



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Diplomová práce

Molekulární determinace václavek r. *Armillaria*

Autorka práce: Bc. Kateřina Salzmannová

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Václavky patří z hospodářského hlediska mezi významné škodlivé činitele našich lesů, kdy václavky způsobují prosychání smrku, které může přerůst v kůrovcovou kalamitu. Pro určování jednotlivých kmenů fytopatogenních hub klasická morfologická charakteristika neposkytuje dostatečné určení jednotlivých druhů. V současné době je věnována pozornost molekulárním metodám analýz polymorfismu DNA spolu s tradiční morfologickou klasifikací.

V literárním přehledu je popsán rod *Armillaria*. Také jsou zde popsány jednotlivé druhy václavek, které se vyskytují na území ČR, jejich role v chřadnutí smrkových porostů a ochranná opatření proti václavkám. Jsou zde zmíněny molekulární markery používané v identifikaci václavek. Součástí teoretické části je i popis a princip použitých molekulárních metod.

Cílem diplomové práce bylo identifikovat jednotlivé druhy václavek rodu *Armillaria* ze vzorků sbíraných v suchem poškozených lesích v ČR. Molekulární analýza byla provedena podle variability úseku genu translačního elongačního faktoru 1- α (*EF 1- α*).

V praktické části jsou zpracovány vlastní výsledky práce. Pro účely výzkumu bylo vybráno několik lesních lokalit postižených suchem v Moravskoslezském a Olomouckém kraji. Testovaný soubor tvořilo celkem 92 vzorků DNA václavek rodu *Armillaria*. Výsledky potvrdily největší výskyt václavky v. smrkové (66 vzorků). V testovaném souboru byly identifikovány i václavky v. cibulkotřenná (21 vzorků) a v. hlíznatá (5 vzorků). Získaná data byla použita ke konstrukci fylogenetického stromu.

Klíčová slova: *Armillaria*, *EF 1- α* , Basidiomycetes, Tricholomataceae, taxonomie

Abstract

Armillaria species causes economic losses in forestry in the Czech Republic. Combination of drought stress, Armillaria infection and bark beetles (*Ips typographus*) is the main reason on tree mortality in Norway spruce (*Picea abies*) plantation.

The theoretical part describes genus *Armillaria*. There is described the role in Norway spruce mortality and the control of *Armillaria* root rot of trees. Review also includes molecular markers used in *Armillaria* identification and description and principle of methods used in this study.

The aim of this thesis was identification of *Armillaria* species came from drought stressed forests from the Czech Republic. Molecular analysis was based on polymorphisms in the translational elongation factor gene (*EF 1- α*).

The empirical part presents the results of the study. The studied population consisted 92 samples of *Armillaria* DNA came from drought stressed forests. The results confirmed the highest incidence of *Armillaria ostoyae* (66 samples). There were identified also *Armillaria cepistipes* (22 samples) and *Armillaria gallica* (5 samples). The results was used to build phylogenetic tree.

Keywords: *Armillaria*, *EF 1- α* , Basidiomycetes, Trichomataceae, taxonomy

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tomáši Tonkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost. Mé díky patří i Ing. Lucii Křížové za její pomoc a rady během práce v laboratoři.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Václavka (<i>Armillaria</i>)	9
1.1.1 Druhové spektrum václavek v ČR	10
1.1.2 Role václavek v chřádnutí smrkových porostů	15
1.1.3 Ochranná opatření proti václavkám	18
1.2 Molekulární markery v taxonomii a fylogenezi václavek.....	18
1.3 Gen <i>EF 1-α</i>	19
1.4 Použité metody	19
1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
1.4.2 Sangerovo sekvenování.....	21
2 Cíle práce	22
3 Materiál a metodika.....	23
3.1 Sběr vzorků.....	23
3.2 Kultivace vzorků	24
3.3 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP	24
3.4 Polymerázová řetězová reakce	25
3.5 Elektroforéza	26
3.6 Sekvenační analýza	27
3.7 Vyhodnocení sekvencí	27
4 Výsledky	28
4.1 Amplifikace úseku <i>EF 1-α</i> genu.....	28
4.2 Porovnání oblasti genu <i>EF 1-α</i> algoritmem BLAST.....	29
4.3 Analýza sekvencí pro <i>EF 1-α</i>	32
4.3.1 Analýza úseku <i>EF 1-α</i> u <i>Armillaria ostoyae</i>	33

4.3.2	Analýza úseku <i>EF 1-α</i> u <i>Armillaria gallica</i>	34
4.3.3	Analýza úseku <i>EF 1-α</i> u <i>Armillaria cepistipes</i>	34
4.3.4	Fylogenetické vztahy napříč testovanými václavkami	35
5	Diskuse.....	37
6	Závěr	40
7	Seznam použité literatury.....	41
8	Seznam obrázků	46
9	Seznam tabulek	48
10	Seznam použitých zkratk.....	49
11	Přílohy	50

Úvod

V důsledku klimatických změn dochází v posledních letech k výraznému zhoršení zdravotního stavu smrkových porostů, které chřadnou a umírají. Na zhoršeném zdravotním stavu smrkových kultur a tím i na ekonomicky méně ziskové produkci dřeva se podílí celá řada biotických škodlivých činitelů. Jedním z hlavních biotických faktorů jsou václavky, které provází chřadnutí a odumírání smrků na řadě lokalit v České republice. V roce 2019 byly evidovány těžby ve výši 145 tis. m³ václavkového dříví. Těžištěm výskytu václavek byl Moravskoslezský a Olomoucký kraj. V současné době jsou václavky považovány za nejvýznamnější problém lesnictví ve střední Evropě.

Václavky je potřeba chápat i jako přirozenou součást lesních ekosystému, kde se václavky významně podílí na koloběhu uhlíku a napadají kořenové systémy jinak oslabených smrků. Nutnost prozkoumat druhové složení a virulenci jednotlivých druhů václavek je jedním ze stěžejních bodů budoucích ochranných strategií v lesním hospodářství. Rozlišení jednotlivých druhů pomocí morfologických znaků je velice obtížné a nedostatečné. V současné době jsou druhy václavek rodu *Armillaria* identifikovány pomocí molekulárních metod.

Tato práce je zaměřena na rozlišení jednotlivých druhů václavek na molekulární úrovni ze vzorků sbíraných v suchem poškozených lesích ČR. Konkrétně se jedná o 9 lokalit v Moravskoslezském a Olomouckém kraji. Na základě molekulární analýzy byla provedena identifikace jednotlivých druhů podle variability genu *EF 1-α*.

1 Literární přehled

1.1 Václavka (*Armillaria*)

Systematické zařazení václavek podle Maphosa 2005:

říše: Fungi

oddělení: Basidiomycota

třída: Basidiomycetes

řád: Agaricales

čeleď: Tricholomataceae

rod: *Armillaria*

Rod *Armillaria*, s českým názvem václavka, představuje skupinu kosmopolitně rozšířených basidiomycetů, jejichž hlavní funkcí je rozklad organického materiálu v lesních ekosystémech. Jsou známy i symbiotické vztahy s některými orchidejemi např. *Galeola septentrionalis* (Ogura-Tsujita, 2021). Václavky se podílejí na regulaci druhů a jedinců, která primárně spočívá v narušení jejich vodního režimu. Většina druhů václavek tak představuje vážný problém pro lesní hospodářství, kde trvale způsobují velké ekonomické ztráty. V hospodářském měřítku jsou václavky považovány za nejvýznamnější činitele poškozující smrkové porosty nižších a středních poloh. Nejvýrazněji se škodlivá činnost václavek projevuje v lesních porostech, v nichž jsou dřeviny pěstovány na hranici ekologického optima nebo mimo něj. Dřeviny se tak stávají citlivými na jakékoliv stresové faktory (Křístek a Urban, 2013). Lesní ochranná služba v roce 2019 evidovala cca 145 000 m³ „václavkového“ dříví, a to zejména na severní Moravě a ve Slezsku (Knížek a Liška, 2020). Václavky nenapadají jen jehličnaté stromy. Byly zaznamenány u více jak 600 rostlinných hostitelských druhů. Přítomnost václavky byla zaznamenána i na zemědělských plodinách např. obilninách, vinné révě a bramborách (Jančařík a Jankovský, 1999).

Václavky jsou také považovány za nejrozsáhlejší a dlouhověké organismy světa. V Oregonu (USA) je známa václavka *Armillaria ostoyae*, která zaujímá plochu 890 hektarů a její stáří se odhaduje na 2 400 let (Maheshwari, 2005). U václavek se také setkáváme s bioluminiscencí. Jedná se o jev, při kterém dochází k reakci kyslíku s luciferinem s účastí enzymu luciferázy. Výsledkem je pak světélkování mycelia a mladých rhizomorf. Ekologický význam bioluminiscence však není jasný. Jednou z hypotéz je lákání bezobratlých živočichů k rozšiřování spór (Sochor et al., 2015).

Václavky mají i schopnost detoxikovat půdu, díky enzymům rozkládajícím dřevo jsou schopné odbourávat fenoláty i ropné deriváty. Jedná se o látky, které se dostaly do lesní půdy z lesnické mechanizace (Jankovský a Scháněl, 1997).

Rod *Armillaria* má dlouhou taxonomickou historii. Poprvé byl rod *Armillaria* znamená v 17. století dánským botanikem Martinem Vahlem. První publikace však pochází z roku 1857 od Friedricha Staude. Rod *Armillaria* čítá kolem 40 morfologických druhů, ale na základě molekulárních analýz DNA byl objeven značný počet biologických druhů (Baumgartner et al., 2011). V současné době je rozpoznáno nejméně 129 biologických druhů (Coetzee et al., 2018).

1.1.1 Druhové spektrum václavek v ČR

V České republice je rozlišováno pět druhů prstenatých václavek:

Václavka smrková (*Armillaria ostoyae*)

Václavka obecná (*Armillaria mellea*)

Václavka hlíznatá (*Armillaria gallica*, syn. *bulbosa*)

Václavka severská (*Armillaria borealis*)

Václavka cibulkotřenná (*Armillaria cepistipes*).

Krom toho se zde vyskytují i dva druhy bezprstenných václavek:

Václavka bezprstenná (*Armillaria socialis*, syn. *tabescens*)

Václavka bažinná (*Armillaria ectypa*) (Antonín a Tomšovský, 2010).

Václavka smrková (*Armillaria ostoyae*, syn. *solidipes*)

Václavka smrková je nejrozšířenějším druhem v České republice. Patří mezi hospodářsky významné parazity. Odpovídá za převážnou většinu kořenových hnilob smrkových porostů ve středních a nižších polohách. Hlavní příčinou masivního odumírání je však vysazování smrkových monokultur v nevhodných klimatických podmínkách. Ve smíšených lesích se s václavkou smrkovou setkáváme jako se saprofytem, k parazitismu dochází pouze u oslabených jedinců (Schwarze et al., 2000). Pro václavku smrkovou je typická medově hnědá barva klobouku s výraznými černohnědými šupinami a silným vatovitým prstenem (Jančařík a Jankovský, 1999).



Obrázek 1: *Armillaria ostoyae* (Antonín a Tomšovský, 2010)

Václavka obecná (*Armillaria mellea*)

Václavka obecná je nejnadněji rozpoznatelná václavka. Jedná se o teplomilnou rostlinu rostoucí výhradně na listnácích, zejména na ovocných dřevinách, dubech a habrech. Plodnice jsou žlutohnědé až olivově zelené, bez šupin vyrůstající na podzim (na přelomu září až října). Václavky vyrůstají v bohatých trsech. Typický je také blanitý prsten. Význačný je rovněž nepříjemný pach připomínající zrající sýr camembert. Václavka se dá dobře rozlišit i mikroskopicky – u bazidií je typická nepřítomnost přezek, tj. orgán tvořící se na přepážkách hyf a bazidií stopkovýtrosých hub, sloužící k přesunu jader buněk při růstu hyf. U ostatních druhů jsou bazidie s přezkou (Antonín a Tomšovský, 2010).



Obrázek 2: *Armillaria mellea* (Antonín a Tomšovský, 2010)

Václavka severská (*Armillaria borealis*)

Václavka severská u nás nebyla dlouho rozlišována, přitom se pravidelně vyskytuje ve středních a vyšších polohách. S tímto druhem je nejvíce spojována bioluminiscence tlejícího dřeva. Typickým znakem je žlutohnědý klobouk s tmavohnědými hustě rozmístěnými šupinami na středu. Vyrůstá v trsech i samostatně na kmenech i pařezech (Antonín a Tomšovský, 2010). Vyskytuje se převážně na smrcích, zřídka i na listnáčích např. bříza a buk. Má válcovitý třen, nesoucí zbytky okrově žluté plachetky a bílý blanitý prsten (Jankovský, 2003).



Obrázek 3: *Armillaria borealis* (Antonín a Tomšovský, 2010)

Václavka hlíznatá (*Armillaria gallica*, syn. *bulbosa*)

Barva klobouku václavky hlíznaté je nejčastěji oranžově hnědá, v mladí je posetá jemnými šupinkami. Třen je krátký, s plstnatými zbytky plachetky a prstenem. Tento druh je spojen s největším počtem hostitelů, ale nejčastěji se vyskytuje na dubech, habrech i na dalších listnatých dřevinách. Velmi vzácně roste na jehličnanech (Antonín et al, 2009). Tato václavka je považována za oportunní patogen a to hlavně na suchem stresovaných lesních porostech či jinak oslabených jedincích (Marçais a Bréda, 2006). Václavka hlíznatá je snadno zaměnitelná s václavkou cibulkotřennou. Někdy nelze rozlišit makroskopicky ani pomocí mikroskopických znaků. Klasickými metodami jsou tyto dva druhy neodlišitelné. Částečně se dají rozlišit podle ekologie. Václavka hlíznatá se dominantně vyskytuje v teplých nížinách, ale můžeme se s ní setkat i ve vyšších polohách (300-500 m n.m.) v blízkosti řek, stejně jako s václavkou cibulkotřennou (Jankovský, 2003). Dalším možným rozlišovacím znakem mohou být

dlouhé vláknité šupiny na klobouku nebo plstnaté zbytky plachetky na třeni u václavky hlíznaté. S jistotou však tyto dvě václavky určíme pomocí molekulárních metod např. sekvencí genu pro translační elongační faktor 1- α (Antonín et al., 2009).



Obrázek 4: *Armillaria gallica*, syn. *bulbosa* (Antonín a Tomšovský, 2010)

Václavka cibulkotřenná (*Armillaria cepistipes*)

Václavka cibulkotřenná má obdobně zbarvený klobouk s václavkou hlíznatou, ale šupiny bývají tmavohnědé až hnědé, na středu vláknité, často vztyčené ve skupinách, brzy kromě středu olysávají. Zbytky plachetky jsou nevýrazné a prsten se při otevírání klobouku nepravidelné trhá. Roste nejčastěji na bucích a smrcích, méně na jedlích, jasaněch, olších a břízách. Zdá se, že tento typ roste pouze ve vyšších polohách (500-900 m n.m.) na vlhkých stanovištích na dřevě buků a jasanů, ale zřídka se objevuje i okolo 250 m n.m., kde se dá snadno zaměnit právě s václavkou hlíznatou (Antonín et al., 2009).



Obrázek 5: *Armillaria cepistipes* (Antonín et al., 2009)

Václavka bezprstenná (*Armillaria socialis*, syn. *tabescens*)

Václavka bezprstenná (*A. socialis*, syn. *tabescens*) je saprofytická teplomilná houba vyskytující se především v doubravách a lužních lesích. U nás se nachází pouze v nejteplejších místech na jižní a střední Moravě (podél řek Moravy a Dyje). Jedná se o statnou houbu s okrově žlutým kloboukem, na středu pokrytým tmavohnědými šupinami. Třeň je typický absencí prstenu, válcovitý, bělavý až červenohnědý, dlouhý až 16 cm (Antonín a Tomšovský, 2010). Václavka bezprstenná je pro svou vzácnost zařazena v Červeném seznamu hub České republiky (Holec a Beran, 2006).



Obrázek 6: *Armillaria socialis*, syn. *tabescens* (Antonín et al., 2009)

Václavka bažinná (*Armillaria ectypa*)

Václavka bažinná (*A. ectypa*) je saprotrof rostoucí na podmáčených loukách a rašeliništích. Je drobnější, průměr klobouku bývá okolo 20-60 mm s okrově žlutou až hnědou barvou. Třeň bývá dlouhý 60-80 mm o tloušťce až 10 mm. Od václavky bezprstenné se kromě ekologie liší zpravidla samostatně rostoucími plodnicemi s drobnými šupinami na povrchu klobouku. Je silně ohrožena vodohospodářskými a lesními zásahy. Pro svou vzácnost a výskytem na ohrožených stanovištích patří mezi kriticky ohrožené druhy v Seznamu zvláště chráněných druhů podle zákona o ochraně přírody č. 114/92 Sb. a vyhlášky č. 395/92 Sb. (Antonín a Bieberová, 1995). V České republice byla nalézána pouze na jediné lokalitě – NPR Ruda v CHKO Třeboňsko. V r. 2009 byla překvapivě nalezena na nové lokalitě na Českomoravské vrchovině (PR v Lísovech u Počátek) (Antonín a Tomšovský, 2010).



Obrázek 7: *Armillaria ectypa* (Zíbarová, 2014)

1.1.2 Role václavek v chřádnutí smrkových porostů

Václavky jsou považovány za jeden z hlavních biotických faktorů, které provází chřádnutí a odumírání smrkových porostů na řadě lokalit v České republice. Hlavní roli v destabilizaci smrku v nižších a středních polohách hraje václavka smrková *A. ostoyae*, ve zvýšené míře byla zjištěna i václavka cibulkotřenná *A. cepistipes*, v menší míře i václavka severská *A. borealis*, v nížinách může smrky napadat i václavka hlízovitá *A. gallica*, zatímco václavka obecná *A. mellea* nebyla na smrku zaznamenána (Jankovský, 2014). Zvýšený výskyt poškozených smrků není způsoben agresivitou václavek, ale především změnami prostředí, které stresují stromy a vzniká tím predispozice k václavkové infekci. Současný stav lesních porostů je dán i nevhodným monokulturálním složením lesů za účelem co největší produkce dřevní hmoty, čímž došlo k posunutí pěstování smrku na okraj ekologického optima (Jankovský, 2014).

V napadení václavkou hraje hlavní roli predispozice hostitele. Nejčastějším předpokladem ke vzniku infekce je narušení vodního režimu rostliny. I krátkodobé narušení vodního provozu rostliny suchem nebo zamokřením a následnou hypoxií prohlubuje predispozici rostlin k houbovým chorobám, ale i hmyzím invazím (Jankovský, 2014).

Václavka se nejčastěji šíří vegetativně myceliem, ale má schopnost i generativního rozmnožování pomocí výtrusů (basidiospory). V dostatečně vlhkém prostředí mají basidiospory schopnost klíčení. Šíří se vzdušnou cestou i na vzdálenost 100 km (Vasaitis et al., 2008). Vegetativně se václavka rozmnožuje z mycelia, které se skládá

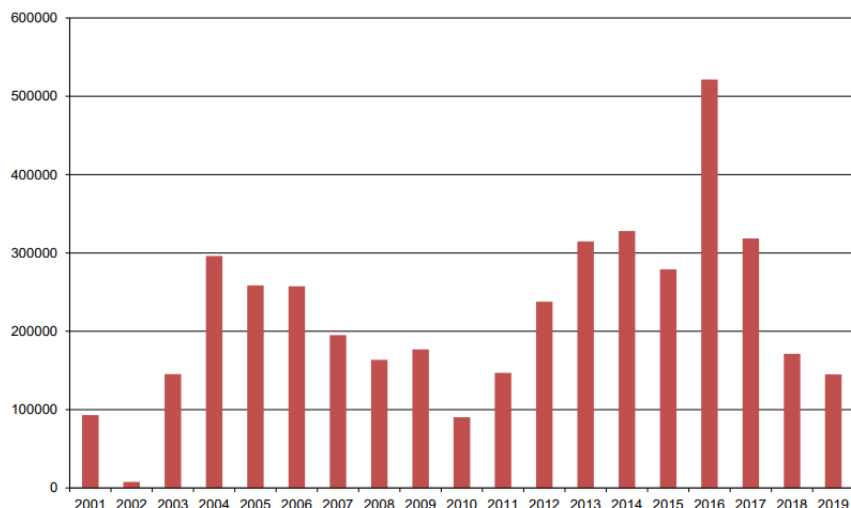
z rhizomof. Rhizomorfy jsou černé provazcovité kořeny, které mají schopnost pronikat do lýkových částí v kořenovém systému, následně i do dřevných a pryskyřičných kanálků (Jankovský, 1997).

Napadení václavkou je pozorovatelné až s příznaky, to už ale strom hyne. Infekce se nejprve projevuje světlešedě zeleným jehličím, následným omezením přírůstu. Poté zaschnutím, opadem jehlic a odumřením napadených stromů (Pešková a Soukup, 2013). Václavky způsobují na stromech charakteristickou bílou hnilobu, kdy pomocí specializovaných enzymů dochází k mineralizaci dřevní hmoty. Dřevní hmota zvětšuje svůj objem, snižuje hmotnost i tvrdost (Jankovský et al., 2005). Další znak je i ronění pryskyřice na kmeni stromů. Pod kůrou napadených stromů lze nalézt bílý povlak, syrrocium, které se rozrůstá od kořenů a postupuje k bázi kmene (Jankovský, 1997). Na obrázku 8 jsou zobrazeny mladé rhizomorfy (*A. ectypa*, zleva), plodnice *A. ostoyae* a hniloba způsobená václavkou (uprostřed) a syrrocium *A. ostoyae* pod kůrou napadeného smrku.



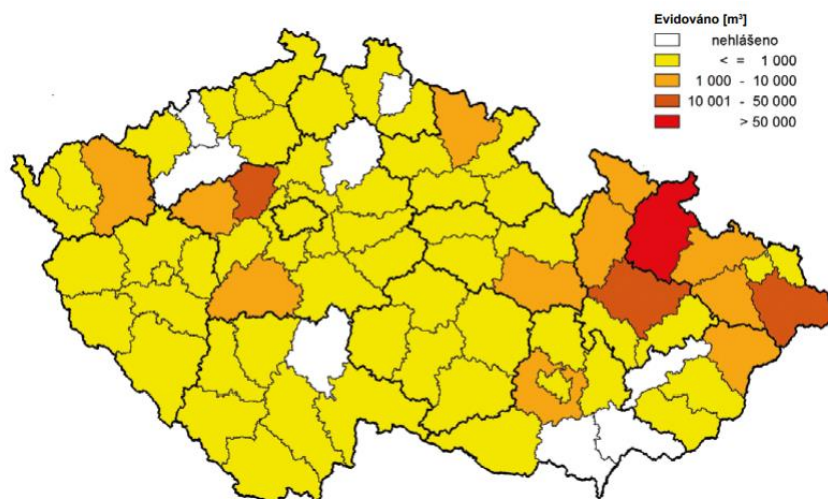
Obrázek 8: Charakteristické znaky kořenové hniloby způsobené václavkou (Sipos et al., 2018)

V roce 2019 bylo v českých lesích evidováno 145 tisíc m³ václavkového dříví. I když byl v posledních letech zaznamenán mírný pokles václavkou napadených porostů, přesto jsou i lokality, kde je situace nadále vážná např. Morava a Slezsko (Knížek a Liška, 2020). Vývoj evidence václavkového dříví od roku 2001 až do roku 2019 je zobrazen na obrázku 9.



Obrázek 9: Evidovaný objem smrkového václavkového dříví od roku 2001 (Knížek a Liška, 2020)

Zdánlivé zlepšení václavkové situace je však spíše výsledkem ústupu smrku z pahorkatin v oblastech střední Moravy a Slezska než skutečný pokles rozsahu napadení lesních porostů václavkami. Nejvyšší objem vytěženého dříví napadeného václavkou byl opět evidován na území Moravskoslezského kraje (cca 74 tis. m³). Na obrázku 10 můžeme vidět evidovaný objem smrkového václavkového dříví v České republice v roce 2019 (Knížek a Liška, 2020).



Obrázek 10: Evidovaný objem smrkového václavkového dříví v roce 2019 (Knížek a Liška, 2020)

V destabilizaci smrkových porostů participuje václavka jako stresor, který oslabuje stromy, ty se tak stávají atraktivní pro kůrovce např. *Ips typographus* (Sierota a Grodzki, 2020). Kůrovec je příčinou současně trvající kalamity na našem území. V roce

2019 bylo evidováno 14,5 mil. m³ smrkového dříví zasaženého kůrovcem (Knížek a Liška, 2020).

1.1.3 Ochranná opatření proti václavkám

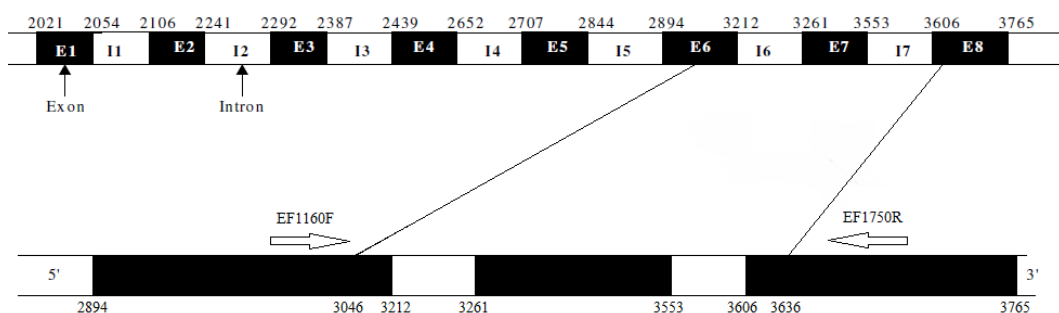
Boj s václavkou v lesních porostech je nelehký. Proti václavce nejsou v současné době známa účinná opatření. Jednou napadené stromy se nedají zachránit. Vykácením napadených stromů se neodstraní zbytky kořenů, které představují další zdroj infekce po dobu několika let (Cox et al., 2004). Mycelia jsou odolné vysokým teplotám a jsou schopna přežít i rozsáhlé požáry (Smith et al., 1992). Pouze včasným vytěžením lze značnou část dřevní produkce zachránit, i za cenu toho, že se po dobu 60 let sníží obmýtí. Jediným možným opatřením proti václavce je efektivní změna dřevinné skladby ve prospěch přirozených dřevin (Pešková a Soukup, 2013).

1.2 Molekulární markery v taxonomii a fylogenezi václavek

K fylogenetické analýze václavek už bylo aplikováno několik genů i genomických oblastí. Většina studií byla zaměřena na nekódující oblasti jaderné rRNA. Jednou z nich byla i oblast IGS-1 (Intergenic Spacer Region 1), umístěna mezi velkou ribosomální podjednotkou (nLSU, 28S gen) a 5S genem. V řadě analýz byly použity i oblasti ITS (Internal Transcribed Spacer). Jedná se o krátké intergenové regiony oddělující strukturní ribosomální rRNA, konkrétně 18S, 5,8 S a 28S rRNA (Anderson et al., 1992). Tyto oblasti lze nalézt pouze na transkripčním prekurzoru, protože během posttranskripční reparace dochází k jejich degradaci. ITS jsou v buňce uspořádány tandemově za sebou v několika tisících kopiích. Ačkoli ITS byly úspěšně použity v několika studiích, tak neposkytují dostatečné rozlišení určitých druhů václavek. Nedostatečné rozlišení *A. gallica* a *A. cepistipes* na základě ITS uvádí i Antonín et al. (2009). U některých druhů byla zaznamenána heterogenita nukleotidů pro oblast ITS a IGS 1, která znemožňovala sekvenování těchto oblastí bez klonování. U afrických druhů byla zaznamenána inverze genu 5S, důsledkem byla nemožnost použít oblast IGS-1 jako marker pro globální fylogenezi (Coetzee et al., 2018). Vhodnými molekulárními markery ve fylogenetické analýze václavek jsou i geny kódující proteiny nebo oblasti těchto genů např. *EF 1- α* a *rpb2* (Matheny et al., 2007). Nicméně bylo prokázáno, že analýza genu *rpb2* nedokáže rozlišit mezi sebou druhy *Armillaria calvescens* a *gallica* (Brazee et al., 2011).

1.3 Gen *EF 1-α*

Gen pro elongační faktor 1- α (*EF 1-α*) kóduje protein, který lze najít ve všech eukaryotických organismech. Protein je hojný v cytosolu a účastní se GTP dependentní vazby aminoacyl-tRNA do místa A ribozomu v druhém kroku translace z mRNA na protein. Gen pro *EF 1-α* obsahuje vysoce konzervované aminokyselinové sekvence dovolující analýzu druhů v širokém taxonomickém měřítku. Determinace i na druhové úrovni je umožněna i díky diferenciaci na třetích variabilních kodonových pozicích. Degenerace na třetí pozici společně s přítomností intronů znesnadňuje design univerzálních primerů. Malý počet kopií tak komplikuje amplifikaci při PCR (Djernæs a Damgaard, 2005). Navzdory tomu se gen *EF 1-α* jeví jako ideální molekulární marker v taxonomii hub, zejména pokud se jedná o fylogenetickou analýzu, kde je potřeba s jistotou odvodit vztahy mezi jednotlivými druhy ve stejné zeměpisné lokalitě (Coetzee et al., 2018). Na obrázku 11 je zobrazena struktura genu pro elongační faktor 1- α . Exony jsou zvýrazněny černou barvou a introny bílou. Místa vazeb primerů EF1160F a EF 1750R jsou znázorněna na zvětšeném diagramu. Čísla značí pozice bazí v genu *EF 1-α* (Kauserud a Schumacher, 2003).



Obrázek 11: Struktura genu *EF 1-α* s vazebnými místy pro primery EF1160F a EF 1750R (upraveno dle Maphosa et al., 2006)

1.4 Použité metody

1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce, z anglického Polymerase Chain Reaction (PCR), je metoda rychlé a snadné in vitro amplifikace specifické sekvence DNA bez klonování. Je založena na principu replikace nukleových kyselin (Erlich, 1989).

Metoda byla poprvé provedena a objevena v roce 1983 americkým vědcem Kary B. Mullisem. Následně mu za tento objev v roce 1993 byla udělena Nobelova cena za chemii (Clark, 2005).

Podstatou polymerázové řetězové reakce je replikace úseku nukleových kyselin *in vitro*. Principem PCR je amplifikace cílových úseku analyzovaného genu prostřednictvím enzymu DNA polymerázy. Vybraná část DNA je ohraničena oligonukleotidovými primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3' konce směřují k sobě. Od těchto primerů je zahájen proces syntézy DNA. Po přidání nukleotidů a enzymu DNA polymerázy probíhá syntéza nových vláken na obou řetězcích v opačném směru (Šmarda et al, 2005).

V průběhu polymerázové řetězové reakce se cyklicky střídají tři kroky, během kterých probíhají odlišné děje s rozdílnými teplotními podmínkami. PCR je zahájena počáteční denaturací dvouřetězcové DNA při teplotě cca 94 °C za vzniku dvou molekul jednořetězcové DNA. V následujícím kroku, tzv. annealing, dochází k připojení primerů k rozpleteným řetězcům DNA. Teplota annealingu závisí na sekvenci primeru. Teplota se pohybuje v rozmezí 30-65 °C. Ve třetím kroku tzv. elongaci dochází k syntéze nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy při teplotě 65-75°C. (Snustad et al., 2009).

Tento cyklus se 20-35x opakuje a během krátké doby, tak dochází k mnohonásobné amplifikaci cílové sekvence DNA. Během každého cyklu dojde k zdvojnásobení těchto sekvencí, takže po 30 cyklech bude teoreticky naamplifikováno 1 073 741 824 cílových sekvencí. Skutečný počet produktů bude nižší než tento údaj v důsledku degradace enzymu DNA polymerázy (Bustin, 2004).

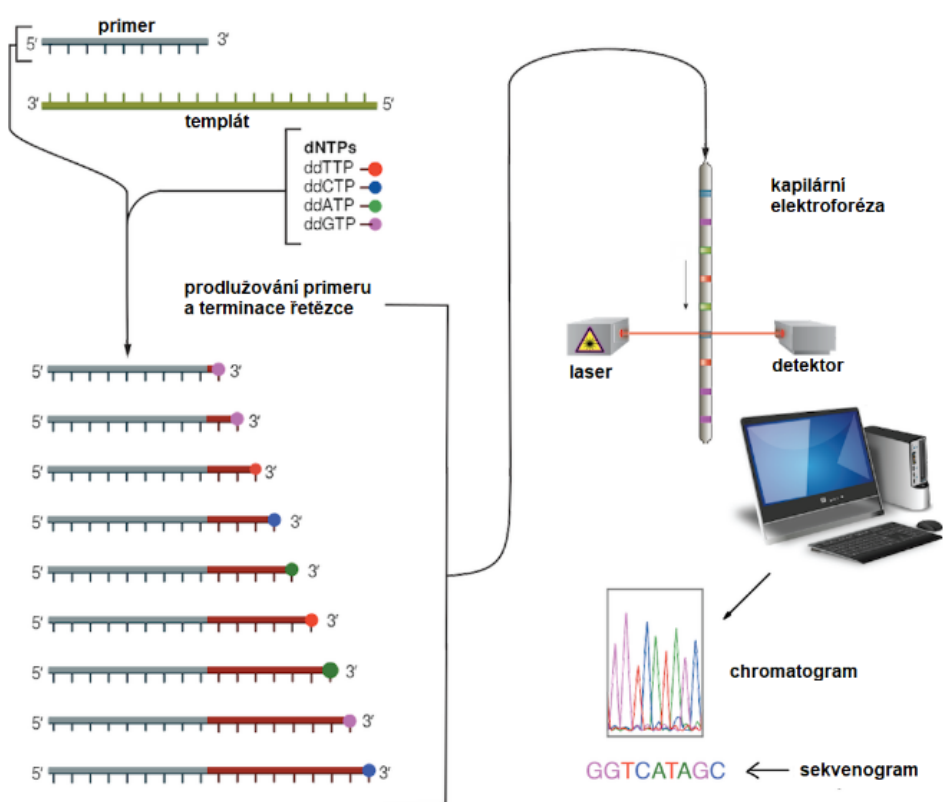
Polymerázová řetězová reakce probíhá v termocyklérech, které umožňují naprogramování jednotlivých teplot.

Výsledkem PCR jsou amplikony, tj. mnohonásobně zmnožené úseky DNA. Úspěšnost a přesnost PCR je závislá na návrhu primerů.

Výsledky PCR produktů se hodnotí pomocí gelové elektroforézy. Elektroforéza je nejpoužívanější separační technika v molekulární biologii. Principem této metody je pohyb záporně nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem záporného náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny. Proto se nukleové kyseliny pohybují ke kladně nabitě elektrodě - anodě. K zviditelnění pod UV světlem se nejčastěji používá interkalační činidlo ethidium bromid (Šmarda et al, 2005).

1.4.2 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je metoda patřící do první generace sekvenování. Metoda je považována za zlatý standard v sekvenování DNA. Sangerova metoda sekvenování byla vyvinuta Frederickem Sangerem v roce 1977. Mechanismus sekvenování je založen na syntéze komplementárního vlákna DNA podle templátu DNA polymerázou a na její terminaci řetězce různými dideoxynukleotidy (ddNTPs) (Sanger et al, 1977). Terminace je docílena inkorporací 2',3'- dideoxyribonukleotidu (ddNTP), který oproti 2'-deoxyribonukleotidu (dNTP) postrádá 3'-hydroxylovou skupinu, a tak znemožňuje další prodlužování DNA vlákna (Atkinson et al., 1969). Metoda probíhá v jedné reakci za použití fluorescenčně značených terminátorů, které jsou rozděleny kapilární elektroforézou. Zaznamenané signály jsou po excitaci laserem snímány detektorem. Délka čtení se pohybuje okolo 500 do 1 000 bází (Kulski, 2016).



Obrázek 12: Schéma Sangerova sekvenování (khanacademy.org, 2020)

2 Cíle práce

Cílem práce bylo na základě amplifikovaných oblastí genu *EF 1- α* rozlišit jednotlivé druhy václavků na molekulární úrovni ze vzorků sbíraných v suchem poškozených leších v ČR.

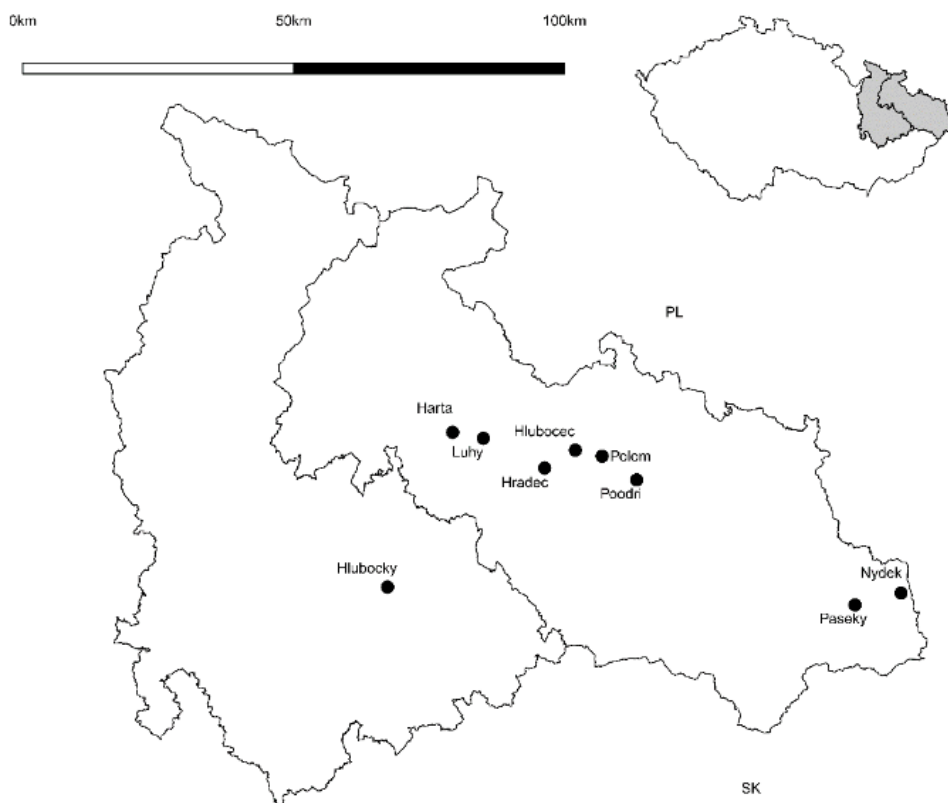
Záměrem molekulární analýzy byla amplifikace částí genu *EF 1- α* , jejich sekvenování a určení přesného pořadí bází v amplifikovaném úseku a také rozdílné pozice bází v sekvenci, které se liší dle druhu.

Účelem sekvenační analýzy byla identifikace jednotlivých druhů václavků a následná konstrukce fylogenetických stromů.

3 Materiál a metodika

3.1 Sběr vzorků

Výchozí biologický materiál představovala mycelia václavek odebraných v suchem poškozených lesích v České republice. Vzorky byly odebrány celkem v 9 lokalitách v Moravskoslezském a Olomouckém kraji během roku 2019.



Obrázek 13: Mapa s lokalitami sběru václavek v Olomouckém a Moravskoslezském kraji

Na obrázku 13 jsou zobrazeny lokace sběru václavek použitých k analýze. Bylo zkoumáno celkem 9 suchem postižených lokalit v Olomouckém a Moravskoslezském kraji. Jedná se o lokality Hlubočec, Polom, Hradec, Paseky, Poodří, Nydek, Hlubočky, Harta a Luhy. Počty odebraných vzorků v jednotlivých lokalitách nalezneme v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam vzorků k analýze *EF 1-α* genu

Lokalita	Počet vzorků
Hlubočec	18
Polom	16
Hradec	15
Paseky	12
Poodří	11
Nýdek	7
Hlubočky	5
Harta	5
Luhý	3

3.2 Kultivace vzorků

Původní vzorky václavěk byly uchovávány a kultivovány na Petriho miskách na MEA (Malt Extract Agar) médiu při teplotě 25°C. MEA bylo připraveno navážením 10 g malt extraktu, 10 g glukosy, 8 g agaru a 3,5 g kukuřičného extraktu. Směs byla rozpuštěna v destilované vodě upravené na pH 5,5 a následně sterilizována v autoklávu (120°, 20 min). Po sterilizaci se médium opět rozmíchalo a rozplnilo do sterilních Petriho misek.

Pro uchovávání původních vzorků byly kmeny namnoženy 2x. Pasážování bylo prováděno pomocí kličky za sterilních podmínek ve flowboxu. Takto připravené vzorky se nechávaly kultivovat při 25 °C po dobu 14 dnů. Po uplynulé době se potřebné množství narostlého mycelia převedlo do mikroskopavek a provedla se izolace DNA.

3.3 Izolace DNA pomocí CTAB-PVP

DNA byla izolována metodou využívající roztok CTAB-PVP (cetyltrimethylamoniumbromid – polyvinylpyrrolidon), která slouží k extrakci velkého množství poměrně čisté DNA a není tak náchylná k degradaci (Čurn et al., 2019).

Tato metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimethylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami. Tento komplex je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při nízké (0,45 M NaCl) má tendenci vytvářet sraženinu. CTAB mimo jiné má detergentní účinky, díky nimž uvolňuje DNA z komplexu

membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB ve srovnání s DNA jsme schopni oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

Ke vzorku houbového pletiva se do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek přidá 500 μ l na 65°C předehřátého 2xPVP-CTAB pufru a vzorek se manuálně homogenizuje. Pro lepší rozdrčení lze přidat sterilní křemičitý písek. Homogenizované vzorky necháme inkubovat 45 minut při 65°C. Během inkubace se každých cca 15 min promíchají. Následně se vzorky centrifugují při 12 000 rpm 10 minut a vytvořený supernatant se převede do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1). Roztok se nechá 10 minut promíchávat, poté centrifugujeme při 12 000 rpm 5 minut. Do nových 1,5 mikrocentrifugačních zkumavek se přepipetuje vodná fáze a přidá se 80 μ l 5% CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500 μ l směsi chloroform s IAA. Roztok se znovu nechá 10 minut promíchávat, poté vzorky centrifugujeme 5 minut maximální rychlostí při pokojové teplotě. Do nových 1,5 mikrocentrifugačních zkumavek se přepipetuje vodní fáze a přidá se 250 μ l ledového isopropanolu a 2-3x se směs lehce promíchá a nechá se přes noc v mrazáku při -20 °C.

Po vyjmutí z mrazáku se vzorky centrifugují 5 min při maximální rychlosti. DNA se zachytí na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraní se supernatant a přidá se 300 μ l 1x TE a nechá se inkubovat 30-60 minut při 37°C. Přidá se 600 μ l ledového 96 % ethanolu, směs se 2-3 lehce promíchá a nechá se přes noc v mrazáku při -20°C.

Po vyndání se vzorky 10 minut centrifugují při maximální rychlosti při 4°C. Na dně mikrocentrifugační zkumavky by DNA měla vytvořit viditelný pelet. Odstraní se supernatant a přidá se 1 ml ledového 70% ethanolu. Směs se 2-3x lehce promíchá a nechá se centrifugovat 2 minuty maximální rychlostí při 4°C. Okamžitě se odstraní všechny supernatant. Pro lepší čistotu izolované DNA opakujeme tento krok 2x. Po odstranění supernatantu se vzorky nechají dobře vysušit. K vysušené DNA se následně přidá 100 μ l 1x TE pufru a nechá se rozpustit při 37 °C. Takto připravené vzorky se skladují při -20°C.

3.4 Polymerázová řetězová reakce

Pomocí PCR byly specificky naamplifikovány úseky genu *EF 1- α* , konkrétně oblast eukaryotického translačního faktoru 1-alfa (*EF 1- α*), která je ohraničená primery EF1160F a EF1750R (Kausrud a Schumacher, 2003).

Tabulka 2: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci *EF 1-α* genu

Primer	Sekvence (5'→3')
EF1160F	CAGGACGTCTACAAGATCGG
EF1750R	GTACTCGTTGTAGGACTCAA

Amplifikace DNA probíhala v konvekčním termocykleru (Bioer Life ECO). PCR probíhala v celkovém objemu 25 µl obsahující:

- 12,5 µl master mixu PPP (Top Bio, CZ)
- 8,5 µl PCR H₂O (Top Bio, CZ)
- 0,75 µl primeru forward
- 0,75 µl primeru reverse
- 2,5 µl extrahované DNA.

Teplotní profil PCR reakce je v tabulce 3.

Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	4 min	1 cyklus
Denaturace	94 °C	30 s	37 cyklů
Annealing	45 °C	40 s	
Elongace	72 °C	40 s	
Terminální elongace	72 °C	10 min	1 cyklus
Chlazení	4 °C	∞	1 cyklus

3.5 Elektroforéza

Produkty PCR byly separovány na 2% agarózovém gelu (2,4 g agarózy + 120 ml 1x TBE pufru). DNA fragmenty byly obarveny pomocí 4 µl ethidium bromidu a společně se 100 bp DNA ladderem (New England Biolabs, UK) separovány v agarózovém gelu při 120 V 45 minut. PCR produkty se analyzovaly za pomoci vyhodnocovacího zařízení, jehož součástí byl kamerový systém, UV transluminátor s UV světlem o vlnové délce 312 nm a vyhodnocovací software (GeneSys). Pomocí toho programu bylo možné pomocí velikostního markeru stanovit velikost PCR produktu.

3.6 Sekvenační analýza

Naamplifikované fragmenty po PCR byly před sekvenováním ošetřeny kitem ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific). Jedná se o kit obsahující hydrolytické enzymy, jejímž úkolem je odstranit primery a zbytky nukleotidů z konečného produktu.

K 10 μ l PCR produktu se přidaly 2 μ l Exo-Sap-IT. Vzorky byly umístěny do termobloku a inkubovány 15 min při 37 °C a následně byl enzym deaktivován 15 minut při 80°C. Ke každému vzorku se poté přidalo 5 μ l primeru ve směru požadovaného sekvenování.

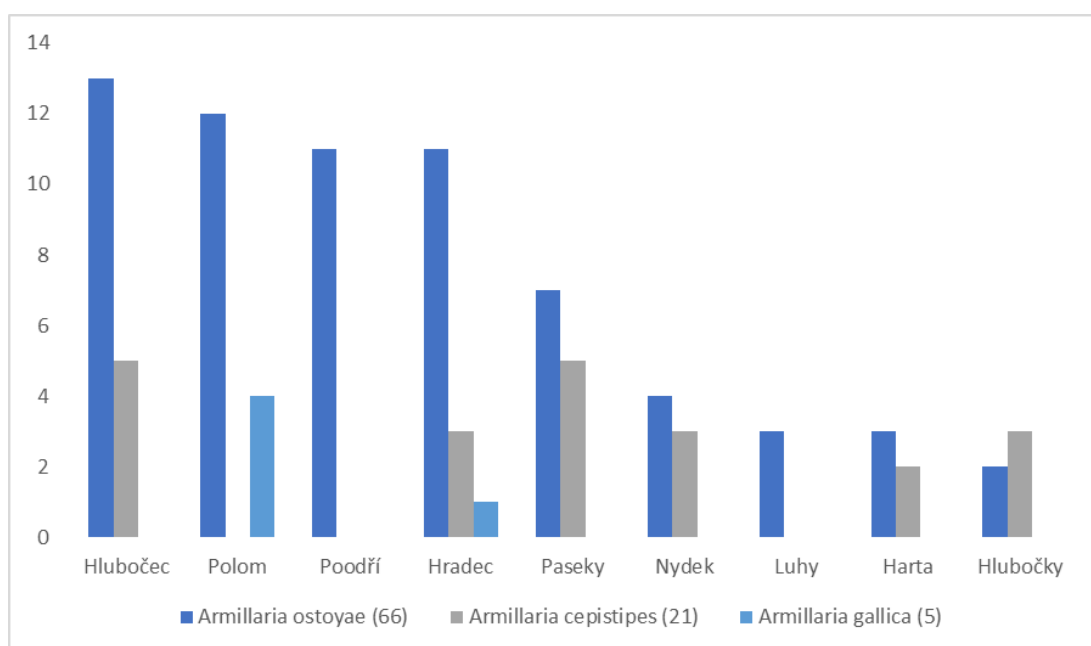
Po přečištění byly takto upravené vzorky odeslány k sekvenaci do externí laboratoře SeqMe s.r.o.. Sekvence probíhala Sangerovou metodou na kapilárních analyzátořech Applied BioSystems prostřednictvím BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Čurn et al., 2019).

3.7 Vyhodnocení sekvencí

Výstupy ze sekvenování, tj. sekvence nukleotidů ve formátu FASTA byly zpracovány ve speciálním programu MEGA-X a upravené sekvence byly porovnávány s on-line dostupnou databází nukleotidových sekvencí NCBI prostřednictvím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Maaden 2002). Sekvence byly porovnávány mezi sebou na základě podobnosti. Alignments byly vytvořeny metodou ClustalW také v programu MEGA-X. Z výsledných sekvencí byl vytvořen dendrogram metodou Neighbour-Joining, přičemž gapy byly zohledňovány a byly započítávány jako další znak (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromu byla testována pomocí metody bootstrap (1000 opakování).

4 Výsledky

Analyzováno bylo celkem 92 vzorků václavek z 9 zkoumaných lokalit v Moravskoslezském a Olomouckém kraji. Molekulární analýzou na základě variability podle genu *EF 1-a* bylo identifikováno 66 vzorků *Armillaria ostoyae*, 21 vzorků *Armillaria cepistipes* a 5 vzorků *Armillaria gallica*. Nejvíce zastoupená *Armillaria ostoyae* byla zaznamenána na všech zkoumaných lokalitách tj. Hlubočec (13), Polom (12), Poodří (11), Hradec (11), Paseky (7), Nýdek (4), Luhy (3), Harta (3) a Hlubočky (2). Přítomnost *Armillaria cepistipes* byla zaznamenána celkem na šesti lokalitách a to – Hlubočec (5), Paseky (5), Hlubočky (3), Nýdek (3), Hradec (3) a Harta (2). Poslední identifikovanou václavkou byla *Armillaria gallica*, která byla nalezena pouze na dvou lokalitách – Polom (4) a Hradec (1). Na obrázku 14 jsou zobrazeny identifikované druhy václavek s počty nalezených jedinců ve zkoumaných lokalitách.

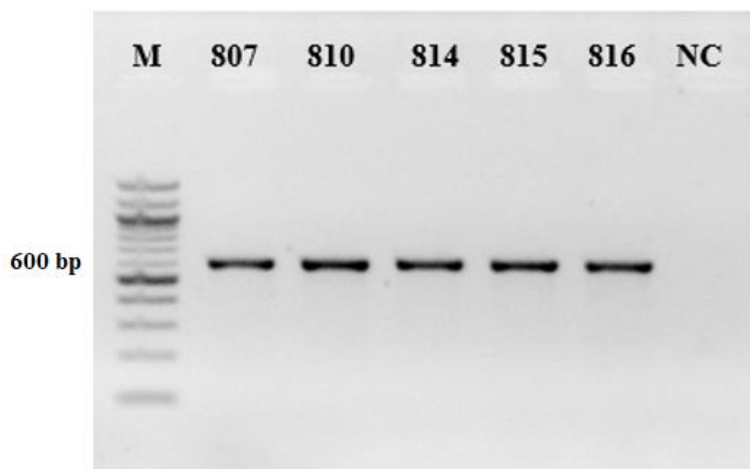


Obrázek 14: Grafické zobrazení identifikovaných václavek rodu *Armillaria* s počty nalezených jedinců ve zkoumaných lokalitách

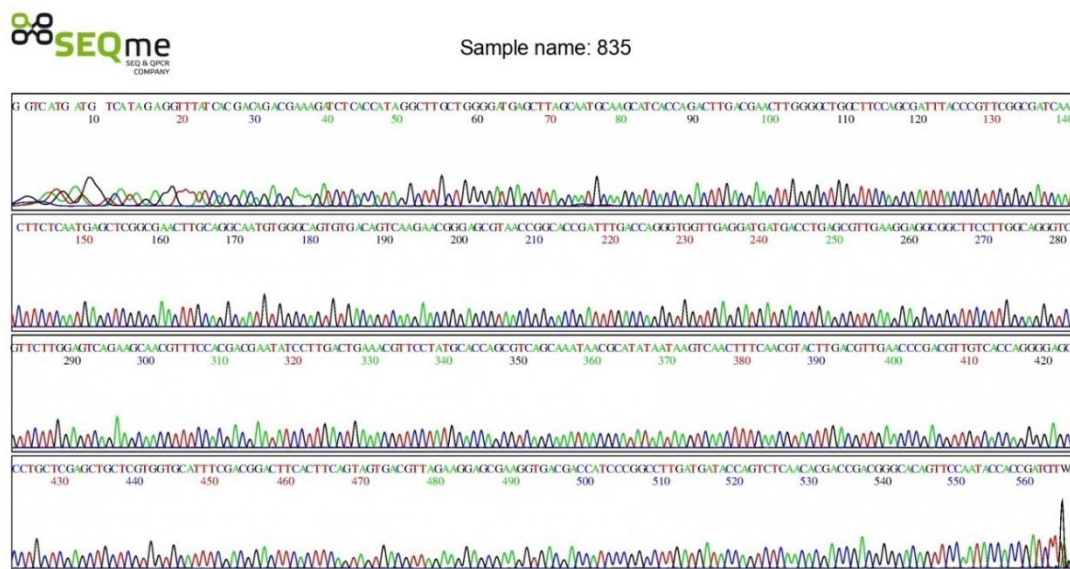
4.1 Amplifikace úseku *EF 1-a* genu

Amplifikace úseku *EF 1-a* genu s primery EF1160F a EF1750R probíhala bez problému. Vznikaly fragmenty o velikosti přibližně 590 bp (obrázek 15). Amplifikace fragmentu probíhala úspěšně, s vysokou přesností. Výsledné produkty byly kvalitní a

v dostatečném množství. Všechny amplifikované fragmenty byly osekvenovány. Ukázka sekvenogramu je zobrazena na obrázku 16.



Obrázek 15: Výsledek PCR zobrazen na 2% agarózovém gelu. M – 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). NC – negativní kontrola. Vzorky 807, 810, 814, 815, 816 s výslednými amplicony o velikosti přibližně 590 bp.



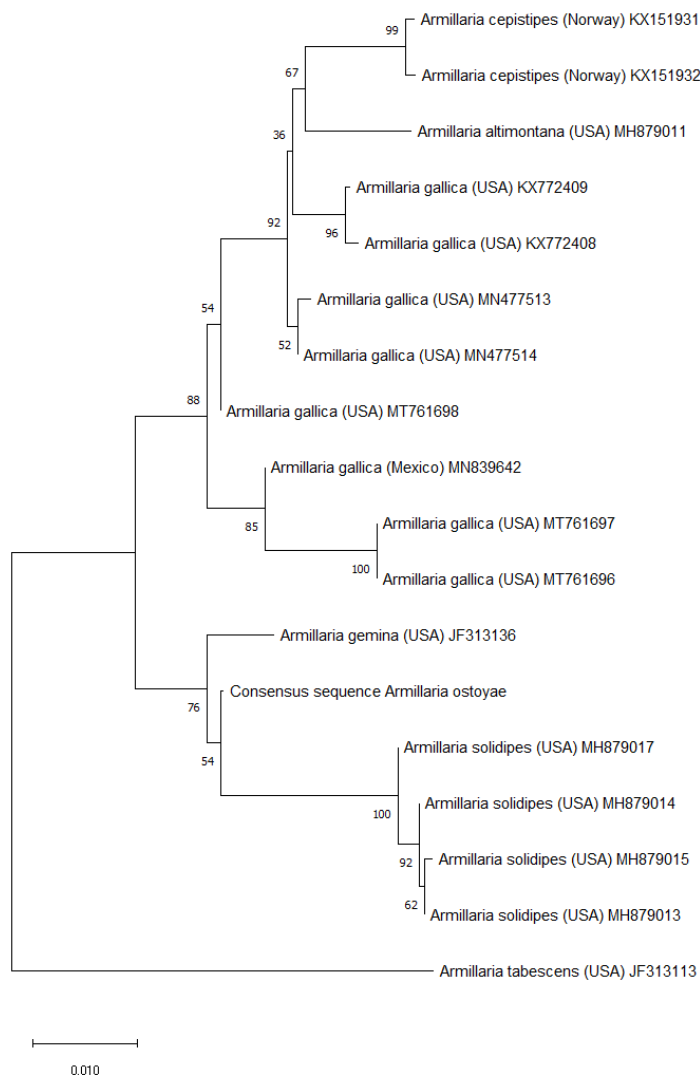
Obrázek 16: Ukázka sekvenogramu *Armillaria ostoyae*

4.2 Porovnání oblasti genu *EF 1-α* algoritmem BLAST

U fragmentu *EF 1-α* byly srovnávány consensus sekvence s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST. Sekvence analyzovaného fragmentu byly porovnávány se sekvencemi genu *EF 1-α* václavěk r. *Armillaria* zařazených v databázi.

Srovnání úseku *EF 1-α* consensus sekvence *Armillaria ostoyae* ukázalo 98,40 % shodu se sekvencí *A. gemina* (JF313136). Další druhy *Armillaria* zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu v této sekvenci – *A. solidipes* v 97,66 - 97,07 %

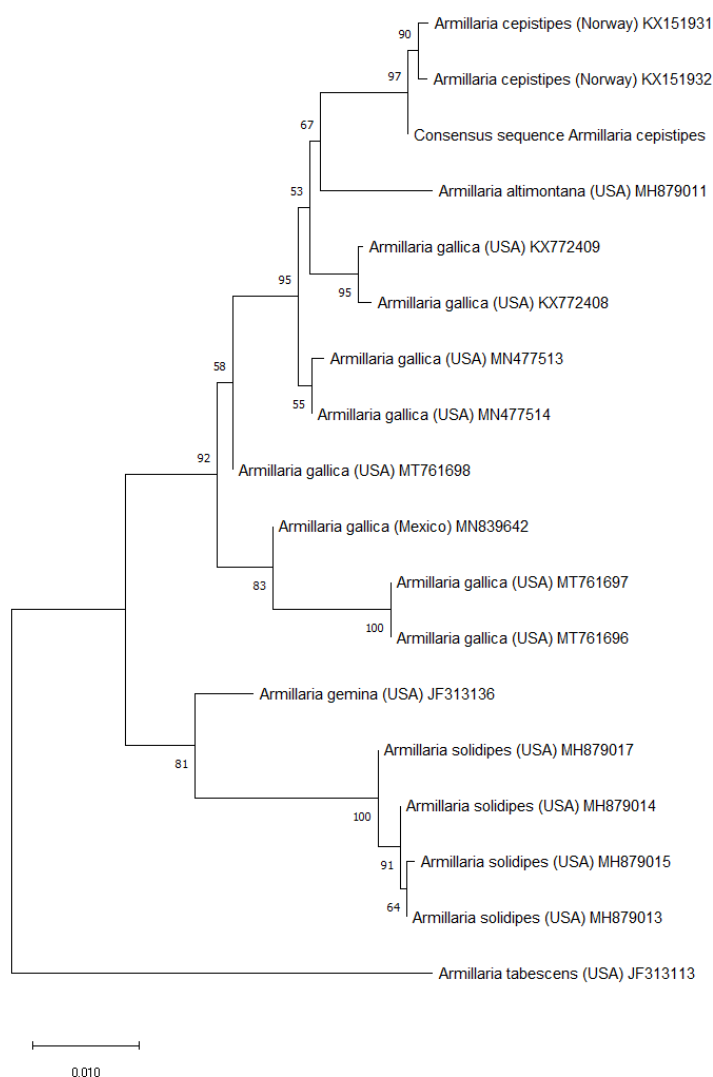
(MH879017, MH879014, MH 879015 a MH879013), *A. gallica* 96,88 – 94,92 % (MT761696, MT761697, MN839642, MT761698, MN477514, MN477513, KX772408 a KX772409), *A. altimontana* v 96,09 % (MH879011), *A. cepistipes* v 96,05-95,90 % (KX151931 a KX151932) a *A. tabescens* v 92,59 % (JF313113). Srovnání consensus sekvence *Armillaria ostoyae* s ostatními václavkami r. *Armillaria* je zobrazeno na obrázku 17.



Obrázek 17: Porovnání úseku genu *EF 1-α* s ostatními druhy václavek r. *Armillaria* vůči consensus sekvenci *Armillaria ostoyae*

Srovnání consensus sekvence *Armillaria cepistipes EF 1-α* genu se shoduje s ostatními sekvencemi u *Armillaria cepistipes* ve 100 – 99,80 % (KX151931 a KX 151932). Další

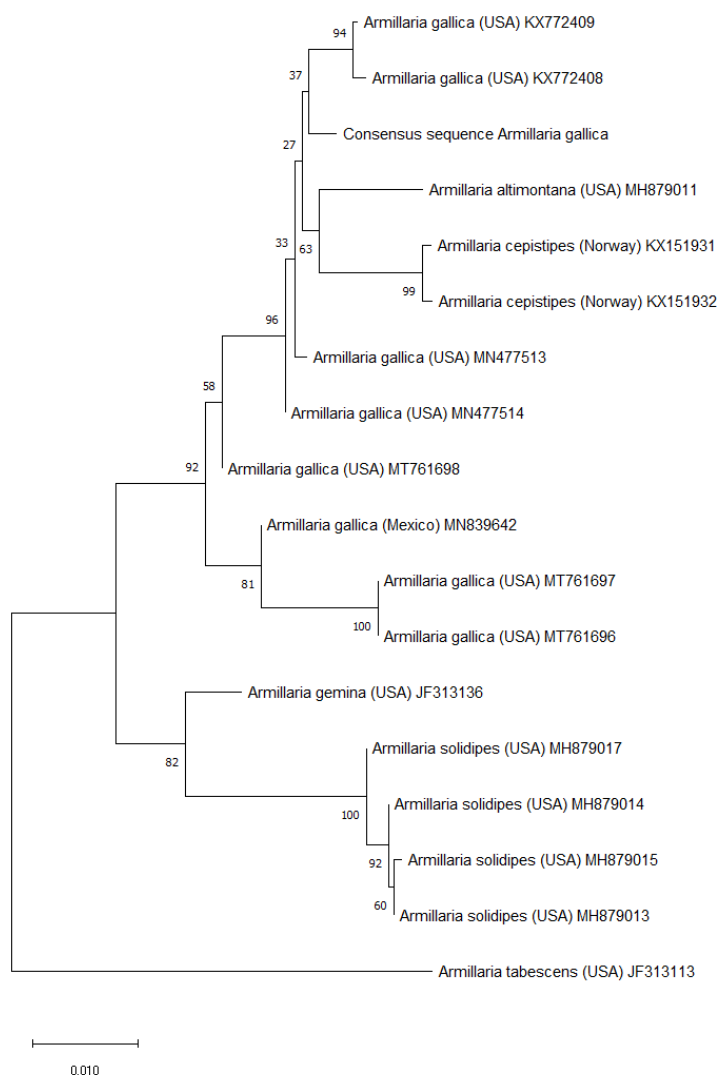
druhy *Armillaria* zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu v této sekvenci – *Armillaria gallica* v 98,83 – 95,70 % (MT761696, MT761697, MN839642, MT761698, MN477514, MN477513, KX772408 a KX772409), *A. altimontana* v 98,05 % (MH879011), *A. gemina* v 96,18 % (JF313136), *A. solidipes* v 95,13 – 94,93 % (MH879017, MH879014, MH 879015 a MH879013) a *A. tabescens* v 92,40 % (JF313113). Srovnání consensus sekvence *Armillaria cepistipes* s ostatními václavkami r. *Armillaria* je zobrazeno na obrázku 18.



Obrázek 18: Porovnání úseku genu *EF 1-α* s ostatními druhy václavek r. *Armillaria* vůči consensus sekvenci *Armillaria cepistipes*

Úsek *EF 1-α* se shoduje s consensus sekvencí *Armillaria gallica* a ostatními sekvencemi u *Armillaria gallica* v 99,22-96,09 % (MT761696, MT761697, MN839642, MT761698, MN477514, MN477513, KX772408 a KX772409), *A. gemina* v 96,79 %

(JF313136), *A. solidipes* v 95,52 – 95,13 % (MH879017, MH879014, MH 879015 a MH879013) a *A. tabescens* v 93,00 % (JF313113). Srovnání consensus sekvence *Armillaria gallica* s ostatními václavkami r. *Armillaria* je zobrazeno na obrázku 19.



Obrázek 19: Porovnání úseku genu *EF 1-α* s ostatními druhy václavek r. *Armillaria* vůči consensus sekvenci *Armillaria gallica*

4.3 Analýza sekvencí pro *EF 1-α*

Z osekvenovaných vzorků václavek Sangerovou metodou se vytvořil alignment a bylo detekováno několik bodových polymorfismů. Alignment několika druhů václavek je součástí přílohy (příloha 1), kde na základě rozdílných pozic bází můžeme od sebe rozlišit jednotlivé druhy, tečky značí stejné nukleotidy.

4.3.1 Analýza úseku *EF 1-α* u *Armillaria ostoyae*

Při porovnávání nukleotidových sekvencí zkoumaných *Armillaria ostoyae* bylo odhaleno několik bodových mutací (obrázek 20). Na pozici 47 došlo k heterozygotní substituci G/A u *A. ostoyae* z lokalit Nýdek, Paseky, Hradec, Harta, Luhy a Hlubočec. Na pozici 47 došlo také k substituci z G na A u *A. ostoyae* pocházející z lokalit Paseky a Polom. U *A. ostoyae* z lokality Hlubočky a Poodří došlo na 131. pozici k heterozygotní substituci A/G. Na 167. pozici došlo k heterozygotní substituci G/A u *A. ostoyae* pocházejících z lokalit Nýdek, Paseky, Poodří, Polom, Hradec, Harta, Luhy a Hlubočec. Na 167. pozici byla také zaznamenána substituce z G na A u *A. ostoyae* pocházející z lokality Paseky. Na pozici 224 došlo k heterozygotní substituci G/A u *A. ostoyae* pocházející z Luhů. U *A. ostoyae* pocházející z lokality Luhy byla nalezena heterozygotní substituce G/A na pozici 300, na pozici 330 heterozygotní substituce T/C. Na 334. pozici došlo k heterozygotní substituci A/G u *A. ostoyae* pocházejících z lokalit Harta a Luhy. U *A. ostoyae* pocházejících z Harty a Luhů byla na 421. pozici detekována heterozygotní substituce A/G. Na pozici 454 došlo k substituci z T na C u *A. ostoyae* pocházejících z Nydku, Poodří, Polomu, Hradce, Luhů a Hluboce. Na pozici 490 byla detekována heterozygotní substituce G/A u *A. ostoyae* z Luhů.

	47	131	167	224	300	330	334	421	454	490
938_A.ostoyae_Hlubočky	GACGAAAC	GCRGT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
934_A.ostoyae_Hlubočky	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
895_A.ostoyae_Nydek	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
892_A.ostoyae_Nydek	GACRAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
890_A.ostoyae_Nydek	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
878_A.ostoyae_Paseky	GACAAAC	GCA GT	CCAAAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
857_A.ostoyae_Paseky	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
853_A.ostoyae_Paseky	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
837_A.ostoyae_Pood	GACGAAAC	GCRGT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATCCG	GACGG	
831_A.ostoyae_Pood	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
830_A.ostoyae_Pood	GACGAAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
813_A.ostoyae_Polom	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
810_A.ostoyae_Polom	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATCCG	GACGG	
804_A.ostoyae_Polom	GACAAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
802_A.ostoyae_Hradec	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
783_A.ostoyae_Hradec	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	
770_A.ostoyae_Hradec	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
761_A.ostoyae_Harta	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
759_A.ostoyae_Harta	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTRGT	CATTCCG	GACGG	
755_A.ostoyae_Harta	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
746_A.ostoyae_Luhy	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATCCG	GACGG	
744_A.ostoyae_Luhy	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTRGC	GCR T	CYTTCRAC	GTRGT	CATTCCG	GACRG	
740_A.ostoyae_Luhy	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATCCG	GACGG	
915_A.ostoyae_Hluboce	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATTCCG	GACGG	
913_A.ostoyae_Hluboce	GACGAAAC	GCA GT	CCGAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATCCG	GACGG	
905_A.ostoyae_Hluboce	GACRAAC	GCA GT	CCRAT	TTGGC	GCGT	CTTCAAC	GTAGT	CATYCCG	GACGG	

Obrázek 20: Nukleotidové substituce oblasti *EF 1-α* pro *Armillaria ostoyae*

Získané sekvence *EF 1-α* pro *Armillaria ostoyae* byla použita pro vytvoření dendrogramu (obrázek 23).

4.3.2 Analýza úseku *EF 1-α* u *Armillaria gallica*

Při porovnávání sekvencí zkoumaných *Armillarií gallica* pro oblast *EF 1-α* bylo odhaleno několik bodových mutací (obrázek 21). Na 95. pozici u *A. gallica* sbírané u Hradce byla nalezeny heterozygotní substituce C/T. Na 292. pozici byla odhalena heterozygotní substituce G/A. Na pozici 376. byla nalezena heterozygotní substituce C/T. Na pozici 466. byla odhalena heterozygotní substituce A/G.

	95	292	376	466
787_A.gallica_Hradec	T T Y T C A	A T R C A	C Y T G	A T R A T
814_A.gallica_Polom	T T C T C A	A T G C A	C C T G	A T A A T
815_A.gallica_Polom	T T C T C A	A T G C A	C C T G	A T A A T
816_A.gallica_Polom	T T C T C A	A T G C A	C C T G	A T A A T
817_A.gallica_Polom	T T C T C A	A T G C A	C C T G	A T A A T

Obrázek 21: Nukleotidové substituce z oblasti *EF 1-α* pro *Armillaria gallica*

Získané sekvence *EF 1-α* pro *Armillaria gallica* byla použita pro vytvoření dendrogramu (obrázek 23).

4.3.3 Analýza úseku *EF 1-α* u *Armillaria cepistipes*

Při porovnávání nukleotidových sekvencí zkoumaných *Armillaria cepistipes* bylo odhaleno několik bodových mutací (obrázek 22). Na 14. pozici u *A. cepistipes* sbírané v Hartě došlo k substituci A/G. Na pozici 56 u *A. cepistipes* pocházející z lokality Harta byla nalezena heterozygotní substituce A/G. U *A. cepistipes* sbírané v lokalitě Hlubočky a Paseky byla detekována heterozygotní substituce A/G na pozici 143. Na 206. pozici byla detekována heterozygotní substituce G/A u *A. cepistipes* sbíraných v Nydku, Pasekách, Hartě a Hlubočci. U *A. cepistipes* pocházející z Harty byla na pozici 224 nalezena heterozygotní substituce A/G a na pozici 331 heterozygotní substituce T/G.

	14	56	143	206	224	331
950_A.cepistipes_Hlubocky	T A A G	G G A C T	G T C R A	T T G A	A G C A	C T T
931_A.cepistipes_Hlubocky	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T G A	A G C A	C T T
897_A.cepistipes_Nydek	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T R A	A G C A	C T T
887_A.cepistipes_Nydek	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T G A	A G C A	C T T
870_A.cepistipes_Paseky	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T R A	A G C A	C T T
866_A.cepistipes_Paseky	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T R A	A G C A	C T T
859_A.cepistipes_Paseky	T A A G	G G A C T	G T C R A	T T G A	A G C A	C T T
796_A.cepistipes_Hradec	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T G A	A G C A	C T T
774_A.cepistipes_Hradec	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T G A	A G C A	C T T
752_A.cepistipes_Harta	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T R A	R G C A	C K T
749_A.cepistipes_Harta	T R A G	G G R C T	G T C A A	T T R A	R G C A	C K T
712_A.cepistipes_Hlubocec	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T R A	A G C A	C T T
706_A.cepistipes_Hlubocec	T A A G	G G A C T	G T C A A	T T G A	A G C A	C T T

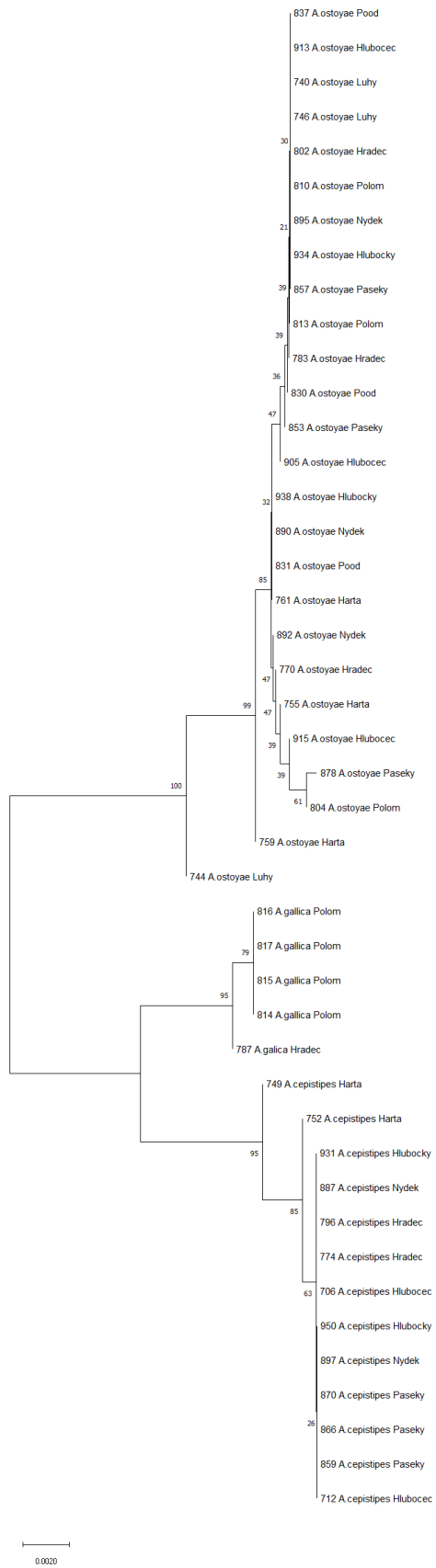
Obrázek 22: Nukleotidové substituce oblasti *EF 1- α* pro *Armillaria cepistipes*

Získané sekvence *EF 1- α* pro *Armillaria cepistipes* byla použita pro vytvoření dendrogramu (obrázek 23).

4.3.4 Fylogenetické vztahy napříč testovanými václavkami

Z analyzovaných sekvencí genu *EF 1- α* pro václavky rodu *Armillaria* byl zkonstruován fylogenetický strom (obrázek 23). Sekvence v dendrogramu jsou označeny taxonomickým názvem a geografickým původem. Fylogenetická analýza 512 bp dlouhé sekvence genu *EF 1- α* rozeznala 3 druhy rodu *Armillaria*: *A. ostoyae*, *A. cepistipes* a *A. gallica*.

Dendrogram rozdělil na základě *EF 1- α* *A. ostoyae* do třech linií. V první linii je zařazena pouze *A. ostoyae* z Luhů a v druhé linii *A. ostoyae* z Harty. V třetí linii jsou zaznamenány *A. ostoyae* pocházející z lokalit Poodří, Hlubočec, Luhy, Hradec, Polom, Nydek, Hlubocky, Paseky a Harta. *A. gallica* na základě *EF 1- α* byla v dendrogramu rozdělena do dvou linií. V první linii je rozpoznána *A. gallica* z Hradce a v druhé linii *A. gallica* z Polomu. Dendrogram rozeznal tři linie *A. cepistipes*. V první a druhé linii je zařazena *A. cepistipes* z Harty. V třetí linii jsou zařazeny *A. cepistipes* pocházející z lokalit Hlubocky, Nydek, Hradec, Hlubočec a Paseky.



Obrázek 23: Dendrogram *EF 1- α* pro analyzované václavky rodu *Armillaria* (Neighbour-Joining, Pairwise deletion, Bootstrap 1000).

5 Diskuse

O molekulární identifikaci václavek rodu *Armillaria* již bylo vydáno mnoho publikací. Zlatým standardem v identifikaci hub je *ITS* region, ten však v identifikaci václavek neposkytuje dostatečné určení jednotlivých druhů. Stejně tak oblast *IGS-1*. Jak uvádí Sicoli et al. (2003) tyto výše zmíněné markery nedostatečně rozlišují evropské druhy václavek jako je *Armillaria gallica* a *Armillaria cepistipes*.

Tato diplomová práce byla inspirována článkem z roku 2003 od autorů Kauserud a Schumacher, kteří vhodně použili k identifikaci stopkovýtrusných hub (*Basidiomycetes*) marker translační elongační faktor $1-\alpha$. Jak uvádí i Coetzee et al. (2018) *EF 1- α* se jeví jako ideální nástroj pro fylogenetickou analýzu václavek, kde je potřeba odvodit vztahy mezi jednotlivými druhy ve stejné zeměpisné šířce. Na základě článku Kauseruda a Schumachera byly vhodně zvoleny primery EF1160F a EF1750R k determinaci václavek analyzovaných v této diplomové práci.

Na základě variability genu *EF 1- α* byly analyzovány václavky v suchem postižených lokalitách na území v České republice. Podle změn v sekvenci genu *EF 1- α* byly rozlišeny tři druhy václavek: *Armillaria ostoyae*, *Armillaria cepistipes* a *Armillaria gallica*. Úspěšně se podařilo rozlišit i blízce fylogeneticky příbuzné *Armillaria gallica* a *Armillaria cepistipes*. Identifikace těchto druhů na základě markeru *EF 1- α* byla zaznamenána v publikacích např. od Maphosa et al. (2009) a Antonín et al. (2009).

Překvapením byl výskyt identifikované *Armillaria gallica* v lokalitě Polom. Přestože se jedná o lokalitu s vyšší nadmořskou výškou, byla zde identifikována václavka, která se převážně vyskytuje v nížinách (Jankovský, 2003). Jak uvádí autoři Marçais a Breda (2006) *Armillaria gallica* je považována za oportunní patogen a to hlavně na suchem stresových oblastech, což studované oblasti byly.

Velice důležitou otázkou v případě molekulární identifikace václavek představuje zvolená technika izolace kvalitní DNA. V tomto případě byla vhodně vybrána metoda izolace CTAB-PVP. Předností této metody je vysoká výtěžnost a čistota DNA, která je nezbytná k molekulárním analýzám. Jedná se o méně finančně náročnou metodu izolace DNA oproti komerčně dostupným kitům. Je sice pracnější, ale kompromisem je vysoká kvalita DNA.

Optimalizace PCR k detekci genu *EF 1- α* proběhla úspěšně. Odlišnost byla v teplotním profilu PCR v teplotě nasedání primerů uvedeného v článku Kauserud a Schu-

macher (2003). Autoři uvádí jako optimální teplotu pro nasedání primerů 55 °C. Optimalizace PCR byla provedena s teplotou annealingu 45 °C. Teplotní rozdíl mohl být způsobený rozdílnými laboratorními podmínkami, použitím jiného cykleru nebo použitím reagensů od různých dodavatelů k přípravě reakční směsi. V této diplomové práci byl použit master mix PPP (Top-Bio). Výhodou tohoto komerčně dostupného mastermixu je obsah všech nezbytných složek k PCR reakci, není potřeba smíchávat jednotlivé složky a minimalizuje se tak i riziko kontaminace. Mimo jiné obsahuje barvivo, které usnadňuje manipulaci při nanášení vzorků na gel.

Úspěšně naamplifikované fragmenty po PCR bylo potřeba osekvenovat. Před samotným posláním vzorků do externí laboratoře SeqMe s.r.o. k sekvenováním bylo potřeba naamplifikované fragmenty ošetřit speciálními hydrolytickými enzymy. Funkcí těchto hydrolytických enzymů je odstranit primery a zbytky nukleotidů, které mohou způsobit potíže při samotné sekvenaci. V této diplomové práci byly fragmenty ošetřeny komerčním kitem ExoSap-IT (Thermo Fisher Scientific). Po přečištění vzorků došlo k přidání primeru v požadovaném směru sekvenování.

Před samotnou analýzou sekvencí genu *EF 1-α* václavek rodu *Armillaria* za účelem zjištění nukleotidových změn bylo provedeno srovnání consensus sekvence *A. ostoyae*, *A. gallica* a *A. cepistipes* s databází GenBank pomocí algoritmu BLAST. Do porovnání byly zařazeny pouze dostupné sekvence požadovaného úseku genu *EF 1-α* druhů *Armillaria* z databáze GenBank.

Srovnání úseku *EF 1-α* consensus sekvence *Armillaria ostoyae* vykazovalo nejvyšší shodu s *A. gemina* a to v 98,40 %. Další druhy zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu a to v rozmezí 97,66-92,59 %.

Srovnání úseku *EF 1-α* consensus sekvence *Armillaria gallica* vykazovalo nejvyšší shodu s *A. gallica* a to v 99,22-96,09 %. Další druhy zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu a to v rozmezí 96,79-93,00 %.

Srovnání úseku *EF 1-α* consensus sekvence *Armillaria cepistipes* vykazovalo nejvyšší shodu s *A. cepistipes* a to ve 100-99,80 %. Další druhy zařazené do porovnání vykazovaly nižší shodu a to v rozmezí 98,83-92,40 %.

Došlo k analýze sekvencí genu *EF 1-α* václavek rodu *Armillaria* za účelem zjištění změn ve studované oblasti. Ve studované oblasti genu bylo nalezeno několik nukleotidových mutací. Však pouze některé z nich mohou způsobit změnu v sekvenci aminokyselin a ty pak mohou mít vliv na výsledný exprimovaný protein. Tyto aminokyselinové změny tak mohou ovlivňovat virulenci jednotlivých druhů václavek. Aby

tato hypotéza byla potvrzena, bylo by však potřeba víceleté analýzy jednotlivých mutací ve studovaných populacích.

V alignmentu oblasti genu *EF 1- α* u studovaných václavek *Armillaria ostoyae* bylo celkem zaznamenáno deset polymorfních míst, kde docházelo k nukleotidovým mutacím. Jednalo se o pozice 47, 131, 167, 224, 300, 330, 334, 421, 454 a 490.

U analyzovaných václavek *Armillaria gallica* byla v alignmentu oblasti genu *EF 1- α* nalezena čtyři polymorfní místa, kde byly zaznamenány nukleotidové mutace. Jednalo se o pozice 95, 292, 376 a 466.

V alignmentu oblasti genu *EF 1- α* u analyzovaných václavek *Armillaria cepistipes* bylo celkem zaznamenáno šest polymorfních míst, v nichž byly nalezeny nukleotidové mutace. Jednalo se o pozice 14, 56, 143, 206, 224 a 331.

Na základě genu *EF 1- α* byl vytvořen fylogenetický strom ze sekvencí analyzovaných václavek rodu *Armillaria*.

Fylogenetická analýza 512 bp dlouhé sekvence genu *EF 1- α* rozeznala v dendrogramu 3 druhy rodu *Armillaria*: *A. ostoyae*, *A. cepistipes* a *A. gallica*.

Dendrogram rozdělil na základě *EF 1- α* *A. ostoyae* do třech linií. *A. gallica* na základě *EF 1- α* byla v dendrogramu rozdělena do dvou linií. Dendrogram rozeznal tři linie *A. cepistipes*.

Byla potvrzena hypotéza vhodnosti použití genu *EF 1- α* jako molekulárního markeru k fylogenetické analýze druhů ve stejné zeměpisné lokalitě jak uvedl Coetzee et al. (2018).

6 Závěr

Během posledních let dochází vlivem nepříznivých klimatických podmínek k zhoršenému stavu smrkových lesů v České republice. Výrazně se na tomto faktu podílejí fytopatogenní houby jako je i václavka. Identifikace jednotlivých druhů a následné zjištění virulence je jeden z hlavních bodů v ochraně lesního hospodářství.

Cílem této diplomové práce byla identifikace václavek na molekulární úrovni ze vzorků sbíraných v suchem poškozených lesích v ČR. Tento cíl byl naplněn – došlo k identifikaci václavek podle variability genu pro translační elongační faktor *EF 1- α* .

V průběhu výzkumu bylo odhaleno několik nukleotidových mutací, které mohou vést ke změně aminokyselinové sekvence. Tyto změny tak mohou ovlivňovat virulenci jednotlivých druhů václavek. V potvrzení této hypotézy by bylo však potřeba víceleté detekování jednotlivých mutací v jednotlivých populacích.

Dokud nebude objasněn mechanismus virulence jednotlivých druhů václavek a navrhuta jiná ochranná opatření, zůstává nejdůležitější metodou ochrany lesních porostů efektivní změna dřevinné skladby ve prospěch přirozených dřevin.

Tato práce vznikla v rámci projektu NAZV QK1920412 „Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů proti václavkám“.

7 Seznam použité literatury

Anderson, J.B. a Stasovski, E. (1992). Molecular Phylogeny of Northern Hemisphere Species of *Armillaria*. *Mycologia*, 84(4):505-516.

Antonín, V. a Bieberová, Z. (1995). *Chráněné houby ČR*. První vydání. MŽP ČR a Agentura OPK ČR, Praha. ISBN 80-85368-77-3.

Antonín, V. et al. (2009). Morphological and molecular characterization of the *Armillaria cepistipes* – *A. gallica* complex in the Czech Republic and Slovakia. *Mycological Progress*, 8(3):259-271.

Antonín, V. a Tomšovský, M. (2010). Václavky – známé neznámé houby. *Živa*, 6:254-255.

Atkinson, M. R. et al. (1969). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by a 2',3'-dideoxyribonucleotide. *Biochemistry*, 8(12):4897–4904.

Baumgartner, K. et al. (2011). Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Biology*, 12:515-534.

Brazee, N.J. et al. (2011). Evaluation of partial *tefl*, *rpb2*, and *nLSU* sequences for identification of isolates representing *Armillaria calvescens* and *Armillaria gallica* from northeastern North America. *Fungal Biology*, 115(8):741-749.

Bustin, S. A. (2004). *A-Z of quantitative PCR*. První vydání. International University Line. ISBN 9780963681782.

Coetzee, M.P.A. et al. (2018). *Armillaria* Root-Rot Pathogens: Species Boundaries and Global Distribution. *Pathogens*, 7(4):83.

Cox, K.K. at al. (2004). *Armillaria* root and crown rot. Southeastern Peach Growers Handbook. [online] College of Agricultural and Environmental Sciences University of

Georgia [cit. 10. 4. 2021]. Dostupné z: http://www.ent.uga.edu/Peach/peach_handbook/armillaria.htm

Clark, D.P. (2005). *Molecular biology: Understanding the genetic revolution*. Druhé vydání. Academic Cell. ISBN 0121755517.

Čurn, V. et al. (2019). *Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

Djernæs, M. a Damgaard, J. (2005). Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 64(1):45-52.

Erlich, H. A. (1989). *PCR Technology: Principles and applications for DNA amplifications*. První vydání. Palgrave Macmillan. ISBN 0333489489.

Holec, J. a Beran, M. (2006). *Červený seznam hub (makromycetů) České republiky*. 24. vydání. Příroda, Praha. ISBN 80-87051-02-5.

Jančařík, V. a Jankovský, L. (1999). Václavka stále aktuální. *Lesnická práce*, 78(6): 414-417.

Jankovský, L. (1997). *Biology of Armillaria sp.: Ecology and phytopathology of Armillaria species*. Disertační práce. Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta.

Jankovský, L. (2003). Distribution and ecology of *Armillaria* species in some habitats of southern Moravia, Czech republic. *Czech Mycology*, 55:73-186.

Jankovský, L. et al. (2005). *Základy anatomie a fyziologie stromů*. Metodika. Český svaz ochránců přírody.

Jankovský, L. a Scháněl, L. (1997). *Význam a možnosti využití dřevokazných hub při biologickém odbourávání látek v lese*. Mendelova univerzita v Brně, Lesnická a dřevařská fakulta.

Kauserud, H. a Schumacher, T. (2003). Ribosomal DNA variation, recombination and inheritance in the basidiomycete *Trichaptum abietinum*: implications for reticulate evolution. *Heredity*, 91:163-172.

Khanacademy.org (2021). *DNA sequencing*. [online] [cit. 17. 4. 2021]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-biotechnology/a/dna-sequencing>

Knížek, M. a Liška, J. (2020). Výskyt lesních škodlivých činitelů v roce 2019 a jejich očekávaný stav v roce 2020. *Zpravodaj ochrany lesa Supplementum*, 4:51-61.

Křístek, J. a Urban, J. (2013). *Lesnická entomologie*, Druhé vydání, Academia, Praha. ISBN 978-80-200-2237-0.

Kulski, J.K. (2016). *Next-Generation Sequencing - An Overview of the History, Tools, and "Omic" Applications*. InTech. ISBN 978-953-51-2240-1.

Maheshwari, R. (2005). The largest and oldest living organism. *Resonance*, 10(4):4-9.

Maphosa, L. et al. (2006). Phylogenetic relationships among *Armillaria* species inferred from partial elongation factor 1-alpha DNA sequence data. *Australasian Plant Pathology*, 35:513-520.

Marçais, B. a Bréda, N. (2006). Role of an opportunistic pathogen in the decline of stressed oak trees. *Journal of Ecology*, 94(6):1214-1223.

Matheny, P.B. et al. (2007). Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43:430-451.

Ogura-Tsujita, Y. et al. (2021). Evolutionary histories and mycorrhizal associations of mycoheterotrophic plants dependent on saprotrophic fungi. *Journal of plant research*, 134(1):19–41.

Pešková, V. a Soukup, F. (2013). Škody působené václavkou v smrkových porostech severní Moravy a Slezska. *Lesnická práce*, 6:20-24.

Sanger, F. et al. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5463–5467.

Schwarze, F.W.M.R. et al. (2000). *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. ISBN 978-3-642-57302-6.

Sicoli, G. et al. (2003). Development of species-specific PCR primers on rDNA for the identification of European *Armillaria* species. *Forest Pathology*, 33(5):287-297.

Sierota, Z. a Grodzki, W. (2020). *Picea abies–Armillaria–Ips*: A Strategy or Coincidence?. *Forests*, 11(9):1023.

Sipos, G. et al. (2018). *Armillaria*. *Current Biology*, 2;28(7):297-298.

Smith M. et al. (1992). The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organism, *Nature*, 356:428-431.

Snustad, D. P. et al. (2009). *Genetika*. První vydání. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 978-80-210-4852-2.

Sochor, M. a Egertová, Z. (2015). Bioluminiscence hub - odvěký a stále záhadný fenomén. *Živa*, 6:282-284.

Šmarda, J. et al. (2005). *Metody molekulární biologie*. První vydání. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-3841-1.

Vasaitis, R. et al. (2008). Stump removal to control root rot in forest stand. *Silva Fennica*, 42(3):457-473.

Zíbarová, L. (2014). *Armillaria ectypa*. [online] Mykologie.net [cit. 17. 4. 2021]. Dostupné z: <http://mykologie.net/index.php/houby/podle-morfologie/lupe-nate/item/1579-armillaria-ectypa>

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Armillaria ostoyae</i> (Antonín a Tomšovský, 2010).....	11
Obrázek 2: <i>Armillaria mellea</i> (Antonín a Tomšovský, 2010)	11
Obrázek 3: <i>Armillaria borealis</i> (Antonín a Tomšovský, 2010).....	12
Obrázek 4: <i>Armillaria gallica</i> , syn. <i>bulbosa</i> (Antonín a Tomšovský, 2010).....	13
Obrázek 5: <i>Armillaria cepistipes</i> (Antonín et al., 2009).....	13
Obrázek 6: <i>Armillaria socialis</i> , syn. <i>tabescens</i> (Antonín et al., 2009)	14
Obrázek 7: <i>Armillaria ectypa</i> (Zíbarová, 2014).....	15
Obrázek 8: Charakteristické znaky kořenové hniloby způsobené václavkou (Sipos et al., 2018).....	16
Obrázek 9: Evidovaný objem smrkového václavkového dříví od roku 2001 (Knížek a Liška, 2020)	17
Obrázek 10: Evidovaný objem smrkového václavkového dříví v roce 2019 (Knížek a Liška, 2020)	17
Obrázek 11: Struktura genu <i>EF 1-α</i> s vazebnými místy pro primery EF1160F a EF 1750R (upraveno dle Maphosa et al., 2006)	19
Obrázek 12: Schéma Sangerova sekvenování (khanacademy.org, 2020).....	21
Obrázek 13: Mapa s lokalitami sběru václavek v Olomouckém a Moravskoslezském kraji	23
Obrázek 14: Grafické zobrazení identifikovaných václavek rodu <i>Armillaria</i> s počty nalezených jedinců ve zkoumaných lokalitách	28
Obrázek 15: Výsledek PCR zobrazen na 2% agarózovém gelu. M – 100 bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). NC – negativní kontrola. Vzorky 807, 810, 814, 815, 816 s výslednými amplikony o velikosti přibližně 590 bp.	29
Obrázek 16: Ukázka sekvenogramu <i>Armillaria ostoyae</i>	29
Obrázek 17: Porovnání úseku genu <i>EF 1-α</i> s ostatními druhy václavek r. <i>Armillaria</i> vůči consensus sekvenci <i>Armillaria ostoyae</i>	30
Obrázek 18: Porovnání úseku genu <i>EF 1-α</i> s ostatními druhy václavek r. <i>Armillaria</i> vůči consensus sekvenci <i>Armillaria cepistipes</i>	31
Obrázek 19: Porovnání úseku genu <i>EF 1-α</i> s ostatními druhy václavek r. <i>Armillaria</i> vůči consensus sekvenci <i>Armillaria gallica</i>	32
Obrázek 20: Nukleotidové substituce oblasti <i>EF 1-α</i> pro <i>Armillaria ostoyae</i>	33
Obrázek 21: Nukleotidové substituce z oblasti <i>EF 1-α</i> pro <i>Armillaria gallica</i>	34

Obrázek 22: Nukleotidové substituce oblasti <i>EF 1-α</i> pro <i>Armillaria cepistipes</i>	35
Obrázek 23: Dendrogram <i>EF 1-α</i> pro analyzované václavky rodu <i>Armillaria</i> (Neighbour-Joining, Pairwise deletion, Bootstrap 1000).....	36

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam vzorků k analýze <i>EF 1-α</i> genu	24
Tabulka 2: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci <i>EF 1-α</i> genu	26
Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce	26

10 Seznam použitých zkratek

A	adenin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
C	cytosin
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
ddNTPs	dideoxynukleotids
dNTP	deoxyribonukleotide
DNA	deoxyribonucleic acid
EF 1- α	elongation factor 1- α
G	guanin
IAA	isoamylalcohol
IGS-1	Intergenic Spacer Region 1
ITS	Internal Transcribed Spacer
MEA	Malt Extract Agar
mRNA	messenger RNA
NC	negative controle
PCR	polymerase chain reaction,
rpb2	RNA polymerase II gene
rRNA	ribosomal RNA
T	thymin
UV	ultraviolet

#938_A.ostoyae_Hlubocky	AGTCAGAAGC AACGTTTCCA CGACGAATAT CCTTGACTGA AACGTTCTTA TGCACCAGCG TCAGCAAATA ACGCATATAA TAAGTCAACT TTCAACGTAC TTGACGTTGA ACCCGACGTT	[360]
#934_A.ostoyae_Hlubocky	[360]
#895_A.ostoyae_Nydek	[360]
#892_A.ostoyae_Nydek	[360]
#890_A.ostoyae_Nydek	[360]
#878_A.ostoyae_Paseky	[360]
#857_A.ostoyae_Paseky	[360]
#853_A.ostoyae_Paseky	[360]
#837_A.ostoyae_Pood	[360]
#831_A.ostoyae_Pood	[360]
#830_A.ostoyae_Pood	[360]
#813_A.ostoyae_Polom	[360]
#810_A.ostoyae_Polom	[360]
#804_A.ostoyae_Polom	[360]
#802_A.ostoyae_Hradec	[360]
#783_A.ostoyae_Hradec	[360]
#770_A.ostoyae_Hradec	[360]
#761_A.ostoyae_Harta	[360]
#759_A.ostoyae_Harta	[360]
#755_A.ostoyae_Harta	[360]
#746_A.ostoyae_Luhý	[360]
#744_A.ostoyae_Luhý	[360]
#740_A.ostoyae_LuhýR.....Y.....R.....	[360]
#915_A.ostoyae_Hlubocec	[360]
#913_A.ostoyae_Hlubocec	[360]
#905_A.ostoyae_Hlubocec	[360]
#787_A.gallica_HradecG.....R.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#814_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#815_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#816_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#817_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#950_A.cepistipes_HlubockyA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#931_A.cepistipes_HlubockyA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#897_A.cepistipes_NydekA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#887_A.cepistipes_NydekA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#870_A.cepistipes_PasekyA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#866_A.cepistipes_PasekyA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#859_A.cepistipes_PasekyA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#796_A.cepistipes_HradecA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#774_A.cepistipes_HradecA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#752_A.cepistipes_HartaA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#749_A.cepistipes_HartaA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#712_A.cepistipes_HlubocecA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#706_A.cepistipes_HlubocecA.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[360]
#938_A.ostoyae_Hlubocky	GTCAACAGGG GAGCCTCTCT CAGCTGCTCT GTGGTGATT TCGACGACT TCACTCAGT AGTGACGTTA GAAGGAGCGA ABGTGACGAC CATTCCGGCC TTGATGATAC CAGTCTCAAC	[480]
#934_A.ostoyae_Hlubocky	[480]
#895_A.ostoyae_Nydek	[480]
#892_A.ostoyae_Nydek	[480]
#890_A.ostoyae_Nydek	[480]
#878_A.ostoyae_Paseky	[480]
#857_A.ostoyae_Paseky	[480]
#853_A.ostoyae_Paseky	[480]
#837_A.ostoyae_Pood	[480]
#831_A.ostoyae_Pood	[480]
#830_A.ostoyae_Pood	[480]
#813_A.ostoyae_Polom	[480]
#810_A.ostoyae_Polom	[480]
#804_A.ostoyae_Polom	[480]
#802_A.ostoyae_Hradec	[480]
#783_A.ostoyae_Hradec	[480]
#770_A.ostoyae_Hradec	[480]
#761_A.ostoyae_Harta	[480]
#759_A.ostoyae_Harta	[480]
#755_A.ostoyae_HartaR.....	[480]
#746_A.ostoyae_Luhý	[480]
#744_A.ostoyae_LuhýR.....	[480]
#740_A.ostoyae_Luhý	[480]
#915_A.ostoyae_Hlubocec	[480]
#913_A.ostoyae_Hlubocec	[480]
#905_A.ostoyae_Hlubocec	[480]
#787_A.gallica_HradecY.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#814_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#815_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#816_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#817_A.gallica_PolomG.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#950_A.cepistipes_HlubockyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#931_A.cepistipes_HlubockyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#897_A.cepistipes_NydekA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#887_A.cepistipes_NydekA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#870_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#866_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#859_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#796_A.cepistipes_HradecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#774_A.cepistipes_HradecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#752_A.cepistipes_HartaA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#749_A.cepistipes_HartaA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#712_A.cepistipes_HlubocecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#706_A.cepistipes_HlubocecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[480]
#938_A.ostoyae_Hlubocky	ACGACCGAGC GGCACAGTTC CAATACCACC GA	[512]
#934_A.ostoyae_Hlubocky	[512]
#895_A.ostoyae_Nydek	[512]
#892_A.ostoyae_Nydek	[512]
#890_A.ostoyae_Nydek	[512]
#878_A.ostoyae_Paseky	[512]
#857_A.ostoyae_Paseky	[512]
#853_A.ostoyae_Paseky	[512]
#837_A.ostoyae_Pood	[512]
#831_A.ostoyae_Pood	[512]
#830_A.ostoyae_Pood	[512]
#813_A.ostoyae_Polom	[512]
#810_A.ostoyae_Polom	[512]
#804_A.ostoyae_Polom	[512]
#802_A.ostoyae_Hradec	[512]
#783_A.ostoyae_Hradec	[512]
#770_A.ostoyae_Hradec	[512]
#761_A.ostoyae_Harta	[512]
#759_A.ostoyae_Harta	[512]
#755_A.ostoyae_Harta	[512]
#746_A.ostoyae_Luhý	[512]
#744_A.ostoyae_LuhýR.....	[512]
#740_A.ostoyae_Luhý	[512]
#915_A.ostoyae_Hlubocec	[512]
#913_A.ostoyae_Hlubocec	[512]
#905_A.ostoyae_Hlubocec	[512]
#787_A.gallica_HradecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#814_A.gallica_PolomA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#815_A.gallica_PolomA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#816_A.gallica_PolomA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#817_A.gallica_PolomA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#950_A.cepistipes_HlubockyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#931_A.cepistipes_HlubockyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#897_A.cepistipes_NydekA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#887_A.cepistipes_NydekA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#870_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#866_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#859_A.cepistipes_PasekyA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#796_A.cepistipes_HradecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#774_A.cepistipes_HradecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#752_A.cepistipes_HartaA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#749_A.cepistipes_HartaA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#712_A.cepistipes_HlubocecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]
#706_A.cepistipes_HlubocecA.....G.....A.....G.....T.....C.....TG.....	[512]