

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA PEDAGOGICKÁ
CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**Molekulární analýza některých druhů hub
z herbářových i nativních položek pro
fylogenetickou specifikaci**
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Růžena Veselá

Přírodovědná studia, Biologie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

Plzeň, 2017

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této bakalářské práce.

Plzeň, 27. dubna 2017

.....

Růžena Veselá

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, PhD. za jeho cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Koutovi, PhD. za poskytnutí vzorků hub a odborné rady při zpracování výsledků.

Zadání bp

Obsah

Obsah	5
Seznam symbolů a zkratk	7
Úvod.....	8
1.1 Houby.....	9
1.1.1 Systém.....	9
1.1.2 Fylogeneze hub	9
1.1.3 Rod <i>Antrodiella</i>	10
1.1.3.1 Druh <i>Antrodiella onychoides</i> a <i>Antrodiella genistae</i>	10
1.2 Herbářové položky hub	11
1.2.1 Sběr	11
1.2.2 Konzervace	11
1.2.3 Scheda a uložení herbářových položek.....	11
1.2.4 Další podmínky	11
1.3 Molekulární analýza hub.....	11
1.3.1 Izolace a purifikace	11
1.3.1.1 Izolace DNA vazbou na silikátovou kolonku.....	13
1.3.1.2 Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou	14
1.3.2 PCR.....	15
1.3.2.1 Typy PCR	16
1.3.2.2 PCR v mykologii	17
1.3.3 Analýza PCR produktů	19
1.3.4 Sekvenční analýza hub.....	20
1.3.5 Konstrukce fylogenetického stromu	20
1.3.5.1 Metody konstrukce	21
1.3.5.2 Programy	22

1.3.5.3	GenBank	23
2	Materiály a metody	23
2.1	Vzorky hub	23
2.2	Design primerů	23
2.3	Izolace DNA	24
2.3.1	Metoda fenol-chloroform	24
2.3.2	Metoda chloroform	25
2.3.3	Metoda chloroform-isopropylalkohol	25
2.3.4	Metoda chloroform-isopropylalkohol podle Murray a Thompson (1980)	26
2.3.5	Metoda pomocí forezního kitu NucleoSpin	26
2.4	PCR reakce	27
2.5	Sekvenování	27
2.6	Vytvoření fylogenetických stromů	27
2.7	Přístroje	28
3	Výsledky	28
3.1	Testování metodiky	28
3.2	Fylogenetické vztahy <i>Antroidella genistae</i>	34
4	Diskuse	35
5	Závěr	39
6	Resumé	40
7	Literatura	41
8	Internetové zdroje	45
9	Seznam obrázků	47
10	Seznam tabulek	47
11	Seznam příloh	47

Seznam symbolů a zkratk

DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová reakce)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
dsDNA	dvouřetězcová 2-deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mitochondriální ribonukleová kyselina
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
SDS	sodiumdodecylsulfát (dodecylsulfát sodný)
dATP	deoxyadenosin trifosfát
dTTP	deoxythymín trifosfát
dGTP	deoxyguanosin trifosfát
dCTP	deoxycytidin trifosfát
rDNA	ribozomální 2-deoxyribonukleová kyselina
TE	Tris/EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

Úvod

Hlavním cílem této práce byla izolace a analýza DNA hub, které pocházely většinou z herbářových položek, sekvenace a následné vytvoření fylogenetických stromů pro konkrétní druhy hub. Vzorky hub byly získávány z různých našich i zahraničních lokalit.

Vytváření fylogenetických stromů pomocí těchto analýz má v dnešní době velký rozmach a nahrazuje zažitý a dnes už neplatný starý systém, který byl konstruován zejména z morfologického hlediska. Na základě molekulární biologické analýzy se zkoumají klíčové vývojové vztahy mezi organismy na úrovni DNA, proto se bez ní systematická biologie již neobejde. Molekulární určení dokáže mnohdy rozlišit druhy hub, které nelze morfologicky určit. Studium hub pomocí molekulárních analýz představují ještě široké možnosti dalšího výzkumu.

Houby, ačkoliv se zdají být jen nezajímavými organismy, jsou velmi významné, protože mají mnoho využití. V potravinářském průmyslu se používají především k výrobě plísňových sýrů či k výrobě kvasnic, ve farmaceutickém a chemickém průmyslu především jako antibiotika a jako producenti různých enzymů a chemických látek. Jsou to také významní rozkladači organické hmoty, mutualisté, bez nichž by mnoho rostlin nemohlo existovat, a mnohé jsou také paraziti.

1.1 Houby

Houby se vyskytují prakticky všude. Jsou to významní rozkladači, saprofyti, paraziti a symbionti cévnatých rostlin (mykorhiza) či sinic nebo řas (lichenismus). Jedná se o eukaryotní organismy, jejichž buňka má na rozdíl od živočišné buněčnou stěnu, která obsahuje chitin, a na rozdíl od rostlinné neobsahují chlorofyl. Mohou být jednobuněčné i mnohobuněčné. Tělo hub se skládá z hyf (houbových vláken), které mohou být rozlišeny v podhoubí a plodnici. Rozmnožují se nepohlavně fragmentací, pučením či pomocí nepohlavních spor, nebo pohlavně (Kubát a kol. 1998).

Houby jsou významné díky produkci různých enzymů, antibiotik a speciálních chemikálií a především díky syntéze proteinů. V genetickém inženýrství jsou houby využívány k produkci heterologních proteinů. Heterologní protein je takový protein, který produkuje určitý genový produkt v organismu, který ho normálně neprodukuje. Zejména *Aspergillus*, *Fusarium* a *Neurospora* jsou v biotechnologii známé jako možný zdroj pro sekrece rekombinantních proteinů (Bridge 1998).

1.1.1 Systém

Dnes řadíme houby mezi tzv. Unikonta. Pod Unikonta jsou tzv. Opisthokonta, kam řadíme Fungi. Tam patří oddělení Chytridiomycota (chytridie neboli plísňě buněčkové), Blastocladiomycota, Microsporidiomycota, Zygomycota (houby spájkivé), Glomeromycota, Ascomycota (vřeckovýtrusné houby) a nejznámější Basidiomycota (stopkovýtrusné houby) [1].

1.1.2 Fylogeneze hub

Dříve byla fylogeneze odvozena od fenotypových znaků. Fenotypovými znaky mohou být znaky morfologické, fyziologické, vývojové nebo jimi mohou být např. sekundární metabolity či jiné chemické látky. V dnešní době je fylogeneze hub odvozována na základě analýzy proteinů nebo nukleových kyselin. Jedná se např. o analýzu izoenzymu, které katalyzují stejnou reakci, ale v každém organismu má jinou strukturu, DNA-DNA hybridizaci, elektroforetický karyotyping, polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) a sekvenování DNA (Bridge a kol. 1998).

Pro zjištění fylogeneze hub je nejlepší polymerázová řetězová reakce (PCR), protože většina hub je v herbářové podobě, kde se vyskytuje pouze malé množství DNA, které je PCR schopna amplifikovat. Díky ní můžeme DNA hub nechat

sekvenovat. Porovnáním sekvencí se sekvencemi ostatních hub pak můžeme zjistit fylogeneze dané houby (Bridge a kol. 1998). Více viz kapitola PCR v mykologii.

1.1.3 Rod *Antrodiella*

Rod *Antrodiella* patří do stopkovýtrusých hub, do řádu Polyporales (chorošotvaré) a do čeledi *Phanerochaetaceae* (kůrovkovité). Plodnice jsou voskovité, většinou rozlité až s tenkými kloboučky. Plodnice mají poroidní hymenofor a jsou většinou měkké až chrupavčité. Výtrusy jsou malé, hladké a bezbarvé. Rostou na stromech, kde vytvářejí bílou hnilobu (Antonín 2006, Holec a kol. 2012).

1.1.3.1 Druh *Antrodiella onychoides* a *Antrodiella genistae*

Antrodiella onychoides byla dříve označovaná jako *Polyporus onychoides* roste převážně na listnatých stromech (*Fraxinus* a *Salix*). *A. onychoides* a *A. genistae* jsou si morfologicky velmi podobné. Mají krémově zbarvené plodnice, které jsou většinou polorozlité až rozlité, které mohou být lemovány širokým sterilním okrajem. Plodničky jsou drobnější a jejich kloboučky mohou být až 3,5 cm dlouhé, 1 cm široké a jen do 3 mm tlusté (Vampola 1991, Miettinen a kol. 2006). Rourky jsou na šikmém podkladu částečně z boku otevřené. Póry *A. onychoides* jsou velmi drobné a okrouhlé až mírně protažené, některé jsou občas spojené. Její hyfový systém je dimitický (Miettinen a kol. 2006). Hyfový systém *A. genistae* je trimitický. Generativní hyfy *A. genistae* obsahují přezky, kdežto *A. onychoides* pouze jednoduchá septa (Ryvarden a Gilbertson 1993).

A. onychoides je makroskopicky od *A. semisupina* téměř nerozeznání, proto nebyla dříve moc známá. Rozlišovat *A. onychoides* od druhu *A. semisupina* se podařilo teprve nedávno. Rozeznat se dá buď mikroskopicky, nebo analýzou DNA. *A. onychoides* má na generativních hyfách přehrádky bez přezek (viz Příloha 1 Obr. 2.), a především tímto znakem se liší od druhu *A. semisupina* (viz Příloha 1 Obr. 3.) a ostatních druhů *Antrodiella*, které mají přehrádky s přezkami (Vampola, 1991). Kromě toho se také liší tvarem a velikostí výtrusů. *A. onychoides* je také podobná druhu *A. genistae* (synonymum *A. leucoxantha*) (viz Příloha 1 Obr. 1.), která by měla být pouze haploidní formou *A. onychoides*, měla by být světlejší a měla by se vyskytovat na jiném místě (Miettinen a kol. 2006). Sekvence *A. genistae* není doposud známá, proto byla vybrána houba určená jako *A. genistae*.

1.2 Herbářové položky hub

1.2.1 Sběr

Houby sbíráme celé, čerstvé, neporušené a někdy i se substrátem. Se substrátem se sbírají většinou menší plodnice. Sběr hub se různě liší. Například hlenky vkládáme do malých krabiček, kde je připevníme špendlíky na polystyren, který krabičku vystýlá. Obecně však platí, že velké plodnice sbíráme do košíku oddělené od ostatních pomocí papíru a menší sbíráme do krabiček utěsněné papírem či mechem [9].

1.2.2 Konzervace

Houby se mohou sušit nebo uložit do konzervační tekutiny. Výhoda tekutinových preparátů je ta, že houba neztratí tvar a částečně ani barvu. Sušení je však nejrozšířenější forma pro vědecké účely. Provádí se při teplotě 30 – 40 °C [2]. Malé plodnice mohou schnout 2 hodiny, velké až 48 hodin [3].

1.2.3 Sceda a uložení herbářových položek

Každá herbářová položka musí být opatřena schedou, což je etiketa, na které je napsáno latinské jméno houby, lokalita, prostředí, kde byl sběr pořízen, substrát, datum a jméno sběratele a určovatele [2]. Opatření schedou je tzv. evidence herbářových položek 1. stupně, po které následuje evidence 2. stupně. Jedná se o zápis do počítačové databáze. Herbářové položky jsou v obálkách či sáčcích uloženy do krabiček, na kterých je scheda. Krabičky jsou pak uloženy do kartonových krabic, které jsou potažené látkou a jsou prachotěsné [3].

1.2.4 Další podmínky

V místnosti, kde jsou herbářové položky, by měla být udržována teplota mezi 17 - 22 °C a relativní vzdušná vlhkost by měla být nižší než 50 %. Herbářové položky ochráníme před napadením hmyzu cyklickým vymrazováním a to tak, že je vystavíme teplotě – 30 °C po dobu 2 – 3 dnů a po týdenní přestávce proces opakujeme [3].

1.3 Molekulární analýza hub

1.3.1 Izolace a purifikace

Izolací se rozumí získávání DNA či RNA z daného vzorku za použití kombinace chemického a fyzikálního přístupu. Izoluje se buď genomová DNA, totální RNA či mRNA a plasmidová DNA z bakterií [4]. Před samotnou PCR je třeba nukleovou kyselinu řádně izolovat a vyčistit tak, aby tam nezůstávaly nečistoty a pozůstatky po

izolačních technikách (ethanol, fenol,...), které by mohly samotné reakci uškodit. Při izolaci je nutno dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku například naší DNA. Izolace je nejlépe provedena, když je použit čerstvý vzorek. Dalšími klíčovými faktory, které zlepšují izolaci, jsou: rychlé zpracování vzorku, vhodně vybraná homogenizační metoda, vhodné množství vzorku (velké množství může způsobit viskozitu DNA preparátu, které vede ke zlomům genomové DNA) a inaktivování nukleáz. Pro zlepšení izolací je také vhodné zajistit, aby zkoumaná DNA nepodléhala degradaci v průběhu izolace, rozsáhlého třepání (vortex) či během opakovaného pipetování. Genomová DNA je nejlépe uchována při 2 – 8 °C ve vhodném pufru. Dlouhodobé skladování je nejvhodnější při teplotě -50 až -80 °C. Podobně RNA se uchovává v pH pod 8 a teplotě -50 až -80 °C (Degen a kol. 2006).

Prvním krokem izolace je rozrušení tkáně za použití tloučků, homogenizátorů či sonikátoru. Poté rozrušíme buňky lyzačními roztoky a proteiny pomocí proteázy. U živočišných stačí slabé neiontové detergenty, jejichž vlivem dojde k popraskání buněk, kdežto u bakterií a rostlinných buněk je třeba rozpustit buněčnou stěnu, čehož dosáhneme použitím lysozymu, roztoku CTAB nebo celulózy. Lyzační roztok obsahuje i proteinázu K, která odstraní přítomné proteiny, a RNázu, která odstraní RNA. Významnou složkou lyzačního roztoku je i EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), tzv. chelatační činidlo, které vyvazuje dvojmocné kationty, a díky tomu nedochází k degradaci DNA působením DNáz. Po rozrušení je třeba DNA separovat od proteinů a dalších příměsí [4].

Templát obsahující DNA musí být vyčištěný, aby byla PCR reakce úspěšná. Templát totiž může obsahovat inhibitory a nukleázy, které negativně ovlivňují výkon reakce. Pro vyčištění se používají produkty specificky vytvořené pro čištění DNA a RNA. Kvalitní DNA templát by měl mít vysoký stupeň integrity a neměl by obsahovat RNA. RNA v tomto případě nese hořčičnaté ionty a snižuje výnos PCR. Naopak RNA templát by neměl obsahovat DNA. Negativním vlivem na reakci může být i to, že vzorek je amplifikován pouze jedním primerem, nebo že ve vzorku není dostatek cílového úseku (Degen a kol. 2006).

Je známo několik typů izolací. Mezi nejznámější patří izolace DNA vazbou na silikátovou kolonku, která se dnes běžně na specializovaných pracovištích používá, a izolace DNA fenol-chloroformovou metodou, která je spolehlivou a levnou metodou.

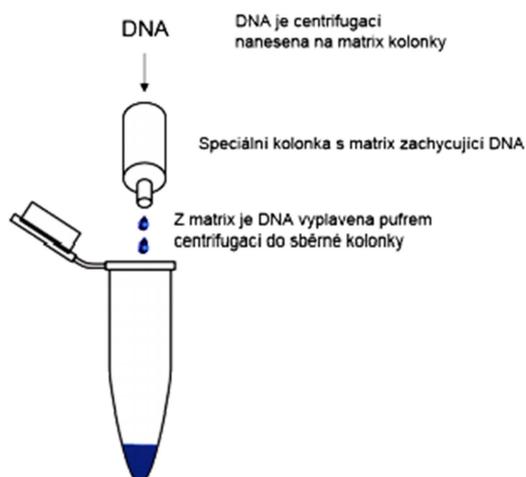
Oproti první zmíněné izolaci trvá mnohem delší dobu a při práci se používají toxické a zápachající látky [4].

1.3.1.1 Izolace DNA vazbou na silikátovou kolonku

Při této izolaci se při vysoké koncentraci chaotropních solí nukleové kyseliny vážou na matrix v silikátové kolonce, zatímco kontaminující látky kolonkou protečou (Degen a kol. 2006) [4]. Chaotropní sůl dokáže rozrušovat strukturu vody, protože s ní vytváří vodíkové můstky. Centrifugací kolonky se roztok (bez DNA) odplaví pryč do sběrné zkumavky. Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím roztokem, který je pak následnou centrifugací z kolonky odplaven [4]. DNA se pak eluuje např. destilovanou vodou nebo pufrém (Janáková 2012). DNA je takto odplavena z matrix do připravené zkumavky [4].

Na silikátovou kolonku se nukleové kyseliny váží podle toho, jakou má roztok iontovou sílu a pH. Záleží i na typu nukleové kyseliny. Každá kolonka obsahuje speciální skleněná vlákna a je upevněná ve válci. Tento princip umožňuje rychlé a efektivní promývání a eluční kroky (Degen a kol. 2006).

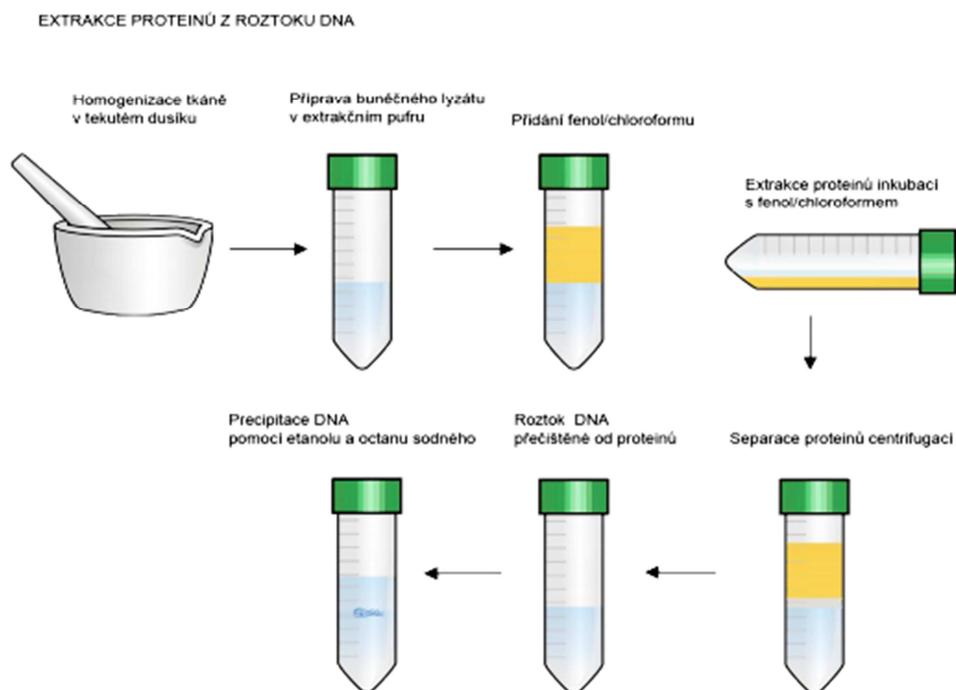
U kolonkových kitů je důležité brát v úvahu několik parametrů. Záleží na tom, jestli jsou určeny pro krev, tkáň nebo rostlinu a jaké je množství vstupního materiálu. Záleží také na délce protokolu, vazebné kapacitě kolonky, čistotě výtěžku (udává kontaminaci proteiny) a na tom, jakou hmotnost má výtěžek [4].



Obr. 1. Silikátová kolonka [4].

1.3.1.2 Izolace DNA fenol-chloroformovou metodou

Nejprve tkáň homogenizujeme v pufru obsahujícím tenzid, který rozpustí buněčnou membránu. Nejčastěji se používá SDS (sodiumdodecylsulfát) a dodecylsírán sodný. Další částečný rozpad buněk zajistí proteináza K, která velmi účinně štěpí nukleázy a hydrolyzuje kontaminující bílkoviny. Tento bakteriální enzym má optimum okolo 60 °C. Poté se přidá směs fenol-chloroform, která se nemísí s vodou, a dochází k denaturaci a vysrážení bílkovin. Při pH 7,6 se DNA disociuje a přechází do vodné fáze a zdenaturované proteiny přechází do hydrofobní fáze. Pro lepší oddělení těchto fází se přidává trochu izoamylalkoholu. Zbytky fenolu by mohly způsobit inhibici polymerázové reakce. Vzorek se proto ještě pročistí samotným chloroformem. DNA se poté musí z vodného roztoku vysrážet pomocí koncentrované soli, která odejme rozpouštědlo (tzv. vysolování), a pomocí následného přidání ethanolu. Vysrážená DNA se pak promývá v 70% ethanolu, který rozpustí zbytky solí a bílkovin. Nakonec se DNA musí rozpustit v alkalickém pufru, který obsahuje EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová). Tato látka stejně jako proteináza K inhibuje nukleázy a také vzorek stabilizuje (Janáková 2012).



Obr. 2. Izolace fenol-chloroform [4].

1.3.2 PCR

PCR je metoda molekulární biologie, která má za úkol opakovaně amplifikovat (zmnožit) DNA z předem určených vzorků. Základním principem PCR je opakovaná denaturace dvouřetězcové DNA, následná renaturace (annealing) osamocených řetězců s primery, což jsou specifické oligonukleotidy, které ohraničují sekvenci vybranou k amplifikaci, a poté následuje syntéza (extension, elongace) nového řetězce DNA (Degen a kol. 2006). PCR reakce se tedy skládá ze tří částí. Denaturace, při které dochází k rozpadu vodíkových můstků mezi řetězci DNA, probíhá při 90 - 95°C. Po tom dochází k ochlazení na 50 – 60 °C a k nasednutí specifických oligonukleotidů na dva jednořetězcové templáty. Při zvýšení teploty na 72 °C se uskuteční syntéza nové DNA. K získání určitého úseku DNA potřebujeme dva primery, které cílený úsek DNA ohraničují. Amplifikace se provádí pomocí DNA polymerázy izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, která je odolná vůči vysoké teplotě. PCR probíhá v cyklech. Jeden cyklus se skládá z již zmíněných tří kroků. Cyklů je obvykle okolo 20 – 30, což zajistí, že se DNA exponenciálně zmnoží (Bridge a kol. 1998).

Podmínky během cyklů musíme vhodně zvolit, aby PCR proběhla úspěšně. Denaturační čas nesmí být moc krátký, protože by nemusela být termostabilní DNA polymeráza aktivní. Optimální renaturační teplota závisí na teplotě nasedání primerů. Elongační čas závisí na délce cíleného úseku, který má být amplifikován. Počet cyklů závisí na tom, jak velké množství má být amplifikováno. Jak cyklické parametry ovlivňují PCR, je možno vidět v tabulce Tab. 1. Z těchto údajů je možno vytvářet vhodné parametry pro vybraný systém (Degen a kol. 2006).

Tab. 1. PCR protokol (Degen a kol. 2006).

Cycling Parameter	Value Used in Standard PCR ^a	Effect if Parameter Value Is Lower than Optimal ^b	Effect if Parameter Value Is Higher than Optimal ^b
Initial Denaturation	94°C 2 min	Few or no PCR products	Premature denaturation of polymerase, leading to reduced yield
Denaturation during Cycling	94°C 15 – 30 s	Reduced yield	Reduced yield
Primer Annealing	50 to 65°C ^c 30 – 60 s	Reduced yield	Formation of nonspecific products
Elongation	72°C 45 s – 2 min ^d	Reduced yield	▶ Reduced yield ▶ Increased error rate
Total Number of Cycles	25 – 30	Reduced yield	Formation of nonspecific products
Final Elongation	72°C 7 min	Products are not fully double-stranded	Formation of nonspecific products

^{a)} With Taq DNA Polymerase; copied from standard PCR protocol (Chapter 4, section 4.1). Other enzyme systems will require different parameter values.

^{b)} From Aoyagi (2001). Effects are generally independent of the enzyme system used.

^{c)} Optimal temperature depends on primer melting temperature.

^{d)} Elongation time depends on fragment length; for Taq DNA Polymerase, the recommended times are 45 seconds for targets that are 1 kb or shorter, 1 minute for 1.0 – 1.5 kb, and 2 minutes for 1.5 – 3.0 kb.

Doba syntézy řetězců závisí na tom, kolik kb má specifický templát. Na řetězce do 1 kb by měla stačit doba 45 sekund. U delších řetězců se doba syntézy zvětší právě o násobek 45 sekund (Degen a kol. 2006).

PCR probíhá v reakční směsi, která obsahuje templát (matrice, předloha), primery, polymerázu a reakční roztok, ve kterém je kromě čtyř deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) také pufrující složka a hořečnaté soli. Pufrující složkou a hořečnatou solí se nastaví vhodná iontová rovnováha. Koncentrace hořečnatých iontů, které jsou kofaktorem polymerázy, je rozhodující pro konečný výtěžek. Specifičnost párování primerů může být zlepšena přidáním konkrétních sloučenin v reakční směsi nebo za použití určitých experimentálních podmínek (Bridge a kol. 1998). Koncentrace primerů je optimální mezi 100 až 900 nM, pokud je ale vyšší, může to zlepšit výsledek (Degen a kol. 2006).

1.3.2.1 Typy PCR

Hot Start PCR je oproti klasické PCR jiná v tom, že je nutná vyšší teplota na to, aby se aktivovala *Taq* polymeráza. *Taq* polymeráza je upravena speciálními enzymy, které blokují její aktivitu při nízkých teplotách. Aktivuje se až při 95 °C, kdy dojde ke zničení inhibujících enzymů. Díky tomu nedochází v průběhu přípravy ke vzniku produktu z nesespecificky nasednutých primerů, které u klasické mohou vzniknout, protože *Taq* polymeráza reaguje už za nízké teploty (Bridge a kol. 1998).

Ramp PCR je zvláštní v tom, že oproti klasické PCR se renaturační teplota s rostoucím počtem cyklů snižuje cyklus po cyklu. Provádí se především, když renaturační teplota daných primerů není přesně určená (Bridge a kol. 1998).

Long and accurate PCR (LA-PCR) dokáže správně amplifikovat fragmenty delší než 5 kb. Dokáže to díky tomu, že obsahuje směs dvou termostabilních DNA polymeráz, která je pojmenována jako *KlenTaqLA-16*. Jedna je vysoce schopná opakovaně pokračovat v její katalytické funkci, aniž by se oddělila od substrátu. Druhá vykazuje 3'→5' exonukleázovou aktivitu, která umožňuje korekturu produktu. Od klasické PCR se neliší jen tím, že obsahuje dvě polymerázy, ale i časy a teploty cyklů jsou jiné. Také množství přidávaných látek je jiné, místo chloridu draselného obsahuje síran amonný a místo cold startu má buď hot start nebo *Taq*antibody start (Bridge a kol. 1998).

PCR with nested primers se používá především při nízkém množství templátové DNA. Hlavním principem je druhá amplifikace, která zvýší počet amplikonů (produktů reakce). Při nízkém množství templátové DNA se často stává, že vznikají nespecifické produkty. Nested primery při druhé amplifikaci bývají často obohaceny o další tři báze, které zajišťují, aby se amplifikovaly pouze žádoucí fragmenty (Bridge a kol. 1998).

Inverzní PCR umožňuje izolaci a identifikaci neznámé sekvence a její následnou amplifikaci. V tomto případě se jedná už o klonování. Neznámá sekvence, v níž leží známá sekvence, se štípe restrikcí enzymem na fragmenty, které se pak ligací cirkularizují. Molekula se pak linearizuje štěpením restikčním enzymem ve známé sekvenci, čímž se úseky známé sekvence dostanou na konec molekuly a ohraničují neznámou sekvenci, která pak lze díky tomu amplifikovat (Bridge a kol. 1998).

Existují ještě další typy PCR, ale tato práce není zaměřená jen na PCR, proto další typy PCR již nejsou uvedeny.

1.3.2.2 PCR v mykologii

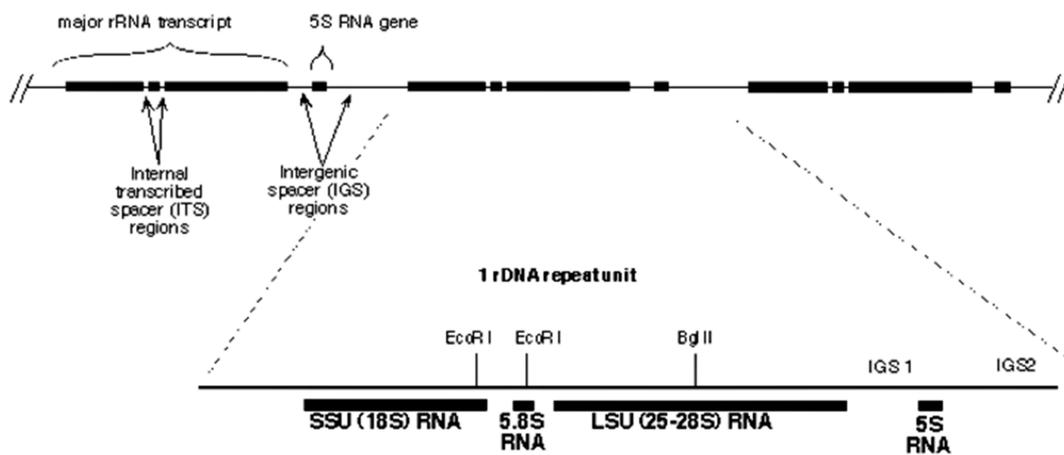
První PCR v mykologii popsal White (viz White a kol. 1990). Kniha se týkala amplifikace a přímého sekvenování ribozomální DNA ke stanovení taxonomických a fylogenetických vztahů (Bridge a kol. 1998).

Při extrakci nukleových kyselin z hub získáme totiž jen malé množství čistého genetického materiálu, proto je pro další využití (pro porovnávání a identifikaci) třeba vzorek čisté DNA pomocí PCR amplifikovat (Bridge a kol. 1998).

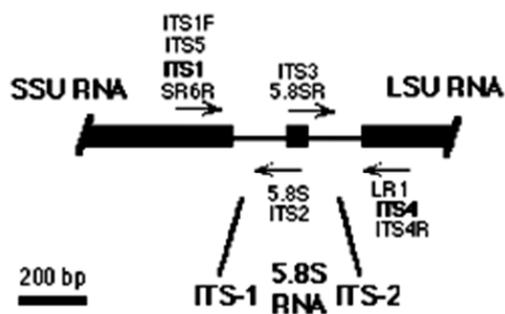
Pro vzájemné porovnávání a identifikaci hub se používá sekvence pro ribozomální RNA, na DNA tyto úseky označujeme jako „rDNA sekvence“, které souvisí se základními životními funkcemi organismů. Mutace v jejich sekvenci může ovlivnit celý ontogenetický vývoj jedince, proto jsou tyto sekvence vysoce konzervativní a můžeme je využít k druhové identifikaci. Část sekvence mají všechny houby společné. Zbytek sekvence se liší, a tím můžeme odvozovat fylogenetické vztahy (Bridge a kol. 1998).

Jednotka rDNA se v jádře tandemově opakuje. Jedna jednotka zahrnuje několik rRNA genů, které jsou vyznačené na obrázku pod textem (Obr. 3.) - malé jaderné (18S), 5.8S rRNA a velké jaderné geny (28S). Jako „S“ se značí Svedbergova jednotka. Je odvozená od sedimentačního koeficientu, což je veličina, která udává čas, za který proběhne sedimentace dané makromolekuly při její centrifugaci (ultracentrifugaci).

Sedimentační koeficient odpovídá sedimentační rychlosti v poli o jednotkovém zrychlení. Sedimentační koeficient se udává v sekundách, kdežto Svedbergova jednotka jako jeho násobek. Platí, že $1S = 10^{-13}$ s. (Rosypal 1997). V jedné jednotce jsou geny od sebe odděleny dvěma ohraničenými vnitřními transkribovanými oblastmi (označovanými jako ITS1 a ITS2), což můžeme vidět na dalším obrázku (Obr. 4.) a tyto dvě jednotky na rDNA jsou oddělené mezigenovou oblastí (5.8S rRNA). Poslední rRNA gen (5S) může nebo nemusí být opakovanou jednotkou, což závisí na taxonech. Malé jaderné geny (18S) se vyvíjejí pomalu a jsou užitečné spíše jen pro porovnání vzdáleně příbuzných organismů (White a kol. 1990). Nekódující oblasti (ITS a IGS) se vyvíjejí rychleji a jsou užitečné pro porovnání druhů hub v rámci rodu nebo čeledi, tedy pro zjištění fylogenetických vztahů. Nejčastěji se pro porovnání využívá oblast ITS. Některé regiony 28S rDNA jsou také variabilní mezi druhy (Bridge a kol. 1998).



Obr. 3. Jednotka rDNA [8].



Obr. 4. Jednotka rDNA s oblastmi ITS [8].

1.3.3 Analýza PCR produktů

PCR produkty se vizualizují elektroforézou na agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu (Bridge a kol. 1998). Elektroforéza je soubor separačních metod, které ve stejnosměrném elektrickém poli za pomoci molekulárního síta tvořeného vlákny polymerní sloučeniny využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost, která závisí na hmotnosti molekuly a tedy délce úseku DNA. Vlivem aniontových fosfátových skupin mají nukleové kyseliny negativní elektrický náboj, proto se pohybují směrem k anodě. Existují dva druhy elektroforézy: kapilární a gelová (Janáková 2012).

Agarosový gel se připraví z agarosového prášku a pufru pro elektroforézu. Koncentraci roztoku připravíme tak, aby byla vhodná pro oddělování fragmentů určité velikosti očekávané ve vzorku při elektroforéze. Koncentrace se může určit z tabulky (viz Tab. 2.). Roztok agarosy ve skleněné nádobě se pak zahřívá ve vodní lázni nebo v mikrovlnné troubě do té doby, než se zrna agarosy rozpustí a roztok nabývá čirého vzhledu. Průběžně se roztok promíchává kroužením a pak se zchladí na 55 °C. Transparentní ochlazený roztok se nalije do formy, kde je připravený hřeben pro vytvoření otvorů. Případné vzniklé bubliny se musí odstranit, což lze provést např. propíchnutím. Gel se nechá ztuhnout. Měl by být 3 až 5 mm vysoký. Když je gel ztuhlý, je hřeben opatrně vyjmut (Sambrook a Russel 2001).

Tab. 2. Koncentrace agarosy v závislosti na rozsahu separace (Sambrook a Russel 2001).

Agarose Concentration in Gel (% [w/v])	Range of Separation of Linear DNA Molecules (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

Na správně umístěný gel je nalit pufr pro elektroforézu tak, aby byl gel zcela ponořený. Do jamek v gelu se pomocí mikropipet nanáší vzorky DNA smíchané s nanášecím pufrem (gel-loading buffer). Nanášecí pufr většinou obsahuje bromfenolovou modř a xylen cyanol. Do jedné jamky se nanáší ladder, podle kterého se potom zjišťuje, kolik párů bazí daná DNA má. Nanášení musí být provedeno rychle, aby nedošlo k chybám vzniklých difúzí molekul. Nakonec se zavře víko gelového

zásobníku a připojí se elektrické vodiče tak, aby DNA migrovalo směrem ke kladné anodě. Při elektroforéze se používá napětí 1,5 V. Kontrolou správného průběhu jsou vznikající bublinky u anody a katody. Elektroforéza trvá tak dlouho, dokud není bromfenolová modř a xylen cyanol dostatečně vzdálený. Pak se vypne elektrický proud a vyjme víčko a kabely z nádrže. Gel se dále zkoumá pod UV světlem a vytvoří se fotografie gelu. Pod UV se může produkt PCR vizualizovat díky přítomnosti ethidium bromidu, který je obsažen v gelu (Sambrook a Russel 2001).

Velikost a množství PCR produktů můžeme určit přiložením standardního formátu „ladderu“ o známé koncentraci a se specifickými fragmenty o definovaných velikostech. „DNA ladder“ se na příslušném gelu porovnává se vzorkem amplifikované DNA (Bridge a kol. 1998).

1.3.4 Sekvenční analýza hub

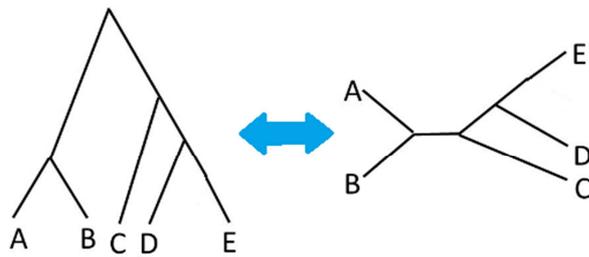
Používají se dvě sekvenční analýzy hub. Jedna zahrnuje klonování a druhá je založena na přímém sekvenování. Sekvenování za použití klonování se stalo přímočařejší, ale je zapotřebí značné úsilí a to zejména při získávání dat sekvence z velkého počtu jedinců. Další nevýhodou jsou mutace vzniklé DNA polymerázou během syntézy. Aby se odlišila mutace v původní sekvenci, musí být pro každý vzorek, který je několikrát klonován, zavedena konvenční sekvence (Bridge a kol. 1998). Konvenční sekvence, které mají stejnou funkci, se mezi srovnávanými nukleotidovými sekvencemi vyskytují nejčastěji (Rosypal 1997).

Přímé sekvenování má oproti první analýze několik výhod. Je časově výhodnější, protože nezahrnuje klonování, a případné chyby jsou minimalizovány, protože každý nukleotid zahrnuje konvenční sekvenci díky tomu, že není klonován (Bridge a kol. 1998).

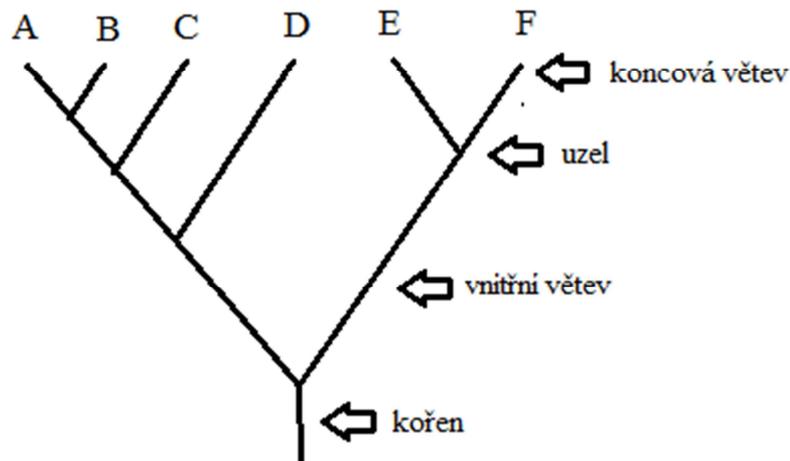
1.3.5 Konstrukce fylogenetického stromu

První fylogenetický strom byl vytvořen Charlesem Darwinem [5]. Fylogenetický strom slouží jako grafické znázornění příbuzenských vztahů mezi různými taxonomickými jednotkami, o nichž lze předpokládat, že mají společného předka. Existují dva typy stromů (viz Obr. 5.) - strom nezakořeněný, který znázorňuje vztahy mezi taxonomickými jednotkami, ale nespecifikuje jejich společného předka, a strom zakořeněný, který specifikuje společného předka všech taxonomických jednotek.

Společný předek je označen jako kořen [5]. Popis zakořeněného fylogenetického stromu můžeme vidět na obrázku pod obrázkem s typy stromů (Obr. 6.).



Obr. 5. Fylogenetický strom - vlevo zakořeněný, vpravo nezakořeněný.



Obr. 6. Popis fylogenetického stromu.

Jednotlivé klady (větve) mají mezi sebou různé vztahy. Mohou být monofyletické, parafyletické nebo polyfyletické. Monofyletické taxony se vyznačují tím, že mají jediného společného předka. Parafyletický znamená, že nezahrnuje všechny potomky společného předka, a polyfyletický znamená, že nezahrnuje společného předka a sestává z organismů různých vývojových linií [5].

1.3.5.1 Metody konstrukce

Metody konstrukce vycházejí z matice distancí, která udává vzájemné vzdálenosti mezi všemi dvojicemi taxonomických jednotek, pro které konstruujeme strom. Jako vzdálenost se zde používá genetická vzdálenost [5].

Patří sem metoda UPGMA, neighborjoining, maximum parsimony, maximum likelihood a molekulární hodiny [5].

UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) neboli shlukovací analýza je nejjednodušší algoritmickeou metodou konstrukce fylogenetického stromu. Je založena na shlukování taxonomických jednotek na základě vzdálenosti. Nejprve se musí zjistit dvojice taxonomických jednotek, které k sobě mají nejbližše. Tato dvojice se sloučí do skupiny, podle které se spočítá vzdálenost ke všem ostatním taxonomickým jednotkám. Vzdálenost taxonomické jednotky T k této nové skupině S se spočítá jako aritmetický průměr vzdáleností mezi jednotkou T a všemi prvky skupiny S. Skupina S se může dále považovat za hypotetickou taxonomickou jednotku. Pokud totiž máme více než jednu taxonomickou jednotku, musí se postup opakovat. Kořenem je poslední hypotetická taxonomická jednotka. Grafickým vyjádřením postupu tohoto shlukování získáme fylogenetický strom [5].

Neighbor joining vychází z hvězdicového stromu, kde je střed, a všechny taxonomické jednotky jsou reprezentovány pomocí listů. Tento strom se postupně rozkládá shlukováním nejbližších taxonomických jednotek tak, aby se celková délka stromu co nejvíce zmenšila [5].

Maximum parsimony se snaží nalézt strom, ve kterém dochází k minimu evolučních událostí. Tato metoda také zohledňuje váhu evolučních událostí např., že některé nukleotidy či aminokyseliny mutují snáze či hůře než ostatní [5].

Maximum likelihood vychází se statistických metod a pravděpodobnosti. Snaží se odhadnout pravděpodobnost platnosti statistické hypotézy, která je představovaná fylogenetickým stromem pro data, která máme k dispozici. Větší věrohodnost má ten strom, který pro vysvětlení dostupných fylogenetických dat potřebuje menší počet změn [5].

Dalšími metodami jsou např.: metoda nejmenších čtverců, minimální evoluce, Bayéská metoda [5].

1.3.5.2 Programy

Pro fylogenetické studie se používá několik počítačových programů. Patří mezi ně např. program MEGA, Clustal W, Phylip, MACCLADE, PAUP a Puzzle. Pro vytváření fylogenetických stromů hub se nejčastěji používá program MEGA7. Ten využívá dálkové metody a šetrnost (parsimony). Dále má zavedené i jiné statistiky zahrnující analýzu DNA, RNA a proteinové sekvence dat (Bridge a kol. 1998).

1.3.5.3 GenBank

GenBank je sekvenční nukleotidová databáze, která je přístupná veřejnosti. Vyměňuje si data s dalšími nukleotidovými databázemi – DNA DataBank of Japan (DDBJ), European Nucleotide Archive (ENA), GenBank v NCBI. Všechny tři tvoří International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC). Do databáze lze nahrát záznamy speciálními programy BankIt a Sequin. Přístup a vyhledávání na GenBank lze přes webové rozhraní <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> či přes FTP (File Transport Protocol), které lze bezplatně nainstalovat do počítače. FTP se musí každé dva měsíce aktualizovat [6].

2 Materiály a metody

2.1 Vzorky hub

Vzorky byly získány ze sbírkového materiálu od Mgr. Jiřího Kouta, PhD. (FPE ZČU). Jednalo se především o herbářové položky. Houby byly získány z různých našich i zahraničních lokalit. Seznam použitých hub je sepsán v příloze 2 (Tab. 1.).

2.2 Design primerů

Konstrukce primerů pro amplifikaci různých rDNA regionů byly navrženy tak, aby se amplifikovaly fragmenty odlišné od fragmentů, které mají většina hub společné. ITS primery byly rekonstruovány z mnoho ITS sekvencí různých hub. Tyto ITS sekvence z různých hub slouží ke zjištění taxonomických a fylogenetických vztahů mezi druhy v rámci různých rodů jako například *Colletotrichum* (hladkoplodka), *Phytophthora* a *Penicillium* (štetičkovec). Rozlišení hub na vnitrodruhové úrovni dosáhneme srovnáním více variabilních oblastí DNA pomocí tzv. ribozomální IGS sekvence. Mitochondriální DNA lze analyzovat po amplifikaci s konsenzuálními primery. ITS region se skládá ze dvou nekódujících variabilních oblastí, které se vyskytují uvnitř rDNA mezi malou a velkou podjednotkou rRNA genů. ITS region je krátký, skládá se z 500 až 800 párů bazí. Pomocí PCR mohou být snadno amplifikovány za použití univerzálních párů primerů, které jsou komplementární k sekvencím v konzervovaných oblastech. Některé starší studie se zaměřují na IGS regiony, od kterých se odvozuje RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) (Bridge a kol. 1998).

2.3 Izolace DNA

Vzorek byl nejprve homogenizován, poté rozmělněn pomocí sterilního písku a měděného homogenizátoru v lyzačním pufru CTAB, který rozpouští buněčnou stěnu. Pufr obsahoval 3% cetyltrimethylamoniumbromid. Kromě již zmíněné homogenizace byla provedena i homogenizace pomocí tekutého dusíku a pro lepší rozrušení buněčné stěny byla použita proteináza K a 1 M roztok dithithreitolu (od firmy Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha)

DNA byla izolována pomocí forenzního kitu pro kriminalistiku, klasickou metodou fenol-chloroform, chloroformem a chloroform-isopropylalkoholem. Jako nejlepší v případě izolace DNA z hub se v těchto analýzách osvědčila metoda pomocí chloroform-isopropylalkoholu.

2.3.1 Metoda fenol-chloroform

Metoda byla použita podle Sambrook a Russell (2001)

1. Do plastické zkumavky 1,5 ml (eppendorf) s homogenizovaným vzorkem v CTAB pufru bylo napipetováno stejné množství fenol-chloroformu.
2. Vzorek s fenol-chloroformem byl intenzivně třepán (vortex) tak dlouho (cca 3 minuty), dokud nevznikla emulze.
3. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 10 minut. Organická a vodná fáze musí být dobře oddělena.
4. Vodná fáze (horní) byla odebrána pomocí pipety do nové plastické zkumavky.
5. Kroky 1-4 byly znovu opakovány, kvůli odstranění proteinů ze vzorku.
6. Bylo přidáno stejné množství chloroformu a byly opakovány kroky 2-4.
7. DNA byla vysrážena pomocí octanu sodného (desetina objemu vodné fáze z rozpuštěné DNA) a 96% ethanolu ($2,5 \times (V_{\text{octanu}} + V_{\text{vzorku}})$).
8. Vlastní srážení bylo prováděno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Vysrážená DNA byla centrifugována při 9000 g 10 minut.
10. Po centrifugaci byla vysrážená DNA na dně plastické zkumavky jako sediment.
11. Supernatant (tekutina nad sedimentem) byl odebrán.
12. Sediment (DNA) byl promyt 70% ethanolem pro odstranění solí, které v něm mohly být obsaženy.
13. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 5 minut.
14. Vzorek byl vysušen a pak byla DNA rozpuštěna v elučním pufru (NucleoSpin).

2.3.2 Metoda chloroform

1. Do plastické zkumavky 1,5 ml (Eppendorf) s homogenizovaným vzorkem v CTAB pufru bylo napipetováno stejné množství chloroformu.
2. Vzorek s chloroformem byl intenzivně třepán (vortex) tak dlouho (cca 3 minuty), dokud nevznikla emulze.
3. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 10 minut, aby organická a vodná fáze byla dobře oddělena. Na rozhraní bylo možno vidět vysrážené proteiny.
4. Vodná fáze (horní) byla odebrána pomocí pipety do nové plastické zkumavky.
5. DNA byla vysrážena pomocí octanu sodného (desetina objemu vodné fáze z rozpuštěné DNA) a 96% ethanolu ($2,5 \times (V_{\text{octanu}} + V_{\text{vzorku}})$).
6. Vlastní srážení bylo prováděno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
7. Vysrážená DNA byla centrifugována při 9000 g 10 minut.
8. Po centrifugaci byla vysrážená DNA na dně plastické zkumavky jako sediment.
9. Supernatant (tekutina nad sedimentem) byl odebrán.
10. Sediment (DNA) byl promyt 70% ethanolem pro odstranění solí, které v něm mohly být obsaženy.
11. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 5 minut.
12. Vzorek byl vysušen a pak byla DNA rozpuštěna v elučním pufru (NucleoSpin)

2.3.3 Metoda chloroform-isopropylalkohol

Metoda byla provedena podle protokolu (Wilkie 1996, Rogers a kol. 1994, Simon a Warner 1996) na základě již publikované metodiky Almakarem a kol. 2012.

1. Do plastické zkumavky 1,5 ml (Eppendorf) s homogenizovaným vzorkem byl přidán CTAB pufr. Vzorek s pufrém byl inkubován po dobu 30 minut na $55\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Poté bylo napipetováno stejné množství chloroformu:isopropylalkoholu (24:1).
3. Vzorek s chloroform-isopropylalkoholem byl opatrně třepán (vortex) tak dlouho (cca 3 minuty), dokud nevznikla emulze.
4. Vzorek byl centrifugován při 1600 g 10 minut, aby organická a vodná fáze byla dobře oddělena. Na rozhraní bylo možno vidět vysrážené proteiny.
5. Vodná fáze (horní) byla odebrána pomocí pipety do nové plastické zkumavky.
6. Krok 2-5 byl znovu proveden.

7. Do vodné fáze obsahující DNA byl přidán TE pufr s vysokou koncentrací solí (složení: 1 M Tris pH 8.0, 0,5 M EDTA pH 8.0, 5 M NaCl a voda), aby se CTAB odvázovalo od DNA.
8. DNA byla vysrážena pomocí octanu sodného (desetina objemu vodné fáze z rozpuštěné DNA) a 96% ethanolu ($2,5 \times (V_{\text{octanu}} + V_{\text{vzorku}})$).
9. Vlastní srážení bylo prováděno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
10. Vysrážená DNA byla centrifugována při 9000 g 10 minut.
11. Po centrifugaci byla vysrážená DNA na dně plastické zkumavky jako sediment.
12. Supernatant (tekutina nad sedimentem) byl odebrán.
13. Sediment (DNA) byl promyt 70% ethanolem pro odstranění solí, které v něm mohly být obsaženy.
14. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 5 minut.
15. Vzorek byl vysušen a pak byla DNA rozpuštěna v elučním pufru (NucleoSpin)

2.3.4 Metoda chloroform-isopropylalkohol podle Murray a Thompson (1980)

2.3.5 Metoda pomocí forenzního kitu NucleoSpin

1. Plastická zkumavka 1,5 ml (eppendorf) s homogenizovaným vzorkem v lyzačním pufru FLB (NucleoSpin) byla inkubována v 56°C po dobu 1 – 2 hodin.
2. Vzorek byl centrifugován při 5000 g 2 minuty.
3. Bylo odebráno 400 μl supernatantu a DNA byla vysrážena pomocí octanu sodného (desetina objemu lyzačního pufru) a 350 μl 96% ethanolu.
4. Vlastní srážení bylo prováděno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Vysrážená DNA byla centrifugována při 9000 g 10 minut.
6. Po centrifugaci byla vysrážená DNA na dně plastické zkumavky jako sediment.
7. Supernatant (tekutina nad sedimentem) byl odebrán.
8. Vysrážená DNA byla promývána firemními promývacími roztoky. Pomocí BW byla promyta jednou a pomocí B5 dvakrát. Po promytí byl vzorek pokaždé centrifugován při 3000 g po dobu 3 minut.
9. Vzorek byl promyt 70% ethanolem pro odstranění solí, které v něm mohly být obsaženy.
10. Vzorek byl centrifugován při 9000 g 5 minut.

11. Vzorek byl vysušen a pak byla DNA rozpuštěna v elučním pufru (NucleoSpin)

2.4 PCR reakce

PCR komponenty byly od firmy Top-Bio, s.r.o. (Nad Safinou II č. 365, Vestec). PCR amplifikační reakce pro úseky ITS oblasti ribozomální RNA vycházela z práce Tomšovský a Kout (2013). Bylo použito několik primerů (viz Tab. 3.). Design primerů vycházel z práce White a kol. (1990). Primery ve formě oligonukleotidů syntetizovala firma generibiotech s.r.o. (Machková 587, 500 11 Hradec Králové). Program na PCR byl podle programu z práce Tomšovský a Kout (2013). Amplifikace byla iniciována denaturací při 94 °C po dobu 2 minut. K annealingu (dosednutí primerů) docházelo v prvním amplifikačním cyklu při 60°C. Potom se teplota s dalším cyklem snižovala o 1°C. Snižování teploty probíhalo u devíti cyklů. Dalších 35 amplifikačních cyklů se skládalo z denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, annealingu při 50°C také po dobu 30 sekund a elongace při 72 °C po dobu 1 minuty (Tomšovský a Kout 2013).

Tab. 3. Primery (White a kol. 1990).

Název primeru	Sekvence (5'→3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

2.5 Sekvenování

Sekvenování prováděla firma Biogen PRAHA s.r.o. ke sv. Isidoru 2293/4a, Praha 4

2.6 Vytvoření fylogenetických stromů

Sekvence byly analyzovány na webových stránkách NCBI (The National Center for Biotechnology) [6]. Vytváření fylogenetických stromů bylo prováděno v programu Mega6 a Mega7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), který byl stažen z webového rozhraní <http://www.megasoftware.net/>. V tomto programu jsem analýzu fylogenetických stromů prováděla pomocí metody maximální věrohodnosti (ang. The Maximum Likelihood) (viz Tamura a Nei 1993).

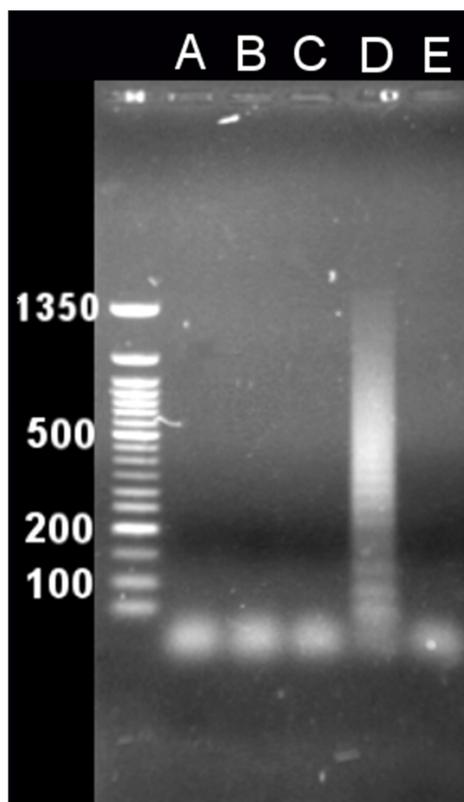
2.7 Přístroje

Pro měření koncentrace genomové DNA byl použit spektrofotometr Hitachi U-2001 se softwarem UV solutions 1.2. Amplifikace byla prováděna na cyclerech: Thermal Cycler C1000TM a BIORAD MJ Mini Personal Thermal Cycler. Pro centrifugování byla použita centrifuga Eppendorf centrifuge 5415R. Pro separaci na gelu byla použita elektroforéza Consort EV243.

3 Výsledky

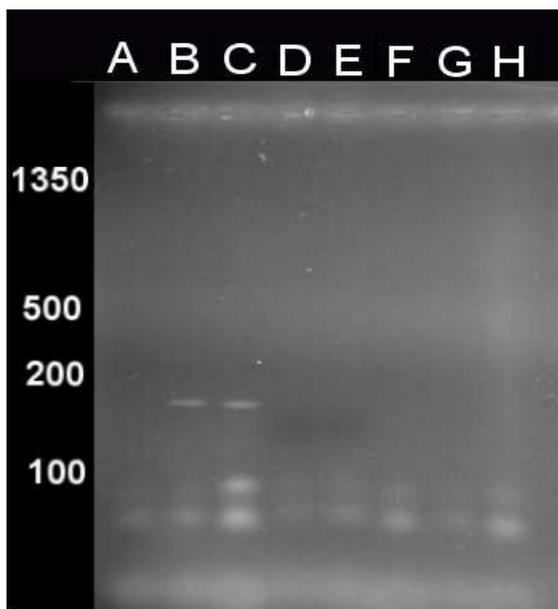
3.1 Testování metodiky

Při použití primerů ITS1 a ITS4 nedocházelo ke standardním výsledkům. Na gelu bylo detekováno více pruhů (Obr. 7.) a nebyla amplifikována žádná DNA o příslušné délce o správném počtu párů bazí. Charakter odpovídal funkčnosti pouze jednoho primeru. Při dalších testech s primery ITS1, ITS2 a ITS5 bylo potvrzeno nasedání původního primeru ITS1 a nikoliv hybridizace primeru ITS4, zřejmě se jednalo o výrobní chybu.

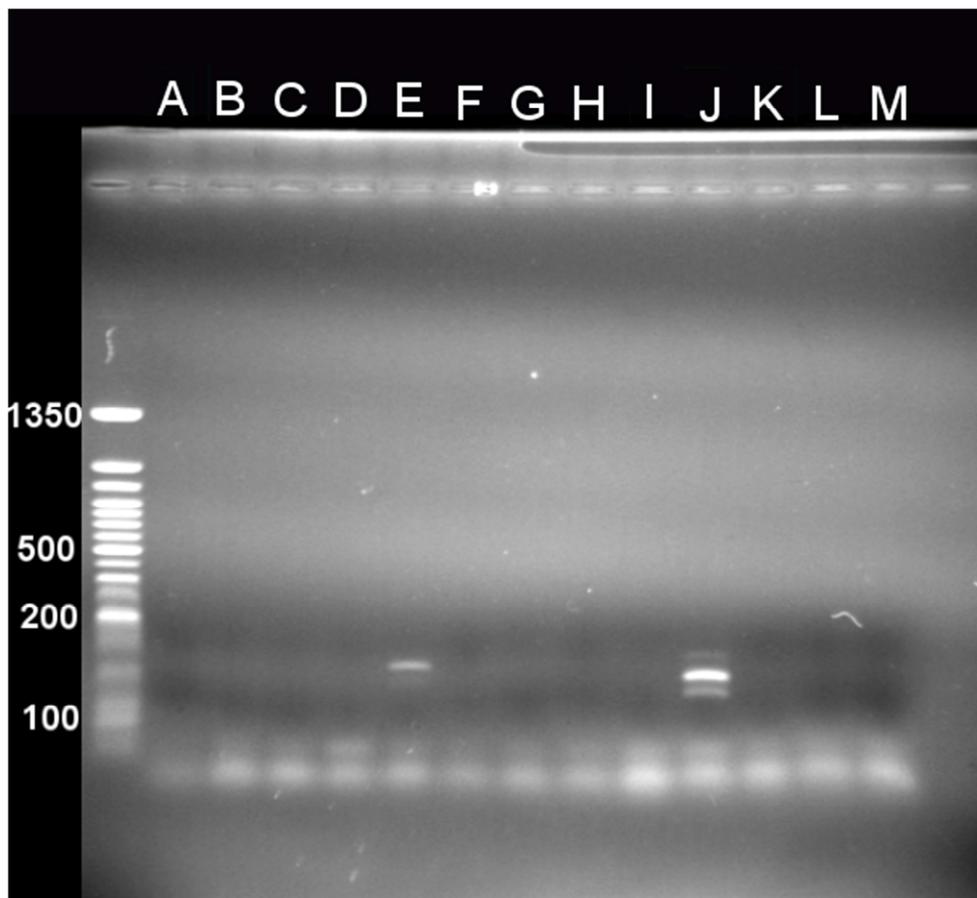


Obr. 7. Detekce na gelu s nestandardním pruhem: A - *Steccherinum* (Guatemala), B - *Phellinus* (La Palma), C - *Auricularia* sp. (ČR), D - *Peniophora rufomarginata* (ČR), E - *Auricularia* sp. (Thajsko).

Izolace byla nejprve prováděna metodou fenol-chloroform. DNA, která byla izolována touto metodou, nebylo možno správně amplifikovat. Templát pravděpodobně neobsahoval kvalitní DNA a nebyl zbaven všech nežádoucích látek, které amplifikaci následně negativně ovlivnily. Tato metoda se pro herbářové položky hub neosvědčila, proto byla poté vyzkoušena metoda čištění DNA pouze pomocí chloroformu s použitím lyzačního pufru CTAB. Izolace chloroformem byla značně účinnější. Podařilo se amplifikovat několik vzorků (Obr. 8. a Obr. 9.), které byly poslány na sekvenování.



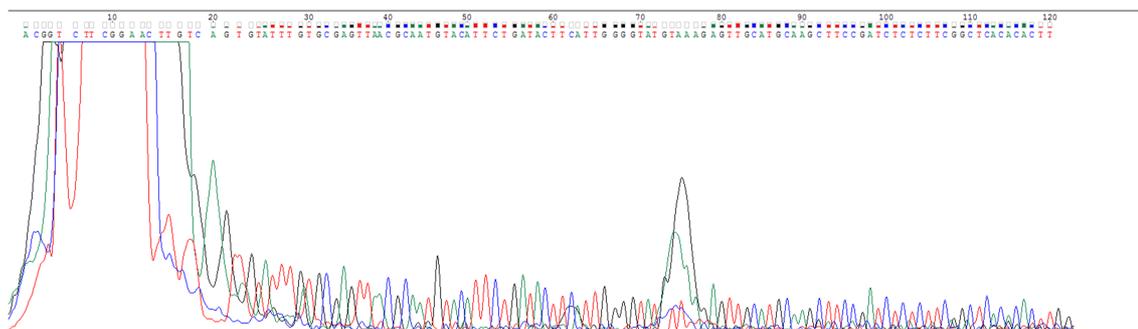
Obr. 8. Detekce na gelu, úspěšná amplifikace DNA – B, C; A – *Steccherinum* sp. (PR Petrovka), B – *Steccherinum basi-badium* (USA), C - *Stereum sanguinolentum* (ČR), D - *Phellinus* (Rusko), E – *Schizophora flavipora* (Morava), F – *Diatrype decorticata* (Plzeň), G – *Peniophora rufomarginata* (Třemošná), H - *Mycorrhaphium* (Sibiř).



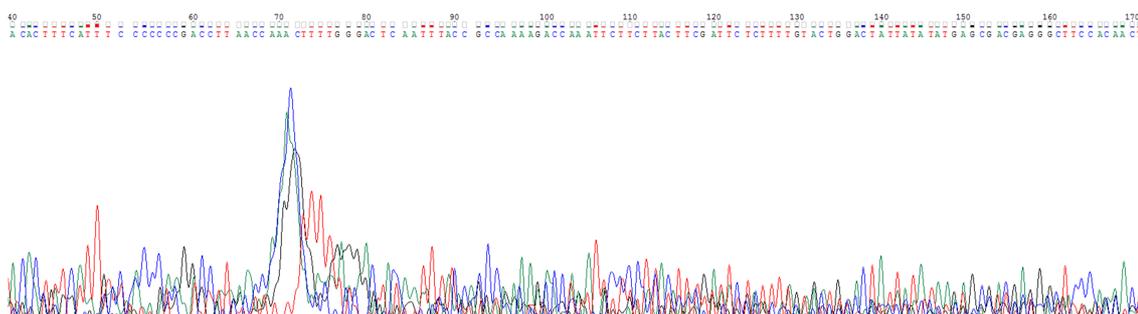
Obr. 9. Detekce na gelu o správném počtu bazí u houby *Mycorrhaphium* sp., *Calocera furcata* – A – *Steccherinum* (USA), B – *Steccherinum basi-badium* (Guatemala), C – *Phellinus* (La Palma), D – *Steccherinum*, E – *Mycorrhaphium* (Sibiř), F – *Stereum sanguinolentum*, G – *Phellinus* (Rusko), H – *Skeletocutis* (Thajsko), I – *Schizopora* (Morava), J – *Calocera furcata* (Plzeň), K – *Diatrype decorticata*, L – *Lepiota* sp., M – *Antrodia* sp..

Vzorky *Steccherinum* sp. (PR Petrovka), *Steccherinum basi-badium*., *Mycorrhaphium* sp. (Sibiř), *Stereum sanguinolentum*, *Calocera furcata* (Plzeň) byly poslány na sekvenaci. Sekvence amplifikovaných vzorků však nebyla úspěšná. Sekvence *Steccherinum basi-badium* byla kontaminována a nevykazovala podobnost se vzorky hub. Jednalo se o směs DNA různého původu, kterou se sice podařilo sekvenovat, ale sekvenci není možno přiřadit žádnému druhu. Sekvence z houby *Calocera furcata* (Obr. 11.) nebyla čitelná (angl. mismatch).

Sekvence nebyla zřejmá ani u houby *Stereum sanguinolentum* (viz Obr. 10.), a tudíž nemohl být vytvořen fylogenetický strom.

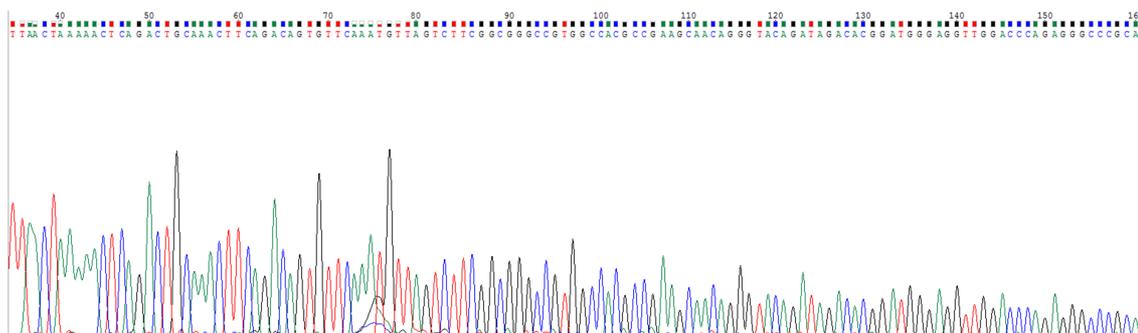


Obr. 10. Sekvenogram houby *Stereum sanguinolentum*.



Obr. 11. Sekvenogram houby *Calocera furcata*.

Správně osekvenovat se podařilo pouze vzorek z houby *Steccherinum* sp. (PR Petrovka) (viz Obr. 12.), ale jednalo se o plíseň *Aspergillus* sp..



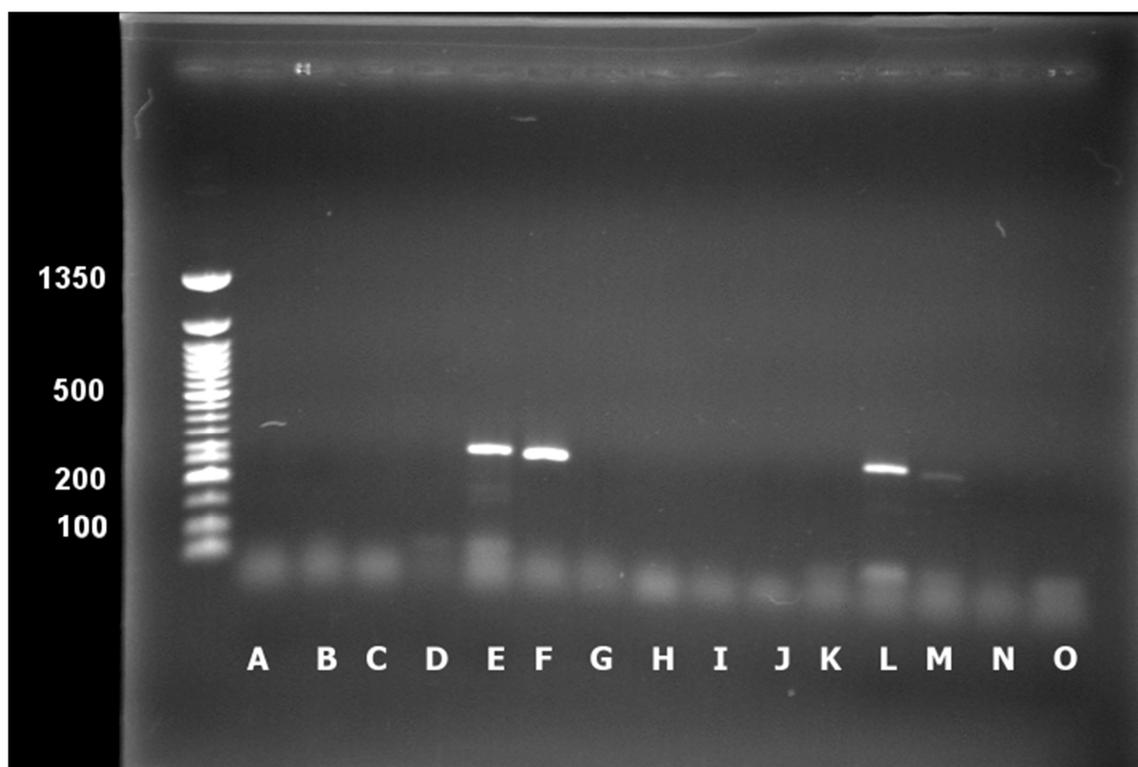
Obr. 12. Sekvenogram plísně *Aspergillus* sp..

Z této sekvence bylo tedy zjištěno, že docházelo ke kontaminaci plísněmi, které následně mohly negativně působit na PCR reakci a způsobit amplifikaci změní fragmentů (ang. *mismatch*). Dalším sekvenovaným vzorkem byl vzorek z houby *Mycorrhaphium* sp. ze Sibíře. V tomto případě se nepodařilo sekvenovat samotnou houbu *Mycorrhaphium* sp., ale kvasinku zřejmě rodu *Cryptococcus* sp..

Isolace a následná amplifikace byla nejúspěšnější z nejméně starých vzorků (např. *Calocera furcata*, která byla čerstvá a nebyla uskladněná jako herbářová

položka). Avšak ani tyto vzorky po namnožení a sekvenování nevykázaly jasně a správně čitelné sekvence, jak můžeme vidět na obrázku (Obr. 11.) na předchozí straně.

Z toho důvodu, že se podařilo amplifikovat pouze plísně a kvasinky, bylo zřejmé, že se doposud nepodařilo správně izolovat žádanou DNA ze vzorků hub. Proto byla vyzkoušena další izolační metoda vytvořena dle různých zdrojů (viz Wilkie 1996, Rogers a kol. 1994, Simon a Warner 1996). Tato metoda vykazovala nejlepší výsledky. Izolace byla prováděna pomocí chloroform-isopropylalkoholu s použitím pufru CTAB. Tato metoda se lišila oproti předchozí v několika krocích. Zhomogenizovaný vzorek s CTAB byl před použitím chloroform-isopropylalkoholu zahříván na 55 °C po dobu 30 minut. Dalším rozdílem bylo použití TE pufru s vysokou koncentrací solí, která zajišťuje odváznutí CTAB od DNA (Wilkie 1996, Rogers a kol. 1994, Simon a Warner 1996). Touto metodou se podařilo namnožit vzorek houby *Antrodiella* sp. a *Fomes* sp. (Obr. 13.).



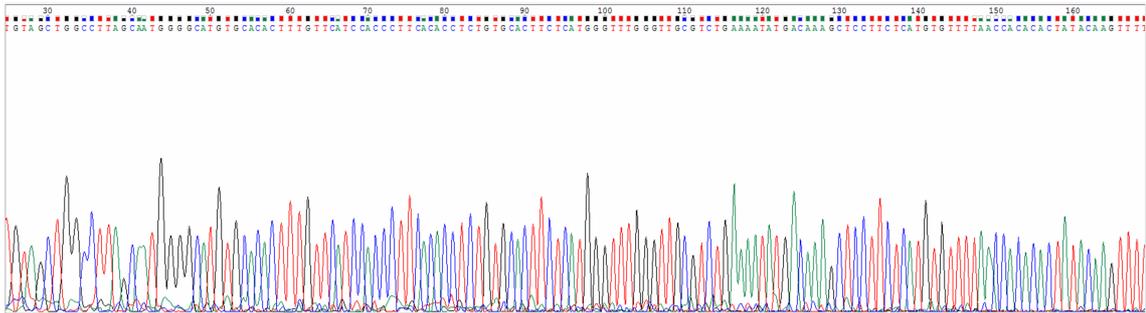
Obr. 13. Detekce na gelu, úspěšná amplifikace vzorku houby *Antrodiella* sp. a *Fomes* sp. - A - *Steccherinum* (PR Petrovka), B - *Stereum sanguinolentum*, C - *Phellinus* (Rusko), D - *Antrodiella* (Kamerun), E - *Antrodiella genistae* (Městec Králové), F - *Fomes* sp., G - *Peniophora rufomarginata* (Třemošná), H - O - shodné (metoda s merkptoethanolem).

Vzorek houby *Fomes* sp. se nepodařilo osekvenovat. Jasnou a správně čitelnou sekvenci však vykazoval vzorek *Antrodiella genistae*, kterému se věnuje následující podkapitola 3.2 Fylogenetické vztahy *Antrodiella genistae*. Úspěšná izolační metoda

byla dále aplikována na další vzorky hub. Vzorky po PCR a detekci na gelu však nevykazovaly žádné výsledky. Izolační metodu jsem proto chtěla zefektivnit. Homogenizaci jsem provedla pomocí tekutého dusíku a přidala proteinázu K a 1 M roztok dithithreitolu pro lepší průběh lyzační reakce. Vizualizace na gelu byla opět negativní, proto byly hledány možné příčiny nedosažení výsledků (viz diskuse).

3.2 **Fylogenetické vztahy *Antrodiella genistae***

Byla získána sekvence druhu *Antrodiella genistae* (viz Obr. 14).

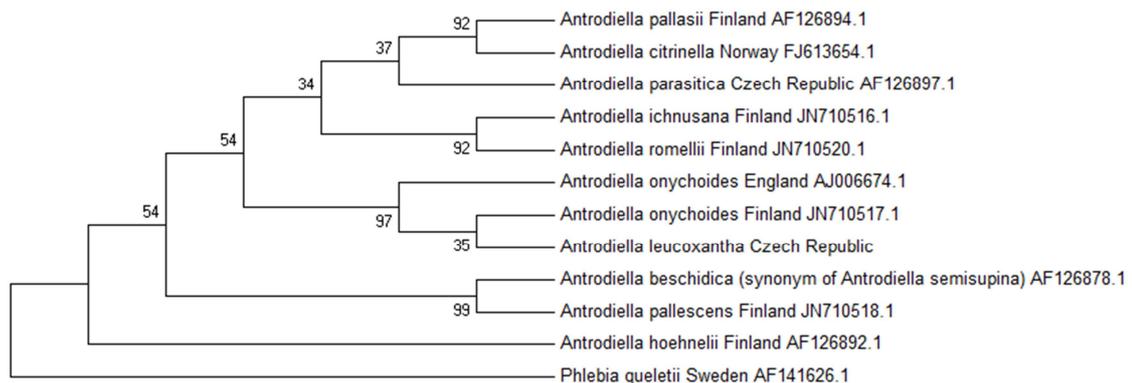


Obr. 14. Sekvenogram vzorku houby *Antrodiella genistae*.

Získaná sekvence houby *Antrodiella genistae*:

```
AAGTTGTAGCTGGCCTTAGCAATGGGGCATGTGCACACTTTGTTTCATC
CACCCTTCACACCTCTGTGCACTTCTCATGGGTTTGGGTTGCGTCTGAAAAT
ATGACAAAGCTCCTTCTCATGTGTTTTAACCACACACTATAACAAGTTTTAGA
ATGTAACAATCATGCATTAATGCATTATAATACTTTCAGCAACGGATCT
CTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
```

Na základě sekvence byl poté vytvořen fylogenetický strom. Databáze NCBI vygenerovala dvě identické sekvence v oblasti ITS1 a ITS2 (Miettinen a kol. 2011, Yao a kol. 1999). *Antrodiella genistae* vykazuje velmi těsnou příbuznost s *A. onychoides* z fylogenetického i morfologického hlediska.



Obr. 15. Molekulární fylogenetická analýza metodou maximální pravděpodobnosti (Maximum Likelihood).

Strom byl vytvořen metodou maximální pravděpodobnosti na základě modelu Tamura-Nei (Tamura a Nei 1993). Zobrazuje se strom s nejvyšší pravděpodobností (log likelihood (-719.2006)). Čísla vedle větví znázorňují procentuální zastoupení stromů, ve kterých jsou přidružené taxony seskupeny. Strom byl získán na základě aplikací algoritmů Neighbor-Join a BioNJ. Evoluční analýzy byly provedeny v MEGA6 (Tamura a kol. 2013). Sekvence pro vytvoření stromu byly zkráceny a přizpůsobeny získané sekvenci vzhledem k oblasti ITS ohraničené primery ITS1 a ITS2.

4 Diskuse

Herbářové položky jsou již obvykle morfologicky určeny specialistou na morfologii hub. Molekulární biologická analýza však může značně zpřesnit fylogenetické postavení konkrétního druhu houby. Proto je tato práce zaměřená především na izolaci DNA z herbářových položek. Izolace DNA z herbářových položek není snadná, protože při pokojových teplotách postupně dochází k degradaci DNA (Bonnet a kol. 2010) a postupnému rozkladu např. díky plísním a jejich enzymům.

Vycházela jsem z literatury a použila jsem nejčastěji navrhované postupy izolace z hub, přestože byly většinou zaměřeny na nativní vzorky hub. Nejčastěji se izolace v rámci homogenizace prováděly pomocí tekutého dusíku v roztoku CTAB a čištění se provádělo několika způsoby. Nejčastějším způsobem čištění byl fenol-chloroform či chloroform-isopropylalkohol.

Nejprve jsem prováděla homogenizaci celkové DNA pomocí homogenizátoru s pískem a čištění bylo prováděné metodou fenol-chloroformem. Tento postup se poté ukázal jako nevhodný na herbářové položky a starší vzorky. Z počátku byly při PCR reakci použity primery ITS1 a ITS4, které navrhl již v roce 1990 White a kol. Ty v kombinaci s izolací pomocí fenol-chloroformu nedokázaly správně amplifikovat DNA z herbářových položek hub. Izolace zprvu nebyla úspěšná pravděpodobně proto, že nebyla dostatečně rozrušena chitinózní stěna houbových buněk. I v případě, že se DNA amplifikovala, došlo k namnožení DNA o nestejně délce, proto se na gelu podařilo namnožit více pruhů (Obr. 7.). Na gelu byly detekovány nestandardní pruhy. Tyto pruhy jsou typické pro PCR s jedním funkčním primerem, podobně jako u sekvenční Sangerovy reakce. Po tomto zjištění byly syntetizovány opakovaně další primery pro oblast ITS4 podle White a kol. (1990). Po syntéze nových primerů ITS4 se DNA opět nedařilo amplifikovat, byly proto vyzkoušeny různé kombinace primerů, z nichž nejosvědčenější byla kombinace primeru ITS1 a ITS2. V okamžiku, kdy byly použity oba správné a fungující primery, sekvenace ukázala směsi DNA různého původu, či kontaminace. Ani čištění po vyříznutí z gelu a opakované PCR reakci nebyly úspěšné. Z více testovaných programů PCR, se nejvýrazněji osvědčil program gradientového nasedání primerů uvedený v práci Tomšovský a Kout (2013). Přesto nedošlo k potřebné amplifikaci DNA.

Za použití izolace pomocí chloroformu, za použití primerů ITS 1 a ITS2 a použití programu podle Tomšovského a Kout 2013 byly na gelu detekovány pruhy o správném

počtu párů bazí. Detekce byly úspěšné u vzorku *Steccherinum* sp. (PR Petrovka), *Steccherinum basi-badium*, *Mycorrhaphium*, *Stereum sanguinolentum*, *Calocera furcata* (Plzeň). Tyto vzorky byly poslány na sekvenaci. Sekvence však nebyla úspěšná. Zřejmě byla DNA amplifikována společně s kontaminacemi, což byla zřejmě DNA z plísní či kvasinek, které primery ITS jsou také schopny zachytit a amplifikovat. Nemohl být tedy vytvořen fylogenetický strom vybraných druhů hub. Amplifikace čerstvých hub *Calocera viscosa* (Plzeň) a *Calocera furcata* (Plzeň) byly o poznání mnohem lepší než amplifikace herbářových položek. Obdobné to bylo i u detekce na gelu. Sekvenovat se podařilo pouze vzorek ze *Steccherinum* sp. (lokality Petrovka), jednalo se však o plíseň *Aspergillus* sp.. Docházelo tedy ke kontaminaci plísněmi, které následně mohly negativně působit na PCR reakci. Dalším sekvenovaným vzorkem byl vzorek z houby *Mycorrhaphium* sp. (z některé blíže nespecifikované sibiřské lokality). Opět se ale nejednalo o očekávanou sekvenci houby, nýbrž o kvasinku *Cryptococcus* sp. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo správně sekvenovat žádnou houbu, pravděpodobně nedošlo k amplifikaci požadovaného druhu houby a k chybě mohlo dojít u samotné izolace. Je otázkou, proč u vzorků, kde vyšla jasně čitelná sekvence kvasinky či plísně, kontaminace nevytvořily žádnou změť (angl. mismatch). Zjevně nedošlo k izolaci DNA z testované houby. DNA byla buď zničená, nebo špatně izolovaná.

Na základě tohoto předpokladu byly vyzkoušeny další dvě metody izolace - izolace chloroform-isopropylalkohol s použitím lyzačního pufru CTAB podle (Wilkie 1996, Rogers a kol. 1994, Simon a Warner 1996) a izolace podle Murray a Thompson (1980). Izolace chloroform-isopropylalkohol s použitím CTAB byla za všech provedených izolací nejlepší. Izolace zahrnovala několik podstatných kroků. Homogenizovaný vzorek s pufrům CTAB byl zahříván na 55 °C po dobu 30 minut pro lepší rozrušení buněčné stěny. Po použití chloroform-isopropylalkoholu byl přidán TE pufr s vysokou koncentrací solí. DNA se totiž od CTAB odváže jen díky přítomnosti vysoké koncentraci solí. U vzorku houby *Antrodiella genistae* a houby *Fomes* sp. byla izolovaná DNA správně amplifikována. Čitelnou sekvenci však poskytl jen vzorek *Antrodiella genistae*. Vzorek houby *Fomes* sp. obsahoval směs sekvencí různého typu (angl. mismatch). Na základě morfologie byl vzorek opakovaně určen jako *Antrodiella genistae*. Sekvence však podle databáze NCBI (National center for biotechnology) odpovídala nejvíce houbě *Antrodiella onychoides* (outkovečka bezpřezkatá). Morfologicky se tyto dva druhy liší. *Antrodiella genistae* má rozeznatelné přezky na

generativních hyfách, zatímco *A. onychoides* tyto přezky neobsahuje. Sekvence *Antrodiella genistae* je první sekvence tohoto druhu. V databázi *GenBank* se sekvence ITS oblasti *A. genistae* nenachází ani pod synonymním pojmenováním *A. leucoxantha* [6]. Z fylogenetického hlediska je zajímavé, že sekvence odpovídá zcela sekvencím *A. onychoides* z jiných částí světa. Pro lepší porovnání by bylo vhodné sekvenovat delší úsek ITS oblasti. Starší studie již potvrdily těsnou blízkost *A. genistae* s *A. onychoides*, kde bylo dokonce uvedeno, že *A. genistae* vychází z *A. onychoides* (Ryvarden a Gilbertson 1993). V našem případě byly zvoleny primery ITS1 a ITS2, které se rovněž používají, i když častěji se používá oblast ITS1 a ITS4, které zahrnují větší oblasti. Ve fylogenetickém stromu jsem použila srovnání sekvencí ze vzorku z Finska a Anglie (viz Obr. 15.). Prozrazuje to velmi těsnou evoluční blízkost. Fylogenetický strom byl vytvořen z většiny evropských sekvencí rodu *Antrodiella* dostupných v databázi *GenBank* [6]. Fylogenetické určení na základě ITS oblasti v jednotlivých větvích do značné míry odpovídá morfologickému určení.

Izolace se ukázala být úspěšná, proto byla aplikována u nových vzorků. Bohužel se žádný z těchto vzorků nepodařilo amplifikovat. Proto byly pro zlepšení lyzačního procesu použity další prostředky (tekutý dusík, proteináza K, 1 M roztok dithiothreitolu). Ani po zdokonalení lyzačního procesu nebylo dosaženo předpokládaných výsledků. Dále byla testována funkčnost PCR cycleru tak, že PCR reakce byla prováděná současně na dvou různých cyclerech. PCR cycler byl však plně funkční. Izolace DNA hub, které jsme vyzkoušeli, se podařila pouze v některých případech a bez žádné spojitosti. Metoda byla pro kontrolu vyzkoušena na *Saccharomyces cerevisiae*, kde by nemělo být obtížné DNA izolovat. Při detekci na gelu však ani izolovaná DNA z kvasinek nevykazovala jasný pruh o správném počtu bazí. Proto bylo provedeno měření předpokládané izolované genomové DNA na spektrofotometru. Nejprve byl vyzkoušen vzorek z kvasinek, u kterého bylo zjištěno, že izolovaný produkt obsahuje DNA ve vysoké koncentraci (viz Příloha 3 Obr. 1.). Poté bylo měření vyzkoušeno ještě na jeden ze zkoumaných vzorků (viz Příloha 3 Obr. 2.), kde se také potvrdila přítomnost DNA. Jedinou možnou příčinou, proč detekce na gelu nevypadá podle předpokladu, může být to, že se DNA stále špatně amplifikuje. Z toho vyplynulo, že DNA se mi podařilo izolovat, došlo však pravděpodobně k tomu, že použitý lyzační pufr CTAB znemožnil přístup primerů potřebných k amplifikaci, což je také uvedeno v některých článcích a protokolech [11].

Vzhledem k tomu, že se podařilo správně sekvenovat pouze jednoho zástupce hub, můžeme kromě špatné amplifikace, také usuzovat, že herbářové položky pravděpodobně nebyly uskladněné nejvhodněji a jejich DNA podlehla degradaci (Bonnet a kol. 2010). Tato degradace DNA mohla být způsobena i již zmíněnými plísněmi, které zřejmě kontaminovaly i úspěšně amplifikované vzorky svojí DNA. Ke kontaminaci mohlo také dojít při manipulaci se vzorky. Vzhledem k tomu, že se na pracovišti tato metodika musela teprve zavádět, byly zkoušeny různé metody izolace, došlo k aplikování nevhodných primerů a nenavázání primerů na DNA, došlo ke značnému opoždění, které se projevilo ve finální fázi malým počtem úspěšně sekvenovaných vzorků.

5 Závěr

Cílem této práce byla izolace a analýza DNA hub, které pocházely většinou z herbářových položek, jejich sekvenace a následné vytvoření fylogenetických stromů pro konkrétní druhy hub. Izolace DNA hub byla navzdory očekávání komplikovanější a byla úspěšná jen u několika vzorků. Vzorky byly po správném namnožení sekvenovány. Většina sekvencí nebyla použitelná, jelikož některé sekvence, ze kterých by se dal vytvořit fylogenetický strom, nepatřily předpokládaným druhům hub, ale patřily plísním či kvasinkám, a pouze jedna sekvence patřila morfologicky určené houbě. V této práci byla poprvé úspěšně sekvenována *A. genistae*, která prokázala velmi těsnou příbuznost s *A. onychoides*. Pomocí nově nalezené sekvence a sekvencí z databáze GenBank byl vytvořen fylogenetický strom pro nejbližší příbuzné druhu *Antrodiella genistae*.

6 Resumé

This bachelor's thesis is focused on molecular biological analysis for phylogenetic specification of some fungi species. I mostly used herbarium fungi. Analysis contained isolation, PCR, sequencing and creating phylogenetic trees. The main part was isolation of DNA because DNA from herbarium fungi is hard to get it. The best way how to isolate DNA from herbarium fungi was chlorophorm-isopryl alcohol isolation after using CTAB in 55 °C for 30 minutes with CTAB removing by highsalt TE buffer. I isolated just some DNA strings, but most of them was just contamination of mould or yeast. I got only one correct sequence and created phylogenetic tree of the sequence. It was sequence of *Antrodiella genistae*, which is very close to *A. onychoides*.

7 Literatura

ALMAKAREM, Armal S. Abu, Katie L. HEILMAN, Heather L. CONGER, Yury M. SHTARKMAN a Scott O. ROGERS, 2012. Extraction of DNA from plant and fungus tissues in situ. *BMC Research Notes*. **5**(266). [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1186/1756-0500-5-266. Dostupné z: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-266>

ANTONÍN, Vladimír, 2006. *Encyklopedie hub a lišejníků*. Praha: Academia, 472 s. ISBN 80-200-1476-4.

BENEŠOVÁ, Marie, 2012. *Taxonomické zařazení rodu Shigella*. Pardubice. 48 s. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

BONNET, Jacques, Marthe COLOTTE, Delphine COUDY, Vincent COUALLIER, Joseph PORTIER, Bénédicte MORIN a Sophie TUFFET, 2010. Chain and conformation stability of solid-state DNA: implications for room temperature storage. *Nucleic Acid Researchs* [online]. **38**(5), 1534-1546 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2836546/>

BRIDGE, P. D., D. K. ARORA, C. A. REDDY a R. P. ELANDER, 1998. *Applications of PCR in mycology*. New York: CAB International. 375 s. ISBN 0851992331.

DEGEN, Hans-Joachim, Annette DEUFEL, Doris EISEL, Grünwald-Janho STEFANIE a Keeseey JOE, 2006. *PCR applications manual* [online]. 3. Germany: Roche Diagnostics, [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf>

FELSENSTEIN J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**(4),783-791.

HOLEC, Jan, Antonín BIELICH a Miroslav BERAN, 2012. *Přehled hub střední Evropy*. Praha: Academia, 624 s. ISBN 978-80-200-2077-2.

JANÁKOVÁ, Tereza, 2012. *Využití molekulárně-genetických metod při výzkumu kolorektálního karcinomu*. Brno. 54 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Vedoucí práce Prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

KUBÁT, Karel, Tomáš KALINA, Jaroslav KOVÁČ, Dagmar KUBÁTOVÁ, Karel PRACH a Zdeněk URBAN, 1998. *Botanika*. Praha: Scientia, počet stran. ISBN 80-7183-053-4.

MIETTINEN, Otto, Ellen LARSSON, Elisabet SJÖKVIST a Karl-Henrik LARSSON, 2011. Comprehensive taxon sampling reveals unaccounted diversity and morphological plasticity in a group of dimitic polypores (Polyporales, Basidiomycota). *Cladistics*. **28**, 251-270.

MIETTINEN, Otto, Tuomo NIEMELÄ a Wjacheslav SPIRIN, 2006. Northern Antrodiella species: the identity of *A. semisupina*, and type studies of related taxa. *Mycotaxon* [online]. **96**, 211-239 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/274836253_Northern_Antrodiella_species_The_identity_of_A_semisupina_and_type_studies_of_related_taxa

MURRAY, M.G. a W.F. THOMPSON, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acid research*. USA, **8**(19), 5.

ROGERS, Scott O. a Arnold J. BENDICH, 1994. Extraction of total cellular DNA from plant, algae and fungi. *Plant Molecular Biology Manual*, **D1**: 1-8.

ROSYPAL, Stanislav, 1997. *Úvod do molekulární biologie*. 2. rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal. 270 s. ISBN 8023881868.

RYVARDEN, L. a R.L. GILBERTSON, 1993. *European Polypores*. Norsko: Fungiflora A/S. ISBN 82-90724-12-8.

SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL, c2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* [online]. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press [cit. 2017-03-24]. ISBN 08-796-9577-3. Dostupné z: http://download.bioon.com.cn/view/upload/201107/30164353_5573.pdf

SIMON, A. a J. WARNER, 1996. *Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction*. England: Gary D. Foster and David Twell (ed) Plant Gene Isolation, s. 56-58.

TAMURA, K. a M. NEI, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. **10**, 512-526.

TAMURA K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI a S. KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. **30**, 2725-2729.

TOMŠOVSKÝ, Michal a Jiří KOUT, 2013. Porodaedalea cedrina (Basidiomycota, Agaricomycetes, Hymenochaetaceae) - a new polypore from the Mediterranean area. *Nova Hedwigia*. **96**(3-4), 419-426.

VAMPOLA, Petr, 1991. Antrodiella onychoides. *Česká mykologie*. Praha: Československá vědecká společnost pro mykologii: Academia, **45**(3), 81-84. ISSN 0009-0476.

WHITE, T.J. , T. BRUNS, S. LEE a J. TAYLOR, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. INNIS, Michael A., David H. GELFAND, John J. SNINSKY a Thomas J. WHITE, 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [online]. USA: AcademicPress. 315 – 322 s. [cit. 2017-03-24]. ISBN 0123721814. Dostupné z: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>

WILKIE, S, 1996. *Genomic DNA Isolation, Southern Blotting and Hybridization*. New York: M. S. Clark (ed) *Plant Molecular Biology – A Laboratory Manual*, Springer, s. 3-9.

YAO, Y.J., D.N. PEGLER a M.W. CHASE, 1999. Application of ITS (nrDNA) sequences in the phylogenetic study of *Tyromyces* s.l. *Mycological research*. **103**(2), 219-229.

8 Internetové zdroje

[1] Fungi. *Tree of Life Web Project* [online]. ©1995 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://tolweb.org/Fungi/2377>

[2] Mykologické sbírky - hlavní typy předmětů. *Národní muzeum* [online]. [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.nm.cz/mapa-webu-detail/Oddeleni-PM/Mykologicke-oddeleni/Mykologicke-sbirky-hlavni-typy-predmetu/>

[3] Mykologický herbář Jihočeského muzea. *Jihočeské muzeum v Českých Budějovicích* [online]. [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.muzeumcb.cz/odborna-pracoviste/prirodovedne-oddeleni/mykologie/herbar-hub/>

[4] *LabGuide.cz – Průvodce laboratoří* [online]. ©2014 [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://labguide.cz>

[5] HAMPL, Vladimír, c2016. *Molekulární taxonomie* [online]. Praha: Hampl. [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~vlada/moltax/>

[6] *GenBank Home* [online]. Maryland: National Center for Biotechnology Information [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

[7] Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, c2017 [cit. 2017-03-25]. ISSN 1559-6095. Dostupné z: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.long>

[8] Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. *Vilgalys Mycology Lab - Duke University* [online]. Durham: Vilgalys lab [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

[9] NĚMCOVÁ, Lenka, 2008. Opora preparace a konzervace přírodnin I. *KATEDRA BIOLOGIE: Přírodovědecká fakulta Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem* [online]. Ústí nad Labem: Katedra biologie PřF UJEP, 2005 [cit. 2017-04-22].

Dostupné z:

http://old.biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory_2014/Opora_Preparace%20a%20konzervace%20prirodnin%20I.pdf

[10] PRŮŠA, Richard, 1998. Učebnice biochemie - RFLP (déřkový polymorfismus restrikčních fragmentů). *UČEBNICE BIOCHEMIE* [online]. Jan LÁNY, Jan VEJVALKA a Karel KOTAŠKA. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <https://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa3.htm>

[11] *Beginning Molecular Biology Laboratory Manual* [online]. Maryland: Department of Biological Sciences, 2010 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: <http://userpages.umbc.edu/~jwolf//m4.htm>

9 Seznam obrázků

Obr. 1. Silikátová kolonka	13
Obr. 2. Izolace fenol-chloroform	14
Obr. 3. Jednotka rDNA.	18
Obr. 4. Jednotka rDNA s oblastmi ITS.....	18
Obr. 5. Fylogenetický strom.	21
Obr. 6. Popis fylogenetického stromu.	21
Obr. 7. Detekce na gelu s nestandardním pruhem.	28
Obr. 8. Detekce na gelu, úspěšná amplifikace DNA – B, C.....	29
Obr. 9. Detekce na gelu o správném počtu bazí u houby <i>Mycorrhaphium</i> sp., <i>Calocera furcata</i>	30
Obr. 10. Sekvenogram houby <i>Stereum sanguinolentum</i>	31
Obr. 11. Sekvenogram houby <i>Calocera furcata</i>	31
Obr. 12. Sekvenogram plísně <i>Aspergillus</i> sp.....	31
Obr. 13. Detekce na gelu, úspěšná amplifikace vzorku houby <i>Antrodiella</i> sp. a <i>Fomes</i> sp..	32
Obr. 14. Sekvenogram vzorku houby <i>Antrodiella genistae</i>	34
Obr. 15. Molekulární fylogenetická analýza metodou maximální pravděpodobnosti (Maximum Likelihood).....	34

10 Seznam tabulek

Tab. 1. PCR protokol	15
Tab. 2. Koncentrace agarosy v závislosti na rozsahu separace.	19
Tab. 3. Primery.	27

11 Seznam příloh

Příloha 1: Morfologie některých druhů *Antrodiella*

Příloha 2: Tabulka vzorků

Příloha 3: Měření spektrofotometrem

Příloha 1: Morfologie některých druhů *Antrodiella*

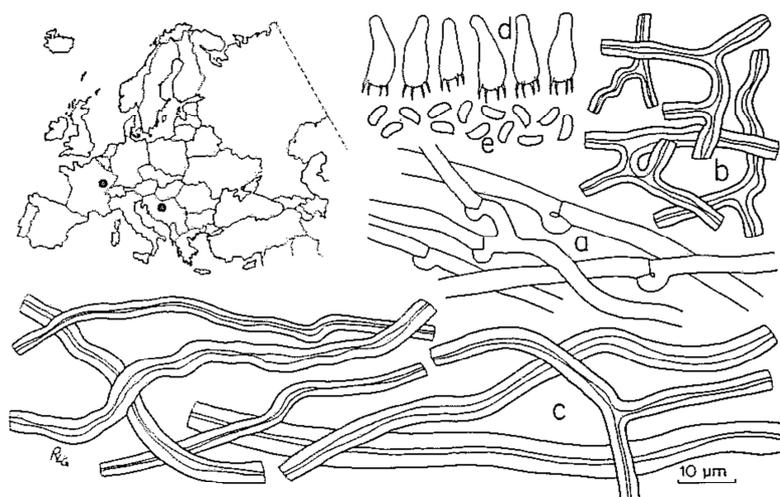


Fig. 64. *Antrodiella genistae* (Bourdot 3975). a, tramal generative hyphae; b, tramal binding hyphae; c, tramal skeletal hyphae; d, basidia; e, basidiospores.

Obr. 1. Morfologie *Antrodiella genistae* (Ryvarden a Gilbertson 1993).

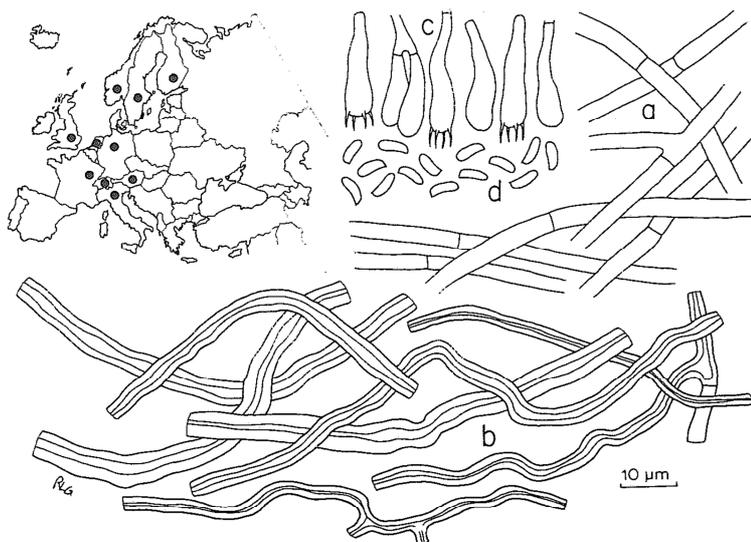


Fig. 66. *Antrodiella onychoides* (Gustavsson 1173). a, tramal generative hyphae; b, tramal skeletal hyphae; c, basidia; d, basidiospores.

Obr. 2. Morfologie *Antrodiella onychoides* (Ryvarden a Gilbertson 1993).

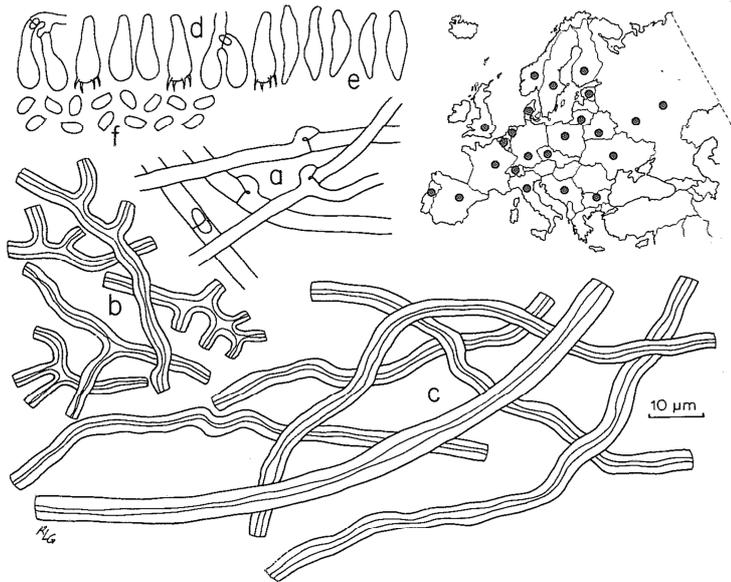


Fig. 70. *Antrodiella semisupina* (RLG 16597). a, tramal generative hyphae; b, tramal binding hyphae; c, tramal skeletal hyphae; d, basidia; e, fusoid cystidioles; f, basidiospores.

Obr. 3. Morfologie *Antrodiella semisupina* (Ryvarden a Gilbertson 1993).

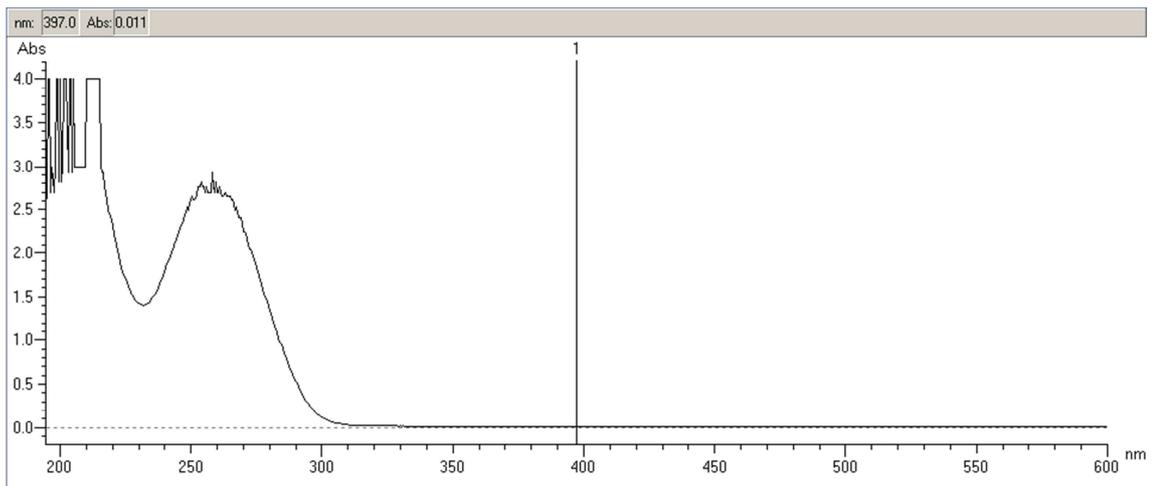
Příloha 2: Tabulka vzorků

Tab. 1. Použité vzorky.

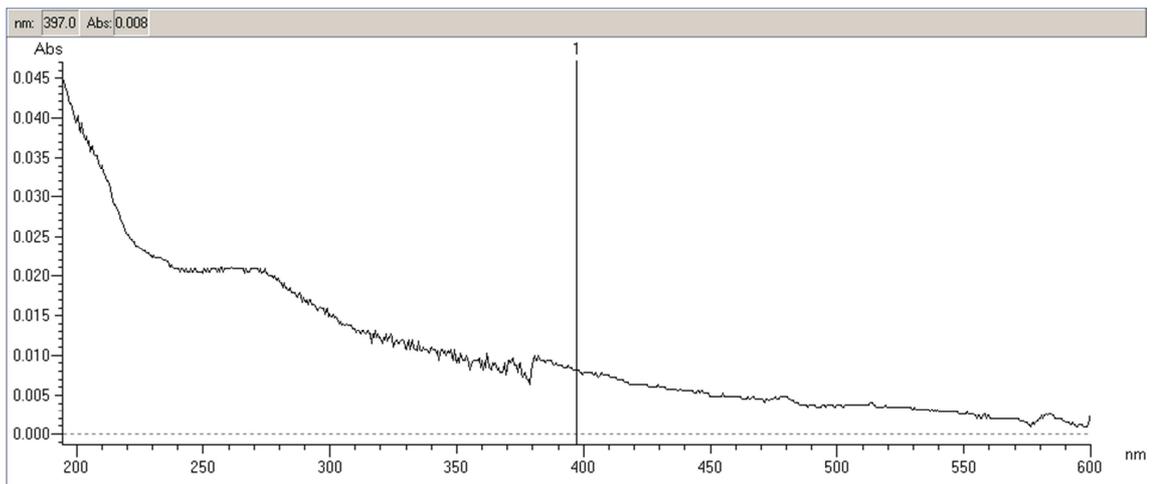
Vědecký název	Místo sběru	Datum sběru
<i>Steccherinum muraskhinski?</i> (1)	USA	25. 4. 2009
<i>Steccherinum</i> sp. (2)	Guatemala	21. 11. 2016
<i>Steccherinum</i> sp. (3)	Česká republika (Plzeň - PR Petrovka)	15. 9. 2013
<i>Phellinus</i> sp. (4)	Kanárské ostrovy (La Palma)	28. 4. 2000
<i>Steccherinum basi-badium</i> (5)	USA	16. 9. 1977
<i>Mycorrhaphium</i> sp. (6)	Rusko (Sibiř)	21. 9. 2007
<i>Stereum sanguinolentum</i> (7)	Česká republika (Plzeň – Bukovec)	3. 10. 2015
<i>Auricularia</i> sp. (8)	Česká republika (NPR Rendez-vous)	29. 10. 2015
<i>Phellinus</i> sp. (9)	Rusko (Kurkula)	27. 7. 2009
<i>Auricularia</i> sp. (10)	Thajsko (Bangkok)	10. 8. 2014
<i>Skeletocutis</i> cf. <i>nivea</i> (11)	Thajsko	březen 2009
<i>Schizopora flavipora</i> (12)	Česká republika (Morava)	28. 10. 2015
<i>Calocera viscosa</i> (20)	Česká republika (Plzeňsko, Vrtbo)	2. 10. 2016
<i>Calocera furcata</i> (21)	Česká republika (Plzeňsko, Vrtbo)	2. 10. 2016
<i>Diatrype decorticata</i> (22)	Česká republika (Plzeň)	30. 9. 2016
<i>Peniophora rufomarginata</i> (KL)	Česká republika (Třemošná)	30. 9. 2016
<i>Lepiota</i> sp. (31)	Česká republika (Plzeň, Bolevecké rybníky)	17. 10. 2016
<i>Antrodia pseudosinosa?</i> (32)	Česká republika (Plzeň, Bolevecké rybníky)	17. 10. 2016
<i>Antrodiella</i> sp. (33)	Kamerun	17. 12. 2007
<i>Antrodiella genistae</i> (syn. <i>A. leucoxantha</i>) (34)	Česká republika (Městec Králové)	6. 5. 2005
<i>Fomes fomentarius</i> (35)	Česká republika (Plzeňsko, Krkavec)	2. 4. 2017
<i>Hapalopilus nidulans</i> (36)	Česká republika (Nová ves)	1. 7. 2014

<i>Sidera</i> sp. (37)	Kanárské ostrovy (La Gomera)	16. 4. 2000
<i>Stereum complicatum</i> (38)	Kanárské ostrovy	27. 2. 2003
<i>Stereum reflexulum?</i> (39)	Kanárské ostrovy (Tenerife, Anaga)	17. 10. 2014
<i>Steccherinum ochraceum</i> (40)	Kanárské ostrovy (Tenerife)	7. 11. 2014
<i>Steccherinum</i> sp. (41)	Kanárské ostrovy (La Gomera)	16. 4. 2000
<i>Porostereum spadiceum</i> (42)	Itálie (Nuoro)	22. 11. 1999
<i>Laxitextum bicolor</i> (43)	USA (Minnesota)	16. 9. 1977
<i>Laxitextum bicolor</i> (44)	Česká republika (Třeboňsko)	26. 4. 2008
<i>Junghuhnia</i> sp. (45)	Česká republika (Plzeň, Chotíkovský les)	26. 2. 2017
<i>Boletopsis grisea</i> (46)	Kanárské ostrovy (Tenerife, Anaga)	31. 10. 2014
<i>Hyphoderma</i> (sp.) (47)	Kanárské ostrovy (Tenerife, Güímar)	22. 11. 2014
<i>Tremella globospora</i> (48)	Kanárské ostrovy (Tenerife, Anaga)	2. 11. 2014

Příloha 3: Měření spektrofotometrem



Obr. 1. Měření absorpce v závislosti na změně spektra světla u *Saccharomyces cerevisiae*.



Obr. 2. Měření absorpce v závislosti na změně spektra světla u *Tremella globospora*.