

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Bakalářská práce

**Sekvenační analýza genu pro elongační faktor 1- α na
modelovém souboru *Beauveria bassiana***

Obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Autor:

Tereza Kávová

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Kateřina Šimáčková

Konzultant diplomové práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Sekvenační analýza genu pro elongační faktor 1- α na modelovém souboru *Beauveria bassiana*, vypracovala samostatně a použila jsem literaturu a studijní materiály, které uvádím v seznamu použité literatury.

České Budějovice, 7.4. 2011

.....

Podpis

Poděkování:

Poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce Ing. Kateřině Šimáčkové za odborné vedení, rady a především za její trpělivost. Rovněž děkuji prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za ochotu a poskytnuté konzultace.

Můj dík patří i Ing. Evě Vondráškové za odborné vedení v laboratoři a při zpracování dat.

Touto cestou bych ráda poděkovala svým blízkým za nemalou oporu, kterou mi věnovali během studia.

Abstrakt

Beauveria bassiana je využívána v biologické ochraně proti hospodářsky významným škůdcům. Detekce morfologického i genetického polymorfismu mezi jednotlivými kmeny používanými v biologické ochraně přirozeného prostředí je důležitá ke studiu šíření této houby a jejího působení v ekosystému.

V České republice mají biologické preparáty na bázi *Beauveria bassiana* nyní největší význam v boji proti lýkožroutu smrkovému (*Ips typographus*) v NP Šumava.

Tato práce je zaměřena na hodnocení genetické variability kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na základě molekulární analýzy elongačního faktoru 1- α . Tato metoda se ukázala jako vhodný nástroj pro hodnocení genetického polymorfismu, vhodnější než metody založené na sekvenačním polymorfismu ITS nebo LSU regionu či ITS-RFLP.

Díky této metodě jsem dospěla k výsledku, že genetická příbuznost je více spojená s geografickým umístěním, než s druhem hostitele, z kterého byl kmen odebrán. U kmenů pocházejících odlišných lokalit byl prokazatelný sekvenční polymorfismus EF-1 α .

Klíčová slova: *Beauveria bassiana*; entomopatogenní houba; elongační faktor 1- α ; biologická kontrola; molekulární markery;

Abstract

Beauveria bassiana is used in biological control against economically important pests. The detection of morphological and genetical polymorphism among different strains used in biological control is important to study the spread of this fungus and its effect on the ecosystem.

In the Czech Republic, there is biological preparation based on *Beauveria bassiana* used most of all in the fight against *Ips typographus* in the Šumava National Park at present.

This work was aimed to evaluate the genetic variability of strains of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by molecular analysis of elongation factor 1- α . This method was proved as useful tool for evaluating the genetic polymorphism and it is more appropriate than methods based on sequence polymorphism of the ITS region or LSU, or ITS-RFLP.

The conclusion of my study is that genetic relationship is more associated with geographic location than with the host species from which the strains were isolated. Sequence polymorphism of EF 1- α was detected in strains originating from different sites.

Key words: *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungus, elongation factor 1- α , biological control, molecular markers.

Obsah

1. Úvod.....	7
1.1 Cíle bakalářské práce	7
2. Literární přehled.....	8
2.1 Entomopatogenní houby	8
2.1.1 Obecná charakteristika.....	8
2.1.2 Klasifikace entomopatogenních hub.....	8
2.1.3 Vývoj entomopatogenních hub	9
2.2 Obecná charakteristika rodu <i>Beauveria</i>	10
2.2.1 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo.- Criv.) Vuillemin 1912.....	10
2.2.2 Biologická kontrola, význam a využití <i>Beauveria bassiana</i>	12
2.3 Možnosti uchování biologického materiálu	13
2.3.1 Uchování vzorku v glycerolu.....	14
2.3.2 Lyofilizace	14
2.4 Molekulární markery.....	14
2.4.1 Charakteristika molekulárních markerů.....	14
2.4.2 Techniky založené na polymerázové řetězové reakci.....	15
2.4.3 Techniky založené na hybridizaci DNA	20
2.5 Sekvenování.....	20
2.6 Separační metody	21
2.6.1 Gelová elektroforéza.....	21
3. Elongační faktor.....	23
3.1 Obecná charakteristika.....	23
3.2 Gen pro elongační faktor 1-alfa (EF 1- α)	23
4. Materiál a metodika.....	24
4.1. Použité kmeny.....	24
4.2. Kultivace vzorků.....	24
4.3 Izolace DNA vzorku	25
4.4 Měření koncentrace DNA	26
4.5 PCR reakce	27
4.6 Separace a detekce	28
4.7 Izolace z gelu	29
4.8 Sekvenování.....	30
4.9 Statistické hodnocení dat	30
5. Výsledky	31
6. Diskuze.....	37
7. Závěr	39
8. Použitá literatura	40
9. Přílohy.....	44

1. Úvod

Beauveria bassiana je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby. Byla objevena a popsána Agostinem Bassim před 200 lety. Devastace populací bource morušového byla impulsem k detailnímu zkoumání rodu *Beauveria* a jeho pozdějšímu využití k biologické ochraně. Nyní má široké spektrum využití v biologické ochraně po celém světě. Tato houba byla izolována z více jak 700 druhů hmyzu a má vysoký potenciál využití k ochraně proti více jak 70 druhům hmyzu.

V současné době se v ČR využívá zejména pro regulaci škůdce lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*) v lokalitách CHKO Šumava a NP Šumava, který způsobuje velké škody na smrkových porostech na celém území České republiky.

V této práci se zaměřuji na primární použití analýzy elongačního faktoru $1-\alpha$ a následné hodnocení genetické variability kmenů entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* na základě sekvenačních dat pomocí této metody. Tato sekvenační analýza se ukázala jako cenný nástroj při určování polymorfismu u hub, stejně tak jako i u jiných organismů. U hub byla dříve identifikace založena na hodnocení morfologických parametrů, např. dle tvaru a velikosti konidií. Tyto metody jsou však nepřesné a k jejich upřesnění se používají metody molekulárních markerů. Díky nim lze určit přesné taxonomické zařazení.

Tato studie byla podporována granty GAČR 521/08/H042, MSM 60076658-06, MZP SP/2d1/41/08.

1.1 Cíle bakalářské práce

- Optimalizace analýzy elongačního faktoru $1-\alpha$ (EF $1-\alpha$)
- Hodnocení polymorfismu odebraných kmenů *Beauveria bassiana* z NP Šumava, Národního parku Krkonoše, z Pěččína (Morava) a Jeseníků pomocí sekvenační analýzy EF $1-\alpha$
- Zhodnocení vhodnosti použité metody pro její zavedení jako rutinního hodnocení molekulárních dat entomopatogenních hub

2. Literární přehled

2. 1 Entomopatogenní houby

2.1.1 Obecná charakteristika

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, způsobujícího škody na kulturních plodinách. Jsou potencionálně všestranné agens v biologické ochraně, jelikož mají široké hostitelské spektrum, svého hostitele mohou infikovat v různém vývojovém stádiu a mohou vyvolávat přírodní epizootie. Charakteristickým rysem entomopatogenních hub je schopnost vyvolat infekci pouhým kontaktem, penetrací kutikuly a nemusí být přijímány jako potrava, zatímco u ostatních entomopatogenů je bezpodmínečně nutný příjem perorálně, aby došlo k vyvolání infekce. V současné době je známo více než 750 druhů hub, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu (Ambethgar, 2002).

Komerční uplatnění mají pouze tři druhy *Beauveria*, *Metarhizium* a *Verticillium*. Jejich zvláštní mechanismus působení, pro infekci vývojových stadií hmyzích škůdců požadují vlhké a teplé podmínky prostředí, limituje jejich použití mimo skleníky (Šedrlová, 2008).

2. 1. 2 Klasifikace entomopatogenních hub

Entomopatogenní houby jsou řazeny do třídy *Eumycota* a zahrnují 750 druhů z 56 druhů, kteří působí jako patogeni, či parazité členovců (Chander a kol., 2000).

V systému hub jsou entomopatogenní druhy zastoupeny v několika řádech a různých oddělení, kde nejvýznamnějšími jsou houby z oddělení *Chytridiomycota* (*Blastocladales*); *Zygomycota* (*Zygomycetes*: *Entomophthorales*, *Mucorales*); *Ascomycota* (*Laboulbeniomyces*, *Sordariomycetes*) a *Deuteromycota* (*Hyphomycetes*; *Moniliales*). Velmi významnou a poměrně dobře známou skupinu entomopatogenních hub představují houby z řádu *Entomophthorales* (*Zygomycota*: *Zygomycetes*). Významnou a nejznámější skupinou entomopatogenních hub jsou druhy *Beauveria*, *Metarhizium* a *Verticillium*.

Houby mají jedno z nejširších hostitelských spekter v rámci patogenů členovců, které napadají celou řadu druhů, rodů, čeledí nebo vyšších taxonomických skupin (Inglis a kol., 2001). Existují však entomopatogenní houby vysoce specializované, které preferují výskyt na jednom hostiteli nebo výskyt na hostiteli pouze v daném vývojovém stádiu (Weiser, 1996).

Nejčastěji jsou parazitické mykózy detekovány na druzích spadajících do řádů stejnokřídlí (*Homoptera*), třásnokřídlí (*Thysanoptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*), ploštice (*Hemiptera*), motýli (*Lepidoptera*), brouci (*Coleoptera*) a dvoukřídlí (*Diptera*). Nejčastější napadané stádium hmyzu jsou larvy, případně kukly. Méně často jsou houbami napadení dospělci a vajíčka (např. *Beauveria bassiana* infikuje vajíčka) (Landa, 1998).

2. 1. 3 Vývoj entomopatogenních hub

Hlavní fáze vývojového cyklu entomopatogenních hub lze definovat ve třech stupních. Prvním stupněm je přichycení a klíčení konidií na povrchu kutikuly hostitele, druhým stupněm je pronikání patogena do tělní dutiny, interní proliferace a vytváření povrchové myceliální sítě (parazitická fáze vývojového cyklu), třetím stupněm je externí sporulace a tvorba konidií nové generace (saprofytická fáze vývojového cyklu).

Šíření konidií v prostředí a mechanismy zajišťující jejich primární kontakt s hostitelem jsou procesy převážně nahodilé, které jsou zprostředkovávány pomocí abiotických nebo biotických faktorů. Z abiotických 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). Je známo jen málo případů šíření konidií entomopatogenních hub pomocí jiných biotických vektorů (např. roztoči, hád'átky, jinými druhy hmyzu) (Landa, 1992).

Přichycení na tělo hostitele probíhá pomocí konidií, které jsou v některých případech vybaveny adhezivními substancemi (mucilageny), pomocí kterých vytvářejí s kutikulou hostitele pevnou vazbu již při první kontaktu (např. *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*). Další formy přichycení konidií k povrchu hostitele probíhají na bázi elektrostatických sil, případně molekulární interakcí mezi látkami, které jsou přítomny na povrchu konidií a kutikule hostitele (např. hemaglutiny, glykoproteiny, steroly, polární lipidy aj.) (Malsam et al., 2002).

Po přichycení na tělo hostitele dochází ke klíčení a počátečnímu růstu. Nejdříve dochází ke zvětšení kolonií a poté se začne tvořit primární klíček. V určité fázi začíná primární klíček sloužit jako penetrující hyfa, která proniká do těla hostitele (Boucias, 1988). Na povrchu těla naklíčené konidie penetrují kutikulu hostitele hyfami přímo, nebo se nejprve rozrůstají po povrchu jeho těla. Hyfy prorůstají do těla hostitele různými způsoby. Přirozenými otvory, mezitělními segmenty, nebo aktivní penetrací kordiálního klíčku do těla (Osborne a Landa, 1992).

Proniknutím do těla hostitele začíná třetí vývojová fáze. Patogen se v těle hostitele rychle rozrůstá, kde tvoří jedno- či vícebuněčná hyfová tělíska (blastospory). Invazivní chování patogena či potravní deficiente hostitele vede k usmrcení hostitele patogenem (Inglis et al., 2001).

Usmrcením hostitele začíná fáze saprotrófní. Houba začíná prorůstat na povrch těla. Na vzdušném myceliu se tvoří fruktifikační orgány, saprotrófní fáze končí úplnou sporulací (Osborne a Landa, 1992).

2. 2 Obecná charakteristika rodu *Beauveria*

Říše	<i>Fungi</i>
Oddělení	<i>Ascomycota</i> -houby vřeckovýtrusé
Podkmen	<i>Pezizomycotina</i>
Třída	<i>Sordariomycetes</i>
Podtřída	<i>Hypocreomycetidae</i>
Řád	<i>Hypocreales</i> - masenkovitý
Čeleď	<i>Clavicipitaceae</i> - paličkovcovité
Rod	<i>Beauveria</i>
Druh	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo.-Criv.) Vuillemin

Rod *Beauveria* tvoří bílé až slabě růžové mycelium. V době sporulace se stávají konidie práškovité až vápnité. Svrchu je mycelium bílé nebo krémové, spodní strana bývá bezbarvá (Fassatiová, 1979). Konidiofory jsou tvořeny jednotlivými fialidami, nebo jejich shluky. Jejich tvar je vejcovitý nebo jsou to protáhlé větévky na vrcholu zúžené v krček, na jehož konci se vytvářejí konidie. Druhé konidie vyrůstají bočně z krčku. Na konci fialidy vyrůstá krček s nejstarší konidií na vrcholu (Fassatiová, 1979).

Rod *Beauveria* je celosvětově využíván pro biologickou ochranu proti škodlivému hmyzu více než 100 let. Po celou tuto dobu byl rod průmyslově množen a využíván. Doposud nebyl prokázán škodlivý vliv po jejich aplikaci na rostliny (Zimmermann, 2007).

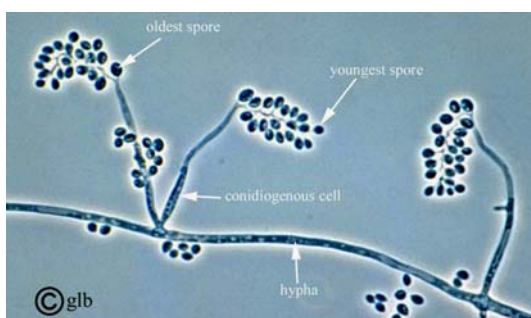
2. 2. 1 *Beauveria bassiana* (Balsamo.- Criv.) Vuillemin 1912

B. bassiana je kosmopolitně rozšířený druh entomopatogenní houby, který byl izolován na více než 700 druhů hmyzu (Goettel et al., 1990). Výskyt houby je v alpínské půdě, na vřesovištích, rašeliništích, lesních a kultivovaných půdách, píscích a trvale

zavodněných půdách (Zimmermann, 2007). Vyskytuje se zejména na herbivorních druzích hmyzu, kteří jsou částí svého života vázání na půdu (Weisser, 1996). V půdě je schopná přežívat v podobě mycelia uvnitř těla uhynulého hostitele, nebo prostřednictvím konidií. Konidie si mohou v půdě uchovat životnost až 2 roky (Gillespie, Moorhouse, 1988). Poprvé tuto houbu studoval v souvislosti s infekcí „white muscardine“ (infekce devastující v 19. století populaci *Bombyx mori*) italský vědec Agostino Bassi (1773-1856). Stejným původcem onemocnění se zabýval také Guiseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, toto onemocnění popsal a na počest Agostina Bassiho v roce 1935 pojmenoval *Botrytis bassiana* (Dirlbeková, 1991). Na počátku 20. století se studiem patogena zabýval Beauverie. Vuillemin vytvořil v roce 1912 nový rod, který pojmenoval na počest Beauveriho, *Beauveria* (Zimmermann, 2007; Dirlbeková 1991).

Optimální teplota pro růst a vývoj *Beauveria bassiana* je v rozmezí 23-26°C při vlhkosti substrátu 80-100%. Minimální teplota pro růst mycelia je 5-8°C, maximální teplota však 28-31°C, při překročení tohoto teplotního maxima se růst houby pozastavuje (Dirlbeková 1991).

B. bassiana se běžně používá k regulaci populace zavíječe kukuřičného. Mimo to byl i prokázán endofytický vztah s hostitelskou rostlinou díky schopnosti houby vyvolat infekci i u larev škodících uvnitř rostliny (Bing, Lewis, 1991). Po celém světě je registrována řada výrobků na bázi této houby: USA-Mycotrol, Botanigard, Francie-Ostrinol, ČR- Boverol.



Obr. 1



Obr. 2

Obr. 1: Konidiofory *Beauveria bassiana*

(<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.10.jpg>)

Obr. 2 : Napadnutí larvy *Beauveria bassiana* (<http://www.forestryimages.org/images/192x128/1223007.jpg>)

2. 2. 2 Biologická kontrola, význam a využití *Beauveria bassiana*

Biologická kontrola je definována jako použití přirozených nepřátel škůdců k jejich regulaci.

B. bassiana má vysoký potenciál být využita jako biopesticid.

Popisují se čtyři základní strategie:

- Klasická biologická ochrana - úmyslná introdukce cizokrajného kmenu pro dlouhou neřízenou ochranu
- Inokulativní biologická ochrana - úmyslné vnesení endemického kmenu, pro dlouhodobou neřízenou ochranu endemických škůdců
- Inundativní biologická ochrana - užití entomopatogenní houby k eliminaci škůdce, kdy je ochranou dosaženo překrytí škůdce velkým bioagens
- Konzervativní biologická ochrana - změnami v životním prostředí navýšit možnost nákazy

Biologická kontrola se člení na klasickou a na augmentativní. Klasická biologická ochrana je záměrná introdukce nepůvodního organismu, růst jeho populace do té doby než obsadí všechny zdroje škůdců, jedná se o dlouhodobou regulaci populace škůdce. Augmentativní biologická ochrana používá přirozených nepřátel v sezónních dávkách. Využívá k potlačení škůdců během sezóny nebo během růstového cyklu plodin jednu nebo několik aplikací přirozených nepřátel do prostředí (Šedrlová, 2008).

Výhody prostředků biologické ochrany:

- nezatěžují životní prostředí
- nízká toxicita vůči člověku a teplokrevným živočichům
- nízká toxicita na necílové organismy
- vytváří dlouhodobě stabilizovaný systém
- podpora užitečných organismů, které pomáhají omezovat necílové škůdce
- možnost použití i v chráněných oblastech, ochranných pásmech vod apod.

Nároky na použití biologické ochrany, nevýhody:

- nutné správné určení škůdců, znalost jejich bionomie
- nutná znalost bionomie užitečných organismů a působení biologických přípravků a jejich vztahu ke škodlivým organismům
- termín použití, podmínky apod.
- často omezená doba skladování
- u některých typů pomalý nástup účinnosti - nutná včasnost

Použití entomopatogenních hub v masové inokulaci jako biopesticidů započal roku 1888 Krassilstchik. V té době Krassilstchik předpovídal regulaci populace hmyzu uměle vyvolanými epidemiemi. Objevení účinných chemických látek v letech 1930-1940 snížilo zájem o používání biopesticidů. Až po prokázání zdravotních rizik a negativních dopadů na životní prostředí spojených s aplikací syntetických pesticidů v 60. letech 20. století, se obnovil zájem o biopesticidy (Glare, 2004).

Uznávaným pesticidem je také *Beauveria bassiana*. Kmen Bb-147, registrován v Evropě pod obchodním názvem Ostrinil®, se užívá v ochraně kukuřice před zavíječem kukuřičným (*Ostrinia nubilalis*). Naproti tomu kmen GHA, registrovaný v U. S. A., je používán ve sklenicích proti molicím, třásněnkám a mšicím (Mycotrol®). V 80. letech firma Bayer Corporation registrovala přípravek Bio 1020 původně proti lalokonosci rýhovanému (*Otiurhynchus sulcatus*), později byl tento přípravek testován na mnoha jiných škůdcích.

Využívání biopreparátu na bázi *B. bassiana* proti *Ips typographus* je rozšířeno zejména v Německu, Švýcarsku a Rakousku, na experimentální úrovni je tato houba zkoušena i v dalších zemích (např. Austrálie, Finsko, Polsko). Nejčastěji je aplikovaná formou vodních suspenzí spor na povrch napadených stromů nebo stromových lapáků. Výsledky laboratorních studií a provozních aplikací dokazují, že v porovnání s většinou ostatních druhů entomopatogenních hub vykazuje *B. bassiana* po aplikaci na dospělce *I. typographus* nejen nejvyšší virulenci, ale i největší adaptaci na hostitele. Tato metoda se hojně využívá v lokalitách NP Šumava a CHKO Šumava (Landa, 1998).

2.3 Možnosti uchování biologického materiálu

Široká škála metod a praktik, které se používají k udržování a uchovávání mikroorganismů, je odvozena z různých časových požadavků pro uchování. Kultury se dají uchovat pomocí vhodných technik prakticky na neomezenou dobu. Pro úspěšné zachování životaschopnosti kultur by bylo ideální zachovat individuální požadavky každého druhu (Betina, 1987).

Uchování vzorků je velmi důležité při následné manipulaci. Je nutné vybrat techniku, která uchová veškeré vlastnosti daného vzorku. V mém případě se jedná o uchování genotypu bez jeho narušení. Nutnost neporušení struktury je důležité pro další

práce v laboratoři jako je izolace DNA, PCR, vizualizace na elektroforéze, sekvenování a hlavně možnost dlouhodobého uchování.

V poslední době se objevila řada publikací diskutujících problematiku genetické stability a identity kmenů hub, bakterií a dalších mikroorganismů v závislosti na technice uchovávání kmenů ve sbírkách a kolekcích. Pro tyto účely jsou používány právě moderní techniky genetické analýzy (Müller, 2007).

2.3.1 Uchování vzorku v glycerolu

Glycerol je hygroskopická bezbarvá viskózní kapalina bez zápachu, sladké chuti. Je důležitou biogenní organickou sloučeninou, neboť je ve formě svých esterů součástí tuků. V laboratoři je vhodný zejména pro šetrné uchování vzorků i za velmi extrémních teplot blížících se absolutní nule. Tato vlastnost se váže k depresi bodu tuhnutí roztoků s vysokou koncentrací glycerolu - např. $-37,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ koresponduje s 60-70 % glycerolu v roztoku (Betina, 1987).

2.3.2 Lyofilizace

Lyofilizace (vymrazování, sublimační sušení) je jedním z komerčně využívaných způsobů sušení. Při tomto postupu se malé kousky výrobku určeného k sušení rychle zmrazí, a to tak, aby se minimalizovalo poškození struktury vznikajícími krystalky ledu. Potom se vzorek umístí do sušárny, v které je udržován tlak nižší než je tlak vodní páry v trojném bodu (610,5 Pa) a voda tak ze zmrazené potraviny sublimuje, tzn. přechází z pevné fáze (ledu) přímo do fáze plynné (vodní páry). Vodní pára se odvádí ze sušicího prostoru a kondenzuje ve výparníku.

2.4 Molekulární markery

2. 4. 1 Charakteristika molekulárních markerů

Molekulární biologie umožňuje využívat pro charakterizaci genomů jednotlivých odrůd kulturních rostlin, hospodářských zvířat i pro získání individuálního profilu jednotlivých osob molekulární znaky DNA (Ondřej, Drobník, 2002). Pomocí DNA markerů lze jednoduše detekovat rozdíly v genetické informaci, kterou sledovaní jedinci nesou. Dříve byly jako molekulární markery používány především bílkoviny a jejich různé varianty, tzv. izoenzymy. V současné době se však využívá nejčastěji DNA markerů, které jsou oproti izoenzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom (Řepková,

Relichová 2001). Narozdíl od proteinových markerů nejsou tak významně ovlivněny prostředím a není tedy narušena jejich selektivní neutralita, což v některých případech nebývá splněno u izoenzymových markerů, na které může selekce působit buď přímo, nebo skrze geny vystavenými selekci, s nimiž bývají často ve vazbě (Bergmann, 1975).

Využívání molekulárních markerů v praxi znamená, že není třeba hodnotit obtížně hodnotitelný znak (například odolnost k houbovému onemocnění), ale je možno si vybrat molekulární znak, který se na chromozomu nachází velmi blízko genu pro odolnost k houbovému onemocnění. V potomstvech je pak možno přesně sledovat přenos tohoto molekulárního znaku (na základě sondy DNA) v zastoupení nepřesně sledovatelného znaku (odolnosti k houbovému onemocnění, například padlí ječmene). Je to podstatné zpřesnění a zvýšení možností využití vazbových map kulturních rostlin. Molekulární mapování umožňuje podstatně urychlit a zpřesnit proces šlechtění (Ondřej, Drobník, 2002). Například v případě potřeby stanovení patogenního agens z vegetativního vzorku je zapotřebí při kultivačních metodách minimálně 2-3 týdnů. Při imunologických testech pak tato doba činí včetně přípravy vzorku cca 24 hodin, u polymerázové řetězové reakce je možno tuto dobu zkrátit na 2 - 4 hodiny (Janovský, Šmerda, 2003).

Z hlediska použité metody se DNA markery dělí na:

1. markery založené na polymerázové řetězové reakci
2. markery založené na hybridizaci DNA

2.4.2 Techniky založené na polymerázové řetězové reakci

Rozdíly mezi metodami, spadajícími do této kategorie, spočívají v různých délkách a sekvencích použitých primerů, přísnosti PCR podmínek a metodou separace a detekce fragmentů (Karp, Edwards, 1997).

PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) je *in vitro* metoda pro enzymatickou syntézu definované sekvence DNA vyvinuta v roce 1983 Kary Mullisem. Reakce využívá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s protichůdnými vlákny DNA a od jejich 3'- konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců. Syntéza nových komplementárních vláken je katalyzována termostabilní DNA polymerázou (např. Taq DNA-polymeráza). Opakování cyklů, které zahrnují denaturaci DNA templátu

(denaturation), hybridizaci primeru (annealing) a syntézu komplementárních vláken DNA (extension), má za výsledek exponenciální nárůst počtu specifických DNA fragmentů. Konce fragmentu jsou určeny 5'-konci primeru. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, musíme znát alespoň počáteční a koncové sekvence amplifikovaného úseku. Z celé molekuly DNA, která je pro reakci použita, je amplifikován pouze úsek mezi dodanými primery, protože DNA polymeráze pro iniciaci replikace na jiném místě chybí primery.

PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci „jediné kopie“ DNA (prakticky 10²-10⁵ kopií templátové molekuly) ve vzorku tím, že určenou sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvením snadno detekovat (Upol, 2006).

Citlivost detekce může být snižována inhibitory, které mohou být obsažené extraktu nukleonových kyselin.

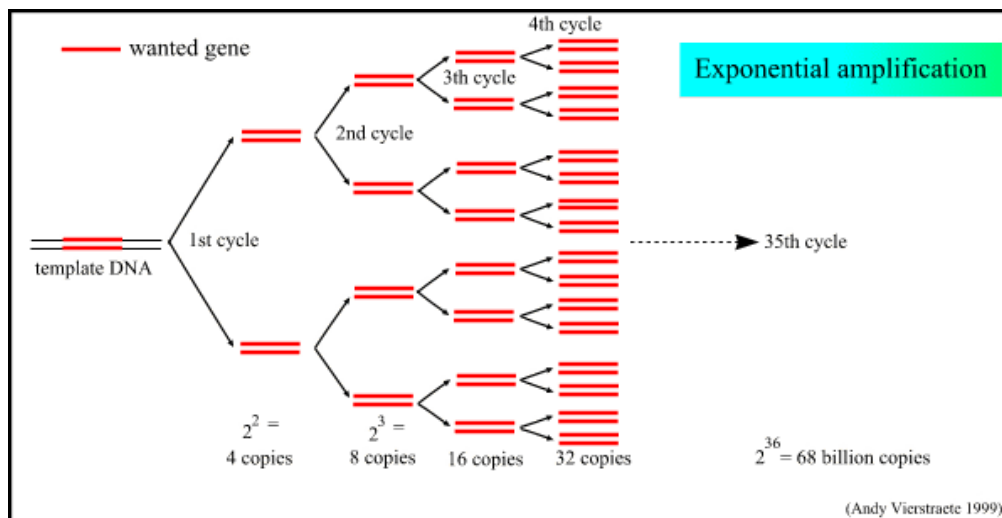
Pro kontrolu kontaminantu, které mohou zasahovat do amplifikačního procesu, je vhodné mít pro kontrolu pro každý pár primeru, nebo využívat Real-time PCR (Tubero et al., 2002).

Průběh reakce PCR

PCR reakce se skládá ze tří po sobě jdoucích kroků, které se liší teplotními podmínkami.

- Teplotní denaturace dsDNA – zahřátí roztoku DNA na takovou teplotu (zpravidla 90–95°C), při níž se oba komplementární řetězce dvoušroubovice zcela disociují od sebe.
- Teplotní hybridizace (annealing) – při němž je reakční směs zchlazena na teplotu (35-65°C dle použitého primeru) a jsou připojeny specifické amplifikační primery k 5' koncům dvou jednovláknových matricových řetězců. Každý primer je připojen k specifickému (komplementárnímu) místu na templátu díky své specifické sekvenci. Tak je 5' konci primerů vymezen daný amplikon.
- Syntéza dvouřetězcové DNA – prodlužování primerů (extension) – DNA-polymeráza katalyzuje vznik fosfodiesterové vazby nejdříve mezi 3' uhlíkem na konci primeru a 5' uhlíkem prvního volného nukleotidu, dále mezi 3' uhlíkem tohoto nukleotidu a 5' uhlíkem následujícího atd. Dochází tedy k zabudování volných dNTPs do nově vznikajícího řetězce podle templátové DNA. Tento řetězec je prodlužován ve směru 5' → 3'. Fáze reakce obvykle probíhá při teplotě 72°C.

Tyto tři kroky se cyklicky opakují. Každý krok trvá obvykle 1-2 minuty. Počet cyklů se většinou pohybuje kolem 30-40ti, přičemž množství nasyntetizovaných sekvencí přibývá exponenciální řadou (2^n ; n = počet cyklů).



Obr. 3 : Průběh reakce PCR
(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrcopies.gif>)

RAPD

RAPD – polymorfizmus náhodně amplifikované DNA (Random Amplified Polymorphic DNA) je jednou z metod založených na PCR. Využívá toho, že do amplifikace vstupuje pouze jeden náhodný (arbitrární) primer o délce deseti nukleotidů (dekanukleotid). Princip metody je v tom, že se několikrát v celém úseku studované DNA stane, že primery nasednou na protiběžných řetězcích DNA v amplifikovatelné vzdálenosti od sebe (do cca 4 kb). V tuto chvíli je umožněna amplifikace části DNA mezi nimi.

Délka používaných primerů je na dolní hranici použitelnosti a zvyšuje pravděpodobnost, že v genomu, o němž nejsou k dispozici žádné sekvenční informace, bude nalezeno místo s alespoň částečnou homologií. Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů lišících se délkou a interním nukleotidovým složením. Zájem se upírá jen na to, který z primerů vykazuje u studovaných vzorků polymorfnní pattern. Rozdíl oproti klasické PCR je ten, že se používá vždy jen jeden primer, který přisedne k homologním místům v protilehlých řetězcích dvoušroubovice. Vzdálenost primerů, mezi nimiž dochází k amplifikaci, zpravidla nepřesahuje 2000bp. Reakce probíhá v programovatelném termocykleru. Frekvence alel jsou spočítány z přítomnosti či nepřítomnosti konkrétních amplifikovaných produktů, které jsou ve většině případů elektroforeticky separovány na agarózovém gelu. K vizualizaci je použit ethidium bromid.

RAPD vykazuje vysoký stupeň polymorfizmu, a proto mohou být genetickými markery pro tvorbu genetických map, mapování QTL, fingerprinting, měření genetických

vzdáleností mezi populacemi atp. RAPD mají dominantní charakter – proto nelze odlišit hetero- a homozygotní genotyp.

AFLP

Metoda AFLP – (Amplified Fragment Length Polymorphisms) kombinuje postupy jak RFLP tak PCR. Uskutečňuje se v několika krocích a je založena na detekci fragmentů DNA získaných štěpením restrikcími endonukleázami prostřednictvím PCR amplifikace

Spektrum fragmentů je možné získat bez předcházející znalosti sekvence a počet fragmentů detekovaných v jedné reakci je „vyladěn“ sadami specifických primerů. Metoda je vhodná především k detekci polymorfismu u blízce příbuzných genotypů (Řepková, Relichová, 2001).

Mikrosatelity

Mikrosatelity (MS, také STRs – Short Tandem Repeats nebo SSRs – Simple Sequence Repeats) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících se motivů o délce 1 – 6 nukleotidů (např. $(GA)_n$, $(GATA)_n$, Tautz, 1984). Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (Weising et al., 1995). Obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, jelikož by měnila čtecí rámec odpovídajícího bílkovinného produktu.

Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se ovšem mohou snadno vyštěpit rekombinací. Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvence získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu (Weising et al., 1995).

Je to metoda časově nenáročná a dají se tak hodnotit různé lokusy a velký počet vzorků najednou. Mikrosatelity jsou markery kodominantní, tak získáme od každého jedince dva typy amplifikátů. To dokazuje jejich vysokou informativnost. Nevýhodou je náročná izolace mikrosatelitových lokusů z genomu, abychom získali unikátní okolní sekvence. A však ne všechny mikrosatelity jsou informativní a snadno identifikovatelné PCR.

Tyto vysoce polymorfní markery se vyskytují ve všech eukaryotních genomech a v některých genomech prokaryot. Použitelnost SSRs jako genetických markerů je částečně limitována jejich specifitou pro určité taxony, ale bylo prokázáno, že stejné markery mohou být někdy používány pro příbuzné druhy. Mikrosatelity se staly dobrým nástrojem pro konstrukci genových map a mají také velké využití v oblasti populační genetiky a

molekulární evoluce. Mikrosatelitové markery se získávají buďto prohledáváním známých sekvencí obsažených v databázích nebo izolací z různých typů DNA knihoven.

PCR-RFLP

Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidium bromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace (polymorfizmu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je vhodná pro geny s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence (analýzy intronů) (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Real-Time PCR

Exponenciální povaha PCR teoreticky umožňuje výpočet množství výchozího materiálu z množství produktu v určitém bodu reakce. V praxi mohou reakční podmínky ovlivňovat exponenciální amplifikaci a působit na produkty koncentrace. Pro stanovení množství výchozí DNA je nejvhodnější technikou standardní PCR. Dřívější pokusy o kvantitativní analýzu zahrnovaly pozastavení PCR reakce v různých fázích a na základě výsledku byly vystaveny kalibrační křivky. Tento postup byl pracný a poskytoval málo prokazatelné výsledky. PCR v reálném čase (Real-time PCR) probíhá pomocí specifických přístrojů při využití fluorescenčního značení a umožňuje sledování amplifikace, detekce a kvantitativní analýzu v jednotlivých krocích. Pro sledování Real-time PCR může být využita řada přístupů. K základním patří využití fluorescenčního barviva interkalující do dvoušroubovicové struktury DNA. Intenzita záření tedy roste s množstvím PCR produktu. Sybr Green umožňuje provést analýzu tání PCR produktu, kdy s rostoucí teplotou dochází k denaturaci DNA a signál fluorescenčního barviva klesá. Na základě této analýzy lze sestavit tzv. rozpadovou křivku, která vypovídá o délce PCR produktu a o zastoupení jednotlivých bází v amplifikovaném produktu. Interkalující fluorescenčního barviva nejsou sekvence specifická a postihují tak amplifikaci všech PCR produktů včetně produktu nespecifických (Weller et al., 2000).

2.4.3 Techniky založené na hybridizaci DNA

RFLP

RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism) se používá k identifikaci alel na základě přítomnosti, nebo absence specifického restričního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restriční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena (blotována) na pevnou membránu pomocí tzv. Southernova přenosu. Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizaci lze zjistit polymorfismus ve velikosti vzniklých restričních fragmentů DNA (Knoll, Vykoukalová, 2002). RFLP markery jsou založeny na změnách v sekvencích DNA, ke kterým docházelo během evoluce. Tyto změny způsobují bodové mutace v místech štěpení restričními enzymy, inserce nebo delece, mohou být důsledkem nerovnoměrného crossing-overu v rámci určitého chromozomu. RFLP markery byly u rostlin poprvé použity ke konstrukci genetických map. Jsou to kodominantní markery, které umožňují určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním nebo heterozygotním stavu (Řepková, Relichová, 2001).

2.5 Sekvenování

Tato metoda slouží k přesnému určení nukleotidové sekvence jakéhokoliv izolovaného fragmentu DNA nebo RNA.

Je nejpresnější, však pracovně nejnáročnějším, nejsložitějším a nejdražším způsobem studia DNA, při kterém se určuje přesné pořadí bází v určitém úseku DNA.

Pro sekvenování DNA byly vyvinuty dvě metody:

- 1) **Sangerova metoda** (1977) – tato metoda využívá syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázami *in vitro*, ukončované náhodně v místě jednotlivých bází (Sanger, Coulson, 1977)
- 2) **Maxam-Gilbertova metoda** (1977) – při této metodě dochází k chemickému štěpení DNA v místě určitých bází (Maxam, Gilbert, 1997)

Nejčastěji se používá Sangerova metoda, také nazývaná dideoxy sekvenování. Sekvenovaný úsek DNA, např. klonovaný fragment nebo produkt polymerázové řetězové reakce se rozdělí do čtyř částí, do každé z těchto částí se přidají všechny volné

deoxynukleotidy a pak odděleně do každé z částí jen po jedné z jejich dideoxy variant: ddATP, ddTTP, ddCTP a ddGTP, kterým chybí 3'-OH skupina. Reakci enzymaticky zajišťuje některá z DNA polymeráz (Řehout et al., 2000). V každé reakci je ddNTP náhodně připojen v pozici k odpovídajícímu deoxynukleotidu (dNTP). Přidání ddNTP ukončí polymeraci, protože nepřítomnost 3'-OH skupiny předejde přidání dalšího nukleotidu. Směs zakončených fragmentů se rozdělí souběžně na gelové elektroforéze. Oddělené fragmenty jsou detekovány autoradiograficky (Lodish et al., 2005).

Sangerova metoda se používá častěji než metoda Maxam-Gilbertova, protože se dá touto metodou sekvenovat úsek o délce 500 – 800 kb. Její nevýhodou je, že při čtení sekvence nečteme sekvenci původní DNA, ale sekvenci k ní komplementární.

Maxam-Gilbertova metoda využívá toho, že čtyři vzorky DNA jsou restriktivně štěpeny a vystaveny různým chemickým reakcím, které selektivně štěpí DNA v různých specifických nukleotidech. DNA je na svých koncích značená. Získané fragmenty jsou odděleny gelovou elektroforézou a pouze koncově značená vlákna jsou následně vizualizována autoradiograficky. Sekvence původního koncově značeného restriktivního fragmentu může být stanovena přímo z paralelní elektroforézy čtyř jednotlivých reakcí (Lodish et al., 2005).

2.6 Separační metody

Separační metody nebo též dělicí metody jsou fyzikálně-chemické metody spočívající v oddělení (separování, izolování) složek směsí. Obvykle spočívají na principu rozdílné distribuce dělených látek mezi různé nemísitelné fáze. Jsou využívány mj. pro kvalitativní i kvantitativní (chemickou i fyzikální) analýzu.

Patří sem metody jako: srážení, elektrodepozice, krystalizace, sublimace, destilace, dialýza, extrakce, a také elektromigrační metody – elektroforéza, chromatografie (plynová, superkritická fluidní, kapalinová, kolonová, plošná...).

2.6.1 Gelová elektroforéza

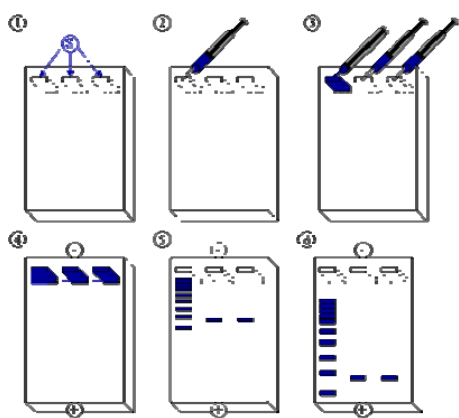
Gelová elektroforéza slouží pro separaci různě dlouhých fragmentů DNA. Principem gelové elektroforézy je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná velikosti DNA. Elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, nejčastěji v gelu tvořeném agarózou či polyakrylamidem.

Gely tvoří přechod mezi pevným a kapalným stavem z čehož většina je voda. Vytváří se trojrozměrná síť, póry slouží jako molekulové síto. Velikost pórů odpovídá velikosti proteinů a nukleových kyselin.

Agarózový gel se připravuje v různé hustotě (udávané v % práškové agarózy). Agaróza se rozpouští v pufru, který je také obsažen v elektroforetické vaně jako elektrolyt. Ve cvičení bude použit TBE pufr obsahující Tris, kyselinu boritou a EDTA. Vzorky se nanášejí do jamek v gelu, které byly vytvořeny pomocí tzv. hřebínku.

Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. velikostní marker (standard, DNA ladder) o definované velikosti jednotlivých fragmentů.

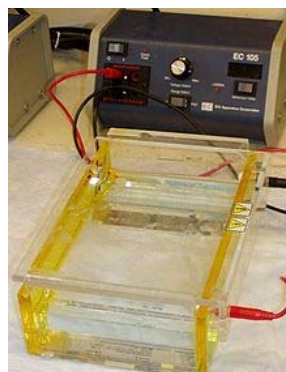
Zahuštění roztoku DNA (klesne do jamky v gelu) a kontrola separace DNA na gelu jsou zajištěny přidáním tzv. nanášecího neboli vkládacího pufru, který je tmavě zbarvený a je tak umožněna kontrola vložení PCR produktu do příslušné jamky a také migrace v gelu. Pro vizualizaci DNA se používá značení barvivem, které váže DNA, např. ethidiumbromid nebo barvivo typu SYBR Green (SYBR Safe Stain).



Obr. 4

Obr. 4: Pipetování do gelu

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png/400px-Agarose-Gelelektrophorese.png>)



Obr. 5

Obr. 5: Elektroforéza

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png/400px-Agarose-Gelelektrophorese.png>)

3. Elongační faktor

3.1 Obecná charakteristika

Elongační faktory (EF) jsou proteiny, které jsou zapojeny do mechanismu elongace (prodlužování) polypeptidového řetězce vznikajících bílkovin na ribozomu (v průběhu translace). Za určitých okolností se bez nich ribozom obejde, ale za cenu snížené efektivity a přesnosti (Alberts, 2002).

3.2 Gen pro elongační faktor 1-alfa (EF 1- α)

EF1- α je gen, kódující protein, který lze najít ve všech eukaryotických organismech. Tento protein je velmi hojný v cytosolu a účastní se GTP dependentního procesu vázání aminoacyl-tRNA do A místa ribozomu v 2. kroku translace mRNA. Jedná se o velmi výhodný marker z hlediska taxonomické determinace a to z několika důvodů: konzervovaná aminokyselinová sekvence dovoluje analýzu druhů v širokém taxonomickém měřítku, diferenciaci na třetích variabilních kodonových pozicích umožňuje determinaci i na druhové úrovni. Některé jeho vlastnosti s sebou ale přinášejí i určité komplikace. Degenerace 3. pozice společně s přítomností intronů znesnadňují vývoj univerzálních primerů, malý počet kopií (2 na buňku u diploidních organismů ve srovnání se stovkami až tisíci kopií u mitochondriálních či ribozomálních markerů) komplikuje amplifikaci. Paralogní kopie a heterozygositu (biparentální dědičnost nukleárních markerů) je třeba brát v úvahu při amplifikaci i následných taxonomických analýzách, které jimi mohou být výrazně zkresleny. Výskyt, počet, pozice a délka intronů výrazně kolísají a to i v rámci čeledí (Havill et al., 2007).

4. Materiál a metodika

4.1. Použité kmeny

Entomopatogenní houby použité pro analýzu byly získány z oddělení Rostlinolékařství, Katedry rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity V Českých Budějovicích během monitoringu v rámci projektu MZP SP/2d1/41/08.

Jako materiál byly použity entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* odběrem v lokalitách Národního parku Šumava, Národního parku Krkonoše, Pěnčína a Jeseníků. Seznam vzorků je uveden v tabulce č.1.

Tabulka č.1.: Seznam použitých kmenů pro analýzu EF 1-α:

Laboratorní označení	Kmen	Lokalita odběru
Bba I 101	<i>Beauveria bassiana</i>	prameny Vltavy, NP Šumava
PK	<i>Beauveria bassiana</i>	Pěnčín (Morava)
KR 7	<i>Beauveria bassiana</i>	Pěnkavčí vrch, KRNAP
JS 13A	<i>Beauveria bassiana</i>	Jeseníky
JS 28	<i>Beauveria bassiana</i>	Jeseníky

4.2. Kultivace vzorků

Použité kmeny byly uchovávány na Petriho miskách na PDA (Potato Dextrose Agar) mediu a kultivovány při teplotě 25°C

PDA složení:

bramborová infuze 200g/l
dextrosa
agar 15g/l

PDA příprava:

39 g PDA do 1000ml H₂O

Pro uchování původních vzorků namnožíme kmeny 2x. Pasážování provádíme očkovací kličkou, buď jednorázovou, či platinovou, kterou je nutno před úkonem vydesinfikovat ožehem plamenem. Snažíme se pracovat sterilně, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků jinými kmeny. Práci provádíme ve flowboxu (Steril-VBH).

Takto namnožené vzorky necháme růst při 25°C po dobu 14 dní. Po uplynulé době narostlé mycelium převedeme do mikrocentrifugačních zkumavek v množství potřebném pro izolaci. Mikrozkušavky řádně popíšeme a uložíme do mrazicího boxu.

Pro další práci se vzorky je nutné je převést do tekutého média PDB. Skalpelem vyřízneme z každé plotny 4 čtverce o rozměru 1x1 cm a umístíme do 300ml roztoku PDB (Erlenmayerova baňka 500 ml) a necháme růst při 25 °C po dobu 4 dní při 150 otáčkách/minutu.

Roztok stáčíme v centrifuze 5-10 minut při otáčkách na maximum, dokud nedocílíme pevného myceálního peletu. Takto stočené vzorky putují na 3-5 dní do lyofilizátoru.

4.3 Izolace DNA vzorku

Izolace DNA pomocí komerčního kitu - DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Na první koloně dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé koloně dochází k zachycení DNA jejímu následnému vymytí elučním roztokem (Čurn et al., 2008).

Postup izolace DNA:

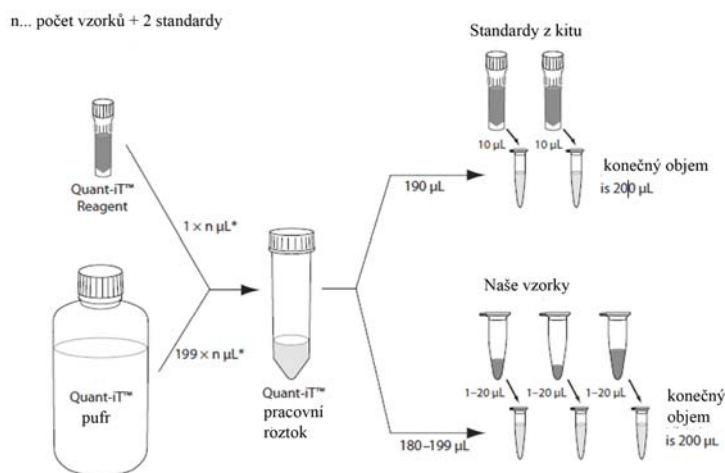
1. Odvážíme 20 mg lyofilizátu a vzorek homogenizujeme
2. Do vzorků přidáme laboratorní písek, 400 µl AP1 + 4 µl RNasa A a vložíme na 2 minuty do disruptoru
3. Inkubujeme při 65 °C 10 minut, během procesu 3x zvortexujeme
4. Vložíme vzorky na 2 minuty do disruptoru
5. Přidáme 130 µl AP2. Promícháme a inkubujeme 5 minut na ledu
6. Centrifugujeme 5 min/max
7. Přepipetujeme supernatant do QIAshredder Mini Spin Column v 2 ml Collection Tubes – centrifugujeme 5 min/max.
8. Přeneseme supernatant do nové mikrocetrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml, cca 450 µl
9. Přidáme 1,5x objemu (cca 675 µl) AP3/E a pipetováním promícháme
10. Přidáme 650 µl mixu do DNeasy Mini Spin Column v 2 ml Collection Tube
11. Centrifugujeme 1 min $\geq 8\,000$ rpm, odstranit supernatant a filtr vložit zpět
12. Opakujeme předchozí krok se zbytkem mixu – Collection Tube odstranit
13. Vložíme filtr do nové Collection Tube, přidat 500 µl AW, centrifugovat 1 min $\geq 8\,000$ rpm, odstranit supernatant a filtr vložit zpět

14. Přidáme 500 μL AW, centrifugovat 2 min na max, odstranit Collection Tube
15. Vložíme filtr do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky, přímo na membránu přidáme 50 μL AE a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě.
16. Centrifugujeme 1 minuta/ rpm

4. 4 Měření koncentrace DNA

Koncentrace genomické DNA byla měřena pomocí fluorimetru kitem Quant-iTTM dsDNA HS Assays Kit, 500 assays.

Čistota a koncentrace DNA se zjistí spektrofotometricky na fluorimetru. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm (ideální poměr $260/280 = 1,8$). Při znečištění vzorku proteiny bude vypočtený poměr výrazně nižší (Vlášková, Trešlová, 2008).



Obr. 6

Obr. 6 : Postup namíchání vzorku pro měření koncentrace DNA

Příprava směsi:

1. Reagent, Pufr a standardy důkladně zvortexujeme
2. Rozpipetujeme z mixu 197 μL do každé mikrozkušavky a 190 μL do mikrozkušavek pro standardy
3. Přidáme k mixu 3 μL stanovované DNA, a 10 μL standardu 1 a 2
4. Zvortexujeme a uchováme 2 minuty při pokojové teplotě
5. Zkalibrujeme fluorimetr pomocí standardu 1 a 2 a měříme koncentrace u jednotlivých vzorků

4. 5 PCR reakce

Celkový objem PCR reakce je 20 μ l.

Její složení je následující: 10 μ l PPP Master Mixu

8, 8 μ l H₂O

0, 1 μ l Primer F

0, 1 μ l Primer R

1 μ l DNA

Použité primery: EF1T F 5' - ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC- 3'
1567 R 5' - ACH GTR CCR ATA CCA CCS ATC TT- 3'
983 F 5' - GCY CCY GGH CAY CGT GAY TTY AT- 3'
2218 R 5' - ATG ACA CCR ACR GCR ACR GTY TG- 3'

Nastavený cyklus reakce:

- Počáteční denaturace 94°C/ 2 minut
 - Denaturace 94°C/ 30 sekund 10x (touchdown)
 - Annealing 66°C/ 30 sekund
 - Elongace 72°C/1minuta
- - Denaturace 94°C/ 30 sekund 36x
 - Annealing 56°C/ 30 sekund
 - Elongace 72°C/ 1 minuta
- Finální elongace 72°C/ 10 minut
- Uchování 4°C/ ∞

Složení Master Mixu dodávaného od firmy Top-Bio s.r.o.:

150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

4. 6 Separace a detekce

Separace

Příprava 2% agaróзовého gelu:

1. Připravíme a vyvážíme vanu
2. Příprava gelu o objemu 200 ml:

4 g agarózy

200 ml 1xTBE

Toto smícháme dohromady v Erlenmayerově baňce. Rozvaříme v mikrovlnné troubě na max. výkon. Během vaření několikrát zamícháme. Dáváme pozor na vychrtnutí roztoku, proto manipulaci provádíme v rukavicích. Roztok vaříme tak dlouho, dokud nejsou viditelná vlákna agarózy.

3. Roztok agarózy zchladíme, přidáme 4 μ l EtBr, důkladně promícháme.
4. Agarózu nalijeme do vany. Nutné bez bublin
5. Po nalití do vaničky umístíme hřebínek a gel necháme tuhnout cca 30 min.
6. Poté vyndáme hřebínek a nanášíme vzorky do jamek v gelu.

Příprava na elektroforézu:

1. Vzorky nemusíme barvit nanášecím pufrem (LB), protože PPP Master Mix obsahuje barvivo.
2. Elektroforetickou vanu naplníme dostatečným množstvím pufru 1x TBE.
3. Vzorky nanášíme postupně do jamek v gelu, po stranách nanese marker DNA Ladder 12 μ l, gel se vzorky poté opatrně vložíme pod hladinu pufru do elektroforetické vany.
4. Elektroforéza běží nejdříve při 40V cca 10 min a pak zvýšíme na 70 V po dobu 2,5 hodiny.
5. Vyjmeme gel z pufru a umístíme pod UV světlo a vyfotíme
6. Vyhodnotíme

Složení 1x TBE: 54 g Tris, 27,5g kyseliny borité, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 4l destilované vody.

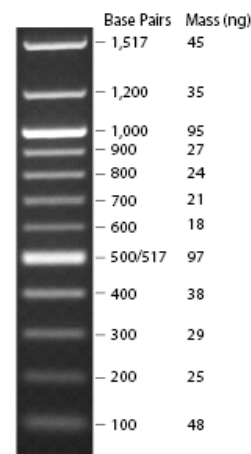
Složení barvy LB: 0,025g bromfenolové modře (Bromphenol Blue), 4 ml glycerolu, doplnit dH₂O do 10 ml.

Složení 100 bp DNA Ladderu NEB, UK: 2,5% Ficoll-400, 11 mM EDTA, 3,3 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,0017% SDS, 0,015% bromfenolové modře.

Detekce

U gelové elektroforézy byly fragmenty DNA zviditelněny pomocí barviva Ethidium bromid. Po ozáření UV světlem, fluoreskuje. Barvivo EtBr neovlivňuje mobilitu DNA v gelu, neovlivňuje detekci správné velikosti fragmentů, proto bylo upřednostněno.

Při používání UV světla je třeba chránit zrak a fotografie pořizovat jen v přístroji k tomu určeném.



Obr. 7

Obr. 7 : Délky fragmentů 100bp DNA Ladderu, podle kterých lze určovat velikost fragmentu vzorku

4. 7 Izolace z gelu

Po separaci fragmentů na gelové elektroforéze provedeme izolaci z gelu.

Použili jsme JETQUICK Gel Extraction Kit.

1. Odměříme 300 μ l L1 na každých 100 mg vyříznutého proužku z gelu
2. Inkubujeme při 50°C /15 minut (každé 3 minuty zvortexovat)
 - o pokud má agarosa vyšší koncentraci než 2% nebo má více jak 300 mg, přidá se na každých 100 mg gelu 600 μ l L1, inkubuje cca 20-30 minut
 - o maximální velikost gelu je 400 mg
3. Napipetujeme mix do JETQUICK column
4. Centrifugujeme 1 minutu/ max (14 000 rpm)
5. V případě většího množství mixu, krok opakujeme
6. Napipetujeme 500 μ l bufferu L2 přímo na filtr
7. Centrifugujeme 1 minuty/max
8. Odstraníme filtrát
9. Centrifugujeme 1 minuty/max
10. Vložíme JETQUICK column do 1,5 ml mikrozkušavky a přidáme 50 μ l přehřátého (65-70°C) TE bufferu
11. Necháme odstát 1 minutu
12. Centrifugujeme 2 minuty/ max
13. Uchováваме při – 20°C

4.8 Sekvenování

Příprava vzorků pro sekvenování DNA na přístroji ABI PRISM 3130xl:

Templát v množství dle tabulky + 2,5 pmol primeru + voda - celkový objem 7,5 µl - vše v 200 µl mikrocentrifugačních zkumavkách.

Templát	Množství Kit 3.1
PCR produkty:	
100-200 bp	0,5-1,5 ng
200-500 bp	1,5-5 ng
500-1000 bp	2,5-10 ng
1000-2000 bp	5-20 ng
>2000 bp	10-25 ng
ssDNA	12,5-25 ng
dsDNA	75-150 ng

4.9 Statistické hodnocení dat

Obdržená data byla dále zpracována v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0 a následovně upraveny v programech: CLUSTAL W, Bioedit, PAUP* executable a TreeView (Win32).

Bioedit, CLUSTAL W

Tyto programy jsou vhodné pro takzvaný „alignement“ – porovnávají se jednotlivé sekvence mezi sebou. U programu CLUSTAL W je výhodou dostupnost na webových stránkách:(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), a kompatibilita s programem Bioedit. V tomto programu lze ručně upravit jednotlivé sekvence pro další fylogenetickou analýzu. Je zde možnost odstranění „gapů“, tedy prázdných míst ve stanovované sekvenci.

PAUP* executable

Program PAUP vyhodnocuje data získaná v programu CLUSTAL W a Bioedit. Pomocí jednotlivých příkazů v příkazovém řádku lze vytvořit fylogenetické stromy.

TreeView (Win32)

V programu TreeView lze zobrazit fylogenetické stromy jako výstup z programu PAUP. Lze v něm upravovat stromy do tvaru fylogramu či kladogramu, přehazovat jednotlivé větve, či upravovat text. Nejdůležitějším úkonem v tomto programu je možnost zakořenění fylogenetického stromu vybráním „kořene“. Většinou to bývá takový druh, který je fylogeneticky nejvzdálenější.

5. Výsledky

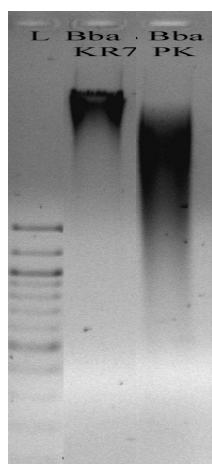
Vzorky určené k výzkumu jsme dle návodů Biotechnologického centra ZF JU napasážívali, nechali 14 dní růst na Petriho miskách s obsahem PDA. Poté jsme je přeočkovali na PDB medium a nechali kultivovat 4 dny. Následně vzorky byly lyofilizovány. Pro dlouhodobé uchování byly uloženy v chladících boxech při teplotě -80°C v roztoku 20% glycerolu a pro krátkodobé v chladících boxech při teplotě -20°C.

Na základě měření čistoty a koncentrace DNA byla, jako optimální metoda pro analýzu EF 1- α , vybrána izolace QIAGEN (DNeasy Plant mini Kit), která nejlépe splňovala požadavky pro analýzu. Tato izolace je komerční izolací což vynahrazuje úsporou času a chemikálií v poměru s kvalitou izolované DNA. Výsledné množství vyizolované DNA bylo reprodukovatelné (viz tabulka č.2)

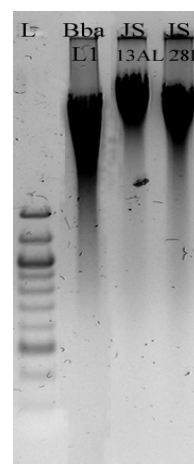
Tabulka č.2.: Měřená koncentrace vzorků na přístroji Quant-iTTM dsDNA HS Assays Kit

Vzorek	Koncentrace v ng/ul
Bba I 101	161
PK	97,5
KR 7	143
JS 13A	620
JS 28	580

Ověření koncentrace DNA ve vzorcích jsme také provedli pomocí gelové elektroforézy (viz. Obr. 8 a 9). Intenzita extrahované genomické DNA u vzorků plně odpovídá zjištěné koncentraci.



Obr.8

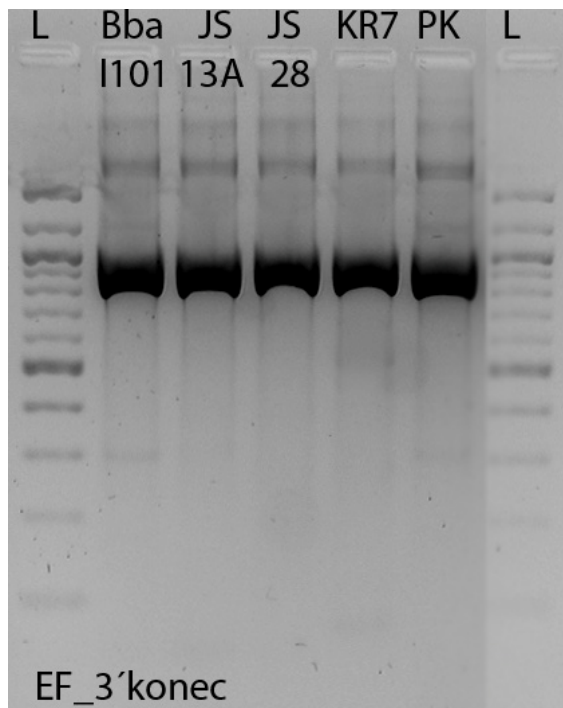


Obr. 9

Obr. 8, 9.: Detekce DNA

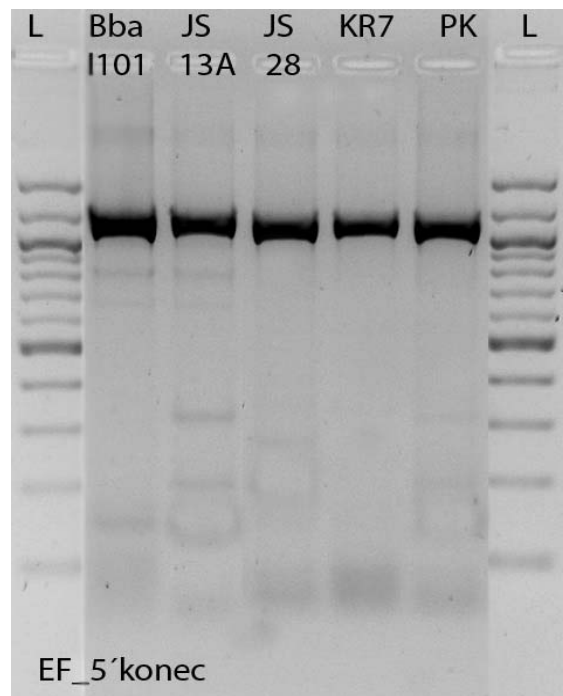
Byla provedena PCR reakce s primery (EF1T, 1567R- Obr.10; 983F, 2218R- Obr.11).

Jednotlivé úseky byly posléze vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (Obr. 12, 13). Vizualizace odpovídá vždy jedné sadě primerů.



Obr. 10

Obr. 10.: Vzorky s primery EF1T, 1567R (2% agarózový gel, 70V 2h)



Obr. 11

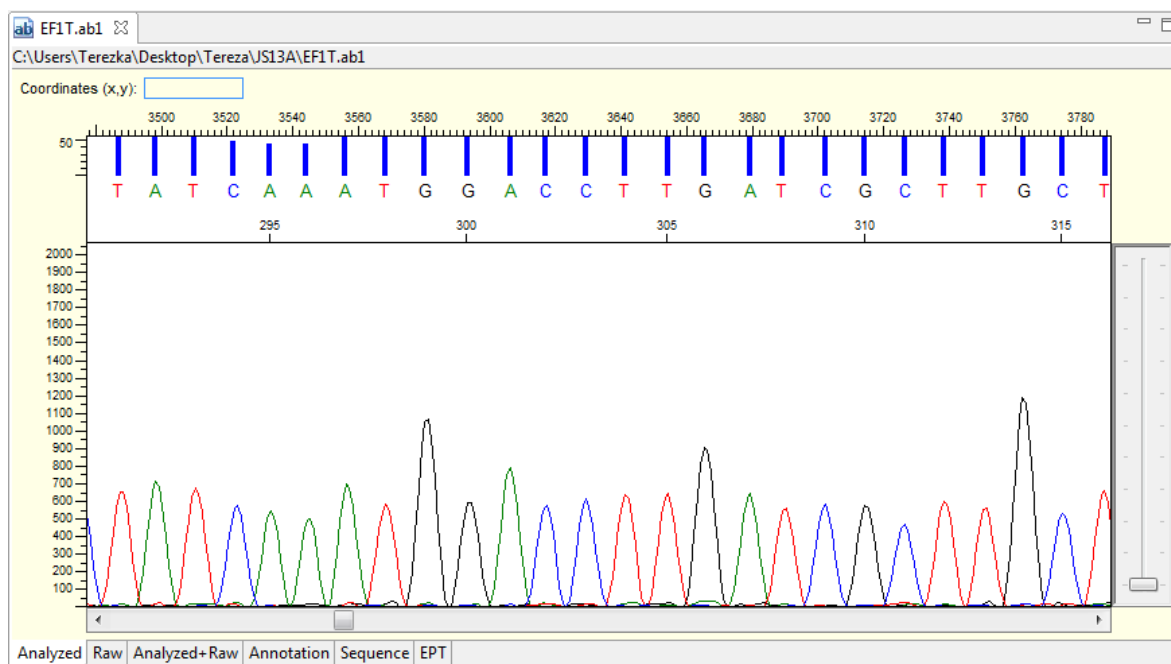
Obr. 11.: Vzorky s primery 983F, 2218R (2% agarózový gel, 70V 2h)

Analyzované vzorky na základě gelové elektroforézy vykazovaly délkovou shodu a nebyly identifikovány žádné velikostní rozdíly mezi jednotlivými vzorky.

Po proběhnutí EF 1- α analýzy, vizualizace a úpravy gelu, byly fragmenty z gelu vyříznuty a vyizolovány JETQUICK Gel Extraction kitem. Po provedení této izolace byla připravena sekvenační reakce pro každý vzorek a byly odeslány na sekvenční analýzu, která byla provedena formou služby.

Díky sekvenační analýze byly zjištěny přesné nukleotidové velikosti jednotlivých vzorků, které se lišily řádově v jednotkách bází. Sekvence byly vyhodnoceny v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0.

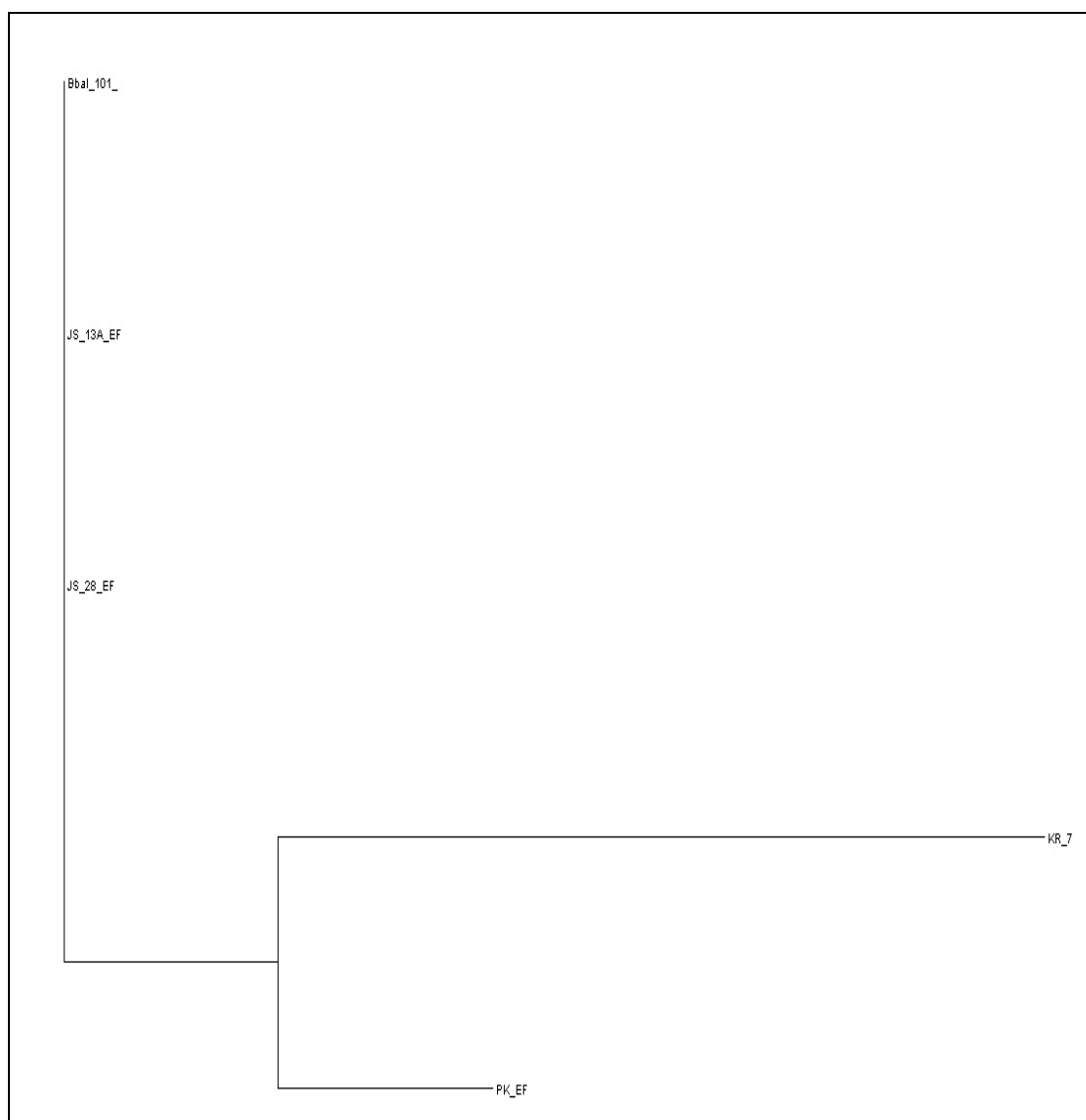
Obr. 12.: Ukázka sekvenovaného vzorku v programu *SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0* Pro každý typ báze je vždy charakteristické barevné označení.



Jednotlivé části sekvencí izolátů *Beauveria bassiana* byly porovnány v programu BioEdit Sequence Alignment Editor, kde byly následně ručně upraveny. Získané kompletní sekvence naleznete v příloze č.1 (barevné odlišení odpovídá grafickému znázornění v programu SEQUENCE SCANNER SOFTWARE v1.0).

V programu PAUP* executable byly vytvořeny fylogenetické stromy, které byly následně zobrazeny a upraveny v programu TreeView (Win32).

Obr. 13: Fylogenetický strom 1, vytvořený pomocí metody Neighbour-joining v programu TreeView (Win32)



Dendrogram, získaný na základě analýzy EF 1- α , kdy celkový počet porovnávaných bází je 1597, z čehož 1527 znaků je konstantních a 59 variabilních. Fylogenetický strom znázorňuje seskupení 5 izolátů kmenů entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*.

Z celkového pohledu byly vygenerovány 2 skupiny. První skupina zahrnující vzorky Bba I101, JS 13A a JS 28, vykazují 100% shodu v sekvenci. Tato shoda je potvrzením příslušnosti k druhu *Beauveria bassiana*.

Druhou skupinu vytvořily kmeny Pk a KR 7. U kmene KR7 se v sekvenci objevuje více odlišností. Vzorek KR 7 zde vykazuje celkovou odlišnost od kmene *Beauveria bassiana*.

Obr. 14: Fylogenetický strom 2, vytvořený pomocí metody Neighbour-joining v programu TreeView (Win32).



Dendrogram, získaný na základě analýzy EF 1- α , kdy celkový počet porovnávaných bází je 1677, z čehož 1336 znaků je konstantních a 296 variabilních. Fylogenetický strom znázorňuje seskupení 8 izolátů kmenů entomopatogenních hub *Beauveria bassiana*.

Do analýzy byly zahrnuty další vzorky z genové banky (NCBI) a to s označením:

Bba_EF_Ge: EF193185

Bbr_EF_Ge: FJ229492

Metarhizi: DQ463996

Tyto vzorky byly použity pro potvrzení ve správnosti druhového zařazení analyzovaných kmenů.

Analyzované kmeny se formují do pěti hlavních skupin. První skupina zahrnující vzorky Bba I101, JS 13A a JS 28 a referenční vzorek z genové banky (Bba_EF_Ge), vykazují téměř 100% shodu v sekvenci a je zde viditelné zařazení ke druhu *Beauveria bassiana* na základě srovnání se vzorkem z genové banky.

Vzorek Pk je zařazen do samostatné skupiny a toto zařazení lze vysvětlit jinými ekologickými podmínkami lokality odběru.

Další skupinu vytvořil kmen Bbr_EF_Ge, *Beauveria brogniartii*, a na další úrovni byly do této skupiny přiřazeny kmeny KR7 a výrazně odlišný *Metarhizium anisopliae*, který byl vložen kvůli zvýraznění příbuzenských vztahu rodu *Beauveria*. KR7 byl primárně determinován na pomoci základních morfologických charakteristik jako *Beauveria bassiana*, ale na základě molekulárních analýz a podrobného studia morfologie bylo zjištěno, že tato determinace není správná a vzorek KR7 je řazen do skupiny podobné *Beauveria brogniartii*. Díky tomuto srovnání můžeme s největší pravděpodobností říci, že se jedná o kmen *Beauveria brogniartii*. Touto domněnkou se bude zabývat další studie.

Fylogenetické stromy vytvořené na základě sekvencí genů či genomových dat u různých druhů mohou poskytnout náhled na průběh evoluce, taxonomického zařazení, tak jsou indikátorem příbuznosti analyzovaných vzorků.

Díky této metodě jsem dospěla k výsledku, že genetická příbuznost je více vázaná na geografické umístění, než na druh hostitele, z kterého byl kmen odebrán. Použití analýzy elongačního faktoru $1-\alpha$ je prokazatelně vhodnější než metody založené na sekvenačním polymorfismu ITS nebo LSU regionu či ITS-RFLP.

6. Diskuze

Entomopatogenní houby jsou již dlouhou dobu známy jako původci infekcí u hmyzu, způsobujícího škody na kulturních plodinách. Jsou potenciálně všestranné agens v biologické ochraně, jelikož mají široké hostitelské spektrum, svého hostitele mohou infikovat v různém vývojovém stádiu a mohou vyvolávat přírodní epizootie. Rysem entomopatogenních hub je schopnost vyvolat infekci pouhým kontaktem, penetrací kutikuly a nemusí být přijímány jako potrava, zatímco u ostatních entomopatogenů je bezpodmínečně nutný příjem perorálně, aby došlo k vyvolání infekce. *B. bassiana* se běžně používá k regulaci populace zavíječe kukuřičného. Mimo to byl i prokázán endofytický vztah s hostitelskou rostlinou díky schopnosti houby vyvolat infekci i u larev škodících uvnitř rostliny (Bing, Lewis, 1991). Po celém světě je registrována řada výrobků na bázi této houby: USA-Mycotrol, Botanigard, Francie-Ostrinol, ČR- Boverol.

Existují různé možnosti izolace kmenů entomopatogenních hub. První možností je izolace z napadených hostitelů – z dospělců, larev, nymf. Druhou možností je izolace entomopatogenních hub z půdy, kde se většina druhů vyskytuje v rámci saprofytické části svého životního cyklu. Vlivem hostitele na genotyp daného kmene entomopatogenní houby se zabýval také Maurer a kol. (1997). Zaměřil se na genetickou diversitu v závislosti na hostiteli. Používal metody molekulárních markerů RFLP a RAPD. Bylo zjištěno, že hostitelský druh může být převažujícím faktorem nad lokalitou. Nepodařilo se to ovšem potvrdit ve všech případech. Naopak Wang a kol. (2003) prokázal, že genetická podobnost je úzce spojena s geografickou lokalitou, více než s hostitelským druhem- s odkazem na studii provedenou Maurerem (1997).

Zatímco životní prostředí a místní podmínky můžou mít výrazný vliv na výskyt, nejsou jediným faktorem ovlivňující patogena. Entomopatogenní houby musí být především v kontaktu s citlivým hostitelem a musí být účastny vhodné podmínky pro infekci, aby bylo docíleno sporulace. Tento vztah houba- hostitel, výskyt v různých substrátech a období roku má značný vliv na koncentraci inokula (Meyling et al., 2006).

Enkerli, Widmer (2009) konstatovali, že izolace vysoce kvalitní DNA je velice důležitou otázkou v případě molekulární a ekologické analýzy entomopatogenních hub. S touto otázkou jsem se potýkala i já při volbě izolace. Dle Reay *et al.* (2008), který izoloval z kůry, z půdy a z kůrovce a dle Castrillo *et al.* (2007), který tuto izolaci použil pro analýzu mikrosatelitových markerů, na jejichž základě byla posuzována genetická variabilita mezi izoláty *Beauveria bassiana*, jsem použila QIAGEN (DNeasy Plant mini Kit). Tato izolace je komerční izolací a vyznačuje se úsporou času a chemikálií v poměru s kvalitou izolované DNA. Výsledné množství vyizolované DNA bylo použitelné pro provedení dalších analýz.

Aplikace analýzy elongačního faktoru 1- α jsme použili na základě studií Rehnera (2005), který se zabýval celým rodem *Beauveria* a používal zde metody ITS regionů a elongačního faktoru 1- α a Glara (2006), který tuto analýzu uplatnil při molekulární analýze druhu *Beauveria caledonica*.

Wang (2003), jak jsem již zmiňovala, dospěl k výsledku, že genetická příbuznost je více spojená s geografickým umístěním, než s druhem hostitele, z kterého byl kmen odebrán. V našem případě byl také prokázán vliv geografického původu u kmenů *Beauveria bassiana*. U kmenů pocházejících z odlišných lokalit byl prokazatelný sekvenční polymorfismus. Genotypy odebrané v montánních lokalitách (Bba I101, JS 13A a JS 28) prokázaly naprostou shodu. Na základě analýzy EF 1- α jsme určili výraznější odlišnost kmene Pk od ostatních analyzovaných kmenů. K tomuto faktu přispívá lokalita odběru, která může být určující v této diverzitě. Kmen Pk se mohl přizpůsobit ekologickým podmínkám svého stanoviště a to vedlo ke změně genotypu.

7. Závěr

Cílem mé bakalářské práce byla optimalizace analýzy elongačního faktoru 1- α , vyhodnocení polymorfismu analyzovaných kmenů *Beauveria* pomocí této sekvenační analýzy a zhodnocení její vhodnosti pro zavedení jako rutinního hodnocení molekulárních dat entomopatogenních hub.

- Byla optimalizovaná metoda analýzy elongačního faktoru 1- α pro účely hodnocení genetického polymorfismu kmenů *Beauveria bassiana*.
- Tato metoda se ukázala jako vhodný indikátor genetického polymorfismu.
- Je to prokazatelně vhodnější metoda než metody založené na sekvenačním polymorfismu ITS nebo LSU regionu či ITS-RFLP.
- U kmenů pocházejících z odlišných lokalit byl prokazatelný sekvenční polymorfismus. Genotypy s odběrem v montánních lokalitách Bba I101, JS 13A a JS 28 prokázaly naprostou shodu.
- Na základě analýzy EF 1- α jsme určili výraznější odlišnost kmene Pk od ostatních kmenů *Beauveria bassiana*. Důvodem rozdílnosti mohl být typ odebrané lokality, kde byly odlišné ekologické podmínky.
- Některé kmeny (KR7) považované za *Beauveria bassiana* byly díky sekvenační analýze odlišeny a předběžně přiřazeny k druhu *Beauveria brogniartii*.

8. Použitá literatura

- Ambethgar, V., 2002: Screening and selection of entomopathogenic fungi for management of cashew stem and root borer, *Plocaederus ferrugineus* L. (Cerambycidae: Coleoptera). *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 9(1): 19-31.
- Bergmann, F., 1975: Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. *Silvae Genetica* 24: 175-177.
- Betina, V., 1987: Mikrobiologické laboratorné metódy. Alfa Bratislava.
- Cano, R. J., Poinar, H. N., 1993: Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* 363: 536-538. Cano, R. J., Poinar, H. N., Clark, D. P., 2005. *Molecular biology: Understanding the genetic revolution*. Elsevier Academic Press.
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Fukuda, T., Lindegren, J. E., 1968: Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes, *Journal of Invertebrate Pathology* 11, 1:1-7.
- Dirlbeková, O., Nesrsta, M., Dirlbek, J., 1991: Biologické zdroje pro nechemickou ochranu rostlin (I. Deuteromycetes, *Beauveria bassiana* [Bals.] Vuill.). Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Praha.
- Enkerli, J., Widmer, F., 2009: Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *BioControl* 55: 17-37.
- Enkerli, J., Widmer, F., Gessler, C., Keller, S., 2001: Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. *Mycological Research* 105 (9): 1079-1087.
- Fassatiová O., 1979: Plísňe a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL, Praha
- Gillespie J.H., 2004: *Population genetics a concise guide*, John Hopkins University Press.
- Goettel M. S., Vincent C., 2007: *Biological control a global perspective*, CABI.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasse H., 2001: *Use of Hyphomycetes fungi for managing Insect Pests*. CABI Publishing.

Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., 1990: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101, USA.

Innis, A. M., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., 1999: PCR Protocols, Protocols for Functional genomics. Academic Press a division of Harcourt Brace & Company, San Diego, California 92101, USA.

Chander et al., 2000: Larval susceptibility of an Insekticide- Resistant Wester Corn Rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae) Population to soil Insekticides: Laboratory Nioassays, Assays od detoxification Enzymes and Field Performance. Journal of Economic Entomology, 93(1):7-13.

Knoll A., Vykoukalová Z., 2002: Molekulární genetika zvířat (metody detekce polymorfizmů DNA genů), Mendlova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta, Brno.

Lodish H. F., 2005: Molecular cell biology. UK Press.

Malsam O., Kilián M., Oerke E., 2002: Oils for increases efficacy of *Metarhizium anisopliae* to kontrol whiteflies, Biocontrol Scio. Tech. 12, 337-348.

Meyling, N. V., 2008: PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies. Department of Agriculture and Ecology. Faculty of Life Sciences. University of Copenhagen, Denmark.

Müller, J.; Day, J.G.; Harding, K.; Hepperle, D.; Lorenz, M.; Friedl, T., 2007: Assesing genetic stability of a range terrestrial microalgae after cryopreservation using amplified fragment lenght polymorphism (AFLP). American Journal of Botany 94(5): 799-808.

Oborník, M., Jirku, M., Doležal, D., 2001: Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Pacyomyces* polyphyletic? Canadian Journal of Microbiology: Sep 2001: 47,9:813-819.

Ondřej J, M., Drobník, J., 2002: Transgenoze rostlin. Academia. Praha.

Osborn, A. M., Smith, C. J., 2005: Molecular Microbial Ecology. Cromwell Press, Triwbridge, Wilts, UK.

Osborne L.S., Landa Z., 1992: Biological Kontrol od Whiteflies with Entomopathologenic Fungi, Florida Entomologist, 75: 456-471.

Reay, S. D., Browbridge, M., Cummings, N. J., Nelson, T. L., Souffre, B., Lignon, C., Glare, T. R., 2008: Isolation and characterization of *Beauveria* spp. associated with exotic bark beetles in New Zealand *Pinus radiata* plantation forests. *Biological control* 46: 484 – 494.

Rehner, S. A., Buckley, E. P., 2003: Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes* 3: 409-411.

Řepková, J., Relichová, J., 2001: *Genetika rostlin*. Vyd. 1., Masarykova univerzita v Brně, Brno.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., 2005: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně. Brno-Krávická Hora.

Vlášková, H., Trešlová, H., 2008: *Izolace DNA. Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice*. Sborník textů, Praha.

Wang, C., Fan, M., Li, Z., Butt, T. M., 2004: Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *Journal of Applied Microbiology* 96: 861–870.

Wang, C., Sshah, F. A., Patel, N., Li, Z., Butt, T. M., 2003: Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structures of *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology* 5 (10): 908-915.

Wang, X., Rinehart, T. A., Wadl, P. A., Spiers, J. M., Hadziabdick, D., Windham, M. T., Trigiano, R. N., 2009: A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *African Journal of Biotechnology* 8(11): 2432- 2436.

Weiser J., 1966: *Nemoci hmyzu*. ČSAV, Praha.

Zimmermann, G., 2007: Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, *Biocontrol Science and Technology*, 17:6, 553 – 596.

Internetové zdroje

- Frantz, G., Mellinger, H. C., 1998, Use of *Beauveria bassiana* for Biological Control of Thrips in Peppers. http://www.gladescrocare.com/potential_use_of_Bb.pdf
- Freeman, W. H., Molecular cell biology: Identifying, Analying and Sequencing Cloned DNA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A1637#A1648>
- Freeman, W. H., 2002, Molecular cell biology: The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A438#A455>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana
- Korzun, V., 2003, Molecular markers and their application in cereals breeding. <http://www.abneta.org/site/pages/terminologies/mas.php#marker3>
- Landa, Z., Křenová, Z., Vojtěch, O., 2007, Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. <http://lesprace.silvarium.cz/content/view/1988/133/>
- Meyling, N. V., 2008, PCR-based characterisation of entomopathogenic fungi for ecological studies. http://orgprints.org/14345/1/D5_2_final.pdf
- Shae, P. C., 2002, Molecular markers in Chinese Medicinal Materials. http://www.worldscibooks.com/etextbook/4700/4700_chap1_2.pdf
- Wiedenmann, R., 2000. Introduction to Biological Control. <http://www.inhs.uiuc.edu/research/biocontrol>

9. Přílohy

Porovnané sekvence dodaných izolátů z kmene *Beauveria bassiana*.

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GCAATAAATACTGACTACCAGACAGCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTT	60
GCAATAAATACTGACTACCAGACAGCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTT	60
GCAATAAATACTGACTACCAGACAGCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTT	60
GCAATACATACTGACCAGCAGACAGCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACCGTAAGTT	60
GCAATA-ATACTGACTACCAGACAGCCACGTCGATTCCGGCAAGTCTACCACTGTAAGTC	59

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

TTTTTCAACGGTCGAG-TGGCTTTTGAGCTCTCGAACCAGCAATCTT---CCGTCTTGCC	116
TTTTTCAACGGTCGAG-TGGCTTTTGAGCTCTCGAACCAGCAATCTT---CCGTCTTGCC	116
TTTTTCAACGGTCGAG-TGGCTTTTGAGCTCTCGAACCAGCAATCTT---CCGTCTTGCC	116
TTTTTCAACGGTCGAGTTGGCTTTTGAGCTCTCGAACCAGCAATCTT---CCGCCTCGCC	117
TCTTTCAACGGTCGAG-TGGCTCTTAAGCTCTCGAGCCAACAATCTTACCCCGCCTCGCC	118

* ***** *

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GGTACCT-CAGCGCAAAGAGCTAACTCATGTATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTG	175
GGTACCT-CAGCGCAAAGAGCTAACTCATGTATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTG	175
GGTACCT-CAGCGCAAAGAGCTAACTCATGTATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTG	175
GGTACCT-GAGAGCAAAGAGCTAACTCATCTACACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTG	176
GGTGTGTCGAGCGCAAGCAGCTAACTCATATATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTG	178

*** *

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAG-AAGGTAAGCATAGTATCCAAC	234
CGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAG-AAGGTAAGCATAGTATCCAAC	234
CGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAGAAAGGTAAGCATAGTATCCAAC	235
CGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAG-AAGGTAAGCATAGTATCCAAC	235
CGGTGGTATTGACAAGCGTACCATTGAGAAGTTCGAG-AAGGTAAGCATATTTATCCAAT	236

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CTTTTCTACTATCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAAAATTTTTTTT--CGTCGTATC	292
CTTTTCTACTATCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAAAATTTTTTTT--CGTCGTATC	292
CTTTTCTACTATCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAAAATTTTTTTT--CGTCGTATC	293
CTTTTCTACTGTCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTGCGCAAAATTTTTTTT--CGTCGTATC	294
-TTTTTCTACTGTCAAATGGACCTTGATCGCTTGCTTCAAACTTTTTCGTCGTATC	295

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GCGCTGGCCACCACCACACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAAAAAATTTTCAGAGTGCCTT	352
GCGCTGGCCACCACCACACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAAAAAATTTTCAGAGTGCCTT	352
GCGCTGGCCACCACCACACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAAAAAATTTTCAGAGTGCCTT	353
GCGCTGGCCACCAGCACTCACTACCCCTCCTCGCTGCGGCAAAAAATTTTCAG--TGCCTT	352
GCGCTGGCCCCCAGCACTCACTACCCCTCCTGGCTGCGGCAAAAAATTTTCAGAGTGCCTT	355

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

ATCAATTCAGTGGGGCCAGTGGGAGTACCCCGCCACCTTGTCGCAAGCTTTCCCTCATC	412
ATCAATTCAGTGGGGCCAGTGGGAGTACCCCGCCACCTTGTCGCAAGCTTTCCCTCATC	412
ATCAATTCAGTGGGGCCAGTGGGAGTACCCCGCCACCTTGTCGCAAGCTTTCCCTCATC	413
ATCAATTCAGTGGGGCCAGTGAGAATACCCCGCCACCTTGTCGCAAGCTTTCCCTCATC	412
ATCATTTTCAGTGGGGCCAGAGAGAATACCCCGCCACCTTGTCGCAAGCTTTCCCTCATC	415

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

TTTTAGGTTCGAAGCAGCAGCAGAAGCGATATCGCGTGCACTCAGCCAACAGATCGCTAAC	472
TTTTAGGTTCGAAGCAGCAGCAGAAGCGATATCGCGTGCACTCAGCCAACAGATCGCTAAC	472
TTTTAGGTTCGAAGCAGCAGCAGAAGCGATATCGCGTGCACTCAGCCAACAGATCGCTAAC	473
TATTAGGTTCGAAGCAGCAGCAGAAGAAATATCGCGTGCACTCAGCCAACAGATCGCTAAC	472
-CTTGGGTTCGAAGCAGCAGCAGAAGAAATATCGCGTGCACTTGGCCAACAGATCGCTAAC	474

** ***** *

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCT 532
CTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCT 532
CTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCT 533
CTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCT 532
CTACCGTCTACAGGAAGCCGCTGAACTCGGCAAGGGTTCCCTTCAAGTATGCCTGGGTTCT 534

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCCCTCTGGAAGTT 592
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCCCTCTGGAAGTT 592
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCCCTCTGGAAGTT 593
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGTT 592
TGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCTCTCTGGAAGTT 594

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CGAGACTCCCAAGTACCAGGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAA 652
CGAGACTCCCAAGTACCAGGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAA 652
CGAGACTCCCAAGTACCAGGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAA 653
CGAGACTCCCAAGTACCAAGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAA 652
CGAGACTCCCAAGTACCAGGTCACCGTCATTGATGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCATCAA 654

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGTAC 712
GAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGTAC 712
GAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGTAC 713
GAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGTAC 712
GAACATGATTACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCTATTCTCATCATCGCCGCCGGTAC 714

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG 772
TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG-CCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG 771
TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG-CCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG 772
TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG-CCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG 771
TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG-CCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCG 773

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CTTTCACACCTCGGTGTCAAGCAGCTCATTGTGCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAG 832
CTTTCAC-CCTCGGTGTCAAGCAGCTCATTGTGCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAG 830
CTTTCAC-CCTCGGTGTCAAGCAGCTCATTGTGCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAG 831
CCTTCAC-CCTCGGTGTCAAGCAGCTCATTGTTGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAG 830
CTTTCAC-CCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCCCATCAACAAGATGGACACCACCAAG- 831

* *****

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

TGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAGCTTCATCAAGAAGGTT 892
TGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAGCTTCATCAAGAAGGTT 890
TGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAGCTTCATCAAGAAGGTT 891
TGGTCCGAGGCCCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAGCTTCATCAAGAAGGTT 890
TGGTCCGAGGCTCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAACCTTCATCAAGAAGGTC 891

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGCGACAACATG 952
GGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGCGACAACATG 950
GGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGCGACAACATG 951
GGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGCGACAACATG 950
GGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCGTCCCCATCT--GTTTCAACGGCGACAACATG 948

BbaI_101_EF CTTGAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGC 1012
JS_28_EF CTTGAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGC 1010
JS_13A_EF CTTGAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGC 1011
PK_EF CTTGAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACTAAGGCTGGC 1010
KR_7 CTGGAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGC 1008

BbaI_101_EF AAGTCTACTGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCT 1072
JS_28_EF AAGTCTACTGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCT 1070
JS_13A_EF AAGTCTACTGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCT 1071
PK_EF AAGTCTACTGGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGACGCCATTGAGCCCCCAAGCGTCCT 1070
KR_7 AAGTCCACTGGCAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATTGAGGCCCAAGCGTCCC 1068

BbaI_101_EF ACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATCGGAACG 1132
JS_28_EF ACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATCGGAACG 1130
JS_13A_EF ACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATCGGAACG 1131
PK_EF ACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATCGGAACG 1130
KR_7 ACCGACAAGCCTCTCCGTCTTCCCCTCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATCGGAACG 1128

BbaI_101_EF GTGCCCGTCGGTCGTGTTGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGCATGGTCGTACACCTTTGCT 1192
JS_28_EF GTGCCCGTCGGTCGTGTTGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGCATGGTCGTACACCTTTGCT 1190
JS_13A_EF GTGCCCGTCGGTCGTGTTGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGCATGGTCGTACACCTTTGCT 1191
PK_EF GTGCCCGTCGGTCGTGTTGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGCATGGTCGTACACCTTTGCT 1190
KR_7 GTGCCCGTCGGTCGTGTTGAGACTGGTATCATCAAGCCCGGCATGGTCGTACACCTTTGCT 1188

BbaI_101_EF CCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAG 1252
JS_28_EF CCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAG 1250
JS_13A_EF CCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAG 1251
PK_EF CCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAG 1250
KR_7 CCCGCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAG 1248

BbaI_101_EF GGTGTTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGT 1312
JS_28_EF GGTGTTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGT 1310
JS_13A_EF GGTGTTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGT 1311
PK_EF GGTGTTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGT 1310
KR_7 GGTGTTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTGAAGAACGTTTCCGTCAAGGAAATCCGT 1308

BbaI_101_EF CGTGGCAACGTCGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAATGGCGCTGCTTCCTTCAAC 1372
JS_28_EF CGTGGCAACGTCGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAATGGCGCTGCTTCCTTCAAC 1370
JS_13A_EF CGTGGCAACGTCGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAATGGCGCTGCTTCCTTCAAC 1371
PK_EF CGTGGTAACGTCGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAATGGCGCTGCTTCCTTCAAC 1370
KR_7 CGTGGTAACGTCGCTGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAATGGCGCTGCTTCCTTCAAC 1368

BbaI_101_EF GCCCAGGTCAATTGTCATCAACCACCCTGGCCAGATCGGTGCCGGCTACGCTCCCGTTCTT 1432
JS_28_EF GCCCAGGTCAATTGTCATCAACCACCCTGGCCAGATCGGTGCCGGCTACGCTCCCGTTCTT 1430
JS_13A_EF GCCCAGGTCAATTGTCATCAACCACCCTGGCCAGATCGGTGCCGGCTACGCTCCCGTTCTT 1431
PK_EF GCCCAGGTCAATTGTCATCAACCACCCTGGCCAGATCGGTGCCGGCTACGCTCCCGTTCTT 1430
KR_7 GCCCAGGTCAATTGTCATCAACCACCCTGGCCAGATCGGTGCCGGTTACGCTCCCGTTCTT 1428

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GACTGCCACACTGCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGC
GACTGCCACACTGCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGC
GACTGCCACACTGCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGC
GACTGCCACACTGCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGC
GACTGCCACACTGCCACATTGCTTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGC

1492
1490
1491
1490
1488

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

CGTACCGGTAAGTCGGTTGAGAACAACCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCCGCCATC
CGTACCGGTAAGTCGGTTGAGAACAACCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCCGCCATC
CGTACCGGTAAGTCGGTTGAGAACAACCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCCGCCATC
CGTACCGGTAAGTCGGTTGAGAACAACCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCCGCCATC
CGTACCGGTAAGTCGGTTGAGAACAACCCCAAGTTCATCAAGTCTGGTGACTCCGCCATT

1552
1550
1551
1550
1548

BbaI_101_EF
JS_28_EF
JS_13A_EF
PK_EF
KR_7

GTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGA
GTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGA
GTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGA
GTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGA
GTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGA

1587
1585
1586
1585
1583
