2011). Meyling & Eilenberg (2007) uvádí, že tato entomopatogenní houba se prokazatelně vyskytuje u více než 700 druhů hostitelů.

Konidie *B. bassiana* jsou globoidního až subgloboidního tvaru, velikost (2-3) x (2-2,5) μm . Konidiogenní buňky tvoří husté shluky nebo hrozny. V umělé kultuře roste *B. bassiana* jako bílá plíseň a na svých hostitelích vytváří typickou bílou muskardinu. Optimální teplota pro růst a vývoj je v rozmezí 23-26°C při vlhkosti substrátu 80-100%. Minimální teplota pro růst mycelia je 5-8°C, maximální teplota však 28-31°C, načež při překročení tohoto teplotního maxima se růst houby pozastavuje (Dirlbeková *et al.*, 1991).

Na bázi entomopatogenní houby *B. bassiana* existuje v současné době celá řada přípravků. Jsou to například BotaniGard 22WP, BotaniGard ES, Mycotrol O, Boverol a Naturalis L.

Faria & Wraight (2007) ve své práci uvádí existenci 58 přípravků na bázi *B. bassiana*, což je asi 34 % ze všech komerčně udávaných výrobků na bázi všech druhů entomopatogenních hub. Největší výrobci těchto přípravků jsou USA, státy Střední a Jižní Ameriky (Mexiko, Kolumbie, Brazílie), Jihoafrická republika, Indie a Rusko.



Obr. 4: Konidie a konidiofory *Beauveria bassiana* (Rehner *et al.*, 2011).

Využití biopreparátů na bázi *B. bassiana*

Biopreparáty na bázi *B. bassiana* se poměrně hojně využívají v boji proti lýkožroutovi smrkovém (*Ips typographus*) (Obr. 4). Efektivita těchto biopreparátů byla testována například v Německu, Švýcarsku, Rakousku a na experimentální úrovni i v dalších zemích (USA, Austrálie, Finsko, Polsko) (Landa *et al.*, 2007).



Obr. 5: Dospělec lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*).

(<http://www.colpolon.biol.uni.wroc.pl/Foto/Ips%20typographus.jpg> staženo dne 8. 3. 2015)

Bylo prokázáno, že biopreparáty na bázi *B. bassiana* jsou velmi účelné zejména pak v situacích, kdy od aplikace biopreparátu není očekáván okamžitý účinek, nýbrž vyhlídka dlouhodobějšího potlačování populací škůdce (Landa *et al.*, 2007).

Nejčastěji je *B. bassiana* aplikována formou vodních suspenzí spor na povrch napadených stromů nebo stromových lapáků (Obr. 5).



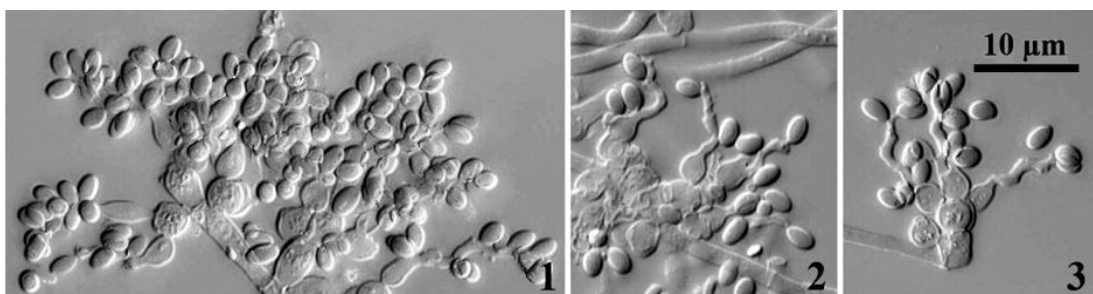
Obr. 6: Lokální aplikace vodní suspenze spor *B. bassiana* v NP Šumava do porostu pomocí upraveného rosícího zařízení neseného vrtulníkem. Cílem aplikace je vytvoření sporové mlhy, která prostupuje korunami stromů, pokrývá povrch kmenů a vytváří infekční prostředí.

(<http://www.npsumava.cz/cz/1598/2185/clanek/prakticke-vyuziti-houby-beauveria-bassiana/> staženo dne 6. 1. 2015)

***Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch**

B. brongniartii je celosvětově rozšířená entomopatogenní houba, která je známa svým velmi omezeným okruhem hostitelských druhů. Přípravky na bázi této houby se využívají v biologické ochraně proti zástupcům rodu *Melolontha* (chrousti) ve všech jejich vývojových stádiích.

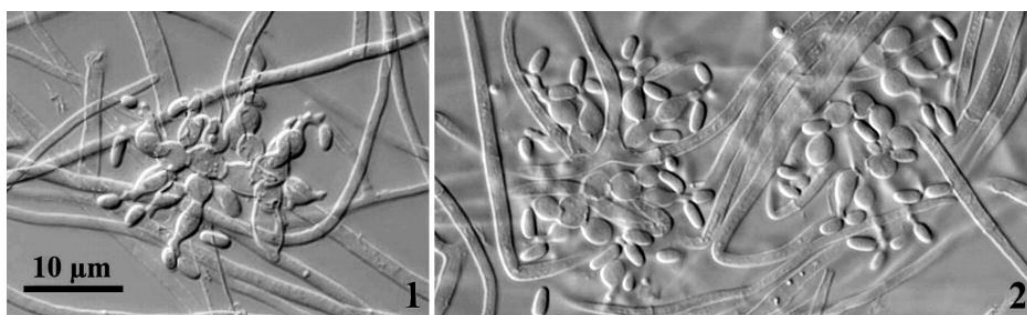
Mycelium je v *in vitro* podmínkách zbarveno do bíla s nažloutlým až narůžovělým nádechem. Hyfy jsou hyalinní, hladkostěnné 1,5-3 μm široké. Konidie *B. brongniartii* jsou hyalinní, hladké, globoidního, zřídka až subgloboidního tvaru o velikosti (2,5-4,5) x (2-2,5) μm (Mycobank, 2014).



Obr. 7: Konidie a konidiofory *Beauveria brongniartii* (Rehner *et al.*, 2011)

***Beauveria caledonica* Bissett & Widden**

Beauveria caledonica byla prvně izolována z půdy rašeliniště ve Skotsku. Tento druh je charakterizován kyjovitými až krátce cylindrickými konidiofory (Bissett & Widden, 1988). Hyfy jsou hyalinní, hladké 1,8-4,1 μm široké, nesoucí seskupení konidiálního aparátu. *B. caledonica* vytváří konidie cylindrického, mírně zakřiveného tvaru, občas zúžené uprostřed, o velikosti (3,7-5,2) x (1,9-2,3) μm (BCRC, 1997), (Glare *et al.*, 2008). Mycelium je zbarvené obvykle od bílé až po bílooranžovou barvu. Testy Glare *et al.* (2008) prokázaly, že *B. caledonica* je v laboratorních pokusech vysoce patogenní vůči dospělcům *Hylurgus ligniperda* a larvám *Tenebrio molitor*. Reay *et al.* (2008) došli k závěru, že *B. caledonica* je obecně spojována s přirozeným prostředím kůrovcovitých brouků. Tento druh entomopatogenní houby byl odizolován z uhynulých jedinců, půdy, kůry, avšak nikoli z živých jedinců. *B. caledonica* by tedy potenciálně mohla být velmi důležitá v biologické ochraně proti kůrovcovitým broukům.



Obr. 8: Konidie a konidiofory *Beauveria caledonica* (Rehner *et al.*, 2011).

2.4 Molekulární markery a populační studie

2.4.1 Úvod

Molekulární markery (značky, ukazatele) jsou pro vědce přibližně to, co otisk prstu pro kriminalistu. Umožňují identifikaci organismu, resp. jeho genetické vlastnosti, stanoví příbuzenské vztahy mezi organismy nebo například podají informaci o zdravotním stavu organismu (Jankovský & Šmerda, 2006).

Molekulární markery se staly nepostradatelnou součástí vědy v různých oblastech mykologie zahrnující například popis kmenů, epidemiologii, populační genetiku, detekci hub a identifikaci, genetické mapování, izolaci genů, fylogenetické

studie a evoluční biologii. U hub můžeme používat molekulární markery na úrovni chromozomální, extrachromozomální nebo mitochondriální DNA (Khachatourians & Arora, 2004).

Dříve se jednalo především o proteinové (izoenzymové) molekulární markery, zatímco v dnešní době se stále častěji využívají DNA markery. DNA markery jsou variabilnější, mohou pokrýt (charakterizovat) celý genom organismu (Jankovský & Šmerda, 2006) a na rozdíl od proteinových markerů nejsou tak významně ovlivněny prostředím a není tedy narušena jejich selektivní neutrálnost, což v některých případech nebývá splněno u izoenzymových markerů, na které může selekce působit buď přímo, nebo skrze geny vystavenými selekci, s nimiž bývají často ve vazbě (Bergmann, 1975).

Velkou výhodou DNA markerů je rychlost a spolehlivost determinace. Například v případě potřeby stanovení patogenního agens z vegetativního vzorku je zapotřebí při kultivačních metodách minimálně 2-3 týdnů. Při imunologických testech pak tato doba činí včetně přípravy vzorku cca 24 hodin, u polymerázové řetězové reakce je možno tuto dobu zkrátit na 2-4 hodiny. Rovněž v souvislosti s využíváním explantátových kultur pro uchovávání genofondu a přípravu sadebního materiálu bude nutná kontrola deklarovaných vlastností (Jankovský & Šmerda, 2006).

V praxi tedy nemusíme hodnotit přímo například znak odolnosti k houbovému onemocnění, který se považuje za složitě hodnotitelný znak. Místo toho si můžeme vybrat molekulární znak, který se na chromozomu nachází velmi blízko genu pro toto houbové onemocnění. V potomstvech pak můžeme poměrně přesně sledovat přenos tohoto molekulárního znaku (na základě sondy DNA) v zastoupení nepřesně sledovatelného znaku (odolnosti k houbovému onemocnění, například padlí ječmene). Je to podstatné zpřesnění a zvýšení možností využití vazbových map kulturních rostlin. Molekulární mapování umožňuje podstatně urychlit a zpřesnit proces šlechtění (Ondřej & Drobník, 2002).

Na základě hlavního principu použité metody se molekulární (DNA) markery dělí na markery založené na hybridizaci DNA a markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR).

2.4.2 Techniky molekulárních markerů založené na restrikčním štěpení a hybridizaci

RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) je technika, která umožňuje diferenciaci genomů na základě spektra DNA fragmentů, které vzniknou po štěpení genomové DNA restrikčními endonukleázami. Jestliže se dva genomy liší vzdáleností mezi pozicemi štěpení určitou restriktaázou, pak se vzniklé fragmenty budou lišit svojí délkou, pokud budou genomy rozštěpeny právě touto restriktaázou. Podobnost spekter genomů vzniklých metodou RFLP značí obecně příbuznost těchto genomů. Po endonukleázovém rozštěpení genomové DNA vzniká velké množství fragmentů, které jsou rozděleny dle velikosti elektroforézou v agarózovém gelu. Vzniklé spektrum fragmentů genomové DNA je nepřehledné a nehodnotitelné. Proto se k analýze využívá jen malá část vzniklých fragmentů. To, která část genomové DNA je použita, je dáno tzv. sondou. Sonda je krátký fragment genomové DNA, který hybridizuje s komplementárními sekvencemi genomové DNA a vyhledává tak mezi mnoha fragmenty genomové DNA jen ty, které v konečném důsledku vytvářejí výsledné spektrum (Bartoš, 2007).

V průběhu evoluce docházelo ke změnám v sekvencích DNA. Na těchto změnách jsou založeny RFLP markery. Tyto změny jsou způsobeny bodovými mutacemi v místech štěpení restrikčními endonukleázami. Inzerce či delece mohou vést k nerovnoměrnému crossing-overu v rámci určitého chromozomu. První použití RFLP markerů u rostlin bylo v oblasti konstrukce genových map. Jsou to kodominantní markery, které umožňují určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním nebo heterozygotním stavu (Řepková & Relichová, 2001).

2.4.3 Techniky molekulárních markerů založené na metodě PCR

PCR

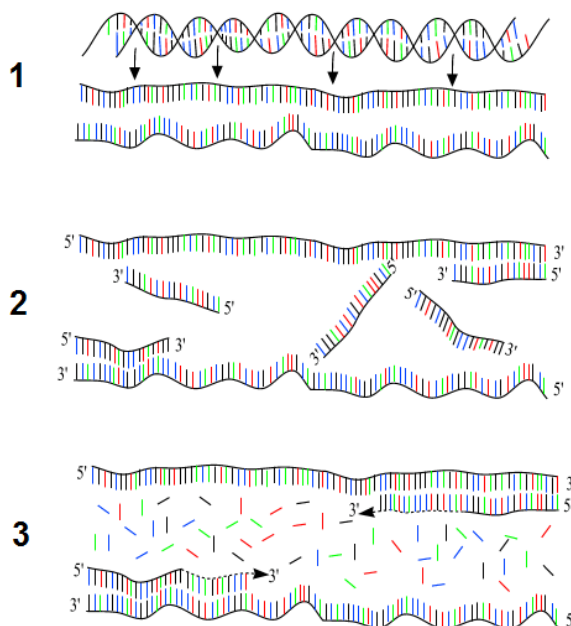
Jednou z nejvyužívanějších metod současné molekulární biologie je PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce). Většina technik studia DNA markerů se odvozuje právě od této metody. PCR probíhá v podmínkách *in vitro* a principiálně je velmi podobná replikaci DNA *in vivo*.

Polymerázová řetězová reakce je metoda zmnožení určité sekvence DNA. Specifičnost této metody je založena na použití dvou výchozích primerů (nukleotidových sekvencí), které jsou následně hybridizovány s komplementárními sekvencemi paralelních vláken DNA. Výchozí primery pak ohraničují žádanou sekvenci. Ohřevem vzorku DNA dochází k denaturaci (rozpletení dvoušroubovice DNA) a na rozpletený řetězec DNA se naváží primery. DNA polymeráza směrem od primeru navazuje komplementární volné nukleotidy obsažené v reakční směsi a vlákno DNA je tak prodlužováno. Dvě vlákna DNA slouží pak jako matrice pro syntézu nové DNA ze dvou primerů. Opakování cyklů denaturace, připojení primerů k jejich komplementárním sekvencím a prodlužování připojených primerů DNA polymerázou vede k exponenciálnímu množení segmentů DNA o definované délce (Šmarda *et al.*, 2008).

První PCR reakce používaly DNA polymerázu *Escherichia coli*, která však byla v každém denaturačním cyklu teplem nevratně zničena. Náhrada teplotně stabilní DNA polymerázou z *Thermus aquaticus*, organismu, který žije a rozmnožuje se při 70-80°C, tento problém odstranila a umožnila reakci automatisovat. Množit je takto možné sekvence DNA o délce od 50-100 bp až do 2,5 kbp, s tím že metoda dovoluje namnožit a analyzovat DNA z jediné buňky (Murray, 2002). K vizualizaci produktů PCR se využívá například gelová elektroforéza.

Průběh reakce PCR

PCR reakce probíhají v zařízení zvané termocykler, ve kterém se střídají teplotní cykly. Každý cyklus má tři fáze (Obr. 9) (denaturace, annealing a extension). Tento cyklus se opakuje obvykle 25-35x, přičemž množství nasyntetizovaných sekvencí přibývá exponenciální řadou (2^n ; n =počet cyklů). Do reakce se navíc zařazuje počáteční denaturace a závěrečná polymerační reakce (Bártová, 2011).



Obr. 9: Průběh PCR: 1 – denaturace, 2 – annealing, 3 – extension

(http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz staženo dne 28. 12. 2014)

RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) je metoda odvozená od PCR. Narozdíl od PCR však nevyžaduje znalost cílové sekvence DNA. Reakce probíhá díky náhodnému nasedání krátkého oligonukleotidu (primeru) na analyzovanou genomovou DNA. Soubor amplifikovaných úseků je charakteristický pro jednotlivé druhy, variety, odrůdy (Jankovský & Šmerda, 2006).

V dnešní době se již tolik nepoužívá, vzhledem k neopakovatelnosti výsledků.

RT-PCR

RT-PCR (Reverse Transcription PCR – reverzní (zpětná) polymerázová reakce) je modifikovaná technika PCR, určená pro amplifikaci molekul RNA. V prvním kroku je molekula RNA přepsána – reverzně transkribována pomocí enzymu reverzní transkriptázy na molekulu cDNA. Molekula cDNA je poté použita jako templát následné PCR (Ovesná & Drašnarová, 2001).

Real Time – PCR

U Real Time – PCR probíhá amplifikace běžným způsobem jako standardní PCR. Kromě dvojice primerů obsahuje reakční směs navíc specifickou vnitřní sondu (*TaqMan* sonda), která je na 3' konci a 5' konci fluorescenčně značená. Na 3' konci tzv. zhášečem a na 5' konci tzv. reportérem. V době kdy neprobíhá amplifikace zhášeč pohlcuje energii vyzařovanou reportérem. V případě amplifikace dojde k rozštěpení vnitřní sondy, reportér se dostane z dosahu zhášeče a uvolněný fluorescenční signál je zaznamenán přístrojem. Tato metoda je využívána zejména ke kvantitativnímu PCR pro zjištění množství transgenu v biologickém materiálu nebo pro posouzení stupně napadení hostitele patogenem (Caetano-Anollés, 1997).

AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) je technika, která kombinuje postupy jak RFLP tak PCR. Po naštípání genomové DNA restrikčními enzymy se na přečnívající konce vzniklých fragmentů připojí (naligují) specifické adaptéry. Po ligaci následuje PCR s primery komplementárními s adaptéry (Jankovský & Šmerda, 2003).

Mikrosatelity

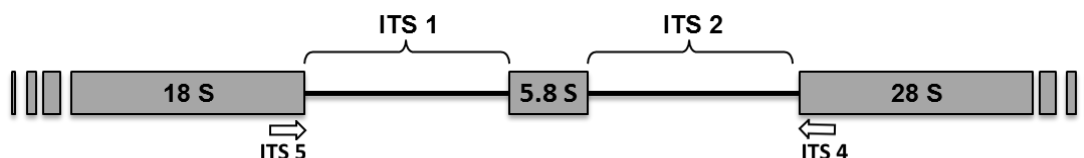
Mikrosatelity (MS; STRs – Short Tandem Repeats nebo SSRs – Simple Sequence Repeats) jsou 2-6 nukleotidové sekvenční motivy v 5-40 opakováních nepřesahující délku 100 párů bází. V důsledku mutací se může snižovat nebo zvyšovat počet opakování (repetic). Po namnožení (amplifikaci) mikrosatelitu pomocí PCR a elektroforetickém rozdělení, se rozdíly v délce fragmentů používají k určení nejrozličnějších parametrů populací i jednotlivých organismů (Jankovský & Šmerda, 2003).

ITS (Internal Transcribed Spacer, vnitřní integrovaný mezerník)

Jednou z nejoblíbenějších sekvencí pro fylogenetické analýzy u entomopatogenních hub je vnitřní transkribovaný mezerník (ITS), region 18S-5,8S-28S jaderného ribozomálního cistronu (Álvarez, 2003).

Jaderný úsek ITS byl stanoven jako doplňkový marker pro skupiny, kde je možné použít přímé sekvenování po provedení amplifikace metodou PCR, tedy bez nutnosti klonování, které by celý postup prodlužovalo a zdražovalo (Záveská-Drábková, 2012).

Geny pro 18S, 5.8S a 28S rRNA jsou u hub navzájem odděleny ITS. Konkrétně mezi 18S a 5.8S rRNA se nachází ITS1 a mezi 5.8S a 28S rRNA se nachází ITS2 (Obr. 11).



Obr. 11: Struktura ITS regionů a pozice primerů, šipky znázorňují přibližnou pozici primerů, využívaných pro PCR amplifikaci.

(http://www.gatc-biotech.com/fileadmin/Kundendaten/Upload_8.0/Bilder/ITS_region_Analysis.png staženo dne 28. 11. 2014, upraveno R. Binder)

ITS odkazuje na nefunkční RNA nacházející se mezi strukturálními ribozomálními RNA (rRNA), dále vykazuje rychlejší evoluci než většina jiných genů a může se tedy značně lišit i mezi blízkce příbuznými druhy. Z tohoto důvodu obsahuje velké množství polymorfických pozic, které jsou primárně způsobeny variabilním počtem jednoduchých opakujících se jednotek mezigenových oblastí. Díky tomuto DNA polymorfismu můžeme organismy rozdělit i do těch nejnižších taxonomických úrovní (Baldwin, 1992; Douglas *et al.*, 2001). Výhodou ITS regionu je, že pro analýzu stačí poměrně malé množství DNA, dále pak její univerzálnost, možnost detekce hybridizace a dostatečná variabilita i uvnitř druhu.

EF 1- α (Elongation Factor, elongační faktor)

Elongační faktory (EF) jsou proteiny, které jsou zapojeny do mechanismu elongace (prodlužování) polypeptidového řetězce vznikajících bílkovin na ribozomu (v průběhu translace). Za určitých okolností se bez nich ribozom obejde, ale za cenu snížené efektivity a přesnosti (Alberts, 1998).

EF1- α je gen, který kóduje protein a je obsažen ve všech eukaryotických organismech. Tento protein se poměrně často vyskytuje v cytosolu, kde se účastní GTP dependentního procesu vázání aminoacyl-tRNA do A místa ribozomu v 2. kroku translace mRNA. Z hlediska taxonomické determinace se jedná o velmi významný marker a to hned z několika důvodů: aminokyselinová sekvence je konzervovaná a umožňuje analýzu druhů v širokém taxonomickém měřítku, dále je umožněna determinace i na druhové úrovni díky diferenciaci na třetích variabilních kodonových pozicích. Některé vlastnosti tohoto molekulárního markeru s sebou ovšem přinášejí i určité komplikace. Přítomnost intronů a degenerace 3. pozice znesnadňují vývoj univerzálních primerů, další komplikací je malý počet kopií (dvě na buňku u diploidních organismů ve srovnání se stovkami až tisíci kopií u mitochondriálních či ribozomálních markerů), který komplikuje amplifikaci. Amplifikace i následné taxonomické analýzy mohou být výrazně zkresleny paralogními kopiemi a heterozygositou. V rámci čeledí také výrazně kolísá výskyt, počet, pozice a délka intronů (Havill *et al.*, 2007).

LSU (Large Subunit, velká ribozomální podjednotka)

Eukaryotické ribozomy se skládají ze dvou podjednotek se sedimentačním koeficientem 60S a 40S. Velká podjednotka má tři molekuly rRNA (28S, 5,8S a 5S), malá podjednotka jednu (18S rRNA) (Lewin, 2000). Jaderné rRNA geny eukaryot jsou umístěny v opakujících se úsecích. Ty jsou spojeny geny pro malou podjednotku (SSU) a velkou jadernou podjednotkou (LSU) (Gerbi, 1985).

Při výběru genu pro sekvenační analýzu pro účely molekulární taxonomie a fylogenetiky je třeba zvažovat v první řadě rychlost molekulární evoluce příslušného genu. Pro vnitrodruhové studie nebo pro studie fylogeneze blízce příbuzných druhů je třeba vybrat geny, pro které je typická vysoká substituční rychlost. V případě, že studujeme druhy, které se odvětovaly před delší dobou, je naopak třeba zvolit geny, které se vyvíjely co nejpomaleji. Pro studium fylogeneze vyšších taxonů velmi často používáme sekvenci genů pro rRNA malé (18S) a velké (28S) ribozomální podjednotky (SSU a LSU rRNA). U eukaryot je substituční rychlost v genu SSU rRNA zhruba o 30% větší než v genu pro LSU rRNA (Flegr, 2007).

Tyto geny ukazují malé rozdíly mezi sekvencemi u velmi podobných druhů, tudíž je metoda velmi úspěšná při fylogenetických studiích zdánlivě příbuzných druhů (Taylor & LoBuglio 1993; Schlötterer *et al.* 1994).

2.4.4 Sekvenování DNA

Na konci sedmdesátých let dvacátého století byly objeveny jednoduché a rychlé metody pro určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA. Bylo vyvinuto několik technik, založených na DNA-polymeráze, která syntetizuje částečné kopie sekvenovaného fragmentu. Princip této techniky spočívá v produkci sady řetězců DNA *in vitro* za podmínek, které zajišťují, že nově vznikající řetězec DNA bude ukončen po dosažení jednoho konkrétního nukleotidu (A, T, C nebo 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 a sekvence původní DNA je čtena na gelu z jejich pořadí (Alberts, 1998).

V roce 1977 vyvinuly dva vědecké týmy nezávisle na sobě první sekvenační metody pod názvy Sangerova a Maxam-Gilbertova metoda.

- **Sangerova metoda** – tato metoda využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, ukončované náhodně v místě jednotlivých bází (Sanger *et al.*, 1977)
- **Maxam-Gilbertova metoda** – při této metodě dochází k chemickému štěpení DNA v místě určitých bází (Maxam & Gilbert, 1977)

Nejčastěji se používá Sangerova metoda, také nazývána dideoxy sekvenování nebo enzymová sekvenace. Tato metoda je založena na použití dideoxyribonukleosidtrifosfátů – derivátů normálních deoxyribonukleosidtrifosfátů postrádajících 3'-hydroxylovou skupinu. DNA je syntetizována *in vitro* ve směsi, která obsahuje jednořetězcové molekuly DNA, která má být sekvenována, enzym DNA-polymerázu, krátký primer DNA, který umožňuje DNA-polymeráze začít replikaci, a čtyři deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Jestliže je do této reakce přidán dideoxyribonukleosidový analog jednoho z nukleotidů, je tento analog začleněn do rostoucího řetězce DNA. V tomto případě však řetězci chybí 3'-hydroxylová skupina, což blokuje přidání dalšího nukleotidu a syntéza tohoto vlákna je ukončena. Ke stanovení kompletní nukleotidové sekvence dvouvláknové DNA je nutné nejprve oddělit oba řetězce a jeden z nich použít jako templát pro

sekvenování. Ve čtyřech oddělených sekvenačních reakcích se stejným jednořetězcovým DNA templátem jsou použity čtyři různé dideoxyribonukleosidtrifosfáty (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Výsledkem každé reakce je sada molekul DNA, která končí na různých místech původní sekvence. Produkty všech čtyř sekvenačních reakcí jsou paralelně vedle sebe elektroforeticky rozděleny v polyakrylamidovém gelu. Nově nasyntetizované fragmenty jsou detekovány radioaktivně nebo fluorescenčně, přičemž označen může být buď primer nebo jeden z deoxyribonukleosidtrifosfátů. V každém sloupci reprezentují proužky fragmenty DNA, které končí vždy stejným druhem nukleotidu, ale v různých pozicích původní DNA. Směrem zdola nahoru poté lze po porovnání všech čtyřech sloupců odečíst sekvenci nově nasyntetizované DNA (Alberts, 1998).

2.4.5 Populační studie

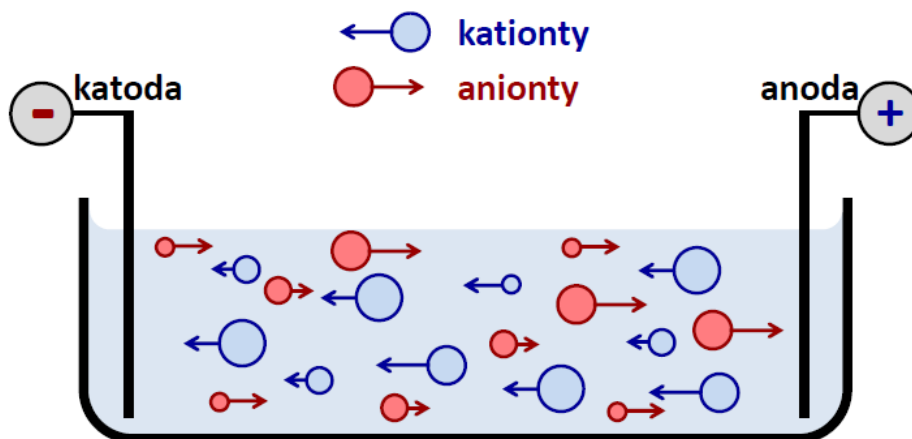
Populační analýza neboli fylogenetická analýza usiluje o rekonstrukci vztahů mezi sekvencemi – je založena na jejich homologii. Informace je prezentována formou fylogenetického stromu, který popisuje v základně (kořeni) stromu předka všech analyzovaných sekvencí a průběh evoluce podél jeho délky, kde větvení představují nejposlednější události. Délka každé větve fylogenetického stromu je složena z času odchylky a stupně evoluce. Delší větve a odchylky bližší kořeni představují starší evoluční jednotky během kolísání ve stupni evoluce (Martínková, 2010).

2.5 Elektroforetické separační metody

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli (Rosypal & Doškař, 1997). Kladně nabité částice (kationty) se pohybují ke katodě a záporně nabité částice (anionty) putují k anodě (Obr. 10).

Různé molekuly mohou být při určitém pH různě nabitě. Nabitě molekuly se pohybují v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu závisí na velikosti a tvaru molekul. Při elektroforéze se využívá rozdílu rychlosti pohybu molekul, s tím že nejrychleji pohybující jsou malé nevětvené molekuly.

Na vhodném podkladu lze pak různé molekuly od sebe elektroforeticky oddělit a tak stanovit, zda se hledaná látka ve vzorku vyskytuje popřípadě v jakém množství. Jednotlivé látky lze poté i izolovat (část gelu se s danou látkou oddělí) (Berger, 1996).



Obr. 10: Pohyb kladně a záporně nabitých iontů (Šiman, 2013)

Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Separace molekul je založena na gelové filtraci a na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Gel tvoří trojrozměrnou síť s póry, které slouží jako molekulové síto (Voet & Voet, 1995). Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin či bílkovin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Polyakrylamid s agarózou vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivňovat složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózovým gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od několika set bp až po zhruba 50 kb, zatímco polyakrylamidové gely se používají k separaci menších molekul (10-1000 bp) (Rosypal & Doškař, 1997).

3. CÍLE PRÁCE

- Porovnání výsledků morfologických charakteristik a molekulárních analýz vzorků entomopatogenních hub na monitorovaném území NP Šumava.
- Analýza sbírkových kmenů pro validaci taxonomického zařazení.
- Potvrzení vlastních výsledků po sekvenační analýze zkoumaných úseků porovnáním s výsledky uvedených v databázi NCBI a jejich statistické vyhodnocení.

Předpokladem této práce bylo potvrzení taxonomického zařazení, na druhové úrovni, dle morfologických charakteristik. Tímto potvrzením se bude moci ověřit či vyvrátit výskyt entomopatogenní houby *Beauveria caledonica* na území NP Šumava, potažmo celé České republiky. Na základě molekulárních analýz budou získány sekvence souboru vzorků Bba a Bca. Tyto sekvence ze sekvenačních analýz budou porovnány s referenčními vzorky z databáze NCBI. Tímto porovnáním se zajistí správné taxonomické zařazení zkoumaných vzorků.

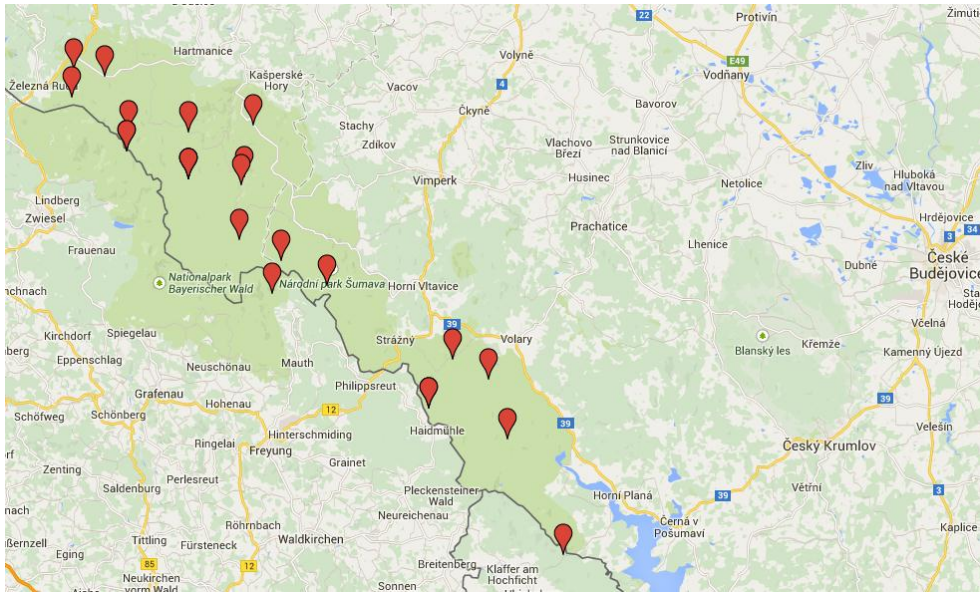
4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

V rámci mé diplomové práce byl použit materiál (Tab. 1) dodaný Oddělením rostlinolékařství, Katedry speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.). Monitoring probíhal na území NP Šumava v rozmezí let 2008 a 2010. Bylo sesbíráno 22 vzorků v různých lokalitách (Obr. 12) a jako zdroj odběru byli dospělci lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) a kůra smrkových stromů. Pro tuto analýzu byly použity entomopatogenní houby rodu *Beauveria*. Vzorky byly dle druhových morfologických charakteristik určeny jako *B. bassiana* a *B. caledonica*.

Označení	Označení ve sbírce	Místo sběru	Zdroj	Morf. určení
Bba_118	NP 0218	N49 07.493 E13 55.589	dospělec	<i>B. bassiana</i>
Bba_222	NP 0097	N49 00.367 E13 30.054	kůra TBM	<i>B. bassiana</i>
Bba_223	NP 0142	N49 05.880 E13 26.146	dospělec	<i>B. bassiana</i>
Bba_224	NP 0238	N49 04.664 E13 21.794	dospělec	<i>B. bassiana</i>
Bba_225	NP 0241	N49 03.605 E13 26.133	dospělec	<i>B. bassiana</i>
Bca_27	NP 0107	N48 58.662 E13 32.795	dospělec	<i>B. caledonica</i>
Bca_28	NP 0156	N48 43.684 E13 57.279	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_29	NP 0232	N49 07.645 E13 16.701	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_30	NP 0230	N49 04.664 E13 21.794	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_31	NP 0155	N48 52.241 E13 50.903	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_32	NP 0163	N48 53.611 E13 47.500	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_33	NP 0165	N49 02.998 E13 30.944	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_34	NP 0131	N48 50.736 E13 45.961	dospělec	<i>B. caledonica</i>
Bca_35	NP 0162	N48 49.136 E13 52.457	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_36	NP 0242	N49 03.605 E13 26.133	dospělec	<i>B. caledonica</i>
Bca_37	NP 0235	N49 06.431 E13 21.093	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_38	NP 0188	N49 08.339 E13 17.394	dospělec	<i>B. caledonica</i>
Bca_39	NP 0227	N48 58.436 E13 33.732	dospělec	<i>B. caledonica</i>
Bca_40	NP 0179	N48 57.322 E13 36.293	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_41	NP 0164	N48 50.736 E13 45.961	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_42	NP 0210	N49 09.558 E13 16.803	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bca_43	NP 0180	N49 06.050 E13 31.247	kůra TBM	<i>B. caledonica</i>
Bbr_617		Francie	ARSEF	<i>B. brongniartii</i>
Bca_2567		Skotsko	ARSEF	<i>B. caledonica</i>

Tab. 1: Seznam zkoumaných vzorků



Obr. 12: Lokality sběrů vzorků v NP Šumava

Pro taxonomické určení hub byly použity referenční vzorky ze sbírky ARSEF (The USDA – ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures), konkrétně *B. caledonica* 2567 (země původu Skotsko) a *B. brongniartii* 617 (země původu Francie).

4.2 Izolace entomopatogenních hub

Cílem izolace entomopatogenních hub bylo získání čisté biomasy kmene. Byly použity následující postupy:

- Izolace entomopatogenních hub přímo z povrchu infikovaných dospělců lýkožrouta smrkového – přímý přenos pasáží z povrchu infikovaného hostitele (sterilní inokulační jehla nebo inokulační očko, separační čáry na povrchu agarizovaného živného média - PDA)
- TBM (Tenebrio Bait Method) – postup izolace entomopatogenních hub z kůry smrkových stromů pomocí živých pastí reprezentovaných larvami potměníka moučného (*Tenebrio molitor*) (Landa *et al.*, 2008).

4.3 Kultivace a uchování

Pro namnožení biomasy byly vzorky, po dobu 2 týdnů, kultivovány v Petriho miskách na PDA (Potato Dextrose Agar, Himedia) při 25°C ve tmě. Materiál pro izolaci DNA byl sebrán z misek a uložen při -20°C. Suspenze spor a mycelia byla poté převedena do kryovialek s roztokem 20% glycerolu a 5% Tweenu 80. Tím byly vzorky připraveny na uchovávání s postupným zamrazením na -80°C.

4.4 Izolace DNA ze vzorků

Izolace DNA ze vzorků byla prováděna dle komerčně dostupného kitu DNeasy Plant Mini Kit 250 od firmy QIAGEN (podrobný protokol je uveden v příloze č. 1)

Standardní protokol byl v průběhu provádění experimentu optimalizován v krocích homogenizace a inkubace. Homogenizace byla prováděná za přítomnosti tekutého dusíku a následná inkubace probíhala ve vodní lázni při 55°C. Za těchto modifikovaných podmínek byla získána čistší a koncentrovanější DNA. Přítomnost či nepřítomnost a DNA ve vzorcích byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. DNA byla dále skladována krátkodobě při teplotě 4°C či dlouhodobě v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

4.5 PCR

Amplifikace DNA proběhla metodou PCR. Byly provedeny tři typy analýz, které se lišily dle cílového markeru (ITS, EF 1- α a LSU). Tyto tři regiony byly vybrány pro výjimečné porovnávací vlastnosti při taxonomických studiích. Analýza každého regionu se lišila zastoupením primerů a odlišnostmi v jednotlivých cyklech samotné PCR, která probíhala v termocykleru.

- **Reakce pro ITS region s primery ITS4 a ITS5**

Složení reakce (25 µl)

12,5 µl PPP Master Mixu (Top Bio)

10,9 µl H₂O

1 µl DNA

0,3 µl primer ITS4

0, 3 µl primer ITS5

Použité primery:

ITS5 – 5' – GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G – 3'

ITS4 – 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'

(White *et al.*, 1990)

Cyklus PCR reakce:

1. 94°C – 2 min
2. 94°C – 30 s
3. 63°C – 3 min
4. 72°C – 1 min
5. 72°C – 10 min
6. 4°C – ∞

2. až 4. krok byl opakován 35 x.

- **Reakce pro region EF 1- α s primery 983F a 2218R**

Složení reakce:

12,5 μ l PPP Master Mixu (Top Bio)

10,9 μ l H₂O

1 μ l DNA

0,3 μ l primer 983F

0,3 μ l primer 2218R

Použité primery:

983F – 5' – GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT – 3'

2218R – 5' – ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG – 3'

(Rehner, 2005)

Cyklus PCR reakce:

1. 94°C – 2 min

2. 94°C – 30 s

3. 66°C – 30 s

4. 72°C – 45 s

5. 94°C – 30 s

6. 56°C – 30s

7. 72°C – 45 s

8. 72°C – 30 min

9. 4°C – ∞

2. až 4. krok byl opakován 9 x; v každém cyklu se snížila teplota o 1°C.

5. až 7. krok byl opakován 35 x.

- **Reakce pro LSU region s primery NL1 a NL4**

Složení reakce:

12,5 µl PPP Master Mixu (Top Bio)

10,9 µl H₂O

1 µl DNA

0,3 µl primer NL1

0,3 µl primer NL4

Použité primery:

NL1 – 5' – GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG – 3'

NL4 – 5' – GGT CCG TGT TTC AAG ACG G – 3'

Oborník *et al.*(2001)

Cyklus PCR reakce:

1. 94°C – 5 min
2. 94°C – 1 min
3. 50°C – 1 min
4. 72°C – 1 min a 15 s
5. 72°C – 5 min
6. 4°C – ∞

2. až 4. krok byl opakován 25 x.

4.6 Separace a detekce vzorků

Pro separaci vzorků byla zvolena gelová elektroforéza. Vzorky byly nanесeny na 2% agarózový gel (4 g agarózy na 200 ml TBE) s obsahem barviva ethidium bromid. Následná detekce fragmentů spočívala ve fluorescenčních schopnostech barviva ethidium bromid pod UV zářením. Jednotlivé fragmenty byly z gelu vyříznuty skalpelem.

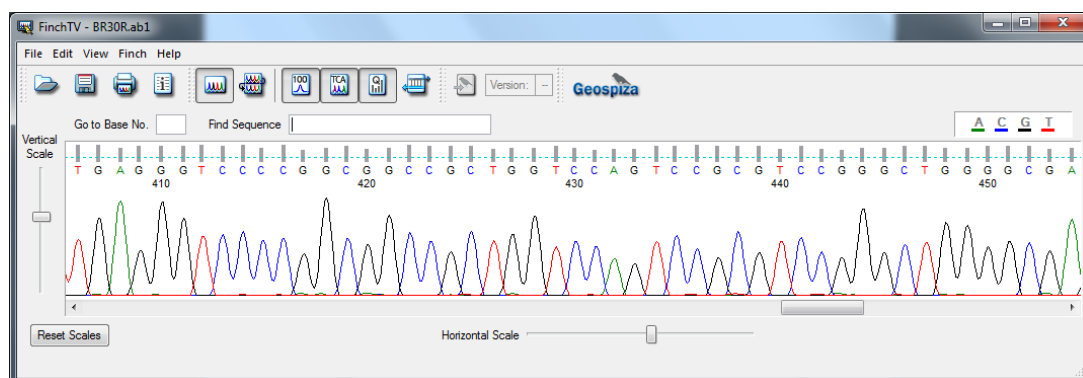
4.7 Úprava vzorků před sekvenováním

Po amplifikaci DNA a vyříznutí fragmentů z agarózového gelu následovalo jejich přečištění. K přečištění byl použit komerčně dostupný kit Invisorb Fragment Cleanup od firmy Stratec (podrobný protokol je uveden v příloze č. 2).

Po této operaci byla DNA připravena k odeslání na sekvenační analýzu.

4.8 Sekvenování

Následně po odeslání materiálu do firmy SEQME, nabízející sekvenační analýzy, nám byly poskytnuty data přesných nukleotidových sekvencí vzorků. Jednotlivé sekvence vzorků se lišily v jednotkách až desítkách bazí. Po obdržení výsledků byly data statisticky vyhodnoceny ve specializovaných programech (Obr. 13).



Obr. 13: Výřez nukleotidové sekvence v programu FinchTV

4.9 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo prováděno v programech:

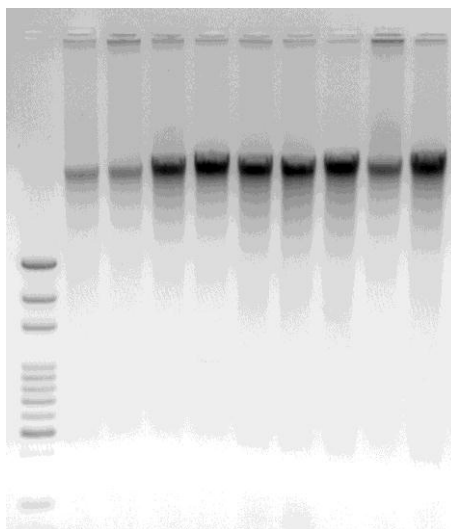
- **FinchTV** – čtení sekvencí, příprava sekvencí na alignment, kontrola správnosti jednotlivých nukleotidů po alignmentu.
- **ClustalW2** – alignment forward a reverse sekvencí.
- **NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** – taxonomické určení druhů rodu *Beauveria* na molekulární úrovni.
- **Geneious** – program na vyhodnocení fylogenetické analýzy (fylogenetických stromů).

5. VÝSLEDKY

5.1 Izolace DNA

Materiál pro izolaci byl uchováván v lednici při teplotě 4°C, v případě dlouhodobějšího uchování v mrazicím boxu o teplotě -20°C. Izolace probíhala dle protokolu viz kapitola 4.4. Izolace byla prováděna v několika opakování s postupným optimalizováním protokolu, konkrétně v bodech homogenizace a inkubace. Po této optimalizaci byla získávána kvalitnější výstupní data.

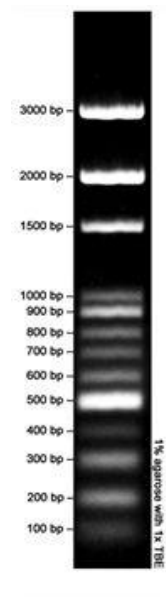
Přítomnost, kvantita i kvalita získané DNA byla po izolaci ověřena pomocí gelové elektroforézy (Obr. 14).



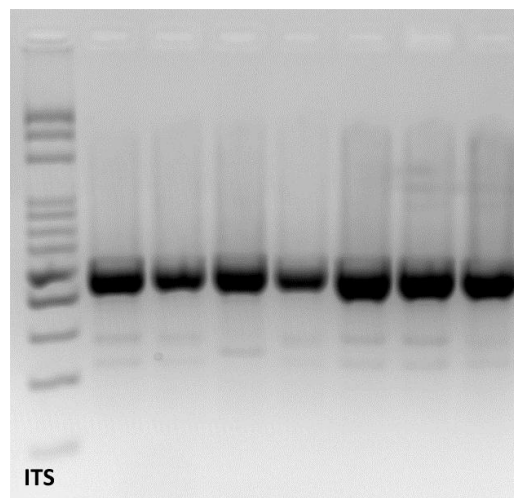
Obr. 14: Kontrola přítomnosti DNA pomocí gelové elektroforézy.

5.2 Gelová elektroforéza

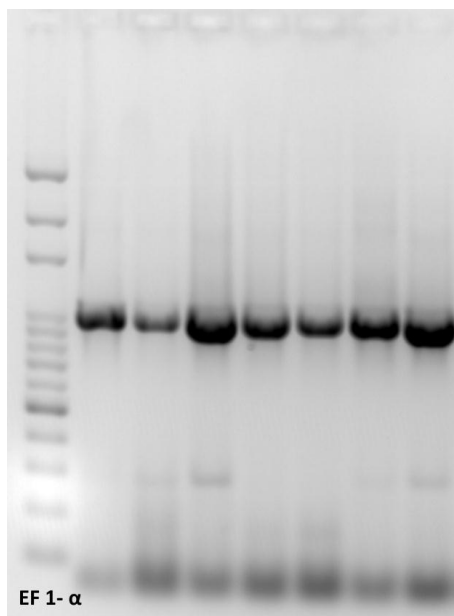
Po dokončení PCR analýz následovala gelová elektroforéza, vizualizace a úprava gelu. Fragmenty z gelu byly následně vyříznuty a přečištěny dle komerčního kitu viz kapitola 4.7.



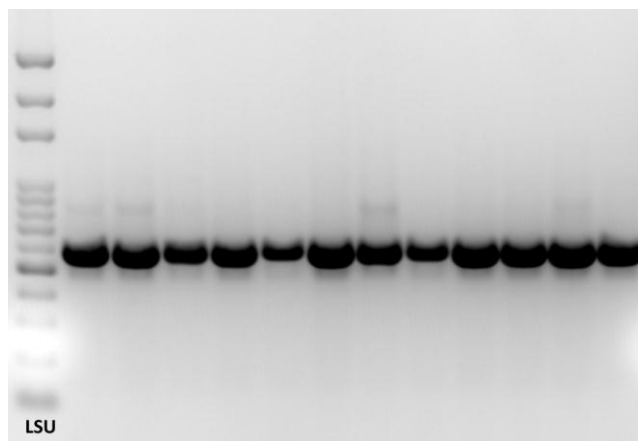
Obr. 15: Velikostní marker, používaný ve všech elektroforetických operacích – DNA molecular weight marker (100 bp ladder), firma Amresco INC.



Obr. 16: Ukázka vizualizace amplifikovaného produktu po PCR reakci ITS s primery ITS5 a ITS4. Amplifikace probíhala u všech 24 vzorků (včetně 2 referenčních vzorků ze sbírky ARSEF). Cílové fragmenty byly o velikosti cca 500 bp. Následné vyříznutí jednotlivých fragmentů bylo provedeno z důvodu nespecifické amplifikace.



Obr. 17: Ukázka vizualizace amplifikovaného produktu po PCR reakci EF 1- α s primery 983F a 2218R. Amplifikace probíhala u všech 24 vzorků (včetně 2 referenčních vzorků ze sbírky ARSEF). Cílové fragmenty byly o velikosti cca 1000 bp. Následné vyříznutí jednotlivých fragmentů bylo provedeno z důvodu nespecifické amplifikace.



Obr. 18: Ukázka vizualizace amplifikovaného produktu po PCR reakci LSU s primery NL1 a NL4. Amplifikace probíhala u všech 24 vzorků (včetně 2 referenčních vzorků ze sbírky ARSEF). Cílové fragmenty byly o velikosti cca 600 bp. Následné vyříznutí jednotlivých fragmentů bylo provedeno z důvodu nespecifické amplifikace.

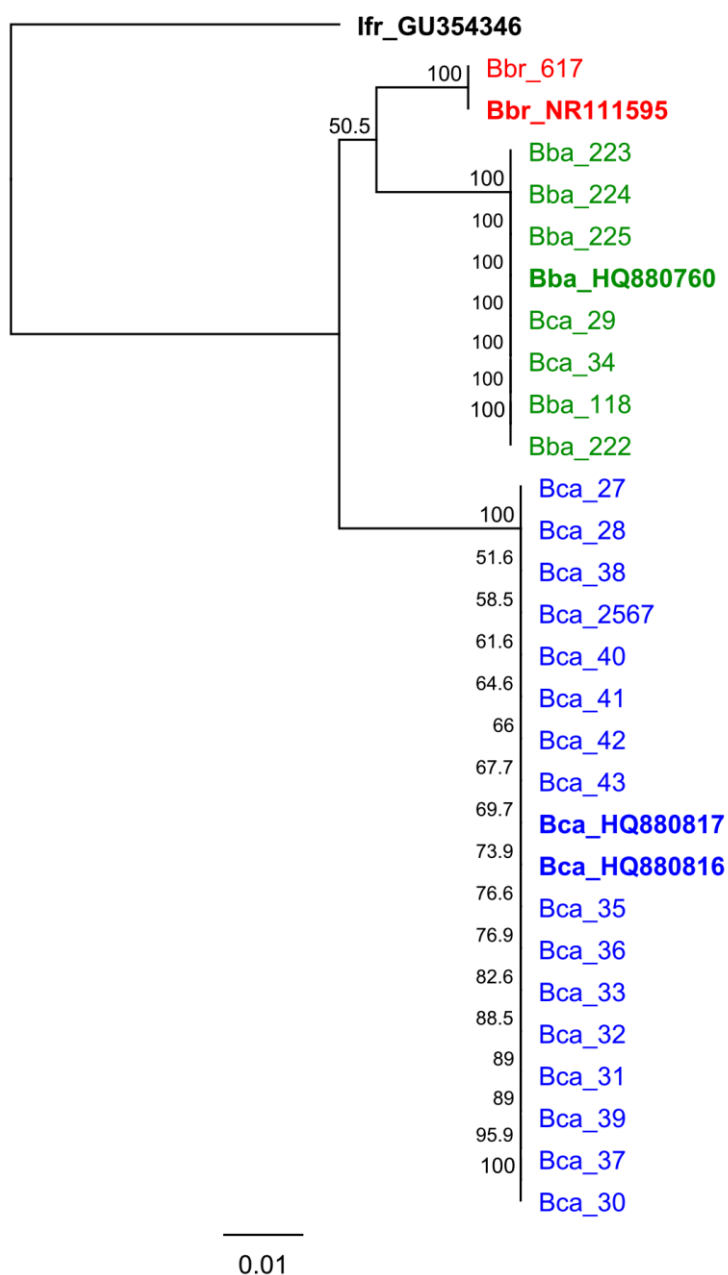
5.3 Fylogenetická analýza

Výsledným produktem fylogenetické analýzy jsou následující fylogenetické stromy. Pro každý ze tří typů PCR reakcí je uváděn jeden strom. Mimo referenční vzorky a zkoumané vzorky, morfologicky příbuzné na druhové úrovni, byly do analýzy přidány také data nepříbuzného druhu houby *Isaria fumosorosea* za účelem vytvoření tzv. kořenu.

Níže uvedené fylogenetické stromy (Obr. 19, 20, 21) jsou výsledným produktem sekvenačních analýz tří odlišných regionů (ITS, EF 1- α , LSU). Z výsledků analýzy je patrné, že byl základní soubor dat rozdělen na čtyři skupiny:

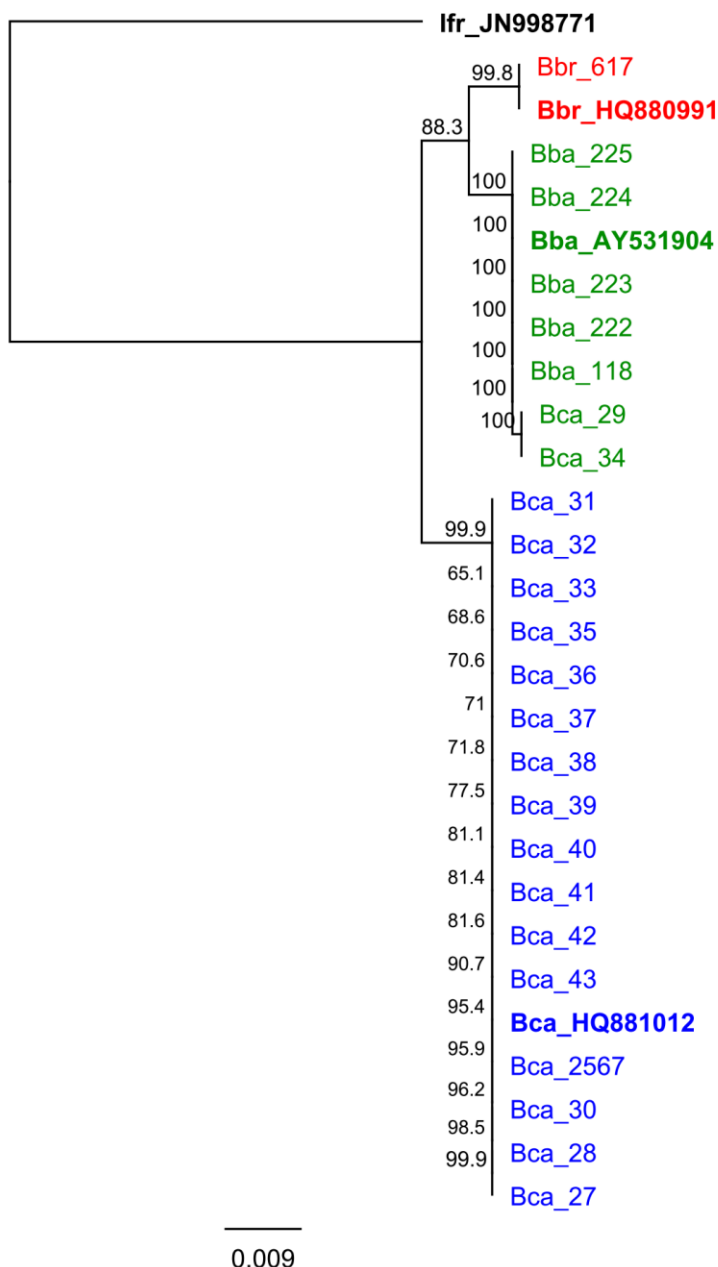
- **Skupina I** – kořen, který je zastoupen vzorkem *Isaria fumosorosea*
- **Skupina II** – soubor charakteristický pro *Beauveria brongniartii*
- **Skupina III** – soubor charakteristický pro *Beauveria bassiana*
- **Skupina IV** – soubor charakteristický pro *Beauveria caledonica*

Fylogenetický strom vzorků určených morfologickými charakteristikami jako *Beauveria bassiana* a *B. caledonica*, získaný na základě analýzy sekvenčních dat ITS regionu a porovnání se sekvencemi referenčních vzorků z NCBI databáze je zobrazen na Obr. 19. Jako kořen byl zvolen vzorek *Isaria fumosorosea* GU354346 (na stromu označen černě). *B. Brongniartii* je na stromu vyznačena červeně, *B. bassiana* zeleně a *B. caledonica* modře. Referenční vzorky jsou zvýrazněny tučným písmem.



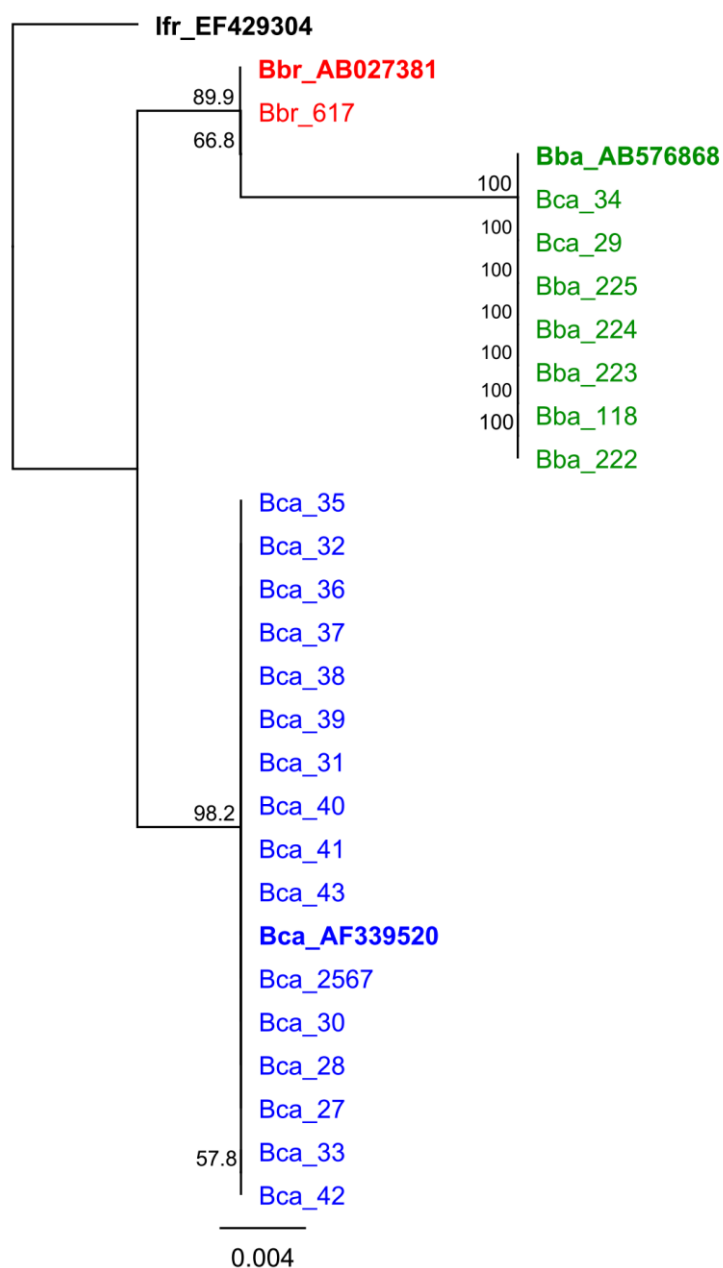
Obr. 19: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining obsahující 26 izolátů *Beauveria* spp. a jeden izolát *Isaria fumosorosea*. Metoda vychází ze sekvenčních analýz úseku ITS regionu. Bootstrap hodnota=1000 replicates.

Fylogenetický strom vzorků určených morfologickými charakteristikami jako *Beauveria bassiana* a *B. caledonica*, získaný na základě analýzy sekvenčních dat regionu EF1- α a porovnání se sekvencemi referenčních vzorků z NCBI databáze je zobrazen na Obr. 20. Jako kořen byl zvolen vzorek *Isaria fumosorosea* JN998771 (na stromu označen černě). *B. Brongniartii* je na stromu vyznačena červeně, *B. bassiana* zeleně a *B. caledonica* modře. Referenční vzorky jsou zvýrazněny tučným písmem.



Obr. 20: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining obsahující 25 izolátů *Beauveria* spp. a jeden izolát *Isaria fumosorosea*. Metoda vychází ze sekvenčních analýz úseku regionu EF1- α . Bootstrap hodnota=1000 replicates.

Fylogenetický strom vzorků určených morfologickými charakteristikami jako *Beauveria bassiana* a *B. caledonica*, získaný na základě analýzy sekvenčních dat regionu LSU a porovnání se sekvencemi referenčních vzorků z NCBI databáze je zobrazen na Obr. 21. Jako kořen byl zvolen vzorek *Isaria fumosorosea* JN998771 (na stromu označen černě). *B. Brongniartii* je na stromu vyznačena červeně, *B. bassiana* zeleně a *B. caledonica* modře. Referenční vzorky jsou zvýrazněny tučným písmem.



Obr. 21: Fylogenetický strom vytvořený metodou Neighbour-joining obsahující 25 izolátů *Beauveria* spp. a jeden izolát *Isaria fumosorosea*. Metoda vychází ze sekvenčních analýz úseku regionu LSU. Bootstrap hodnota=1000 replicates.

Výsledky fylogenetické analýzy tedy vyvrátily původní taxonomické označení zkoumaných entomopatogenních hub. Toto označení bylo založené na biologických a morfologických vlastnostech hub a ukázalo se jako nesprávné ve dvou z dvaceti dvou případů. Na základě výsledků analýzy byl potvrzen vůbec první výskyt entomopatogenní houby *B. caledonica* nejen v NP Šumava, ale i v celé České republice.

Z následující tabulky lze vyčíst původní taxonomické určení entomopatogenních hub rodu *Beauveria* založené na morfologických vlastnostech hub a určení nové, které je založeno na metodách molekulárních markerů.

Označení	Morf. určení	Určení na základě MM
Bba_118	<i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Bba_222	<i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Bba_223	<i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Bba_224	<i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Bba_225	<i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Bca_27	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_28	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_29	<i>B. caledonica</i>	<i>B. bassiana</i>
Bca_30	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_31	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_32	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_33	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_34	<i>B. caledonica</i>	<i>B. bassiana</i>
Bca_35	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_36	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_37	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_38	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_39	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_40	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_41	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_42	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>
Bca_43	<i>B. caledonica</i>	<i>B. caledonica</i>

Tab. 2: Určení zkoumaných vzorků dle morfologických charakteristik a dle metod molekulárních markerů (MM).

6. DISKUSE

Rehner *et al.* (2011) ve své studii uvedli, že rod *Beauveria* je charakterizován kulovitými do baňky tvarovanými konidiogenními buňkami, ze kterých vyúsťují jednobuněčné, terminální holoblastické konidie v úzké apikální prodloužení zvané rachis. Druhy *Beauveria* se z morfologického hlediska rozlišují hlavně podle charakteristik konidií, které jsou typicky tenkostěnné a hyalinní. Velikost je v rozmezí 1,5-5,5 μm a mají kulovitý, cylindrický nebo červovitý tvar. Dále Rehner & Buckley (2005) uvedli, že i přesto, že je rod *Beauveria* dostatečně morfologicky odlišný na rodové úrovni, na úrovni druhové je odlišení jednotlivých druhů kvůli strukturní jednoduchosti a nedostatku rozlišovací fenotypové variace velmi obtížné. Určování druhů na základě biologických a morfologických vlastností využívajících se k identifikaci zástupců rodu *Beauveria* se tedy jeví jako ne vždy úplně přesné a ke kompletnímu přesnému určení je vhodné tuto metodu doplnit o metody využívající molekulární markery.

Podobnou problematikou se zabýval D'Alessandro *et al.* (2014) u rodu *Isaria*. Morfologicky (dle cylindrických konidií) se jeví *B. caledonica* velmi podobná *B. brongniartii*, avšak Glare & Inwood (1998) a Rehner & Buckley (2005) ve svých studiích prokázali fylogenetickou odlišnost těchto druhů na molekulární úrovni.

Velmi důležitým krokem v této studii bylo zajištění vstupního materiálu, odpovídající kvantitativně a hlavně kvalitativně, pro následující operace. Tímto materiálem je myšlena vysoce kvalitní DNA, která byla ze získaných vzorků hub extrahována. Například Enkerli & Widmer (2009) konstatovali, že extrakce vysoce kvalitní DNA je velice důležitou součástí molekulární analýzy entomopatogenních hub. V mé práci byla zvolena metoda extrakce podle komerčně dostupného kitu DNeasy Plant Mini Kit 250 od firmy QIAGEN. Extrakci dle tohoto komerčního kitu uvedl ve své práci například i Castrillo *et al.* (2010).

Standardní protokol extrakce DNA byl v průběhu provádění experimentu optimalizován v krocích homogenizace a inkubace. Homogenizace byla prováděna za přítomnosti tekutého dusíku a následná inkubace probíhala ve vodní lázni při 55°C. Za těchto modifikovaných podmínek byla získána čistší a koncentrovanější DNA.

V této studii bylo na základě metod molekulárních markerů taxonomicky určeno 22 vzorků entomopatogenních hub rodu *Beauveria*, které byly sebrány na území NP Šumava. V rámci této studie byly molekulárními analýzami určeny druhy *B. bassiana* a *B. caledonica*. Určením druhu *B. caledonica* byl zároveň potvrzen její první oficiální výskyt v NP Šumava, potažmo v celé České republice. U morfologického rozlišení druhů *B. bassiana* a *B. caledonica* se využívá zejména morfologických odlišností ve tvaru a velikosti konidií. Rozlišení druhů *B. bassiana* a *B. caledonica* na základě odlišnosti morfologických znaků se jeví jako ne zcela jednoduché a stoprocentně přesné. Díky vysokému DNA polymorfismu jednotlivých použitých regionů bylo možné, na druhové úrovni, zkoumané houby rodu *Beauveria* s přesností určit. U všech tří využívaných lokusů (ITS, EF1- α a LSU) se jednotlivé sekvence druhů *B. bassiana* a *B. caledonica* lišily v přibližném počtu desítek bazí.

Schoch *et al.* (2012) udává, že region vnitřního integrovaného mezerníku (internal transcribed spacer, ITS) jaderné ribozomální DNA je formální DNA barcoding region (barcode=čárový kód) pro identifikaci hub na molekulární úrovni.

Rehner & Buckley (2005) vydali studii, kde za použití sekvenačních analýz regionu ITS provedli molekulární fylogenetickou analýzu na souboru vzorků patřících do rodu *Beauveria*. Na základě této studie byly jednotlivé izoláty hub rozděleny na druhy *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorpha*, *B. caledonica* a *B. vermiconia*. V mé práci byly tímto způsobem analyzovány druhy *B. bassiana*, *B. brongniartii* a *B. caledonica*.

Pro potvrzení výsledků metody sekvenační analýzy ITS regionu byla má studie doplněna ještě o další dvě metody – sekvenační analýzu regionu EF1- α a regionu LSU.

Rehner *et al.* (2011) ve své studii popsal dalších sedm druhů rodu *Beauveria* na základě použití molekulárních metod využívajících jaderný intergenový region Bloc a tři jaderné protein-kódující geny – EF1- α , RPB1 a RPB2.

Právě metoda sekvenační analýzy regionu EF1- α byla další použitou metodou v mé studii. Amplifikace DNA fragmentu byla provedena za přítomnosti primerů 983F a 2218R. Stejnou metodu využil u rodu *Isaria* například D'Alessandro *et al.* (2014). Tato metoda potvrdila výsledky metody sekvenační analýzy ITS regionu.

Wang *et al.* (2003) popisuje způsob haplotypizace detekcí přítomnosti či absence skupiny I intronů pro použití v populační studii entomopatogenní houby *B. bassiana*. V této studii využívá velkou ribozomální podjednotku (LSU) 28S rDNA.

Metoda sekvenční analýzy regionu velké ribozomální podjednotky (LSU) byla vybrána jako třetí a poslední ověřovací metoda.

Taylor & LoBuglio (1993) a Schlötterer *et al.* (1994) uvádí, že geny velké ribozomální podjednotky vykazují malé rozdíly mezi sekvencemi u velmi podobných druhů, tudíž je metoda velmi úspěšná při fylogenetických studiích zdánlivě příbuzných druhů. Metoda sekvenční analýzy regionu LSU potvrdila výsledky předcházejících metod použitých v této práci.

Na základě výsledků analýzy sekvencí LSU je určení druhu *B. caledonica* v NP Šumava potvrzeno již třetím molekulárním markerem. Interpretace dat analyzovaného úseku LSU rDNA má stejný charakter výsledků jako obě předchozí metody (ITS a EF1- α) není tedy pochyb o přítomnosti *B. caledonica* v NP Šumava.

Glare *et al.* (2008) ve své práci uvedl, že entomopatogenní houba *B. caledonica* má potenciál proti škůdcům z řádu brouci (*Coleoptera*). Dále uvádí, že ve Velké Británii *B. caledonica* kolonizuje významné škůdce v oblasti lesnictví, konkrétně *Hylobius abietis*, který je vážný škůdce smrkových a borových stromů.

V lokalitě NP Šumava byly vzorky *B. caledonica* odebrány z uhynulých dospělců *Ips typographus*, čímž byla potvrzena jejich patogenita vůči tomuto významnému lesnímu škůdci. Vedle biopesticidních přípravků na bázi *B. bassiana* je zde možnost potenciálního využití právě druhu *B. caledonica*.

7. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo porovnat morfologické analýzy s molekulárními analýzami vzorků entomopatogenních hub získaných z lokality NP Šumava. Dále pak na základě metod molekulárních markerů potvrdit výskyt entomopatogenní houby *Beauveria caledonica*, jejíž výskyt v České republice nebyl doposud zaznamenán.

Vzorky entomopatogenních hub z oblasti NP Šumava, dodané Oddělením rostlinolékařství, Katedry speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.), byly určeny, dle morfologických charakteristik, jako *B. bassiana* a *B. caledonica*. Tento soubor vzorků byl podroben sekvenačním analýzám tří odlišných regionů (ITS, EF1- α , LSU). Na základě výsledků těchto molekulárních analýz byly vyhotoveny fylogenetické stromy, které vedly k přesnému taxonomickému určení jednotlivých vzorků.

Metody sekvenačních analýz regionů ITS, EF1- α a LSU se v rámci této studie ukázaly jako vhodné.

Při porovnání metod založených na morfologických vlastnostech a na metodách molekulárních markerů, se určení, dle morfologické charakteristiky jednotlivých druhů, ukázalo jako nesprávné ve dvou z dvaceti dvou případech. Dle porovnání výsledných sekvencí se sekvencemi uvedených v databázi NCBI, bylo u vzorků Bca_29 a Bca_34 potvrzeno určení *B. bassiana* místo *B. caledonica*.

Určením druhu *B. caledonica* v NP Šumava se potvrdil první oficiální výskyt tohoto druhu entomopatogenní houby v NP Šumava, potažmo v celé České republice.

Hypotézou bylo potvrzení taxonomického zařazení na úrovni druhu dle morfologických charakteristik. Tato hypotéza byla potvrzena. Pomocí MM je možné verifikovat a upřesnit morfologickou klasifikaci a u nesprávně či sporně určených vzorků použít MM pro jejich správné určení. To se ukázalo na studovaném souboru, kdy dvacet z dvaceti dvou analyzovaných vzorků bylo správně morfologicky určeno a MM potvrdily tuto klasifikaci.

8. ZDROJE

ALBERTS, B. (1998): Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902906-2-0.

ÁLVAREZ, I. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]., vol. 29, issue 3, s. 417-434 [cit. 2015-03-22]. DOI: 10.1016/s1055-7903(03)00208-2.

AUNG, O. M., SOYTONG, K. & HYDE, K. D. (2008): Diversity of entomopathogenic fungi in rainforests of Chiang Mai Province, Thailand. *Fungal Diversity*, Vol. 30, (May 2008), pp. 15-22, ISSN 1560-2745.

BALDWIN, B. G. (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositaogy. *Mol. Phyl. Evol.* 1, pp. 3–16.

BARR, D. J. S. (2001): Chytridiomycota. In *Systematics and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 93-112.

BARTOŠ, M. (2007): Metodiky stanovení genových polymorfismů. *Farmakogenomika* [online]. [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: <http://farmakogenomika.cz/index.php?kapitola=9&podkapm=91>

BÁRTOVÁ, E. (2011): PCR (polymerázová řetězová reakce). *Molekulární biologie* [online]. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz

BERGER, J. (1996): Buněčná a molekulární biologie. 1. vyd. Havlíčkův Brod: Tobiáš. ISBN 8085808420.

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

BISSET, J. & WIDDEN, P. (1988): A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. *Canadian Journal of Botany* 66: pp. 349-360.

BRIDGE, P. D., CLARK, M. S. & PEARCE D.A. (2005): A new species of *Paecilomyces* isolated from the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus*. *Mycotaxon*, Vol. 92, (April-June 2005), pp. 213-222, ISSN 0093-4666.

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.

CASTRILLO, L. A., L. S. BAUER, H. LIU, M. H. GRIGGS & J. D. VANDENBERG (2010): Characterization of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) isolates associated with *Agrilus planipennis* (Coleoptera. Biological Control [online]., vol. 54, issue 2, pp. 135-140 [cit. 2015-04-16]. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2010.04.005.

COOPER, R. D. & SWEENEY, A. W. (1986): Laboratory studies on the recycling potential of the mosquito pathogenic fungus *Culicinomyces clavisporus* Journal of invertebrate pathology, 48(2), pp. 152-158.

D'ALESSANDRO, C. P., L. R. JONES, R. A. HUMBER, C. C. L. LASTRA & D. R. SOSA-GOMEZ (2014): Characterization and phylogeny of *Isaria spp.* strains (Ascomycota: Hypocreales) using ITS1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. Journal of Basic Microbiology [online]., vol. 54, S1, S21-S31 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1002/jobm.201300499. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201300499>

DIRLBEKOVÁ O., NESRSTA M., DIRLBEK J. & JEDLIČKA M. (1991): Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (I. *Deuteromycetes*, *Beauveria bassiana*, [Bals.] Vuill.), Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha, pp. 52.

DOUGLAS, L. J. & HAYMER, D. S. (2001): Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 94, pp. 726-731.

EDWARDS, S. (2002): The Mycota XI. Agricultural Applications edited by F. Kempen. pp. 388. ISBN 3-540-42628-0 (hardback). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. ISBN 10.1017/s0269915x0422420x.

EILENBERG J., HAJEK A., LOMER C. (2001): Suggestions for unifying the terminology in biological control. Biocontrol 46: pp. 387–400

EILENBERG, J., SCHMIDT, N. M., MEYLING, N. & WOLSTED, C. (2007): Preliminary survey for insect pathogenic fungi in Arctic Greenland. IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 30, No. 1, pp. 12, ISSN 1027-3115.

EKESI, S. & N. K. MANIANIA (2007): Use of entomopathogenic fungi in biological pest management. Kerala, India: Research Signpost, xiv, 333 p. ISBN 81-308-0192-2.

ENKERLI, J. & WIDMER, F. (2009): A PCR-based tool for the cultivation – independent monitoring of *Pandora neoaphidis*, PATHOL 99: pp. 49-56

FARIA, M. R. & WRAIGHT, S. P. (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* 43, 237–256.

FLEGR, J. (2007): Molekulární fylogenetika. [online]. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~flegr/dokumenty/>

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., REAY S. D., NELSON T. L., MOORE R. (2008): *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. *Mycol Res* 112: pp. 352–360

GLARE, T. R. & INWOOD, A. J. (1998): Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research*, v.102, p.250-256.

GUL, H. T., S. SAEED & F. Z. A. KHAN (2014): Entomopathogenic Fungi as Effective Insect Pest Management Tactic: A Review., roč. 1, č. 1.

HAJEK, A. E (2004): *Natural enemies: an introduction to biological control*. New York: Cambridge University Press, xv, 378 p. ISBN 05-216-5385-1.

HAVILLI, N. P., FOOTIT, R. G., von DOHLEN, C. D. (2007): Evolution of host specialization in *Adelgidae* (*Insecta: Hemiptera*) inferred from molecular phylogenetics. *Mol. Phylog. Evol.*,44: pp. 357-370.

JANKOVSKÝ, L. & ŠMERDA, J. (2006): Aplikace molekulární biologie v lesnictví - molekulární markery. *Lesnická práce*. sv. 82, č. 1, pp. 32-33. ISSN 0322-9254.

KALINA, T. & VÁŇA, J. (2005): *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha : Karolinum. 606 s. ISBN 80-246-1036-1.

KHANG, C. H. & VALENT, B. (2010): *Magnaporthe oryzae* and rice blast disease. In: *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. (eds. K. Borkovich, D. Ebbole, and M. Momany) ASM Press, Washington D.C., pp. 593-606.

KLINGEN, I., EILENBERG, J. & MEADOW, R. (2002). Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Vol. 91, No. 2-3, (November 2002), pp. 191–198, ISSN 0167-8809.

KOUBOVÁ, D. (2009): Využití hub v biologické ochraně rostlin proti škůdcům. [online]. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=91063&ids=3816>

LANDA, Z., A. BOHATÁ. & M. KALISTA (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Ekonomická fakulta, Ediční středisko. ISBN 978-80-7394-149-9.

LANDA, Z., Z. KŘENOVÁ & O. VOJTĚCH (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému.. Lesnická práce [online]. [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.silvarium.cz/lesnicka-prace-c-10-07/vyuziti-houby-beauveria-bassiana-v-ochrane-proti-lykozroutu-smrkovemu>

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

LI, Z., C. LI, B. HUANG, M. FAN, L. DEVOTTO & R. A. HUMBER (2001): Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. Chinese Science Bulletin., vol. 46, issue 9, pp. 751-753. DOI: 10.1007/BF03187215. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03187215>

LO (2012): Forest ecosystems: more than just trees. Edited by J. A. Blanco and Yueh-Hsin. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. ISBN 978-953-5102-021.

MARTÍNKOVÁ, N. (2010): Analýza DNA sekvencí. Analýza genomických a proteomických dat [online]. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://telemedicina.med.muni.cz/genomic-proteomic-analysis/index.php?pg=e-learning--2-analyza-dat--2-2-analyza-vysokopokryvnych-genomickyh-dat--2-2-2-analyza-dna-sekvenci>

MAXAM A. & GILBERT W. (1977): A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A;74(2): pp. 560–564.

MEYLING N. V. & EILENBERG J. (2007): Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate 47 agroecosystems: Potential for conservation biological control, Biological Control 43: pp. 145 – 155.

MEYLING N. V., THORUP-KRISTENSEN K., EILENBERG J. (2011): Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping systems. Biol Control 59:pp. 180–186

MURRAY, R. K. (2002): Harperova biochemie: a LANGE medical book. 23. vyd. Jinočany: H H, ix, [3], 872 s. ISBN 80-731-9013-3.

Mycobank (2014)

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=14682616000000063&Rec=7938&Fields=All>. Dostupné 4. ledna 2015

NIELSEN, C., JENSEN, A. B, EILENBERG, J. (2008): Survival of entomophthoralean fungi infecting aphids and higher flies during unfavorable

conditions and implications for conservation biological control. In: Ekesi, S., Maniania, N.K. (Eds.), Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. Research SignPost, Kerala, India, pp. 13–38.

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

ONDŘEJ J., M. & DROBNÍK, J. (2002): Transgenozie rostlin. Academia. Praha.

OVESNÁ J. & DRAŠNAROVÁ Z. (2001): Identifikace transgenů v rostlinách, semenech a odvozených produktech. Osivo a sadba – V. odborný a vědecký seminář, Praha.

PHAM, T. A., J. J. KIM, S. G. KIM & K. KIM (2009): Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. Mycobiology., vol. 37, issue 3, pp. 218-. DOI: 10.4489/MYCO.2009.37.3.218. Dostupné z: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4489/MYCO.2009.37.3.218>

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

REHNER, S. 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.

REHNER, S. A., A. M. MINNIS, G.-H. SUNG, J. J. LUANGSA-ARD, L. DEVOTTO & R. A. HUMBER (2011): Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia. 2011-09-07, vol. 103, issue 5, pp. 1055-1073. DOI: 10.3852/10-302. Dostupné z: <http://www.mycologia.org/cgi/doi/10.3852/10-302>

ROSYPAL, S. & J. DOŠKAŘ (1997): Úvod do molekulární biologie. 2. rozšíř. vyd. Brno: Rosypal, pp. 560 - 839.

ŘEPKOVÁ, J., RELICHOVÁ, J. (2001): Genetika rostlin. Vyd.1., Masarykova univerzita v Brně, Brno.

SAMSON, R. A., H. EVANS & J.-P. LATGÉ (1988): Atlas of entomopathogenic fungi. Utrecht: Wetenschappelijke Uitgeverij Bunge, xi, 187 p. ISBN 90-634-8413-5.

SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74(12), 5463–5467.

SHAH, P. A., PELL, J. K. (2003): Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5-6), pp. 413-423.

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

SCHOCH C. L., SEIFERT K., HUHDORF S. *et al.* (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, pp. 6241–6246.

SUNG G-H, HYWEL-JONES N. L., SUNG J-M, LUANGSA-ARD J. J. ,SHRESTHA B., SPATAFORA J. W. (2007): "Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the *clavicipitaceous* fungi". *Studies in Mycology* 57: pp. 5–59. doi:10.3114/sim.2007.57.01. PMC 2104736.

ŠIMAN, P. (2013): Elektroforéza. In: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové [online]. [cit. 2013-04-04]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/siman/Prednasky/Elfo.pdf>

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

TAYLOR, J. W. & LOBUGLIO, K. F. (1993): *Ascomycete phylogenetics: Morphology and molecules*. *Mycoscience* 35: pp. 109-112.

VANNINEN, I. (1995): Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycological Research*, Vol. 100, No. 1, (January 1996), pp. 93–101, ISSN 1469-8102.

VEGA, F. E. & M. BLACKWELL (2005): *Insect-fungal associations: ecology and evolution*. New York: Oxford University Press, xvii, 333 p. ISBN 01-951-6652-3.

VEY A., HOAGLAND R.E., BUTT T. M. (2001): Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan H, eds. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, UK: CAB International, pp. 311–346.

VOET, D. & J. G. VOET (1995): *Biochemie*. 1. vyd. Přeložil Arnošt Kotyk. Praha: Victoria Publishing, 1325 p. ISBN 8085605449.

VUILLEMIN, P. (1912) *Beauveria*, nouveau genre de Verticillacees, *Bull. Soc. Bot. Frant.*, 59: 34.

WANG, Ch., F. A. SHAH, N. PATEL, Z. LI & T. M. BUTT (2003): Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria*

bassiana. Environmental Microbiology [online]. 2003, vol. 5, issue 10, s. 908-915 [cit. 2015-04-12]. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00485.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1462-2920.2003.00485.x>

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. & 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.

WIDDEN, P. & PARKINSON, D. (1979): Populations of fungi in a high arctic ecosystem. Canadian Journal of Botany, Vol. 57, No. 21, pp. 2408-2417, ISSN 0008-4026.

ZÁVESKÁ-DRÁBKOVÁ, L. (2012): Čárový kód života. Vesmír [online]. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/carovy-kod-zivota>

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Protokol firmy QIAGEN pro izolaci DNA.

DNeasy[®] Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the *DNeasy Plant Handbook*, which can be found at www.qiagen.com/handbooks.

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.
 - Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates.
 - Preheat a water bath or heating block to 65°C.
1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor[®], the TissueLyser, or a mortar and pestle.
 2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.
Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
 3. Add 130 μ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
 4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
 5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
 6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
 7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
 8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flow-through.
 9. Add another 500 μ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
 10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
 11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g.
 12. Repeat step 11.

Příloha č. 2: Protokol pro přečištění DNA Invisorb Fragment CleanUp od firmy Strattec Biomedical.

Protocol 4: Extraction of a DNA-fragment from an agarose gel slice

Please read the instructions carefully and conduct the prepared procedure!

for Invisorb® Spin DNA Extraction Kit and Invisorb® Fragment CleanUp

Important: *TBE-gels contain more potentially inhibitors for down stream application than TAE-gels. So we recommend the use of TAE-gels for critical downstream application!
Before starting with the purification procedure please place a Spin Filter into a 2.0 ml Receiver Tube!*

Attention: *Please be aware, that you have to prepare the Binding Enhancer – see instruction page: 16*

1. Excise the DNA-fragment from the agarose gel with a sharp scalpel. Minimize the agarose gel slice. Check the weight.
For gel slices up to 150 mg add 500 µl Gel Solubilizer S.
For gel slices > 150 mg add 1 ml of Gel Solubilizer S.
Do not use more than 300 mg gel slice for one Spin Filter.
Transfer the gel slice into a 1.5 or 2.0 reaction tube.
2. Incubate at 50°C for 10 minutes until the agarose gel slice is completely dissolved.
Incubation under continuous shaking (e.g. Eppendorf Thermo mixer) is very helpful.
3. Add 250 µl Binding Enhancer to a 500 µl reaction volume or 500 µl Binding Enhancer to a 1 ml reaction volume and mix the suspension by pipetting some times or by vortexing.
Load approx. 800 µl of the sample onto the Spin Filter. Centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 2 minute. Discard the filtrate. For reaction volumes > 800 µl reload the residual volume onto the Spin Filter and repeat the centrifugation step.
4. Add 500 µl Wash Buffer to the Spin Filter and centrifuge for 1 min at 11.000 x g (11.000 rpm)
Discard the filtrate. Repeat the washing step once again.
5. Discard the filtrate. Remove the residual ethanol of the Wash Buffer by centrifugation for 4 min at maximum speed.
6. Transfer the Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube.
Add at least 20 µl Elution Buffer directly onto the center of the Spin Filter.
Incubate at room temperature for 5 minutes. Centrifuge for 1 minute at 11.000 x g (11.000 rpm).

Note: *To increase the final DNA yield we recommend using a higher volume of Elution Buffer. Please take into account that an increasing volume of Elution Buffer reduces the final concentration of the purified DNA.
An extended incubation time with Elution Buffer (up to 10 minutes) leads also to a slightly higher final yield.*