



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

A cluster of mushrooms with smooth, orange-brown caps and thick, white stems grows on a mossy forest floor. The mushrooms are surrounded by green ferns and evergreen branches, with dry leaves scattered in the background.



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.
Ing. Lucie Křížová, Ing. Eva Jozová, Ph.D.

České Budějovice, 2019

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta

**Metodika byla vypracovaná jako výstup projektu NAZV QK1920412
“Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů
proti václavkám“**

**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.
Ing. Lucie Křížová
Ing. Eva Jozová, Ph.D.**

České Budějovice, listopad 2019

Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub

Vladislav Čurn a kol.

vcurn@seznam.cz

Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích

www.zf.jcu.cz

<http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1920412 "Mykoviry jako součást potenciálních biopreparátů v ochraně smrkových porostů proti václavkám".

Posudek metodiky zpracovala:

Ing. Vlasta Knorová

MZE, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů

Těšnov 65/17

110 00 Praha

vlasta.knorova@mze.cz

Ing. Miloň Dvořák, Ph.D.

Ústav ochrany lesů a myslivosti

LDF Mendelova univerzita

Zemědělská 3

613 00 Brno

milon.dvorak@mendelu.cz

Text: ©2019 Čurn V., Tonka T.

Foto: ©2019 Tonka T., Šimáčková K.

Grafická úprava: ©2019 Tonka T.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7394-781-1

ISBN 978-80-7394-781-1



Obsah

I. Cíl metodiky	4
II. Vlastní popis metodiky	5
1. Úvod	5
2. Metodika izolace DNA	6
Materiál používaný pro izolaci DNA	6
Metody izolace DNA hub	6
Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)	6
Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)	7
Izolace DNA s použitím NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel)	8
Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)	9
Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)	11
Izolace DNA pomocí CTAB a současného přidání PVPP	11
Izolace DNA s použitím SDS	12
Porovnání jednotlivých metod izolace DNA.....	13
3. Metodika analýzy DNA markerů.....	15
SSR (single sequence repeat), mikrosatelity.....	15
PCR -RFLP analýza ITS.....	17
PCR-RFLP analýza rDNA.....	20
AFLP (amplified fragment length polymorphism).....	23
AFLP (amplified fragment length polymorphism) dle Suazo et al. (1999).....	26
AFLP (amplified fragment length polymorphism) dle Muro et al. (2003).....	27
PCR a sekvenční analýza ITS regionu u václavek.....	30
PCR a sekvenční analýza tefa regionu u václavek r. Armillaria	32
4. Metodika elektroforézy DNA.....	34
Elektroforéza v agarózovém gelu.....	34
Elektroforéza v SYNERGELu.....	36
Detekce DNA pomocí SYBR GREEN.....	37
Separace fragmentů DNA na „čipové“ elektroforéze.....	38
5. Sekvenční analýza DNA.....	39
Purifikace PCR produktu.....	40
III. Srovnání novosti postupů.....	42
IV. Popis uplatnění metodiky.....	44
V. Ekonomické aspekty	45
VI. Seznam použité literatury.....	46
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	50

I. Cíl metodiky

Pro hodnocení jednotlivých izolátů/kmenů hub (entomopatogenních hub ze skupiny Deuteromycetes a hub rodu *Armillaria* ze skupiny Basidiomycetes) jsou používány různé metody. Samotná biologická či „klasická“ morfologická charakteristika již ale v současné době neposkytuje dostatečně přesné určení jednotlivých druhů. Již v průběhu 90. let 20. století byla v rámci taxonomických a populačně-genetických studií u hub věnována pozornost kombinaci tradiční morfologické klasifikace a nových molekulárních metod analýzy polymorfismu DNA (Hillis 1987; Hillis et al. 1990; Bridge a Arora 1998).

Jedna z významných oblastí aplikace molekulárních metod byla směřována do identifikace kmenů entomopatogenních hub využívaných v programech biologické ochrany rostlin. Metody založené na použití metody PCR byly u entomopatogenních hub využity např. u rodu *Verticillium* (Nazar et al. 1991; Typas et al. 1992; Roberts et al. 1995; Mor et al. 1996), rodu *Paecilomyces* resp. *Isaria* (Tigano-Milani et al. 1995a, 1995b; Oborník a Landa 1997) i u dalších zástupců skupiny Deuteromycota, např. *Beauveria* (Couteaudier et al. 1998a; Driver a Milner 1998), *Metarhizium* (Driver a Milner 1998; Bidochka et al. 2001), *Trichoderma* (Mills et al. 1998; Abbasi et al. 1999) a *Gliocladium* (Lexová et al. 1998; Bielíková et al. 2002).

V témže období se začaly molekulární markery využívat i v populační genetice hub pro účely studia populací fytopatogenních druhů (Brown 1996) či pro sledování genetické struktury populací hub v přírodních ekosystémech (McDonald 1997; Couteaudier et al. 1998b; Xu 2006).

U václavek rodu *Armillaria* byly molekulární přístupy k identifikaci jednotlivých kmenů či druhů využity např. v pracích Schulze et al. (1997), Smith-White et al. (2002), Lochman et al. (2004) nebo Holuša et al. (2018). Molekulární metody jsou používány i pro studium genetické struktury populací václavek (Prospero et al. 2010; Tsykun et al. 2017), studium fylogeneze (Kim et al. 2006) a evoluce této skupiny (Anderson et al. 2018).

Vypracování postupů pro aplikaci molekulárních technik pro popis a charakterizaci kmenů hub je významné i z pohledu polyfaktoriálního hodnocení sbírkových kmenů – toto polyfaktoriální hodnocení kmenů využívá standardní systém „*in vitro*“ testů, „*in vivo*“ biotestů v kombinaci s kmenově specifickým profilem DNA markerů.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Klasické a doposud standardní metody popisu a identifikace kmenů a izolátů hub jsou založeny zejména na mikroskopickém hodnocení jejich morfologických charakteristik. Využívány jsou i jejich biologické charakteristiky a v některých případech i biochemické markery, např. spektrum mastných kyselin (Stahl a Klug 1996). Závažným nedostatkem tohoto přístupu je omezená možnost popisu, charakterizace a identifikace kmenů a izolátů na druhové a poddruhové úrovni.

Mezi spolehlivé nástroje pro identifikaci genotypů/kmenů či izolátů, které mohou být rutinně aplikovány na velký počet vzorků patří molekulární markery. Molekulární přístup má také svá úskalí, nicméně převažují značné výhody a tento přístup umožňuje vypracování postupů pro identifikaci genotypů, hodnocení genetické struktury populací hub nebo jejich stabilitu. Moderní postupy a přístupy zahrnují využití metod molekulární biologie a jsou založeny na analýze isoenzymů, proteinů a DNA. Obrovský rozvoj metod, založených na PCR, která byla poprvé použita v roce 1984 (Saiki et al. 1985, 1988), vedl k vývoji celé řady technik a metodických postupů, využívaných i pro popis a identifikaci genotypů hub. Metody využívající molekulární a biochemické markery se tak staly účinným nástrojem stanovování genetické variability, který umožňuje charakterizaci jednotlivých genotypů (Görg et al. 1992; Araujo 2014; Araujo a Sampaio-Maia 2018).

Předkládaná metodika zahrnuje metody a postupy pro izolaci DNA, analýzu různých typů molekulárních markerů (analýzu založenou na amplifikaci specifických částí genomu), metody a postupy pro elektroforetickou separaci a vizualizaci molekulárních markerů a hodnocení výsledků molekulární analýzy.

2. Metodika izolace DNA

Materiál používaný pro izolaci DNA

- biomasa z povrchových kultur na živném agaru
- biomasa ze submerzní kultury
- konidie získané ze sporulující kultury
- čerstvé nebo v silikagelu vysušené rhizomorfy

Kultivace hub probíhá podle standardních protokolů. DNA izolujeme dle příslušného protokolu z čerstvého materiálu nebo z materiálu zamraženého (po odebrání materiál zamrazíme a uchováváme v -80°C).

Metody izolace DNA hub

DNA izolujeme ze všech výše uvedených typů materiálu, a to jak z materiálu čerstvého, tak i zamraženého nebo lyofilizovaného. Výťažnost, čistota a použití takto získané DNA jsou shrnuty na konci této kapitoly.

DNA je možno izolovat mikroextrakčními metodami (komerčně dostupnými kity) nebo pomocí standardních metod izolace DNA (získání většího množství DNA). Metody izolace DNA pomocí kitů jsou založeny na principu purifikace DNA pomocí mikrokolonek – na první kolonce dochází k zachycení proteinů, polysacharidů, detergentu a dalších nečistot, na druhé kolonce dochází k zachycení DNA a jejímu následnému vymytí elučním roztokem.

Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

Analýzovaný vzorek můžeme rozdrtit v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík, rozdrtíme vzorek kovovými kuličkami v homogenizátoru (např. BeadBeater, BioSpec Products, Inc., USA) přímo v mikrocentrifugační zkumavce. Maximální množství biomasy, které můžeme k homogenizaci použít je 100 mg.

1. K homogenizovanému vzorku přidáme 400 µl pufru AP1 předehřátého na 65°C a 4 µl RNázy A (20 mg/ml). Důkladně protřepeme na vortexu. Směs inkubujeme 10 min. při 65°C, během inkubace mikrocentrifugační zkumavku 2–3x převrátíme.
2. Přidáme 130 µl pufru AP2, promícháme a inkubujeme 5 min. na ledu.
3. Lyzát přeneseme do QIAshredder kolonek a centrifugujeme 2 min. při 8000 rpm. Při pipetování lyzátu do kolonek je nutné odstříhnout špičku pipety. Přes filtr projde do sběrné nádoby i malá část mrtvých buněčných pletiv a sraženin, kde vytvoří pelet.
4. Supernatant přeneseme do nových mikrocentrifugačních zkumavek. Většinou získáme 450 µl supernatantu. Je-li ho méně, přepočteme množství roztoků přidávaných v dalších krocích.

5. Přidáme 0,5 dílu pufru AP3 a 1 díl etanolu (96–100%) a promícháme pomocí pipety. Př.: 450 µl supernatantu + 225 µl pufru AP3 + 450 µl etanolu.
6. 650 µl směsi z kroku 5 (včetně sraženin) přeneseme do DNeasy kolonek, centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
7. Opakujeme krok 6 se zbývajícím vzorkem, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky.
8. DNeasy kolonky umístíme do nových centrifugačních zkumavek, přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm a odstraníme přefiltrovanou frakci.
9. Přidáme 500 µl pufru AW do DNeasy kolonky, centrifugujeme 2 min. při maximálních otáčkách až do vysušení membrány v kolonce, odstraníme přefiltrovanou frakci i centrifugační zkumavky. DNeasy kolonky vyndáme opatrně z centrifugačních zkumavek, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku etanolem obsaženým ve filtrátu.
10. DNeasy kolonky přeneseme do 1,5 ml (2 ml) mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 100 µl pufru AE (zahřátého na 65°C) přímo na membrány kolonek a centrifugujeme 1 min. při ≥ 8000 rpm. Eluci můžeme zopakovat (do nové mikrocentrifugační zkumavky).

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

Izolace DNA s použitím Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme cca 60 mg biomasy. Homogenát přeneseme do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 400 µl Lysis Buffer P a 20 µl proteinázy K. Vortexujeme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace 2 – 3krát promícháme. Připravíme si Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube.
2. Vzorky přeneseme na Spin Filter. Centrifugujeme 10 min. při 12000 rpm. Pokud je to nutné přidáme 40 µl Rnázy A (10 mg/ml), vortexujeme a necháme 5 min. inkubovat při pokojové teplotě.
3. Přidáme 200 µl Binding Buffer P a vortexujeme.
4. Umístíme nové Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube, přeneseme vzorky a 1 min. inkubujeme. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
6. Přidáme 550 µl Wash Buffer I a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
7. Přidáme 550 µl Wash Buffer II a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a Spin Filter umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok

opakujeme. Nakonec centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.

8. Spin Filter umístíme do nových 1,5 ml Receiver Tube a přidáme 50 – 100 µl Elution Buffer D předehřátého na 65°C. Inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50 µl Elution Buffer D předehřátého na 65°C a inkubujeme 3 min. při pokojové teplotě. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. Postup opakujeme znovu s dalšími 50 µl Elution Buffer D, ale do nové 1,5 ml Receiver Tube. Vznikne nám tak 50 µl 1. a 2. eluátu.

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

Izolace DNA s použitím NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel)

1. V mikrocentrifugační zkumavce zhomogenizujeme cca 100 mg biomasy. Přidáme 150 mg písku a 200 µl buffer PL1, zhomogenizujeme a zvortexujeme. Přidáme 100 µl buffer PL1 a 10 µl RNázy A (10 mg/ml) a pokračujeme v homogenizaci.
2. Přidáme 100 µl chloroformu, vortexujeme 10 s a centrifugujeme 5 min. při 12000 rpm.
3. Do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi a inkubujeme 10 min. při 65°C.
4. Umístíme nové NucleoSpin Filter (fialové) do nové 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube, přeneseme vzorky a centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm.
5. Odstraníme filtr a přidáme 450 µl Binding Buffer PC, min. 5x propipetujeme.
6. Umístíme NucleoSpin Plant II Column (zelená barva) do nové 2,0 ml NucleoSpin Collecting Tube a přeneseme vzorky. Centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm (maximální kapacita je 700 µl, pro větší objem opakujeme krok). Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube.
7. Přidáme 400 µl Wash Buffer PW1 a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml NucleoSpin Collection Tube.
8. Přidáme 700 µl Wash Buffer PW2 a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Odstraníme filtrát a filtr umístíme zpět do 2,0 ml Receiver Tube.
9. Přidáme 200 µl Wash Buffer PW2 a centrifugujeme 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.
10. NucleoSpin Plant II Column umístíme do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidáme 50 µl Buffer PE předehřátého na 70°C. Inkubujeme 5

min. při 70°C a centrifugujeme 1 min. při 12000 rpm. Opakujeme tento krok do stejné mikrozkušavky.

Pokud chceme vytvořit 1. a 2. eluát přidáme 50 µl Buffer PE předehřátého na 70°C a inkubujeme 5 min. při 70°C. Centrifugujeme 1 min. při 10000 rpm. Postup opakujeme znovu s dalšími 50 µl Buffer PE, ale do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Vznikne nám tak 50 µl 1. a 2. eluátu.

Chemikálie:

- roztoky a kolony jsou součástí kitu
- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led

Přístroje:

- centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostat, analytické váhy

Izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992)

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA pro účely standardizace metod, pro účely AFLP analýzy a metodu PCR s následným sekvenováním.

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (Murray a Thompson 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z komplexu membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou DNA.

1. Připravíme si roztok 2x CTAB a 1% 2-merkptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 µl roztoku. Připravený roztok CTAB s merkptoetanolom dáme předehřát na 65°C.
2. Analyzovaný vzorek můžeme homogenizovat v tekutém dusíku. Pokud nepoužíváme tekutý dusík do sterilních 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek dáme vzorek (cca 100 mg), ze kterého chceme izolovat DNA. Pro lepší drcení pletiva přidáme sterilní křemičitý písek.
3. Ke každému vzorku přidáme 500 µl předehřátého pufru CTAB s merkptoetanolom, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
4. Přidáme 500 µl směsi fenol–chloroform–IAA (IAA - izoamylalkohol, Isopentylalkohol, 3-metyl-1-butanol, 3-metyl–butan-1-ol), 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 500 µl směsi chloroform:IAA, 10 min. protřepáváme. Centrifugujeme 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.

6. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek přepipetujeme vodnou fázi. Přidáme 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 µl). 2–3x lehce promícháme. Dáme na 30 min. do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 5 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant. Pelet usušíme (max. 3 hodiny při laboratorní teplotě).
7. Přidáme 300 µl 1x TE a necháme 30–60 min. inkubovat při 37°C.
8. Přidáme 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 600 µl ledového (z mrazáku) 96% ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).
9. Vzorky vyndáme z mrazáku a 10 min. centrifugujeme maximální rychlostí při 4°C. DNA vytvoří pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant (opatrně pipetou). Necháme dobře usušit (max. 3 hodiny při laboratorní teplotě).
10. Přidáme 400 µl ledového 70% ethanolu. 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při teplotě 4°C. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant. Vzorky necháme dobře usušit (cca 10 min.).
11. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní vody.

Pro dokonalé přečištění můžeme zopakovat postup od bodu 5. Přidáme 1 µl Rnázy A a necháme 30 min. inkubovat ve 37°C.

Chemikálie:

- kapalný dusík
- ethanol (čistý, 96% ethanol nedenaturovaný)
- šupinkový led
- 2x CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 50 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkaptoetanol = 2-sulfanylethan-1-ol)
- 2-merkaptoethanol
- fenol–chloroform–IAA (25 : 24 : 1)
- chloroform–IAA (24 : 1)
- 1x TE pufr sterilní
- 3 M octan sodný
- isopropanol
- 70% ethanol
- Rnáza A 2 mg/ml

Přístroje:

- stolní centrifuga, sada automatických pipet, homogenizátory, vortex, třepací vodní lázeň nebo třepací dry-blok, termostát, analytické váhy, pH metr, mrazák, digestoř

Izolace DNA pomocí CTAB–PVP (polyvinylpyrrolidon)

Jedná se o modifikaci předchozí metody s použitím CTAB. Přidání PVP (polyvinylpyrrolidon) odstraňuje kontaminanty a umožňuje získání čisté a kvalitnější DNA. Vzorek, ze kterého izolujeme DNA, se homogenizuje v roztoku CTAB – PVP. V kroku 4 se nepřidává směs fenolu a chloroformu s IAA, ale přidává se pouze směs chloroformu s IAA (24:1), 10 minut se protřepává a centrifuguje se 5 min při 14 000 ot. Poté se přidá 1/5 objemu 5% CTAB a směs se promíchá, opět se přidá 500 µl směsi chloroform–IAA a 10 min. se protřepává. Centrifuguje se 5 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě.

V 8. kroku se přidá pouze 600 µl ledového (z mrazáku) 96% ethanolu. 2–3x lehce promícháme. Vzorky dáme do mrazáku (-20°C) minimálně na 20 min., maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).

Další kroky jsou stejné jako při izolaci metodou CTAB.

Chemikálie:

- 2x PVP–CTAB extrakční pufr (2% CTAB, 100 mM Tris–HCl, pH=8,0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 1% 2-merkaptioetanol, 1% PVP–40000)
- 5% CTAB
- chloroform–IAA (24 : 1)

Izolace DNA pomocí CTAB a současného přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)

Další modifikací izolace DNA pomocí CTAB je přidání PVPP (polyvinylpolypyrrolidonu) do CTAB pufru při homogenizaci vzorku. Ke každému vzorku přidáme 500 µl předehřátého CTAB pufru s merkaptioetanol a 50 mg PVPP, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufr. Necháme 45 min. inkubovat při 65°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.

Další kroky izolace jsou stejné, jako v předchozích případech.

Chemikálie:

- PVPP (polyvinylpolypyrrolidon)

Izolace DNA s použitím SDS

Poslední modifikací této metody je izolace DNA pomocí lyzačního pufru s SDS.

1. Připravíme si roztok lyzačního pufru a 1% 2-merkaptoethanolu, na jeden vzorek počítáme 500 μ l roztoku.
2. Ke každému vzorku přidáme 500 μ l lyzačního pufru s merkaptoethanolem, pletivo rozdrtíme a promícháme s pufrem. Přidáme 50 μ l 10% SDS, zhomogenizujeme a necháme 60 min. inkubovat při 37°C. Během inkubace každých cca 15 min. lehce promícháme.
3. Přidáme 75 μ l 5M NaCl a promícháme. Přidáme 60 μ l 10% CTAB a 1 μ l 1% PVP, promícháme a necháme 30 min. inkubovat při 65°C
4. Po centrifugaci 14000 rpm 10 min. se převede supernatant (500 μ l) do nových 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek a přidá se 500 μ l chloroformu s IAA, směs se 10 min. promíchává a následně centrifuguje 5 min. při 14000 rpm.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek odpipetujeme vodnou fázi. Přidáme 5 μ l RNázy A (10 mg/ml) a necháme 30 min. inkubovat při 37°C.
6. Přidáme 0,6 objemu isopropanolu a 2–3x lehce promícháme. Dáme na 20 min. (až na noc) do mrazáku (-20°C). Centrifugujeme 10 min. při 4°C maximální rychlostí. DNA by se měla zachytit na dně mikrocentrifugační zkumavky. Odstraníme supernatant.
7. Přidáme 1 ml ledového 70% ethanolu, 2 – 3x lehce promícháme. Centrifugujeme 2 min. maximální rychlostí při pokojové teplotě. Okamžitě odstraníme všechnu supernatant, pro odstranění viditelných nečistot opakujeme tento krok 2x. Vzorky necháme dobře vysušit (max. 3 hodiny při laboratorní teplotě).
8. Podle množství peletu (DNA) přidáme 20–200 μ l 1x sterilní vodu (rozpustit 40 min. při 37°C).

Chemikálie:

- kapalný dusík
- lyzační pufr (50 mM Tris–HCl, 150mM NaCl, 100 mM EDTA)
- 10% SDS
- 5M NaCl
- 10% CTAB (w/v, v 0,7 M NaCl)
- 1% PVP (PVP-40 – Sigma, mol w 40000)

Porovnání jednotlivých metod izolace DNA

Vzhledem k tomu, že techniky analýzy DNA markerů mají být rutinně používány v běžné praxi pro identifikaci a charakterizaci nejenom sbírkových kmenů hub, ale i vzorků hub u kterých je nutná přesná a rychlá identifikace ze stádií životního cyklu předcházejícím tvorbu plodnic (např. rhizomorf v případě václavků a jiných stopkovýtrusých saprofytních a parazitických hub), je nutné, aby byla k tomuto účelu používána taková metoda extrakce DNA, která bude optimalizována pro toto uplatnění. Za optimální je považována taková metoda, která bude na straně jedné prakticky a ekonomicky nenáročná a na straně druhé bude poskytovat dostatečný výtěžek čisté DNA, použitelné k dalším analýzám. Takto vybraná „kompromisní“ a optimalizovaná metoda pak umožní extrahovat co největší počet vzorků za jednotku času (např. denně) při uspokojivé vysoké kvalitě DNA a za současné ekonomické únosnosti.

V tabulce 1 jsou porovnány sledované charakteristiky při hledání optimální metody izolace DNA.

Tab. 1: Porovnání metod izolace DNA.

Metoda	Cena [Kč]	Doba izolace [h]	Počet vzorků na den**	Pracnost ***	Práce s fenolem	Výtěžek roztoku DNA [μl]	Koncentrace roztoku DNA [ug/ml]	Výtěžek DNA [ng]
CTAB	10	8 (2dny)*	2 x 24	4	ano	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+PVP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 200	100-400	2-40
CTAB+PVPP	11	8 (2dny)*	2 x 24	4	ne	10 - 200	100-400	2-40
SDS	12	8	2 x 24	3	ne	10 - 200	100-400	2-40
INVITEK	72	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-10	0,05-0,2
QIAGEN	120	1,5-2	4 x 24	1	ne	100	5-20	0,05-0,2
MN	71	1,5-2	4 x 24	2	ne	100	5-10	0,05-0,2

* osm hodin, ale rozloženo do dvou dnů

** standardní laboratoř, 1 pracovní linka, 1 centrifuga s rotorem pro 24 mikrocentrifugačních zkušavek

*** 1 – nejméně náročné, 5 – nejvíce náročný postup

Bylo testováno sedm metod extrakce DNA: čtyři klasické metody izolace DNA – izolace DNA pomocí CTAB (Williams et al. 1992) a pomocí CTAB s přidáním PVP nebo PVPP, pomocí CTAB a SDS (Tigano-Milani et al. 1995b) a tři metody, při nichž byl používán komerčně dodávaný kit pro izolaci rostlinné DNA - Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK), DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) a NucleoSpin Plant II (MACHEREY-NAGEL).

Jako nejvhodnější metoda izolace DNA byla vybrána metoda CTAB–PVP metoda. Je sice pracnější než rychlé „kitové“ metody, je ale výrazně méně finančně náročná a u této metody lze modifikovat jednotlivé kroky, je dosahována vyšší výtěžnosti a čistoty DNA, které jsou nezbytné k dalším molekulárním analýzám. Všechny tři metody izolace založené na použití CTAB (metoda CTAB, metoda

CTAB-PVP a metoda CTAB-PVPP) mají stejné parametry při základním porovnání (pracnost, množství izolované DNA). Odlišnost je zejména v kvalitě a čistotě DNA a spolehlivosti izolace. Tyto dva poslední parametry se projevily u náročnějších technik, jako jsou AFLP markery nebo izolace DNA z rhizomorf a syrocií václavěk. U méně náročných technik (analýzy ITS, mikrosatelity) jsou tyto techniky srovnatelné a poskytují stejné výsledky.

3. Metodika analýzy DNA markerů

SSR (single sequence repeat), mikrosatelity

Za mikrosatelity se považují tandemově uspořádaná krátká opakování DNA s délkou motivu 2–4 párů bazí (Morgante and Olivieri, 1993). Di-, tri- nebo tetranukleotidová opakování jsou uspořádána v tandemech po 5 – 50 ti kopiích.

DNA fingerprinting založený na SSR markerech použili pro identifikaci kmenů hub např. Enkerli et al. (2001), Rehner a Buckley (2003), Schwarzenbach et al. (2007), Gauthier et al. (2007), Dara et al. (2008), Castrillo et al. (2008) nebo Tsykun et al. (2017).

Pro SSR analýzu byly pro účely předkládané metodiky použity primerové páry Ba01, Ba02, Ba03, Ba05, Ba06, Ba08, Ba12, Ba13, Bb1F4, Bb8D6, Bb6A8, Bb2F8, Bb10D4, Bb2A3, Bb5F4, Bb4H9, Bb8C11, Bb13A5 - sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 2 (Rehner a Buckley 2003; Enkerli et al. 2001).

Tab. 2: Sekvence primerů používaných pro SSR analýzu u hub.

Primer	Sekvence '5—3'	Teplota nasedání
Ba01	5'–CCAACCCAATCAATCGTCAT – 3' 5'– GAGAGGCGGAGCTAAGCA– 3'	54°C
Ba02	5'– AACGCTATGCCTTGACGAC– 3' 5'–GACGCCGAGCAATGTAACA – 3'	54°C
Ba03	5'–GCATAGATATGTCTCGCACC – 3' 5'–ACTACCCTGTCCCGCTGA – 3'	54°C
Ba05	5'–AGGCAATACCGAGGTTGGC – 3' 5'– ATCCATGGCGAGCCGTCC – 3'	58°C
Ba06	5'– GCGATTGACGAAAAGCTAGA– 3' 5'– ACTTGCTTTGCTGTTGCACA– 3'	54°C
Ba08	5'– TGTTGCCGACACGAATTGT – 3' 5'–GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA – 3'	56°C
Ba12	5'–GGGTCCATCATGTACGGC – 3' 5'–AGGCGTATACAGGTCGTG – 3'	56°C
Ba13	5'–CAGGCAACAACACGATTTCA – 3' 5'–ATGCCATCTACGACTTTATGA – 3'	56°C
Bb1F4	5'–GATCCTTCGTCACCTGCTC– 3' 5'–CGGTGTTGGAGAGCTATTGT– 3'	58°C
Bb8D6	5'–TTTGTCCGAAGTTGTCTCAGT– 3' 5'–TGCATTGTGAAAGGTAATGC– 3'	58°C
Bb6A8	5'–GATGATGCGACCTCTTGGAC– 3' 5'–TGCGACAGATTCCGGAGAGTA– 3'	56°C

Bb2F8	5'–GCACACTTTTCGCTGTGTCAT– 3' 5'–ATGATGTCTGCCACGTCTGA– 3'	58°C
Bb10D4	5'–TCTCCATTCCATATATCCAAGC– 3' 5'–ACGCTGTTGCCGTAGTAGTC– 3'	58°C
Bb2A3	5'–CACTTCAGTTATCATGCTCGAA– 3' 5'–ATCTGGCACGTCAAGTGTCT– 3'	58°C
Bb5F4	5'–CTCGATCACTTTTCCATCAA– 3' 5'–TGGTTGGGTCATGTTAGTCA– 3'	56°C
Bb4H9	5'–CTGCTCAGTGCTCATTGCTC– 3' 5'–ACAGCTCGGCATTGATGATT– 3'	54°C
Bb8C11	5'–TTGAATGGCCATGAGTTCTG– 3' 5'–TGCTATGGTATGGATGGGCT– 3'	58°C
Bb13A5	5'–CGACTTTGCGTGGAAGTATG– 3' 5'–GGTTAGCAAATGGCCCTCTA– 3'	58°C

Protokol SSR analýzy vychází z metodiky Williams et al. (1990) upravené na pracovišti Biotechnologického centra ZF JU Novákovou et al. (2008).

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer F
- 0,5 µl primer R
- 10,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- počáteční denaturace 45 s 95°C
- 33 cyklů: 40 s 94°C
40 s 54–58°C, dle příslušného primeru
30 s 72°C
- konečná elongace 5 min 72°C
- stop – 4°C

PCR produkty se rozdělují na 2% agarózovém gelu nebo na 3% Synergelu v 0,5x TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Profily se zaznamenávají pomocí systému Ingenius3 (Syngene, USA).

Profily SSR markerů se vyhodnocují pomocí specializovaného software (BioProfil 1D+, Vilber Lourmat; GelManager for Windows, BioSystematica; UltraQuant) a primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- PPP Master Mix
- templátová DNA
- primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák

PCR-RFLP analýza ITS

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci ITS regionu a štěpení amplifikovaného produktu. Volbou primerů je možno amplifikovat úsek ITS1, ITS2 nebo celý region zahrnující ITS1+ITS2 a 5,8S rDNA. ITS představují nekódující úsek mezi geny pro rRNA a oproti kodujícím sekvencím jsou více variabilní. Jejich délkového a sekvenčního polymorfismu se využívá při analýze pomocí metody PCR-RFLP a analýza ITS může poskytnout data pro konstrukci fylogenetických stromů, data pro identifikaci hub a hodnocení homogenity souboru kmenů.

Metoda se skládá ze dvou částí:

I. Amplifikace specifického fragmentu z ITS regionu.

II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restričních endonukleáz.

I. Protokol ITS-RFLP analýzy byl modifikován z metodik práce Gardes a Bruns (1996) a Endrychová (2004). Pro účely PCR-RFLP analýzy byly použity univerzální primery ITS1 a ITS4, resp. ITS1F a ITS4: a ITS5 a ITS4

Tab. 3: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci ITS regionu.

Primer	Sekvence '5—3'
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG
ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

White et al (1990)

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA (Obr. 1.).

Obr. 1. PCR analýza ITS genu 4-5 za použití specifických primerů. Fragment o velikosti 550-600 bp amplifikován u izolátů Bba (*Beauveria bassiana*).

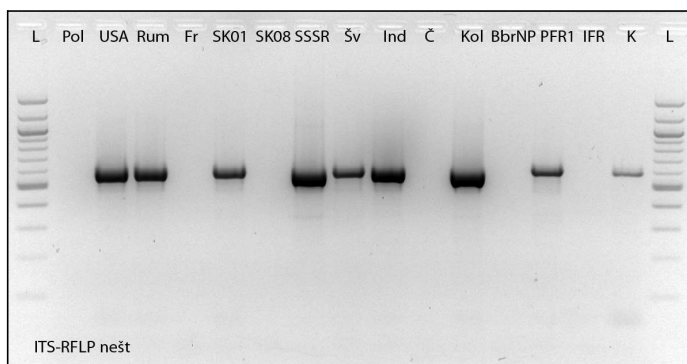


Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 μ l PPP master mixu
- 1 μ l DNA
- 0,5 μ l primer ITS5 nebo ITS1 nebo ITS1F
- 0,5 μ l primer ITS4
- 10,5 μ l dH₂O (voda do objemu 25 μ l)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár ITS1F a ITS4:

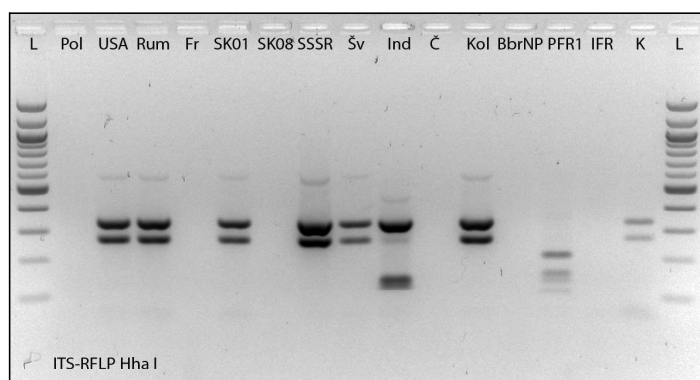
- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 5 min | 95°C |
| • 35 cyklů: | 1 min | 95°C |
| | 45 s | 50°C |
| | 2 min | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

Pro primerový pár ITS1 a ITS4, ITS5 a ITS4:

- | | | |
|-----------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 2 min | 94°C |
| • 10 cyklů (-1°C/1 cyklus): | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 66°C |
| | 1 min | 72°C |
| • 25 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 56°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

II. Po ukončení PCR reakce se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu (Obr. 2). K této části PCR reakce je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1 μ l je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu. Štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz (*AluI*, *HaeI*, *MboI*, *HinfI* a *HhaI*).

Obr. 2. ITS-RFLP analýza genu 4-5 u izolátů Bba (*B. bassiana*) za použití restriktázy *HhaI*.



Příprava reakce pro restriční analýzu:

- 15 μ l PCR reakční směsi
- 2 μ l 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s restriční endonukleázou)
- 0,5-1 μ l restriční endonukleázy ($\approx$ 5 U)
- $\pm$ 1 μ l 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)
- voda do celkového objemu 20 μ l

Štěpení probíhá při teplotě 37°C po dobu 6 - 7 hodin v termocykleru. Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Kvalitnějšího rozdělení je dosaženo na 3 % Synergelu nebo 10 % PAGE v TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Na gel je nanášeno 10 μ l neštěpených produktů a celý objem (20 μ l) štěpených fragmentů. Fingerpriny se zaznamenávají pomocí systému Ingenius3 (Syngene, USA). Fingerpriny se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

pro PCR analýzu

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl₂ nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

pro RFLP analýzu

- PCR reakce
- restrikční endonukleáza
- pufr pro restrikční endonukleázu
- 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, termostát

PCR-RFLP analýza rDNA

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci části genů pro rRNA – rRNA, která je součástí velké (LSU) a malé (SSU) podjednotky ribozómu. Volbou primerů je možno amplifikovat různé domény genů pro rRNA. Jejich sekvenčního polymorfismu se využívá při analýze pomocí metody PCR-RFLP a ta může poskytnout data pro konstrukci fylogenetických stromů, data pro identifikaci hub a hodnocení homogenity souboru kmenů. (White et al. 1990; Rehner a Buckley 2003).

Metoda se skládá ze dvou částí:

I. Amplifikace specifického fragmentu rDNA.

II. Štěpení příslušného fragmentu pomocí specifických restrikčních endonukleáz.

I. Protokol PCR-RFLP analýzy byl modifikován z metodiky práce Gardes a Bruns (1996). Pro účely PCR-RFLP analýzy byly použity primery NL1 a NL4, LS1 a LS5, NS1 - NS8:

Tab. 4: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci LSU a SSU.

Primer	Sekvence '5—3'
NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

Oborník et al. (2001)

Primer	Sekvence '5—3'
LS1	AGTACCCGCTGAACTTAAG
LS5	CCTGAGGGAACTTCG

Hausner et al. (1993)

Primer	Sekvence '5—3'
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA

White et al. (1990)

PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakční pufru (75 mM Tris–HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pM primeru (Qiagen), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 12,5 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer NL1 / LS1 / NS1 / NS3 / NS5 / NS7
- 0,5 µl primer NL4 / LS5 / NS2 / NS4 / NS6 / NS8
- 10,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár NL1 a NL4:

- počáteční denaturace 5 min 94°C
- 25 cyklů: 1 min 94°C
45 s 50°C
1,25 min 72°C
- konečná elongace 5 min 72°C
- stop – 4°C

Pro primerový pár NL1 a NL4:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 30 cyklů: 1 min 94°C
1 min 55°C
1 min 72°C
- konečná elongace 10 min 72°C
- stop – 4°C

Pro primerové páry NS:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 3 min. | 95°C |
| • 40 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 40 s | 50°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 7 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

II. Po ukončení PCR se část objemu reakční směsi použije pro RFLP analýzu. K této části PCR reakce je přidán pufr pro příslušnou restriční endonukleázu, 5 U restričního enzymu, BSA (zlepšuje provedení restričního štěpení, množství je nutno optimalizovat dle restriktázy a použitého RE pufru, 1 μ l je vhodný u restriktáz NEB) a probíhá štěpení amplifikovaného fragmentu. Štěpení amplifikovaných fragmentů DNA je možno provádět pomocí různých restričních endonukleáz (*Mbol*, *Hinf*l a *Eco*RI).

Příprava reakce pro restriční analýzu:

- 15 μ l PCR reakční směsi
- 2 μ l 10x RE reaction buffer (pufr dodávaný společně s restriční endonukleázou)
- 0,5-1 μ l restriční endonukleázy ($\approx$ 5 U)
- $\pm$ 1 μ l 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)
- voda do celkového objemu 20 μ l

Štěpení probíhá při teplotě 37°C po dobu 6 hodin v termocykleru. Produkty (naštěpené fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru. Kvalitnějšího rozdělení je dosaženo na 2 % Synergelu nebo 10 % PAGE v TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Na gel je nanášeno 10 μ l neštěpených produktů a celý objem (20 μ l) štěpených fragmentů. Fingerpriny se zaznamenávají pomocí systému Ingenius3 (Syngene, USA). Fingerpriny se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

pro PCR analýzu

- DNA polymeráza, dNTP's, 10x pufr, MgCl₂ nebo PPP Master Mix
- templátová DNA
- specifické primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

pro RFLP analýzu

- PCR reakce
- restrikční endonukleáza
- pufr pro restrikční endonukleázu
- 0,02 % BSA (bovine serum albumin, Sigma)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, termostát

AFLP (amplified fragment length polymorphism)

Technika AFLP kombinuje principy technik RFLP a PCR (Vos et al., 1995). Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restrikčními endonukleázami. Na vzniklou směs restrikčních fragmentů se ligují adaptory o známé sekvenci a provádí se preselektivní amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalším selektivním nukleotidem na 3'– konci. Selektivní amplifikace se pak provádí s primery se třemi selektivními nukleotidy (v případě rostlin resp. objektů s velkým genomem). U AFLP dochází ke kombinaci specifčnosti restrikčního štěpení se snadností PCR. Polymorfismus se pak zjišťuje na základě přítomnosti/nepřítomnosti a velikosti amplifikovaných fragmentů po separaci na PAGE nebo na genetickém analyzátoru (sekvenátoru).

Oproti metodám RFPL a RAPD má technika AFLP řadu výhod, mezi nejdůležitější patří generování velkého množství dominantních markerů pokrývajících celý genom. Kromě využití při identifikaci genotypů je cílena zejména pro účely mapování významných kvalitativních a kvantitativních znaků. Tato metoda nachází uplatnění také při studiu biodiverzity, přípravě markerů a genetickém mapování (Ballvora et al., 1995; Boucias et al., 2000a;2000b; Suwannakut et al., 2005).

Restrikce genomické DNA a ligace adaptorů (restrikčně ligační krok):

Restrikce (50 µl celkový objem):

40 µl vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U *EcoRI*, 5 U *MseI*

Na 1 vzorek: 4 µl H₂O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl *EcoRI* = 5 U, 0,5 µl *MseI* = 5 U (10 µl restrikčního master mixu se přidá ke 40 µl templátu DNA, promíchá se a štěpí se 16 h při 37°C)

Ligace (60 µl celkový objem):

50 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol *EcoRI* 3' adaptor, 5 pmol *EcoRI* 5' adaptor, 50 pmol *MseI* 3' adaptor, 50 pmol *MseI* 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza

Na 1 vzorek: 1 μ l 10x RL pufru, 0,1 μ l EcoRI–3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 μ l EcoRI–5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 μ l Mse–3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 μ l Mse–5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 μ l 10 mM ATP, 1 μ l (1 U) T4 Ligase, 6,2 μ l vody
(10 μ l ligačního master mixu se přidá k 50 μ l restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37°C)

R/L směs se po ukončení ligace naředí 10x T0.1E puftrem (540 μ l T0.1E pufru + 60 μ l R/L směsi)

Pre-selektivní amplifikace (+1/+1) PCR

Preselektivní amplifikace (50 μ l celkový objem):

5 μ l vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 75 ng EcoRI–A primeru, 75 ng MseI–A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 5 μ l vzorku, 5 μ l PCR pufru, 2 μ l 50 mM MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTP's, 0,15 μ l EcoRI–A primeru (500 ng/ μ l), 0,15 μ l MseI–A primeru (500 ng/ μ l), 0,2 μ l Taq (5 U/ μ l), 36,5 μ l vody
(45 μ l PCR master mixu se přidá k 5 μ l vzorku)

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 2 min. | 94°C |
| • 30 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 60°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 9 min | 72°C |
| • stop | – | 4°C |

Po ukončení preselektivní amplifikace se 40 μ l reakční směsi 20 x naředí (860 μ l TE + 40 μ l templátu).

10 μ l nenaředěného PCR produktu se použije na elektroforézu (1,2% agarozový gel v 1x TBE/TAE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 0 – 400 bp.

Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR

Selektivní amplifikace (10 μ l celkový objem):

2,5 μ l vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 5 ng EcoRI–ANN–FAM primeru, 30 ng MseI–ANN primeru, 0,5 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 2,5 μ l vzorku, 1 μ l PCR pufru, 0,2 μ l 10 mM dNTP's, 0,087 μ l EcoRI–ANN–FAM primeru (10000 pmol), 0,095 μ l MseI–ANN primeru (316 ng/ μ l), 0,1 μ l Taq (5 U/ μ l), 6,018 μ l vody

(7,5 μ l PCR master mixu se přidá k 2,5 μ l vzorku)

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 65°C (-1°C/cyklus)
 - 1 min 72°C
- 25 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 56°C
 - 1 min 72°C
- konečná elongace 15 min 72°C
- stop – 4°C

Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

Vzorky jsou připraveny do 96 jamkových destiček (Applied Biosystems):

11 µl formamidu, 0,4 µl 400 HD Rox Size Standard (Applied Biosystems),
1,0 µl vzorku (po selektivní amplifikaci)

Vzorky se důkladně promíchají, musí být bez bublinek a jsou v cyklu denaturovány – 4 min. při 95°C. Ihned (!) po ukončení denaturace jsou položeny na nejméně 2 min. do chladicího bloku temperovaného na -20°C. Po té je provedena fragmentační analýza (ABI – Hitachi 3500 sekvenátor) dle manuálu k sekvenátoru.

Chemikálie:

- 10x RL pufr (10 ml zásobní roztok): 0,121g Tris–acetate do 8 ml H₂O (100 mM); upravit pH na 7,5 pomocí led. kys. octové; přidat 0,214 g MgAc (octan hořečnatý) (100 mM); 0,491g KAc (octan draselný) (500 mM); 0,077g Dithiothreitol (DTT) (50 mM)
- ATP (10 mM, 100 µl alikvoty, uchovávat v -80°C): 0,06 g ATP do 8 ml H₂O; upravit pH na 7,0 pomocí 0,1N NaOH; doplnit do 10 ml
- T0.1E pufr: 5 ml 1 M Tris pH=7,5 (8,0), 100 µl 0,5 M EDTA, doplnit vodou do 500 ml
- Hi-Di formamid (Applied Biosystems)
- 400 HD Rox Size Standard nebo 500 Liz Size Standard (Applied Biosystems)
- templátová DNA
- restrikční enzymy (*Mse*I, *Eco*RI – NEB)
- *Mse* a *Eco* adaptory, *Mse* a *Eco* preselektivní primery, *Eco* fluorescenčně značené selektivní primery, *Mse* selektivní primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, mrazicí destička, genetický analyzátor

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – modifikace dle Suazo a Hall (1999)

Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí jednou restriční endonukleázou. Na vzniklou populaci restričních fragmentů se ligují adaptory o známe sekvenci a provádí se amplifikace. Primery pro tento amplifikační krok jsou komplementární k adaptorům s dalšími třemi selektivními nukleotidy na 3'–konci.

Tab. 5: Sekvence adaptorů a primerů používaných pro ligaci a amplifikaci.

Primer	Sekvence '5—3'
EcoRI adaptor U	CTCGTAGACTGCGTACC
EcoRI adaptor L	AATTGGTACGCAGTCTAC
AAA primer	GACTGCGTACCAATTCAA
Atd.	

(Suazo a Hall, 1999)

Na rozdíl od nemodifikované metody AFLP je její výhodou použití jednoho primeru a méně kroků při analýze. Po restrikci genomické DNA a ligaci adaptorů (na 20 µl celkový objem na jeden vzorek potřebujeme 8 µl H₂O, 2 µl 10x R/L pufru, 2 µl *EcoRI* = 20 U, 1 µl *EcoRI* adaptor, 1 µl T4 ligáza = 1U, 1 µl ATP, 5 µl DNA). Štěpení a ligace probíhá 8 h při 37°C.

Po restrikci následuje hned selektivní amplifikace, kdy na vzorek o celkovém objemu 25 µl potřebujeme 1 µl vzorku, 2,5 µl PCR pufru, 2 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP's, 2 µl primeru, 1 µl Taq (5 U/µl), 15,5 µl vody.

Teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 65°C (-1°C/cyklus)
 - 1 min 72°C
- 25 cyklů:
 - 30 s 94°C
 - 30 s 56°C
 - 1 min 72°C
- konečná elongace 15 min 72°C
- stop – 4°C

Produkty (amplifikované fragmenty) se rozdělují na 2 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru nebo 10 % PAGE v TBE pufru. Jako marker se používá 100 bp DNA ladder (NEB) a DNA fragmenty se vizualizují barvením pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Fingerpriny se zaznamenávají pomocí systému Ingenius3 (Syngene, USA). Fingerpriny se následně vyhodnocují pomocí specializovaného software a získaná primární data se dále statisticky zpracovávají.

Chemikálie:

- 10x RL pufr (10 ml zásobní roztok): 0,121g Tris–acetate do 8 ml H₂O (100 mM); upravit pH na 7,5 pomocí led. kys. octové; přidat 0,214 g MgAc (octan hořečnatý) (100 mM); 0,491g KAc (octan draselný) (500 mM); 0,077g Dithiothreitol (DTT) (50 mM)
- ATP (10 mM, 100 µl alikvoty, uchovávat v -80°C): 0,06 g ATP do 8 ml H₂O; upravit pH na 7,0 pomocí 0,1N NaOH; doplnit do 10 ml
- templátová DNA
- restrikční enzymy (*EcoRI* – NEB)
- *EcoRI* adaptory, *EcoRI* primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)
- MgCl₂
- T4 ligáza, Taq polymeráza

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, mrazicí destička

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – modifikace dle Muro et al. (2003)

Vysokomolekulární genomická DNA (nebo v případě cDNA–AFLP získaná cDNA) se štěpí současně dvěma restrikčními endonukleázami. Oproti protokolu dle Vos et al. (1995) je použita kombinace jiných restrikčních endonukleáz – *EcoRI* a *HpaII*.

Tab. 6: Sekvence adaptorů a primerů používaných pro ligaci a amplifikaci.

	Primer	Sekvence '5—3'
Ligace	EcoRI-adaptors	CTC GTA GAC TGC GTA CC
		CAT CTG ACG CAT GGT TAA
	HpaII-adaptors	GAC GAT GAG TCC TGA G
		TG CTA CTC AGG ACT C GC
Pre-amp	EcoRI-ad1	CTC GTA GAC TGC GTA CC
	HpaII-ad1	GAC GAT GAG TCC TGA G
Sel-amp	EcoRI-GC	GAC TGC GTA CCA ATT CGC
	EcoRI-AT	GAC TGC GTA CCA ATT CAT
	HpaII-CTC	GAT GAG TCC TGA GCG CCT C
	HpaII-ACC	GAT GAG TCC TGA GCG CACC

(Muro et al., 2003)

Jedná se o další modifikaci základní AFLP reakce. Po restrikci ve 40 μ l celkového objemu na jeden vzorek (20 μ l H₂O, 4 μ l 10x R/L pufru, 0,25 μ l *Eco*RI = 5 U, 0,5 μ l *Hpa*II = 5 U, (štěpení probíhá se 1 h při 37°C) následuje ligace v objemu 50 μ l, kdy 40 μ l restrikční směsi smícháme s 1 μ l 10x RL pufru, 0,1 μ l *Eco*RI–3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 μ l *Eco*RI–5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 μ l *Hpa*II–3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 μ l *Hpa*II–5' adaptoru = 50 pmol, 1 μ l 10 mM ATP, 1 μ l (1 U) T4 Ligase, 6,4 μ l vody a inkubujeme 3 h při 37°C.

Následuje preselektivní amplifikace. Na 1 vzorek budeme potřebovat 1 μ l vzorku R/L, 2 μ l PCR pufru, 0,5 μ l 50 mM MgCl₂, 5 μ l 10 mM dNTP's, 1 μ l *Eco*RI–ad1 primeru (500 ng/ μ l), 1 μ l *Hpa*II–ad1 primeru (500 ng/ μ l), 0,2 μ l Taq (5 U/ μ l), 9,3 μ l vody.

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 5 min. 94°C
- 31 cyklů:

30 s	94°C
1 min	56°C
1,5 min	72°C
- konečná elongace 5 min 72°C
- stop – 4°C

Dalším krokem této modifikace je selektivní amplifikace, kdy smícháme 5 μ l vzorku, 2 μ l PCR pufru, 0,4 μ l 10 mM dNTP's, 0,087 μ l *Eco*RI–NN–FAM primeru (10000 pmol), 0,1 μ l *Hpa*II–NN primeru (300 ng/ μ l), 0,1 μ l Taq (5 U/ μ l), 6,018 μ l vody.

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- počáteční denaturace 2 min. 94°C
- 10 cyklů:

30 s	94°C
30 s	65°C (-1°C/cyklus)
1 min	72°C
- 25 cyklů:

30 s	94°C
30 s	56°C
1 min	72°C
- konečná elongace 15 min 72°C
- stop – 4°C

Posledním krokem je fragmentační analýza v sekvenátoru. Vzorky jsou připraveny do 96 jamkových destiček (Applied Biosystems) smícháním 11 μ l formamidu, 0,4 μ l 400 HD Rox Size Standard (Applied Biosystems) a 1 μ l vzorku (po selektivní amplifikaci)

Vzorky se důkladně promíchají, musí být bez bublinek a jsou v cykleru denaturovány – 4 min. při 95°C. Ihned (!) po ukončení denaturace jsou položeny na nejméně 2 min. do cold bloku vychlazeného na -20°C, po té je provedena fragmentační analýza (ABI – automatický genetický analyzátor ABI Hitachi 3500 – sekvenátor) dle manuálu k sekvenátoru.

Chemikálie:

- 10x RL pufr (10 ml zásobní roztok): 0,121g Tris–acetate do 8 ml H₂O (100 mM); upravit pH na 7,5 pomocí led. kys. octové; přidat 0,214 g MgAc (octan hořečnatý) (100 mM); 0,491g KAc (octan draselný) (500 mM); 0,077g Dithiothreitol (DTT) (50 mM)
- ATP (10 mM, 100 µl alikvoty, uchovávat v -80°C): 0,06 g ATP do 8 ml H₂O; upravit pH na 7,0 pomocí 0,1N NaOH; doplnit do 10 ml
- T0.1E pufr: 5 ml 1 M Tris pH=7,5 (8,0), 100 µl 0,5 M EDTA, doplnit vodou do 500 ml
- Hi-Di formamid (Applied Biosystems)
- 400 HD Rox Size Standard nebo 500 Liz Size Standard (Applied Biosystems)
- templátová DNA
- restrikční enzymy (*Mse*I, *Eco*RI – NEB)
- *Mse* a *Eco* adaptory, *Mse* a *Eco* preselektivní primery, *Eco* fluorescenčně značené selektivní primery, *Mse* selektivní primery
- dH₂O (PCR dH₂O, nebo Millipore dH₂O)

Přístroje:

- PCR thermocykler, centrifuga, sada automatických pipet, mrazák, mrazicí destička, genetický analyzátor

PCR a sekvenační analýza ITS regionu u václavek r. *Armillaria*

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci ITS regionu při použití primerů specifických pro rod *Armillaria*. Nejprve proběhne PCR reakce za přítomnosti ITS primerů a následně je tento produkt reamplifikován pomocí specifických AR primerů (Lochman et al. 2004). Tyto primery umožňují amplifikovat specificky fragmenty těchto hub i ze směsných vzorků. Po PCR analýze jsou amplifikované fragmenty purifikovány a sekvenovány. Na základě sekvenační analýzy je pak možné identifikovat jednotlivé druhy václavek, které nelze na gelu po PCR rozlišit (Obr. 3.). Analýza ITS může poskytnout data pro konstrukci fylogenetických stromů, data pro identifikaci hub a hodnocení homogenity souboru kmenů.

Tab. 7: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci ITS regionu.

Primer	Sekvence '5—3'
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA

Lochman et al. (2004)

PCR reakce s ITS1 a ITS4 primery (viz tab. 3) probíhá v objemu 20 µl, v 1x reakčním pufru PPP Master Mix (Top-Bio, CZ), 12,5 pM primeru (IDT), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

- 10 µl PPP master mixu
- 1 µl DNA
- 0,5 µl primer ITS1
- 0,5 µl primer ITS4
- 8 µl dH₂O (voda do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

Pro primerový pár ITS1 a ITS4:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 5 min | 95°C |
| • 40 cyklů: | 40 s | 95°C |
| | 30 s | 57°C |
| | 40 s | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • chlazení | — | 4°C |

Reamplifikace s AR1 a AR2 primery probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru PPP Master Mix (Top-Bio, CZ), 12,5 pM primeru (IDT), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng PCR templátu s PCR reakce s ITS primery.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

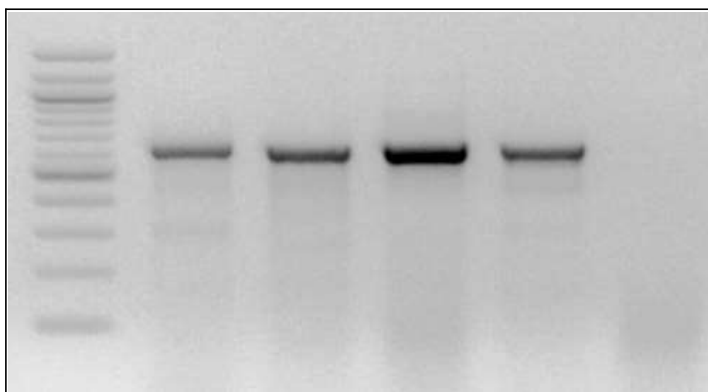
- 12,5 µl PPP master mixu
- 2,5 µl PCR templátu
- 0,75 µl primer AR1
- 0,75 µl primer AR2
- 8,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- | | | |
|------------------------|----------|------|
| • počáteční denaturace | 2:30 min | 94°C |
| • 35 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 40 s | 60°C |
| | 30 s | 72°C |
| • konečná elongace | 7 min | 72°C |
| • chlazení | – | 4°C |

PCR produkty jsou separovány na 2% agarózovém gelu v 1xTBE pufru a úspěšně amplifikované fragmenty jsou sekvenovány.

Obr. 3. Amplifikované úseky oblasti ohraničené AR primery (cca 700 bp). Slot č. 1 velikostní marker, sloty č. 2 – 5 pozitivní vzorky po amplifikaci, slot č. 6 kontrola.



PCR a sekvenační analýza tefa regionu u václavek r. *Armillaria*

Tato metoda je založena na specifické amplifikaci oblasti eukaryotického translačního elongačního faktoru 1-alfa – eEF1A (tefa). Tento faktor je kódován genem *EEF1A* který kóduje protein, podílející se na elongačních procesech na ribozómech v buňkách eukaryotických organismů. Konzervovaná sekvence aminokyselin tvořící protein umožňuje použití tohoto molekulárního markeru v taxonomické determinaci na druhové úrovni (Kausarud a Schumacher 2001). Po PCR analýze jsou amplifikované fragmenty purifikovány a sekvenovány. Na základě sekvenační analýzy je pak možné identifikovat jednotlivé druhy václavek a získaná data sekevenováním lze použít i pro konstrukci fylogenetických stromů, pro identifikaci hub a hodnocení homogenity souboru kmenů.

Tab. 8: Sekvence primerů používaných pro amplifikaci tefa regionu.

Primer	Sekvence '5—3'
EF595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG
EF1160R	CCGATCTTGTTAGACGTCCTG

Kausarud a Schumacher (2001)

PCR reakce s EF primery probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru PPP Master Mix (Top-Bio, CZ), 12,5 pM primeru (IDT), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ) a 50 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

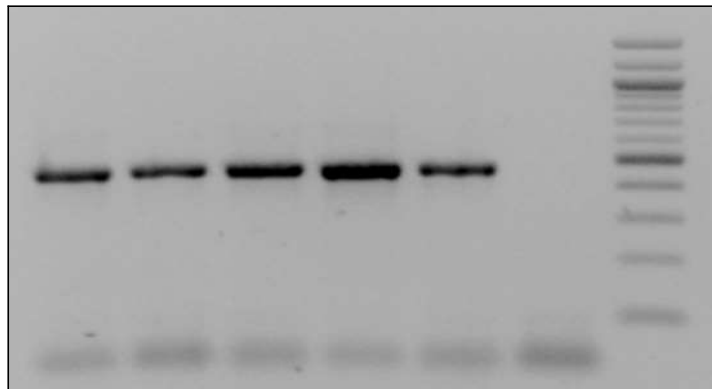
- 12,5 µl PPP master mixu
- 2,5 µl PCR templátu
- 0,75 µl primer EF595F
- 0,75 µl primer EF1160R
- 8,5 µl dH₂O (voda do objemu 25 µl)

Amplifikace probíhá na Bioer XP Cycler při následujícím teplotním profilu:

- | | | |
|------------------------|--------|------|
| • počáteční denaturace | 4 min | 94°C |
| • 35 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 35 s | 55°C |
| | 40 s | 72°C |
| • konečná elongace | 10 min | 72°C |
| • chlazení | – | 4°C |

PCR produkty jsou separovány na 2% agarózovém gelu v 1xTBE pufru pomocí vyhodnocovacího zařízení, jehož součástí je kamerový systém, UV transiluminátor a vyhodnocovací software. Pomocí tohoto programového vybavení je možné pomocí velikostního markeru a pozitivní kontroly potvrdit (stanovit) velikost PCR produktu.

Obr. 4. Amplikony tefa o délce 511 bp. Slot 1 – 5 pozitivní vzorky DNA, slot č. 6 kontrola, slot č. 7 velikostní marker.



4. Metodika elektroforézy DNA

Klasickou metodou, univerzálně používanou k rozdělení makromolekul, je elektroforéza. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA je kyselina, obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se pohybují fragmenty DNA od záporné elektrody směrem ke kladné. K dělení fragmentů DNA se užívá nejčastěji agarózový gel uložený horizontálně. Fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a vytvoří proužek. DNA je na gelu vizualizována pomocí specifického barvení ethidiumbromidem (EtBr). Tato látka patří mezi interkalační barviva. Váže se dovnitř dvoušroubovice a po ozáření ultrafialovým světlem (UV) oranžově fluoreskuje. Vzhledem k tomu, že ethidium bromid je karcinogen, gely jsou po vyfotografování skladovány ve zvláštní odpadní nádobě.

Elektroforéza v agarózovém gelu

Příprava gelu:

1. Agaróza se smíchá s vodou a pufrům v příslušném poměru v širokohrdlé Erlenmayerově baňce a rozvaří se v mikrovlnné troubě (2+1 min. na max výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozváření je nutné s Erlenmayerovou baňkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy je třeba zchladit na cca 55°C, přidá se odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promíchá a nalije se do připravené vaničky; nalévací vanička musí být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy. Agarózu je nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny je zapotřebí eliminovat.
3. Po naliť agarózy je se do vaničky umístí hřebínek a gel se nechá 30–60 min. ztuhnout.
4. Ztuhlý gel je umístěn do elektroforetické vany a pod hladinu pufru jsou do jamek vkládány vzorky.

Nanášení vzorků:

Vana elektroforetické jednotky se naplní dostatečným množstvím pracovního roztoku 1x koncentrovaného pufru (2 mm nad úroveň gelu). K celému objemu PCR reakce (25 µl) se přidá 4 µl nanášecího pufru (LB), promíchá se špičkou a nanese pod hladinu elektroforetického pufru do jamek. Alternativně je možné nanést vzorky na gel a poté opatrně vložit gel i se vzorky pod hladinu elektroforetického pufru.

Nanášecí pufr – LB:

- 0,25% bromfenolové modři, 40% (w/v) glycerolu nebo sacharózy ve vodě
- 0,025 g bromfenolové modři, 4 g sacharózy – rozmíchat do 10 ml vody, pufr se rozpipetuje do mikrocentrifugačních zkumavek a uchovává v lednici

Roztok ethidium bromidu – EtBr:

- 10 mg ethidium bromidu se rozpustí v 1 ml destilované vody (pracovat s rouškou v digestoři)

Marker – DNA ladder:

- 100 bp DNA ladder (NEB) – 1 µl markeru, 10 µl vody, 2 µl LB se promíchá a nanese na gel

Podmínky separace:

- 23 V po dobu 30 min. a poté 90 V po dobu 2,5 hod

Vizualizace DNA:

- gel je položen na UV transiluminátor a pod UV světlem je zaznamenáno/vyfotografováno spektrum markerů

Příprava gelu a pufrů:

Tab. 9a: Složení 1,5% agarózového gelu v TAE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 50x TAE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TAE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,75	49	1	5
100	1,5	98	2	8
150	2,25	147	3	8-10
200	3	196	4	12-13

Tab. 9b: Složení 1,5% agarózového gelu v TBE pufru.

Elektroforéza 1,5% agarózový gel [pufr 5x TBE]				
objem gelu [ml]	množ. agarózy [g]	množ. vody [ml]	množ. pufru TBE [ml]	množ. Et. Br. V [µl]
50	0,75	40	10	5
100	1,5	80	20	8
150	2,25	120	30	8-10
200	3	160	40	12-13

Tab. 10: Příprava pracovních roztoků TAE a TBE pufrů.

1x pufr TAE/TBE na 100 ml		
koncentrace pufru	množ. vody	množ. pufru
50x	98	2
10x	90	10
5x	80	20

Tab. 11: Složení zásobních roztoků TAE a TBE pufrů

	50x TAE	5x TBE
Tris (Trizma)	242 g	54
0,5 M EDTA	100 ml	20 ml
led. kys. octová	57,1 ml	-
kys. boritá	-	27,5
dH ₂ O	voda do 1 L	voda do 1 L

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- zásobní roztok TAE/TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Elektroforéza v SYNERGELu

Synergel je přípravek, který po smíchání s agarózou vytváří gel a výrazně zvyšuje separační možnosti agarózového gelu. Separované fragmenty DNA vytváří ostré pruhy, dobře rozdělené. Je používán zejména pro separaci a detekci malých fragmentů. Oproti PAGE gelu je zachována jednoduchost přípravy a provedení gelu a jeho netoxičnost. Výpočet množství synergelu, které přidáváme k agaróze – koncentraci synergelu vypočítáme na základě následujícího vzorce:

$$\text{conc}_{\text{Synergel}} = (A - 0,7) / 2$$

kde A je koncentrace agarózového gelu bez přídavku synergelu, který chceme převést na synergel/agarózový gel

0,7 – je hodnota koncentrace základního agarózového gelu

např. v případě, kdy standardní 3% agarózový gel nahražíme gelem s přídavkem synergelu je složení gelu následující:

A = 3%

množství synergelu ve směsi: $(3-0,7) / 2 = 1,15\%$

1,15% synergelu přidáme k 0,7% agarózy, tj. pro přípravu 250 ml roztoku použijeme 2,875 g synergelu a 1,75 g agarózy

Postup přípravy Synergel/agarózového gelu:

- Navážíme daná množství agarózy a synergelu.
- Přidáme takové množství 100% ethanolu, aby došlo k rozmíchání (nesmí se tvořit hrudky).
- Přidáme 250 ml 0,5x TBE pufru.
- Rozvaříme v mikrovlnné troubě.
- Přidáme 5 µl roztoku ethidium bromidu.
- Důkladně promícháme.
- Nalijeme do vany / formy na gel.
- Necháme ztuhnout – cca 1–1,5 hod.

Chemikálie:

- agaróza (v kvalitě pro elektroforézu DNA)
- Synergel (Roth)
- zásobní roztok TBE pufru
- roztok ethidium bromidu
- LB pufr
- DNA marker
- PCR reakce

Přístroje:

- mikrovlnná trouba, sada automatických pipet, jednotka horizontální elektroforézy se zdrojem

Detekce DNA pomocí SYBR GREEN

V případě použití barviva SYBR GREEN (nižší toxicita, lepší vizualizace DNA gelu, nižší pozadí) se při přípravě gelu nepoužívá ethidium bromid. Po ukončení PCR je ke vzorkům DNA přidán nanášecí pufr (LB) se SYBR GREEN. Vzorky jsou nanášeny na gel a probíhá elektroforéza. Po ukončení elektroforézy probíhá vizualizace DNA fragmentů/PCR produktů na UV transiluminátoru. V případě dokumentace gelů pomocí kamery nebo fotoaparátu je nutné použití zeleného filtru namísto červeného filtru používaného u gelů barvených ethidium bromidem !

LB se SYBR GREEN: 0,025 g Bromphenol Blue
 0,025 g Xylene Cyanol FF
 3 ml glycerol
 20 µl SYBR GREEN (koncentrovaný roztok, FLUKA)
 doplnit dH₂O do 10 ml

rozpipetovat do alikvot a skladovat v temnu při -20°C, krátkodobě lze skladovat i při +4°C

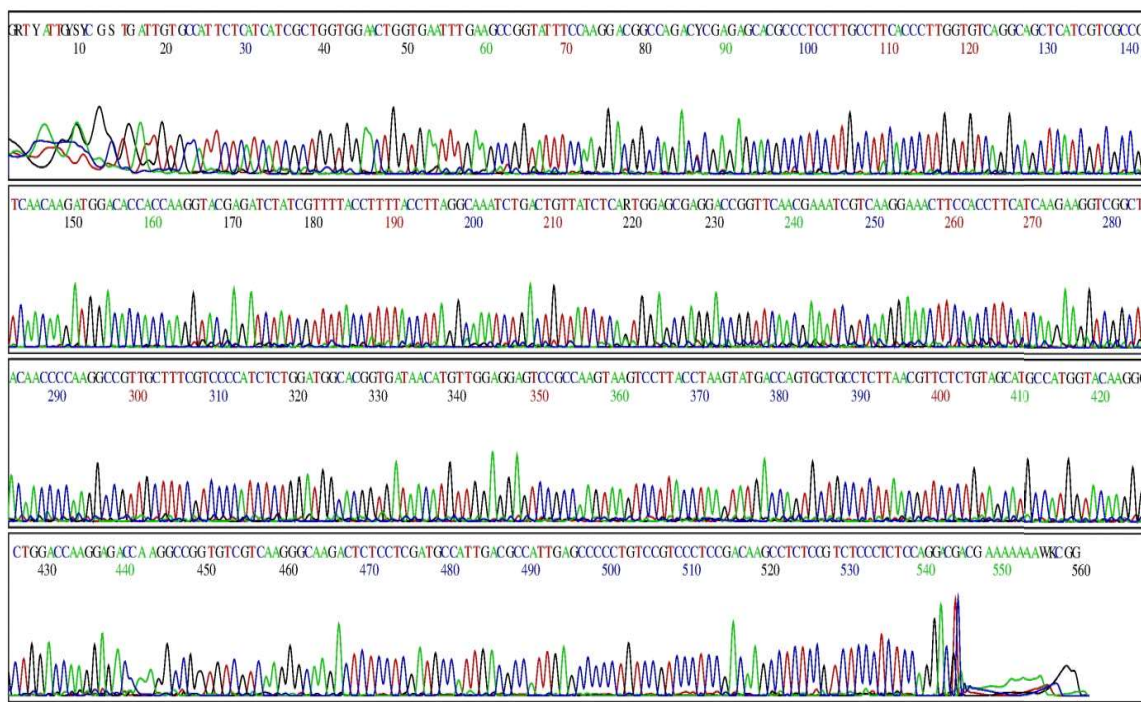
Separace fragmentů DNA na „čipové“ elektroforéze

Analýza amplifikovaných, resp. restrikčních fragmentů DNA byla provedena na systému automatické čipové elektroforesy Experion (Bio-Rad, USA), která pracuje na principu mikrofluidní technologie, kdy se celá analýza odehrává v miniaturním prostředí speciálního čipu. Vlastní separace a detekce fragmentů DNA probíhá ve speciálních čipech založených na kombinaci mikrofluidní technologie LabChip (Caliper Life Sciences) a citlivé fluorescentní detekce. Pro analýzu DNA se používá analytický kit Experion DNA 1K/12K Analysis Kit, který obsahuje DNA standard (1k nebo 12k Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barvu, centrifugační filtry a mikrofluidní čipy; každý čip pojme 11 vzorků. Příprava vzorku pro analýzu spočívá ve smíchání 1 μ l vzorku a 5 μ l vzorkového pufru. Na čipy, do kterých jsou před vlastní analýzou zavedeny gelové roztoky pomocí přístroje "priming station" (dodávaného jako součást systému), jsou vzorky aplikovány v množství 6 μ l po výše uvedené úpravě. Vlastní analýza na přístroji Experion a zpracování získaných dat je prováděno pomocí speciálního software Experion, version 2.1 (Bio-Rad, USA).

5. Sekvenační analýza DNA

V případě, kdy se amplifikované produkty neliší svojí délkou, není ověření výsledku PCR analýzy na agarózovém gelu možné (viz obr. 3 a 4). Druhou, popř. kmenovou variabilitu lze z amplifikovaných úseků DNA určit pomocí různých typů fragmentační analýzy, ale v současné době je nejjednodušší, nejrychlejší a z hlediska ekonomického nejideálnější amplifikované úseky DNA osekvenovat. Pro sekvenování amplikonů se standardně využívá Sangerova metoda. Pomocí sekvenování lze určit přesné pořadí bází v amplifikovaném úseku a také rozdílné pozice bází v sekvenci, které se liší dle druhu, popř. kmenu. Takto lze získat relevantní informace, které slouží ke genotypizaci nebo determinaci analyzovaných vzorků. PCR produkt slouží jako templát pro sekvenování, kdy je vlákno amplifikovaných produktů denaturováno a jednořetězcová DNA slouží jako templát pro syntézu komplementární sekvence. Před vlastní sekvenací se amplifikované úseky přečišťují z důvodu vyšší stability a přesnosti sekvenační analýzy. Výsledkem sekvenační reakce je určení pořadí nukleotidů v sekvenovaném úseku DNA znázorněné v podobě chromatogramu, kde každému nukleotidu je přiřazena jiná barva. Toto grafické znázornění pořadí jednotlivých bází v řetězci DNA umožňuje rychle určit kvalitu analýzy a editaci získané sekvence (Obr. 5 a 6). Po získání výsledků jsou tyto chromatogramy elektroforetogramy vyhodnocovány speciálním softwarem.

Obr. 5. Výstup ze sekvenátoru – získaná sekvence eEF1A pro *A. ostoyae*.

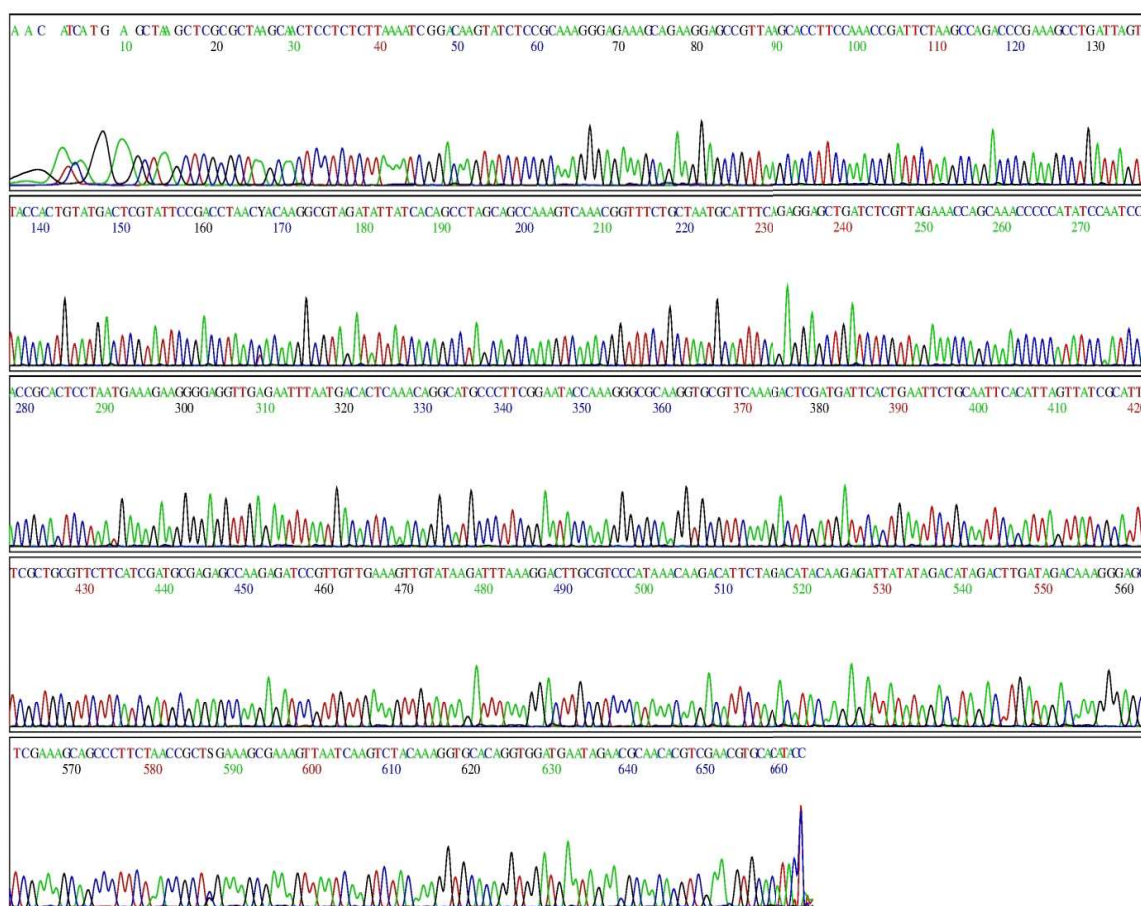


V případě analýzy václavek r. *Armillaria* se amplifikovaný produkt sekvenuje s primery specifickými k dané sekvenci (tefa, AR).

Purifikace PCR produktu

Po PCR reakci se kromě požadovaných amplikonů ve směsi nacházejí zbytky nukleotidů a primerů, které negativně ovlivňují sekvenování. Proto se PCR produkty před vlastní sekvenací purifikují pomocí kitu ExoSap-IT (USB Corp.). Kit je v zásadě tvořen směsí enzymů - exonukléazami a alkalickými fosfatázami v reakčním pufru. Tímto roztokem se ošetří konečná PCR reakce. Exonukleáza odstraňuje z produktu primery, alkalická fosfatáza zbytky nukleotidů. ExoSap se přidává přímo do PCR produktu. Na každých 5 μ l PCR reakce se přidá 2 μ l ExoSapu (např. k 25 μ l reakce přidáme 10 μ l ExoSapu). Reakci inkubujeme 30 minut při 37°C a následně reakci inaktivujeme při 80°C 15 minut. Inkubace může probíhat v termobloku, nebo v termocykleru. Pokud prodloužíme čas inkubace, výsledný produkt bude lépe přečištěný. Po ošetření PCR produktu ExoSapem je potřeba k reakci přidat opět jeden z primerů!! Na každých 10 μ l vzorku přidáme 5 μ l primeru, forward nebo reverse, podle směru, který chceme sekvenovat. Takto upravený vzorek je připraven k sekvenování.

Obr. 6. Výstup ze sekvenátoru – získaná sekvence ITS (AR) oblasti pro *A. cepistipes*.



Sekvenace přečištěného produktu probíhá v externí laboratoři (SEQme s.r.o., ČR). Purifikovaný PCR produkt se posílá v PCR mikrozkuhavce. Sekvenace Sangerovou metodou probíhá na kapilárních analyzátoch Applied BioSystems prostřednictvím BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems). Výstup ze sekvenátoru je ve formátu *ab1* (abi - chromatogram) a jako sekvenace nukleotidů ve formátu FASTA. Takto získané soubory sekvencí jednotlivých amplikonů/druhů/kmenů jsou dále zpracovány ve speciálních programech (např. MEGA X – Kumar et al. 2018, Geneious - <https://www.geneious.com>) a upravené sekvenace porovnány s on-line dostupnou databází nukleotidových sekvencí NCBI prostřednictvím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Madden 2002). Sekvenace jsou porovnávány mezi sebou na základě podobnosti (Obr. 7).

Obr. 7. Uspořádání (alignment) sekvencí několika druhů václavků r. *Armillaria*, získaných z databáze GenBank. Tečky znamenají stejné nukleotidy, barevně jsou označeny pozice bazí, které se v rámci druhů a kmenů liší. Takto se dají od sebe jednotlivé druhy/kmeny odlišit.



III. Srovnání novosti postupů

Předkládanou „Metodiku izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub“ lze hodnotit jako novou metodiku, protože v současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zahrnující optimalizované pracovní postupy pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů u entomopatogenních hub a václavek rodu *Armillaria*. Dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích, které se problematikou molekulárních markerů zabývají. Komplexní vyhodnocení vhodnosti jednotlivých postupů izolace DNA a použitelnosti jednotlivých markerů pak dostupné není. Molekulární markery představují ve srovnání s morfologickými či biochemickými markery kvalitativně nový přístup, který má na jedné straně obrovský potenciál využití, na straně druhé pak má i své limity. Pro nekontroverzní použití molekulárních markerů pro účely popisu kmenů a jejich možné identifikace je naprosto nezbytné použít vhodné postupy izolace DNA, které poskytují kvalitní DNA použitelnou pro opakovatelné a reprodukovatelné analýzy. Rovněž v oblasti vývoje a použití jednotlivých markerů dochází k vývoji a značnému posunu a každý z definovaných molekulárních markerů má svá specifika. Reálná interpretace molekulárních dat pak vyžaduje volbu vhodných a optimalizovaných postupů. Přednosti a limity jednotlivých postupů pro izolaci DNA a analýzu molekulárních markerů jsou předmětem předkládané metodiky.

IV. Popis uplatnění metodiky

„Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů u hub“ obsahuje optimalizované postupy pro izolaci DNA. V metodice je uveden nejen přehled jednotlivých metod extrakce nukleových kyselin ze vzorků hub, ale je poukázáno i na přednosti jednotlivých metod. Metody izolace DNA jsou vyhodnoceny z pohledu rychlosti a pracnosti provedení, kvantity a kvality získané DNA. Ve druhé části jsou pak představeny základní fingerprintové techniky a metody určené pro separaci a vyhodnocení molekulárních markerů.

Metodika představuje soubor optimalizovaných metod a postupů, na jejichž základě lze provádět rutinní analýzy DNA markerů pro potřeby rychlé a přesné determinace druhů/kmenů hub. Výstupem analýzy je pak spektrum markerů, které mohou být využity pro popis a identifikaci druhů, popř. jednotlivých kmenů a určení genetické struktury variabilních populací. Jednotlivé molekulární metody jsou již standardně pro tyto účely používány, mohou být ale vhodným doplňkem morfologických a biochemických metod při taxonomické determinaci druhů a rozlišení jednotlivých populací. Uživatelé metodiky jsou výzkumná a vývojová pracoviště, pracoviště kontrolních orgánů, která mohou s výhodou využít přednosti analýzy molekulárních markerů – rychlost analýzy, vysokou míru polymorfismu a nízké ovlivnění faktory vnitřního a vnějšího prostředí.

Uživatelé metodiky jsou pracoviště výzkumná a vědecká, která mohou s výhodou využít předností optimalizovaných postupů detekce genotypů různých druhů hub. Metodika bude uplatněna prostřednictvím Retorta s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

V. Ekonomické aspekty

Předpokládané ekonomické přínosy metodiky jsou kalkulovány až do výše několika tisíc Kč. Dalšími přínosy předkládané metodiky jsou rozšíření spektra technik a metodických postupů používaných v diagnostických laboratořích, rozšíření, portfolia technik a služeb prováděných v laboratoři, metodická a vzdělávací funkce.

Do nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice lze započítat pořízení nejnutnějšího investičního a neinvestičního vybavení pro provoz specializované laboratoře a provedení úkonů a postupů uváděných v metodice. V případě automatizace izolace DNA a zpracování velkého objemu vzorků je pak nutné počítat s dalšími náklady na pořízení linky pro izolaci DNA pomocí paramagnetických partikulí v objemu cca 2,5 mil Kč a automatické čipové elektroforézy nebo fragmentačního analyzátoru ve výši 1,4 mil Kč. Další náklady pak představují náklady na chemikálie a na základě dlouhodobých kalkulací činí jednotková cena za analýzu 100 vzorků se 3 molekulárními markery 2 298 tis. Kč. (ceny za chemikálie, fragmentační analýzu, sekvenování a bioinformatickou analýzu). V uvedeném příkladu kalkulace nákladů nejsou uvedeny doplňkové náklady, odpisy, náklady na vzdělávání a vyškolení personálu laboratoře, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace a vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. Analýza 100 vzorků ve specializovaných laboratořích, prováděná službou, je kalkulována na 824 tis. Kč pro stejný rámec analýzy. Ekonomický přínos činí rozdíl v ceně analýzy, který je vyjádřen úsporou 1,5 mil. Kč.

VI. Seznam použité související literatury

- Abbasi, P.A., miller, S.A., Meulia, T., Hoitink, H.A.J. and Kim, J. (1999): Precise detection and tracing of *Trichoderma hamatum* 382 in compost-amended potting mixes by using molecular markers. *Applied and environmental microbiology* 65: 5421-5426.
- Anderson J.B., Bruhn J.N., Kasimer D., Wang H., Rodrigue N., Smith M.L. (2018). Clonal evolution and genome stability in a 2500-year-old fungal individual. *Proc. R. Soc. B.* 19;285(1893):20182233.
- Araujo R. (2014). Towards the Genotyping of Fungi: Methods, Benefits and Challenges. *Current Fungal Infection Reports.* 8: 203-210.
- Araujo R., Sampaio-Maia B. (2018). Fungal Genomes and Genotyping. *Adv .Appl. Microbiol.* 102: 37-81.
- Ballvora, A., Hesselbach, J., Niewohner, J., Leister, D., Salamini, F., Gebhardt, C. (1995). Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harboring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 82-90.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J. and Amritha de Croos, J.N. (2001): Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? *Applied and environmental microbiology* 67: 1335-1342.
- Bieliková, L., Landa, Z., Osborne, L.S., Čurn, V. (2002): Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique. *Plant protection science* 38: 1-12.
- Boucias, D.G., Stokes, C., Suazo, A., Funderburk, J. (2000a): AFLP analysis of *Nomuraea rileyi* DNA. *Mycologia* 92: 638-648.
- Boucias, D.G., Tigano, M.S., Sosa-Gomez, D.R., Glare, T.R., Inglis, P.W. (2000b): Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Biological control* 19: 124-138.
- Bridge, P.D. and Arora, D.K. (1998): Interpretation of PCR methods for species definition. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. and Elander, R.P (eds.): *Applications of PCR in mycology*. CAB International, Wallingford, pp. 63-84.
- Brown J.K.M. (1996). The Choice of Molecular Marker Methods for Population Genetic Studies of Plant Pathogens. *The New Phytologist.* 133: 183-195.
- Castrillo, L.A., Ugine, T.A., Filotas, M.J., Sanderson, J.P., Vandenberg, J.D., Wraight, S.D. (2008): Molecular characterisation and comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates (*Ascomycota: Hypocreales*) associated with the greenhouse shore fly, *Scatella tenuicosta* (*Diptera: Ephydriidae*). *Biological control* 45: 154-162.
- Couteaudier Y., Viaud M., Neuveglise C., Bridge P., Clarkson J. (1998a). Combination of different independent molecular markers to understand the genetic structure of *Beauveria* populations. In: Bridge P. and Couteaudier Y. (eds): *Molecular Variability of Fungal Pathogens*. CAB International, Wallinford, pp. 95-104.

- Couteaudier, Y., Viaud, M. and Neuvéglise, C. (1998b): Combination of different independent molecular markers to understand the genetic structure of *Beauveria* populations. In: Bridge, P., Couteaudier, Y. and Clarkson, J. (eds.): Molecular variability of fungal pathogens. CAB International, Wallingford, pp. 95-104.
- Dara, S.K., McGuire, M.R., Ulloa, M., Kaya, H.K. (2008): Evaluation and molecular characterization of *Beauveria bassiana* for the control of the glassy-winged sharpshooter (Homoptera : Cicadellidae) in California. Journal of entomological science 43: 241-246.
- Driver, F. and Milner, R.J. (1998): PCR applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. In: Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. and Elander, R.P (eds.): Applications of PCR in mycology. CAB International, Wallingford, pp. 153-186.
- Endrychová, V. (2004): Využití technik molekulárních markerů na modelových skupinách hub. Dizertační práce, JU ZF České Budějovice.
- Enkerli, J., Widmer, F., Gessler, C., Keller, S. (2001): Strain-specific microsatellites markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. Mycol Res 105: 1079-1087.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1996): ITS-RFLP matching for identification of fungi. In: Clapp, J.P. (ed.): Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods, Methods in molecular biology, Vol. 50, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 177-186.
- Gauthier, N., Dalleau-Clouet, C., Fargues, J. (2007): Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. Mycologia 99: 693-704.
- Görg, R., Schachtschabel, U., Ritter, E., Salamini, F., Gebhardt, C. (1992). Discrimination among 136 tetraploid potato variety by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop Sci. 32: 815-819.
- Hausner, G., Reid, J., Klassen, G.R. (1993). On the subdivision of *Ceratocystis* s.l., based on partial ribosomal DNA sequences. Canadian J. Botany 71: 52-63.
- Hillis D.M. a Moritz C. (1990): Molecular Systematics. - Sinauer Ass., Inc., Sunderland, MA.
- Hillis, D. M. (1987): Molecular versus morphological approaches to systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 23-42.
- Holuša J., Lubojacký J., Čurn V., Tonka T., Lukášová K., Horák J. (2018): Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. Forest Ecology and Management 427: 434-445.
- Kausrud, H., Schumacher, T. (2001). Outcrossing or inbreeding: DNA markers provide evidence for type of reproductive mode in *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). Mycological Research. 105. 676-683.
- Kim M.-S., Klopfenstein N.B., Hanna J.W., McDonald G.I. (2006). Characterization of North American *Armillaria* species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers. For. Path. 36: 145-164.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, Ch., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.

- Lexová, L., Dědičová, L., Landa, Z. and Čurn, V. (1998): Evaluation of RAPD technique for identification and characterization of *Gliocladium virens* isolates. Sborník JU ZF v Českých Budějovicích, fytotechnická řada, 15: 25-39.
- Lochman J., Šerý O., Mikeš V. (2004) The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 237, Issue 1, August 2004, Pages 105–110.
- Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2002 Oct 9 [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- McDonald B. (1997). The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. *Phytopathology*. 87: 448-53.
- Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S. and Muthumeenakshi, S. (1998): Assessing diversity in *Colletotrichum* and *Trichoderma* species using molecular markers. In: Bridge, P., Couteaudier, Y. and Clarkson, J. (eds.): Molecular variability of fungal pathogens. CAB International, Wallingford, pp. 105-120.
- Mor, H., Gindin, G., Ben Ze'ev, I.S., Raccah, B., Geschtovt, N.U. and Ajtkhozina, N. (1996): Diversity among isolates of *Verticillium lecanii* as expressed by DNA polymorphism and virulence towards *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica* 24: 111–118.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Muro de, A.M., Mehta, S., Moore, D. (2003): The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters* 229: 249-257.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Nazar, R.N., Hu, X., Schmidt, J., Culham, D. and Robb, J. (1991): Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 1–11.
- Nováková, A., Šimáčková, K., Kubátová, B., Čurn, V (2008). Stability of different molecular marker systems and their suitability for cultivar identification in potato. *Potato Res.* (*submitted*).
- Oborník, M. and Landa, Z. (1997): Molecular phylogeny of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* based on RAPD analysis. - Sborník JU ZF v Českých Budějovicích, fytotechnická řada, 14: 57-62.
- Oborník, M., Jirku, M., Doležel, D. (2001): Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic? *Can.J.Microbiol.* 47: 813-819.
- Prospero S., Jung E., Tsykun T., Rigling D. (2010). Eight microsatellite markers for *Armillaria cepistipes* and their transferability to other *Armillaria* species. *European Journal of Plant Pathology*. 127: 165-170.
- Rehner, S.A., Buckley, E.P. (2003): Isolation and characterisation of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Molecular Ecology Notes* 3: 409-411.

- Roberts, D.M., Bainbridge, B.W., Evans, H.C. and Heale, J.B. (1995): Genome analysis in isolates of *Verticillium*, *V. albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. lecanii*. *Phytoparasitica* 23: 40.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Schulze S., Bahnweg G., Tesche M., Sandermann H. (1997). Identification techniques for *Armillaria* spp. and *Heterobasidion annosum* root and butt rot diseases / Methoden zur Identifizierung von *Armillaria* spp.- und *Heterobasidion annosum*-Wurzel- und Stockfäulen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*. 104: 433-451.
- Schwarzenbach, K., Widmer, F., Enkerli, J. (2007): Cultivation-independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6519-6525.
- Smith-White, J. L., Summerell, B. A., Gunn, L. V., Rinzin, C., Porter, C., and Burgess, L. W. (2002). Molecular detection and differentiation of Australian *Armillaria* species. *Australasian Plant Pathology*. 31:75–79.
- Stahl P.D., Klug M.J. (1996). Characterization and Differentiation of Filamentous Fungi Based on Fatty Acid Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4136-4146.
- Suazo, A., Hall, H.G. (1999): Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques* 26: 704-709.
- Suwannakut, S., Boucias, D.G., Wiwat, Ch. (2005): Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. *J. of Invertebrate Pathology* 90: 169–176.
- Tigano-Milani, M.S., Honeycutt, R.J., Lacey, L.A., Assis, R., McClelland, M. and Sobral, B.W.S. (1995a): Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates as revealed by molecular markers. *J. of Invertebrate Pathology* 65: 274–282.
- Tigano-Milani, M.S., Samson, R.A., Martins, I. and Sobral, B.W.S. (1995b): DNA markers for differentiating isolates of *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiology* 141: 239–245.
- Tsykun T., Rellstab C., Dutech C., Sipos G., Prospero S. (2017). Comparative assessment of SSR and SNP markers for inferring the population genetic structure of the common fungus *Armillaria cepistipes*. *Heredity (Edinb)*. 119: 371-380.
- Typas, M.A., Griffen, A.M., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. (1992): Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol. Letters* 95: 157–162.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Homes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zebau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. - *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds): PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1992). Genetics analysis using RAPD markers. *Method Enzymol.* 260: 335-348.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Xu J. (2006). Fundamentals of fungal molecular population genetic analyses. *Curr Issues Mol Biol.* 8: 75-89.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Holuša J., Lubojacký J., Čurn V., Tonka T., Lukášová K., Horák J. (2018): Combined effects of drought stress and *Armillaria* infection on tree mortality in Norway spruce plantations. *Forest Ecol. Manag.*, 427: 434-445,.

Název: Čurn V. a kol. (2019): Metodika izolace DNA a analýzy
molekulárních markerů u hub

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.
Ing. Lucie Křížová
Ing. Eva Jozová, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 19.12.2019 (č.j. 65865/2019-MZE-16222/M204), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice
vcurn@seznam.cz

ISBN: 978-80-7394-781-1