

Zemědělská fakulta

**Využití techniky PCR-RFLP pro hodnocení polymorfismu
ITS regionu u kmenů *Beauveria bassiana***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Lucie Kocková

vedoucí práce

Ing. Kateřina Gmálková

Konzultant

prof. Ing. Vladislav Lurn, Ph.D.

České Budějovice 2010



Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Využití techniky PRC-RFLP pro hodnocení polymorfismu ITS regionu u kmenů *Beauveria bassiana* vypracovala sama na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

V Českých Budějovicích, 2010

Lucie Kocková



Děkuji své vedoucí práce Ing. Kateřině Ğimálkové a konzultantovi prof. Ing Vladislavu Ľurnovi, PhD za metodické a odborné vedení a poskytnuté zázemí pro tvorbu této práce.

Lucie Kocková

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled	2
2.1. Biologická ochrana.....	2
2.1.1. Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně rostlin	2
2.1.2. Strategie užívané v biologické ochraně.....	3
2.2. Entomopatogenní houby.....	4
2.3. Charakteristika houby Beauveria bassiana	5
2.3.1. Vývojový cyklus patogena.....	6
2.4. Lýkoňrout smrkový	8
2.4.1. Obecný popis.....	9
2.4.2. Vývojový cyklus.....	9
2.5. Molekulární markery	10
2.5.1. Volba vhodného markeru pro specifické aplikace	13
2.6 ITS region	13
3. Materiál a metody	17
3.1. Materiál.....	17
3.2. Metody.....	18
4. Výsledky a diskuse	23
5. Závěr	23
6. Seznam použité literatury.....	29

Cílem této práce bylo posouzení vhodnosti techniky PCR-RFLP a analýzy ITS regionu pro účely hodnocení genetické variability entomopatogenních hub- *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* a *Isaria fumosorosea*. Na základě analýzy ITS-RFLP tvořily kmeny *B. bassiana* původem z NP Čumava jednu homogenní skupinu, zatímco kmeny *B. bassiana* z jiných geografických lokalit vykazovaly vyšší stupeň polymorfismu a došlo k jasnému odlišení různých druhů entomopatogenních hub použitých v této studii.

Annotation

The aim of this study was the evaluation of the suitability PCR-RFLP technique and ITS region analysis for determination the genetic variability of the entomopathogenic fungi - *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* and *Isaria fumosorosea*. By the means of ITS-RFLP technique, it was possible to identify the uniformity of the *B. bassiana* isolates from NP Čumava, the higher level of polymorphism of *B. bassiana* isolates from different geographical areas was detected and it was possible to distinguish different entomopathogenic fungi used in this study.

1. Úvod

Nárůst využívaní biologické ochrany rostlin souvisí se stále se vyvíjejícími technologiemi a rozvojem molekulárně biologických metod. Hlavním důvodem pro rozvoj biologické ochrany rostlin je rostoucí snaha o omezení používání chemických přípravků a ochranu životního prostředí, kdy se využívá přirozených nepřítelů škodlivých organismů. Vyznačuje se nízkou nebo nulovou toxicitou k necílovým organismům. Tím není snižována druhová bohatost, diverzifikace a stabilita přírodních systémů v zemědělské krajině je umožněna kvalitní produkce.

V rámci projektu, snažící se o využití entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* jako přírodního insekticidu v boji proti křovci, který je aktuální hrozbou pro jehličnany v Národním parku Āumava, byl proveden monitoring entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* a následně analýzy molekulárních markerů pro identifikaci a charakterizaci kmenů. S tímto projektem souvisí i má práce na téma Využití techniky PCR-RFLP pro hodnocení polymorfismu ITS regionu u kmenů *Beauveria bassiana*, díky níž byla zjištěna homogenita populace získané v NP Āumava, oproti kmenům *B. bassiana* získaných ze sbírky oddělení Rostlinolékařství KRA ZF JU, pocházejících z jiných geografických oblastí, resp. kmenům jiných druhů entomopatogenních hub, které vykazovaly odlišnosti. Toto zjištění pomáhá při rozhodování, jaký kmen bude možno použít v biologické ochraně v NP Āumava a nahrává faktu využití lokálního kmene s nejlepšími biologickými charakteristikami.

2.1. Biologická ochrana

První poznatky a pokusy o využití biologické ochrany rostlin proti škodlivým organismům vstoupily do podvědomí již v druhé polovině 19. století, avšak intenzivnější rozvoj je až v posledních několika desetiletích. Nárůst využívání biologické ochrany rostlin souvisí se stále se vyvíjejícími technologiemi a rozvojem molekulárně biologických principů. Hlavním důvodem pro rozvoj biologické ochrany rostlin je rostoucí snaha o omezení používání chemických látek a chránit životní prostředí. V minulosti byly používány širokospektrální a perzistentní pesticidy, které způsobovaly vysokou mortalitu necílových druhů, a zároveň jejich vlivem vznikaly populace škodlivých organismů rezistentních vůči škodlivým látkám chemických přípravků. V současné době se výroba účinných látek orientuje na výrobu specifických pesticidů působících pouze na cílové škůdce. Zároveň probíhá intenzivní výzkum mikrobiálních preparátů, užitečných organismů a především se věnuje pozornost bioregulátorům určeným k ochraně proti plevelům.

Při biologické ochraně se využívá přirozených nepřátel škodlivých organismů. Moderní prostředky biologické ochrany jsou vysoce a dlouhodobě účinné, a zároveň jsou šetrné k lidskému zdraví a životnímu prostředí. Vyznačují se nízkou nebo nulovou toxicitou k necílovým organismům. Tím není snižována bohatost, diverzifikace a stabilita přírodních systémů v zemědělské krajině a je umožněna kvalitní produkce. V biologické ochraně rostlin se využívají predátoři, parazitoidi, bakterie, houby, viry, řasy a prvoci. (Eilenberg et al., 2006). V případě využití nějakého organismu, jako prostředku biologické ochrany, do prostředí je předem nutné znát jeho detailní charakteristiky pro zjištění jeho účinnosti a případného negativního vlivu na životní prostředí a druhovou biodiverzitu.

2.1.1. Využití entomopatogenních hub v biologické ochraně rostlin

V současné době je známo více než 750 druhů hub ze zhruba 90 rodů, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu. (Landa, 1998) U entomopatogenních hub je velmi malá

ence hmyzu. Mezi významné zástupce patří *Beauveria*
is, *Metarhizium anisopliae* a *Lecanicillium leccanii*.

2.1.2. Strategie užívané v biologické ochraně

Důležitým hlediskem je zjistit míru variability jednotlivých škůdců a následně zvolit správnou strategii pro jejich regulaci.

Druhy strategií:

Klasická strategie

Záměrná introdukce nepřivodního organismu (prostředek biologické ochrany) za účelem trvalého zabudování do ekosystému a dlouhodobé regulace populace škůdce.

Augmentativní/inundativní strategie

Využití řídicích organismů pro regulaci populace škůdce. Introdukce je zpravidla jednorázová a je dosaženo okamžité regulace četnosti cílového organismu.

Augmentativní/inokulativní strategie

Záměrné vypuštění řídicího organismu do ekosystému s očekáváním, že se v ekosystému bude množit a regulovat četnosti cílového organismu po určitou dobu, ne však trvale.

Strategie konzervace a podpory přirozených nepřátel

Modifikace prostředí, nebo zavedených postupů za účelem ochrany a podpory specifických přirozených nepřátel nebo jiných organismů regulujících četnosti cílových organismů.

(Eilenberg et al., 2001)

Vztahy mezi houbami a hmyzem jsou velmi rozmanité. Lze nalézt vztahy saprofytické, symbiotické, mutualistické i parazitické. Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stádií hmyzu (entomopatogenní houby). Entomopatogenní houby parazitují na zástupcích všech řádů hmyzu. Nejčastěji jsou parazitické mykózy zjišťovány na druhích patřících do řádů plošnice (*Hemiptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), těsnokřídlí (*Thysanoptera*), stejnokřídlí (*Homoptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*). Nejčastěji infikovaným stadiem hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou hmyzem infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. (Landa, 1998)

Entomopatogenní druhy jsou v systému hub zastoupeny mnoha řády různých oddělení. Nejvýznamnější entomopatogenní houby nalezneme v oddělení *Chytridiomycota* (*Chytridiomycetes*: *Blastocladales*, *Chytridiales*), *Eumycota*: pododdělení *Zygomycotina* (*Zygomycetes*: *Entomophthorales*, *Mucorales*), *Ascomycotina* (*Ascomycetes*: *Laboulbeniales*, *Pleosporales*) a *Deuteromycotina* (*Hyphomycetes*: *Moniliales*, *Coelomycetes*). Nejznámější jsou entomopatogenní houby sdružené v rodech *Beauveria*, *Hirsutella*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Nomuraea* a *Tolypocladium*.

(1. <http://www.zf.jcu.cz/structure/departments/sekce-rostlinolekarstvi/entomopatogenni-organizmy/entomopatogenni-houby/klasifikace-entomopatogennich-hub/>)

Vzhledem k odlišnému mechanismu rozmnožování se liší hostitelský potenciál entomopatogenních hub. Některé houby jsou široce polyfágní a iniciují nákazy nejen na zástupcích z mnoha řádů hmyzu v různých vývojových stádiích, ale i na fytofágních roztočích a některých druhích hánátek (např. *Paecilomyces fumosoroseus*). (Landa, 1998) Mezi široce polyfágní druhy patří např. *Beauveria bassiana* nebo *Lecanicillium lecanii*, které působí proti velkému množství škodlivých organismů jako plošnice, molice, mšice. (2. http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1042846_11/index.html) Jiné druhy entomopatogenních hub vykazují podstatně užší patogenitu s účinností omezenou

přítomnost houby *Nomuraea rileyi* parazitující výhradně (Bouček, 1998), přičemž i různé izoláty v rámci jednoho druhu houby mohou vykazovat různou hostitelskou specifikou. (3. http://www2.biologie.uni-halle.de/zool/dev_biol/diss/schreiter/diss_einl.html) Entomopatogenní houby mají tedy velký předpoklad pro biologickou ochranu.

2. 3. Charakteristika houby *Beauveria bassiana*

Rod *Beauveria* zahrnuje několik entomopatogenních druhů. Jeden z nejvýznamnějších je *Beauveria bassiana* (Boucias et al., 2008). Do rodu *Beauveria* patří například také *Beauveria brongniartii*, *Beauveria amorpha*, *Beauveria caledonica*, *Beauveria felina* a *Beauveria velata*. Entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je kosmopolitně rozšířený druh, který je běžně označován jako původce onemocnění na mnoha druzích hmyzu, které jsou alespoň částí svého vývoje vázány na půdu (Landa et al., 2007). *Beauveria bassiana* je typickým představitelem entomopatogenní mykoflóry půdy (4. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/beauveria-bassiana/beauveria-bassiana/>) a způsobuje u hmyzu nákazu, která bývá označována jako *White muscardine*. Tato nákaza byla popsána již kolem roku 900 př.n.l. v Japonsku na larvách bource morušového. Hmyz infikovaný touto houbou byl používán v medicíně jako antiseptikum. Seriózní záznamy o tomto onemocnění a jeho původci uveřejnil A. Bassi v roce 1834. Později se stejným onemocněním zabýval také Giuseppe Gabriel Baldami-Crivelli, který ho v roce 1935 popsal a po svém objeviteli pojmenoval *Botritis bassiana*. (Boucias et al., 2008)

Beauveria bassiana je dimorfní organismus rostoucí jako kvasinkový organismus nebo jako mycelium v závislosti na dosud nespecifikovaných faktorech. (Burge, 1988) Tvorbí bílé až krémové kolonie, ojedinele růžové. Konzistence je kyprá až práškovitá. Spodní strana kolonie na Petriho misce při pěstování na umělých živných médiích je bílá až nažloutlá. Hyfy jsou dělené septy, které jsou přímé a poměrně křehké. Konidiofory jsou protáhlé, baňkovitého tvaru v charakteristickém zig-zagó uspořádání a v každém ohybu je uložena jedna konidie. Konidie jsou malé (2-4 μm v průměru), jednobuněčné, kulaté nebo oválné, tvořící se po jednom na tenkém zoubku. Nejlépe je tato struktura pozorovatelná na mladých

Čiroce polyfágní entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* je typickým představitelům nejen entomopatogenní, ale i saprofytní mykoflóry pŕíd a na celém území České Republiky, patŕí k nejčastěji pozorovaným druhům mitosporických hub (druhy hub u kterých není známo pohlavní stádium, dŕíve *Deuteromycetes*). Infikuje jak vývojová stádía, tak dospěle hmyzu. V zahraničí je registrovaná řada biopreparátŕ formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *Beauveria bassiana* a jsou využívány i v ochraně lesních porostŕ proti některým druhům škŕdcŕ, vřetně lýkoŕrouta smrkového. (Landa et al., 2007) V Líně bylo vyvinuto velké množství programŕ, pro využití *Beauveria bassiana* v ochraně porostŕ kukuřice proti zavřejeli kukuřičnému (*Ostrinia hubinalis*) a v ochraně lesních porostŕ napŕklad proti rodu *Dendrolimus* spp. Přípravky na bázi *Beauveria bassiana* jsou v těchto programech řasto ekonomicky výhodnější, než klasické metody ochrany rostlin a rolně se využívají na ploše o výměře přibližně 1 milionu hektarŕ. (Hajek, 2004)

2.3.1. Vývojový cyklus patogena

Fáze infekčního cyklu

- přichycení spor na kutikulu hostitele
- klíčení spor
- penetrace kutikuly
- překonání imunitních obranných reakcí hostitele
- externí růst a produkce konidií

(Zimmermann, 2007)

Houby z rodu *Beauveria* napadají svého hostitele přes kutikulu. (Roy et al., 2008) Infekce hostitele je iniciována konidiemi, které po přichycení na povrch kutikuly klíčí a pronikají do tělní dutiny. (Landa, 2007) Toto pořáteřní spojení je způsobeno nespecifickými adhezními silami mezi hydrofobním povrchem konidií a epikutikulou hmyzu anebo prostřednictvím elektrostatických sil. (Boucias et al., 1988)

konidie na povrchu kutikuly vnímavého hostitele mŕže
zaŕít klíŕit. Optimální teplota pro klíŕení konidií *Beauveria bassiana* se pohybuje
mezi 25-30°C a optimální relativní vzdušná vlhkost mezi 95-100%. Pŕ zachování
tŕchto podmínek konidie zaŕnou klíŕit v rozmezí 10ŕ72 hodin. (Luz et al., 1997)
Schopnost klíŕit je ovlivnŕna i ŕadou dalŕích faktorŕ mezi, které patŕ kmen patogena,
druh hostitele (i jeho vývojové stádium) a pŕstomnost nŕkterých látek (kutikulární
lipidy a proteiny, aldehydy a ketony). (James et al., 2003)

Beauveria bassiana proniká nejŕastŕji do napadeného jedince kombinací
enzymatické penetrace a aktivní penetrace. (Landa et al., 2007) Hmyzí kutikulu tvoŕí
chitin, který je obklopen proteiny. Chitinové a proteinové sloŕky jsou degradovány
chitinázami a proteázami, které produkují entomopatogenní houby a umohŕují
tak proniknout hyfám skrz kutikulu a dostat se tak k nutriŕnŕ bohaté hemolymfŕ
Na základŕ aktivity proteáz a chitináz se posuzuje virulence jednotlivých kmenŕ
Beauveria bassiana. (Boucias et al., 2008)

Odpovŕŕ hostitelského organismu na invazi *Beauveria bassiana* závisí
na konkrétním druhu hostitele a jeho náchylnosti k pouŕhitému kmenu patogena.
V místech penetrace kutikuly se objevují melanizované skvrny (tmavŕ kruhy
s prŕmŕem 0,1-0,5mm), coŕ poukazuje na zvýŕenou tvorbu fenoloxidázy
v napadeném organismu. (Boucias et al., 1988) Lze pozorovat i dalŕích látky
fungicidního charakteru jako napŕklad nasycené i nenasycené mastné kyseliny.
(Boucias et al., 2008) Po napadení organismu je patogen vystaven ŕadŕspecifických
i nespecifických imunitních reakcí. Vŕŕi tŕnto reakcím si *Beauveria bassiana*
vyvinula rŕzné druhy obrany. V pŕpadŕpohlcení blastospor fagocytyujícími buŕkami,
zŕŕstávají v tŕchto buŕkách ŕivotaschopné, jako forma intracelulárního parazita
a následnŕ hostitelskou buŕku penetrují a dále mohou infikovat hostitele. (Boucias
et al., 1998) *Beauveria bassiana* zároveŕ produkuje velké mnoŕství sekundárních
metabolitŕ, které ji usnadŕují projev na hostiteli (antifungální látky, inhibitory
proteáz a obrané proteiny). (Whipps et al., 1990)

Klíŕní hyfa pronikne pŕŕes kutikulu a epidermální vrstvy, zaŕíná rŕŕst smŕrem
k hemocélu, kde se po 48 hodinách zaŕínají objevovat první blastospory,

polymfou po tĚe hostitele. (Boucias et al., 1998) UvnitĚ
 astospory klĚí a vytváĚí hustou myceliální masu, která
 posléze hostitele mumifikuje. (Landa et al., 2007) První viditelné známky poĝkození
 hostitele se obvykle objevují po 60-80 hodinách od napadení patogenem. StĚvo
 a malpighiho trubice bývají Ľasto napadeny aĥ po 6-8 dnech. Tracheje, snovací ĥlázy,
 svalstvo a málokdy stĚvo zĚstávají bĚhem infekce zpravidla nedotĚené. Smrt
 hostitele je velmi Ľasto zpĚsobena vyĤerpáním energetických rezerv, dehydratací
 nebo intoxikací toxiny, které produkuje patogen. (Boucias et al., 1998)

V poslední fázi vývoje prorĚstají hyfová vlákna na povrch usmrčeného
 jedince a na povrchu se vytváĚí vzdugné mycelium, na kterém se tvoĚí nové konidie
 (nepohlavní spory mikroskopických hub), které mohou zahájit nový vývojový cyklus
 patogena. (Landa et al., 2007) PĚ nepĚznivých vnĚĝích podmínkách (nĥzká relativní
 vzdugná vlhkost) nedochází ke konidiogenezi a patogen zĚstává v tĚe hostitele
 v podobĚ mycelia. (Boucias et al., 1998) Konidie jsou do prostĚdí uvolĤovány
 pasivnĚ a jsou pĚnáĝeny pĚdevĝím vĚrem. Konidie *Beauveria bassiana*
 jsou díky proteinĚm (tzv. hydrofobinĚm) bohatých na cystein silnĚhydrofobní. (Butt
 et al., 2001)

2.4. Lýkoĥrout smrkový

Ĥíĝe: *Animalia*- ĥivoĤichové

Kmen: *Arthropoda* ĥĤlenovci

TĚĥda: *Insecta*- hmyz

Ĥád: *Coleoptera*- brouci

LeleĤ: *Curculionidae*- nosatcovitĤ

Obr. Ĥ. 1.: Lýkoĥrout smrkový napadený entomopatogennĤ houbou *Beauveria bassiana*



Lýkoňrout smrkový je úzce vázán na smrk (*Picea abies*). Před 150-200 lety došlo v Evropě k přeměně původních, většinou listnatých a smíšených lesů v porosty smrkové. Ty se snáze pěstovaly, rychle rostly a dávaly daleko větší výnos dřeva potřebného v dřevařství a v průmyslu. Před tím bylo posunuto pěstování smrku do nižších poloh a v současné době je smrk hlavní dřevinou v polohách od 200 do 800 m. Na tento posun výskytu smrku do nižších poloh reagoval i lýkoňrout smrkový. Výhodou pro něj byla schopnost mít generace potomků několikrát ročně. Mylná domněnka o tom, že lýkoňrout smrkový se vyskytoval v nižších polohách vedla v letech 1984-1990 k závěru, že lýkoňrout se ve vyšších polohách nad 1000 m.n.m. nebude šířit. (Skuhravý, 2001)

Tělo křovce je válcovité, černohnědobarvené, lesklé se světle hlutými chloupky. Tykadla jsou paličkovitá s lomeným čtvrcem. Dorůstá velikosti 4-5,5 mm. Čít je v přední části hrbokatý, v zadní části jemně oteřkovaný. Mezery mezi šádkami teček má hladké. Prohlubeň sklonu na krovkách je vroubená na každé straně čtyřmi zuby, z nichž třetí odshora je největší. Dospělá larva měří 4-5 mm, je bílá se hlutohnědou hlavou. Kukla je bílá a měří asi v průměru 4 mm. Vajíčka jsou také bílá lesklá a oválná. (Benz et al., 2007)

2.4.2. Vývojový cyklus

Koncem dubna až začátkem května probíhá rojení v podhorských oblastech, koncem května až začátkem června v horách. Brouci vylétají ze svých zimovišť po zahřátí kůže a hrabanky nad 14°C. Brouci, kteří nedokončili dospělou hříadu na podzim, vylétávají o 1-2 týdny dříve a dokončují je v první křížové kmeně nebo odšiznutých vrcholcích stromů, podle podmínek se může během roku vylíhnout jedno až dvě a za velmi příznivých podmínek (v nižších polohách) i třetí pokolení. Schopnost přezimovat mají brouci, larvy i kukly. (Watt et al., 1997)

Rojící se brouci se nejčastěji vyskytují na umírajících nebo první pokácených stromech a polomovém dříví, při přemnožení se mohou objevit

Za normálních podmínek trvá celý vývoj asi 10 týdnů (stadium vajíčka 12 dní, larvy 24 dní, kukly 12 dní, dospívání 24 dní, což je dohromady 72 dní). Při příznivých podmínkách (teple) to může být 6 týdnů, naopak při nepříznivých podmínkách až 12 týdnů i více. Jako imago lýkohout žije 2-3 měsíce, výjimečně až 20 měsíců. (Frost et al., 1985)

Kvalitativní a kvantitativní informace týkající se úrovně diverzity jsou nesmírně důležitým faktorem v mnoha oblastech biologického výzkumu, ať již základního nebo aplikovaného v evoluční biologii, ekologii, taxonomii, genetikě a ochraně genofundu. Pro markerování o diverzity, pro detekci polymorfismu na úrovni nukleových kyselin (zejména DNA) je možné použít celou řadu různých molekulárních technik. Molekulární techniky lze rozdělit do tří kategorií: (1) techniky využívající hybridizaci, (2) techniky založené na PCR (Polymerase Chain Reaction=polymerázová řetězová reakce) reakci (amplifikace využívající náhodných primerů, *multi-locus PCR*) a (3) techniky založené na PCR reakci (amplifikace známých cílových sekvencí, *single locus PCR*). Mnohé další

PCR reakce

Metoda PCR je metoda často používaná v molekulární biologii pro amplifikaci určitých sekvencí DNA, která je založena na principu replikace nukleových kyselin. Lze vytvořit tisíce až miliony kopií určité sekvence DNA. Reakční směs pro PCR reakci tvoří master mix, DNA, obvykle dva primery a voda. Primery jsou krátké oligonukleotidy DNA, které ohraničí úsek DNA, který se má namnožit na začátku a na konci. Jako polymeráza bývá nejčastěji používána termostabilní polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud vznikl název *Taq* polymeráza. PCR reakce probíhá v zařízení označovaném jako termocykler, které dokáže během několika sekund snížit nebo zvýšit teplotu až o několik desítek stupňů. Této reakce se využívá k vědeckým účelům, kontrole potravin, zjišťování GMO a geneticky modifikovaných složek nebo také v kriminalistice při identifikaci osob. Výsledkem této reakce je velké množství kopií původní sekvence DNA. Tato metoda je velmi citlivá má schopnost odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku. Tuto metodu objevil r. 1983 Kary Mullis a o deset let později za ní dostal Nobelovu cenu za chemii. Namnožený materiál lze využít pro další biotechnologické metody jako sekvenování DNA, vytvášení fylogenetických stromů podle DNA, analýza genů, DNA fingerprinting. Dále lze tuto metodu využít pro diagnostiku infekčních nemocí, zjišťování genetických nemocí. (White et al., 1990)

Tato analýza zahrnuje 3 kroky: denaturaci, annealing a elongaci.

- během denaturace (při teplotě cca 94 °C po dobu 2 minut) dojde k denaturaci dvouřetězce DNA narušením vodíkových můstků mezi oběma vlákny, vzniká jednovláknová DNA
- v anealingu (nasedací teplota je 45-60°C) dojde ke komplementárnímu připojení volných oligonukleotidů k jednovláknové DNA
- v elongaci dochází k samotné syntéze DNA, ve směru od 5' konce ke 3' konci

1. Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce

Techniky založené na hybridizaci bez použití PCR reakce jsou historicky první skupinou molekulárních markerů, které byly použity v začátcích molekulární biologie od 70. let, v současné době se používají techniky odvozené od PCR reakce.

RFPL analýza (*Restriction Fragment Length Polymorphism*=polymorfismus délky restrikních fragmentů) je metoda založená na restrikním řezání DNA a následné elektroforetické separaci fragmentů DNA a hybridizaci se specifickou sondou (Southernův přenos). Mutace v restrikním místě vede ke změně velikosti restrikních fragmentů a tedy i velikost proužků pro hybridizaci. (Grant et al., 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 složité a náročné hybridizační kroky. Do této první kategorie amplifikačních metod můžeme seskupit všechny PCR techniky, které k amplifikaci DNA produktů (včetně produktů odvozených z produktů RNA) používají náhodné primery. Tyto techniky se obejdou bez požadavku znalosti cílových sekvencí DNA fragmentů, tak jako tomu bylo v případě RFLP a příbuzných metod. Různé metody z této kategorie se liší délkou a sekvencí těchto dležitých primerů. (Karp et al., 1997)

3. Amplifikace cílových sekvencí (*single-locus PCR*)

Nevýhodou náhodně amplifikované DNA je nedostatek znalosti charakteru markerů ve smyslu dominance a ve smyslu přechodu/postupu alel do lokusu. Tyto problémy byly překonány pomocí PCR zaměřené na specifické single-lokusy, pro které je nezbytná znalost cílových sekvencí nebo sekvencí ohraničujících cílovou oblast. Rostliny a živočišné mají tyto zdroje potenciálních sekvencí pro tento typ

A), mitochondriální (mtDNA) a jaderné (nDNA) sekvence obsahují fylogenetické a frekvenční informace a jsou tedy neobyčejně důležitými markery pro ekologické a evoluční studie. Sekvenování je ale v mnoha ohledech náročná technika, která navíc na sledované úrovni (odrůda, plemeno) detekuje nedostatečnou míru polymorfismu. (O'Malley et al., 1997) Když jsou ale polymorfní sekvence identifikovány, mohou být pomocí relativně snadných a jednoduchých PCR analýz vyvinuty markery pro testování rozsáhlých souborů či populací (*easy-to-screen markers*).

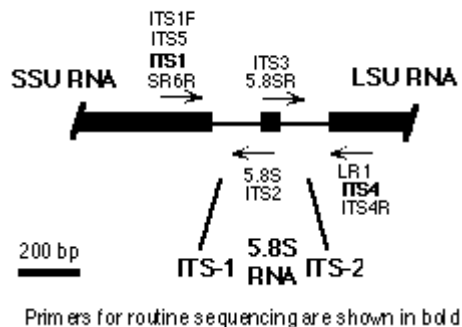
Při PCR-RFLP jsou amplifikované fragmenty DNA rozštěpeny restriktivními enzymy k odhalení polymorfismu restriktivních míst. (Kapr et al., 1997)

2.5.1. Volba vhodného markeru pro specifické aplikace

Velké množství různých technik DNA markerů, a zároveň široká rozmanitost aplikací, které mohou být použity, vyvolávají problém jak vybrat nejvhodnější DNA marker pro danou specifickou studii. Tento problém nastane vždy, 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 souvisí se zkoumanou problematikou a další se týkají výzkumníka a jeho možností. Není proto reálné nalézt odpověď, která by vyhovovala všem reálným variantám. (Karp et al., 1997)

2.6 ITS region

V ITS regionu jsou zahrnuty dva variabilní nekódující úseky, kterými jsou ITS1 a ITS2. Tyto úseky jsou umístěny uvnitř repetice rDNA mezi velmi konzervativním genem pro 18S rRNA (obsaženým v malé podjednotce ribozomu), genem pro 5,8S rRNA a genem pro 25-28 rRNA (obsaženým ve velké podjednotce ribozomu). (Gerbi, 1985)



ITS region je vhodná oblast pro molekulární charakteristiku hub a to z těchto hlavních důvodů:

1. ITS region je snadné amplifikovat i z malých, zředěných nebo vysoce degradovaných vzorků
2. Mezi morfologicky vzdálenými druhy může být ITS region velmi variabilní (Gardes et al., 1993), a tak mohou být následně PCR-RFLP restriční data založená na analýze ITS použita pro odhad genetické vzdálenosti, a zároveň poskytovat data pro systematické a fylogenetické analýzy. (Bruns et al., 1991)
3. ITS region je relativně krátký úsek (500-800bp) a může být snadno amplifikován pomocí PCR u většiny zástupců ze tříd *Basidiomycetes* a *Ascomycetes* pomocí univerzálních primerů ITS1 a ITS4 nebo ITS5 a ITS4. (White et al., 1990; Gardes et al., 1996)
4. druhově specifické sondy pro ITS oblast mohou být navrženy rychle a to bez potřeby vytvoření chromozomální knihovny. (Sreenivasaprasad et al., 1996)
Sekvence ITS používané pro vytvoření druhově specifických sond se vyskytují v mnoha kopiích a mají tendenci být mezi jednotlivými druhy hub různé a uvnitř jednotlivých druhů podobné. (Bridge et al., 1998)

Amplifikované ITS produkty jsou následně použity pro RFLP analýzu. Analýza RFLP je založena na restriktivním řezání DNA a následné elektroforetické separaci fragmentů DNA.

Nazar et al. (1991) využili ITS sekvence pro popis, identifikaci a detekci na jimi vybraných druzích hub. Identifikace odlišných skupin nehomologických nukleotidů v regionech ITS1 a ITS2 umožnila navrhnout specifických primerů, které zajistily specifickou detekci těchto dvou významných rostlinných patogenů.

Obdobný princip použili Moukhamedov et al. (1993), kteří použili sekvence z amplifikovaných úseků 5,8-28S rRNA k odlišení zástupců jednotlivých druhů rodu *Verticillium*. Bylo zjištěno, že sekvence 5,8S byly u uvedených druhů rodu *Verticillium* konzervativní, zatímco ITS oblast se u druhu *V. tricorpus* dostatečně odlišovala. To pomohlo vytvořit dvojici druhově specifických primerů, která umožnila detekci *V. tricorpus* v kultuře i v infikovaných stoncích bramboru. Použití PCR protokoly dovolilo i kvantifikaci patogena u patogenních polních plodin.

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

Studie týkající se struktury a polymorfismu ITS regionu vyústily i v praktické využití získaných poznatků pro účely identifikace a diagnostiky hub (houbových patogenů). Na základě těchto studií byly navrženy univerzální primery na podkladě sekvencí rDNA. Tyto primery jsou specifické pro hlavní skupiny hub. Gardes et al. (1993) navrhli dva selektivní primery (ITS1-F a ITS4-B), které byly specifické pro houby, respektive pro zástupce třídy *Basidiomycetes*. V případě, že se primer ITS4-B zkomboval s univerzálním primerem ITS1 nebo specifickým primerem ITS1-F, odlišil *Basidiomycetes* od *Ascomycetes*. Primery ITS1-F/ITS4-B byly využity pro detekci rzí v infikovaných tkání

atřící do třídy *Basidiomycetes*=pododdělení
být použity ke studiu šíření rzi na alternativní
hostitele a ke studiu ektomycorhizních společenstev. (Váňa, 1998)

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

3.1. Material

V této studii byly použity následující kmeny entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea* a *Paecilomyces fumosoroseus* (viz. Tab. 1.1.) Všechny kmeny použité v této studii byly poskytnuty Katedrou rostlinné výroby a agroekologie oddělení rostlinolékařství na Zemědělské fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Použité kmeny z oblasti CHKO a NP Šumava byly získány v rámci monitoringu populace *Beauveria bassiana* v rámci projektu MZP SP/2d1/41/08.

Tab. 1.1.: Použité kmeny a jejich původ

LAB. OZNAČENÍ	KMEN	PŮVOD/LOKALITA
Pol	A24	Polsko
USA	Bba 01	Spojené státy americké, FL
Rum	A32	Rumunsko
Fr	A135	Francie
Sk01	T01A	Slovensko - Tatry
Sk08	T08	Slovensko - Tatry
SSSR	A131	Rusko
Čv	A36	Československo
Ind	A52	Indie
L	A74	Čína
Kol	A133	Kolumbie
Bbr	NP0155 <i>Beauveria brongniartii</i>	L'R - Stohel'ek, Šumava
IFR	NP0056 <i>Isaria fumosorosea</i>	L'R - V kotli, Šumava
PFR	PFR 97 Florida	Biopreparát PREFERAL
Pk	Pk	L'R - Píchný (Morava)
Pm	Pm	L'R - Píchný (Morava)
I 101	Bba I 101	L'R - Prameny Vltavy

Obr. 1.3.: Mapa NP Šumava



Sterilní práce

Média, sklo a veškeré nástroje byly sterilovány v autoklávu (120°C, 0,1 MPa, 30min).

Kultivace a udržení kultur

Kultury poskytnuté Katedrou rostlinné výroby a agroekologie byly dlouhodobě uchovávány v 20% glycerolu při teplotě -80°C. Pro tuto studii byly následně jednotlivé kmeny kultivovány na živném médiu PDA (Potato Dextrose Agar) po dobu po dobu 14 dnů při teplotě 25°C. Z povrchových kultur kultivovaných na PDA proběhl mechanický odběr pro izolaci DNA.

PDA (Potato Dextrose Agar)

Himedia, dodáváný: LADERSKÝ ENVITEK, spol. s.r.o.

složení: bramborová infuze 200,0 g/l, dextrosa 20,0 g/l, agar 15 g/l

příprava: 39 g směsi vložíme do 1000 ml destilované vody a zahříváme do úplného rozpuštění, sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 15 minut, dále pak promíchanou směsí naléváme na Petriho misky.

Extrakce DNA

Z povrchových kultur kultivovaných na PDA proběhl mechanický odběr pro izolaci DNA. Izolace byla prováděna pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Tato metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolonek, na první kolonce dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé kolonce dochází k zachycení DNA a následně k jejímu vymytí elučním roztokem. Pro extrakci DNA bylo použito přibližně 100mg (90-110mg) mycelia získané z povrchových kultur kultivovaných na PDA. Vzorů DNA byly uchovávány při -20°C.

DNA

- pendorfek dáme 100mg mycelia, ze kterého chceme izolovat DNA a dťkladnřzhomogenizujeme
2. Ke kařdřmu vzorku přřdřme 400řl, znova zhomogenizujeme a přřdřme jeřřř 4řl RNAase A, dťkladnřzvortexujem
 3. Inkubujeme 10 minut přř 65°C, 2-3 břhem inkubace promřchřme (přřvrřcenř)
 4. Přřdřme 130řl AP2 , promřchřme a inkubujeme 5 minut na ledu
 5. Centrifugujeme 5 minut na maximum ř 14000 rpm
 6. Nřslednř přřpipetujeme lyzřt na QIA Shredder Mini Spin Column v 2ml collection tube a centrifugujeme 2 minuty na maximum
 7. To co proteklo, přřneseme na novř 1,5ml eppendorfky
 8. Přřdřme 1,5 objemu AP3/E a promřchřme pipetovřnřm (450řl lyzřtu ř 675řl AP3/E
 9. 650 řl mixu z kroku 8) napipetujeme do DNeasy Mini Spin Column v 2ml colection tube a centrifugujeme 1 minutu na 10000 rpm, to co proteřře, vylijeme a filtr vlořřme zpřř
 10. opakujeme 9) se zbytkem mixu- collection tube vyhodřme
 11. filtr vlořřme do novř Collection tube a přřdřme 500řl AW, centrifugujeme 1 minutu 10000 rpm, to co proteřře, vylijeme a filtr vlořřme zpřř
 12. přřdřme 500řl AW a centrifugujeme 2 minuty na maximu, collection tube vyhodřme
 13. filtr vlořřme do novř 1,5ml eppendorfky a přřdřme 100řl AE přřmo na membrřnu a inkubujeme 5 minut RT, nřslednřcentrifugujeme 1 minutu na 10000rpm

PCR

Polymerřzovř řetřřzovř reakce (PCR) umořřuje amplifikaci specifickřch nukleotidovřch sekvencř z velmi malřho mnořstvř vřchozřho materiřlu.

ITS-RFLP analřza

Metoda se sklřdř ze dvou řřstř:

- I. Amplifikace specifickřho fragmentu z ITS regionu ř primery ITS5 a ITS4
- II. řřpenř přřsluřnřho fragmentu pomocř specifickřch restrikl'nřch endonukleřz ř *HhaI*, *AluI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI*

Tyto kroky probřhřly podle standardnřch protokolř Biotechnologickřho centra KRA ZF JU.

v objemu 25 μ l. Pro pŠpravu vzorkŤ na analŷzu byl pouhŷt PPP Master Mix (Taq- Pyrole DNA Polymerŷza PCR Master Mix s 5 mM MgCl₂) (Top-Bio s.r.o., LŘ) Tento Master Mix se dodŷvŷ 2krŷt koncentrovanŷ:
150 mM Tris-HCL, pH 8,8, 40mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20,5 mM MgCl₂ ,
400 μ M dATP, 400 μ M DTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100U/ml Taq Pyrole DNA polymerŷzy, stabilizŷtory a aditiva.

Sekvence pouhŷtŷch primerŤ:

ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

ITS5: GGA AGT AAA AGT GGT AAC AAG G

(White et al.,1990)

Schŷma pipetovŷnŷsystŷm PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l PPP master mixu
- 1 μ l DNA
- 0,5 μ l primer ITS5
- 0,5 μ l primer ITS4
- 10,5 μ l dH₂O (voda do objemu 25 μ l)

1. Po napipetovŷnŷ vzorek zvortexujeme a krŷtce centrifugujeme
2. Nŷslednŷ provedeme kvantitativnŷ PCR

PCR reakce probŷhaly v termocykleru BIOER XP a byl pouhŷt nŷsledujŷcŷ profil reakcŷ:

Cyklus PCR

- | | | |
|------------------------------|--------|------|
| • poŷŷetel'nŷ denaturace | 2 min | 94°C |
| • 10 cyklŤŤ (-1°C/1 cyklus): | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 66°C |
| | 1 min | 72°C |
| • 25 cyklŤŤ: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 56°C |
| | 1 min | 72°C |
| • koneŷnŷ elongace | 10 min | 72°C |
| • stop | nŷ | 4°C |

PCR

e DNA se docílí pomocí restrikl'ních enzymŮ (RE), což jsou enzymy prokaryotního pŮvodu. KaŮdŮ RE je charakteristickŮ specifickŮm mŮstŮm ůŮŮenŮ. Specifika spolŮvŮ v rozpoznŮnŮ sekvence 4 nebo 6 pŮrŮ bŮzŮ. Na ůŮŮenŮ produktŮ z PCR byly pouŮity tyto restrikl'nŮ enzymy: *HhaI*, *AluI*, *MboI*, *HaeIII*, *MseI*, *HpaII*, *ClaI*, *EcoRI*, *HincII*, *SspI* (NEB, USA).

ůŮŮicŮ mŮsta:

HhaI

5'... GCGC...3'
3'... CGCG...5'

AluI

5'... AGCT...3'
3'... TCGA...5'

MboI

5'... GATC...3'
3'... CTAG...5'

HaeIII

5'... GGCC...3'
3'... CCGG...5'

MseI

5'... TTAA...3'
3'... AATT...5'

HpaII

5'... CCGG...3'
3'... GGCC...5'

ClaI

5'... ATCGAT...3'
3'... TAGCTA...5'

EcoRI

5'... GAATTC...3'
3'... CTTAAG...5'

HincII

5'... GTYRAC...3'
3'... CAR YTG...5'

SspI

5'... AATATT...3'
3'... TTATAA...5'

fragment byl pouhý 2% agarózový gel.

složení 5xTBE pufru (objem 1l): 54g TRIS, 27,5ml kyseliny borité, 20ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

Vizualizace vzorků

PCR produkty a štěpené PCR produkty byly vizualizovány barvením agarózového gelu *ethidium bromidem*. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí digitálního fotoaparátu Canon Power Shot A640 a zpracovány digitální obrazovou analýzou v programu TotalLab (Nonlinear Dynamics, VB).

Statistické zpracování dat

Pro účely komplexního hodnocení PCR-RFLP 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 koeficientů genetické identity, výpočty podobností a sestavení dendrogramů). Pro tyto účely byl využíván program MVSP (Kovach Comp.Serv.). Výsledky matice pak byly podrobeny clusterové analýze (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method Using Averages*) a výsledky zobrazeny jako dendrogram.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Jsou zpracovávány do vědecké publikace a po jejím vydání budou vloženy a
doplňeny

Tato bakalářská práce měla za cíl posouzení vhodnosti techniky ITS-RFLP pro účely hodnocení genetické variability izolátů *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea*. Pro tuto studii bylo zvoleno celkem 17 kmenů a u všech byla provedena technika ITS-RFLP a následná vizualizace pomocí elektroforézy.

Z bakalářské práce vyplývá význam techniky PCR-RFLP pro zjištění polymorfismu ITS regionu. Tato technika se jeví jako vhodná pro hodnocení genetické variability entomopatogenních hub, avšak pro přesnější výsledky bych doporučila použít ještě další restriční enzymy, nebo si nechat jednotlivé úseky osekvenovat a zjistit tak přesné nukleotidové složení a porovnat sekvenční polymorfismus.

AQUINO DE MURO, M. et al.: Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species), 2005, s. 294-306

BENSON, D.A. et al.: Nucleic Acids Research, 2000, s. 15-18

BENZ, G., ZUBER, M.: Die Wichtigsten Forstinsekten der Schweiz und des angrenzenden Auslands: 2007, s.121

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C.: Principles of insect pathology.: Springer, 1998, 568 s. 1. ISBN 041203591X

BOUCIAS, D.G., PENDLAND, J.C., LATGE, J.P.: Nonspecific factors involved in attachment of enthomopatoghenic *Deuteromycetes* to host insect cuticle. Applied and environmental mikrobiology. 1988, vol.54, no.7., s. 1795-1805

BOUCIAS, D. G., PENDLAND, J.L.: *Beauveria*, in Capinera, J.L.(ed). Encyklopedia of Entomology. 2end edition, Springer, 2008.s. 401-404

BRIDGE, P.D., ARORA, D.K.: Interpretation of PCR methods for species deginition. In: BRIDGE, P.D., ARORA, D.K., REDDY, C.A. , FLANDER, R.P : Applications of PCR in mycology.-CAB International, Wallingford, 1998, s.63-84

BURGE, M.N.: Fungi in biological kontrol systeme. : Manchester university press, 1988. 376s.

BUTT, T.M., JACKSON, C., MAGAN, N.: Fungi as biocontrol agents : Gabi, 2001.390.s. ISBN 0851993567

COATES, B.S. et al.: *Beauveria bassiana* haplotype determination based of nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP, 2002, s. 40-50

DAVISE, J.H.: Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 4th edition: AMS Press, 2002. 409 s. ISBN 1555811728.

EILENBERG, J., HAJEK, A., LOMER, C.: Suggestions for unifying the terminology in biological control . *Biocontrol*. 2001, no. 46, s. 387-400

EILENBERG, J., HOKKAKEN, H.M.T.: An ecological and societal approach to biological control. [s.l.]: Springer, 2006. 322 s. ISBN 1402043201

FROST, P. et al.: Ochrana lesŤ a pŤirodnŤho prostŤedŤ : StátnŤ zemŤŤskŤ nakladatelstvŤ, 1985, s. 409

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

.D.: ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*. application to identification of mycorrhizae and rusts.- *Molekular Ekology*, 2: 1993, s.113-118

GARDES, M., BRUNS, T.D.: Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFPL pattern of their PRC amplified-ITS.- *Mycological Society Newsletter*, 1991, s. 41:14

GERBI, S.A.: Evolution of ribosomal DNA. In: Macintyre, R.J.(ed.): *Molekular Evolutionary Genetics* .- Plenum, New York, 1985, s. 419-517

GRANT, D., SHOEMARKER, R.: Molekular hybridization. In: CAETANO-ANOLLÉS, G., GRESSHOFF, P.M.: *DNA markers. Protocols. Applications, and Overviews*.-Wiley-Liss,Inc., New York, 1997, s. 15-26

HAJEK, A.: *Naturall enemies: an introduction to biological kontrol*. Cambridge University press, 2004. 378 s.

HOPFER, R.L. et al.: Detektion and differentitation of Fungi in clinical specimen using polymerase chain reactions (PCR) amplification and restriction enzyme analysis.- *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 31, 1993, s. 65-75

JAMES, R.R., BUCKNER, J.S., FREEMAN, T.P. : Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect cinidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of invertebral pathology*. 2003, roľ. 84. ř. 2, s. 67-74

KARP, A., EDWARDS, K.J., DNA markers: a global overview. In: CAETANOANOLLÉS, G., GRESSHOFF, P.M.: *DNA markers, Protocols, Applications, and Overviews*.-Wiley-Liss, Inc., New York, 1997, s. 1-13

LANDA, Z. Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *AGRO-ochrana rostlin*, 1998, ř. 10, s. 7ñ12.

LANDA, Z, KOŠ ENOVÁ, Z., OLDŠ ICH, V.: Využití houby *Beauveria bassiana* v ochranĚ proti lýkořroutu smrkovému. *Lesnická práce*. 2007, roľ.86. ř.10,s. 20-22

LIEUTIER, F. et al.: Bark and wood boring insects in Libiny trees in Europe: 2004, s.569

LIU, Y. et al.: Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* species taxa based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers, 1997, s. 519-532

LUZ, C., FARGUES, J.: Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana* . *Mytopatologia*. 1997, vol. 37, no.2, s. 117-125

Use of polymerase chain reaction-amplified ribosomal
detections and differentiation of *Verticillium* wilt
pathogens.- Physiological and Molekular Plant Pathology ,39, 1993, s. 256-259

NAZAR, R.N. et al.: Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences
in the detektion and differentiation of *Verticillium* with pathogens .- Physiological
and Molekula Plant Patology, 39: 1991s.1-11

NEUVÉGLISE, C. et al.: Komparative analysis of molekular and biological
characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolatér from insects. Mycol Res
98:322-328

O'MALLEY, D.M., WHWTTEN, R.: Molekula markers and forest trees. In.
CAETANO-ANOLLÉS, G., GRESSHOFF, P.M.: DNA markers. Protocols,
Applications, and Overviews.- Wiley.Liss,Inc., New York, 1997, s. 237-257

PAËOUTOVÁ, S.: The Phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*.-
Mycological Research, 2001, s. 275-283

REHNER, S.A., BUCKLEY, E.: A *Beauveria* Phylogeny inferred from nuclear ITS
and IF1-alfa sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps*
teleomorphs, 2005, s. 84-98

ROY, H.E, BROWN,P.M.J., ROTHERY,P.: Interactions between the fungal
pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*,
Coccinella septempunctata and *Adalia bipunctata*. BioControl. 2008, vol.53,no.1,s.
265-276

SKUHRAVÝ, Lýkořrout smrkový: Ākřdce horských lesř. Lesnická práce. 2001,
roř.80, ř.7,s.1

SREENNIVASAPRASAD, S. et al.: Phylogeny and systematics of 18
Colletotrichum species based on ribosomal DNA spacer sequences.- Geonome,39,
1996, s. 499-512

VÁř A, J.: Systém a vývoj hub a houbových organismř.- Karolinum, Praha, 1998,
s.164

WATT, A.D.: Forests and insects: 1997, s. 406

WHIPPS, J.M., LUMSDEN, R.D.: Biotechnology of Fungi for Improving Plant
Growth: Cambridge University Press, 1990, 303 s.

WHITE, T.J. et al.: 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 : PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.- Academic
Press, San Diego, 1990, s. 315-322

ZIEMMERMAN, G.: Biocontrol Science and Technology, Vol. 17, Number 6, 2007,
s.553-596(44)

 **PDF**
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

[e/departments/sekce-
ni-organizmy/entomopatogenni-houby/klasifikace-
entomopatogennich-hub/](#)

2. http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/menu/1042846_11/index.html
3. http://www2.biologie.uni-halle.de/zool/dev_biol/diss/schreiter/diss_einl.html
4. <http://rl.zf.jcu.cz/informacni/cihlar/beauveria-bassiana/beauveria-bassiana/>