

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

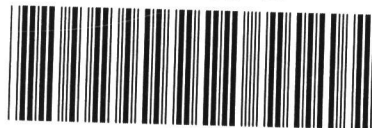
Katedra pícninářství



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická variabilita v rámci rodu *Lecanicillium*

Knihovna JU - ZF



3114703746

Vedoucí diplomové práce:
Doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Autor:
Vít Matys

2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vít MATYS**
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství - sp. gen. inž. a šlechtění rostlin**
Název tématu: **Genetická variabilita v rámci rodu *Lecanicillium* (syn. *Verticillium*)**

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

Úvod: Stručný nástin významu tématu a cíl práce.

Cílem práce bude posouzení vhodnosti techniky molekulárního markerování pro účely popisu identifikace kmenů hub rodu *Pythium* - vytvoření databáze spekter fingerprintů známých izolátů, posouzení míry genetické variability.

Literární přehled: zhodnocení významu molekulárních markerů pro účely popisu a identifikace genotypů.

Materiál a metody: popis metodiky molekulárního markerování, charakteristika studovaných kmenů

Výsledky: vyhodnocení primárních elektroforetických dat, uspořádání do tabulek a grafů, databáze spekter

Diskuse: porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možnosti praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.

Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.

Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"

Obsah: Uvedení stran jednotlivých kapitol práce.

Rozsah práce: 30-40
Rozsah příloh: fingerprinty, databáze spekter
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Hoelzel, A.R. (1992): Molecular Genetic Analysis of Populations. - IRL Press at Oxford Univ. Press, New York.

Gustavo Caetano-Anollés, Peter M. Gresshoff (1997): DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. - John Wiley - Sons, Inc., New York.

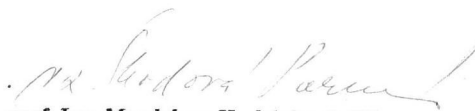
Retrospektivní rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby

Datum zadání diplomové práce: 28. března 2006

Termín odevzdání diplomové práce: 28. dubna 2006

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
/ ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 Česká Budějovice


prof. Ing. Magdalena Hrabánková, CSc.

děkanka

L.S.


doc. Ing. František Klimeš, CSc.

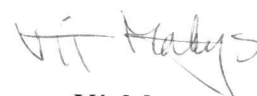
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 28. března 2006

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Genetická variabilita v rámci rodu *Lecanicillium*“ vypracoval sám na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 2006


Vít Matys

Děkuji svému vedoucímu práce doc. Ing. Vladislavu Čurnovi PhD. a svému odbornému konzultantovi Ing. Kateřině Šimáčkové za metodické a odborné vedení, cenné rady a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Vít Matys

OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1 Obecná charakteristika rodu <i>Lecanicillium</i>	2
2.1.1 Vývojový cyklus.....	2
2.1.2 Využití houby <i>Lecanicillium lecanii</i> při biologické ochraně rostlin.....	8
2.2 Mutageneze.....	9
2.2.1 Klasifikace mutací.....	10
2.2.2 Indukce mutací	11
2.2.3 Získávání mutantů.....	12
2.2.4 Výběr a hodnocení mutací.....	12
2.2.5 Příprava mutantů působením fyzikálních faktorů.....	12
2.3 Molekulární markery.....	13
2.4 RAPD.....	14
2.4.1 RAPD v mykologii.....	14
3. MATERIÁL A METODIKA.....	17
3.1 Kmeny a jejich uchování.....	17
3.2 Použitá média a jejich složení.....	17
3.3 Příprava média PDA.....	17
3.4 Metody.....	18
3.4.1 Sterilizace a sterilní práce.....	18
3.4.2 Příprava kultivačních médií.....	18
3.4.3 Kultivace	18
3.4.4 Příprava středových kultur.....	18
3.4.5 Příprava mutantů	19
3.4.6 Izolace mutantů.....	19
3.4.7 Kultivace mutantů.....	19
3.4.8 Izolace DNA pomocí NucleoSpin Plant.....	20
3.4.9 Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB.....	21
3.4.10 RAPD analýza.....	22
3.4.11 Analýza dat.....	23

4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
4.1 Hodnocení morfologických charakteristik.....	25
4.2 Genetická analýza.....	36
5. ZÁVĚR.....	46
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Houbová onemocnění hmyzu představují důležitou část interakcí mezi entomopatogenními houbami a jejich hostiteli. V současné době se považuje 90 rodů a 700 druhů za entomopatogenní, ale pouze pár druhů *Entomophthorales* a *Hyphomycetes* bylo dobře prostudováno jako potenciální mykoinsekticidy (KHACHATOURIANS 1991).

Velký potenciál entomopatogenních hub ve výzkumu, je jejich aplikace proti hmyzu při biologické ochraně rostlin (LEATHERS a kol. 1993)

Protože entomopatogenní houby nemohou být manipulovány stejně snadno jako jednoduché eukaryotické mikroorganismy, nebyly doposud oblíbenými předměty genetických experimentů (KHACHATOURIANS 1991).

Komericializace entomopatogenních hub pro biologickou ochranu rostlin požaduje poznání fyziologických aspektů růstu, metabolické aktivity, genetického základu virulence a hostitelské specifity. S takovými znalostmi, fyziologické manipulace, izolace mutantů se zvýšenou virulencí a vytvoření kmenů s limitovanou perzistencí bezpečných k okolnímu prostředí, by mělo být možno v dohledné budoucnosti (KHACHATOURIANS 1986; BOUCIAS 1988).

V diverzním ekosystému působí na kmen mnoho vlivů, které mohou vést k různým změnám fenotypového projevu (změny morfologických charakteristik = změny vzhledu mycelia, zvrásnění, barvy, produkce spór, rychlosti růstu, tvaru konidií), které mohou vznikat na základě změny regulace genetické informace nebo přímo změnou genetické informace-mutace.

Použité techniky a typy mutagenů jsou důležité z hlediska získání výnosu a konkrétních typů mutantů, které požadujeme. Je velice málo informací, které popisují kontrolovanou metagenezi a vztahy mezi auxotrofií, patogenicitou a virulencí (BIDOCHKA a KHACHATOURIANS 1990, 1993)

Ve své práci se zabývám vlivem selekce a mutací pomocí ultrafialového záření na genetické charakteristiky u vybraných kmenů houby *Lecanicillium lecanii* (ZIMM.) ZARE & GAMS (dříve *Verticillium lecanii* (ZIMM.)), (*Deuteromycotina* / *Deuteromycetes*: *Hyphomycetes*). Cílem diplomové práce, bylo provést sérii mutačních zásahů a vyhodnotit rozsah změn morfologických charakteristik a posoudit změny genotypů pomocí molekulárních markerů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Obecná charakteristika rodu *Lecanicillium*

Rod *Lecanicillium* patří mezi patogenní houby napadající rostliny, hmyz, ostatní houby, hlísty a jiné mikroskopické organismy.

Lecanicillium lecanii představuje široce polyfágní entomopatogenní druh patogena, který je používán k biologické ochraně rostlin (LANDA 1998) a řadí se do *Deuteromycotina* a třídy *Hyphomycetes* (VÁŇA 1996).

Hyphomycetes jsou *Deuteromycetes*, prastarý taxon, jehož členové (rody, druhy) ztratili schopnost sexuálního rozmnožování. *Hyphomycetes* jsou charakteristické produkcí početného množství vzdušných konidií. Tyto *hyphomycetes* jsou patogenní vůči hmyzu a jsou pravděpodobně všechny příbuzné s *Ascomycetes*. Všechny se také projevují podobnou infekční charakteristikou. Tyto patogeny produkují toxiny a antibiotiku podobné látky, které oslabují hostitele a následně vedou k hostitelově smrti (MURRIN 1987). Toxiny jsou často produkovány k usmrcení hostitele (SAMUELS a kol. 1988).

Lecanicillium lecanii má účinek na širokou škálu hostitelů včetně několika velkých řádů hmyzu: *Homoptera* (stejnokřídílí), *Coleoptera* (brouci), *Orthoptera* (rovnokřídílí), *Lepidoptera* (motýli) (FENG 2000), *Hemiptera* (ploštice), *Thysanoptera* (třásnokřídílí), *Diptera* (dvoukřídílí) (LANDA 1998).

2.1.1 Vývojový cyklus

Vývojový cyklus houby *Lecanicillium lecanii* lze stručně rozdělit do těchto fází:

- 1) přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele a produkce extrabuněčných hydrolytických enzymů
- 2) produkce lepivé mucilagenní látky
- 3) formování apresorií na povrchu kutikuly hostitele
- 4) pronikání klíčících konidií (primárního klíčku) do kutikuly a následně hemocoelu a hemolymfy hostitele, interní proliferace
- 5) vytváření povrchové myceliální sítě, externí sporulace a tvorba konidií nové generace

Houbovou nákazu zpravidla iniciují vitální a virulentní konidie. Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem, jsou procesy zpravidla nahodilé, které jsou zprostředkovány pomocí biotických a abiotických faktorů. Z biotických faktorů se na šíření konidií v prostředí nejčastěji podílí vzduch a voda (vítr, déšť, pohyb vody v půdě, vodní páry). Běžným mechanismem šíření houbových nákaz v populacích hmyzu je kontakt zdravých jedinců s jedinci infikovanými nebo tzv. autodisseminace při které dochází k šíření konidií uvnitř populace v souvislosti se specifickými vnitropopulačními procesy (migrace, kopulace, kladení vajíček). Doposud je známo jen málo případů šíření konidií entomopatogenních hub pomocí jiných biotických vektorů (např. roztoči, háďátky, jinými druhy hmyzu), nicméně i tyto mechanismy se při šíření hub v některých případech významně uplatňují (LANDA 1998).

Adheze

Přichycení konidií na tělo hostitele je základním předpokladem vzniku houbového onemocnění (LANDA 1998).

Kutikula hmyzu, hlavní bariéra vůči etomopatogenní infekci je složena ze tří vrstev, epikutikuly, prokutikuly, epidermis. Při styku konidie s kutikulou se uplatňuje nejdůležitější mechanismus a tím je hydrofobní interakce. Hydrofobnost entomopatogenních spór je jedním z aspektů, který zodpovídá za přichycení spór ke kutikule hostitele, stejně tak jako vnější hydrofobní vrstva chrání spóru před vysoušením v prostředí (BOUCIAS a kol. 1988).

Když už jsou spóry pomocí přímé interakce mezi dvěma hydrofobními povrchy (konidie-kutikula hmyzu) přitahovány, další specifické rozpoznávací systémy, jako jsou např. lektiny, mohou zesílit přichycení mucilagenními látkami (LECUONA a kol. 1991) a podporují následné klíčení (LATGE a kol. 1988). Landa uvádí přichycení prostřednictvím elektrostatických sil, případně i molekulární interakci mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikuly hostitele (např. hemaglutiny, N-acetylglucosamin, glykoproteiny, steroly, polární lipidy a jiné).

Klíčení a růst

Pro klíčení a prorůstání houbových spór do hostitelského organismu, musí dojít k jejich hydrataci, aktivaci a produkci hydrolytických enzymů. Schopnost spór klíčit vyžaduje přítomnost uhlíku a zdroje energie, uchycení na substrátu a produkci a využití prekurzorů

k buněčnému růstu a makromolekulární syntézu látek čerpaných z hostitele (KHACHATOURIANS 1992).

Většina entomopatogenních hub produkuje konidie, které jsou energeticky dostatečně vybaveny k vyklíčení, bez nutnosti absorbovat externí živiny. Klíčení konidií převážně závisí na abiotických faktorech, zejména pak na relativní vzdušné vlhkosti a teplotě. Limitní hodnoty extrémních teplot jsou +15°C a +32°C, ale napadení hostitele je většinou pouze jen zpožděno (HUNT a kol. 1995), Landa označuje klíčení konidií za kritickou fázi vývoje a charakterizuje rozmezí optimálních teplot na rozmezí 20°C - 30°C.

Při přímé penetraci kutikulou uplatňují houby kombinaci biologických a fyzikálně mechanických prvků. V první fázi penetrace jsou v oblasti apresoria pronikající hyfy produkovány kutikulu degradující enzymy (lipázy, chytinázy, proteázy). Od určité fáze naklíčení je další vývoj patogena závislý na externím příjmu živin. Houba začíná přijímat látky, které jsou zprvu součástí kutikuly, následně pak absorbuje živiny i z vnitřních orgánů a tkání hostitele. Kromě přímé penetrace kutikulou využívají entomopatogenní houby k pronikání do tělní dutiny i přirozené otvory. Běžným místem k pronikání jsou dýchací otvory, řitní nebo ústní otvor (LANDA 1998).

Dillon a Charnley 1991 poukazují na zhoubnost spor hub v zažívacím traktu hmyzu. Kousavý hmyz s porovnáním se savým hmyzem přichází do kontaktu se spoustou mikroorganismů při příjmu rostlinné potravy nebo při kanibalismu. Samozřejmě jakákoli zranění, rány či poškození činí ústní partie náchylnější k infekcím a vniknutí mikrobiálních činitelů při příjmu potravy.

Růst uvnitř tělní dutiny hmyzu

Infekce hemocoelu a tkání hostitele má za následek rozpad fyziologických funkcí, chorobu a konečnou smrt hostitele (BROBYN a WILDING 1983).

Po proniknutí patogena do tělní dutiny, dochází zpravidla k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělící a pomnožující tělíška, tzv. hyfová tělíška, blastospory. Tato tělíška se rychle namnožují a ve velmi krátké době zcela vyplňují a mumifikují hostitele, který je v této fázi vývoje mykózy již usmrcen (LANDA 1998).

Hyfy jsou úzkého tvaru a mají septy – příčky v pravidelných intervalech, sloužící k limitované ztrátě cytoplazmy, když dojde k poškození hyfy. Tyto septy jsou uprostřed perforované, umožňují omezený pohyb cytoplazmy a někdy i jádérka. (KENDRICK 1992).

Mechanismus odolnosti buněk hub proti obraně imunologické reakci hmyzu je velmi důležitý pro dělení (množení) hyf entomopatogenních hub uvnitř těla hostitele (KHACHATOURIANS 1986).

Vztah mezi teplotou a relativní vzdušnou vlhkostí na virulenci *Lecanicillium lecanii* vůči různým druhům mšic, *Rhopalosiphum padi* (HSIAO a kol. 1992) a *E. neoaphidis* a *Sitobion avenae* (SCHMITZ a kol. 1993) či *Acyrtosiphon pisum* (MORGAN a kol. 1995) ukazuje teplotní závislost virulence na teplotě bezkřídlých populací hmyzu k entomopatogenním houbám. Citlivost či odolnost (resistence) vývojových stádií hmyzu k houbovým infekcím poskytly další cenné informace o vztazích mezi entomopatogenními houbami a hmyzem (KHACHATOURIANS 1992).

Mumifikace

Mumifikací hostitele končí parazitická fáze vývojového cyklu a nastupuje finální fáze – tvorba povrchového mycelia a sporulace (saprofytický vývoj patogena na usmrčeném hostiteli) (LANDA 1998).

Po smrti hostitele prorůstá houba na povrch mrtvého těla, tvoří hustou myceliální síť (KHACHATOURIANS 1986), kde se postupně vytváří konidiofory, na kterých se ve finální fázi vývojového cyklu formují nové konidie (LANDA 1998)

Konidie

Mnoho běžných hub produkuje konidie basipetálně ze specializovaných konidiogenních buněk zvaných konidiofory. Tímto typem konidiogeneze asexuálně produkuje konidie i rod *Lecanicillium* (KENDRICK 1992).

Konidie mohou být pokryty mucilagenní vrstvou, ale spousta jich je suchých. Přichycení suché spóry je zprostředkováno lektinovými interakcemi či silnou hydrofobností vnější vrstvy (BOUCIAS a PENDLAND 1991).

Velikost a tvar konidií

U druhu *Lecanicillium lecanii* byla zjištěna velká variabilita ve tvaru a velikosti konidií. Vzhledem k tvaru, můžeme konidie rozdělit na 5 skupin:

1. cylindrické s polovičním sevřením a zaoblenými konci
2. tvaru srpku, zahnuté s ostrými konci
3. s jedním koncem poněkud zřetelně zúženým
4. čočkovitého tvaru
5. ovoidního až elipsovitého tvaru

Velikostně můžeme konidie rozdělit do 3 skupin:

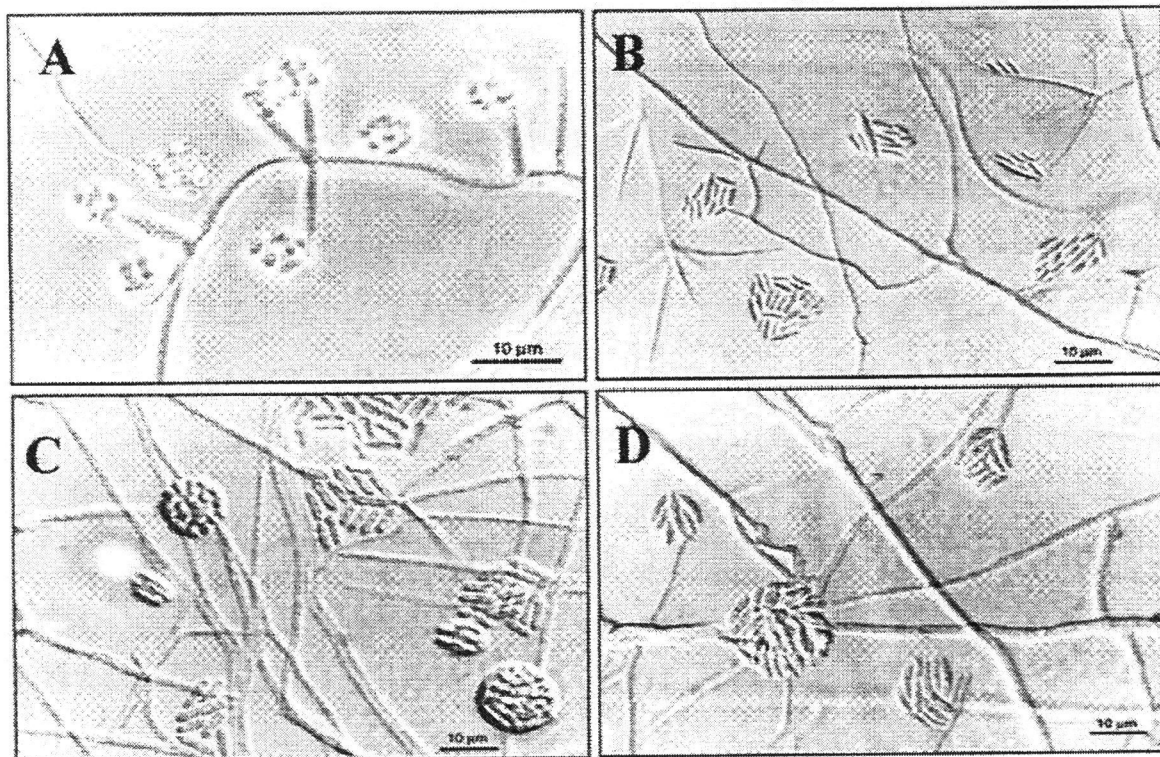
1. malé 2,9-3,9 μ m
2. střední 4,6-5,8 μ m
3. velké 6,5-8,8 μ m

(CORTEZ-MADRIGAL 2001)

Velikost a tvar konidií společně s makroskopickým vzhledem kolonií, byly nejužitečnější charakteristikou při výběru multisporických izolátů *Lecanicillium lecanii*. Přestože Balazy (1973) rozpoznal variabilitu závislou na tvaru a velikosti konidií, bylo překvapující, že byla pozorována tak široká variabilita velikosti a tvaru konidií (u našich izolátů) (CORTEZ-MADRIGAL 2001).

Například kmeny *Lecanicillium lecanii* s velkými konidiami (6,7-8,4 μ m) měly větší účinek proti mšicím zatímco kmeny s malými konidiami byly více virulentnější vůči molicím (HALL 1984)

Obr.1 Velikost a tvar konidií různých kmenů *Lecanicillium lecanii*



- A- malé konidie ovoidního až elipsovitého tvaru
- B- malé konidie čočkovitého tvaru
- C- velké konidie cylindrického tvaru
- D- středně velké konidie srpovitého tvaru

Velikost konidií je jedním z faktorů, které mohou mít vliv na rychlost klíčení. V souladu s tímto Hall (1984) spekuloval, že kmeny s vnějšími konidii měli vyšší rychlost klíčení, než ty s malými konidii (CORTEZ-MADRIGAL 2001). Rychlé klíčení dává velkou výhodu pro započítí infekce, zejména když nejsou podmínky pro klíčení ideální (DRUMMOND a kol. 1987). Hall (1984) a Jackson (1985) shledali přímou závislost mezi stupněm(rychlostí) klíčení konidií *Lecanicillium lecanii* a infekčností (nakažlivostí) druhu mšice *Macrosiphoniella sanborni*, avšak obrácený účinek byl prokázán u rekombinantních kmenů *Lecanicillium lecanii* (DRUMMOND a HEALE 1988).

2.1.2 Využití houby *Lecanicillium lecanii* při biologické ochraně rostlin

Hmyz přichází do konfliktu s lidmi v mnoha odvětvích lidské činnosti. Hmyz ničí a znehodnocuje lidské zdroje, například poškozují lesní kultury, pastviny, zemědělské plodiny a v neposlední řadě má i velký vliv při rozšiřování lidských chorob. Použití hub při kontrole hmyzích populací je potenciální biologickou alternativou před používáním chemických pesticidů, které poškozují životní prostředí. Bezpečnost k necílovým druhům je velmi důležitou složkou a houby jsou zřejmě méně nebezpečné než použití chemických pesticidů (MURRIN 1987).

Podrobná znalost ekologických vztahů mezi houbou a hmyzem, stejně tak jako znalost genetického základu těchto vztahů, je nezbytná k efektivnímu realizování programu ochrany rostlin pomocí biologických činitelů (MURRIN 1986). Zkoumání genetických informací hostitele a patogena pomocí molekulárních technik je základem k pochopení specifity vztahů mezi nimi (ROBERTS a HAJEK 1992).

Obrovský rozsah genetické diverzity entomopatogenů v přírodě nabízí široký potenciál pro jejich selekci a použití v biologické ochraně proti hmyzu (GOETTEL a kol. 1989, 1990). ROBERTS a HAJEK (1992) uvádí 14 rodů hub, které mají potenciální využití v biologické ochraně proti hmyzu, ale pouze 6 jich dosud prošlo kompletním registračním procesem a bylo schváleno pro komerční využití. Největší zájem byl zaměřen na *Deuteromyces* konkrétně na *Lecanicillium lecanii* a *Beauveria bassiana* (CHARNLEY 1991).

Komerční biopreparáty

Účinnou složkou většiny biopreparátů na bázi entomopatogenních hub tvoří konidie nebo blastospory. Konidie jsou produkovány formou povrchových kultivací na tekutých živných půdách nebo na pevných přirozených substrátech a biotechnologie jejich produkce imituje přirozený cyklus, při kterém je zprvu vytvořena povrchová myceliální biomasa a na konci cyklu se na vzdušném myceliu tvoří konidie (LANDA 1998).

Ve Velké Británii prošly kompletním registračním procesem izoláty *Lecanicillium lecanii* od firmy Microbial resources pro kontrolu mšic (Vertalec) a molice (Mycotal) na ochranu okrasných rostlin a zemědělských plodin. Tyto přípravky se přestaly vyrábět kvůli malé tržní síle a nespolehlivosti těchto preparátů. Holandská společnost Koppert navrátila

Mycotal a Vertalec zpátky na trh použitím nových metod při kultivaci a získávání preparátů (CHARNLEY 1989). V sortimentu dostupných biopreparátů mají již tradiční místo biopreparáty firmy Koppert, které jsou známy pod obchodními názvy Mycotal (určen k ochraně skleníkových plodin proti molici skleníkové a molici bavlníkové), Vertalec (kmen vysoce virulentní na různé druhy mšic) a Triptal (kmen *L. lecanii* s vysokou účinností na hmyz třásnokřídly, např. třásněnka zahradní *T. tabaci* a třásněnka západní *Frankliniella occidentalis*) (LANDA 1998).

2.2 Mutagenese

Změna genu nebo geneticky aktivních struktur organismu skokem byla nazvána mutací. Jedinci, kteří jsou nositeli těchto změn a odlišují se od původního typu dané formy nebo odrůdy, jsou mutanty. Změny vyvolané mutagenním agens mohou přispět k doplnění genových zdrojů. Tento způsob využití mutací je označován ve šlechtitelském procesu jako mutagenese (BOHÁČ 1990).

Mutagenese, kterou rozumíme umělé vyvolávání mutačních změn, pomáhá rozšiřovat genetickou proměnlivost rostlin i hub. Může přispět k rozšíření genetických zdrojů pro plnění úkolů šlechtitelského programu (GRAMAN 1997).

Mutace a selekce zatím představují nejdůležitější postupy při přípravě kmenů. Patří mezi techniky šlechtění, které umožní výhodné obměny nebo lepší expresi genů, zodpovědných za tvorbu produktu. Současné pokroky u mutagenese, zejména lepší pochopení mechanismu účinku mutagenů a reparačních mechanismů, zdůraznily úlohu mutačních programů v průmyslové genetice (KRUMPHANZL, ŘEHÁČEK a kol. 1988).

Používá se řada fyzikálních a chemických faktorů: ultrafialové světlo (245nm), blízké ultrafialové světlo v přítomnosti 8-methoxypsoralenu, ionizující záření (paprsky X nebo γ), kolchicin, dusitá kyselina, diepoxybutan, N-yperit, β -propiolakton, epichlorhydrin, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, N-methyl-N-nitrosourea, ethylmethansulfonát, ethylenimin, dimethylsulfát, triethylenmelamin, akrilflavin, akridinová oranž, ethidiumbromid, ICR-sloučeniny, analoga bází (např. 5-bromdeoxyuridin, 5-fluorouracil, 6-merkaptopurin, 8-azaguanin) apod. Vhodný a systematický přístup indukce mutací zahrnuje výběr nejúčinnějšího mutagenu, optimalizaci experimentálních podmínek (pH, dávka, doba působení, fáze buněčného růstu) a izolaci mutantů senzitivních k mutagenu nebo deficientních v opravných procesech. Techniky komutace a řízené mutagenese je možno použít pouze v

případě, že je známa topologie genomu ve vztahu ke genům, řídícím biosyntézu daného produktu (KRUMPHANZL, ŘEHÁČEK a kol. 1988).

Podstatného zvýšení produkce antibiotik nebo jiných metabolitů, řízené polygenními systémy, může být dosaženo hromaděním drobných mutací v několika následných mutagenních cyklech. Pro klasifikaci mutantních klonů v populacích ovlivněných mutageny je možno použít statistickou metodu (KRUMPHANZL, ŘEHÁČEK a kol. 1988).

Široce využíváno je indukovaných mutací u mikroorganismů, kde úspěšné šlechtění např. kmenů *Penicillium* bylo založeno vlastně jen na selektování mutovaných kmenů po ozařování (ŘEHOUT 2000).

2.2.1 Klasifikace mutací

Třídění mutací pro šlechtitelské účely vychází z materiální lokalizace genetické změny. Pro teorii mutageneze a její využití ve šlechtění mají význam vedle vitálních i letální a semiletální mutace (BOHÁČ 1990).

Z hlediska lokalizace mutací v genotypu rozdělujeme mutace na:

- genové (změny v molekule DNA)
- chromozomální (změny struktury a tvaru chromozomů)
- genomové (změny v chromozomálním počtu)
- mimojaderné

Z hlediska praktického je účelné členit mutace na

- spontánní (důsledek mutagenní zátěže daného prostředí)
- indukované (vyvolány přesně definovaným, cíleným mutagenním faktorem)

Podle účinku na fenotyp nositele se člení mutace na:

- vitální (změna genotypu v příznivém smyslu)
- letální (nepříznivé účinky, vedou ke snížení životaschopnosti až letalitě) (ŘEHOUT 2000).

2.2.2 Indukce mutací

Pro úspěšnost indukce mutací je důležité stanovení dávky či koncentrace mutagenu. Při tvorbě mutací se očekává, že se převážná část genetické výbavy původního organismu zachová (BOHÁČ 1990).

Podle povahy agens, které mutaci vyvolává, se rozlišují mutageny fyzikální a chemické. U fyzikálních jde hlavně o tepelné šoky, ionizující záření, jehož zdrojem jsou rentgen, radioaktivní izotopy a reaktory nebo urychlovače nebo ultrafialové (neionizující) paprsky. Po ionizujícím záření dochází ke změnám vzájemným působením záření s látkou a uvolněním atomů a molekul, vedoucí k přenosu energie. Celkový účinek záření je rovný množství energie, již pohlcují tkáň. Je proto účinné především takové záření, které proniká do větší hloubky. Přenos energie vzrůstá s hustotou ionizace. Nejnižší je u beta částic, vysoká u gama paprsků, následuje rentgenové záření, neutrony a alfa částice (BOHÁČ 1990).

Záření se aplikuje:

- *akutně*, což je jednorázová krátkodobá aplikace, např. ozářením objektu průmyslovým rentgenem. Ozařují se semena, semenáče nebo očka, rouby apod. Akutně se např. ovlivňuje rostlinný materiál neutrony v biologickém kanálu atomového reaktoru.

- *chronicky*, tj. po celou dobu vegetace nebo jen po určitou dobu vegetace (před kvetením), po dobu několika týdnů, měsíců apod., např. na gamapoli (GRAMAN 1997; BOHÁČ 1990).

Chemomutageny mají pro spektrum vitálních mutací obdobný účinek jako ionizující záření. Jsou používány hlavně epoxidy, etyleniminy, metansulfonát, alkaloidy, peroxidy, formaldehyd, močovina a její deriváty, etylmetansulfonát. Jsou aplikovány v podobě vodných roztoků různé koncentrace (BOHÁČ 1990).

Chemické látky s mutagenním účinkem lze rozčlenit do těchto skupin:

1. sloučeniny yperitu a slzotvrné látky
2. alkylační sloučeniny
3. puriny a jejich deriváty (BOHÁČ 1990).

2.2.3 Získávání mutantů

Po aplikaci různých mutagenů dochází k rozdílným důsledkům. Vzhledem k základnímu členění mutagenů lze rozlišit typy mutací, které se mohou jevit v množství i kvalitě. Po působení chemomutagenů se uskutečňují chemické reakce. Při těchto pochodech mohou vznikat chemicky aktivní molekuly, které jsou produktem interakce molekul chemomutagenu a dalšími komponenty buňky. Proti ionizujícímu záření vyvolávají chemomutageny hlavně mutace a mikromutace kvantitativních znaků (BOHÁČ 1990).

Četnost umělých mutací se často porovnává s výskytem mutací přirozených. Podíl přirozených mutací stoupá při extrémních podmínkách stanoviště. Při vyšším počtu mutací umělých je pravděpodobný vyšší podíl zcela nových genotypů. Značná část změn je však i v tomto případě negativních. Zvyšování účinnosti mutagenů se dosahuje rovněž kombinacemi mutagenů nebo chemomutagenů se stimulatory růstu (BOHÁČ 1990).

2.2.4 Výběr a hodnocení mutací

V závislosti na dávce fyzikálního mutagenu nebo na koncentraci chemomutagenu se mohou podle druhu plodiny projevit buď příznaky stimulace nebo inhibice.

De Vries rozčlenil mutace podle hodnoty na progresivní (k dědicímu komplexu se připojuje další znak), retrogresivní (určitý znak mizí) a degresivní (znak, který už jednou zanikl se objevuje znovu) (BOHÁČ 1990).

2.2.5 Příprava mutantů působením fyzikálních faktorů

Ultrafialové záření (UV) je světelná energie od 100 do 400 nm vlnové délky, mezi částí rentgenového záření a viditelnou částí spektra. Z fyzikálních faktorů se na přípravu mutantů nejčastěji používá UV s vlnovou délkou 250 až 270 nm. Ultrafialové paprsky, vyjma krátkovlnného spektra, nevyvolávají ionizaci. Jejich nedostatkem je jejich slabá průniková aktivita a jako mutagen poškozuje zpravidla jen genetický materiál povrchových buněk. UV záření v mikroorganismech způsobuje vznik chemických vazeb v buněčné DNA. Vystavení tak přerušuje normální DNA replikaci a organismy jsou buď zabity nebo inaktivovány (BETINA a kol. 1987).

Působením tohoto mutagenu se mohou získat morfologičtí, auxotrofní nebo barevní mutanti, mutanti s různou rychlostí růstu, různou citlivostí na antibiotika a i mutanti se zvýšenou schopností produkce některých průmyslově důležitých látek. Ozařují se přímo buňky v určité růstové fázi (BETINA a kol. 1987).

2.3 Molekulární markery

Kvalitativní a kvantitativní informace týkající se úrovně diverzity jsou nesmírně důležitým faktorem v mnoha oblastech biologického výzkumu, ať již základního nebo amplifikovaného: v ekologii, taxonomii, šlechtění a ochraně genofondu. Pro "markerování" diverzity, pro detekci polymorfismu na úrovni nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik. Většina molekulárních markerů spadá do jedné ze tří kategorií technik: (1) techniky využívající hybridizaci; (2) techniky založené na PCR reakci (amplifikace využívající náhodných primerů, multi-locus PCR); a (3) techniky založené na PCR reakci (amplifikace známých cílových sekvencí, single-locus PCR). Některé techniky jsou navíc modifikacemi nebo kombinacemi dalších metodických postupů (KARP A EDWARDS 1997).

Pomocí DNA markerů lze 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 (např. SLG geny), genetické mapování, populační genetiku a populační genekologii 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 (HARAŠTOVÁ 2003).

2.4 RAPD analýza = Random Amplified Polymorphic DNA (polymorfismus náhodně amplifikované DNA)

Tato technika je řazena mezi ty které jsou založené na PCR reakci, je u nich odstraněna nezbytnost složitých a náročných hybridizačních kroků. Jejich společným znakem je ten fakt, že se obejdeme bez požadavku znalosti cílových sekvencí DNA fragmentu.

Při RAPD jsou jako primery používány krátké náhodné hexametry až dekametry a amplifikované produkty jsou separovány na agarózovém gelu za přítomnosti ethidium bromidu a vizualizovány pod UV světlem (RAFALSKI 1997).

Metoda RAPD detekuje malé převrácené nukleotidové sekvence roztroušené po celé genomické DNA (WELSH A McCLELAND 1990; WILLIAMS a kol. 1990). RAPD technika používá pouze jeden primer o náhodné nukleotidové sekvenci. Principy RAPD jsou detailně uvedeny v pracech Hadrys a kol. (1992) a Tingey a del Tufo (1993). Technika RAPD má mnoho výhod:

- nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA, postup je relativně jednoduchý a rychlý a pro vytvoření PCR produktů je potřeba pouze nanogramové množství DNA;
- technika je upřednostňována pro rozlišení genotypů u mnoha druhů, populací a nebo patotypů, RAPD markery mohou být též použity při analýze genotypů po křížení rodičů na různých taxonomických úrovních;
- je to vhodný nástroj pro vytvoření genetických map (JUDELSON a kol. 1995) a RAPD se osvědčila jako efektivní metoda pro identifikaci molekulárních markerů (TINGEY a del TUFO 1993);
- tato technika je vhodná pro populační techniku a je úspěšně používána pro rozlišení druhů a kmenů v rámci druhů u rostlin, bakterií, živočichů a hub (WILLIAMS a kol. 1990).

2.4.1 RAPD v mykologii

Jedna z prvních aplikací PCR v mykologii byla popsána 1990 v práci White a kol. a zabývala se amplifikací a sekvenováním rDNA, aby prokázala taxonomické a fylogenetické vztahy hub. Sekvence rDNA jsou velmi často používány v taxonomických a fylogenetických studiích, protože jsou běžně nacházeny v buňkách, ve kterých mají důležitou funkci; takže, jejich evoluce odráží evoluci celého genomu. RAPD je stále více využívána k vytváření molekulárních markerů, které jsou užitečné v taxonomii a pro charakteristiku populací hub.

Hlavní výhodou této metody je to, že není potřeba znát sekvence DNA, takže jakýkoli primer může amplifikovat DNA (EDEL 1998).

Metoda RAPD je úspěšně používána k rozlišování a identifikaci hub na úrovni jak vnitrodruhové (GUTHRIE a kol. 1992), tak mezidruhové (LEHMAN a kol. 1992). Rovněž, PCR fingerprinting pomocí primerů, jež detekuje variabilní a opakující se sekvence, je používán k objasnění taxonomických vztahů mezi kmeny hub a druhy (MEYER a kol. 1993).

Na druhové úrovni jsou RAPD data využívána pro produkci druhově specifických sond a primerů (např. u *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*, *Phytophthora cinnamoni*, *Tuber magnatum* a *Glomus mosseae* (DOBROWOLSKI A O'BRIEN 1993; LANFRANCO a kol. 1998; MANULIS a kol. 1994)). V některých studiích jsou RAPD profily používány pro rozlišení individuálních izolátů v rámci druhu i mezi druhy, jako např. u hub rodu *Metarrhizium* a *Candida* (LEHMANN a kol. 1992; BRIDGE a kol. 1997).

Metoda RAPD je často používána k determinaci odlišných vnitrodruhových skupin, jako jsou anastomózní skupiny hub u druhu *Rhizoctonia solani* (DUNCANS a kol. 1991; BIDOCHKA a kol. 1994). Další aplikace RAPD jsou v determinaci jednotlivých kmenů uvnitř konkrétní populace, např. toxické kmeny *Aspergillus flavus* (BAYMAN a COTTY 1993) a kmeny rodu *Trichoderma* (FUJIMORI a OKUDA 1994; SCHLICK a kol. 1994).

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

Metody založené na PCR nabízejí mnoho nových nástrojů vhodných pro systematické studie u hub a pro vymezení druhu jako taxonomické jednotky. Tyto nástroje mohou být používány také pro vymezení a určení vztahů mezi druhy, a to buď bezprostředním porovnáním nebo prostřednictvím fylogenetických analýz. PCR metody vedly k lepšímu pochopení molekulární variability hub a zdůraznily nutnost pečlivého posouzení strategie odbírání vzorku a jeho velikosti před taxonomickou klasifikací. To také ukazuje, že molekulární variabilita v rámci různých druhů hub není konstantní a úroveň jak homogenity, tak i heterogenity se bude měnit v závislosti na studovaném druhu. Možná je překvapující, že

zavedení PCR technik nevedlo k hromadnému revidování názvů jednotlivých druhů hub a v mnoha případech již existující pojetí druhu dokonce posílilo. Nicméně široký rozsah molekulární heterogenity, který byl nalezen u některých druhů, vedl k závěru, že uvnitř skupiny již existujících druhů se může vyskytovat i mnohem více druhů "tajných" a nepopsaných. U těchto technik je naděje, že budou moci v budoucnosti poskytnout mnoho odpovědí na dosud nezodpovězené základní otázky systematiky a biodiverzity (BRIDGE a ARORA 1998).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Kmeny a jejich uchování

V této práci byly použity tři kmeny houby *Lecanicillium lecanii*: P, 7, 9. Kmen P je divokým kmenem odizolovaným z molice skleníkové v průběhu spontánní epizootie ve sklenicích v Prachaticích. Kmen 7 je izolát z biopreparátu Mycotal a kmen 9 pochází z biopreparátu Vertalec (oba poskytnuté firmou Koppert B.V. Nizozemí).

Kmeny byly vitalizovány vyočkováním na PDA médium (tab. 1). Kultivace probíhala při teplotě 25°C do dosažení úplné sporulace.

Krátkodobé udržování, udržování mezi jednotlivými pasážemi, kmenového materiálu bylo realizováno s použitím téhož média, tzn. média PDA.

3.2 Použitá média a jejich složení

Při práci bylo použito médium PDA (potato dextrose agar) od firmy HiMedia Pvt. Ltd. Složení média ukazuje tabulka 1.

Tab.1

PDA médium	(g.l ⁻¹)
bramborová infuze	200,0
dextrosa	20,0
agar	15,0

Výsledné pH je při teplotě 25°C 5,6 ± 0,2

3.3 Příprava média PDA

Pro přípravu navážíme 39,0g média PDA a přidáme 1000ml destilované vody. Zahříváme až do rozpuštění a poté sterilujeme v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 minut. Před naléváním na Petriho misky je třeba médium promíchat.

3.4 Metody

3.4.1 Sterilizace a sterilní práce

Média, sklo a veškeré nástroje byly sterilovány v autoklávu (120°C, 0,1 Mpa, 30 min). Veškeré sterilní operace byly prováděny v laminárním boxu.

3.4.2 Příprava kultivačních médií

Příprava kultivačních médií pro kultivaci na zpevněné agarizované půdě v Petriho miskách: připravené médium, bylo sterilováno autoklávováním a v laminárním boxu rozlito po 5 ml do Petriho misek. Po vychladnutí byly Petriho misky s médiem skladovány ve 4°C po dobu max. 30 dnů.

3.4.3 Kultivace

Byla prováděna na Petriho miskách roztěrem inokula setřeným ze sporulující kultury, po celém povrchu média. Roztěr byl prováděn kličkou, klikatým pohybem, tahy těsně vedle sebe.

3.4.4 Příprava středových kultur

Jako původní kultura byla použita kultura přesně 7 dní stará, aby bylo dosaženo objektivních výsledků při morfologickém hodnocení jak původních kmenů, tak mutantů.

Sterilním skalpelem se odebral co možná nejmenší kousek mycelia a přenesl se na novou Petriho misku s PDA médiem.

3.4.5 Příprava mutantů

K přípravě byly použity kultury základních kmenů staré 12 dní, v době, kdy začaly sporulovat. Rozředěním 20% roztoku Tween 20 se sterilní vodou získáme 5% roztok. Tento použijeme ke smývání mycelia pro získání konidií a vzniklou suspenzi konidií převedeme pomocí sterilní pipety do eppendorfky. Koncentrace konidií byla spočítána pomocí Bürgerovy komůrky a titer byl upraven na 10^7 . Eppendorfky s 1,5 ml suspenze byly vloženy do ultrazvukové lázně a byly exponovány ultrazvukem po dobu 5-25 minut. Poté se na dvě Petriho misky s médiem PDA z každé eppendorfky převedlo po 50 μ l suspenze. Ty byly dále ozařovány UV světlem (při kterém by mělo docházet k vlastním mutacím). Jedna z Petriho misek byla ozařována 5 minut, druhá 10 minut. Kultivace konidií vystavených mutačním zásahům trvala od 7 do 14 dnů.

3.4.6 Izolace mutantů

Po regenerační kultivaci (7-14 dní), byly jednotlivé individuálně rostoucí kolonie odizolovány. Izolace byla provedena sterilním skalpelem, podobně jako při přípravě středových kultur, na samostatnou Petriho misku s médiem PDA.

3.4.7 Kultivace mutantů

Izolované kolonie byly kultivovány 12 dní na médiu PDA; po této době bylo možné všechny, i ty s pomalejším růstem, přepasážovat na dvě nové Petriho misky s médiem PDA. První byla kultivována 7 dní a použita k přípravě dvou dalších Petriho misek: pro středovou kulturu a získání mycelia pro genetickou analýzu. Druhá byla kultivována 16 dní pro další uchování v 20% glycerinu za teploty -80°C .

Příprava i hodnocení středových kultur mutantů byla provedena naprosto stejně jako u základních kmenů. Kultura pro genetickou analýzu byla kultivována 16 dní.

3.4.8 Izolace DNA z mycelia s použitím NucleoSpin Plant (Macherey-Nagel)

Příprava a homogenizace vzorku

Odebrané mycelium propereme v ethanolu a připravíme si vzorek cca 200mg (váha čerstvého vzorku). Mycelium může být získáno z kultury kultivované v kapalném médiu nebo setřeno z povrchu pevného média. Vzorek vložíme do eppendorfky, opět kompletně zalijeme ethanolem, rozmixujeme a následně odpipetujeme ethanol.

Izolace DNA

K připravenému vzorku přidáme 200 μ l buffer C1 a řádně vzorek pomocí tyčinky rozmělnujeme. Poté vzorek vortexujeme po dobu cca 1 minuty. Opět přidáme 100 μ l buffer C1 a pokračujeme v rozmělnování. Dále přidáme 100 μ l chloroformu a vzorek vortexujeme 10 vteřin. Následuje centrifugace vzorku 5 minut při 11000 rpm, při které se nám vytvoří 2 fáze. Svrchní vodní fázi odpipetujeme do nové 1,5ml eppendorfky a necháme inkubovat 30 minut při 60°C.

Fialovou NucleoSpin filtrační kolonu umístíme dovnitř nové sběrné NucleoSpin eppendorfky, nahoru kolony přemístíme pipetou lyzát a centrifugujeme 5 minut při 11000 rpm.

Filtrát získaný filtrací přelijeme do nové 1,5ml eppendorfky, přidáme 300 μ l pufru C4 a 200 μ l ethanolu a směs vortexujeme 30 vteřin. Zelenou NucleoSpin kolonu umístíme dovnitř nové sběrné NucleoSpin eppendorfky, nahoru kolony přemístíme pipetou lyzát a centrifugujeme 1 minutu při 11000 rpm. Filtrát vylejeme.

Vymytí křemenné membrány provádíme ve třech fázích. Nejprve přidáme do zelené kolony 400 μ l pufru CW. Provedeme centrifugaci po dobu 5-ti minut při 11000rpm, do kolony přidáme 700 μ l pufru C5 a centrifugaci provádíme za stejných podmínek, znovu přidáme 200 μ l pufru C5 a centrifugujeme 2 minuty při 11000 rpm resp. do úplného vyschnutí membrány.

Získání vysoce čisté DNA

NucleoSpin kolonu vložíme do nové 1,5ml eppendorfky a na její membránu napipetujeme 100 μ l pufru CE (eluční pufr) predehřátý na 70°C. Inkubujeme 5 minut při

pokožové teplotě a následně centrifugujeme 1 minutu při 11000 rpm. Tímto získáváme 1. eluát. Pokud chceme získat 2. eluát tak NucleoSpin kolonu vložíme do jiné 1,5ml eppendorfky, na membránu opět napipetujeme 100 μ l pufru CE přehřátého na 70°C. Opět inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě a následně centrifugujeme 1 minutu při 11000 rpm. Tímto postupem získáváme 2. eluát.

3.4.9 Izolace rostlinné DNA pomocí CTAB dle Williams a kol. 1992

Modifikovaná metoda

Protokol:

- 1) do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek (eppendorfek) dáme cca 200 mg mycelia, ze kterého chceme izolovat DNA; zhomogenizujeme
- 2) ke každému vzorku přidáme 500 μ l extrakčního pufru (2% CTAB + β -merkaptoethanol) přehřátého na 65°C, tkáň zhomogenizujeme a promícháme s pufrem
- 3) necháme 5 minut inkubovat při 65°C ve vodní lázni, během inkubace jednou lehce promícháme
- 4) přidáme 500 μ l směsi chloroformu-IAA, 5 minut protřepáváme
- 5) centrifugujeme 5 minut na maximální rychlost při pokojové teplotě
- 6) do nových eppendorfek přepipetujeme vodní fázi
- 7) přidáme 2/3 objemu isopropanolu (cca 250 μ l), 2-3x lehce promícháme
- 8) dáme na 2 minuty do mrazáku (-20°C)

- 9) centrifugujeme 5 minut při 4°C na maximální rychlost, DNA by se měla zachytit na dně eppendorfky; supernatant odstraníme
- 10) přidáme 1ml ledového 70% ethanolu, centrifugujeme 5 minut na maximální rychlost při 4°C, slijeme (pozor – nevylít DNA pelet), usušíme (přes noc)
- 11) dle množství peletu přidáme 20-200 µl sterilní vody
- 12) uzavřené eppendorfky necháme při 37°C třepat, aby došlo k rozpuštění DNA
- 13) DNA uchováváme při -20°C

3.4.10 RAPD analýza

Protokol RAPD analýzy byl modifikován z metodiky práce WILLIAMS a kol. (1990). PCR reakce byla prováděna v objemu 25µl obsahující lx PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 100µM 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 2,5 hodiny při napětí 70V. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí digitálního fotoaparátu EPSON PHOTOPC® 3100Z.

3.4.11 Analýzy dat

Analýza pruhů na gelu

Po vyhodnocení pozice pruhů na gelu byla sestavena matice přítomnosti/nepřítomnosti pruhu v dané zóně a provedlo se statistické vyhodnocení dat. Pro tyto účely byl využíván program *MVSP* (Kovach Comp.Serv.). 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. Na základě zjištěných 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* (Kovach Comp.Serv.).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Hodnocení morfologických charakteristik

Byly hodnoceny tyto 3 znaky:

- radiální růst
- barva mycelia
- tvorba pigmentu

Hodnocení bylo prováděno 3., 5. a 7. den ode dne inokulace. Středové kultury původních kmenů i kurantních kmenů byly hodnoceny na médiu PDA.

Význam hodnot uvedených v tabulkách:

B – bílá

SŽ – světle-žlutá

Ž – žlutá

BŽ – béžová

TBŽ – tmavě-béžová

V tabulce 2-4 jsou uvedeny morfologické charakteristiky u původních kmenů *Lecanicillium lecanii* na PDA médiu.

Tab.2 Kmen 7

č.p.	druh: <i>Lecanicillium lecanii</i> kmen: 7 médium: PDA								
	radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu		
	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den
1	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
2	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
3	0,3	0,5	0,7	B	B	B	Ž	TBŽ	TBŽ
4	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
5	0,5	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
6	0,4	0,6	0,7	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
7	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
8	0,5	0,6	0,9	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
9	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
10	0,5	0,6	0,9	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ

Tab.3 Kmen 9

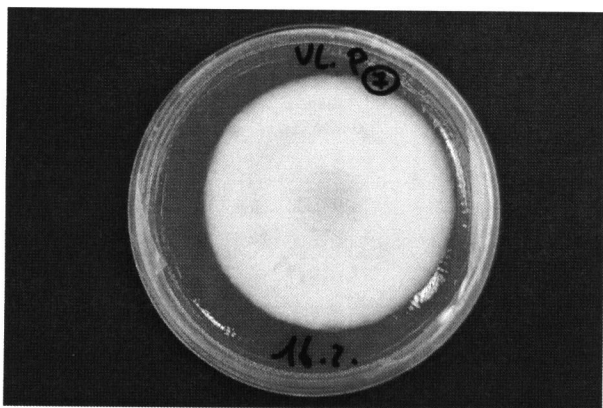
č.p.	druh: <i>Lecanicillium lecanii</i> kmen: 9 médium: PDA								
	radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu		
	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den
1	0,3	0,4	0,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
2	0,3	0,4	0,5	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
3	0,4	0,5	0,6	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
4	0,4	0,6	0,7	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
5	0,3	0,4	0,5	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ
6	0,4	0,5	0,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
7	0,4	0,5	0,6	B	B	B	BŽ	BŽ	BŽ
8	0,3	0,4	0,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
9	0,4	0,5	0,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
10	0,3	0,5	0,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ

Tab.4 Kmen P

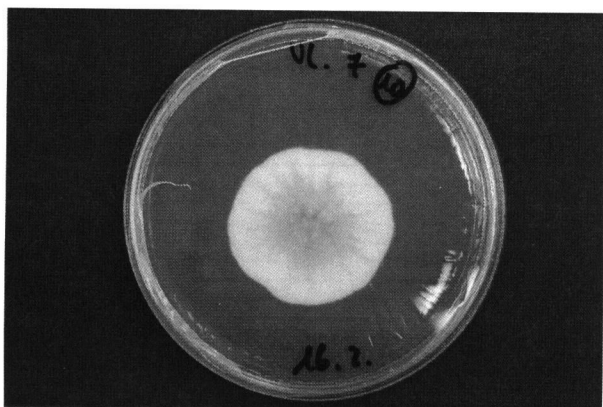
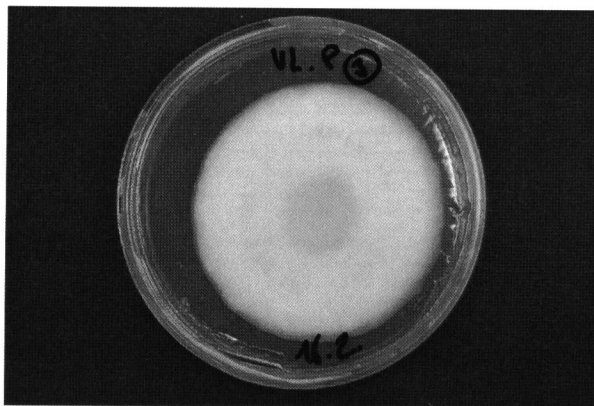
		druh: <i>Lecanicillium lecanii</i>			kmen: P			médiu: PDA		
č.p.	radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu			
	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	
1	0,6	1,2	1,5	B	B	B	SŽ	Ž	BŽ	
2	0,7	1,3	1,6	B	B	B	SŽ	Ž	BŽ	
3	1,2	1,5	1,9	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ	
4	1,1	1,4	1,8	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ	
5	1,0	1,4	1,7	B	B	B	BŽ	BŽ	BŽ	
6	1,0	1,3	1,7	B	B	B	Ž	Ž	BŽ	
7	1,0	1,4	1,8	B	B	B	BŽ	BŽ	BŽ	
8	1,0	1,4	1,8	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ	
9	1,0	1,4	1,8	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ	
10	1,0	1,4	1,8	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ	

Grafický list č.1

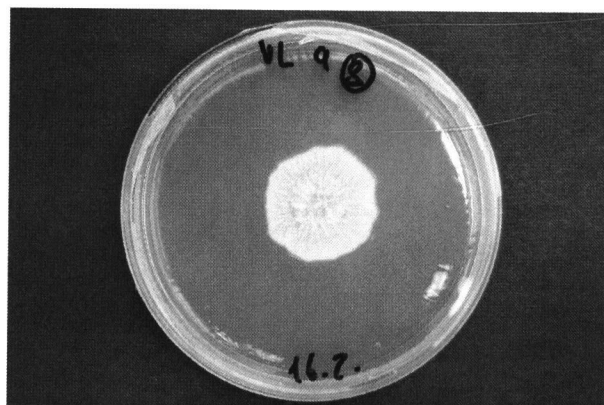
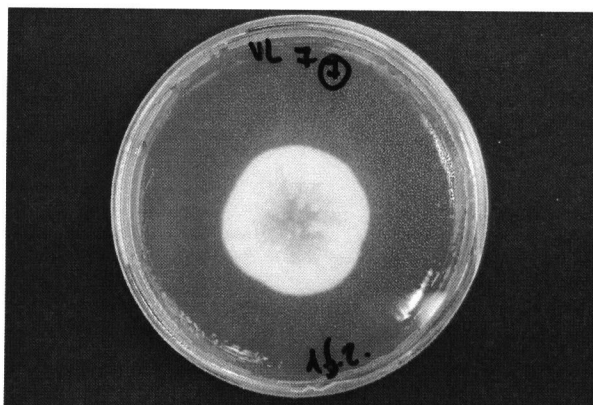
Původní kmeny *Lecanicillium lecanii*



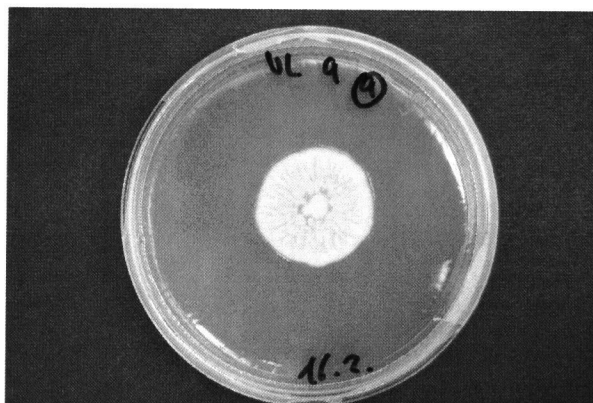
původní kmen P, starý 14 dní, médium PDA



původní kmen 7, starý 14 dní, médium PDA



původní kmen 9, starý 14 dní, médium PDA



Morfologické hodnocení kolonií vystavených mutačním zásahům bylo provedeno na všech odizolovaných koloniích. Zde jsou uvedeny pouze varianty, které byly vybrány pro genetickou analýzu tak, aby reprezentovaly celou škálu variability.

Výběr byl proveden na základě porovnání mutantní kolonie a kolonie daného původního kmenu.

Označení vzorků mutantů *Lecanicillium lecanii*

Tab.5 Mutanti kmene 7

označení vzorku	doba působení sonikace/UV (v min.)
M7	5/5
M9	10/5
M13	10/5
M21	15/5
M22	15/5
M24	15/5
M25	20/5
M29	25/5
M30	25/5
M35	5/10
M40	5/10
M42	10/10
M46	15/10
M49	20/10

Tab.6 Mutanti kmene 9

označení vzorku	doba působení sonikace/UV (v min.)
M1	5/5
M2	5/5
M11	10/5
M18	15/5
M25	20/5
M31	20/5
M35	25/5
M36	25/5
M39	5/10
M50	10/10
M52	10/10
M58	15/10
M62	20/10
M66	20/10

Tab. Mutanti kmene P

označení vzorku	doba působení sonikace/UV (v min.)
M1	5/5
M3	10/5
M4	10/5
M5	15/5
M10	15/5
M16	20/5
M20	20/5
M24	5/10
M29	5/10
M34	10/10
M40	20/10
M41	20/10
M42	20/10
M46	25/10

Tab.8 Mutanti kmenu 7

M	7	Druh <i>Lecanicillium lecanii</i>			Kmen M7			Médium PDA		
		radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu		
		3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den
a 5/5 C	7	0,8	1,3	1,7	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
10/5 A	9	0,8	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 10/5 A	13	0,7	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 15/5 A	21	0,8	1,2	1,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 15/5 B	22	0,8	1,2	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 15/5 D	24	0,9	1,3	1,6	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
20/5 A	25	0,8	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
25/5 A	29	1,0	1,3	1,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
25/5 B	30	0,8	1,2	1,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
5/10 C	35	0,5	1,0	1,5	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
a 5/10 D	40	0,7	1,1	1,5	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ
a 10/10 B	42	0,7	1,2	1,7	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ
15/10 B	46	0,8	1,1	1,5	B	B	B	Ž	BŽ	BŽ
20/10 A	49	0,6	1,0	1,4	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ

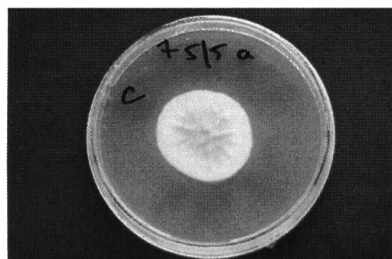
Tab.9 Mutanti kmene 9

M	9	Druh <i>Lecanicillium lecanii</i>			Kmen M9			Médium PDA		
		radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu		
		3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den
5/5 A	1	0,5	1,0	1,4	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
5/5 B	2	0,7	1,1	1,4	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
10/5 C	11	0,5	0,9	1,3	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
15/5 B	18	0,7	1,2	1,6	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
20/5 A	25	0,6	1,0	1,3	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 20/5 C	31	0,7	1,1	1,4	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
25/5 C	35	0,6	1,1	1,4	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
25/5 D	36	0,7	1,1	1,4	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
5/10 C	39	0,4	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 10/10 A	50	0,7	1,1	1,5	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
a 10/10 C	52	0,6	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 15/10 A	58	0,7	1,0	1,4	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
a 20/10 A	62	0,6	1,0	1,3	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ
20/10 A	66	0,7	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	TBŽ	TBŽ

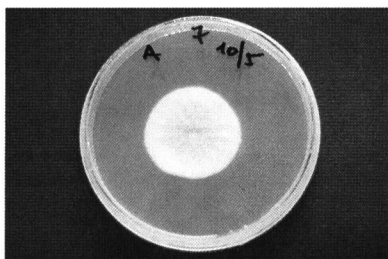
Tab.10 Mutanti kmene P

M	P	Druh <i>Lecanicillium lecanii</i>			Kmen MP			Médium PDA		
		radiální růst (cm)			barva mycelia			tvorba pigmentu		
		3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den	3. den	5. den	7. den
5/5 A	1	1,0	1,5	2,0	B	B	B	Ž	Ž	BŽ
10/5 B	3	1,0	1,5	1,9	B	B	B	Ž	Ž	BŽ
a 10/5 A	4	0,9	1,5	2,0	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
15/5 A	5	1,1	1,6	2,1	B	B	B	Ž	Ž	BŽ
a 15/5 A	10	0,9	1,5	2,1	B	B	B	Ž	Ž	Ž
20/5 C	16	0,9	1,5	2,0	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
a 20/5 B	20	1,0	1,6	2,1	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
5/10 B	24	0,8	1,4	1,9	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
a 5/10 C	29	1,0	1,5	2,0	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
a 10/10 A	34	0,6	1,1	1,5	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
20/10 A	40	1,1	1,6	2,1	B	B	B	Ž	BŽ	TBŽ
20/10 B	41	0,9	1,4	1,8	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
20/10 C	42	1,0	1,6	2,1	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ
25/10 A	46	0,3	0,6	0,8	B	B	B	BŽ	BŽ	TBŽ

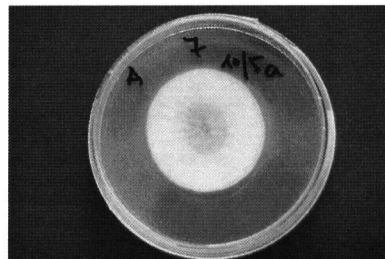
Zmutovaný kmen 7 *Lecanicillium lecanii*



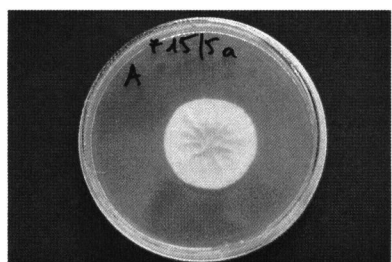
M7



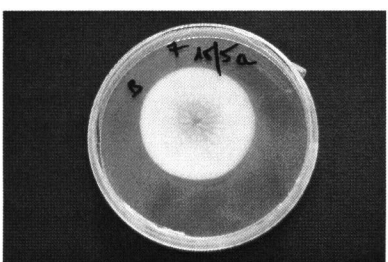
M9



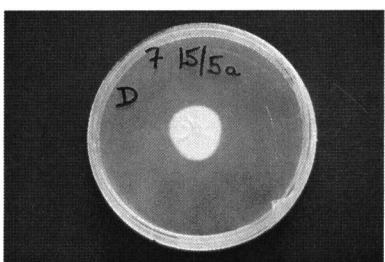
M13



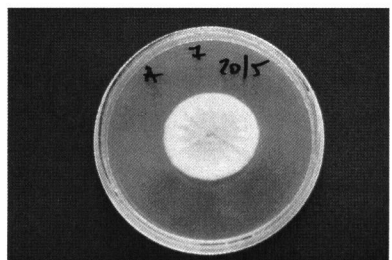
M21



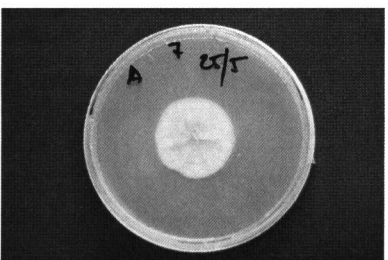
M22



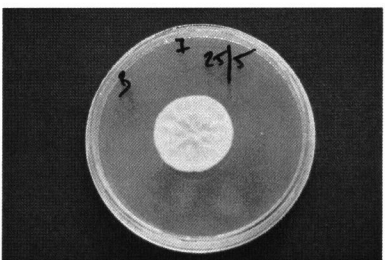
M24



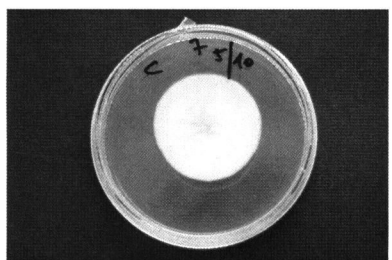
M25



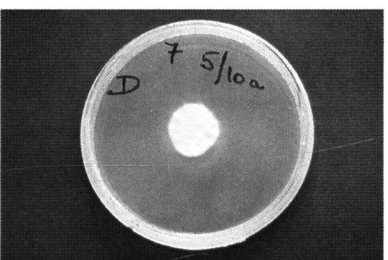
M29



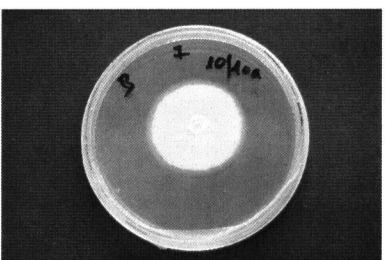
M30



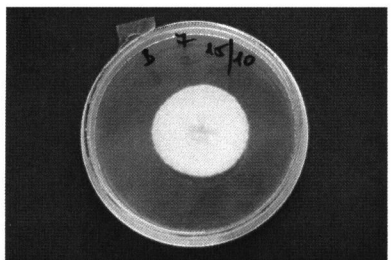
M35



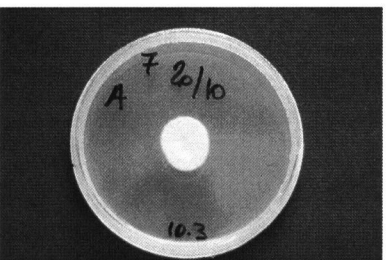
M40



M42

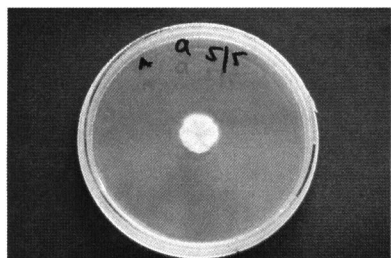


M46

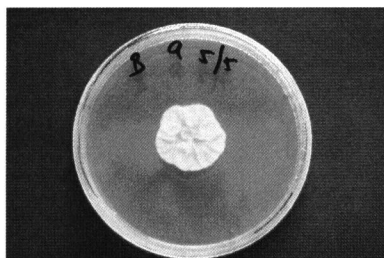


M49

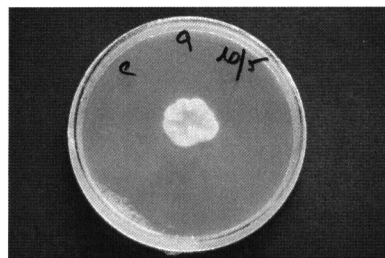
Zmutovaný kmen 9 *Lecanicillium lecanii*



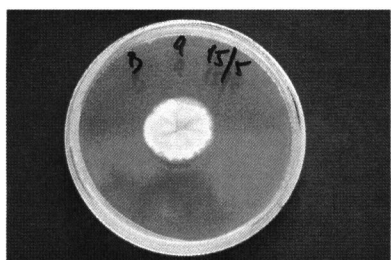
M1



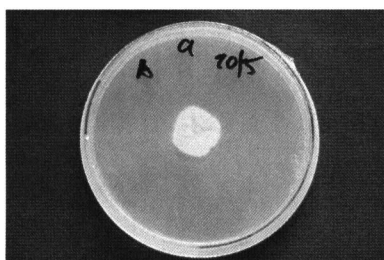
M2



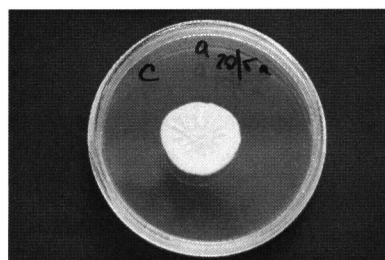
M11



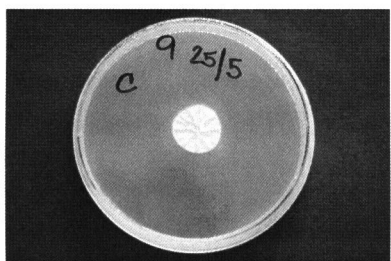
M18



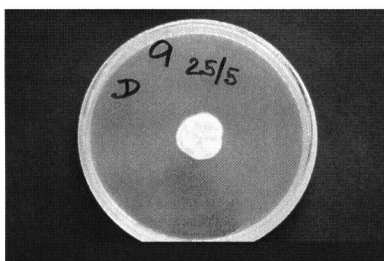
M25



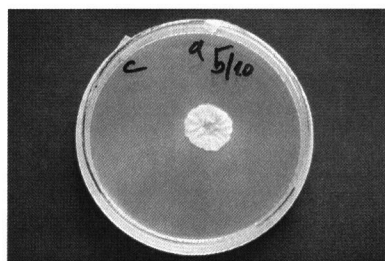
M31



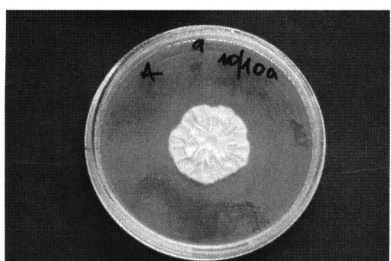
M35



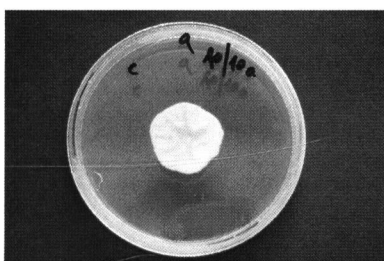
M36



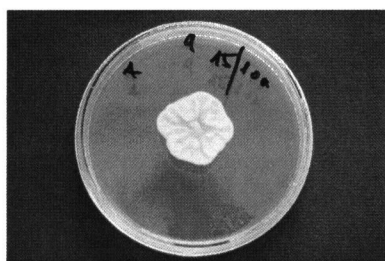
M39



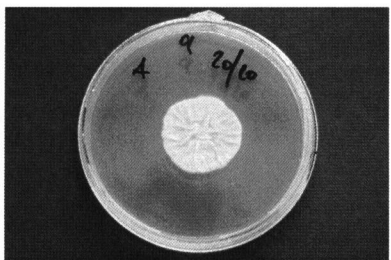
M50



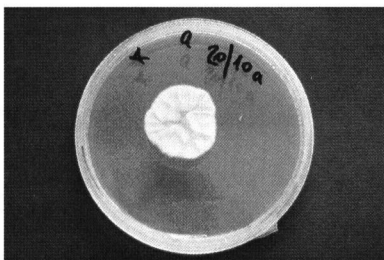
M52



M58

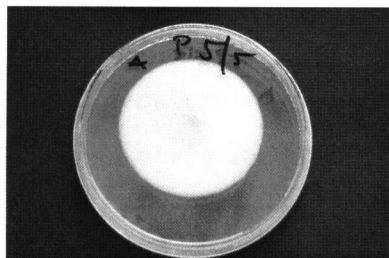


M62

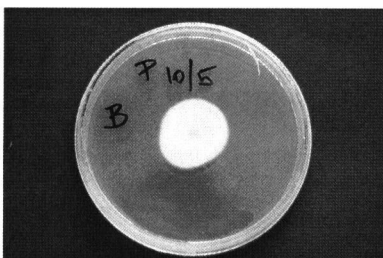


M66

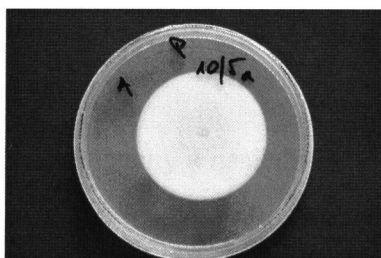
Zmutovaný kmen *P Lecanicillium lecanii*



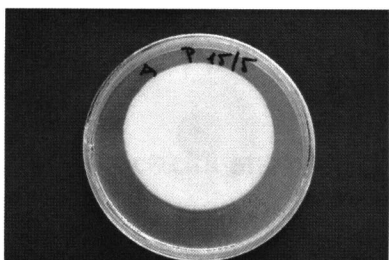
M1



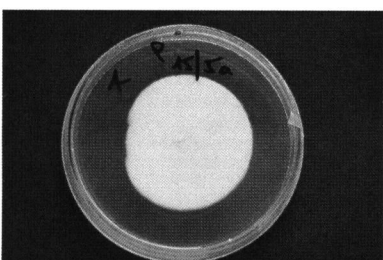
M3



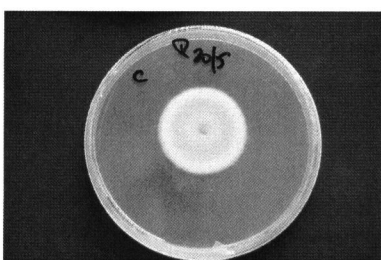
M4



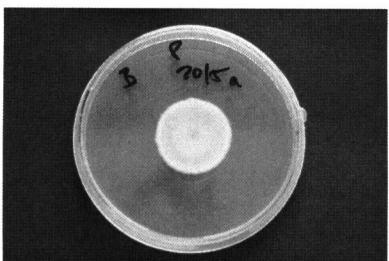
M5



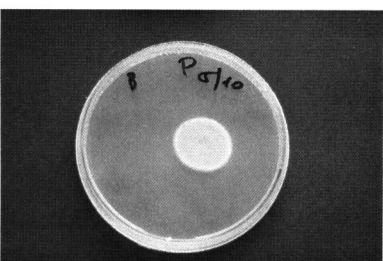
M10



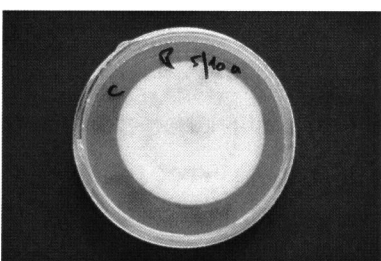
M16



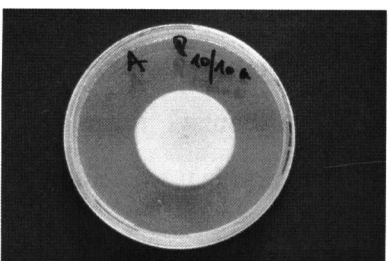
M20



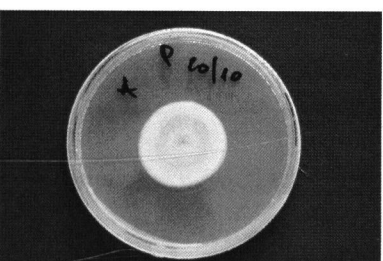
M24



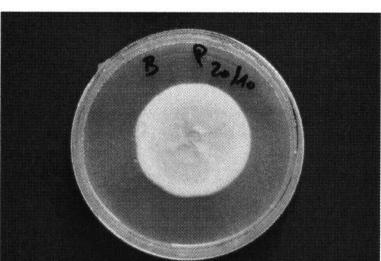
M29



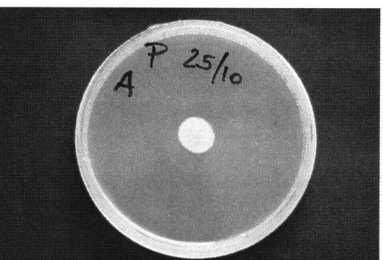
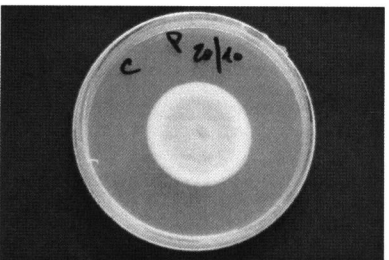
M34



M40



M41



Indukované mutace jsou hojně využívány v mykologii pro zvýšení variability genotypu daného kmene a v mnoha případech dále pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů. Mutageneze následovaná selekcí izolovaného kmene produkujícího vyšší množství zkoumaného metabolitu je důležitou technikou při zvyšování výnosu antibiotik. Například, výtěžnost penicilinu byla zvyšována mnohokrát od roku 1940, kdy se penicilin začal produkovat komerčně (QEENER a SWARTZ 1979).

Kobel a kol. (1973) získali pomocí mutací osmi různými mutageny a následné selekce kmen *Claviceps purpurea* s produkcí alkaloidů 180krát vyšší než byla u původního kmenu.

Hisao-Ming Wan a kol. (2004) použil při šlechtění *Aspergillus oryzae* na produkci koji-kyseliny RTG a UV záření v kombinaci s fúzí protoplastů. Byl získán vysoce produktivní kmen, který akumuloval 41 g koji-kyseliny na litr, což je 100x více než u divokého kmene.

4.2 Genetická analýza

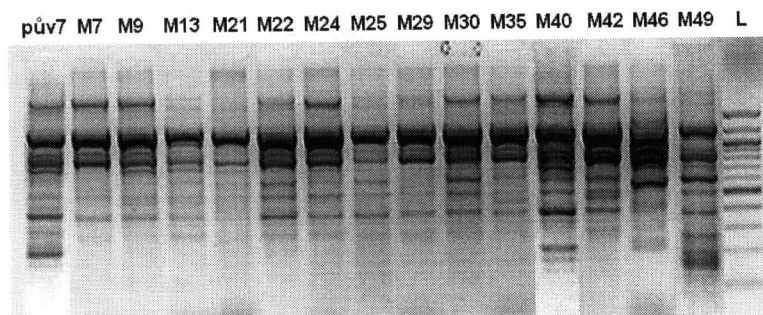
V posledních letech se u entomopatogenních hub a i dalších skupin hub začíná s úspěchem využívat techniky molekulárních markerů pro hodnocení, popis a identifikaci na druhové či poddruhové úrovni (DEAN a kol. 2005). Roberts, Reymond a Andersen (2000) využívají ve svých studiích techniku RAPD, tuto techniku s úspěchem používala u hub řada dalších autorů, např. Tigano-Milani a kol. (1995), Oborník a kol. (1997), Lexová a kol. (1998), Pažoutová (2004).

Bielikova a kol. (2002) využívala techniku RAPD pro hodnocení stability kmenů *Paecilomyces* a *Gliocladium*. Techniku RAPD používám pro hodnocení kmenů *Lecanicillium lecanii* ve své práci i já. Dle práce Oborníka a kol. (2000), který také využívá této techniky u hodnocení *Deuteromycetes*, nepohlavně se rozmnožujících druhů hub, je zřejmé, že tuto techniku lze u skupiny hub *Deuteromycetes* s úspěchem využít.

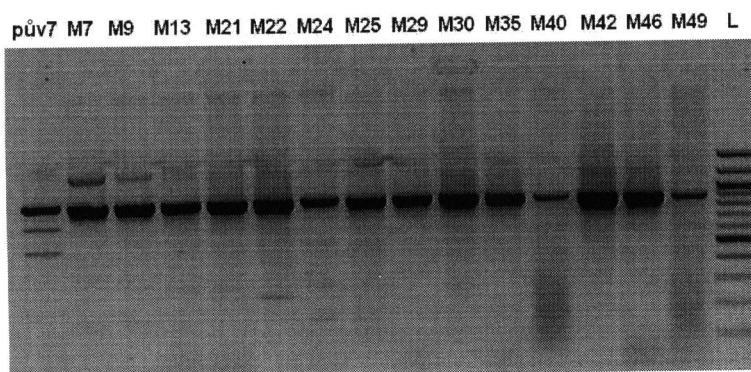
Genetické hodnocení kmenů *Lecanicillium lecanii* proběhlo pomocí metody RAPD. Byl proveden screening náhodných RAPD primerů a pro další analýzu byly vybrány 3 primery – A6, B16, B18, produkující polymorfni a opakovatelné spektrum pruhů.

Na následujících obrázcích (obr.2-10) jsou dokumentovány výsledky RAPD analýzy.

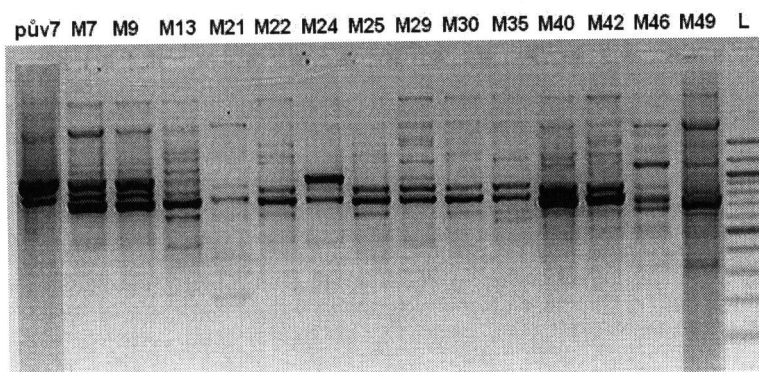
Obr.2 Vizualizace gelu, primer A6, kmen 7



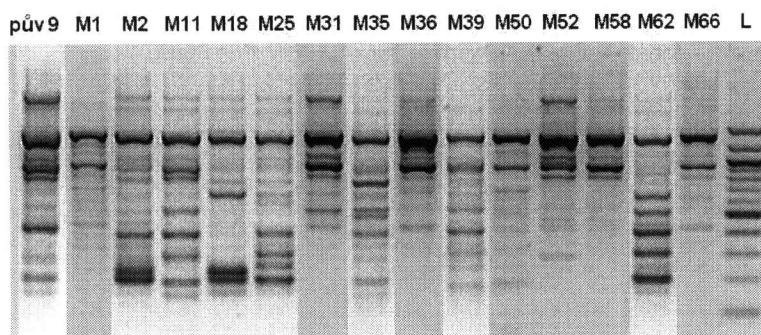
Obr.3 Vizualizace gelu, primer B16, kmen 7



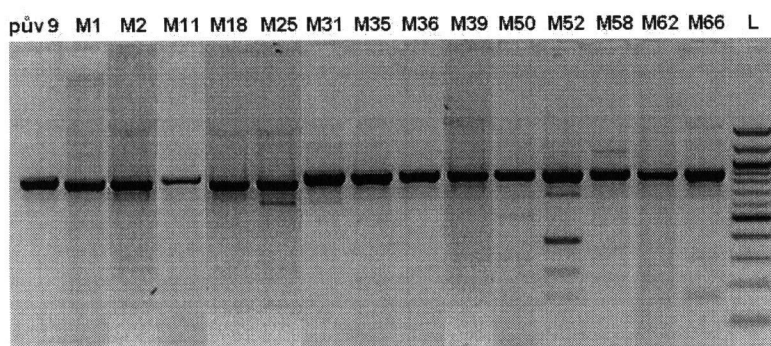
Obr.4 Vizualizace gelu, primer B18, kmen 7



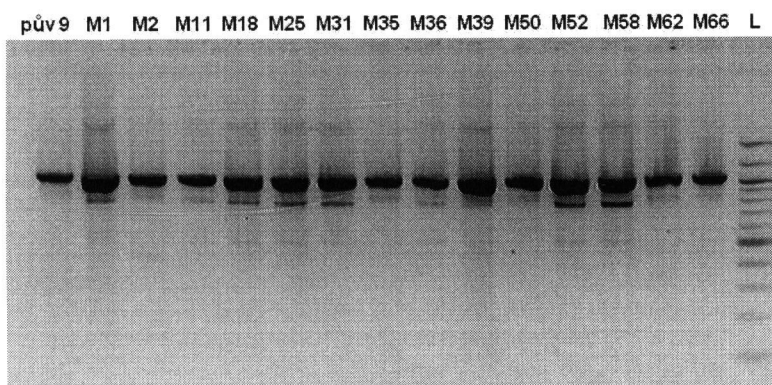
Obr.5 Vizualizace gelu, primer A6, kmen 9



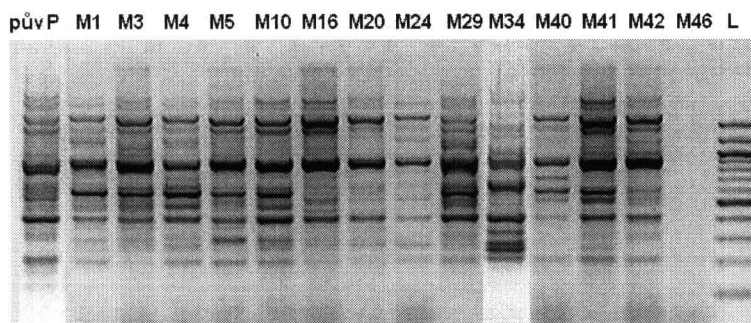
Obr.6 Vizualizace gelu, primer B16, kmen 9



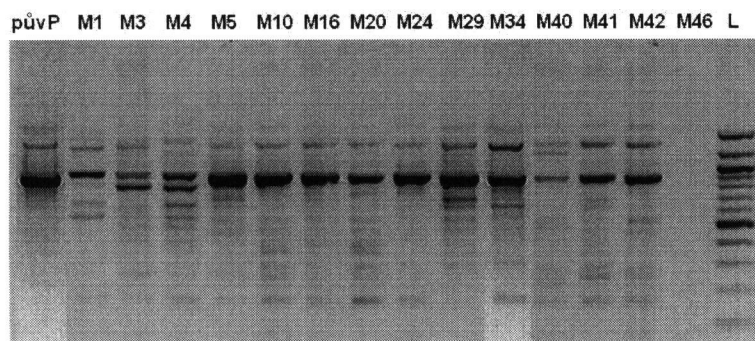
Obr.7 Vizualizace gelu, primer B18, kmen 9



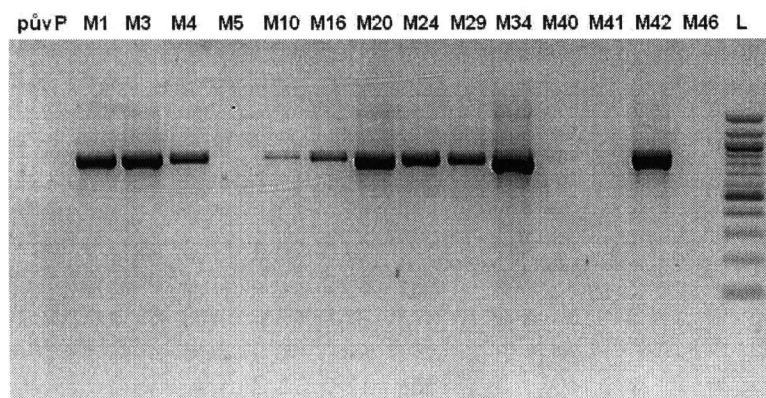
Obr.8 Vizualizace gelu, primer A6, kmen P



Obr.9 Vizualizace gelu, primer B16, kmen P



Obr.10 Vizualizace gelu, primer B18, kmen P



Po proběhnutí RAPD reakce s vybranými náhodnými primery byla primární data přítomnosti/nepřítomnosti pruhů na gelu použita pro grafické znázornění vzdáleností mezi genotypy. Grafické vyjádření je prezentováno ve formě matice podobnosti a dendrogramů.

Tab.11 Matice podobnosti pro původní kmen 7 a jeho mutanty získaná pomocí Nei & Li's metriky

Similarity matrix															
	pův.7	M7	M9	M13	M22	M23	M25	M26	M30	M31	M35	M40	M42	M46	M49
pův.7	1														
M7	0,42	1													
M9	0,57	0,83	1												
M13	0,52	0,74	0,9	1											
M22	0,33	0,2	0,42	0,59	1										
M23	0,48	0,57	0,72	0,79	0,67	1									
M25	0,59	0,7	0,74	0,73	0,44	0,67	1								
M26	0,5	0,6	0,67	0,67	0,5	0,76	0,7	1							
M30	0,48	0,67	0,72	0,64	0,29	0,55	0,58	0,57	1						
M31	0,36	0,56	0,64	0,64	0,44	0,84	0,48	0,67	0,53	1					
M35	0,5	0,4	0,58	0,59	0,4	0,67	0,44	0,7	0,67	0,78	1				
M40	0,69	0,4	0,62	0,63	0,4	0,54	0,5	0,64	0,54	0,52	0,72	1			
M42	0,4	0,57	0,72	0,71	0,38	0,64	0,42	0,67	0,73	0,63	0,76	0,69	1		
M46	0,62	0,27	0,54	0,55	0,46	0,61	0,4	0,64	0,52	0,5	0,73	0,74	0,7	1	
M49	0,58	0,2	0,33	0,37	0,4	0,48	0,35	0,5	0,29	0,44	0,5	0,72	0,48	0,64	1
	pův.7	M7	M9	M13	M22	M23	M25	M26	M30	M31	M35	M40	M42	M46	M49

Tab.12 Matice podobnosti pro původní kmen 9 a jeho mutanty získaná pomocí Nei & Li's metriky

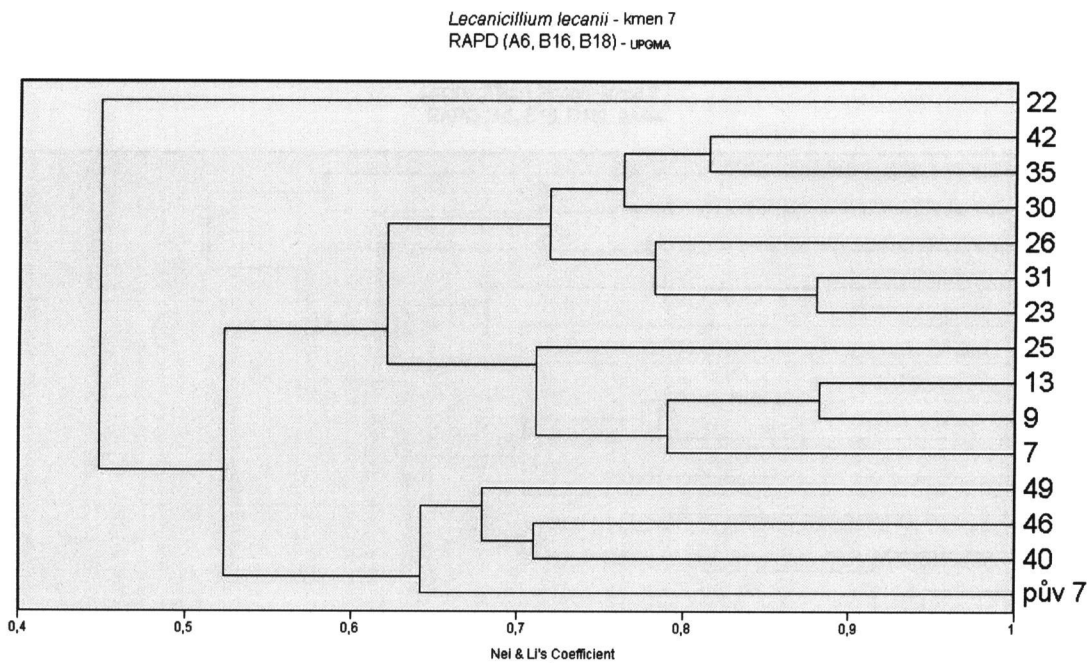
Similarity matrix															
	pův.9	M1	M2	M11	M18	M25	M31	M35	M36	M39	M50	M52	M58	M62	M66
pův.9	1														
M1	0,71	1													
M2	0,73	0,57	1												
M11	0,89	0,71	0,82	1											
M18	0,59	0,5	0,76	0,71	1										
M25	0,76	0,7	0,72	0,76	0,7	1									
M31	0,67	0,71	0,64	0,78	0,59	0,67	1								
M35	0,95	0,67	0,78	0,84	0,56	0,73	0,63	1							
M36	0,78	0,82	0,73	0,89	0,59	0,76	0,78	0,74	1						
M39	0,84	0,78	0,78	0,95	0,67	0,82	0,74	0,8	0,95	1					
M50	0,7	0,53	0,67	0,7	0,42	0,61	0,5	0,76	0,7	0,76	1				
M52	0,5	0,53	0,67	0,6	0,42	0,61	0,6	0,57	0,6	0,57	0,46	1			
M58	0,53	0,57	0,53	0,67	0,43	0,44	0,53	0,5	0,67	0,63	0,35	0,59	1		
M62	0,75	0,53	0,6	0,75	0,4	0,63	0,5	0,71	0,75	0,82	0,78	0,33	0,31	1	
M66	0,56	0,71	0,55	0,56	0,47	0,57	0,67	0,53	0,67	0,63	0,6	0,5	0,4	0,5	1
	pův.9	M1	M2	M11	M18	M25	M31	M35	M36	M39	M50	M52	M58	M62	M66

Tab.13 Matice podobnosti pro původní kmen P a jeho mutanty získaná pomocí Nei & Li's metriky

Similarity matrix														
	pův.P	M1	M3	M4	M5	M10	M16	M20	M24	M29	M34	M40	M41	M42
pův.P	1													
M1	0,4	1												
M3	0,48	0,78	1											
M4	0,52	0,76	0,8	1										
M5	0,48	0,74	0,71	0,88	1									
M10	0,44	0,72	0,77	0,81	0,87	1								
M16	0,4	0,73	0,78	0,76	0,82	0,88	1							
M20	0,35	0,56	0,69	0,75	0,73	0,86	0,8	1						
M24	0,47	0,63	0,7	0,62	0,58	0,64	0,53	0,64	1					
M29	0,36	0,92	0,72	0,77	0,83	0,74	0,75	0,59	0,57	1				
M34	0,48	0,52	0,58	0,67	0,64	0,54	0,52	0,54	0,6	0,64	1			
M40	0,4	0,64	0,61	0,76	0,74	0,72	0,64	0,56	0,42	0,67	0,44	1		
M41	0,46	0,64	0,69	0,8	0,85	0,84	0,71	0,71	0,48	0,73	0,69	0,64	1	
M42	0,5	0,64	0,78	0,76	0,74	0,8	0,73	0,64	0,53	0,67	0,61	0,82	0,79	1
	pův.P	M1	M3	M4	M5	M10	M16	M20	M24	M29	M34	M40	M41	M42

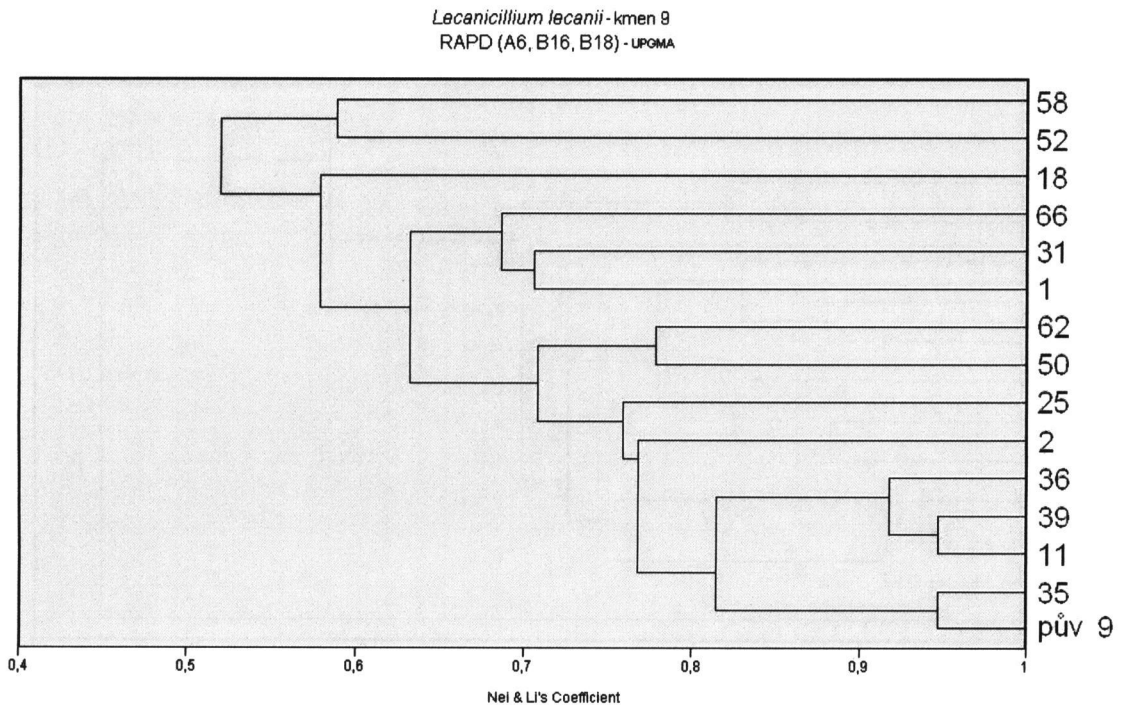
Z posouzení morfologických změn, změn rychlosti růstu a pigmentace u kmenů *Lecanicillium lecanii*, které byly vystaveny mutagenním účinkům, lze mezi těmito kmeny vyzorovat určitou variabilitu. Několik kmenů vykazovalo podstatně odlišnou rychlost růstu oproti původnímu kmenu, z kterého byly odizolovány a objevila se i odlišnost mezi samotnými zmutovanými kmeny. Také při hodnocení pigmentace a míry zvrásnění se objevila široká variabilita. Zatímco některé kmeny vykazovaly výraznou pigmentaci, u jiných se tato neprojevila. Posouzením barvy mycelia nebylo zjištěno výrazných rozdílů mezi kmeny. Barva mycelia byla většinou bílá, někdy přecházela ve světle žlutou.

Obr.11 Dendrogram kmene 7 a jeho mutantů získaný metodou shlukové analýzy UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*)



Na základě dendrogramu znázorňujícího podobnost spekter RAPD markerů u původního kmene 7 a z něj odvozených 14 kmenů po indukované mutagenézi, lze získanou populaci hodnotit jako velmi variabilní. Pomocí techniky indukované mutagenéze došlo k výrazným změnám ve spektru RAPD markerů, míra odlišnosti jednotlivých kmenů je na úrovni 10-55%. Původní kmen 7 je ve shluku se třemi dalšími kmeny, ale míra shody je s těmito kmeny pouze ze 65%. Všechny získané kmeny a kmen původní lze od sebe navzájem dobře odlišit (na základě RAPD dat, morfologických změn, změny pigmentace, atd.).

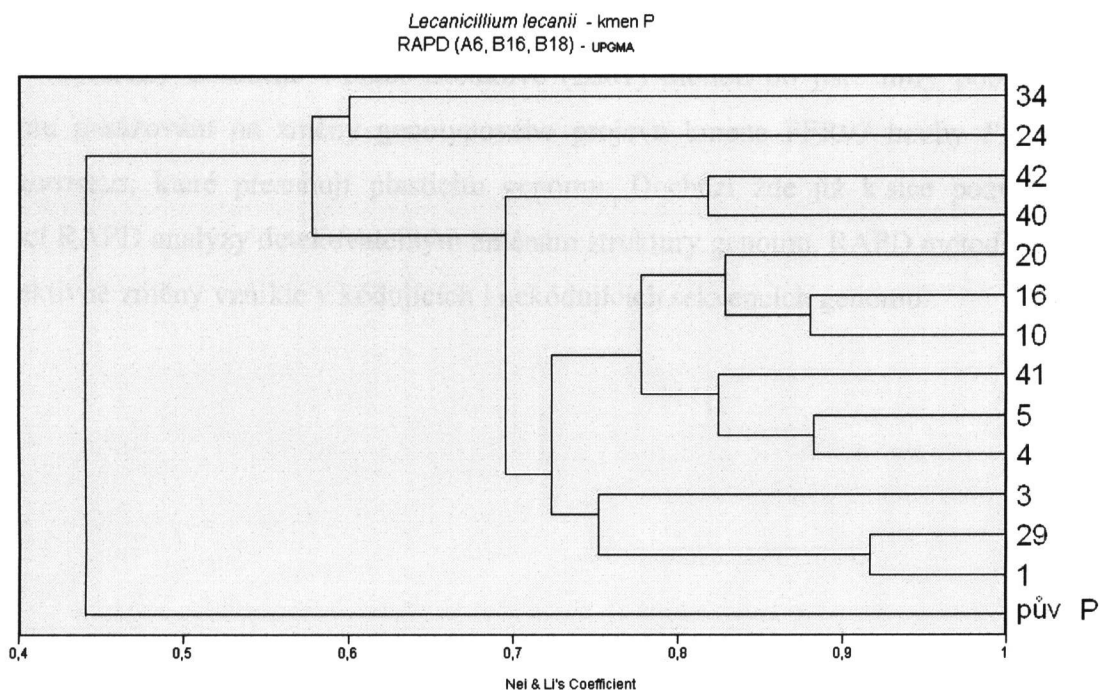
Obr.12 Dendrogram kmene 9 a jeho mutantů získaný metodou shlukové analýzy UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*)



Na základě dendrogramu znázorňujícího podobnost spekter RAPD markerů u původního kmene 9 a z něj odvozených 14 kmenů po indukované mutagenézi, lze získanou populaci hodnotit jako velmi variabilní. Pomocí techniky indukované mutagenéze došlo k výrazným změnám ve spektru RAPD markerů, míra odlišnosti jednotlivých kmenů je na úrovni 5-45%. Ve sledované populaci 15 kmenů není patrný téměř žádný trend a seskupování kmenů do větších skupin podle podobnosti spektra RAPD markerů. Kmen 35 se z pohledu RAPD fingerprintu získaného pomocí třech primerů velmi podobá původnímu kmenu 9, podobnost těchto dvou kmenů je přibližně na úrovni 96 %.

Další kmeny jsou pak velmi variabilní, jejich odlišnost od původního kmene je v rozmezí 9-54 % a nevytváří výrazně odlišitelné bloky.

Obr.13 Dendrogram kmene P a jeho mutantů získaný metodou shlukové analýzy UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages*)



V případě kmene P došlo po mutačních zásazích k velmi výrazným změnám v RAPD fingerprintech, které vedly k jednoznačnému odlišení původního kmene a z něj vycházejících mutantů. Všechny mutované kmeny vytváří jeden, byť variabilní blok, který je odlišný od původního kmene. Odlišnost mezi blokem mutantů a původním kmenem je na úrovni 56 %. V rámci skupiny mutantů se vytvořily tři bloky (kmeny 24+34, kmeny 40+42 a blok ostatních kmenů). Odlišnost těchto 3 bloků mezi sebou je na úrovni 42 a 30 %. Variabilita v rámci celého shluku mutantů je velmi vysoká, podobnost jednotlivých kmenů je na úrovni 60-90 %.

Indukovaná mutageneze vede ke zvýšení variability sledovaných morfologických znaků a toto zvýšení fenotypové odlišnosti je podloženo i změnami genotypu, které byly detekovány na úrovni RAPD markerů.

Shluková analýza nám prokázala, že hodnocené kmeny *Lecanicillium lecanii* získané po mutacích vytvářely spektrum s širokou variabilitou. Z toho plyne, že díky mutačním zásahům použitých v této práci lze získat širokou škálu mutantů s velkou genetickou variabilitou. Těchto poznatků může být dále využito v produkčních analýzách.

RAPD metoda byla již použita pro konstrukci specifických fingerprintů různých izolátů entomopatogenních hub (OBORNÍK a kol. 1997, LEXOVÁ a kol. 1998). Na základě těchto výsledků se lze domnívat, RAPD metoda mohla být rutinně využívána pro tyto účely, a to nejen v mikrobiálních laboratořích, ale i v komerční oblasti producenty mikrobiálních pesticidů.

Výsledky dosažené v práci Bielikové (2001) mohou do jisté míry potvrzovat vliv systému pasážování na změny genotypového projevu kmene PFR97 houby *Paecilomyces fumosoroseus*, které přesahují plasticitu genomu. Dochází zde již k sice pozvolným, ale pomocí RAPD analýzy detekovatelným změnám struktury genomu. RAPD metodika detekuje neselektivně změny vzniklé v kódujících i nekódujících sekvencích genomu.

5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo provést sérii mutačních zásahů a vyhodnotit rozsah změn morfologických charakteristik a posoudit změny genotypů pomocí molekulárních markerů. Díky této práci lze říci, že mutační techniky, jako je ultrazvuk v kombinaci s UV zářením, jsou vhodným prostředkem pro zvýšení genetické variability. Důkazem je vytvoření široké škály mutantů, u kterých se projeví výrazné morfologické změny i změny genotypu, prokázané na základě RAPD analýzy.

Výstupem diplomové práce je metodika indukované metagenese pro *Lecanicillium lecanii*. Dalším výstupem je soubor mutovaných kmenů a soubor charakteristik jejich molekulárních a morfologických vlastností.

Poznatků z této práce může být využito v následných studiích a dalším šlechtění kmenů houby *Lecanicillium lecanii*.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BAYMAN, P. and COTY, P.J. (1993): Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. - Canadian Journal of Botany, 71: 23-31.
- BETINA, V. (1987): Mikrobiologické laboratórne metódy. - Alfa.
- BIDOCHKA, M.J., MCDONALD, M.A., ST LEGER, R.J. and ROBERTS, D.W. (1994): Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). - Current Genetics, 25: 107-113.
- BIDOCHKA, MJ., KHACHATOURIANS, GG. (1990): Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanopus sanguinipes*, -J Invertebr Pathol 56: 362-370
- BIDOCHKA, MJ., KHACHATOURIANS, GG. (1993): oxalic acid overproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to a utilizable karbon source but not virulence, -J Invertebr pathol 62: 53-57
- BIELIKOVÁ L., LANDA Z., OSBORNE L.S., ČURN V. (2002): Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique, - Plant Protect. Sci. 38: 1-12.
- BOHÁČ, J. (1990): Šľachtenie rastlín. - Príroda Bratislava
- BOUCIAS, DG. (1988): Genetic improvement of entomopathogenic fungi, In: Herzog GA., Ramaswamy S., Lentz, G., Goodenough, JL., Hamm, JJ., (eds) Theory and tactics of *Heliothis* population management, III. Emerging control tactics and techniques, -South coop Ser Bull 337: 66-68
- BOUCIAS, DG., PENDLAND, JC. (1991): Attachment of mycophatogens to cuticle: The initial event of mycosis in arthropod hosts. In: Cole, GT., Hoch, HC., (eds), The fungal spore and disease initiation in plants and animals, -Plenum Press, New York, 101-128

- BRIDGE, P.D., ARORA, D.K. (1998): Applications of PCR in Mycology. - CABI Publishing.
- BRIDGE, P.D., PRIOR, C., SAGBOHAN, J., LOMER, C.J., CAREY, M. and BUDDIE, A. (1997): Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. -Biodiversity and Conservation, 6: 177-189.
- BROBYN, P.J., WILDING, N. (1983): Invasive and developmental process of *Entomophthora muscae* infecting house flies *Musca domestica*, -Trans Br mycol Soc 80: 1-8
- CORTEZ-MADRIGAL, H. (2001): Characterization of multispore and monospore isolates of *Lecanicillium lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa
- DOBROWOLSKI, M.P. and O'BRIEN, P.A. (1993): Use of RAPD-PCR to isolate a species specific DNA probe for *Phytophthora cinnamomi*. - FEMS Microbiology Letters, 113: 43-48.
- DRUMMOND, J., HEALE, J.B., (1988): Genetic studies on the inheritance of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against, *Trialeurodes vaporariorum*, -J Invertebr pathol 52: 57-65
- DUNCANS, S., BARTON, J.E. and 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): Applications of PCR in Mycology. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. - CABI Publishing.
- FENG, K. C., LIU, B.L., TZENG, Y. M. (2000): *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. -Bioprocess Engineering 23: 25-29
- CHARNLEY, A.K. (1989): Mechanisms of fungi pathogenesis in insects, In: Whipps Jm, Lumsden RD (eds) Biotechnology for improving plant growth, -Cambridge University Press, 85-125

CHARNLEY, AK., ST LEGER RJ. (1991): The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. In: Cole GT, Hoch H (eds) The fungi spore and disease initiation in plants and animals. -Plenum Press, New York, 267-286

JUDELSON, H.S., SPIELMAN, L.J. and SHATTOCK, RC. (1995): Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. -Genetics, 141: 503-512.

KARP, A. and EDWARDS, K.J. (1997): DNA markers: a global overview. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. and GRESSHOFF, P.M. (eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. - Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 1-13.

KENDRICK, B. (1992): The fifth kingdom, -Mycologue Publ.

KHACHATOURIANS, GG. (1986): Production and use of biological pest control agents. Trends Biotechnol 4: 120-124

KHACHATOURIANS, GG. (1991): Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: Arora, DK., Ajello, L., Mukerji, KG., (eds) Handbook of applied mycology, vol 2: Humans, animals, and insects. Marcel Dekker, New York, 613-661

KHACHATOURIANS, GG. (1992): Virulence of five *Beauveria* strains, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii* against the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. - J Inverteber Pathol 59: 212-214

KRUMPHANZL, V., Řeháček Z. (1988): Mikrobiální technologie. - Academia Praha.

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

LANFRANCO, L., PEROTTO, S. and BONFANTE, P. (1998): Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In: BRIDGE, P.D., ARORA, D.K., REDDY, C.A. and ELANDER, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. - CAB Intemational, Wallingford, pp. 107-124.

- LATGE, J., MONSIGNY, M., PREVOST, M., (1988): Visualization of exocellular lectins in the entomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*, -J Histochem Cytochem 36: 1419-1424
- LEATHERS, TD., GUPTA, SC., ALEXANDER, NJ., (1993): Mycopesticides: status challenges and potential, -J Ind Microbiol 12: 69-75
- LECUONA, R., RIBA, G., CASSIER, P., CLEMENT, JL., (1991): Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *Beauveria brongniartii*, -J Invertebr Pathol 58: 10-18
- LEHMAN, P.F., LIN, D. and LASKER, B.A. (1992): Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. - Journal of Clinical Microbiology 30:3249-3254.
- LEXOVÁ, L., DĚDIČOVÁ, L., LANDA, Z., ČURN, V. (1998): Evaluation of RAPD technique for identification and characterization of *Gliocladium virens* isolates. - Sborník JCU ZF - fytot. 15,2: 25-39.
- MANULIS, S., KOGAN, N., REUVEN, M. and BEN-YEPHET, Y. (1994): Use of RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* from carnation. - Phytopathology, 84: 98-101.
- MEYER, W., LIECKFELDT, E., KUHLS, K., FREEDMAN, E.Z., BORNER, T. and MITCHELL, T.G. (1993): DNA- and PCR-fingerprinting in fungi. In: PENA, S.D.J., CHAKRABORTY, R., EPPLER, J.T. and JEFFREYS, A.J.(eds): DNA fingerprinting: State of the Science. - Birkhauser Verlag, Basel: 311-320.
- MORGAN, LW., BODDY, L., CLARK, SJ., WILDING, N., (1995): Influence of temperature on germination of primary and secondary conidia of *Ergnia neoaphidis*, -J Invertebr Pathol 65:132-138
- MURRIN, F., NOLAN, RA. (1987): Ultrastructure of infection of spruce budworm by the fungus *Entomophaga aulica*, -Can J Bot 65: 1694-1706

- MURRIN, F., NOLAN, RA., HOLTBY, J., DAVIDSON, WS. (1986): The genome of *Entomophaga aulica*, base composition and size, -Exp Mycol 10: 65-75
- OBORNIK, M., LANDA, Z., ČURN, V. (1997): Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* strain 97 by use of RAPD markers. - Sborník JCU ZF 2/XIV: 49-55.
- PAŽOUTOVÁ, S. (2001): The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. - Mycol. Research 105: 275-283.
- QUEENER, S. and SWARTZ, R. (1979): *Penicillins*: biosynthetic and semisynthetic. In: ROSE, A.H. (ed.), Economic microbiology 3, Secondary products of metabolism. - Academic Press, Inc., New York.
- RAFALSKI, J.A. (1997): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. and GRESSHOFF, P.M. (eds.): DNA markers. Protocols, Applications, and Overviews. - Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 75-83.
- RIESBERG, L.H. (1996): Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. - Molecular Ecology, 5: 99-105.
- ŘEHOUT, V. (2000): Genetika I. - JU ZF České Budějovice.
- ROBERTS, DW., HAJEK, AE. (1992): Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, In: Leatham GF (ed) Frontiers in industrial mycology, Chaman and Hall, London, pp.144-173
- SAMUELS, RI., REYNOLDS, SE., CHARNLEY, AK. (1988): Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium antisopliae*, -Comp Biochem Physiol 90C: 403-412
- SCHLICK, A., KUHL, K., MEYER, W., LIECKFELDT, E., BORNER, T. and MESSNER, K. (1994): Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. - Current Genetics, 26: 74-78.

SCHMITZ, V., DEDRYVER, C-A, PIERRE, J-S, (1993): Influence of an *Erynia neoaphidis* infection on the relative rate of increase of the cereal aphid *Sitobion avenue*, - J Invertebr Pathol 61: 62-68

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

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

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

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. and WHITE, T.J. (eds): PCR Protocols. A guide to methods and applications. - Academic Press, San Diego: 315-322.

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

YROCCINA 1110 1111
SEMIDULKA FACULTA
Cetibani Kabinata
Siyadanta 11
11105 Cetak Pindaktas