

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra speciální produkce rostlinné
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická variabilita entomopatogenních hub rodu *Isaria*
v České republice

Autor diplomové práce:

Bc. Aneta Čápková

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Kateřina Šimáčková, Ph.D.
ENTÚ BC AV ČR, v.v.i.

Konzultant:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
ZF JU v ČB

2015
České Budějovice

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta ČÁPOVÁ**
Osobní číslo: **Z13740**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Genetická variabilita entomopatogenních hub rodu *Isaria* v České republice**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Cíl práce:

Vytvoření kryo-kolekce vzorků entomopatogenních hub rodu *Isaria*. Získaných v rámci monitoringu v České republice. Zhodnocení jejich genetické variability pomocí technik molekulárních markerů, vytvořením fylogenetických stromů na základě získaných sekvenčních dat zkoumaných lokusů. Zhodnocení taxonomického zařazení studovaných vzorků po morfologické analýze.

1. Stručný úvod do problematiky a nástín jejího současného významu.
2. Literární přehled - charakteristika entomopatogenních hub použitých v práci, principy technik molekulárních markerů a jejich význam v taxonomii hub.
3. Metodika - charakteristika analyzovaných kmenů, kultivace jednotlivých kmenů hub, izolace DNA, výběr vhodných lokusů, metodika PCR, sekvenování a statistického hodnocení.
4. Výsledková část - porovnání jednotlivých výsledných sekvencí s výsledky v databázi NCBI a taxonomické zařazení zkoumaných kmenů pomocí fylogenetické analýzy pro jednotlivé testované lokusy.
5. Diskuze - porovnání a posouzení významu vlastních výsledků s literárními údaji, zhodnocení použití dosažených dat a doporučení.
6. Závěr - přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení vyplývajících z řešené problematiky
7. Seznam literatury - v abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace"


Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Caetano-Anolles G. a kol. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Liss NY, 1997, 364 s.
Arora D. K. a kol. Applied mycology and biotechnology: Volume 4 Fungal genomics. Elsevier B.V., 2004, 415 s.
Stock S.P. a kol. Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques. CABI UK, 2009, 417 s.
Arora D. K. a kol. Handbook of Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., 2004, 592 s.
Innis, M.A. a kol. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990, 482 s.
Butt T.M. a kol. Fungi as Biocontrol agents. CABI UK, 2001, 390 s.
Váňa, J. a kol. Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 1998, 164 s.
Šmarda J. a kol. Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 2008, 188 s.
Retrospektivní rešerše z databází: Web of Science, Biological abstracts, NCBI.


Vedoucí diplomové práce: **Ing. Kateřina ŠIMÁČKOVÁ, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: **11. února 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2015**


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studená 13
370 05 České Budějovice

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 11. února 2014

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

10. 4. 2015 v Českých Budějovicích

.....

Ráda bych poděkovala především své vedoucí diplomové práce Ing. Kateřině Šimáčkové, Ph.D. za její čas, odborné rady, pomoc při zpracování výsledků, úsilí a hlavně trpělivost. Poděkování také patří prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. který mě provázel celým studiem oboru Zemědělské biotechnologie na ZF JČU v ČB. Dále chci poděkovat pracovníkům KSPR ZF JČU v ČB, kteří mají velikou zásluhu na přípravě vzorků, hlavně pak Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za odborné rady v oblasti mykologie. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

ABSTRAKT

V mé diplomové práci se zabývám genetickou variabilitou entomopatogenních hub rodu *Isaria* v České republice. Zástupci tohoto rodu se nacházejí v půdě a napadají všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji napadají larvy a kukly. Využití entomopatogenních hub rodu *Isaria* je zejména v rámci biologické ochrany rostlin.

U mitosporických hub je často velmi obtížná jejich precizní identifikace, taxonomie je často nejasná, u řady rodů včetně rodu *Paecilomyces/Isaria* se prokázala jejich polyfyletičnost. Základem klasifikace hub jsou morfologické studie, taxonomie je založena na pohlavních znacích, vzhledem k jejich absenci jsou pak u mitosporických hub nejpoužívanějšími znaky pro jejich identifikaci tvar a velikost konidií a biologické vlastnosti (klíčení spor, testy biologické účinnosti). Nicméně identifikace na základě morfologických markerů je nepřesná a velmi variabilní. Řešením se nedávno stalo využití molekulárních DNA markerů, které se staly díky nedostatku morfologických charakteristik neocenitelnými a to v oblasti ekologie, biologie a genetiky hub.

V mé práci využívám jako molekulární marker ITS (internal transcribed spacer) region. ITS regiony jsou součástí rDNA, ale nejsou kódující, a proto je pravděpodobné, že se v nich během evoluce nahromadily změny a jedná se o velmi variabilní úseky DNA. Tento fakt je důvodem jejich hojného využití v taxonomických analýzách mnohých organismů. Výstupem mé práce je fylogenetický strom, který je vytvořen ze sekvencí ITS regionů vzorků entomopatogenních hub rodu *Isaria* získaných během monitoringu v letech 2013-2014 v České republice. Na jeho základě jsem došla ke zjištění druhového zastoupení hub rodu *Isaria* v České republice.

Klíčová slova: entomopatogenní houby, *Isaria* sp., *Isaria fumosorosea*, biologická ochrana, genetická variabilita, molekulární marker, ITS region.

ABSTRACT

My diploma thesis deals with genetic variability of entomopathogenic fungi of the *Isaria* genus encountered in the Czech Republic. Individual representative of the genus can be found in soil where they attack all developmental stages of insects, giving preference to larvae and pupae. The *Isaria* fungi find application first and foremost where plants have to be provided biological protection.

In case of mitosporic fungi is the precise identification very difficult, taxonomy is often unclear in many genera, including the genus *Paecilomyces/Isaria* to demonstrate their polyphyletic nature. The fungi are classified primarily with reliance on morphological studies. The most common markers used to identify fungi are the shapes and sizes of their conidia and the biological properties (germination of spores, tests of biological efficiency). Identification made in consideration of the morphological markers is inaccurate and very variable. To overcome those inaccuracies, there are very useful molecular DNA markers, which can be relevant in ecology, biology and in fungi genetics.

This paper relies on applying the ITS region (Internal Transcribed Spacer) as a molecular marker. ITS regions are partial constituent rDNA carrying no code - that is why the regions are likely to accumulate evolutionary changes in the DNA sequence, which makes them suitable for extensive use in taxonomic analyses of many organisms. The study results in a phylogenetic trees constructed by comparing different sequences of ITS regions obtained from the samples of entomopathogenic fungi of the *Isaria* genus gathered in the Czech Republic during the monitoring stage 2013 to 2014. Thereunder detection of *Isaria* sp. occurring in the Czech Republic.

Key words: entomopathogenic fungi, *Isaria* sp., *Isaria fumosorosea*, biocontrol, genetic variability, molecular marker, ITS region.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY	3
3.1.1 <i>Charakteristika entomopatogenních hub</i>	3
3.1.2 <i>Vývojový cyklus entomopatogenních hub</i>	4
3.1.3 <i>Integrovaná ochrana rostlin</i>	6
3.2 ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY RODU <i>ISARIA</i>	7
3.2.1 <i>Identifikace entomopatogenních hub</i>	10
3.3 MOLEKULÁRNÍ DNA MARKERY	12
3.3.1 <i>Využití molekulárních DNA markerů u entomopatogenních hub</i>	12
3.3.2 <i>PCR (Polymerase chain reaction)</i>	13
3.3.3 <i>Nejvíce využívané DNA molekulární markery u hub</i>	16
3.4 POPULAČNÍ STUDIE	19
MATERIÁL A METODIKA	21
3.5 POUŽITÝ MATERIÁL	21
3.6 IZOLACE HUB Z PŮDY	24
3.7 KULTIVACE A UCHOVÁVÁNÍ VZORKŮ	24
3.8 IZOLACE DNA	25
3.9 PCR REAKCE	26
3.10 SEPARACE A DETEKCE VZORKŮ	27
3.11 PŘEČIŠTĚNÍ PCR REAKCE	27
3.12 SEKVENOVÁNÍ	27
3.13 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	28
4. VÝSLEDKY	29
5. DISKUZE	35
6. ZÁVĚR	39
7. POUŽITÁ LITERATURA	40
8. PŘÍLOHY	45

1. ÚVOD

Entomopatogenní houby jsou organismy schopné vyvolat infekční onemocnění u hmyzu. Díky velmi propracovaným mechanismům působení na hostitelský organismus a účinným adaptacím, mezi které patří hlavně produkce velkého množství toxických látek, jsou tyto houby ve většině případů schopny způsobit až smrt svého hostitele. Se skupinami entomopatogenních organismů je spojován termín biologická ochrana rostlin - strategie využívající živé organismy k potlačení hmyzích škůdců. Při aplikacích přípravků biologické ochrany rostlin na bázi entomopatogenních hub se využívá infekčního potenciálu houbových konidií či blastospor přítomných v daném přípravku. Očekávaným výsledkem je poté ochrana před napadením a poškozením zemědělských plodin, lesních porostů i okrasných rostlin v důsledku potlačení celých populací daného hmyzího škůdce.

V diplomové práci se zaměřuji na entomopatogenní houby rodu *Isaria*. V literární části nejprve obecně popisuji způsob života těchto hub a jejich využití. Dále se věnuji molekulárním markerům, které se staly již nezbytným nástrojem pro taxonomickou klasifikaci entomopatogenních hub. Pro stanovení základní charakteristiky entomopatogenních hub se dříve využívalo pouze hodnocení morfologických parametrů (např. tvaru a velikosti konidií, barvy mycelia). Tyto metody jsou však nepřesné a pro jejich upřesnění se využívá metod molekulárních markerů. Díky nim můžeme potvrdit či vyvrátit primární taxonomické zařazení. V případě mé analýzy byl použit jako molekulární marker ITS region. ITS je vhodnou oblastí pro molekulární charakteristiku hub, a to zejména proto, že je ho snadné amplifikovat i z malých, naředěných, či vysoce degradovaných vzorků. ITS region je relativně krátký úsek (500-800 bp) a je snadné ho amplifikovat na základě univerzálních primerů (ITS1 a ITS4, nebo ITS4 a ITS5) (White *et al.*, 1990).

V experimentální části popisuji průběh celé analýzy hub rodu *Isaria* začínající izolací hub z půdy, přes extrakci DNA, PCR reakci, sekvenování, následné vyhodnocení sekvenačních dat a konečnému zařazení v taxonomickém systému a potvrzení či vyvrácení zařazení dle morfologického hodnocení.

2. CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo vytvoření kryo – kolekce vzorků entomopatogenních hub rodu *Isaria* získaných v rámci monitoringu v České republice. Dalším cílem bylo provedení molekulárních analýz kmenů entomopatogenních hub, fylogenetická analýza a následné porovnání taxonomické klasifikace získané na základě molekulárních dat a morfologického hodnocení izolátů.

Bylo předpokládáno, že se potvrdí taxonomické zařazení dle morfologických parametrů, soubor „ISA“ bude druhově rozčleněn na základě molekulárních analýz a získaná data ze sekvenačních reakcí bude možno porovnat s referenčními vzorky z NCBI databáze a tím je spolehlivě přiřadit ke správnému druhu.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Entomopatogenní houby

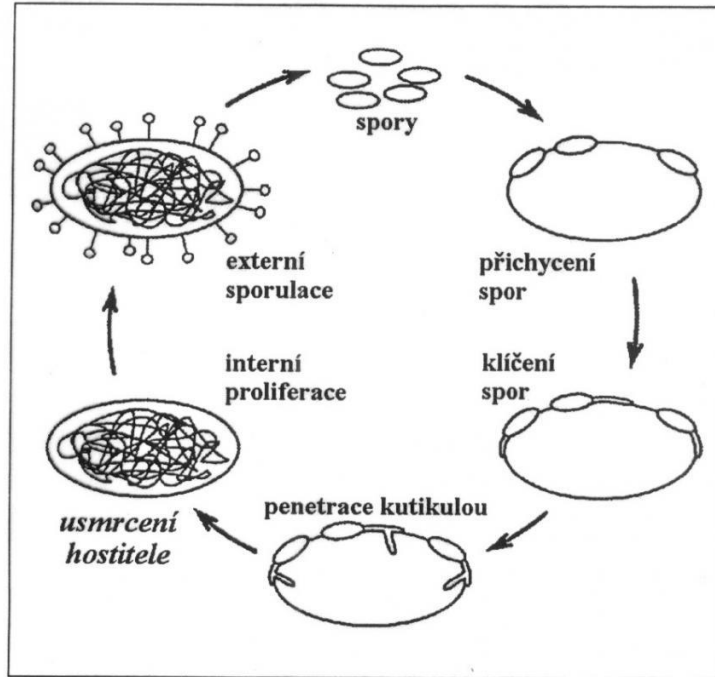
3.1.1 Charakteristika entomopatogenních hub

Ve srovnání s jinými entomopatogenními organismy (viry, bakterie, háďátka) mají entomopatogenní houby široký okruh hostitelů a navíc mohou napadat všechna vývojová stádia hmyzu, nicméně nejčastěji se vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu (Váňa, 1998). Mezi hostitele hub rodu *Isaria* patří zástupci mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Homoptera*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočů (např. sviluškovití - *Tetranychidae*) a některých druhů háďátek (cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*). Mezi entomopatogenními houbami jsou jak vysoce specifické druhy (jeden hostitel, či vývojové stádium), tak i méně specifické (celá řada druhů, rodů, čeledí hmyzu). Mezi specifické druhy patří například houby rodu *Aschersonia* sp., které jsou schopny infikovat buď molice, nebo červce. Mezi polyfágní druhy lze zařadit houby *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* a *Lecanicillium muscarium*. Absence pohlavního rozmnožování u těchto entomopatogenních hub v našich podmínkách umožňuje velmi rychlý průběh nepohlavních rozmnožovacích cyklů a produkci značného množství konidií (Ekesi a Maniania, 2007). Z hlediska praktické biologické ochrany nepředstavuje takto rozmanitý potenciál žádná jiná skupina entomopatogenních mikroorganismů (Váňa, 1998). Entomopatogenní houby, díky své kosmopolitní existenci a bohaté rozmanitosti, představují řešení pro integrované programy ochrany před škůdci. Vzhledem k jejich šetrnosti k životnímu prostředí a bioperzistenci jsou na rozdíl od pesticidů vhodné k hubení hmyzu a využití v ekologickém zemědělství. Nejdůležitější entomopatogenní houby, které jsou komerčně používány pro výrobu biopreparátů, jsou *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Isaria fumosorosea* (Gul *et al.*, 2014).

Mezi faktory, které entomopatogenní houby ovlivňují a určují i účinnost biopreparátu, patří relativně vysoká vlhkost vzduchu, teplota a sluneční svit (Gul *et al.*, 2014). I Ekesi a Maniania (2007) uvádí, že u houbových nákaz hmyzu ve srovnání s ostatními entomopatogenními mikroorganismy hraje významnou roli vliv vnějšího prostředí, stav hostitele a dávka houbového inokula.

3.1.2 Vývojový cyklus entomopatogenních hub

Nepohlavní rozmnožování dominuje u většiny hub včetně entomopatogenních. Tento typ rozmnožování není provázen střídáním jaderných fází. Z tohoto důvodu může probíhat na haploidním i dikaryotickém myceliu i několikrát během vegetační sezóny a výsledkem je poté vznik velkého množství nových jedinců. Rozmnožování probíhá dělením, přičemž dochází k tvorbě nepohlavních spor. Tvorba spor probíhá u entomopatogenních hub exogenně na hyfách. Na specializovaných hyfách nazývaných konidiofory se vytvářejí tzv. konidiogenní buňky, které dávají vznik sporám zvaným konidie či konidiospory. Celý proces tvorby spor se pak označuje jako konidiogeneze. Obecně se rozlišují dva základní typy vzniku konidií. Konidie vznikající z buněk hyf se označují jako thalokonidie nebo artrokonidie (zkráceně konidie). Hyfa se nejčastěji rozdělí přehrádkami a rozpadne se na jednobuněčné části. Takto vytvořené nepohlavní spory se mohou po uvolnění z hyfy zvětšovat či dodatečně měnit svůj tvar. Druhým typem jsou blastokonidie, které vznikají vypučením z konidiogenní buňky. Tyto útvary dorůstají do konečné velikosti ještě před uvolněním z mateřské konidiogenní buňky. Evolučně potřebná genetická proměnlivost nových jedinců je většinou zprostředkována pohlavním rozmnožováním, které však u entomopatogenních hub chybí. U zástupců pomocného oddělení *Deuteromycota* tuto funkci nahrazuje parasexualita. Během parasexuálního cyklu neprobíhá genetická rekombinace pomocí meiózy a nevytváří se pohlavní stádium, ale může docházet k plazmogamii, karyogamii i haploidizaci (Kalina a Váňa, 2005).



Obrázek 1: Vývojový cyklus entomopatogenních hub (Landa, 2006)

Samotný vývojový cyklus začíná přichycením konidií a klíčením na povrchu hostitele. Patogen následně proniká do tělní dutiny, kde vytváří tzv. blastospory, které vyplní obsah hostitele a ten následně umírá. V dalším kroku dochází k interní proliferaci (patogenní fáze). Poté se začnou vytvářet povrchové myceliální sítě, dochází k externí sporulaci a tvoří se konidie nové generace (saprofytická fáze) (Váňa, 1998).

Teplotní tolerance entomopatogenních hub je poměrně vysoká. Délka vývojového cyklu probíhá v úzké korelaci s okolní teplotou. Optimální teploty charakterizuje rozmezí 20-30°C, krátkodobě mohou entomopatogenní houby přežít i vysoké teploty (40-45°C). Většina druhů entomopatogenních hub je dokonale adaptována i na dlouhotrvající nízké teploty a přežívá i dlouhodobé zmrazení. Ostatní abiotické faktory svým významem nedosahují relevance vlhkosti a teploty. Na základě uvedených údajů je možné definovat charakter optimálních a potenciálních nik. V soustavě odlišných agroekosystémů se pro využití biopreparátů na bázi entomopatogenních hub jako nejvhodnější jeví skleníky (ochrana sazenic, rychlené zeleniny a okrasných květin), závlahové technologie pěstování různých plodin a kultur a aplikace do půdy (Landa, 2009).

3.1.3 Integrovaná ochrana rostlin

Akutní ochrana rostlin před hmyzími a fytofágními roztoči se provádí především pomocí konvenčních chemických pesticidů. Jejich používání je však z hlediska ochrany životního prostředí a bezpečnosti práce problematické. Hmyz se na ně stává postupně více rezistentní, což vyvolává potřebu zvyšovat dávky nebo přecházet na jiné typy účinnějších pesticidů. Rovněž zpřísňující se legislativa omezuje tento způsob ochrany. Jedním z východisek je výzkum a vývoj nových ochranných prostředků na principech biologické ochrany rostlin, při nichž se využívají přirození nepřátelé škůdců, jako jsou predátoři, parazité nebo patogenní organismy. V roce 2009 byla přijata člena Evropské Unie směrnice 2009/128/ES stanovující rámec pro činnost Společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů, která je v současné době již součástí národní legislativy, resp. v novele rostlinolékařského zákona č. 199/2012 Sb. § 5. V rámci biologické ochrany rostlin se využívají biologické prostředky označované jako bioinsekticidy. Ty využívají přirozených antagonistických vztahů mezi organismy za účelem potlačení populací škůdce bez podstatného narušení přírodní rovnováhy a tím přispívají k udržení stability ekosystémů (Prenerová, 2011).

Právě entomopatogenní houby se ukázaly jako vhodné prostředky v integrované ochraně rostlin, která klade důraz na omezení využití pesticidů. Houbové biopesticidy využívané v biologické ochraně již pokrývají široké spektrum rodů hub a aplikací. Více než 700 druhů hub z přibližně 90 rodů jsou známy jako patogeny hmyzu (Bieliková et al., 2002).

Hledání entomopatogenních hub vhodných pro využití v programech integrované ochrany proti škůdcům zahrnuje několik kroků. Druhy hub a izoláty musí být nejprve získány z nakaženého hmyzu, izolovány z půdy nebo nadzemních částí rostlin a následně identifikovány. V laboratorních podmínkách dojde k posouzení jejich vhodnosti pro systém integrované ochrany rostlin. Současně však nastává několik problémů, které je třeba řešit. Vybraný izolát musí být vyráběn levně a ve velkém množství. Zároveň musí být vyřešena otázka jeho skladování a musí být účinný v rámci polních podmínek (Butt a Goettel, 2000).

3.2 Entomopatogenní houby rodu *Isaria*

Taxonomické zařazení entomopatogenních hub rodu *Isaria* podle Sunga (2007) uvádí následující tabulka:

Říše:	<i>Fungi</i>	
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>	
Třída:	<i>Sordariomycetes</i>	
	Čeleď:	
<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Ophiocordycipitaceae</i>
	Rod:	
<i>Paecilomyces</i>	<i>Isaria</i>	<i>Purpureocillium</i>
	Druh:	
<i>P. carneus</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>P. lilacinum</i>
<i>P. marquandii</i>	<i>I. tenuipes</i>	
	<i>I. farinosa</i>	
	<i>I. javanica</i>	

Rod *Isaria* zahrnuje entomopatogenní nebo nematofágní houby, které jsou často termofilní. V sekci *Isarioidea* jsou zastoupeny mezofilní druhy, zahrnující např. druhy *Isaria farinosa*, *Isaria fumosorosea*, *Isaria javanica*, *Isaria tenuipes* a *Paecilomyces carneus*.

Zimmermann (2008) uvádí, že první popisy *I. farinosa* a *I. fumosorosea* zveřejnil již v roce 1832 Fries a v roce 1904 Wize. Poté na základě monografické studie rodu *Paecilomyces* od Samsona (1974), byly entomopatogenní houby *Isaria farinosa* a *Isaria fumosorosea* zahrnuty do nově vytvořené sekce *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* a od té doby se nazývaly *Paecilomyces farinosus* a *Paecilomyces fumosoroseus* po mnoho let. V sekci *Paecilomyces* byly zařazeny termofilní druhy s tmavě zbarvenými konidii. Do sekce *Isarioidea* se řadily druhy mezofilní, jejichž konidie měly světlé zbarvení. Molekulární studie dokázaly, že druhy v rámci sekce *Paecilomyces* mají určitou podobnost s *Eurotiomycetes*, zatímco druhy v sekci *Isarioidea* se asociují *Sordariomycetes* (Ekesi a Maniana, 2007).

Morfologické popisy včetně seznamu synonym obou druhů *Isaria* byly přejmenovány Samsonem (1974) a Domsch, Gams a Anderson (1980). Další synonyma těchto hub jsou uvedeny v Indexu Fungorum (Zimmermann, 2008). V současné době se opět používají názvy *Isaria fumosorosea* a *Isaria farinosa*.

Entomopatogenní houby *Isaria farinosa* a *Isaria fumosorosea* jsou celosvětově rozšířené a mají poměrně široký hostitelský okruh. Zatímco *I. farinosa* má v současné době menší význam jako prostředek biologické ochrany, *I. fumosorosea* je považována za komplexní druh, který je v tomto odvětví široce využíván proti několika hmyzích škůdců, hlavně molic (Zimmerman, 2008). Mnoho odlišných faktorů však limituje využití entomopatogenních mitosporických hub v praktických systémech biologické ochrany (Oborník *et al.*, 2001), proto je důležitá optimalizace formulací biologických preparátů pro jejich praktické využití.

Jako většina entomopatogenních hub napadá *Isaria fumosorosea* svého hostitele tím, že naruší jeho kutikulu. Různé metabolity umožňují, aby patogen fyzicky pronikl do hostitele a zároveň inhiboval hostitelův regulační systém. V případě *I. fumosorosea* mezi ně patří např. proteázy, chitinázy a lipázy. Tyto enzymy umožňují houbě narušit pokožku hmyzu a rozšířit se přes hemolymfu.

I. fumosorosea a další druhy rodu *Isaria* produkují beauvericin, což je sekundární metabolit, který se podílí na ochromení hostitele. Cantone a Vanderberg (1998) uvádějí, že v oblasti ekologie zůstává stále mnoho otázek nezodpovězených. Zcela jasný zatím není konkrétní způsob, jakým entomopatogenní houby infikují svého hostitele a získávají z něj živiny. Nedostatek informací máme i o životním cyklus entomopatogenních hub mimo své hostitele a způsobu, jakým přežívají v půdě. Využití této houby jakožto mykoinsecticidu jistě povede k dalším výzkumům, které nám tyto nejasnosti určitě objasní. Podle Landy (2009) spóry entomopatogenních hub klíčí na povrchu kutikuly hostitele a hyfy vnikají kutikulou do haemocelu. Smrt hostitele je způsobena uvolňováním toxinů nebo intenzivním růstem hyf uvnitř těla. Klíčení spor a infekce většinou vyžadují vysokou vlhkost, což omezuje použitelnost těchto bioagens na teplejší oblasti a skleníky.

Mezi další zástupce rodu *Isaria* patří *Isaria tenuipes*. Jedná se o druh entomopatogenní houby, jejíž význam nalezneme hlavně v čínské medicíně. Její hostitel je bourec morušový. Na podzim prorůstá mycelium této entomopatogenní houby do housenky a odebírá ji ze střeva živiny, plodnice prorůstají z těla až následující léto jako *Cordyceps sinensis*. Takto napadená housenka se zahrabe do země a houba postupně vyplňuje celé její tělo. Plodnice v těchto podmínkách (oblast Číny) vznikají pohlavním rozmnožováním. *C. sinensis* během dvouletého vývoje v zemi nemusí přijímat živiny a snáší chlad a nedostatek kyslíku. V Číně jsou plodnice této entomopatogenní houby využívány v tradiční medicíně a její účinky jsou hodnoceny stejné úrovni jako ling zhi a ženšen (Kyong *et al.*, 2000).



Obrázek 2: Mycelium druhu *Isaria fumosorosea* (zdroj vlastní)



Obrázek 3: Mycelium druhu *Purpureocillium lilacinum* (zdroj vlastní)

3.2.1 Identifikace entomopatogenních hub

I přesto, že entomopatogenní houby hrají důležitou fyziologickou a ekologickou roli v ekosystému, zůstává chování jednotlivých druhů často stále neznámé. Problémem je nedostatek vhodných technik pro jejich detekci a identifikaci (Freed, 2011).

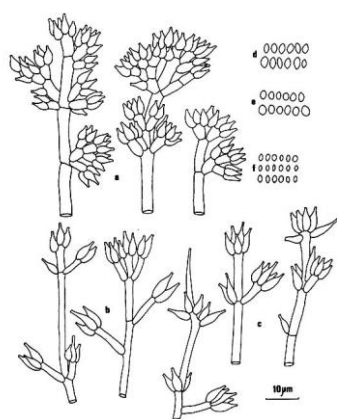
K identifikaci entomopatogenních hub vědci tradičně používají morfologické znaky na základě celkového vzhledu makro a mikroskopické struktury. Zvláště formování a tvorba konidií na konidioforech, tvary a velikosti konidií jsou používány jako diagnostická kritéria pro popis druhů. Nicméně, nedávné výzkumy dokazují, že tyto metody jsou často velmi nepřesné. Využití molekulárních markerů na úrovni DNA v samostatných fylogenetických větvích poskytuje mnohem více informací o jejich ekologii než tradiční morfologická charakterizace (Meyling, 2008). I Schoch (2014) uvádí, že na základě molekulárních analýz došel k závěru, že morfologické studie často podceňují rozmanitost entomopatogenních hub.

Jak již bylo zmíněno, základem pro klasifikaci hub jsou stále morfologické studie. Nejpoužívanějšími makroznaky pro identifikaci entomopatogenních hub rodu *Isaria* jsou tvar a velikost myceliálních kultur. *Isaria fumosorosea* vytváří na přirozeném hostiteli i na živných půdách zprvu bílé vatovité kultury, které později mění barvu do odstínů světle růžové, fialové až šedofialové. Změna barvy kolonií přímo koreluje se stupněm sporulace kultury. Starší plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter a kolonie se mění v prašný, s povrchem plně pokrytým obrovským množstvím kolonií. *Isaria fumosorosea* byla poprvé detekována jako patogen vyskytující se přirozeně v populacích molice až v roce 1983, kdy se v populacích molice *Trialeurodes vaporariorum* ve sklenicích v oblasti Pekingu objevily velmi silné spontánní epizootie, které dočasně zcela decimovaly populace tohoto škůdce. Druhým případem přirozené epizootie způsobené *I. fumosorosea* v populacích molice je jeho periodický výskyt v populacích molice bavlníkové na různých hostitelských rostlinách a lokalitách na Floridě. Odizolovaný kmen byl označen jako PFR 97 – kmen Apopka (= jméno oblasti na Floridě, kde byl kmen PFR 97 v roce 1987 poprvé zachycen a odizolován Dr. Lance S. Osbornem). Tato houba je tedy schopna infikovat široký hostitelský cyklus a byla detekována na více než 40 druzích hmyzu z více než 25 různých čeledí (Koubová, 2009).

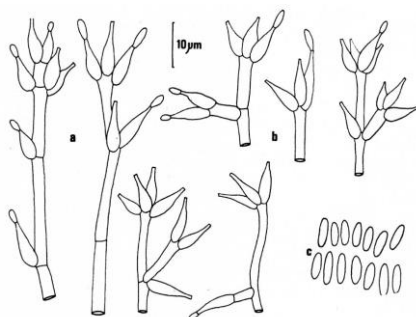
Isaria farinosa vytváří na hmyzím hostiteli bílou myceliální plst', ze které vyrůstají v husté vrstvě početné konidiofory. Ze všech částí těla hostitele vyrůstá obvykle několik bílých až žlutých synnemat (coremií – konidiomat složených z více či méně kompaktních skupin vzpřímených a někdy spojených konidioforů). Tento druh byl testován především k ochraně proti škůdcům bavlníku jako je např. blýskavka červivcová. *Isaria farinosa* byla také ojediněle zaznamenána v asociaci s lýkožroutem a byla také úspěšně testována v půdách školek proti pilatkám a ploskohřbetkám. Dalšími výzkumy bylo zjištěno, že potlačuje kolonie padlí na oddělených listech rostlin, avšak v praxi ji nelze vzhledem k nedostatečnému účinku aplikovat (Koubová, 2009).

Znázornění tvorby konidií u vybraných entomopatogenních hub rodu *Isaria* (Samson, 1974):

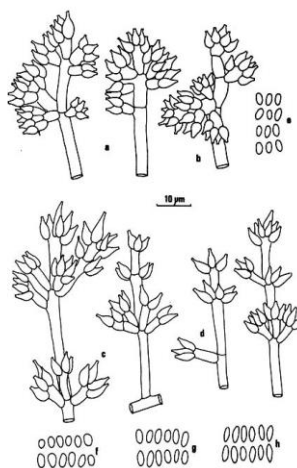
A. *Isaria farinosa*



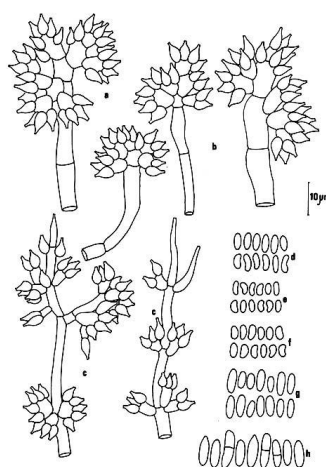
C. *Isaria javanica*



B. *Isaria fumosorosea*



D. *Isaria tenuipes*



3.3 Molekulární DNA markery

3.3.1 Využití molekulárních DNA markerů u entomopatogenních hub

Molekulární marker je molekula bílkoviny nebo určitý úsek DNA, které mohou být porovnávány u jednotlivých zkoumaných druhů organismů. Tyto markery jsou proto důležitým nástrojem, který se uplatňuje při řešení problémů a otázek, týkajících se různých oblastí biologie – jako jsou ekologie, fylogenetika a evoluce. Mají své specifické výhody, mezi které patří především možnost použití u různých stadií vývoje. Další výhodou je fakt, že jejich použití není limitováno množstvím použitého materiálu a lze je tedy využít i v případech, kdy jiné metody nejsou možné (Avisé, 2004).

Výzkumy zabývající se entomopatogenními houbami se tradičně zaměřují na rozvoj výroby biopreparátů, které mohou být použity v polním systému jako přirozená kontrola výskytu, a proto je vyžadováno nalezení nástrojů pro spolehlivou identifikaci příslušného druhu (Meyling, 2008). Koncept genetických markerů založených na sekvencích DNA byl skutečně revolučním průlomem v možnostech konstrukce genetických map u jednotlivých rostlinných druhů, především kulturních, a stal se dalším významným nástrojem při studiu rostlinných genomů. Úplné nebo částečné sekvence genomů umožňují tvorbu obrovského počtu DNA markerů založených především na specifické amplifikaci známých sekvencí. Počty genetických markerů tak dosahují desítek tisíc. Molekulární markery jsou ve významném rozsahu využívány ke konstrukci genetických map jednotlivých rostlinných druhů. Tyto mapy podstatně rozšiřují naše poznatky o struktuře genomů i jejich evoluci. Porovnáním map příbuzných druhů můžeme vyhodnotit druhy genomových změn, které doprovázejí vznik daného druhu. Úroveň konzervativního charakteru těchto map se značně liší u jednotlivých druhů (Řepková, 2013). Genové inženýrství umožňuje využívat pro charakterizaci genomů jednotlivých odrůd kulturních rostlin, hospodářských zvířat i pro získání individuálního profilu jednotlivých osob molekulární znaky DNA (Ondřej a Drobník, 2002).

Molekulární markery se staly enormně důležitými v mnoha oblastech biologie hub, zahrnující taxonomii, epidemiologii, populační genetiku, detekci hub, genetické mapování, izolaci genů, fylogenetiku a evoluční biologii. Tyto markery jsou založeny na malých rozdílech, které se hromadí v zástupcích či druzích a tím se od sebe v průběhu času odchyľují. V případě hub, mohou být markery vytvořeny z chromozomální, extrachromozomální či mitochondriální DNA. V genomu mohou být markery v jedné kopii ale i ve více kopiích. Existuje mnoho sekvencí, které mohou být použity jako markery pro různé genomy hub a to s malou či žádnou předchozí znalostí genomu (Khachatourians a Arora, 2004).

Využití molekulárních markerů v praxi znamená, že není třeba hodnotit obtížně hodnotitelný znak (např. odolnost k houbovému onemocnění), ale je možno si vybrat molekulární znak, který se na chromozomu nachází velmi blízko genu pro odolnost k houbovému onemocnění. V potomstvech je pak možno přesně sledovat přenos tohoto molekulárního znaku (na základě sondy DNA) v zastoupení nepřesně sledovatelného znaku (odolnosti k houbovému onemocnění, např. padlí ječmene). Je to podstatné zpestření a zvýšení možností využití vazbových map kulturních rostlin (Ondřej a Drobník, 2002).

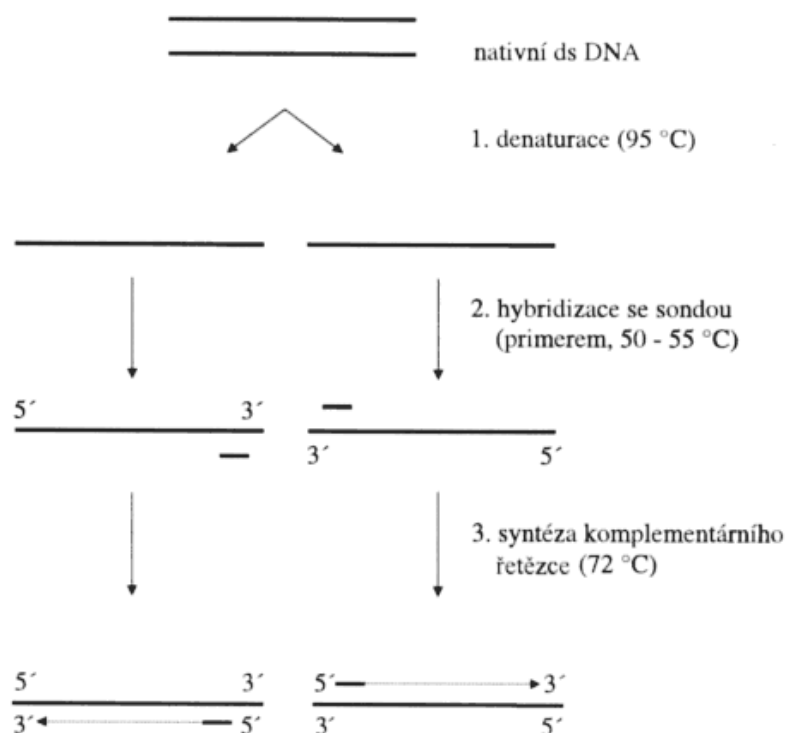
3.3.2 PCR (Polymerase chain reaction)

Pro identifikaci entomopatogenních hub se využívají metody založené na PCR reakci. Polymerázová řetězová reakce byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. V roce 1993 byl na základě zavedení této techniky oceněn Nobelovou cenou za chemii. Pro molekulární biologii znamenala PCR reakce stejný přínos jako objev restričních endonukleáz nebo zavedení sekvenování DNA. Výhoda PCR spočívá zejména v tom, že umožňuje namnožit specifickou a požadovanou sekvenci genomové DNA bez potřeby klonování ve vektorech. Princip PCR spočívá v amplifikaci (replikace je zkopírování celé molekuly, amplifikace jen části) nukleových kyselin. Replikace je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dsDNA ve směru 5' → 3' a to prostřednictvím DNA – polymerázy.

Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojenými primery, které se na protilehlé řetězce naváží tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Syntéza nových vláken probíhá po přidání DNA – polymerázy a nukleotidů na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. Taq DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza probíhala opakovaně v cyklech. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři naprosto odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (Šmarda, 2005).

Kroky PCR reakce:

1. Denaturace - DNA je denaturována zahřátím na 94 - 96 C° po dobu cca 1 minuty
2. Annealing - primery nasedají na úseky DNA dle komplementarity bází při teplotě 45 - 65 C° po dobu cca 1 minuty
3. Elongace – DNA polymeráza syntetizuje komplementární DNA řetězec ve směru 5'→ 3' při 65 – 75 C° (Fowler a Gartland, 1993).



Obrázek 4: Kroky PCR reakce (<http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-dna/pic/scanu8.gif>)

Reakce se provádí v zařízení zvaném termocykler, kde se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Jelikož výsledkem procesu PCR je mnohonásobné namnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA (Šmarda, 2005).

Metody založené na PCR mohou být časově náročné v závislosti na navržení vhodných primerů a izolaci samotné DNA. Např. vzorky odebrané z půdy obsahují velké množství organické hmoty, která může inhibovat PCR amplifikaci. Nicméně po překonání těchto možných překážek jsou metody založené na PCR reakci rychlejší než ostatní metody. Avšak ani díky PCR metodám nejsme schopni získat informace o biologických parametrech jako např. morfologické struktury při etapách přezimování (Ekesi a Maniana, 2007).

PCR byla poprvé patentována v roce 1987. O rok později byla komercializována firmou American Cetus Corporation. Nicméně v roce 1991 Hoffmann La Roche a Perkin Elmer koupili plná práva na PCR za 300 mil. USD (Smith a Gartland, 1996).

Pro vizualizaci PCR produktu se nejčastěji využívá technika zvaná elektroforéza. V molekulární biologii patří k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě. Elektroforéza se provádí v gelu, který je nejčastěji tvořen agarosou nebo polyakrylamidem. Po dokončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Lze je snad zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji se používá ethidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA a vytváří v ní komplex, který po osvětlení UV světlem červeně floreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA (Šmarda, 2005). Dnes už jsou dostupná i méně toxická barviva např. Sybr Green nebo Red Gel.

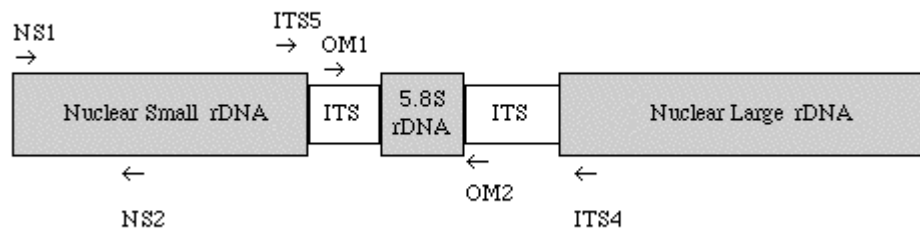
3.3.3 Nejvíce využívané DNA molekulární markery u hub

3.3.3.1 ITS regiony (*internal transcribed spacer*)

Vývoj PCR a navrhování primerů pro amplifikaci různých regionů rDNA významně usnadnil taxonomické studie hub. ITS primery navržené Whitem *et al.* (1990) dokázaly stanovit mnoho ITS sekvencí z různých druhů hub a byly použity ve výzkumu taxonomických a fylogenetických vztahů v rámci jednoho druhu rozdílného rodu. DNA sekvence, které jsou polymorfní mezi druhy hub, jsou vhodnými kandidáty pro detekci druhu a vyloučení všech ostatních druhů. Rozdíly právě v ITS regionech byly použity pro rozvoj testů založených na PCR pro detekci mnoha druhů nejen fytopatogenních hub v hostitelském organismu bez potřeby jejich izolace (Edel, 1998).

Tato oblast je velice důležitá pro taxonomické studie a to z následujících důvodů:

- Oblast ITS je poměrně krátká (500-800bp) a může být snadno amplifikována pomocí PCR.
- Amplifikace ITS regionů je snadná z malého množství vzorku DNA, ze zředěného vzorku i z vysoce degradovaného.
- ITS region může být mezi různými druhy hub morfologicky velmi variabilní (Bridge a Arora, 1998).



Obrázek 5: Umístění ITS regionů (<http://www.fao.org/docrep/005/x4946e/x4946e06.gif>)

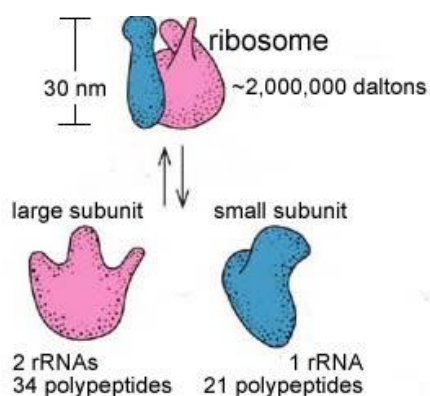
3.3.3.2 *Large subunit rRNA (LSU)*

LSU v překladu znamená velká podjednotka rRNA. V ribozomální RNA má funkci katalytickou a pracuje jako peptidyltransferáza, která umožňuje vznik peptidové vazby ve vznikajícím polypeptidovém řetězci (Alberts, 2004). Sekvence velké podjednotky rRNA je konzervativní. To je důvodem, proč je využívána převážně mezi příbuznými rody a její využití není tak rozmanité jako u ITS regionu.

3.3.3.3 *Small subunit rRNA (SSU)*

SSU, nebo-li malá podjednotka rRNA, je zhruba dvakrát menší než velká podjednotka. SSU zodpovídá za nasednutí tRNA na kodony mRNA. Obě podjednotky se spojují na molekule mRNA obvykle blízko jejího 5' konce a zahajují syntézu bílkovin. Sekvence genů pro rDNA se čím dál více využívají v taxonomii a fylogenetice (Alberts, 2008).

SSU rDNA se vyvíjí poměrně pomalu, a proto je vhodný pro rekonstrukci evoluce taxonů větších než druh. Naopak pro vnitrodruhové studie a určení vztahů blízce příbuzných druhů jsou vhodné geny s vyšší substituční rychlostí nebo nekódující oblasti, tak jako ITS (Internal Transcribed Spacer) nebo IGS (Intergenic Spacer) (Edel, 1998). Proto se dnes pro potřeby fylogeneze používá také řada dalších genů a výjimkou už nejsou ani vícegenové studie (Tartar *et al.*, 2005).



Obrázek 6: Velká a malá podjednotka rRNA (http://virtuallaboratory.colorado.edu/Biofundamentals/lectureNotes-Revision/Topic3-6_Making%20Proteins.htm)

3.3.3.4 Elongační faktor 1- α

Elongační faktory (EF) jsou proteiny, které jsou zapojeny do mechanismu elongace (prodlužování) polypeptidového řetězce vznikajících bílkovin na ribozomu (v průběhu translace). Za určitých okolností se bez nich ribozom obejde za cenu snížené efektivity a přesnosti (Alberts, 2004). Z hlediska taxonomické determinace je velmi výhodným markerem gen EF1- α a to hned z několika důvodů. Konzervovaná aminokyselinová sekvence dovoluje analýzu druhů v širokém taxonomickém měřítku, diferenciace na třetích variabilních kodónových pozicích umožňuje determinaci i na druhové úrovni. Avšak některé jeho vlastnosti, sebou přinášejí i určité komplikace. Degenerace 3. pozice společně s přítomností intronů znesnadňují vývoj univerzálních primerů a malý počet kopií (2 na buňku u diploidních organismů ve srovnání se stovkami až tisíci kopií u mitochondriálních či ribozomálních markerů) komplikuje amplifikaci. Mezi další nevýhody patří i ta skutečnost, že výskyt, počet, pozice a délka intronů výrazně kolísají a to i v rámci čeledi (Havill, 2007).

3.3.3.5 Další molekulární DNA markery

Jako vhodné molekulární markery využívané v taxonomii hub se prokázaly mikrosatelity. Mikrosatelity (MS, také STRs – Short Tandem Repeats nebo SSRs – Simple Sequence Repeats) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících se motivů o délce 1 – 6 nukleotidů (např. $(GA)_n$, $(GATA)_n$). Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (Powell *et al.*, 1996).

Jako neméně důležité molekulární DNA markery se ukázaly dvě největší podjednotky RNA-polymerázy. Jedná se o RPB1 a RPB2. RPB2, čili druhá největší podjednotka RNA polymerázy II, je stejně jako ostatní proteiny, které se účastní replikace, transkripce a translace – pro organismy nezbytná a má tudíž malé předpoklady pro horizontální genový transfer. Zároveň obsahuje velmi konzervativní úseky, které umožňují její amplifikaci, a vyskytuje se v genomu hub jen v jedné kopii. Z těchto důvodů byla vybrána jako první proteinová alternativa, když se geny pro ribosomální DNA začaly jevit nedostatečné (Liu, Hall, 2004, Liu *et al.*, 1999, Miller, Huhndorf, 2005)

Tyto podjednotky odpovídají bakteriálním beta podjednotkám. Na RPB1 se nachází unikátní doména CTD obsahující množství repetitivních sekvencí obsahujících aminokyseliny Tyr - Ser - Pro - Thr - Ser - Pro - Ser. Doména CTD prochází na začátku transkripce fosforylací a v jejím průběhu dochází opět k její defosforylaci (Rehner *et al.*, 2011, Matheny, 2004)

Schoch (2012) uvádí, že mezi další molekulární markery, které mají široké uplatnění při identifikaci entomopatogenních hub patří Bloc a gen pro β -Tubulin. Konkrétně β -Tubulin hraje důležitou roli při získání rezistence proti fungicidům (Chahuan, 2007).

3.4 Populační studie

Populační studie se zabývají strukturou populací a evolučními procesy, které formují tyto strukturální modely. Odlišné modely a divergentní populace jsou odvozeny z genetické diverzity současných vzorků sebraných „z pole“ zahrnujících i klinické populace. Evoluční procesy zahrnují mutace, rekombinace, selekci a genetický drift. Mezi různými biologickými druhy či jinými taxonomickými jednotkami, u kterých se předpokládá, že mají společného předka, se znázorňují příbuzenské vztahy grafickým znázorněním, které nazýváme fylogenetický strom. Každé větvení (uzel) představuje hypotetického posledního společného předka. Každá větev znázorňuje jednu evoluční linii, na jejichž konci jsou dané taxony (Woese, 2002).

Jak již bylo zmíněno, houby rodu *Isaria* mají vysoký potenciál být využity jako přirozený biopesticid. To je důvodem proč téměř po celém světě probíhají populační studie entomopatogenních hub s využitím molekulárních markerů.

V roce 2012 provedl Nicolai V. Meyling studii s entomopatogenními houbami v Grónsku. Houby byly odebrány z půdy a izolovány metodou „tenebrio bait method“. Jako molekulární markery použil ITS 1 a ITS 2. Tímto výzkumem bylo dokázáno, že nejfrekventovanější entomopatogenní houbou v Grónsku je právě *Isaria farinosa*. Vyskytovala se nejčastěji na všech čtyřech lokalitách, které byly do tohoto výzkumu zahrnuty (Meyling, 2012).

V tom samém roce probíhal výzkum v Kanadě, který vedl Shajahan Johnny se svým týmem. Úkolem této studie byla izolace, charakterizace a fylogenetická analýza hub *Isaria farinosa* a *Purpureocillium lilacinum*.

Dalším cílem bylo dokázat, že tyto houby je možné použít jako biopesticid proti *Agrilus planipennis*, což je žravý brouk, který napadá širokou paletu stromů z rodu jasan a ničí velké plochy v zalesněných oblastech a stromy v mnoha příměstských sídelních čtvrtích. Je také více než ekologickou hrozbou. Pro vytvoření fylogenetického stromu a zjištění genetické variability použili opět ITS regiony a gen pro β -tubulin.

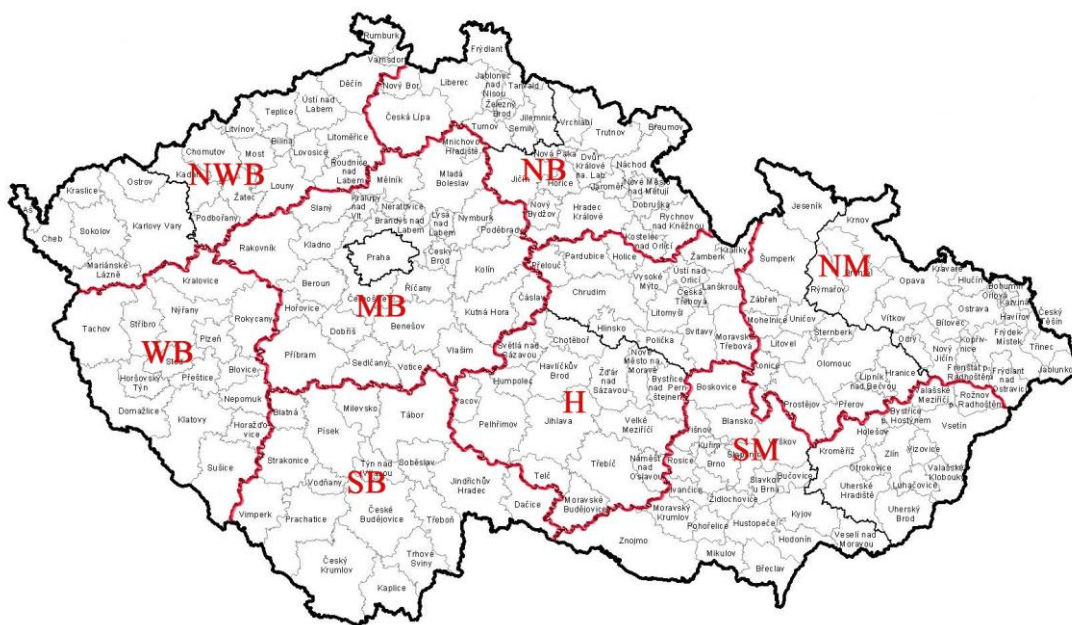
Kromě genetické variability se vědci zabývali virulencí těchto entomopatogenních hub a došli k závěru, že *I. farinosa* a *P. lilacinum* jsou patogenní pro dospělce *Agrilus planipennis*. *I. farinosa* je více virulentní než *P. lilacinum*. Dále bylo dokázáno, že zkoumané houby jsou méně virulentní než dostupné komerční izoláty (Johnny *et al.*, 2012).

Freed *et al.* (2011) započal svůj výzkum o rok dříve a to v roce 2011. Výzkum byl zaměřen na fylogenetiku entomopatogenních hub izolovaných z půdy v různých ekosystémech. Materiál pocházel z různých stanovišť (les, sídliště, pole) a také různých zemí (Pakistán, Čína, Jižní Korea, Indonésie a Holandsko). Fylogenetická analýza zde byla zaměřena na ITS 1 a ITS 2 regiony a gen pro 5.8S rRNA. Taxonomická příbuznost mezi houbami odebraných z odlišných stanovišť a zemí byla potvrzena. Genetická variabilita mezi izoláty *I. fumosorosea* a *Paecilomyces* sp. byla minimální.

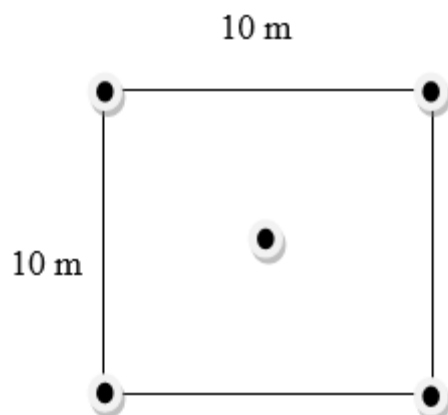
MATERIÁL A METODIKA

3.5 Použitý materiál

Pro tuto studii byly použity entomopatogenní houby, které byly pomocí morfologických markerů identifikovány jako houby rodu *Isaria* sp. (viz. obr. č. 11) a *Isaria fumosorosea* (viz. obr. č. 10). Sběr materiálu probíhal v letech 2013 a 2014 a to po celé České republice. Území ČR bylo rozděleno na 8 regionů (viz obr. č. 7). V každém regionu bylo vytipováno 6-11 lokalit dle typu a druhu půdy, nadmořské výšky, vegetačních stupňů, typů krajiny a výskytu škůdců. Na každé z nich bylo vybráno 5 habitů a jednalo se vždy o stanoviště s odlišnými ekologickými podmínkami - les, louka, pole, křoviny a speciální místo (např. ovocný sad, chmelnice apod.). Jeden vzorek se skládal celkem z pěti dílčích odběrů z stanoviště (viz. obr. č. 8), které byly následně homogenizovány v jeden vzorek.

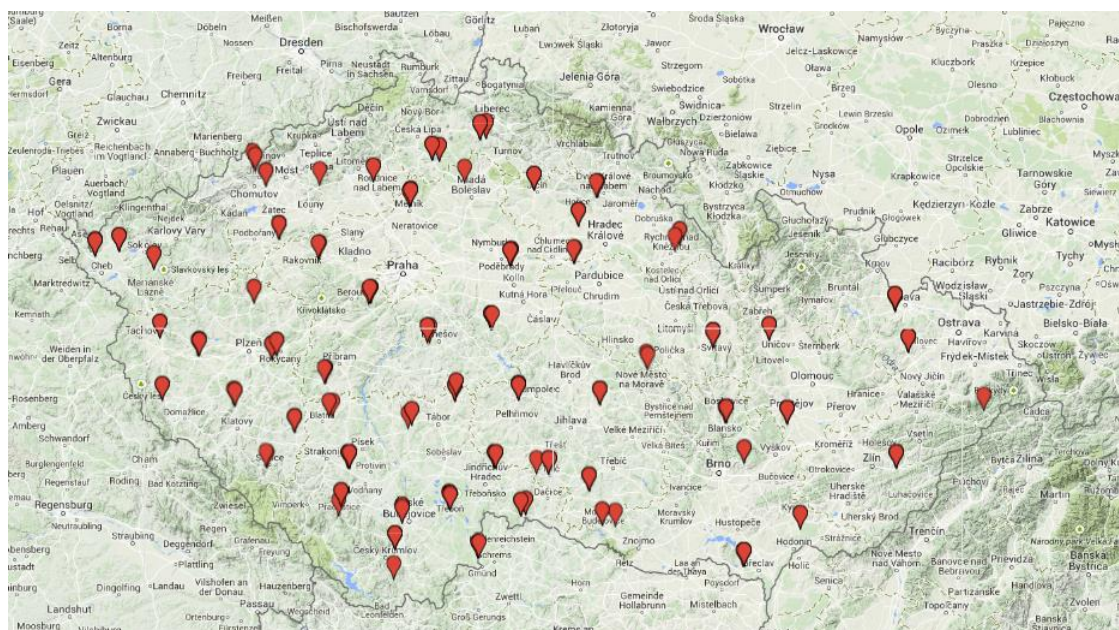


Obrázek 7: Znázornění rozdělení ČR do 8 regionů, kde proběhl sběr vzorků

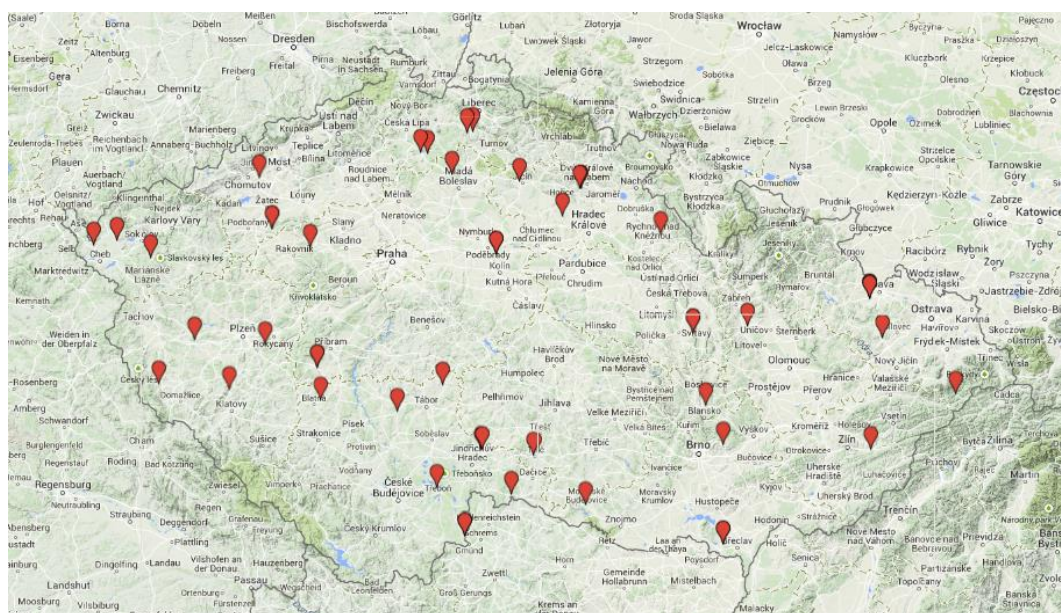


Obrázek 8: Schéma sběru vzorku v rámci jednoho stanoviště

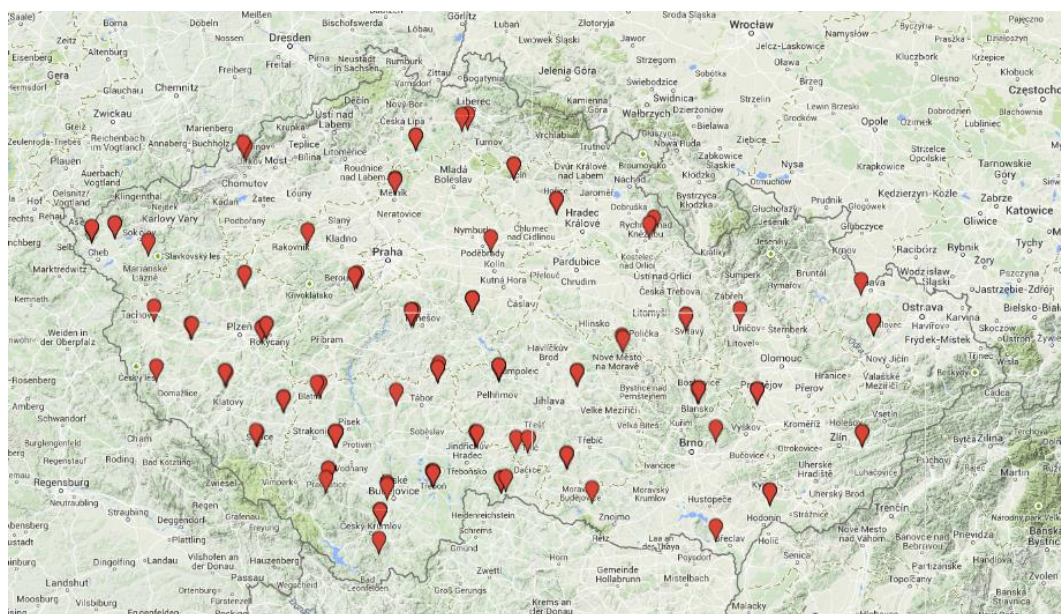
Houbové izoláty byly připraveny ve spolupráci s oddělením Rostlinolékařství, katedry speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Sběr vzorků proběhl v rámci projektu řešeného na Entomologickém ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích.



Obrázek 9: Mapa všech odběrových míst, kde byly nalezeny vzorky rodu *Isaria*



Obrázek 10: Mapa míst sběru vzorků určených dle morfologické analýzy jako *Isaria fumosorosea*



Obrázek 11: Mapa míst sběru vzorků určených dle morfologické analýzy jako *Isaria sp.*

3.6 Izolace hub z půdy

Při sběru bylo odebráno 2,5 kg půdy a z ní poté izolovány entomopatogenní houby. Izolace hub z půdy probíhala v rámci oddělení Rostlinolékařství, katedry speciální produkce rostlinné, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Pro naši analýzu byly použity 3 způsoby izolace:

1. CFU (Colony forming unit) – Izolace pomocí selektivního média
2. „Tenebrio bait method“ - Princip této metody je založen na schopnosti virulentních kmenů entomopatogenních hub vyvolat onemocnění na senzitivním živém hostiteli. Za tímto účelem jsou používány larvy různých druhů hmyzu, nejčastěji pak larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)
3. „Galleria bait method“ - V případě této metody je využíván jako hostitel závíječ voskový (*Galleria mellonella*) (Landa, 2009).

Seznam izolátů použitých v mé studii je uveden v přílohách. č. 1 a 2.

3.7 Kultivace a uchovávání vzorků

Pro získání co největšího množství biomasy byly houby kultivovány v Petriho miskách na PDA médiu (Potato Dextrose Agar, Himedia) po dobu 2 týdnů. Po té byla směs mycelia a konidií odebrána a převedena do kryoprezervační zkumavky s roztokem 20% glycerolu s 5% Tweenem 80. Tímto způsobem je uchována celá sbírka v rámci celého sběru. Z dalších Petriho misek bylo odebráno mycelium pro následující analýzy a uchováno v -20 °C pro nezbytně dlouhou dobu. Zbylé mycelium bylo zamraženo na -80°C.

3.8 Izolace DNA

Genomická DNA ze vzorků byla vyizolovaná pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy Plant Mini Kit 250 od firmy QIAGEN dle přiloženého protokolu v přílohách jako příloha č. 4. Standardní protokol jsme optimalizovali modifikací způsobu homogenizace a inkubace. Vyzkoušeli jsme různé způsoby homogenizace a následné inkubace:

1. Homogenizace pomocí plastových homogenizátorů a inkubace v thermobloku na 65°C
2. Homogenizace pomocí homogenizátorů a inkubace ve vodní lázni na 65°C
3. Homogenizace tekutým dusíkem a inkubace ve vodní lázni na 65°C
4. Homogenizace dusíkem, písem a inkubace ve vodní lázni na 65°C

Po otestování všech 4 postupů byla změřena koncentrace DNA, které se nám podařilo extrahovat. Nejvíce DNA a také nejmenší podíl nečistot obsahoval vzorek, kde homogenizace proběhla pomocí tekutého dusíku a inkubace ve vodní lázni při 65°C. Proto jsem prováděla homogenizaci tímto způsobem. Přítomnost, množství a kvalita DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy.

3.9 PCR reakce

Celkový objem reakce byl 25 μ l.

Složení reakce:

12,5 μ l PPP Master Mixu (Top Bio)

10,9 μ l H₂O

0,3 μ l primer ITS4

0,3 μ l primer ITS5

1 μ l DNA

Použité primery (White *et al.*, 1990):

ITS5- 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'

ITS4- 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

Cyklus PCR reakce (Don a Cox, 1991):

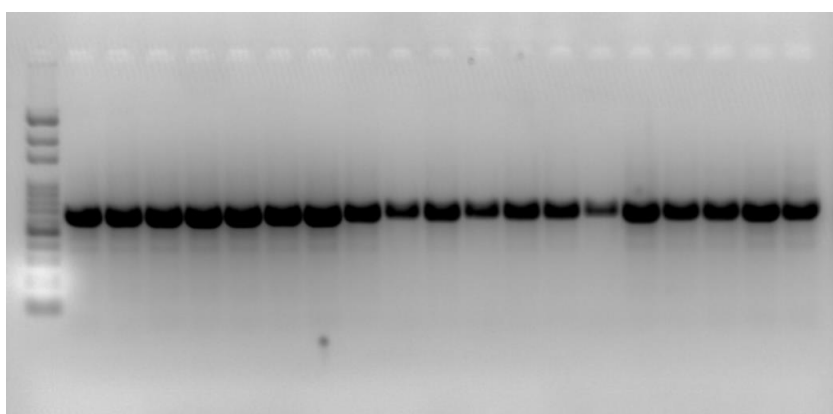
1. 94 °C – 2 min
2. 94 °C – 30 s
3. 63 °C – 3 min
4. 72 °C – 1 min
5. 72 °C – 10 min
6. 4 °C - ∞

Kroky č. 2 – 4 byly 35 x opakovány.

3.10 Separace a detekce vzorků

Separaci jsem provedla technikou zvanou gelová elektroforéza. Detekce produktů byla provedena na 2% agarosovém gelu a jako velikostní marker byl použit DNA Molecular Weight Marker – 100 bp Ladder (Amresco Inc.).

U gelové elektroforézy byly fragmenty DNA vizualizovány barvivem ethidium bromid, které emituje UV záření. Barvivo EtBr neovlivňuje mobilitu DNA v gelu ani detekci správné velikosti fragmentů, proto bylo použito pro mou analýzu. Záznam byl získán pomocí přístroje Avegene SLite 140S.



Obrázek 12: Ukázka separace a detekce PCR produktu ITS regionu na 2% agarosovém gelu

3.11 Přečištění PCR reakce

Pro sekvenování fragmentů je nutné jejich vyříznutí z gelu a následné přečištění, tzn. odstranění volných nukleotidů. Pro tento účel jsem použila komerční kit Invisorb Fragment CleanUp od firmy Stratec Biomedical a postupovala dle protokolu přiloženého v přílohách jako příloha č. 5.

3.12 Sekvenování

Pro získání sekvencí byly vzorky odeslány do firmy SEQme (www.seqme.eu). Obdržená sekvenační data jsem dále zpracovala.

3.13 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení sekvenačních dat byl použit program Chromas Lite 2.1.1., tzv. alignment byl vytvořen pomocí programu ClustalW. Obdržená sekvenační data byla porovnána se sekvencí v databázi NCBI online na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. V programu Geneious 7.0.5 (Biomatters Limited) proběhla tvorba fylogenetických stromů.

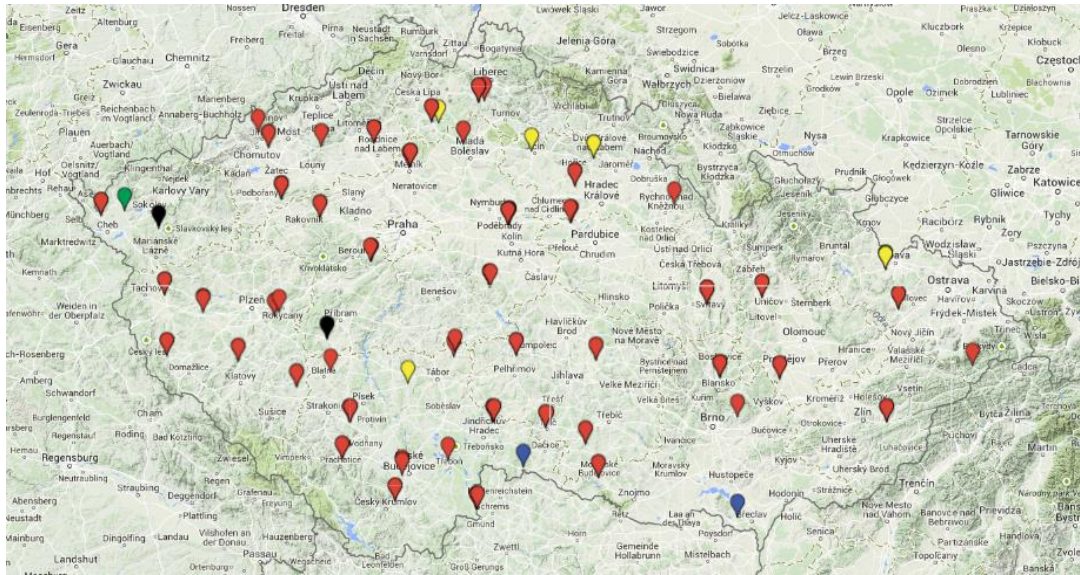
4. VÝSLEDKY

V rámci monitoringu v letech 2013-2014 bylo odebráno celkem 290 vzorků půdy na území České republiky, ze kterých bylo následně získáno 202 izolátů entomopatogenních hub rodu *Isaria* z různých lokalit i habitů. Po morfologické analýze jich 87 bylo určeno jako *Isaria fumosorosea* a ostatních 115 nebylo druhově zařazeno.

Protože identifikace entomopatogenních hub na základě morfologických markerů není jednoznačná, použila jsem při své studii molekulární DNA marker, konkrétně ITS region. Na základě obdržených sekvenačních dat a následným porovnáním se sekvencemi v NCBI databázi (Basic BLAST – Basic Local Alignment Search Tool), jsem došla k závěru, že v některých případech se taxonomické zařazení dle molekulárních DNA markerů liší od zařazení na základě morfologické charakteristiky.

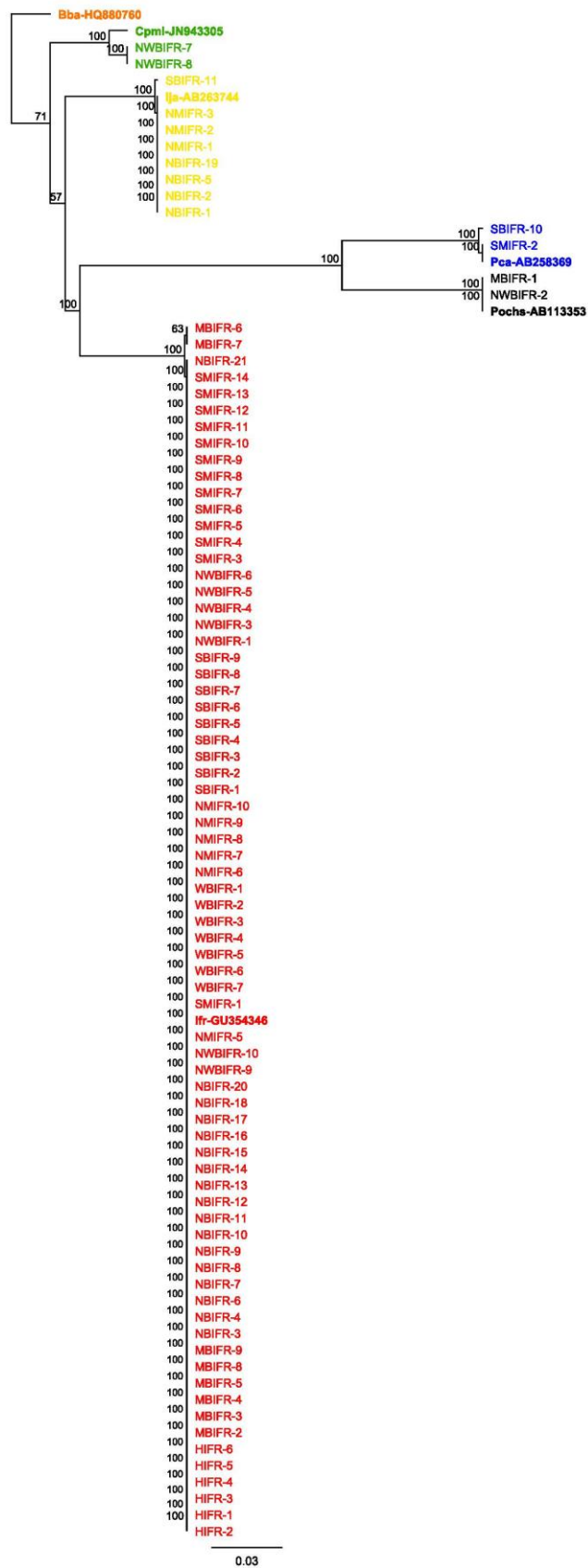
Z 87 vzorků určených morfologickými markery jako *Isaria fumosorosea*, poukázala molekulární analýza na výskyt taxonu *Isaria javanica* a to u 8 vzorků. V dalších dvou případech se jednalo o entomopatogenní houbu *Pochonia suchlasporia*, jeden vzorek byl určen jako *Paecilomyces carneus* a dva jako *Cordyceps pseudomilitaris*. Výsledky po molekulární analýze jsou zobrazeny na mapě č. 13. Rozdíl mezi morfologickou a molekulární identifikací jednotlivých vzorků entomopatogenních hub jsou patrné při porovnání mapy č. 13 a 10.

Červeně označená místa na mapě odpovídají výskytu druhu *Isaria fumosorosea*, lze tedy konstatovat, že v tomto případě, se shoduje taxonomické zařazení pomocí morfologických a molekulárních markerů. Ovšem u míst zvýrazněných žlutou barvou jsem zjistila, že tyto vzorky spadají do druhu *Isaria javanica*, modře označená lokalita odpovídá výskytu druhu *Paecilomyces carneus*, černě označená místa druhu *Pochonia suchlasporia*, lokality označené zelenou barvou odpovídají druhu *Cordyceps pseudomilitaris*. Barevné označení na mapě odpovídá barevnému znázornění ve fylogenetickém stromu.



Obrázek 13: Výsledky analýzy vzorků určených pomocí morfologických markerů jako *Isaria fumosorosea*

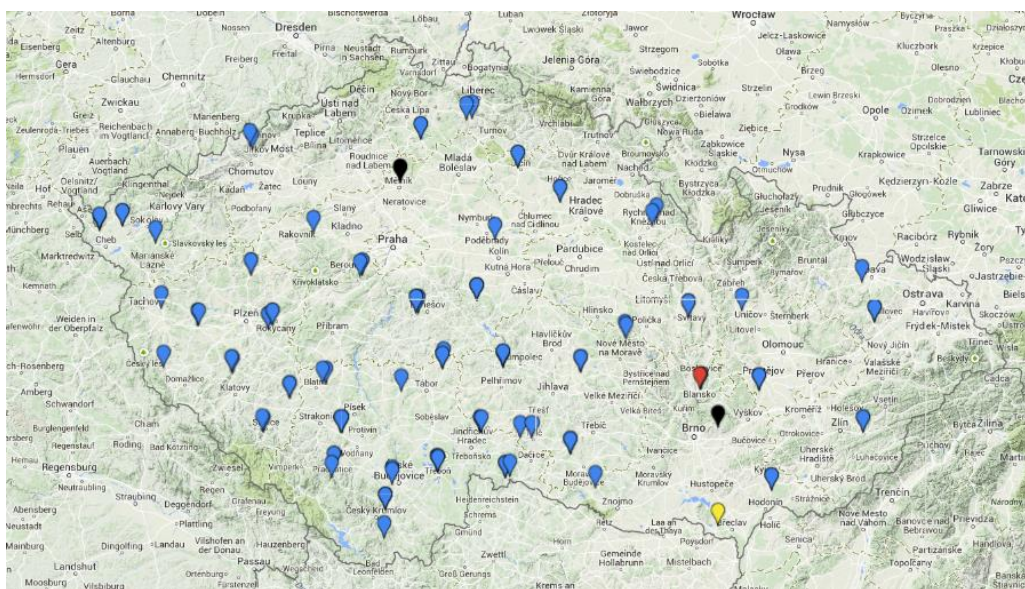
Fylogenetický strom vzorků určených morfologickými markery jako *Isaria fumosorosea*, získaný na základě analýzy sekvenačních dat mých vzorků a zařazení referenčních (viz. příloha č. 3) z NCBI databáze je zobrazen na obr. č. 14. Tvorba všech fylogenetických stromů proběhla na základě UPGMA metody. Jako kořen byl zvolen vzorek *Beauveria bassiana* HQ880760.



Obrázek 14: UPGMA fylogenetický strom 87 izolátů určených morfologicky jako *I. fumosorosea*, izolovaných z půdy na území ČR, založený na sekvencích ITS regionu. „Bootstrap“ hodnota poukazuje na 1000 opakování tvorby fylogenet. stromu v programu Geneious.

Zbylých 115 vzorků bylo taxonomicky zařazeno pouze rodově – *Isaria* sp. Po molekulární analýze ITS regionu a porovnáním s referenčními vzorky (viz tabulka přílohy č. 2) z NCBI databáze byl jeden z mých vzorků identifikován jako *Isaria fumosorosea*, jeden jako *Isaria javanica*, tři vzorky označeny jako *Pochonia suchlasporia* a zbytek vzorků byl tvořen druhem *Paecilomyces carneus*.

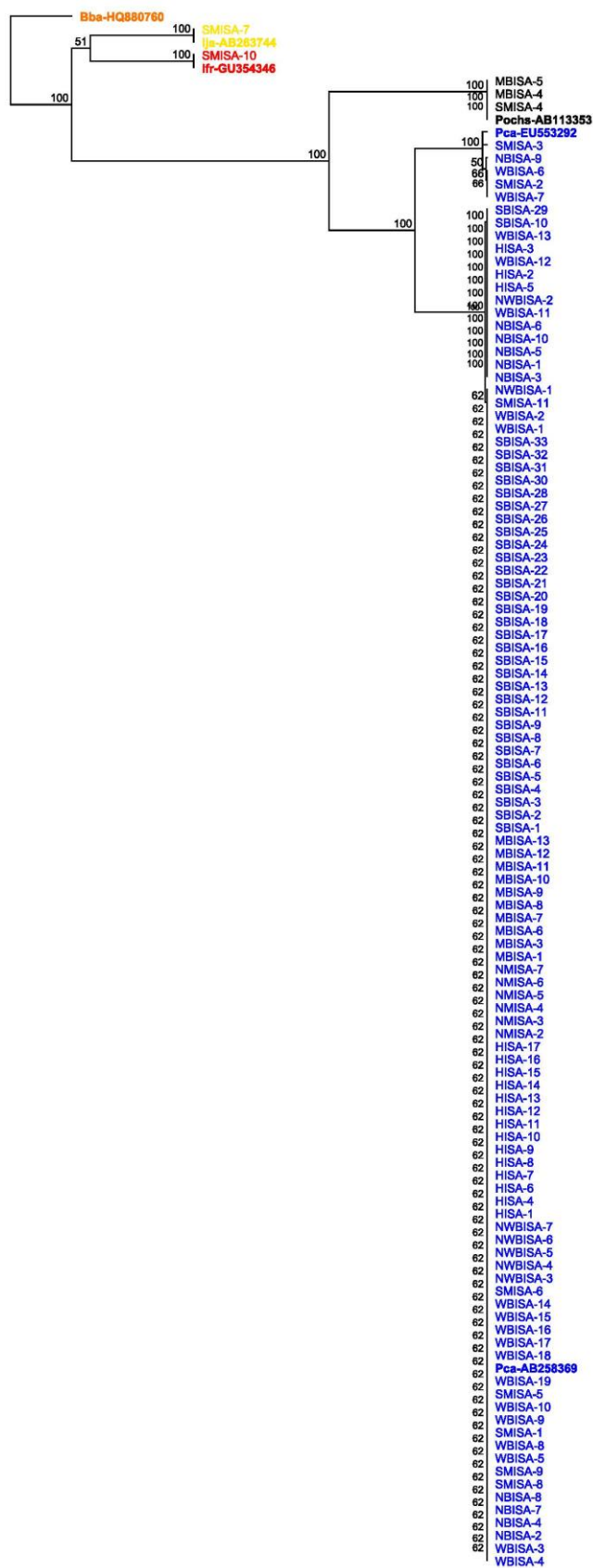
Taxony identifikované molekulárním DNA markerem jsou vyznačené na mapě č. 18, kdy modře zvýrazněné body odpovídají výskytu druhu *Paecilomyces carneus*, červeně označená místa poukazují na přítomnost druhu *Isaria fumosorosea*, černé body na mapě znázorňují druh určený jako *Pochonia suchlasporia* a žlutě zvýrazněný je druh *Isaria javanica*. Rozdíl v analýzách je patrný při porovnání map č. 15 a 11.



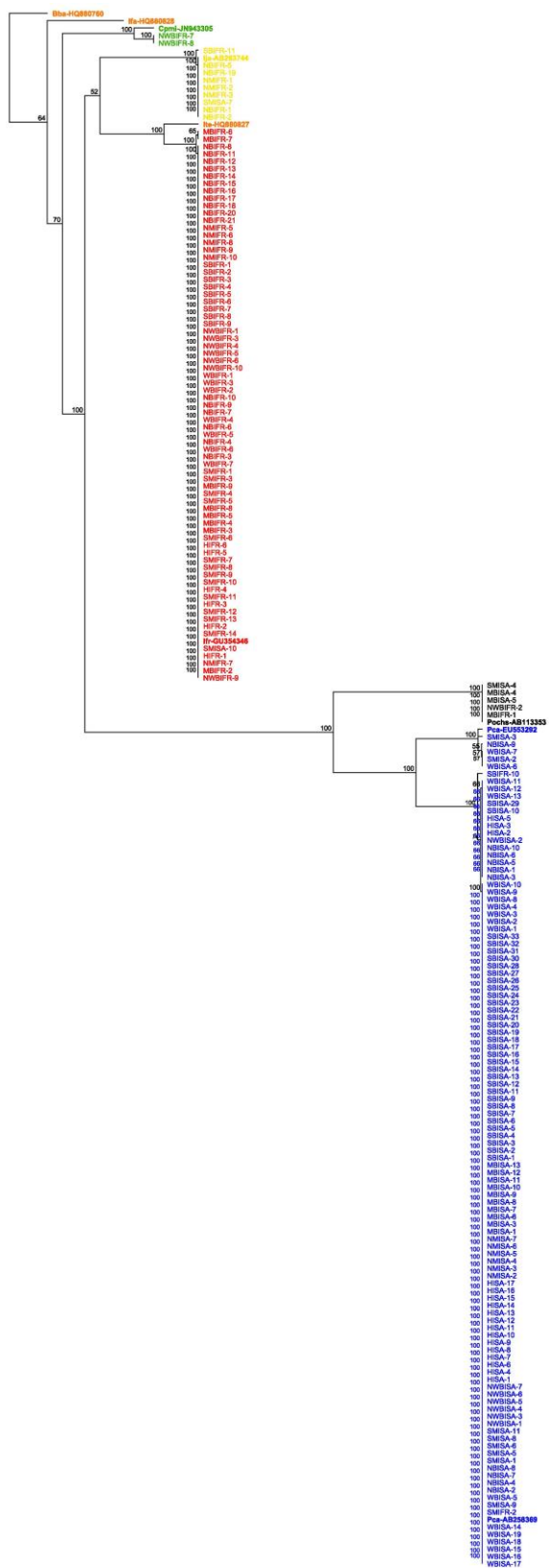
Obrázek 15: Výsledky analýzy vzorků určených pomocí morfologických markerů jako *Isaria* sp.

Fylogenetický strom vzorků určených morfologickými markery jako *Isaria* sp., získaný na základě analýzy sekvenčních dat s porovnáním se sekvencemi referenčních vzorků z NCBI databáze je zobrazen na obr. č. 16. Jako kořen byl zvolen vzorek *Beauveria bassiana* HQ880760.

Jako finální výsledek je znázornění všech získaných sekvenčních dat ITS regionu na obr. č. 17, kde jsou uvedeny všechny vzorky zařazené po morfologické identifikaci jako *Isaria* sp.



Obrázek 16: UPGMA fylogenetický strom 115 izolátů určených morfologicky jako *Isaria sp.*, izolovaných z půdy na území ČR, založený na sekvencích ITS regionu. „Bootstrap“ hodnota poukazuje na 1000 opakování tvorby fylogenet. stromu v programu Geneious.



Obrázek 17: Finální UPGMA fylogenetický strom všech 202 izolátů entomopatogenních hub izolovaných z půdy na území ČR, založený na sekvencích ITS regionu. „Bootstrap“ hodnota poukazuje na 1000 opakování tvorby fylogenet. stromu v programu Geneious.

5. DISKUZE

Již mnoho let je znám význam entomopatogenních hub, jakožto původců infekce u hmyzu, způsobujícího škody na kulturních plodinách. Díky širokému spektru hostitelů nachází uplatnění v biologické ochraně rostlin. Jejich další výhodou je fakt, že mohou napadat různá vývojová stádia hmyzu a vyvolávat přírodní epizootie. Entomopatogenní houby jsou charakterizovány také schopností vyvolat infekci pouhým kontaktem s hmyzem, penetrací jeho kutikuly na rozdíl od jiných entomopatogenů, kdy je nutný příjem perorálně, aby došlo k přenosu infekce (Bing, Lewis, 1991)

Druh *Isaria fumosorosea* je výjimečný v rámci biologické ochrany právě díky svým vlastnostem, zejména vysoké virulenci na cílové škůdce. Už předběžné testy ukázaly, že tento mykoinsekticid je mnohem účinnější, než jiné průmyslově produkováné kmeny, ať už americká Apopka 97, nebo v lesnictví využívaná *Beauveria bassiana* C86. Tento druh je možné využít s neztenčenou efektivitou na skutečně širokou škálu škůdců, ať už skleníkových, zemědělských či lesních. Pro aplikaci je z koncentráту biomasy připravena homogenní suspenze spor, nebo se spory používají ve směsi s inertním nosičem. Spory infikují hmyzí škůdce, kteří po krátké době hynou. Agens houby se vyrovnává s brouky, motýli, roztoči i stejnokřídlým hmyzem. *Isaria fumosorosea* se ukázala jako účinný mykoinsekticid v boji proti klíněnce jírovcové (*Cameraria ohridella*), blýskavce (*Spodoptera littoralis*), molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*) a mnoho dalších. Vzhledem ke kolísavým podmínkám v lesních či polních kulturách, které by mohly snižovat efektivitu aplikace, je prozatím doporučováno využití jen v zemědělských sklenících (Oborník *et al.*, 2001).

Izolovat entomopatogenní houby lze dvěma způsoby. Jedním z nich je izolace z půdy, kde se většina druhů vyskytuje v rámci saprofytické části svého životního cyklu. Druhou možností je izolace z napadených hostitelů – dospělců, nymf, larev. Vhodnými způsoby izolace entomopatogenních hub se ve svých pracích zabývali mimo jiné i Meyling (2008) a Zimmermann (1986). V mé studii byly při izolaci entomopatogenních hub z půdy využity metody CFU, TBM i GBM. Z toho důvodu, že jsou již v laboratořích KSPR ZF JU v ČB zavedeny a osvědčeny již po dlouhou dobu.

Maurer (1997) se zaměřil se na genetickou diversitu v závislosti na hostiteli. Při analýzách použil metody molekulárních markerů RFLP a RAPD. Díky nim došel k závěru, že hostitelský druh může být převažujícím faktorem nad lokalitou. Nepodařilo se to ovšem potvrdit ve všech případech. Naopak Wang *et al.* (2003) prokázal, že genetická podobnost je úzce spojena s geografickou lokalitou, více než s hostitelským druhem s odkazem na studii provedenou Maurerem (1997).

Izoláty entomopatogenních hub, použité při mé studii, pochází z mnoha lokalit a habitů České republiky. Proto jsem měla možnost porovnat výskyt druhů entomopatogenních hub rodu *Isaria* v závislosti jak na lokalitě, tak i ekologických podmínkách. V mé studii jsem nezaznamenala, žádnou souvislost mezi lokalitou, výskytem daného druhu a ekologickými podmínkami. Otázkou však je zda Česká republika nabízí dostatečné spektrum odlišných lokalit a podmínek. I Meyling (2006) uvádí, že entomopatogenní houby musí být především v kontaktu s citlivým hostitelem a musí být účastny vhodné podmínky pro infekci, aby bylo docíleno sporulace. Tento vztah houba-hostitel, výskyt v různých substrátech a období roku má značný vliv na koncentraci inokula. A jelikož v mé práci jsou použity vzorky z půdy, nelze tyto vztahy hodnotit.

Základem pro mou studii byla vysoce kvalitní DNA. Jak konstatovali i Enkerli a Widmer (2009), izolace vysoce kvalitní DNA je velice důležitou otázkou v případě molekulární a ekologické analýzy entomopatogenních hub. Jako nejrychlejší a nejúčinnější metodou se ukázala izolace DNA pomocí komerčně dostupného kitu od firmy QIAGEN. Vyzkoušena byla také metoda CTAB, která se však neukázala tak účinná a měla problém s překonáním kontaminace pigmenty a dalších PCR inhibičních látek, které entomopatogenní houby rodu *Isaria* obsahují. Izolaci DNA komerčním kitem také upřednostňují Reay *et al.* (2008), který izoloval z kůry, z půdy a z kůrovce a Castrillo *et al.* (2007), který tuto izolaci použil pro analýzu mikrosatelitových markerů, na jejichž základě byla posuzována genetická variabilita mezi izoláty *Beauveria bassiana*. V mém případě byl však protokol modifikován a to v bodě, kde probíhá homogenizace materiálu. Pro důkladnější homogenizaci byl použit tekutý dusík a inkubace probíhala ve vodní lázni namísto doporučeného termobloku.

Pro identifikaci entomopatogenních hub jsem v mé studii použila molekulární DNA marker ITS region. Již v dřívějších studiích bylo dokázáno, že ITS region je důležitou oblastí, která nám dobře poslouží při určení genetické variability entomopatogenních hub. Johnny *et al.* (2012) použil tuto analýzu při fylogenetickém zařazení druhu *Isaria farinosa* a *Paecilomyces lilacinus* v Kanadě. Podobnou studii provedl i Freed o rok dříve (2011). Ten se zabýval fylogenezí entomopatogenních hub izolovaných z odlišných ekosystémů v Pakistánu, Číně, Jižní Koreji, Indonésii a Holandsku. Získaná sekvenční data také porovnával se sekvencemi v NCBI databázi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). V tomto případě byl nejvíc zastoupen druh *Isaria fumosorosea*, ovšem s odlišnými referenčními kmeny, než které byly využity při mé analýze.

Jak uvádí Meyling (2007), identifikace entomopatogenních hub pomocí molekulárních markerů je mnohem vhodnější než využití morfologických markerů, které je velmi variabilní a nepřesné. Vzhledem k závěrům, ke kterým jsem při mé studii dospěla, se mohu k tomu názoru přiklonit. V některých případech se taxonomické zařazení lišilo podle druhu markerů, který byl pro identifikaci použit (morfologický x molekulární). Avšak musím konstatovat, že jisté nedostatky jsou stále v sekvencích, které jsou přístupné v NCBI databázi a slouží k porovnání se sekvencemi získanými během analýzy. Některé sekvence v databázi jsou součástí prací, které nebyly doposud publikovány, a proto není jejich správnost zcela jistá, proto jsem referenční vzorky vybírala velmi precizně dle autorů a publikací, které byly již vydány a jejich spolehlivost je prokázána.

Z 87 vzorků určených morfologickými markery jako *Isaria fumosorosea* poukázal molekulární DNA marker ITS region na přítomnost druhu *Cordyceps pseudomilitaris*, *Paecilomyces carneus*, *Pochonia suchlasporia*, *Isaria javanica* a již zmíněný druh *Isaria fumosorosea*. Rod *Cordyceps* je telemorfoou od rodu *Isaria* a byl identifikován i během studie, kterou vedl Johnny *et al.* (2012)). V našich podmínkách není pohlavní rozmnožování rodu *Isaria* běžné a tyto případné změny nebyly patrné ani z morfologického hlediska.

Během studie se Johny *et al.* (2012) setkal s výskytem druhu *Paecilomyces carneus*, který byl rovněž identifikován v mé práci v souboru vzorů „IFR“. V jeho případě byl tento druh izolován z písku (Francie) a lesní půdy (USA), v mém případě pocházel vzorek z neobdělané půdy v Jižní Moravě. *Pochonia suchlasporia* spadá taxonomicky také do stejné čeledi *Clavicipitaceae* jako rod *Isaria*. Usuki *et al.* (2009), který se zabýval významem pochonicinu, sekundárního metabolitu *Pochonie*, uvádí, že její mycelium má bílou až nažloutlou barvu, a proto se mohlo stát, že morfologicky byla zařazena jako *Isaria fumosorosea*. U 73 vzorků bylo potvrzeno taxonomické zařazení pomocí morfologických markerů a entomopatogenní houby byly určeny jako *Isaria fumosorosea* a to dle stejného referenčního kmenu v NCBI databázi GU354346.

Zbýlých 115 vzorků bylo zařazeno pouze rodově. Nelze zde tedy porovnat shodu mezi identifikací morfologickými a molekulárními markery. Nejvíce, a to u 110 vzorků, byl zastoupen druh *Paecilomyces carneus*, který byl však také označen na základě morfologických markerů jako *Isaria fumosorosea*. Vzhledem k tomu, že literatura nevěnuje tomuto druhu příliš pozornosti, mě velké zastoupení tohoto druhu překvapilo. Otázkou je zda důvodem nemůže být nedostatečné množství informací o případném druhu, který má z molekulárního hlediska stejný profil jako *Paecilomyces carneus*. Na druhou stranu ale i Horňák (2004), který se ve své práci věnoval monitoringu entomopatogenních hub na území jihočeského regionu, uvádí, že druhým nejvíce zastoupeným druhem v rámci jeho analýzy byl právě druh *Paecilomyces carneus*. Očekávaná byla přítomnost druhu *Isaria farinosa*, kterou se nám však detekovat nepodařilo. Další druhy, které byly identifikovány u vzorků *Isaria* sp. byly *Isaria javanica*, *Isaria fumosorosea* a již zmíněná *Pochonia suchlasporia*.

6. ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo vytvoření kryo – kolekce vzorků entomopatogenních hub rodu *Isaria* získaných v rámci monitoringu v České republice. Dále pak zhodnocení genetické variability pomocí technik molekulárních markerů a vytvoření fylogenetického stromu na základě získaných sekvenačních dat zkoumaného lokusu. Mezi cíle této diplomové práce také patřilo zhodnocení taxonomického zařazení studovaných vzorků po morfologické analýze.

- Během této studie došlo k vytvoření kryo – sbírky vzorků entomopatogenních hub rodu *Isaria* uchovávané v -80°C , které byly získané během monitoringu v letech 2013 – 2014 na území České republiky
- Díky molekulárnímu DNA markeru ITS region byly vytvořeny fylogenetické stromy, pomocí kterých bylo možné zhodnotit genetickou variabilitu analyzovaných vzorků
- Byla dokázána účinnost a využitelnost ITS regionu při identifikaci entomopatogenních hub rodu *Isaria* sp.
- Na základě výsledků molekulární analýzy, jsem zhodnotila taxonomické zařazení studovaných vzorků po morfologické analýze a zjistila přítomnost druhů, které nebylo možno morfologickými markery identifikovat (*Isaria javanica*, *Paecilomyces carneus*, *Pochonia suchlasporia*, *Cordyceps pseudomilitaris*), z čehož plyne hlavní závěr a to, že je v dnešní době nutné doplnit morfologické charakteristiky o molekulární, aby bylo možné správné taxonomické zařazení

Hypotézou bylo potvrzení taxonomického zařazení dle morfologických parametrů. Tato hypotéza nebyla plně potvrzena. U několika vzorků se lišilo taxonomické zařazení na základě molekulárních dat od morfologických markerů. Analýzou ITS regionu došlo ke druhovému rozčlenění souboru „ISA“ a získaná data ze sekvenačních reakcí bylo možno porovnat s referenčními vzorky z NCBI databáze a tím je spolehlivě přiřadit ke správnému druhu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS, B. (2004): ESSENCIAL CELL BIOLOGY. 2. VYD. NEW YORK: GARLAND SCIENCE, ISBN 978-0815334804.

ALBERTS, B.(2008): MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 5. VYD. NEW YORK: GARLAND SCIENCE, ISBN 978-081-5341-062.

AVISE, J. C. (2004): THE HOPE, HYPE, AND REALITY OF GENETIC ENGINEERING. OXFORD UNIVERSITY PRESS, NEW YORK

BIELIKOVA, L.; LANDA, Z.; OSBORNE, L.; ČURN, V. (2002): CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF ENTHOMOPATHOGENIC AND MYCOPARAZITIC FUNGI USING RAPD-PCR TECHNIQUE. *PLANT PROTECTION SCIENCE*. Č. 38.

BING, L. A.; LEWIS, L. C. (1991): SUPPRESSION OF *OSTRINIA NUBILALIS* BY ENDOPHYTIC *BEAUVERIA BASSIANA*, ENVIRON ENTOMOL, 20 :1207-1211

BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K. (1998): INTERPRETATION OF PCR METHODS FOR SPECIES DEFINITION. AN OVERVIEW. APPLICATION OF PCR IN MYCOLOGY.

BUTT, T. M.; GOETTEL, M. S. (2000): BIOASSAY OF ENTOMOGENOUS FUNGI. BIOASSAYS OF ENTOMOPATHOGENIC MICROBES AND NEMATODES.

CANTONE, A. F; VANDENBERG, J. D (1998):INTRASPECIFIC DIVERSITY IN *PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS*, MYCOL. RES. 102 (2) : 209-215.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. (1980): COMPENDIUM OF SOIL FUNGI. VOL. 1, ACADEMIC PRESS, LONDON, PAGES: 859.

DON, R. H.; COX, P. T. (1991): TOUCHDOWN PCR TO CIRCUMVENT SPURIOUS PRIMING DURING GENE AMPLIFICATION. NUCLEIC ACIDS RES. 1991 JUL 25; 19(14): 4008.

EDEL, V.(1998): POLYMERASE CHAIN REACTION IN MYCOLOGY: AN OVERVIEW. APPLICATION OF PCR IN MYCOLOGY.

EKESI, S.; MANANIA, N. K. (2007): USE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN BIOLOGICAL PEST MANAGEMENT. KERALA, INDIA: RESEARCH SIGNPOST, 2007, XIV, 333 P. ISBN 81-308-0192-2.

ENKERLI, J.; WIDMER, F. (2009): A PCR-BASED TOOL FOR THE CULTIVATION-INDEPENDENT MONITORING OF *PANDORA NEOAPHIDIS*, PATHOL 99: 49-56

FOWLER, M; GARTLAND, K. (1993):TECHNIQUES FOR ENGINEERING GENES. BOSTON: BUTTERWORTH HEINEMANN, BIOTECHNOLOGY BY OPEN LEARNING (SERIES). ISBN 07-506-0556-1.

FREED, S.; JIN F. L.; REN, S. (2011): PHYLOGENETICS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM THE SOILS OF DIFFERENT ECOSYSTEMS. ZOOLOGICAL SOCIETY OF PAKISTAN. Č. 43.

GOETTEL, M. S.; INGLIS, G.D. (1997): FUNGI: HYPHOMYCETES. MANUAL OF TECHNIQUES IN INSECT PATHOLOGY (ED. BY L. A. LACEY), PP. 213-249. ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, USA.

GAUDET, J.; JULIEN, J.; LAFAY, J. F.; BRYGOO, Y. (1989): PHYLOGENY OF SOME *FUSARIUM* SPECIES, AS DETERMINED BY LARGE SUBUNITS rRNA SEQUENCE COMPARISON. MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION 6: 227-242.

GUL, H. T.; SAEED S.; KHAN, F. Z. A. (2014): ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AS EFFECTIVE INSECT PEST MANAGEMENT TACTIC: A REVIEW. *APPLIED SCIENCES AND BUSINESS ECONOMICS*, Č. 1.

HAVILL, N. P. (2007): EVOLUTION OF HOST SPECIALIZATION IN THE ADELGIDAE. *DIRECT SUBMISSION*, Č. 44.

HORŇÁK, P. (2004): MONITORING PŘIROZENÉHO VÝSKYTU ENTOMOPATOGENNÍCH HUB V PŮDNÍCH EKOSYSTÉMECH. ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA, JIHOČESKÁ UNIVERZITA V Č. BUDĚJOVICÍCH, S. 128. (DIZERTAČNÍ PRÁCE).

CHAHUAN, J. B. (2007): ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF B-TUBULIN GENE FROM *ARTHROBOTRYS MUSIFORMIS* A NEMATODE TRAPPING FUNGUS, INDIAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY VOL 6, JULY 2007, PP 404-406

INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S. (2006): IDENTIFICATION AND TAXONOMY OF SOME ENTOMOPATHOGENIC *PAECILOMYCES* SPP. (*ASCOMYCOTA*) ISOLATES USING rDNA-ITS SEQUENCES. *GENET. MOL. BIOL.* 29 (1), 132-136

JOHNY, S.; KYEI-POKU, G.; GAUTHIER, D. (2012): ISOLATION AND CHARACTERISATION OF *ISARIA FARINOSA* AND *PURPUREOCILLIUM LILACINUM* ASSOCIATED WITH EMERALD ASH BORER, *AGRILUS PLANIPENNIS* IN CANADA. *BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY*, ROČ. 22, Č. 6.

KALINA, T.; VÁŇA, J. (2005): SINICE, ŘASY, HOUBY, MECHOROSTY A PODOBNÉ ORGANISMY V SOUČASNÉ BIOLOGII. PRAHA: KAROLINUM. S. 231-233. ISBN 8024610361.

KHACHATOURIANS G.; ARORA, D. K. (2004): APPLIED MYCOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. 4ST ED. NEW YORK: ELSEVIER, 3 V. ISBN 044451807X6.

KOUBOVÁ, D. (2009): VYUŽITÍ HUB V BIOLOGICKÉ OCHRANĚ ROSTLIN [ONLINE]. [CIT. 2014-10-25]. DOSTUPNÉ Z: WWW.BIO-INFO.CZ/UPLOADS/DOWNLOAD/VYUZITI_HUB_V_BIOLOGICKE_OCHRANE_ROSTLIN.PDF

KYONG, S. N.; YOUNG, S. J.; YOUNG, H. K.; JIN, W. H.; HA, W. K. (2000): CYTOTOXIC ACTIVITIES OF ACETOXYSCIRPENEDIOL AND ERGOSTEROL PEROXIDE FROM *PAECILOMYCES TENUIPES*, *LIFE SCIENCES* 69 (2001) 229-237

LANDA, Z. (2009): ENTOMOPATOGENNÍ HOUBY. KATEDRA ROSTLINNÉ VÝROBY A AGROEKOLOGIE, JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH [ONLINE] [VID. 21. ÚNOR 2014]. DOSTUPNÉ Z: [HTTP://RL.ZF.JCU.CZ/DOCS/RUZNE/RUZ-MOR-P4F-F6C167A163.PDF](http://rl.zf.jcu.cz/docs/ruzne/ruz-mor-p4f-f6c167a163.pdf)

LANDA, Z.; BOHATÁ, A.; KALISTA, M. (2008): ZÁMĚRNÉ VYUŽÍVÁNÍ AUTOCHTONNÍCH KMENŮ VYBRANÝCH DRUHŮ ENTOMOPATOGENNÍCH HUB. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH EKONOMICKÁ FAKULTA, EDIČNÍ STŘEDISKO. ISBN 978-80-7394-149-9.

LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. (1999): PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG ASCOMYCETES: EVIDENCE FROM AN RNA POLYMERASE II SUBUNIT. *MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION* 16: 1799-1808

LIU, Y., J.; HALL, B., D.(2004): BODY PLAN EVOLUTION OF ASCOMYCETES, AS INFERRED FROM AN RNA POLYMERASE II PHYLOGENY. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 101: 4507-4512

MATHENY, B. P (2004): IMPROVING PHYLOGENETIC INFERENCE OF MUSHROOMS WITH RPB1 AND RPB2 NUCLEOTIDE SEQUENCES (INOCYBE; AGARICALES), *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 35 (2005) 1–20

MAURER, P.; RÉJASSE, A.; CAPY, P.; LANGIN, T.; RIBA, G. (1997): ISOLATION OF THE TRANSPOSABLE ELEMENT HUPFER FROM THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAUVERIA BASSIANA* BY INSERTION MUTAGENESIS OF THE NITRATE REDUCTASE STRUCTURAL GENE, *MOLECULAR AND GENERAL GENETICS*, 256: 195-202.

MEYLING, N. V.(2008): PCR-BASED CHARACTERISATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR ECOLOGICAL STUDIES. *VEGQURE*.

MEYLING, N. V. (2007): METHODS FOR ISOLATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FROM THE SOIL ENVIRONMENT, DELIVERABLE 5.1, VEGQURE, DARCOF III: RESEARCH IN ORGANIC FOOD AND FARMING

MEYLING, N. V. (2012): OCCURRENCE AND DIVERSITY OF FUNGAL ENTOMOPATHOGENS IN SOILS OF LOW AND HIGH ARCTIC GREENLAND, *POLAR BIOL* (2012) 35:1439–1445.

MILLER, A. N.; HUHNDORF, S. M. (2005): MULTI-GENE PHYLOGENIES INDICATE ASCOMAL WALL MORPHOLOGY IS A BETTER PREDICTOR OF PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS THAN ASCOSPORE MORPHOLOGY IN THE SORDARIALES (ASCOMYCOTA, FUNGI). *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 35: 60-75

OBORNÍK, M.; JIRKŮ, M.; DOLEŽEL, D.(2001): FYLOGENY OF MITOSPORIC ENTOMOPATHOGENIC FUNGI: IS THE GENUS *PAECILOMYCES* POLYPHYLETIC?. *CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, č. 47.

ONDŘEJ, M.; DROBNÍK, J. (2002): TRANSGENOZE ROSTLIN, AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; LINGEY, S. A. RAFALSKI, A. (1996): THE UNITY OF RFLP, RAPD, AFLP AND SSR (MICROSATELLITE) MARKERS FOR GERMPLASM ANALYSIS. *MOL. BREED.* 2: 225-238.

PRENEROVÁ, E. (2011): STUDIUM VYUŽITELNOSTI ENTOMOPATOGENNÍCH HUB V SYSTÉMU INTEGROVANÉ OCHRANY SMRKOVÝCH POROSTŮ PROTI PLOSKOHŘBETCE SMRKOVÉ VE STÁDIU VAJÍČEK A PRVÝCH INSTARŮ. *VÝZKUMNÉ PROJEKTY GRANTOVÉ SLUŽBY LČR.*

REAY, S. D., BROWBRIDGE, M., CUMMINGS, N. J., NELSON, T. L., SOUFFRE, B., LIGNON, C., GLARE, T. R. (2008): ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *BEAUVERIA* SPP. ASSOCIATED WITH EXOTIC BARK BEETLES IN NEW ZEALAND *PINUS RADIATA* PLANTATION FORESTS. *BIOLOGICAL CONTROL* 46: 484 – 494.

REHNER, S. A.; MINNIS, A. M.; SUNG, G. H.; LUANGSA, J. J.; DEVOTTO, L.; HUMBRER, R. A. (2011): PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF THE ANAMORPHIC, ENTOMOPATHOGENIC GENUS *BEAUVERIA*, *MYCOLOGIA*, 103(5)

ŘERP KOVÁ, J. (2013): GENETIKA ROSTLIN, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF,S.; ROBERT, V.; SPOUGE,J. L.; LEVESQUE,C.A.; CHEN,W. (2012): NUCLEAR RIBOSOMAL INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) REGION AS A UNIVERSAL DNA BARCODE MARKER FOR FUNGI, *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.*

SAMSON, R. A. (1974): *PAECILOMYCES* AND SOME ALLIED *HYPHOMYCETES*. *STUDIES IN MYCOLOGY.* 6:1-119

SMITH, J. E.; GARTLAND, K. (1996): *BIOTECHNOLOGY.* 3RD ED. NEW YORK, NY, USA: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, BIOTECHNOLOGY BY OPEN LEARNING (SERIES). ISBN 05-214-4911-1.

SUNG, G. H; HYWEL-JONES, N. L.; SUNG, J. M.; LUANGSA-ARD, J. J.; SHRESTHA B & SPATAFORA, J. W. (2007): PHYLOGENETIC CLASSIFICATION OF *CORDYCEPS* AND THE CLAVICIPITACEOUS FUNGI. *STUD MYCOL* 57: 5–59.

ŠMARDA, J. (2005): *METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE.* 1. VYD. BRNO: MASARYKOVA UNIVERZITA, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

TARTAR, A.; SHAPIRO, A. M.; SCHARF, D. W.; BOUCIAS, D., G. (2005): DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CHITIN SYNTHASE (CHS) AND GLUCAN SYNTHASE (FKS) GENES CORRELATES WITH THE FORMATION OF A MODIFIED, THINNER CELL WALL IN *IN VIVO*-PRODUCED *BEAUVERIA BASSIANA* CELLS. *MYCOPATHOLOGIA* 160:303-314.

USUKI, H.; MIHO, T. O.; KANZAKI, H.; OKUDA, T. (2009): POCHONICINE, A POLYHYDROXYLATED PYRROLIZIDINE ALKALOID FROM FUNGUS POCHONIA SUCHLASPORIA VAR. SUCHLASPORIA TAMA 87 AS A POTENT B-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE INHIBITOR

VÁŇA J. (1998): SYSTÉM A VÝVOJ HUB A HOUBOVÝCH ORGANISMŮ, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, NAKLADATELSTVÍ KAROLINUM, PRAHA, 164 s.

WANG, C., SSHAH, F. A., PATEL, N., LI, Z., BUTT, T. M. (2003): MOLECULAR INVESTIGATION ON STRAIN GENETIC RELATEDNESS AND POPULATION STRUCTURES OF BEAUVERIA BASSIANA. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 5(10): 908-915.

WHITE, T. J., BRUNS T., LEE, S., TAYLOR, J. (1990): AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. IN: PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS. (INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE TJ, EDS). ACADEMIC PRESS, NEW YORK, USA: 315–322.

WOESE, C. (2002): ON THE EVOLUTION OF CELLS. PROC NATL ACAD SCI U S A 99 (13): 8742–7

YOKOYAMA, E., ARAKAWA, M., YAMAGISHI, K. HARA, A. (2006): PHYLOGENETIC AND STRUCTURAL ANALYSES OF THE MATING-TYPE LOCI IN CLAVICIPITACEAE. FEMS MICROBIOL. LETT. 264 (2), 182-191

ZIMMERMANN, G. (2008): THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGI *ISARIA FARINOSA* (FORMERLY *PAECILOMYCES FARINOSUS*) AND THE *ISARIA FUMOSOROSEA* SPECIES COMPLEX (FORMERLY *PAECILOMYCES FUMOSOROSEUS*): BIOLOGY, ECOLOGY AND USE IN BIOLOGICAL CONTROL. *BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY*. 2008, č. 18.

ZIMMERMANN, G. (1986): THE GALLERIA BAIT METHOD FOR DETECTION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN SOIL. JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY, 102, 213-215.

8. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Seznam vzorků určených morfologickými markery jako *I. fumosorosea*

Název Vzorku	Označení lokality	Lokalita	Habitat	Datum sběru	Morf. určení
NBIFR-1	NB3B	Jičín	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-2	NB3B	Jičín	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-3	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-4	NB5B	Doubravice	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-5	NB5B	Doubravice	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-6	NB5C	Doubravice	Smíšený les	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-7	NB2C	Knežničky	Neobdělaná půda	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-8	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-9	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-10	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-11	NB5B	Doubravice	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-12	NB2B	Česky Dub	Smíšený les	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-13	NB1B	Doksy	Pole (obilí)	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-14	NB5B	Doubravice	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-15	NB4A	Nechanice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-16	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-17	NB4A	Nechanice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-18	NB5A	Doubravice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-19	NB1A	Doksy	Louka	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-20	NB4A	Nechanice	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NBIFR-21	NB6A	Liberk	Louka	22.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-1	NM3A	Slavkov	Louka	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-2	NM3C	Slavkov	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-3	NM3D	Slavkov	Pole	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-4	NM3E	Slavkov	Křoviny	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-5	NM5C	Stavenice	Břeh řeky	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-6	NM3E	Slavkov	Křoviny	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-7	NM3E	Slavkov	Křoviny	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-8	NM2A	Fulnek	Louka	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-9	NM2A	Fulnek	Louka	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NMIFR-10	NM1D	Staré Hamry	Jehličnatý les	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-1	SM5A	Hostěnice	Louka	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-2	SM2C	Hlohovec	Neobdělaná půda	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-3	SM6B	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-4	SM1A	Vranovská Ves	Louka	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-5	SM4B	Vizovice	Křoviny	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>

SMIFR-6	SM1A	Vranovská Ves	Louka	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-7	SM6B	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-8	SM1A	Vranovská Ves	Louka	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-9	SM6B	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-10	SM1A	Vranovská Ves	Louka	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-11	SM6B	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-12	SM6B	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-13	SM2D	Hlohovec	Jehličnatý les	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
SMIFR-14	SM2D	Hlohovec	Jehličnatý les	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-1	MB1D	Skruhrov	Smišený les	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-2	MB3C	Ruda	Neobdělaná půda	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-3	MB5B	Čistá	Pole (obilí)	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-4	MB5B	Čistá	Pole (obilí)	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-5	MB1A	Skruhrov	Louka	21.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-6	MB8D	Velký Osek	Smišený les	21.9.2014	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-7	MB8C	Velký Osek	Smišený les	21.9.2014	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-8	MB8D	Velký Osek	Smišený les	21.9.2014	<i>I. fumosorosea</i>
MBIFR-9	MB8D	Velký Osek	Smišený les	21.9.2014	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-1	NWB1B	Františkovy Lázně	Pole (řepka olejka)	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-2	NWB3A	Krásno	Louka	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-3	NWB3B	Pesvice	Pole (obilí)	16.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-4	NWB4A	Sádek	Neobdělaná půda	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-5	NWB4E	Sádek	Křoviny	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-6	NWB2A	Horka	Louka	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-7	NWB2A	Horka	Louka	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-8	NWB2A	Horka	Louka	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-9	NWB3B	Pesvice	Pole (kukuřice)	16.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
NWBIFR-10	NWB2A	Horka	Louka	15.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-1	H5C	Telč	Pole (řepka olejka)	29.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-2	H2C	Koclířov	Ovocný sad	23.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-3	H2A	Koclířov	Louka	23.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-4	H2A	Koclířov	Louka	23.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-5	H2A	Koclířov	Louka	23.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>
HIFR-6	H2A	Koclířov	Louka	23.10.2013	<i>I. fumosorosea</i>

SBIFR-1	SB1D	Třeboň	Listnatý les	18.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-2	SB2C	Pýchov	Břeh řeky	19.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-3	SB5C	Skaličany	Břeh rybníka	22.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-4	SB1D	Třeboň	Listnatý les	18.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-5	SB7E	Mladá Vožice	Křoviny	29.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-6	SB9A	Halámky	Neobdělaná půda	29.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-7	SB9E	Halámky	Křoviny	29.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-8	SB2D	Pýchov	Smíšený les	19.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-9	SB8E	Staré město pod L.	Křoviny	29.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-10	SB8E	Staré město pod L.	Křoviny	29.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
SBIFR-11	SB6A	Opařany	Louka	22.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-1	WB1E	Švihov	Křoviny	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-2	WB2E	Drahotín	Křoviny	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-3	WB1E	Švihov	Křoviny	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-4	WB1E	Švihov	Křoviny	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-5	WB1E	Švihov	Křoviny	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-6	WB4E	Lhota u Stříbra	Něobdělaná půda	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>
WBIFR-7	WB6B	Lhůta	Pole (řepka olejka)	20.10.2014	<i>I. fumosorosea</i>

Pozn.: V případě, že číselná řada vzorků není kompletní, došlo k vyřazení izolátu z analýzy z důvodu kontaminace a nemožného přečištění vzorku.

Příloha č. 2: Seznam vzorků určených morfologickými markery jako *Isaria* sp.

Název vzorku	Označení lokality	Lokalita	Habitat	Datum sběru	Morf. určení
NBISA-1	NB1B	Doksy	Pole (obilí)	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-2	NB1E	Doksy	Křoviny	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-3	NB3B	Jičín	Pole (řepka olejka)	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-4	NB3E	Jičín	Křoviny	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-5	NB2B	Český Dub	Smíšený les	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-6	NB2E	Knežničky	Křoviny	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-7	NB4B	Nechanice	Pole (obilí)	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-8	NB4E	Nechanice	Křoviny	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-9	NB6C	Liberk	Skála	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NBISA-10	NB6E	Jaroslav	Křoviny	22.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-1	SM1E	Vranovská Ves	Křoviny	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-2	SM3D	Vacenovice	Smíšený les	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-3	SM3E	Vacenovice	Křoviny	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-4	SM5C	Hostěnice	Smíšený les	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-5	SM4A	Vizovice	Louka	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-6	SM4B	Vizovice	Křoviny	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-7	SM2E	Hlohovec	Křoviny	29.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-8	SM6A	Rajec Jestřebí	Louka	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-9	SM6C	Rajec Jestřebí	Pole (obilí)	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-10	SM6D	Rajec Jestřebí	Smíšený les	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
SMISA-11	SM6E	Rajec Jestřebí	Křoviny	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-1	MB3B	Ruda	Pole (obilí)	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-3	MB2E	Mořina	Křoviny	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-4	MB4D	Mělník	Smíšený les	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-5	MB4E	Mělník	Křoviny	21.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-6	MB6A	Vlková	Louka	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-7	MB6C	Vlková	Břeh reky	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-8	MB6D	Vlková	Smíšený les	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-9	MB6E	Vlková	Křoviny	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-10	MB7A	Vatěkov	Louka	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-11	MB7D	Černikovice	Smíšený les	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-12	MB7E	Černikovice	Křoviny	23.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
MBISA-13	MB8D	Velký Osek	Smíšený les	21.9.2014	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-2	NM5E	Stavenice	Křoviny	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-3	NM2A	Fulnek	Louka	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-4	NM2B	Fulnek	Pole (řepka olejka)	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-5	NM6A	Dětkovice	Louka	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-6	NM6B	Dětkovice	Třeňový sad	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NMISA-7	NM6C	Dětkovice	Jehličnatý les	30.10.2013	<i>Isaria</i> sp.
NWBISA-1	NWB1A	Františkovy Lázně	Louka	15.10.2013	<i>Isaria</i> sp.

NWBISA-2	NWB1C	Františkovy Lázně	Neobdělaná půda	15.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
NWBISA-3	NWB3A	Krásno	Louka	15.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
NWBISA-4	NWB5A	Jindřišská	Louka	16.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
NWBISA-5	NWB5B	Boleboř	Jehličnatý les	16.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
NWBISA-6	NWB2A	Horka	Louka	15.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
NWBISA-7	NWB2B	Horka	Pole (řepka olejka)	15.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-1	H3A	Milovy	Louka	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-2	H3B	Milovy	Pole (obilí)	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-3	H5A	Mrákotín	Louka	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-4	H5C	Telč	Pole (řepka olejka)	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-5	H2A	Koclířov	Louka	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-6	H2C	Koclířov	Ovocný sad	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-7	H4A	Poděšín	Louka	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-8	H4B	Poděšín	Pole (brambory)	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-9	H4E	Poděšín	Křoviny	23.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-10	H6A	Želetava	Louka	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-11	H6B	Želetava	Pole (řepka olejka)	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-12	H6C	Želetava	Pole (obilí)	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-13	H6D	Želetava	Jehličnatý les	29.10.2013	<i>Isaria sp.</i>
HISA-14	H7A	Želiv	Louka	26.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
HISA-15	H7B	Želiv	Pole (obilí)	26.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
HISA-16	H7C	Želiv	Břeh rybníku	26.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
HISA-17	H7E	Želiv	Křoviny	26.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-1	SB1A	Třeboň	Louka (vlhká)	18.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-2	SB1B	Třeboň	Pole (řepka olejka)	18.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-3	SB1C	Třeboň	Břeh rybníku	18.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-4	SB1E	Třeboň	Křoviny	18.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-5	SB2B	Pýchov	Pole (obilí)	19.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-6	SB2C	Pýchov	Břeh řeky	19.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-7	SB2D	Pýchov	Smíšený les	19.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-8	SB2C	Pýchov	Břeh řeky	19.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-9	SB3B	Ostrov	Pole (kukuřice)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-10	SB3E	Prachatice	Křoviny	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-11	SB4A	Sedliště	Louka	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-12	SB4B	Sedliště	Pole (řepka olejka)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-13	SB4C	Sedliště	Pole (obilí)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-14	SB4D	Sedliště	Smíšený les	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-15	SB4E	Sedliště	Křoviny	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-16	SB5A	Vahlovice	Pole (řepka olejka)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-17	SB5B	Skaličany	Pole (obilí)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-18	SB6B	Opařany	Pole (obilí)	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-19	SB3A	Ostrov	Louka	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-20	SB7A	Mladá Vožice	Louka	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>

SBISA-21	SB7C	Mladá Vožice	Pole (obilí)	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-22	SB7E	Mladá Vožice	Křoviny	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-23	SB8A	Dobrotín	Louka	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-24	SB8B	Dobrotín	Pole (řepka olejka)	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-25	SB8C	Dobrotín	Břeh řeky	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-26	SB9E	Halámky	Křoviny	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-27	SB10B	Zlatá Koruna	Pole (obilí)	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-28	SB10C	Zlatá Koruna	Pole (řepka olejka)	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-29	SB10A	Čeřín	Louka	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-30	SB11A	Šindlovy Dvory	Louka	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-31	SB11E	Šindlovy Dvory	Neobdělaná půda	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-32	SB7B	Mladá Vožice	Pole (kukuřice)	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
SBISA-33	SB10E	Zlatá Koruna	Křoviny	29.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-1	WB4A	Lhota u Stříbra	Louka	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-2	WB4B	Lhota u Stříbra	Pole (obilí)	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-3	WB4B	Lhota u Stříbra	Pole (obilí)	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-4	WB6A	Lhůta	Křoviny	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-5	WB6B	Lhůta	Pole (řepka olejka)	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-6	WB6D	Lhůta	Smíšený les	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-7	WB6E	Lhůta	Křoviny	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-8	WB1A	Lhovice	Louka	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-9	WB1B	Švihov	Pole (obilí)	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-10	WB1C	Lhovice	Neobdělaná půda	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-11	WB2A	Drahotín	Louka	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-12	WB3A	Janov	Louka	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-13	WB5A	Plasy	Louka	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-14	WB5B	Plasy	Pole (řepka olejka)	20.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-15	WB7B	Sušice	Břeh řeky	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-16	WB8C	Velký Bor	Neobdělaná půda	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-17	WB8E	Velký Bor	Křoviny	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-18	WB7C	Sušice	Louka	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>
WBISA-19	WB8D	Velký Bor	Jehličnatý les	22.10.2014	<i>Isaria sp.</i>

Pozn.: V případě, že číselná řada vzorků není kompletní, došlo k vyřazení izolátu z analýzy z důvodu kontaminace a nemožného přečištění vzorku.

Příloha č. 3: Taxonomická identifikace po analýze ITS regionu s použitím referenčních vzorků z NCBI databáze

Název vzorku	Identifikovaný druh	Referenční kmen	Zdroj sekvence
NBIFR-1	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBIFR-2	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-5	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-8	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-10	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-11	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-12	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-13	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-14	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-15	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-16	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-17	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-18	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-19	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBIFR-20	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBIFR-21	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-1	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMIFR-2	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMIFR-3	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-8	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NMIFR-10	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-1	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-8	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)

SMIFR-10	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-11	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-12	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-13	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
SMIFR-14	<i>I. fumosorosea</i>	GU351346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-1	<i>Pochonia suchlasporia</i>	AB113353	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBIFR-2	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-8	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
MBIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-1	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-2	<i>Pochonia suchlasporia</i>	AB113353	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-7	<i>Cordyceps pseudomilitaris</i>	JN943305	Schoch <i>et al.</i> (2012)
NWBIFR-8	<i>Cordyceps pseudomilitaris</i>	JN943305	Schoch <i>et al.</i> (2012)
NWBIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NWBIFR-10	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-1	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-2	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
HIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-1	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-2	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-8	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SBIFR-9	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)

SBIFR-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBIFR-11	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBIFR-1	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-2	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-3	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-4	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-5	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-6	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
WBIFR-7	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
NBISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NBISA-9	<i>P. carneus</i>	EU553292	Inglis, Tigano (2006)
NBISA-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-2	<i>P. carneus</i>	EU553292	Inglis, Tigano (2006)
SMISA-3	<i>P. carneus</i>	EU553292	Inglis, Tigano (2006)
SMISA-4	<i>Pochonia suchlasporia</i>	AB113353	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-7	<i>I. javanica</i>	AB263744	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-9	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SMISA-10	<i>I. fumosorosea</i>	GU354346	Meyling, Schmidt (2009)
SMISA-11	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-4	<i>Pochonia suchlasporia</i>	AB113353	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-5	<i>Pochonia suchlasporia</i>	AB113353	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-9	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-11	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-12	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
MBISA-13	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)

NMISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NMISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
NWBISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-9	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-11	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-12	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-13	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-14	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-15	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-16	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
HISA-17	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-6	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-7	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-9	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-11	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-12	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)

SBISA-13	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-14	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-15	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-16	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-17	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-18	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-19	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-20	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-21	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-22	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-23	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-24	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-25	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-26	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-27	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-28	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-29	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-30	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-31	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-32	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
SBISA-33	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-1	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-2	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-3	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-4	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-5	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-6	<i>P. carneus</i>	EU553292	Inglis, Tigano (2006)
WBISA-7	<i>P. carneus</i>	EU553292	Inglis, Tigano (2006)
WBISA-8	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-9	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-10	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-11	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-12	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-13	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-14	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-15	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-16	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-17	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-18	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)
WBISA-19	<i>P. carneus</i>	AB258369	Yokoyama <i>et al.</i> (2006)

Příloha č. 4: Protokol DNeasy Plant Mini kit 250 od firmy QIAGEN

DNeasy[®] Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year.

For more information, please refer to the *DNeasy Plant Handbook*, which can be found at www.qiagen.com/handbooks.

For technical assistance, please call toll-free 00800-22-44-6000, or find regional phone numbers at www.qiagen.com/contact.

Notes before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
 - If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AP3/E concentrates.
 - Add ethanol to Buffer AW and Buffer AP3/E concentrates.
 - Preheat a water bath or heating block to 65°C.
1. Disrupt samples (≤ 100 mg wet weight or ≤ 20 mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor[®], the TissueLyser, or a mortar and pestle.
 2. Add 400 μ l Buffer AP1 and 4 μ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.
Note: Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.
 3. Add 130 μ l Buffer AP2. Mix and incubate for 5 min on ice.
 4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).
 5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
 6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E, and mix by pipetting.
 7. Transfer 650 μ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.
 8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500 μ l Buffer AW, and centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g. Discard the flow-through.
 9. Add another 500 μ l Buffer AW. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.
Note: Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.
 10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.
 11. Add 100 μ l Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at ≥ 6000 x g.
 12. Repeat step 11.

Příloha č. 5: Protokol komerčně dostupného kitu Invisorb Fragment CleanUp od firmy Stratec Biomedical

Protocol 4: Extraction of a DNA-fragment from an agarose gel slice

Please read the instructions carefully and conduct the prepared procedure!

for Invisorb® Spin DNA Extraction Kit and Invisorb® Fragment CleanUp

Important: *TBE-gels contain more potentially inhibitors for down stream application than TAE-gels. So we recommend the use of TAE-gels for critical downstream application!
Before starting with the purification procedure please place a Spin Filter into a 2.0 ml Receiver Tube!*

Attention: *Please be aware, that you have to prepare the Binding Enhancer – see instruction page: 16*

1. Excise the DNA-fragment from the agarose gel with a sharp scalpel. Minimize the agarose gel slice. Check the weight.
For gel slices up to 150 mg add 500 µl Gel Solubilizer S.
For gel slices > 150 mg add 1 ml of Gel Solubilizer S.
Do not use more than 300 mg gel slice for one Spin Filter.
Transfer the gel slice into a 1.5 or 2.0 reaction tube.
2. Incubate at 50°C for 10 minutes until the agarose gel slice is completely dissolved.
Incubation under continuous shaking (e.g. Eppendorf Thermo mixer) is very helpful.
3. Add 250 µl Binding Enhancer to a 500 µl reaction volume or 500 µl Binding Enhancer to a 1 ml reaction volume and mix the suspension by pipetting some times or by vortexing.
Load approx. 800 µl of the sample onto the Spin Filter. Centrifuge at 11.000 x g (11.000 rpm) for 2 minute. Discard the filtrate. For reaction volumes > 800 µl reload the residual volume onto the Spin Filter and repeat the centrifugation step.
4. Add 500 µl Wash Buffer to the Spin Filter and centrifuge for 1 min at 11.000 x g (11.000 rpm)
Discard the filtrate. Repeat the washing step once again.
5. Discard the filtrate. Remove the residual ethanol of the Wash Buffer by centrifugation for 4 min at maximum speed.
6. Transfer the Spin Filter into a new 1.5 ml Receiver Tube.
Add at least 20 µl Elution Buffer directly onto the center of the Spin Filter.
Incubate at room temperature for 5 minutes. Centrifuge for 1 minute at 11.000 x g (11.000 rpm).

Note: *To increase the final DNA yield we recommend using a higher volume of Elution Buffer. Please take into account that an increasing volume of Elution Buffer reduces the final concentration of the purified DNA.
An extended incubation time with Elution Buffer (up to 10 minutes) leads also to a slightly higher final yield.*