

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA



Bakalářská práce

**Využití molekulárních markerů pro hodnocení populační diverzity padlí
dubového v Evropě**

Martina Novotná

2006

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, za použití zdrojů, které cituji v příloženém seznamu literatury.

Martina Novotná

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří mi pomohli při vypracování bakalářské práce. Zejména děkuji panu doc. Ing. Vladislavu Čurnovi Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za odborné vedení, neocenitelné rady a připomínky při vypracování této práce.

Obsah:

1. Úvod	4
2. Literární přehled	5
2.1. Genetické markery	5
2.2. Molekulární DNA markery	5
3. Kategorie technik molekulárních markerů	6
3.1. Metody PCR s náhodnými primery	7
3.2. Techniky využívající hybridizaci bez použití PCR reakce	13
3.3. Single-locus PCR založené na amplifikaci známých cílových sekvencí	15
4. Elektroforéza nukleových kyselin	15
5. Způsoby vyhodnocení molekulárních markerů	18
6. Volba vhodného markeru pro specifické aplikace	19
7. Padlí dubové (<i>Microsphaera alphitoides</i>)	20
7.1. Taxonomické zařazení padlí dubového	20
7.2. Původ padlí dubového	20
7.3. Význam padlí dubového	21
7.4. Obecná charakteristika a rozmnožování houby	21
7.5. Symptomy napadení	24
7.6. Faktory ovlivňující výskyt padlí dubového	26
7.7. Ochrana	26
8. Materiál a metody	28
8.1. Odběr kleistotheциí padlí dubového	28
8.2. Izolace DNA	28
8.3. PCR-RFLP analýza	29
8.4. RAPD analýza	30
8.5. Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat	31
9. Výsledky	32
9.1. PCR-RFLP analýza	32
9.2. RAPD analýza	35
10. Diskuze	41
11. Závěr	43
12. Seznam použité literatury	44

1. Úvod

Cílem této bakalářské práce bylo hodnocení populační diverzity padlí dubového (*Microspheera alphitoides*) v Evropě pomocí molekulárních markerů a posouzení vhodnosti techniky molekulárních markerů pro tyto účely.

Padlí dubové není řazeno mezi hospodářsky významná onemocnění. Příčinou je fakt, že jen zřídka bývá znehodnocen veškerý materiál. Zde je třeba si uvědomit, že padlí dubové je jen jedním z mnoha škodlivých činitelů, kteří negativně působí na porosty dubů a negativně se projevuje zejména ve školkách. K působení padlí dubového se přidružují další patogenní organismy, herbivorní škůdci a nelze opomenout ani vliv abiotických faktorů a vliv člověka, který svou činností ovlivňuje prostředí. Výsledkem takového negativního působení klimatických vlivů, biotických činitelů a člověka je zhoršení zdravotního stavu a odolnosti dubů, na kterých pak padlí dubové způsobí větší škody. Může tak dojít k odumírání nejen semenáčků, ty jsou obecně více náchylné, ale i dospělých stromů, jinak více odolných. Ačkoli dříve byl výskyt padlí dubového ojedinělý a nedocházelo ke vzniku epidemií, dnes je situace zcela jiná. V evropských podmínkách se tomuto parazitu daří a začíná způsobovat vážné ekonomické škody. Velké problémy působí ve Francii, kde poškozují lanýžové plantáže, které jsou založené na přítomnosti dubů.

Abychom mohli regulovat výskyt patogena preventivním opatřením či přímo pomocí fungicidních přípravků, je zapotřebí jeho včasná detekce a identifikace. Zde se stále více uplatňují metody, které analyzují nukleové kyseliny, proteiny, lipidy a polysacharidy, což jsou makromolekuly, které nesou dostatečnou informaci ve svých sekvencích, aby poskytly jednoduchý, jednotný přístup ke studiu mikrobiální diverzity. Tyto metody pak nahrazují konvenční identifikační postupy, které jsou dosti pracné a zdlouhavé. Především se uplatňují molekulárně biologické metody, u kterých se předpokládá větší specifčnost, citlivost, lepší reprodukovatelnost výsledků a možnost rychlého testování rozsáhlého materiálu, přičemž pro analýzu odebíráme jen nepatrné množství tohoto materiálu.

Pro tyto účely se v dřívější době častěji užívaly proteinové markery. V současnosti se dává přednost DNA markerům pro jejich větší variabilitu, schopnost pokrýt větší část genomu a pro větší stálost vůči prostředí. Ve prospěch DNA markerů hovoří též rychlost a spolehlivost práce. Cílem práce bylo zavést a vyhodnotit techniku DNA markerů pro hodnocení diverzity kmenů padlí dubového získaných v rámci výzkumného projektu z oblastí Francie-Pyrenees, Bordeaux a Česká Republika-České Budějovice, Třeboňsko.

2. Literární přehled

2.1. genetické markery

Genetický marker, jinak nazývaný též signální gen, je označení pro určitý znak, který se jasně fenotypově projevuje a je jednoduše dědičně založen. Pro označení markerem musí být splněna podmínka spojení tohoto znaku genovou vazbou s jinými kvantitativními nebo kvalitativními znaky (Kukolíková, 2005).

V současné době jsou využívány genetické markery na úrovni biochemických markerů (proteinové markery-isoenzymy a zásobní bílkoviny, mastné kyseliny, sekundární metabolity) (Graman a Čurn, 1999). Ty však mají řadu nevýhod jako nízký polymorfismus isoenzymových systémů, a také skutečnost, že analyzují fenotyp příslušného organismu spíše než jeho genotyp (Čurn, 1999, Towner a Cockayne, 1993). Proto se do popředí dostávají molekulární DNA markery (Graman a Čurn, 1999).

2.2. Molekulární DNA markery

DNA markery jsou markery na úrovni molekuly DNA. Umožňují jednoduše určovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací) (Kukolíková, 2005).

Pomocí DNA markerů můžeme detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy, populacemi, klony, jedinci, buňkami. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány např. pro DNA fingerprinting při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, sledování určitých genů během šlechtitelských programů, genetické mapování, populační genetiku a populační gynekologii a při studiu evoluce na molekulární úrovni (fylogenetické analýzy, řešení taxonomických otázek). DNA markery jsou aplikovatelné u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA (Cano, 2000).

3. Kategorie technik molekulárních markerů

Většina molekulárních markerů spadá do jedné ze tří kategorií technik:

1. Techniky využívající hybridizaci bez použití PCR reakce:

Je to historicky první skupina molekulárních markerů, která byla používána od 70. let a v současné době je nahrazována technikami odvozenými od PCR. Jedná se o RFLP analýzu a metodu VNTR, která identifikuje minisatelity a mikrosatelity (Grant a Shoemaker, 1997).

2. Techniky založené na PCR reakci (multi-locus PCR a další techniky založené na využívání náhodných primerů):

Vývoj PCR metod od poloviny 80. let 20. století odstranil nezbytnost složitých hybridizačních kroků. Do této první kategorie amplifikačních metod můžeme seskupit všechny PCR techniky, které k amplifikaci DNA produktů (včetně produktů odvozených z RNA) používají náhodné primery. Společným znakem těchto technik je ten fakt, že nemusíme znát cílové sekvence DNA fragmentů. Různé metody z této kategorie se liší délkou a sekvencí použitých primerů, přísností PCR podmínek a metodou separace a detekce fragmentů (Karp a Edwards, 1997). Řadíme sem např. techniky RAPD, AFLP, SSR atd. (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

3. Techniky založené na PCR reakci (single-locus PCR založené na amplifikaci známých cílových sekvencí):

Pro metody PCR zaměřené na specifické single-lokusy je nezbytná znalost cílových sekvencí nebo sekvencí ohraničujících cílovou oblast (O'Malley a Whetten, 1997). Řadíme sem např. techniku PCR-RFLP (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

3.1. Metody PCR s náhodnými primery

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Podstatou této metody je *in vitro* amplifikace specifických fragmentů DNA, charakteristických pro patogena, kterého chceme detekovat a identifikovat (Kůdela et al., 2002).

Od roku 1985, kdy byla metoda popsána, se pro svou specifitu, citlivost (teoreticky může být detekována jedna kopie DNA ve vzorku) a rychlost používá nejen pro detekci a identifikaci patogenů, ale své uplatnění nachází i v soudnictví pro genetický fingerprinting, v lékařství pro prenatální diagnostiku genetických chorob, v detekci jednotlivých alel polymorfních lokusů, sekvenování DNA atd. (Kukolíková, 2005).

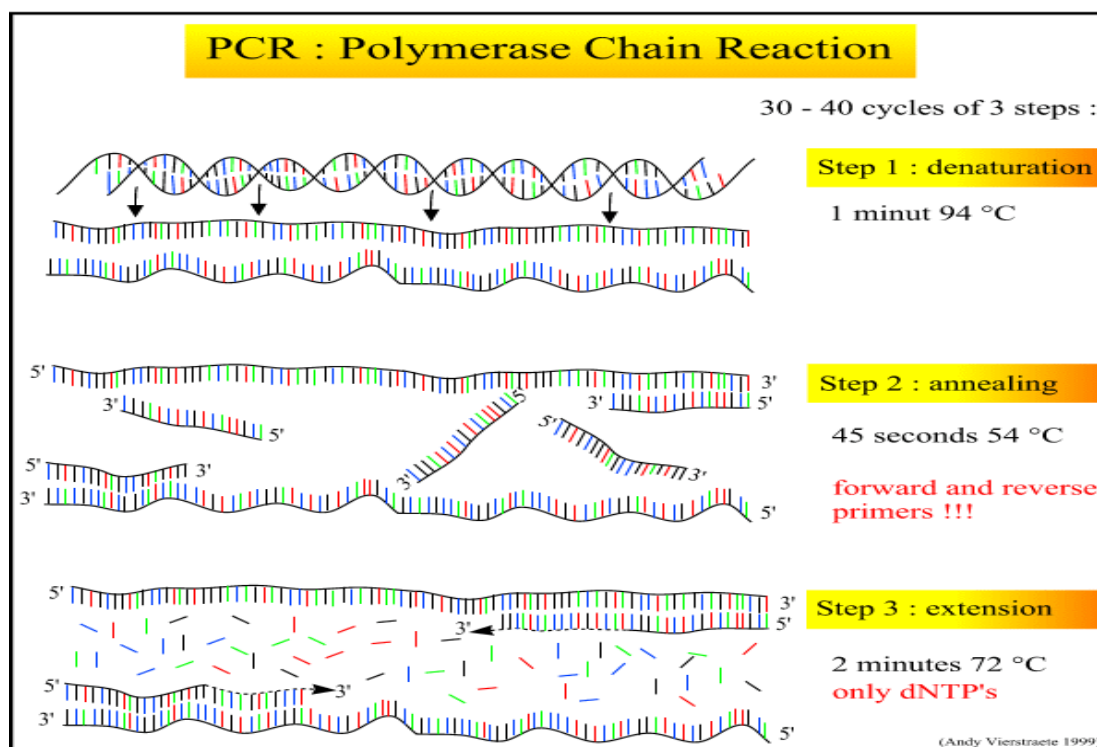
Směs, v níž polymerázová řetězová reakce probíhá, obsahuje templátovou DNA, zpravidla 2 různé primery, prekurzory DNA, termostabilní polymerázu a pufr s hořčnatými ionty. Primery jsou dva krátké jednořetězcové specifické „matricové“ oligonukleotidy odvozené z DNA definovaného kmene houby (Kůdela et al., 2002). Koncentrace a vzájemné poměry koncentrací templátu, prekurzorů i primerů a zejména hořčnatých iontů jsou pro průběh polymerázové řetězové reakce klíčové (Vondřejš a Storchová, 1997).

Amplifikace je založena na užití termostabilní DNA polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, nazývané *Taq* polymeráza. Bakterie *Thermus aquaticus* je schopná růstu i při 70-75°C. Purifikovaná polymeráza má optimální teplotu pro polymerizaci 70-80 °C. Při teplotách nad 90°C ztrácí svou aktivitu, není však denaturována a při snížení teploty se znovu stává aktivní (Hoelzel, 1992).

Celá reakce se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků, které jsou determinovány různými teplotními podmínkami:

- teplotní denaturace dsDNA
- teplotní hybridizace (annealing), neboli připojení primerů
- syntéza dvouřetězcové DNA

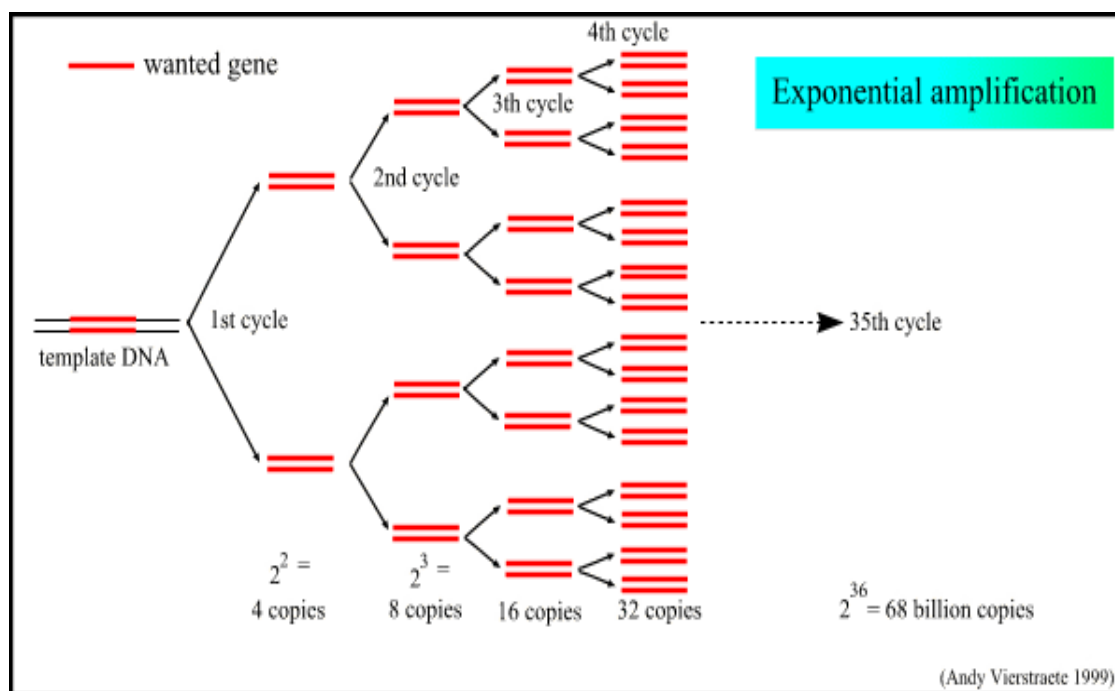
Obr. 1.: Teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků při polymerázové řetězové reakci



V prvním kroku dochází vlivem vysoké teploty (90-95°C) k denuraci dvouvláknové matricové DNA. Zchlazením reakční směsi na teplotu annealingu (35-65°C dle použitého primeru) se pro cílovou oblast specifické primery připojí k 5' koncům dvou jednovláknových matricových řetězců (Edel, 1998). V posledním kroku je teplota zvýšena na 72 °C a za přítomnosti teplotně stabilní DNA polymerázy a deoxynukleotidtrifosfátů, stavebních kamenů nukleové kyseliny, dochází k syntéze dvouřetězcové DNA (Kúdela et al., 2002). Každý krok trvá obvykle 1-2 minuty. Tento sled tří kroků odpovídá jednomu cyklu PCR. Celý proces se opakuje 30-50krát (Edel, 1998). PCR produkty jsou separovány na agarózovém gelu, DNA obarvena (ethidium bromid, SYBER Green, stříbro) a produkty jsou vizualizovány pod UV zářením (Hönig, 2005).

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly (obr. 2). Jelikož výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA (Šmarda et al., 2005).

Obr. 2.: Teoretická amplifikace cílového fragmentu DNA při zvyšujícím se počtu cyklů



PCR je technika s vysokou citlivostí a specifitou, ale právě tyto její vlastnosti mohou vést ke značným problémům, obzvláště když detekujeme virové či bakteriální geny pro diagnostické účely. Je důležité si připomenout, že nukleová kyselina z mrtvých, stejně tak jako z živých mikroorganismů nám dá pozitivní reakci. Dokonce i jediná molekula DNA může být amplifikována pomocí PCR, proto je nezbytné zabránit kontaminaci DNA vzorků molekulou amplifikované, nebo exogenní DNA. Už nepatrná kontaminace laboratorního skla, pipet, nebo jednotlivých složek PCR směsi může mít za následek falešnou pozitivní reakci. Takovéto problémy s kontaminací si vynucují potřebu extrémní čistoty a pečlivé kontroly. Amplifikační reakce by se měla odehrávat ve fyzické izolaci (např. v odlišné místnosti) od částí laboratoře, kde jsou přijímány vzorky a kde je izolována cílová DNA (Towner a Cockayne, 1993).

Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávovaných roztoků, fyzikální separaci používaných PCR-reagensů od templátové DNA a produktů PCR, přípravu reagensů i vzorků do alikvotních částí, používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše,

používání jednorázových rukavic, přidávání DNA do reakce jako poslední složky a pečlivou volbu pozitivních, negativních a vnitřních kontrol (Šmarda et al., 2005).

Dalším problémem je relativně velký počet chyb, který má na svědomí Taq polymeráza. Záměna bazí se objevuje přibližně 1 v každých 9000 bp a posun (frameshift) přibližně 1 v každých 40 000 bp (Tindall a Kunkel, 1988). Ačkoli se takové množství chyb může zdát nedůležité, mohou mít velký účinek na homogenitu amplifikovaných produktů (Towner a Cockayne, 1993).

Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD analysis)

Metoda RAPD je jednou z metod založených na PCR. K amplifikaci využívá jeden, nebo více primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA, které se váží na příslušná místa templátové DNA (Šmarda et al., 2005). Metoda detekuje malé převrácené nukleotidové sekvence roztroušené po celé genomické DNA. RAPD technika je u hub rozsáhle používána pro definici populací na úrovni druhu, rodu nebo kmene. Na druhové úrovni jsou RAPD data využívána pro produkci druhově specifických sond a primerů. V některých studiích jsou RAPD profily používány pro rozlišení individuálních izolátů v rámci druhu i mezi druhy. Často je metoda používána k determinaci odlišných vnitrodruhových skupin, jako jsou anastomózní skupiny u druhu *Rhizoctonia solani* (Duncans et al., 1993) a patogenní skupiny hub (Bidochka et al., 1994).

Princip metody je v tom, že dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálená a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'konci směřujícími k sobě. Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2000 bp) a rozdílným molárním množstvím, v závislosti na izolátu, ze kterého DNA pochází (Šmarda et al., 2005).

Je rozumné optimalizovat všechny parametry RAPD analýzy, především koncentraci DNA, koncentraci hořčičných iontů a primerů, podmínky PCR reakce (především teplotu annealingu) a typ a množství termostabilní DNA polymerázy.

Následující faktory ovlivňují reprodukovatelnost RAPD profilů uvnitř a mezi laboratořemi:

- **Koncentrace DNA** (existuje jistá kritická koncentrace genomové DNA a pokud jí nedosáhneme, RAPD amplifikace již není reprodukovatelná)
- **Reprodukovatelnost profilů z termocycleru** (v různých termocyclerech jsou odlišné teplotní podmínky)
- **Kvalita a koncentrace primerů** (kvalita primerů skladovaných v podobě zmražených roztoků se může zhoršit obzvláště když roztok často rozpouštíme a následně opět zmrazíme)
- **Koncentrace hořčnatých iontů** (*Taq* polymerázy mají odlišné požadavky na množství hořčnatých iontů. Pokud máme malou koncentraci hořčnatých iontů, dostaneme málo produktů. EDTA přítomná v pufru tvoří komplex s hořčíkem a snižuje tak účinnou koncentraci dostupných hořčnatých iontů)
- **Výběr DNA polymerázy**
- **Přesnost pipetování** (pipetování malých množství, zejména množství pod 3 μ l, může být zdrojem chyb. Mnohé pipety již nejsou přesné při nabírání množství pod 5 μ l. Proto je výhodnější pipetovat roztok pro více vzorků najednou) (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

Výsledné produkty amplifikace jsou obvykle tříděny podle velikosti na agarózovém gelu a následně jsou vizualizovány pomocí ethidium bromidu. Když použijeme stejný primer pro DNA z odlišných druhů, pozorujeme jedinečné vzory fragmentů. Když použijeme DNA z odlišných kmenů stejného druhu, vzory fragmentů jsou téměř stejné s výjimkou toho, že příležitostně amplifikovaný fragment je u jednoho kmene přítomen, zatímco u dalšího chybí. Tyto polymorfni fragmenty byly dědičné a vytvořily novou třídu genetických markerů-RAPD markery. Většina RAPD produktů, jsou výsledkem polymorfizmu, ke kterému došlo během amplifikace. Tyto polymorfizmy jsou výsledkem buď záměny nukleotidových bází na jednom z hlavních míst, nebo insercí či delecí v amplifikované oblasti (Phillips a Vasil, 2001).

Výhody metody RAPD:

1. nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA, postup je relativně jednoduchý a rychlý a pro vytvoření PCR produktů je potřeba pouze nanogramové množství DNA;

2. technika je upřednostňována pro rozlišení genotypů u mnoha druhů, populací nebo patotypů, RAPD markery mohou být též použity při analýze genotypů po křížení rodičů na různých taxonomických úrovních;

3. je to vhodný nástroj pro vytvoření genetických map a RAPD se osvědčila jako efektivní metoda pro identifikaci molekulárních markerů;

4. tato metoda je vhodná pro populační genetiku a je úspěšně používána pro rozlišení druhů a kmenů v rámci druhů u rostlin, bakterií, živočichů a hub.

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

Mikrosatelity (Simple Sequence Repeat-SSR analysis)

V eukaryotních genomech se v překvapivě hojném počtu vyskytují tandemová opakování velmi krátkých nukleotidových motivů, která se nazývají mikrosatelity. Tyto úseky genomové DNA jsou délkově polymorfní, tj. jejich délka se u jednotlivých individuí téhož druhu často liší. Přitom ale rozložení mikrosatelitů je v genomech konzervativní, což svědčí o jejich funkční významnosti. Pro své specifické vlastnosti jsou mikrosatelity vhodným nástrojem mapování genomů i analýz v populační genetice (Kypr a Vorlíčková, 1997).

Mikrosatelity jsou tedy krátké tandemové repetice složené z di-, tri- nebo tetranukleotidových motivů. Při stanovení genotypu se postupuje tak, že fragment s repetitivním motivem je amplifikován v polymerázové řetězové reakci za použití primerů se specifickým pořadím bází. Tím je identifikován daný lokus, protože uvedená repetitivní sekvence se v jaderné DNA vyskytuje mnohokrát. Produkty získané PCR reakcí se poté elektroforeticky rozdělí a stanoví se přítomnost jednotlivých alel, které díky rozdílné délce mají různou rychlost migrace v gelu (Řehout et al., 2000).

Mikrosatelity jsou vhodnými markery pro vazbové mapování genů a studium diverzity včetně určování otcovství (paternity) a rodičovství (parentity) (Kukolíková, 2005).

Mikrosatelitové markery se u hub používají hlavně u zástupců pododdělení *Ascomycotina* a *Basidiomycotina* pro účely populačních studií a pro detekci vnitrodruhového a mezidruhového polymorfizmu (Groppe et al., 1995; Hantula et al., 1996; Geistlinger et al., 1997; Khashnobish et al., 1999).

3.2. Techniky využívající hybridizaci bez použití PCR reakce

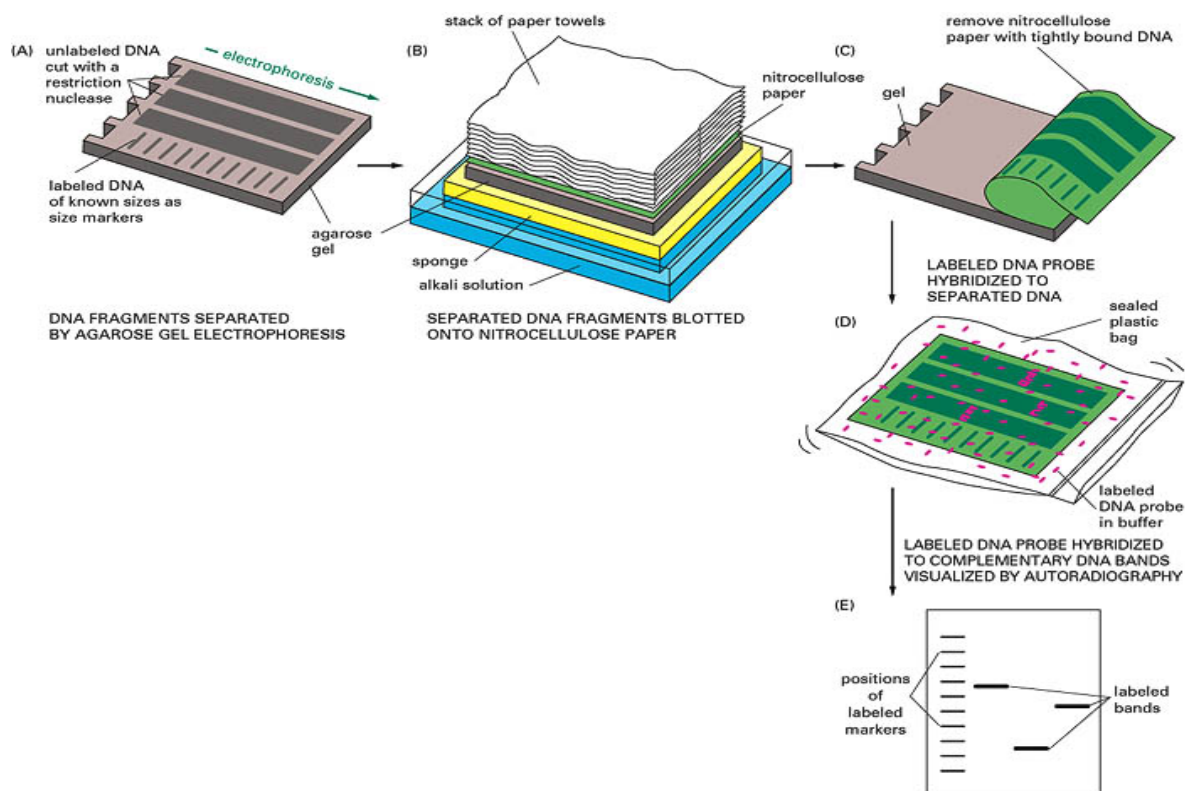
Analýza délkového polymorfizmu restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP Analysis)

RFLP analýza je metoda založená na restrikčním štěpení DNA, elektroforetické separaci fragmentů DNA a hybridizaci se specifickou sondou (Southernův přenos) (Grant a Shoemaker, 1997).

Typická analýza RFLP zahrnuje nejprve izolaci a purifikaci genomové nebo organelové DNA, poté následuje štěpení purifikované DNA restrikčními endonukleázami. Tyto enzymy štěpí DNA ve specifických místech na fragmenty různé délky (Kúdela et al., 2002). Restrikční endonukleázy používané v molekulární genetice pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávaná místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoliv zdroje (Alberts et al., 1998). Několik faktorů ovlivňuje endonukleázovou aktivitu, jsou to pH, koncentrace a typ iontů obsažených v pufru a teplota reakce (Hoelzel, 1992).

Rozštěpené fragmenty DNA lze rozdělit jednosměrnou elektroforézou v agarózových gelech, v nichž mají různě dlouhé fragmenty odlišnou pohyblivost. Použijeme-li ke štěpení určitou endonukleázu, můžeme podle shodnosti či odlišnosti restrikčních profilů usuzovat na shodnost či odlišnost analyzované genomové nebo organelové DNA. Restrikční analýze můžeme podrobit buď celý chromozom, nebo jen jeho určité sekvence DNA. Při analýze celého genomu je fragmentů obvykle mnoho a překrývají se, takže vyhodnocení je obtížné. Z tohoto důvodu se používají sondy, které umožní zviditelnit pouze ty fragmenty, které hybridizují s použitou sondou. Postup RFLP analýzy je naznačen na obr. 3.

Obr. 3.: DNA fragmenty separované elektroforézou v agarózovém gelu, jejich přetisk na porézní membránu a hybridizace s komplementárními DNA oligonukleotidovými sondami (Southern blot)



Uplatňuje se postup známý jako Southernův přenos. Denaturovaná DNA se přenáší z gelu na membránový filtr, na kterém pak může hybridizovat s komplementární sekvencí nukleové kyseliny (Kůdela et al., 2002).

Navzdory pracnosti je technika RFLP dosud považována, hlavně kvůli svému polymorfizmu, alelické informaci a robustnosti, jako jeden z nejvhodnějších markerů pro mapování.

3.3. Single-locus PCR založené na amplifikaci známých cílových sekvencí

Stanovení polymorfizmu délky restričních fragmentů u produktů PCR (PCR-RFLP)

PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu obsahujícího sekvenční polymorfizmus. V závislosti na volbě primerů může být provedena analýza jakéhokoliv genu.

Metoda PCR-RFLP se skládá ze dvou kroků:

1. amplifikace konkrétního úseku DNA pomocí dvojice známých primerů. Často se využívá primerů, které jsou komplementární k začátkům a koncům kódujících genů okolo nekódující intergenické oblasti. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které se detekují elektroforeticky.

2. restrikce (naštěpení) namnoženého úseku pomocí restričních endonukleáz, které specificky štěpí DNA. S použitím vhodné restriční endonukleázy získáme spektrum několika (až 8) fragmentů, které se liší počtem a velikostí podle druhu nebo kmene houby. Amplifikované produkty jsou opět analyzovány elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu (Šmarda et al., 2005).

Pro metodu PCR-RFLP jsou používány především ITS a IGS regiony, protože se vyznačují velkým polymorfizmem a snadností amplifikace pomocí PCR univerzálních primerů (Takamatsu, 1998).

4. Elektroforéza nukleových kyselin

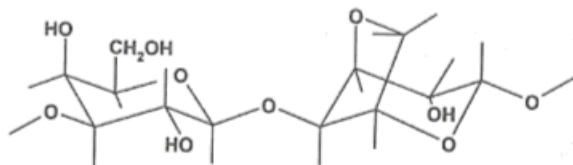
Elektroforéza je fyzikálně-chemická metoda separace látek založená na rozdílné rychlosti pohybu částic nesoucích elektrický náboj v elektrickém stejnosměrném poli. Rychlost pohybu závisí na náboji a velikosti částic (Kúdela et al., 2002). Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě-anodě (Šmarda et al., 2005).

Elektroforetická analýza vzorků izolované DNA poskytuje důležité informace o vlastnostech a čistotě DNA. Pomocí této metody můžeme zjistit, zda je vzorek kontaminován zbytky RNA, zda plazmidová DNA je kontaminována chromozomální DNA, zda izolovaná DNA má očekávanou konformaci a jaké je rozložení velikostí fragmentů izolované lineární DNA.

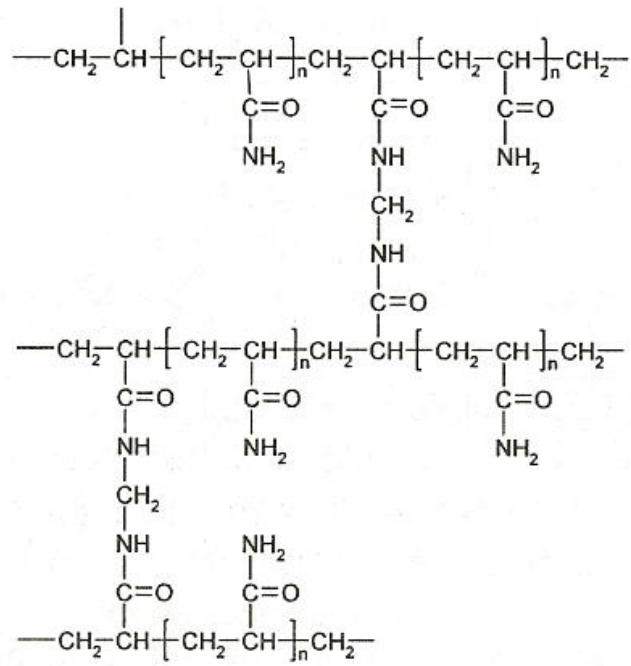
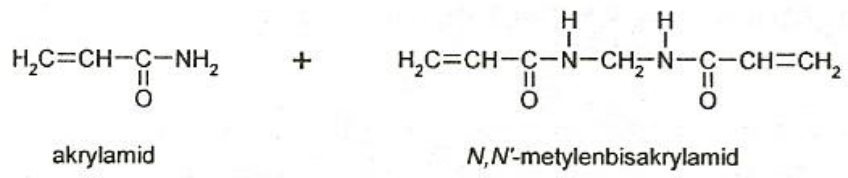
Pro elektroforetickou frakcionaci DNA se používá v poslední době zásadně tzv. gelových elektroforéz, při kterých frakcionované molekuly putují gelem. Pro molekuly menší než asi 1 kbp se jako nosič používá polyakrylamidový gel (obr. 5), pro větší molekuly agarózový gel (obr. 4). Gelové elektroforézy jsou vhodné nejen pro rozdělení fragmentů DNA podle velikosti, ale také podle konformace (Vondřejš a Storchová, 1997). Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry.

Po dokončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul, které nejsou viditelné pouhým okem. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji se používá etidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA (Šmarda et al., 2005). Ještě citlivější metodou je začlenění radioaktivně značených nukleotidů do DNA před elektroforézou; pro tyto účely se nejčastěji používá radioizotop ^{32}P , který je možno snadno inkorporovat ve formě fosfátu do DNA a který emituje vysoce energetické β -částice, jež je možno jednoduše detekovat pomocí autoradiografie (Alberts et al., 1998).

Obr. 4.: Struktura agarózy. Agaróza je lineární polysacharid tvořený β -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- β -L-galaktopyranózou, které jsou spojeny glykozidovými vazbami.



Obr.5.: Polyakrylamidové gely jsou tvořeny kopolymerem akrylamidu (propenamidu) a N,N'-metylen-bisakrylamidu



5. Způsoby vyhodnocení molekulárních markerů

Vlastnosti jako je dominance či kodominance a úroveň polymorfizmu, jsou důležité při výběru markerů pro specifické aplikace. Molekulární markery však přináší i jiné informace, než jen ty o dominanci/kodominanci a polymorfizmu. Data přítomnosti či nepřítomnosti proužků na gelu nám přinášejí informace o podobnosti nebo odlišnosti mezi genotypy (a jsou závislé na použitém postupu výpočtu, např. simple matching, Jaccardův a Diceův koeficient atd.). Toto zjišťování genetické vzdálenosti je důležitou metodou vyjadřující rozdílnost (nebo podobnost) sekvencí jednotlivců nebo taxonomických jednotek. Získaná data jsou potom použita ke konstrukci „podobnostních matic“ a analyzována pomocí jednoho nebo několika různých shlukových algoritmů, jako je např. UPGMA (Unweighed Pair-Group Method using arithmetic Averages), Neighbour-Joining nebo PCA (Principal Coordinate Analysis). Výsledky jsou prezentovány ve formě phenogramu/dendrogramu nebo základní souřadnicové křivky, které umožňují grafické znázornění podobnosti mezi skupinami subjektů nebo taxonomickými jednotkami.

Data týkající se nukleotidových sekvencí a restričních míst mohou být analyzována pomocí phenetických přístupů založených na měření celkové odlišnosti/podobnosti. Tato data mohou být vhodná též pro kladistickou analýzu, ve které jsou dva vzorky společně umístěny ve stejné skupině/klastru, nikoli pro velkou genetickou podobnost, ale protože mají stejný jeden nebo více markerů. Výsledné dendrogramy (nazývané kladogramy) jsou rekonstrukcemi fylogeneze a k selekci nejlepších „stromů“ jsou používány různé metodické přístupy (parsimony nebo maximum likelihood approaches). Jako taxonomické jednotky jsou v těchto studiích obvykle vybráni zástupci vyšších taxonomických jednotek nebo druhů, ale kladistické metody mohou být použity i když rekombinace mezi taxonomickými jednotkami je zanedbatelná, např. pro dobře izolované kon-specifické populace a organelové geny. Náhodně amplifikovaná data obvykle nejsou vhodná pro kladistické analýzy kvůli problémům identity a homologie proužků. K výzkumu diverzity přírodních populací se více vztahují data týkající se genové frekvence a frekvence alel. Při něm jsou data hodnocena pomocí populační genetické statistiky (Caetano-Anollés a Gresshoff, 1997).

6. Volba vhodného markeru pro specifické aplikace

Předpokládaný nesčetný počet různých technik DNA markerů a široká rozmanitost aplikací, které mohou být použity, vyvolávají problém, jak vybrat nejvhodnější DNA marker pro danou specifickou studii. Tento problém volby vhodného markeru vyvstává pokaždé, když je vyvinuta nová technika DNA markerování. V otázce volby vhodného markeru sehrává svou úlohu celá řada faktorů, některé z nich se zabývají technologií (markeru), jiné více souvisejí se zkoumanou problematikou a další se týkají výzkumníka a jeho možností. Není proto reálné nalézt odpověď, která by vyhovovala všem uvažovaným variantám. Pro účely studia diverzity se zdá, že zatímco techniky „multi-lokus profilingu“ mají silnou stránku ve fingerprintingu, identifikaci a charakterizaci, kodominantní markery, jako např. RFLP, CAPS, STMS a sekvence haplotypů (jestliže jsou dostupné) jsou vhodnější pro genotypování a populační studie. Na otázky týkající se evolučních vztahů, ať na druhové nebo populační úrovni, nejpřesněji odpovídají výsledky sekvenačních analýz (Karp a Edwards, 1997).

7. Padlí dubové *Microsphaera alphitoides*

7.1. Taxonomické zařazení padlí dubového

Říše:	FUNGI
Oddělení:	EUMYCOTA
Pododdělení:	ASCOMYCOTINA
Třída:	ASCOMYCETES
Podtřída:	ASCOHYMENOMYCETIDAE
Řád:	ERYSIPHALES
Rod:	MICROSPHAERA
Druh:	MICROSPHAERA ALPHITOIDES

V rámci svého životního cyklu vytváří houba dvě stádia, a proto jí byly dány dva názvy se zařazením do odlišných tříd. Dnes je houba známa pod názvem *Microsphaera alphitoides* – pohlavní stádium, které houbu řadí mezi Ascomycetes, zatímco anamorfa *Oidium quercinum* řadí houbu mezi Deuteromycetes (Heřmanová, 2003).

7.2. Původ padlí dubového

Padlí dubové je zavlečený ektoparazit, který se v našich podmínkách již dokonale aklimatizoval. Poprvé byla houba objevena v roce 1907 v Portugalsku, Španělsku a Francii. V roce 1908 se padlí dubové rozšířilo do celé střední Evropy, kromě horských a severských oblastí. V roce 1909 proniklo až do východní Evropy. Dnes parazituje na dubech v celé Evropě a Malé Asii. Vážné ekonomické škody působí v severní Evropě na plantážích, kde jsou jedlé ektomykorhizické houby rodu *Tuber* (lanýže) pěstovány pomocí inokulace semenáčků dubu (Heřmanová, 2003).

Odkud padlí dubové pochází, nebylo spolehlivě vysvětleno. Podle jednoho názoru bylo zavlečeno do Evropy z Ameriky, podle jiného názoru pochází z Portugalska, kde bylo pozorováno již od roku 1876, ne však jako vážný škůdce. V Portugalsku snad vytvořilo novou, škodlivější rasu, která se rozšířila po Evropě. Klimatické nároky spíše nasvědčují

jižnímu původu z Portugalska, neboť tato houba vyžaduje k úplnému vývoji teplé podnebí (Příhoda, 1959).

7.3. Význam padlí dubového

Původně jde o teplomilnou houbu, která se rozšiřovala a působila škody v suchých horkých létech, dnes se tato houba rozšiřuje již brzy z jara a plodnice vytváří i v chladných a deštivých obdobích. V současné době napadá tato houba duby v lesích, parcích a školkách po celé Evropě a vždy po několika letech vyvolává epidemie (Heřmanová, 2003). Ke kalamitě dochází ve většině případů po zavlečení nového patogena, který v nových oblastech našel mimořádné přírodní podmínky ke svému rozšíření. Nově napadené hostitelské dřeviny nemají vyvinutý žádný obranný mechanismus, protože se se zavlečeným patogenem vůbec nedostaly do styku. Z těchto důvodů je v současné době kladen velký důraz na vypracování co nejpodrobnějších karanténních předpisů a opatření, jakož i na jejich velmi přísné dodržování (Havlová, 2003).

Padlí dubové vytváří přísně specifický vztah se svým hostitelem. Citlivý k patogenu je dub zimní (*Quercus robur*) i dub letní (*Q. petraea*). Uvádí se, že dub zimní je k tomuto patogenu méně citlivý. Pouze příležitostně jsou napadány i ostatní druhy rodu *Quercus*, *Fagus*, *Castanea* a *Acer* (Johansson, 2001). V letech s epidemickým šířením napadá i druhy dubů, které jsou v letech běžného šíření odolné (např. dub červený). Proto imunita, uváděná u některých druhů je relativní a záleží na infekčním tlaku choroby v daném vegetačním období (Heřmanová, 2003).

7.4. Obecná charakteristika a rozmnožování houby

Jako padlí se označují choroby rostlin, způsobené vřeckatými houbami z čeledi *Erysiphaceae*. Obyčejně povlékají listy i jiné živé části rostlin bílým povlakem podhoubí s konidiiemi. Jsou to houby vesměs cizopasně, jejich podhoubí roste většinou na povrchu listů nebo letorostů a vysílá do buněk haustoria, kterými z nich čerpá výživu (Gutwirthová, 2003). K nákaze dochází po celé léto, hlavně na mladém listí letorostů. Starší listy jsou odolnější snad proto, že mají silnější pokožku a obsahují méně vody. Větévky letorostů se zelenou kůrou se nakazí konidiiemi méně a také se na nich konidie obvykle nevyvíjejí (Havlová, 2003).

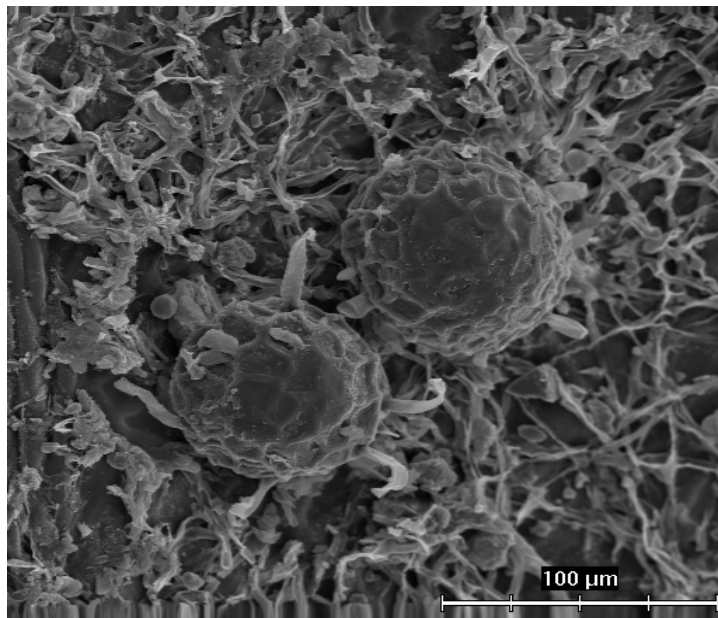
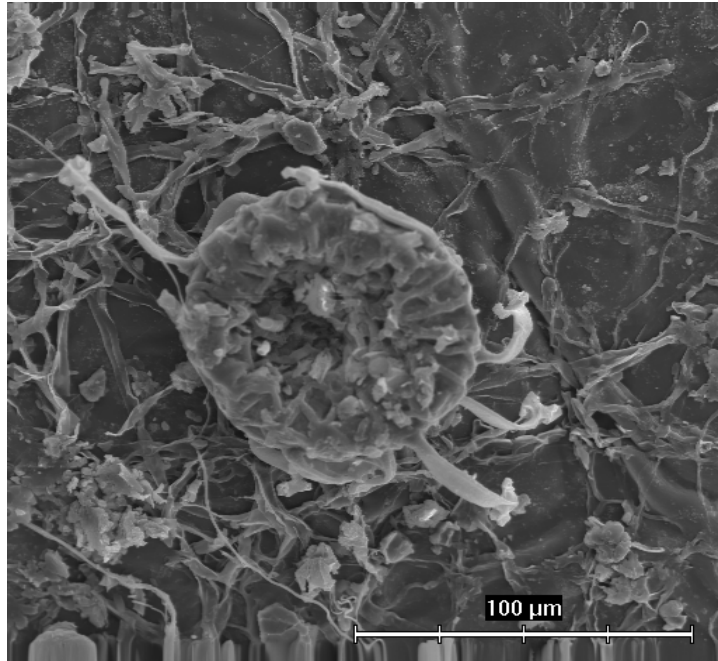
Rozmnožování je buď nepohlavní (konidiemi), nebo pohlavní (askosporami), které se tvoří v malých kulatých uzavřených plodničkách, jež se nazývají kleistothecia (Gutwirthová, 2003). U nás se padlí dubové rozmnožuje především konidiemi. Konidie jsou bezbarvé, eliptického tvaru o velikosti 30-36 x 19-23 μm a vyvíjí se na konidioforech podlouhlého tvaru (Havlová, 2003). Konidie vyklíčí v mycelium a při vhodných podmínkách vzniká nová generace konidií během 3 dnů. Téměř nepřetržitá produkce spor je podporována nízkou vlhkostí vzduchu a silným slunečním zářením. Velkému infekčnímu tlaku jsou tedy vystaveny především tzv. jánské výhony, které se tvoří během srpna (Heřmanová, 2003). Největší rozvoj podhoubí je při teplotách 26-28°C.

Obr. 6.: *Microsphaera alphitoides*-apendixy



Rozmnožování askosporami je u nás vzácnější. Na jaře stěny plodnic praskají a z puklých vřecek se uvolňují a vyletují četné askospory a vyvolávají jarní infekci. Askospory u nás dozrávají v pozdním létě, kdy se zejména na spodní straně listů začnou objevovat žlutavé až černohnědé kulovité plodničky houby–kleistothecia (obr. 8). Kleistothecia dosahují v průměru velikosti 0,1 mm. Jsou opatřena přívěsnými vlákny (apendixy) na konci rozvětvenými (obr. 7). Přívěsná vlákna jsou na konci 3-6 krát dichotomicky rozvětvená. Počet přívěsných vláken je průměrně 17-20. Uvnitř kleistothecií se nachází obvykle 8-15 ask s 2-8 askosporami. Velikost ask je 50-80 x 30-40 μm a velikost askospor se pohybuje v rozmezí 20-24 x 10-14 μm (Havlová, 2003).

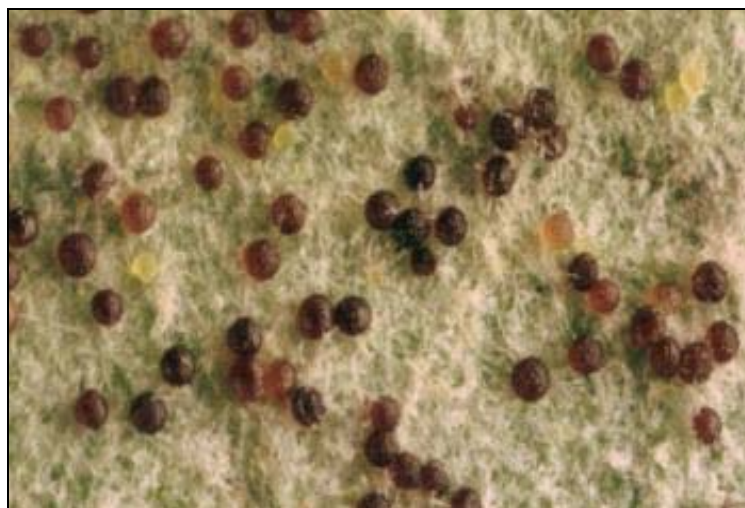
Obr. 7.: Snímky kleistotheциí a mycelia z elektronové mikroskopie



7.5. Symptomy napadení

Houby infikují hostitele a odebírají mu živiny prostřednictvím haustorií, kterým speciální struktura umožňuje vstup do buněk pokožky hostitele. Jelikož houby penetrují pouze buněčnou stěnou a ne buněčnou membránou, není tato invaze pro hostitele smrtelná. První stupně infekce jsou skryté (Gutwirthová, 2003).

Obr. 8.: Kleistothečia na povrchu listu dubu



Během počáteční fáze infekce (konec jara) se objevují malé chlorotické skvrny na svrchní straně mladých listů a výhonků. Jakmile se houba rozšíří v tkáních hostitele, na listech se objeví viditelné šedobílé povlaky mycelia (obr. 10). Mycelium roste, shlukuje se a povlaky pokrývají obě strany listů a mohou nakonec pokrýt téměř celou plochu listu. Na charakteristickém šedavém vzhledu padlí se podílí konidie tvořící se na myceliu. Kleistothechia jsou viditelná pouhým okem, sférická, žlutá, později tmavá (Johansson, 2001) (obr. 9).

Těžce napadené listy se svinují, ztrácí zbarvení, usychají a opadávají. Výzkumy ze Švédska ukazují, že nekrózy se mohou objevit na sazenicích již v červenci. Špičky výhonů bývají znetvořené a pokroucené. Silně infikované výhony usychají a po odumření

vrcholových výhonů dochází ke krnění a košatění horní části koruny (Heřmanová, 2003). Infikované výhonky zeslábnou, ztvrdnou, postupně chřadnou a jsou náchylné k poškození mrazem už na podzim. Infikované rostliny po silném napadení mohou zahynout v následujícím ročním období, nebo mohou zahynout po několika dalších ročních obdobích, kdy se napadení padlím neustále opakuje (Johansson, 2001).

Obr. 9.: šedobílé povlaky mycelia na listech dubu



Důsledkem napadení je snížení přírůstku dubových semenáčků. Pletiva nedostatečně vyžívají, prodlužuje se vegetační doba listů a letorostů, letorosty nedřevnatí a jsou náchylnější k mrazovým škodám. Ztráta přírůstku vede někdy k nutnosti předržet semenáčky do dalšího roku, což je z pěstitelského hlediska naprosto nežádoucí a zvyšuje to nároky na lidskou práci - podřezávání, vyzvedávání a výsadbu sazenic s velkým kořenovým systémem. Při podřezávání vzniká nebezpečí infekce pomalu se hojících řezných ran a odřenin půdními patogenními houbami (*Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Alternaria* aj.) a houbami vyvolávajícími tracheomykózní onemocnění (*Verticillium*, *Ophiostoma*). Při sledování dvacetiletých dubových porostů vypěstovaných ze sazenic se zkrácenými kořeny se ukázalo, že na těchto stromech je velmi silný výskyt dřevokazných hub a původců kořenových hnilob. Procento napadení stromů dosahovalo až 51% celkového počtu vyšetřených dubů (Heřmanová, 2003).

7.6. Faktory ovlivňující výskyt padlí dubového

Onemocnění je přítomné v Evropě tam, kde jsou porosty dubů. Mladé jemné listy jsou více citlivé než starší listy a mladé stromky jsou náchylnější než starší, protože mají větší poměr nových výhonů. Škody způsobené padlím jsou větší, pokud je strom vystaven působení dalších škůdců nebo patogenů

Počasi má velký vliv na životní cyklus *M. alphitoides*. Infekce je podporována vlhkými a chladnými podmínkami během rozvíjení pupenů, kdežto vlhké a teplé podmínky jsou potřebné pro růst patogena v létě. Také pozdní mráz podporuje rozvoj patogena snížením rezistence hostitele (Johansson, 2001). Mycelium padlí dubového nejlépe roste při teplotách 26-28°C, proto bývá nejsilnější infekční tlak na místech přímo ozářených sluncem.

Vysoké dávky dusíkatého hnojiva mohou podporovat vývoj padlí. Spory houby se snadněji šíří v hustém porostu. Mikroklima v hustém porostu je vlhčí, a to podporuje růst houby a nízká intenzita světla v přízemní vrstvě zvyšuje mortalitu semenáčků. Z těchto důvodů školky vytvářejí příznivé podmínky pro šíření padlí (Heřmanová, 2003).

Dalším faktorem, který ovlivňuje šíření nemoci, je znečištění vzduchu. V oblastech s vysokým obsahem SO₂ ve vzduchu mělo onemocnění mírnější průběh než v oblastech s „čistým“ vzduchem (Gutwirthová, 2003).

7.7. Ochrana

Pokud známe ekologické nároky patogena, je možná ochrana změnou podmínek prostředí. Padlí dubové je snadněji kontrolováno ve sklenících, kde lze ovlivnit klimatické podmínky. Ve venkovních podmínkách se výskyt reguluje změnou pěstitelských postupů. Protože největší rozvoj padlí je na rostlinách osluněných, zastíňujeme doušky, nebo je pěstujeme ve stínu rostlin, které tvoří zelený kryt (např. lupina) a působí jako bariéra chránící sazenice před spory šířenými větrem (Heřmanová, 2003).

Ořezávat větve napadené padlím se nedoporučuje, protože ořezáváním se probudí spící pupeny, jež vyraší a nově vyrostlé listy jsou zvláště náchylné k nákaze a ihned bývá

napadeno padlím, takže nákaza se tímto způsobem spíše rozšiřuje, než omezuje. Zdrojem nákazy semenáčků a sazenic v porostech bývají výmladky z pařezů po poražených stromech. V oblastech zamořených padlím je proto účelné soustavně odstraňovat tyto výmladky (Příhoda, 1959). Proti padlí jsou vysoce účinné fungicidní přípravky na bázi síry, ale i některé přípravky organické. Ochrana proti padlí ve školcích by se neměla ani podceňovat, ani zanedbávat, a pokud se padlí ve školce objeví, aplikovat fungicidní přípravky. Padlí totiž vniká do pupenů a pokud se nepoužijí žádné fungicidní přípravky na jeho potlačení, rozšiřuje se s napadenými sazenicemi do výsadeb a porostů (Gutwirthová, 2003). Aplikace chemikálií má být provedena při prvních symptomech a následně v pravidelných intervalech. Je důležité přijmout opatření dříve než dojde k vytvoření konidií. Preventivní ošetření před objevením symptomů je zbytečné, drahé a poškozuje prospěšné houbové organismy v půdě, a to má nepříznivý vliv na růst a zdravotní stav rostlin.

O úspěšné biologické ochraně nejsou žádné zprávy, avšak některé produkty založené na rostlinných extraktech mají preventivní efekt. Komerčně jsou využívány přírodní antagonisté padlí, ale většinou se jedná o preparáty, které jsou účinné u padlí na obilninách nebo okurkách a není zjištěna jejich použitelnost vůči padlí dubu (Heřmanová, 2003). K přirozeným nepřítelům padlí dubového patří houba *Cicinnobolus cesatii* De Barry. Tato houba však napadá padlí obyčejně až tehdy, když je překročen nejvyšší bod jeho množení, takže až poté, co se padlí značně rozšířilo. Její význam pro omezení nákazy bývá tedy již velmi malý (Příhoda, 1959).

8. Materiál a metody

8.1. Odběr kleistotheциí padlí dubového (*Microsphaera alphitoides*)

Vzorky byly odebírány v Českých Budějovicích v lokalitě Stromovka, na Třeboňsku v lokalitách Opatovický mlýn a Opatovický mlýn-Branná, v Pyrenees v lokalitě St. Giron a v Bordeaux.

Kleistotheция byla izolována z listů již vzrostlých stromů. Napadené listy byly z obou stran pokryty bělavým až šednoucím moučnatým povlakem mycelia houby. Silně napadené listy byly tvarově deformovány a zasychaly. Pro následnou izolaci DNA byla vhodná pouze zralá kleistotheция, která jsou pouhým okem viditelná, sférická a vyznačují se tmavohnědým až černým zbarvením. Zralá kleistotheция byla vybírána pod binolupou a následně odebírána do eppendorfkы.

8.2. Izolace DNA

Izolace byla provedena komerčním kitem Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex). Tato metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon, na kterých dochází k zachycení DNA, odstranění proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, a pak následuje vymytí DNA elučním roztokem. Pro DNA extrakci bylo použito přibližně 100 mg biomasy, získané z kleistotheциí. Vzorky DNA byly uchovávány při -20°C.

Množství 100 mg kleistotheциí bylo homogenizováno v eppendorfce. Homogenát byl přenesen do 1,5 ml *reaction tube* a bylo k němu přidáno 400 μ l *Lysis Buffer P* a 20 μ l proteinázy K. Směs byla vortexována a ponechána 30 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace byla směs 2–3krát promíchána. Následně byl připraven *Spin Filter* do 2,0 ml *Receiver Tube*. Vzorky byly přeneseny na *Spin Filter*. Následovala centrifugace 10 min při 12000 rpm. Pokud je to nutné přidá se 40 μ l Rnázy A (10mg/ml), vortexuje a nechá 5 min. inkubovat při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 200 μ l *Binding Buffer P* a směs byla vortexována. Do 2,0 ml *Receiver Tube* byly umístěny nové *Spin Filter*, do nich byly přeneseny vzorky a 1 min. byly inkubovány. Následná centrifugace probíhala 1 min. při 12000 rpm. Byl odstraněn filtrát a *Spin Filter* byl umístěn zpět do 2,0 ml *Receiver Tube*. Bylo přidáno 550 μ l *Wash Buffer I* a proběhla centrifugace 1 min. při 12000 rpm. Filtrát byl

odstraněn a *Spin Filter* umístěn zpět do 2,0 ml *Receiver Tube*. Byl přidán 550 μ l *Wash Buffer II* a proběhla centrifugace 1 min. při 12000 rpm. Filtrát byl odstraněn a *Spin Filter* byl umístěn zpět do 2,0 ml *Receiver Tube*. Krok byl opakován. Nakonec byla směs znova centrifugována 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu. *Spin Filter* byl umístěn do nových 1,5 ml *Receiver Tube* a bylo přidáno 50–100 μ l přehřátého na 65°C *Elution Buffer D*. Směs byla inkubována 3 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50 μ l přehřátého *Elution Buffer D* na 65°C. Inkubujeme 3 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. A postup opakujeme znovu s dalšími 50 μ l *Elution Buffer D*, ale do nové 1,5 ml *Receiver Tube*. Vznikne nám tak 50 μ l 1. a 2. eluátu.

8.3. PCR-RFLP analýza

Pro PCR byly použity univerzální primery ITS1 a ITS4:

ITS1 (5'–3') - TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ITS4 (5'–3') - TCCTCCGCTTATTGATATGC (White a kol. 1990).

Schéma pipetování PCR reakce (TAKARA):

- 2,5 μ l reakčního pufru
- 0,5 μ l dNTPs
- 0,25 + 0,25 μ l primeru (ITS1, ITS4)
- 0,2 μ l DNA polymerázy
- 1 μ l DNA
- dH₂O voda do objemu 25 μ l

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ RESEARCH) s následujícími parametry: 94°C (2 min) pro počáteční separaci DNA řetězců a 35 cyklů: 94°C (30 sek.) - denaturace, 62°C (3 min) - annealing primerů, 72°C (1 min) - elongace. Termální cyklus byl zakončen elongační teplotou 72°C (10 min).

Amplifikované ITS produkty byly použity pro RFLP analýzu. Digestce amplifikovaných fragmentů DNA se prováděla pomocí různých restričních endonukleáz (HinfI a EcoRI) tak, že 15 μ l PCR produktu bylo smícháno s 2 μ l RE pufru, 0,5 μ l restriční endonukleázy a doplněno 2,5 μ l H₂O do konečného objemu 20 μ l.

Směs byla inkubována v termocykleru 6 hod při 37°C. Produkty po štěpení byly separovány pomocí PAGE (10% polyakrylamidový gel v TBE pufru) nebo 2% agarózového gelu v TBE a detekovány ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla 6 hodin při napětí 150 V. Gely byly fotografovány pod UV světlem.

Získané elektroforeogramy byly zpracovávány pomocí speciálního software- BioProfil 1D++ pro vyhodnocování molekulárních dat.

8.4. RAPD analýza

Protokol RAPD analýzy byl modifikován z metodiky práce WILLIAMS a kol. (1990). PCR reakce byla prováděna v objemu 25 µl obsahující 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 100 µM dNTP, 1 U Taq polymerázy (TaKaRa), 10 pM primeru (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování:

- 2,5 µl reakčního pufru
- 2 µl dNTPs
- 1 µl DNA
- 4 µl primeru
- 0,2 µl DNA polymerázy
- dH₂O voda do objemu 25 µl

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ RESEARCH). Teplotní profil reakce byl následující: 93°C (5 min) pro počáteční separaci DNA řetězců a 45 termálních cyklů: 92°C (1 min), 35°C (2 min) a 72°C (3 min). Termální cyklus byl zakončen elongační teplotou 72°C (10 min).

RAPD produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózových gelech (v TBE pufru) a detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla 3 hodiny při napětí 70V. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí digitálního fotoaparátu EPSON PHOTOPC® 3100Z a zpracovány digitální obrazovou analýzou v programu Bioprofil 1D++.

8.5. Digitální obrazová analýza gelů a hodnocení dat

Pro vyhodnocování dat byl využit speciální software – *BioProfil 1D++*. Je to softwarový produkt určený zejména pro analýzu a objektivní porovnávání jednorozměrných elektroforetických spekter. Umožňuje konstrukci rozsáhlých databází "fingerprintů", které pak mohou být porovnávány. Využití má zejména v epidemiologických studiích, identifikaci genotypů, systematice, ekologii, populační genetice, klinické biochemii a biotechnologických aplikacích.

Korekce obrázků gelů byly prováděny za použití speciálního grafického software *Adobe Photoshop 7.0 CE*.

Clusterová analýza

Celkem přehledným a ilustrativním výsledkem analýzy spekter je možnost seskupení (sgrupování) podobných spekter na základě výpočtu *podobnostní matice*-koeficientů podobnosti každého vzorku se všemi ostatními z vybrané databáze. Výsledky matice pak byly podrobeny clusterové analýze (*UPGMA - Unweighted Pair Group Method Using Averages*) a výsledky zobrazeny jako *dendrogram*.

Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení RAPD spekter bylo využito statistického zpracování dat. Metoda digitální analýzy pak představovala prostředek pro primární zpracování elektroforeogramů a zaznamenání pozice pruhů na gelu. Na základě takto zjištěných a korelovaných pruhů na gelu bylo možné sestavit matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provést statistické hodnocení (výpočet frekvence alel, výpočet koeficientů genetické identity, výpočty genetických vzdáleností či podobností a sestavení dendrogramů). Pro tyto účely byl využíván program *MVSP*.

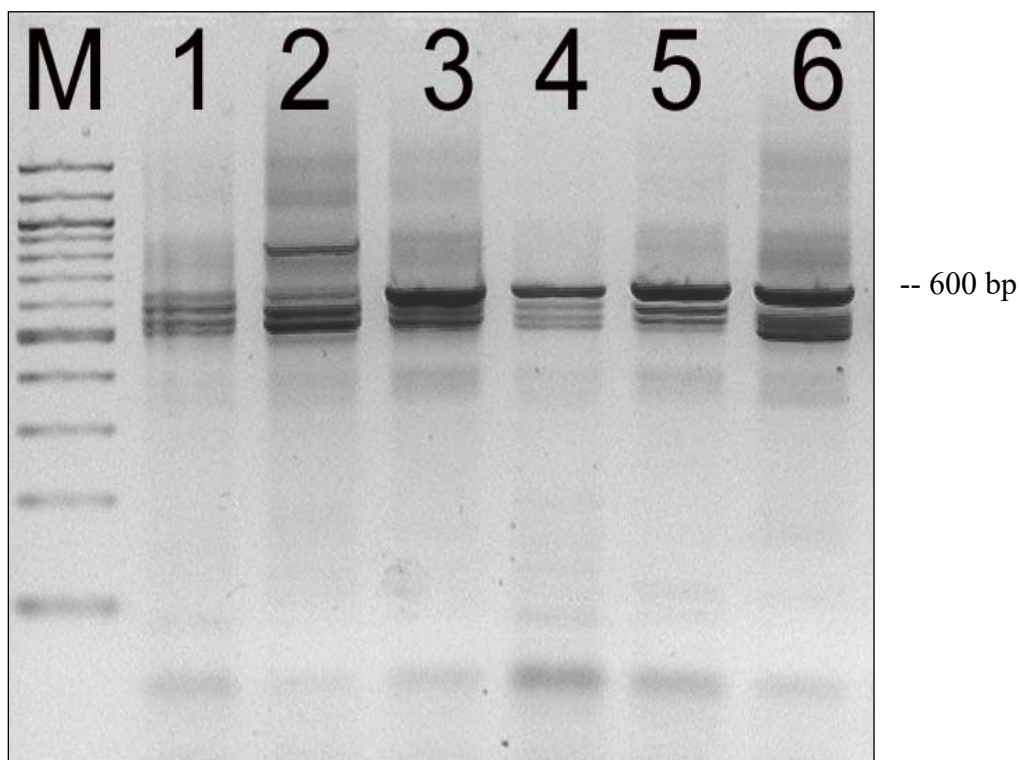
9. Výsledky

9.1. PCR-RFLP analýza

Nejprve byla pro analýzu vzorků houby druhu *Microsphaera alphitoides* použita metoda PCR-RFLP analýzy ITS regionu. V souvislosti s touto technikou byly pak na jednotlivých vzorcích testovány dvě restriční endonukleázy.

Výsledkem PCR reakce byl fragment o velikosti přibližně 600 bp. Nicméně docházelo i k amplifikaci dalších nesespecifických fragmentů a bylo nutné optimalizovat průběh reakce a reakční podmínky. Pro analýzu bylo použito 6 vzorků *Microsphaera alphitoides*. Výsledek PCR reakce – amplifikace ITS je na obr. 10.

Obr. 10.: výsledky po provedené PCR analýze u 6 vzorků padlí.



M-marker

1-vzorek pocházející z oblasti České Budějovice Stromovka

2-vzorek pocházející z oblasti Třeboňsko – Opatovický mlýn

3-vzorek pocházející z oblasti Třeboňsko – Opatovický mlýn - Branná

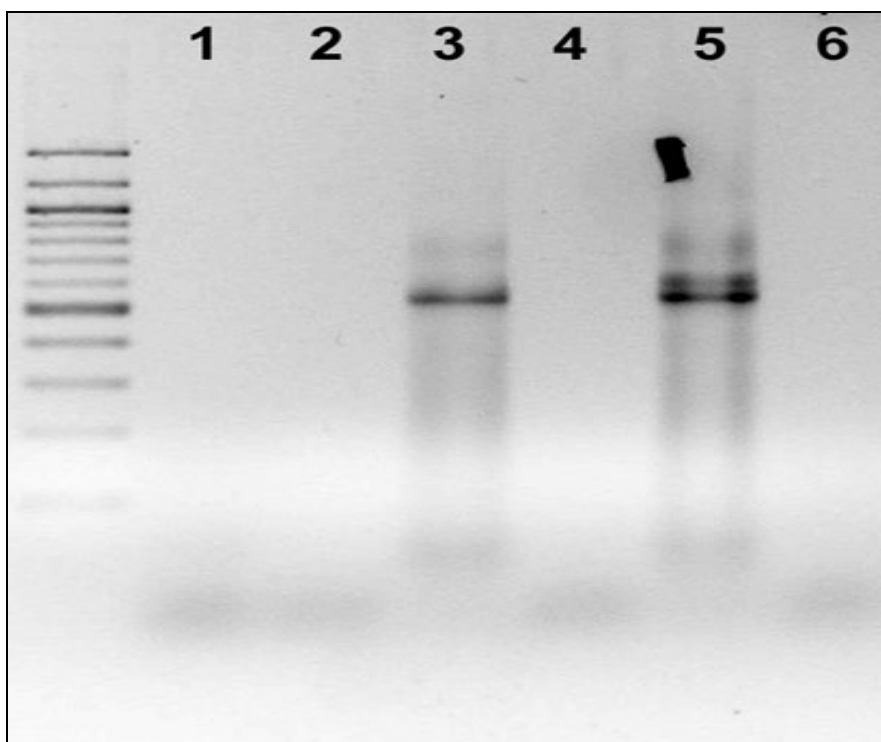
4-vzorek pocházející z oblasti Pyrenees (St.Giron)

5-vzorek pocházející z oblasti Bordeaux

6- vzorek pocházející z oblasti Bordeaux

Z důvodu amplifikace nespecifických fragmentů se tedy přistoupilo k optimalizaci reakčních podmínek. Konkrétně byla zvýšena teplota pro nasedání primeru na 63°C. Ani změna teplotního profilu reakce však nepřinesla odpovídající výsledky. Došlo sice k omezení tvorby nespecifických signálů nicméně v řadě případů vůbec nedošlo k amplifikaci. Výsledek PCR reakce po změně teplotního profilu je na obr. 11.

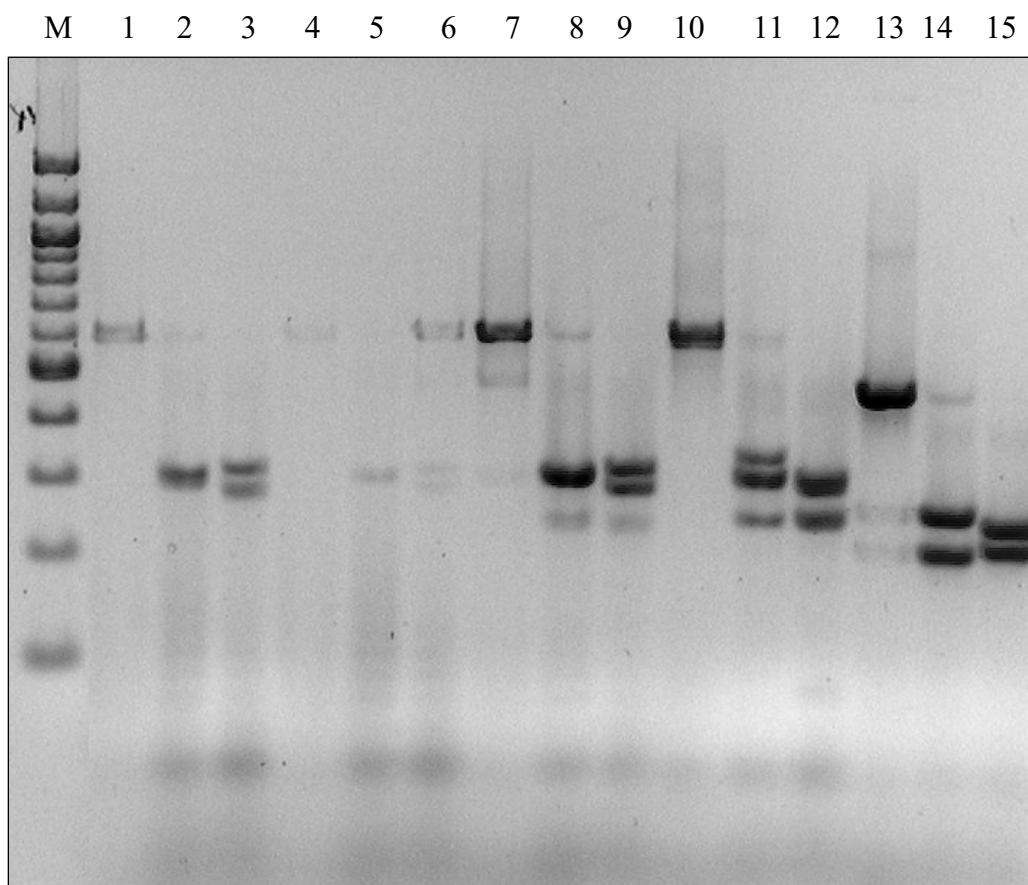
Obr. 11.: Výsledek PCR reakce po změně teplotního profilu - v dráze 1,2,4 a 6 nedošlo k amplifikaci. V dráze 3 a 5 došlo k amplifikaci a byla zde omezena tvorba nespecifických fragmentů.



Protože ani změna teplotního profilu reakce nevedla k požadovaným výsledkům, přistoupilo se ke změně pufru a Taq polymerázy. Takto optimalizovaná reakce pak probíhala v objemu 25 µl, s použitím Taq polymerázy a master mixu Top-Bio. Výsledkem po této

optimalizaci jsou neštěpené ITS fragmenty na obr. 12. Na obr. 12 je také uveden výsledek štěpení fragmentů jednotlivými restrikčními endonukleázami.

Obr. 12.: Neštěpené ITS fragmenty pěti vzorků padlí a výsledek štěpení těchto fragmentů restrikčními endonukleázami Eco RI a HinfIII.



M : 100 bp marker

Dráha 1, 2, 3 odpovídá vzorku č.1 pocházejícímu z oblasti České Budějovice-Stromovka

Dráha 4, 5, 6 odpovídá vzorku č.2 pocházejícímu z oblasti Třeboňsko-Opatovický mlýn

Dráha 7, 8, 9 odpovídá vzorku č. 3 pocházejícímu z oblasti Třeboňsko-Opatovický mlýn-Branná

Dráha 10, 11, 12 odpovídá vzorku č. 4 pocházejícímu z oblasti Pyrenees (St.Giron)

Dráha 13, 14, 15 odpovídá vzorku č. 5 pocházejícímu z oblasti Bordeaux

Neštěpené ITS fragmenty :

dráha 1, 4, 7, 10 – u těchto vzorků nebyl na základě PCR prokázán žádný

polymorfizmus.

dráha 13 – délka PCR produktu se u tohoto vzorku lišila od ostatních.

PCR-RFLP s Eco RI:

dráha 2, 5, 8, 11 – u těchto vzorků nebyl prokázán žádný polymorfizmus restričních fragmentů.

dráha 14 – vzorek vykazuje polymorfizmus.

PCR-RFLP s HinfIII:

dráha 3, 6, 9, 12 - u těchto vzorků nebyl prokázán žádný polymorfizmus restričních fragmentů.

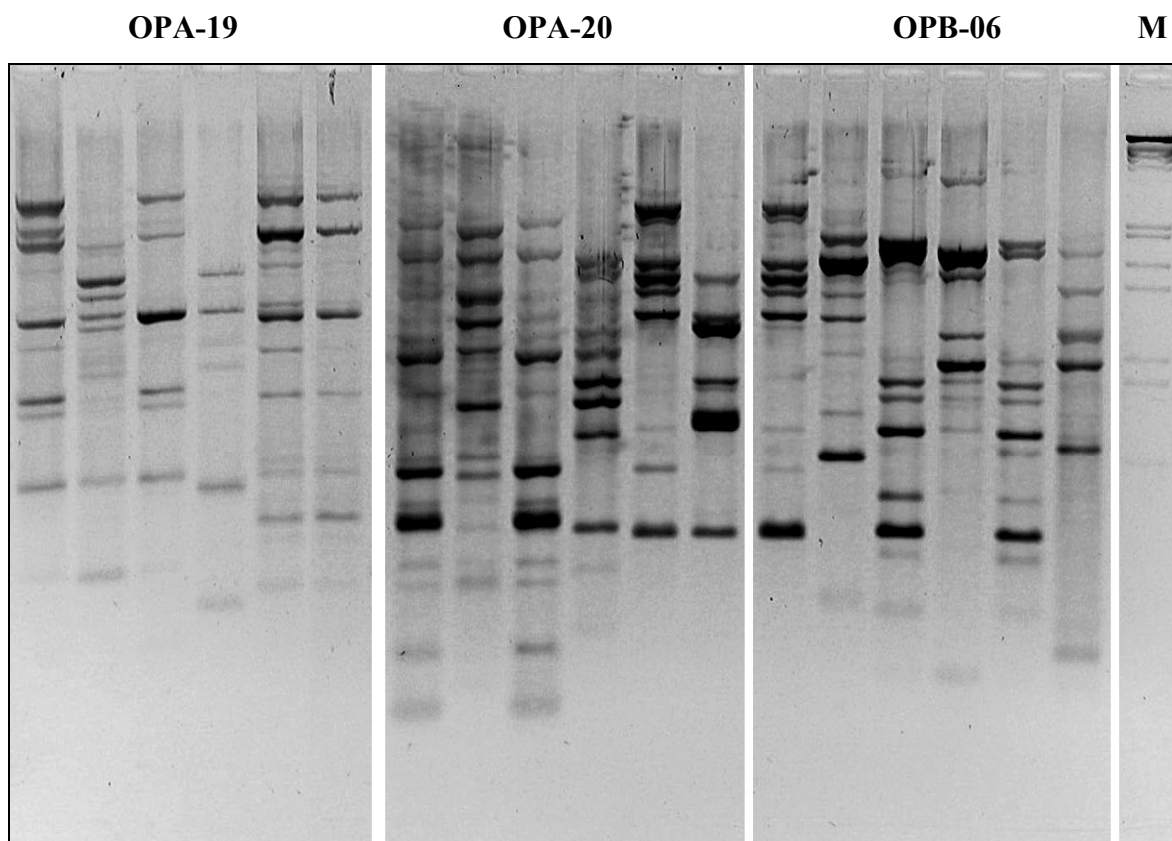
dráha 15 - vzorek vykazuje polymorfizmus.

Restričními endonukleázami byly naštěpeny amplifikované fragmenty, rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly ale malé. Vzorky 1-4 vykazují prakticky stejné spektrum restričních fragmentů, vzorek 5 je pak odlišný, ale i tato odlišnost je způsobena výrazně menší velikostí původního amplifikovaného fragmentu ITS. Toto může být způsobeno kontaminací vzorku jinou houbou a proto bez ověření sekvenováním nemohl být tento vzorek hodnocen.

9.2. RAPD analýza

Provedení RAPD analýz předcházelo výběr vhodných náhodných primerů, poskytujících u jednotlivých kmenů polymorfní spektrum pruhů. Byly vybrány 3 vyhovující primery poskytující dostatečný počet zřetelných a jasně odlišitelných proužků: OPA-19, OPA-20, OPB-06. Výsledné spektrum amplifikovaných fragmentů po RAPD analýze se třemi vybranými primery je na Obr.13.

Obr. 13.: Výsledky RAPD analýzy – 6 vzorků padlí, primery OPA-19, OPA-20 a OPB-06.



Pozice na gelu 1-6 odpovídá vzorkům 1-6 a primeru OPA-19

Pozice na gelu 7-12 odpovídá vzorkům 1-6 a primeru OPA-20

Pozice na gelu 13-18 odpovídá vzorkům 1-6 a primeru OPB-06

Pozice na gelu 19 představuje DNA marker

Po odečtu fragmentů z gelu na obr. 13 byla získána matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhů v dané zóně u hodnocených vzorků padlí dubového a vybraných polymorfních primerů (tab. 1). Výsledná matice genetické vzdálenosti vypočtená na základě Nei and Li koeficientu je v tab. 2.

Tab. 1.: matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhů na gelu

	vz. 1	vz. 2	vz. 3	vz. 4	vz. 5	vz. 6
OPA-19	1	0	1	0	1	1
	1	0	1	0	0	0
	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	0	1	0
	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	1
	0	1	0	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
	0	1	0	0	1	1
	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	0
	1	0	1	0	0	0
	1	1	1	0	1	1
	1	1	1	0	1	1
	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	0	1	1
OPA-20	1	1	1	0	0	0
	0	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	0
	1	1	1	1	1	1
	1	0	1	1	0	1
	1	1	1	1	0	0
	0	0	0	1	0	1
	0	1	0	1	0	0
	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	1	1	1
	1	1	0	0	0	0
	1	1	1	0	1	0
	1	1	1	0	0	0
	1	1	1	1	1	1
OPB-06	1	1	0	1	0	0
	1	0	1	1	0	0
	1	1	0	0	0	1
	1	1	0	0	0	0
	0	0	0	1	0	1
	0	0	0	1	1	1
	0	0	1	1	1	0
	0	0	1	1	1	0
	0	1	0	0	0	0
	1	0	1	1	1	0
	0	1	0	0	1	1
	1	0	0	0	0	0

	0	0	1	1	1	0
	1	0	1	0	1	0

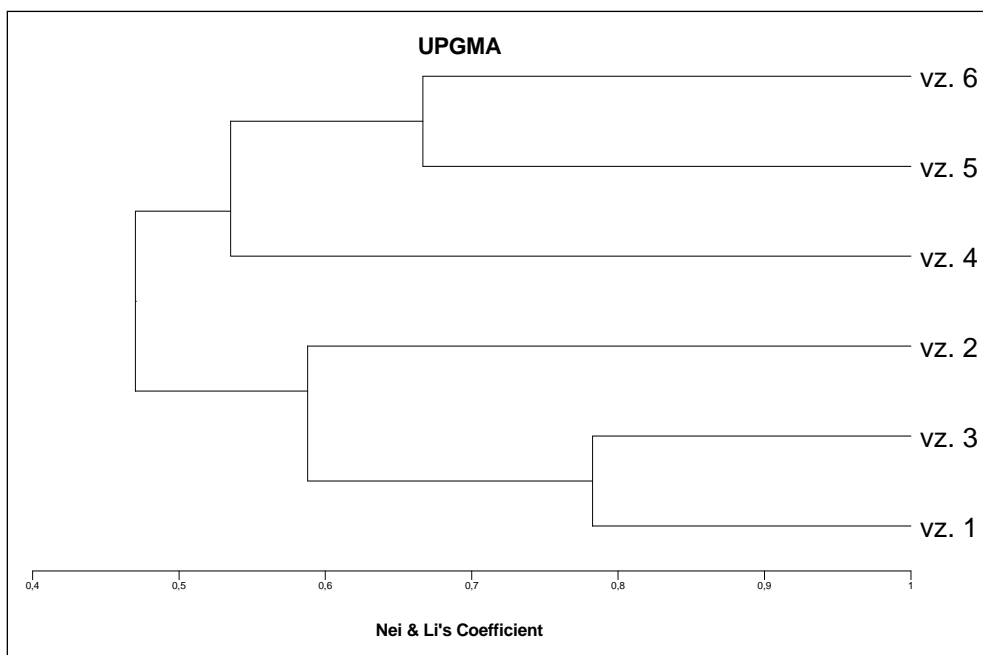
Tab. 2.: Matice genetické vzdálenosti vypočtená na základě Nei and Li koeficientu genetické podobnosti:

Nei & Li's Coefficient						
Similarity matrix						
	vz. 1	vz. 2	vz. 3	vz. 4	vz. 5	vz. 6
vz. 1	1,000					
vz. 2	0,652	1,000				
vz. 3	0,783	0,524	1,000			
vz. 4	0,400	0,390	0,537	1,000		
vz. 5	0,458	0,500	0,636	0,558	1,000	
vz. 6	0,409	0,500	0,400	0,513	0,667	1,000

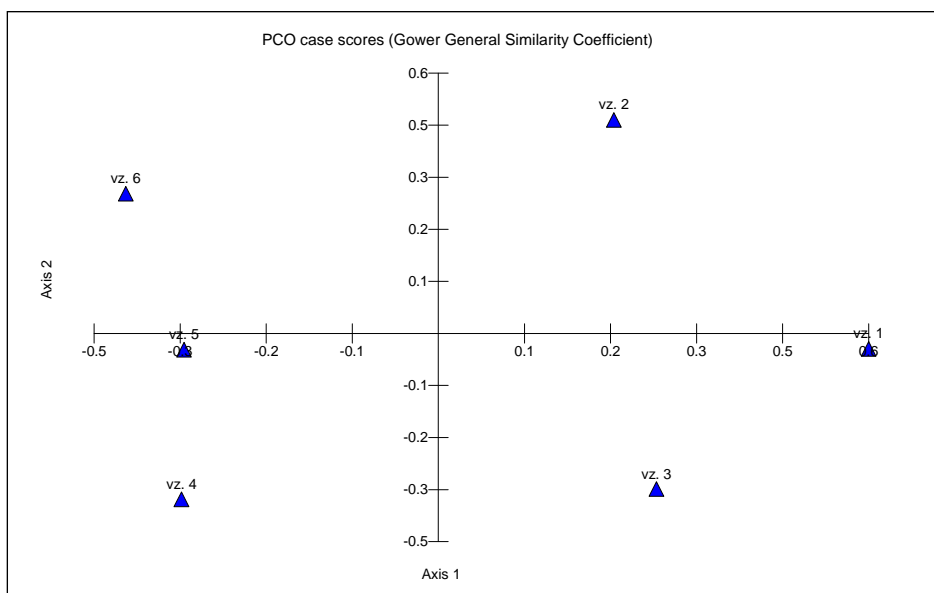
Dendrogram na obr. 15 ukazuje genetickou vzdálenost, vyjádřenou jako míru podobnosti (shody) mezi kmeny houby druhu *Microsphaera alphitoides*. Na základě uvedeného dendrogramu je možné odlišit každý ze sledovaných vzorků, nedochází k jejich překrývání a je zřejmé, že se vzorky shlukovaly podle místa původu. Vzorky pocházející z Francie a vzorky pocházejí z České republiky se seskupily do dvou shluků podle geografické lokalizace a odlišnost mezi těmito dvěma shluky je vyšší než 50%.

Výstup z ordinační analýzy – PCO analýza na obr. 14 vykazuje podobný výsledek jako dendrogram na obr. 15. I po provedení PCO analýzy se vzorky rovnoměrně rozmístily ve výsledném grafu a je možné všechny vzorky rozpoznat, nepřekrývají se a vytváří samostatné, dobře odlišitelné a identifikovatelné skupiny.

Obr. 15.: Dendrogram získaný metodou clusterové analýzy UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method using arithmeric Averages*) a vytvořený na základě použití sady tří vybraných prumerů u jednotlivých kmenů padlí dubového:



Obr. 14.: Ordinační diagram – PCO metoda:



PRINCIPAL COORDINATES ANALYSIS						
Gower General Similarity Coefficient						
Eigenvalues						
	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6
Eigenvalues	0,862	0,562	0,436	0,303	0,132	0,000
Percentage	37,555	24,479	19,010	13,210	5,746	0,000
Cum. Percentage	37,555	62,034	81,044	94,254	100,000	100,000
PCO case scores						
	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5	Axis 6
vz. 1	0,570	-0,034	0,013	0,219	0,198	0,408
vz. 2	0,232	0,467	-0,212	-0,278	-0,057	0,408
vz. 3	0,289	-0,341	0,178	-0,022	-0,245	0,408
vz. 4	-0,340	-0,363	-0,437	-0,040	0,052	0,408
vz. 5	-0,337	-0,036	0,407	-0,230	0,139	0,408
vz. 6	-0,414	0,306	0,051	0,351	-0,087	0,408

Výsledky RAPD analýz ukazují na vysokou míru genetického polymorfizmu mezi analyzovanými vzorky. Na základě clusterové i PCO analýzy lze vzorky odlišit. Na základě RAPD profilů lze konstatovat, že odlišnost mezi jednotlivými vzorky je velmi vysoká a je na úrovni 20-50 %. Na základě analýzy tohoto molekulárního markeru je tedy možné odlišit každý ze sledovaných vzorků, nedochází k jejich překrývání a je zřejmé, že se vzorky shlucovaly podle místa původu, přičemž největší odlišnost je mezi vzorky pocházejícími z Francie a vzorky pocházejícími z České republiky.

10. Diskuze

Cílem této práce bylo posouzení vhodnosti techniky molekulárních markerů pro hodnocení diverzity kmenů padlí dubového (*Microsphaera alphitoides*) a pokus o výběr takové metody, která by podávala reprodukovatelné výsledky a byla spolehlivá a jednoduchá. Hodnoceny byly metody RAPD, PCR-RFLP a SSR. Těmto analýzám byla podrobena genomová DNA z kleistothecií, nasbíraných z listů dospělých dubů.

V práci byly provedeny analýzy RAPD a ITS, mikrosatelity se nepodařilo úspěšně amplifikovat. Analýzy SSR markerů byly prováděny ve spolupráci s pracovištěm INRA Bordeaux, nicméně ani na tomto pracovišti se doposud nepodařilo izolovat vhodné primery a optimalizovat reakci.

Pro izolaci genomové DNA z kleistothecií se jako optimální jeví metoda izolace pomocí Invisorb Spin Plant Mini Kit. Pomocí této metody je DNA získána v dobré kvalitě a my tak můžeme v klidu analyzovat testované DNA markery. Dobrá kvalita je zajištěna odstraněním proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot od námi požadované DNA. Jistou nevýhodou může být vyšší cena tohoto komerčního kitu. Dalšími metodami používanými pro izolaci DNA je metoda CTAB a metoda využívající CHELEX (Doyle a Doyle, 1990; Oborník et al., 2000).

Tyto metody mi ale neposkytly odpovídající výsledky, na druhou stranu např. Kavková et al. 2004 CHELEX úspěšně použila pro izolaci DNA z mykorhizních kořenů dubu.

Při PCR reakci byl amplifikován fragment o velikosti přibližně 600 bp, ale docházelo i k amplifikaci dalších nespecifických fragmentů. Z tohoto důvodu bylo nutné optimalizovat průběh reakce a reakční podmínky. Byla tedy zvýšena teplota pro nasedání primeru na 63°C a došlo k omezení tvorby nespecifických signálů. V řadě případů však vůbec nedošlo k amplifikaci, proto se tato optimalizace nejevila jako vhodná. Následovala další optimalizace, při které se přistoupilo ke změně pufru a Taq polymerázy. Reakce pak probíhala v objemu 25 µl, s použitím Taq polymerázy a master mixu Top-Bio. Ani tato optimalizace

však nepřinesla požadované výsledky. Zřejmě došlo ke kontaminaci vzorků jinou houbou nebo DNA z rostlinného pletiva. Tato možnost je velmi reálná, vezmeme-li v úvahu, jakou citlivostí se PCR analýza vyznačuje.

Po použití restričních endonukleáz došlo k naštěpení amplifikovaného fragmentu. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky však byly malé. Vzorky 1-4 vykazovaly prakticky stejné spektrum restričních fragmentů, vzorek 5 byl pak odlišný, ale tato odlišnost byla způsobena výrazně menší velikostí původního amplifikovaného fragmentu ITS. Toto může být způsobeno právě kontaminací vzorku jinou houbou a proto bez ověření sekvenováním nemohl být tento vzorek hodnocen. Tuto metodu (PCR-RFLP) pro hodnocení diverzity patogenních a mykorrhizických hub používali i Kavková et al., 2005. V dalším postupu budou amplifikované produkty purifikovány pomocí PCR Produkt Purification Spin Kit (Genomed). Takto připravené vzorky budou zaslány k sekvenování na Mikrobiologický ústav AVČR na sekvenační analýzu. Získané nukleotidové sekvence budou porovnávány se sekvencemi uloženými v *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information* pomocí programu BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1997), který slouží ke komplexnímu vyhledávání podobnosti a homologie v nukleotidových databázích.

Výsledky RAPD analýz ukazují na vysokou míru genetického polymorfizmu mezi analyzovanými vzorky. Na základě clusterové i PCO analýzy lze vzorky odlišit. Odlišnost mezi jednotlivými vzorky je velmi vysoká a je na úrovni 20-50 %. RAPD analýza však obecně poskytuje velice variabilní a obtížně opakovatelné a nereprodukovatelné výsledky. Z toho důvodu se také v dnešní době přistupuje spíše k AFLP analýze.

11. Závěr

Cílem práce bylo zavést a vyhodnotit techniku DNA markerů pro hodnocení diverzity kmenů padlí dubového.

V práci jsem použila techniku RAPD a PCR-RFLP ITS. Nejprve byla vybrána nejvhodnější metoda izolace DNA. Tou se zdá být izolace pomocí komerčního kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Následovalo provedení PCR analýz-amplifikace ITS a RAPD analýza. Protokoly pro provedení PCR analýz musely být optimalizovány, neboť docházelo k amplifikaci nespecifických fragmentů. Ani výsledky po štěpení restrikcími endonukleázami nebyly optimální, neboť rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly malé. Molekulární metoda PCR-RFLP ITS se tedy neosvědčila jako vhodný nástroj pro analýzu genetické variability padlí dubového. Jinak tomu bylo u RAPD analýzy. Ta se ukázala jako velmi vhodná pro detekci polymorfizmu a hodnocení diverzity. Na základě analýzy tohoto molekulárního markeru bylo možné odlišit každý ze sledovaných vzorků, nedocházelo k jejich překrývání a bylo zřejmé, že se vzorky shlukovaly podle místa původu, přičemž největší odlišnost byla mezi vzorky pocházejícími z Francie a vzorky pocházejícími z České republiky. RAPD analýza však obecně poskytuje velice variabilní a obtížně opakovatelné a nereprodukovatelné výsledky. Z toho důvodu se také v dnešní době přistupuje spíše k AFLP analýze.

12. Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** 1998. Základy buněčné biologie. Espero publishing s.r.o., Ústí nad Labem, str. 316-318.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., Leger, R.J., Roberts, D.W.** 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*. 25: 107–113.
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M.** 1997. DNA markers protocols, applications, and overviews. Wiley-Liss, New York, str. 79-81.
- Cano, J.** 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Bot.* 78: 1150–1155.
- Čurn, V.** 1999. Analýza biochemických a molekulárních markerů u kulturních a planých rostlin. Habilitační práce, JU ZF v Českých Budějovicích, str. 205.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Duncans, S., Barton, J.E., O'Brien, P.A.** 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycological Research*. 97: 1075–1082.
- Edel, V.** 1998. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. 1-20. In: "Applications of PCR in Mycology", Bridge P.D., Arora D.K., Reddy C.A., Elander R.P. (eds.), CAB International Wallingford, UK.
- Geistlinger, J., Weising, K., Kaiser, W.J., Kahl, G.** 1997. Allelic variation at a hypervariable compound microsatellite locus in the ascomycete *Ascochyta rabiei*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 298-305.
- Graman J., Čurn V.** 1999. Semenářství (dodatek). Skripta ZF JU České Budějovice.
- Grant, D., Shoemaker, R.** 1997. Molecular hybridization. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. and GRESSHOFF, P.M. (eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, New York, str. 15-26.

- Groppe, K., Sanders, I., Wiemken, A., Boller, T.** 1995. A microsatellite marker for studying the ecology and diversity of fungal endophytes (*Epichloë* spp.) in grasses. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3943-3949.
- Gutwirthová, L.** 2003. Epidemiologické limity šíření padlí dubového *Microsphaera alphitoides* (Ascomycotina: Erysiphales). Diplomová práce, JU ZF v Českých Budějovicích, str. 7-9, 10.
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M., Hamelin, R.C.** 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) – a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For. Path.* 26: 159-166.
- Havlová, P.** 2003. Biologie padlí dubového *Microsphaera alphitoides* (Ascomycotina: Erysiphales). Diplomová práce, JU ZF v Českých Budějovicích, str. 28-33.
- Heřmanová, V.** 2003. Kompetiční a mykoparazitické vztahy vůči padlí dubovému *Microsphaera alphitoides* (Ascomycotina: Erysiphales) ve fyloplánu dubů. Diplomová práce, JU ZF v Českých Budějovicích, str. 7-9, 12-14.
- Hoelzel, A.R.** 1992. *Molecular genetic analysis of populations a practical approach*. Oxford University Press, New York, str. 122, 164, 165.
- Hönig, V.** 2005. Analýza mezidruhových rozdílů spirochét lymeské boreliózy metodami molekulární biologie. Diplomová práce, JU BF v Českých Budějovicích, str. 17.
- Johansson, J.** 2001. Ecology and control of oak mildew, <http://www.mykopat.slu.se./mycorrhiza/kantarellfiler/texter/mildew.html>
- Karp, A., Edwards, K.J.** 1997. Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges. *Nature biotechnology*. 15 (7): 625-628.
- Kavková, M., Čurn, V., Endrychová, V.** 2004. Species composition and significance of mycorrhizas in young oak plantations of *Q. petraea* and *Q. robur*. Fourth International Conference on Mycorrhizae: Mycorrhiza: Fundamentals and multiproposed, ICOM4th Montreal, Quebec, Canada, 10-15 August, 2004.
- Kavková, M., Čurn, V., Kubátová, B., Figura, J.** 2005. Effect of inoculation of oak plantlets with *Paxillus involutus* (Batch.) and Fr. and *Laccaria bicolor*. 6th Meet. IUFRO Work.Party 7.03.04. Diseases and Insects in Forest Nurseries. 09-14 Sept. 2005, Uherske Hradiste, str. 10.
- Khashnobish, A., Hamann, A., Osiewacz, H.D.** 1999. Modulation of gene expression by (CA)_n microsatellites in the filamentous ascomycete *Podospira anserina*. – *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 191-195.

- Kukolíková, B.** 2005. Využití molekulárních markerů ve šlechtění řepky. Diplomová práce, JU ZF v Českých Budějovicích, str. 8, 6.
- Kůdela, V., Novacky, A., Fucikovsky, L.** 2002. Rostlinolékařská bakteriologie. ACADEMIA, Praha, str. 76-78.
- Kypr, J., Vorlíčková, M.** 1997. Konformační vlastnosti a Prodlužování molekul DNA obsahujících tandemová opakování tripletů začínajících cytosinem a končících guaninem. Chem. Listy. 91: 570-574.
- Oborník, M., Klíč, M., Žižka, L.** 2000. Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of Botany-revue Canadienne de Botanique. 78: 1150-1155.
- O'Malley, D.M. and Whetten, R.** 1997. Molecular markers and forest trees. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. and GRESSHOFF, P.M. (eds.): DNA markers, Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss, New York, str. 237-257.
- Phillips, R.L., Vasil, I.K.** 2001. DNA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, str. 12-13.
- Příhoda, A.** 1959. Lesnická fytopatologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, str. 172-174.
- Riesberg, L.H.** 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. Molecular Ecology. 5: 99-105.
- Řehout, V., Čítek, J., Sáková, L.** 2000. Genetika I. (Úvod do studia genetiky). Jihočeská univerzita Zemědělská fakulta České Budějovice, České Budějovice, str. 130.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.** 2005. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, Brno, str. 13-14, 74-76, 85.
- Takamatsu, S.** 1998. PCR Applications in Fungal Phylogeny. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. and Elander, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, str. 125-152.
- Tindall, K.R., Kunkel, T.A.** 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry. 27: 6008-13
- Towner, K.J., Cockayne, A.** 1993. Molecular methods for microbial identification and typing. Chapman & Hall, London, str.99-100.
- Vondrejs, V., Storchová, Z.** 1997. genové inženýrství I. Karolinum, UK-Praha, str. 25, 41.

**[http://72.14.207.104/search?q=cache:tRryciVjH4YJ:fle.czu.cz/~spolek/lesaci/materialy/slech
teni/07_molekularni_biologie.ppt+mikrosatelity&hl=cs&ct=clnk&cd=40&lr=lang_cs&client
=opera](http://72.14.207.104/search?q=cache:tRryciVjH4YJ:fle.czu.cz/~spolek/lesaci/materialy/slech
teni/07_molekularni_biologie.ppt+mikrosatelity&hl=cs&ct=clnk&cd=40&lr=lang_cs&client
=opera)**

<http://botany.upol.cz/atlas/system/nazvy/microsphaera-alphitoides.html>

<http://temporas.cesga.es/mildiu.htm>