Identifikaci jednotlivých druhů václavek

v Evropě bylo popsáno sedm druhů václavek:

A. borealis, A. cepistipes, A. ectypa, A. gallica, A. mellea, A. ostoyae and *A. tabescens*

Hlavní ekologická funkce:

Dekompozice dřevní hmoty, ale velmi častý přechod k nekrotrofnímu parazitismu

druhy hodnocené jako slabí parazité

A. borealis, A. ectypa, A. gallica and *A. tabescens*

druhy hodnocené jako vážní parazité na stresovaných dřevinách

A. mellea, A. ostoyae and *A. cepistipes*

Identifikace jednotlivých druhů václavek

Párové testy

Založeny na kompatibilitě neznámého izolátu s testovacím druhem

Časově náročné, v případě diploidních vzorků jsou výsledky často špatně interpretovatelné

Metody založené na analýze sekvence DNA

- RAPDs (random amplified polymorphic DNAs)
- RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) – IGS a ITS oblasti
- sekvenace specifických oblastí

Nutnost čistého mycelia václavky nebo plodnic

Identifikace jednotlivých druhů václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti

Sekvenční homologie ITS1 oblasti

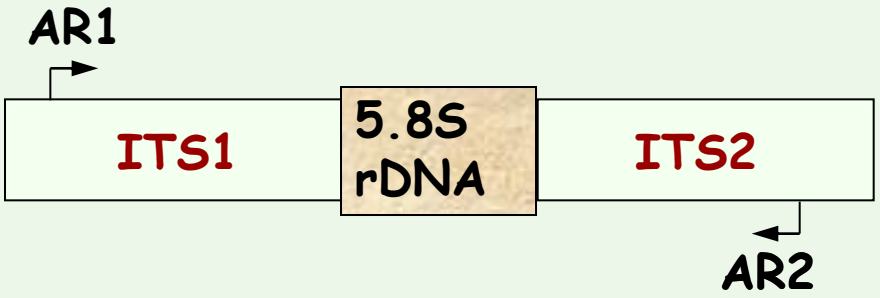
AR1

```
A. borealis    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACGTG
A. ostoyae     TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAGCTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACGTG
A. gallica     TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAAATCGTAGCATCG-AGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACGTG
A. cepistipes  TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACGTG
A. tabescens   TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAACTTGAA-TCGTAGCATGGCAGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTTGAAGTG
A. mellea      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATGAAACTTGAATTTGTAGCATTG-AGAACTGTTGCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCAAAGTG
               ****************************** ********** * ******* * *** ********************************  * ***

A. borealis    TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC---------GAGCTC
A. ostoyae     TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGGTTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC---------GAGCTC
A. gallica     TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC---------GAGCTC
A. cepistipes  TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTTTCGAG--CGGTTAGAAGGGCTGCTTTC---------GAGCTC
A. tabescens   TTGCG--TTTTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGGTTAACTTTCGCTCCAAGGGCTGGATAGAAGGGTTGCTTTC---------GAGCTC
A. mellea      TTACGGGTTCTGTTCTAATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGGTTAAGCTTCGCTTTCGAG--CGGTTTGAAGGGTTGCTTGCTTTCGAGCTAAGCTC
               ** **  ** * ***  ********************************** ******     *   ** * ****** ***** *          *****

A. borealis    CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTC-TTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. ostoyae     CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTTTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. gallica     CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. cepistipes  CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTC-TTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. tabescens   CCTTTGTCTTACCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAATGTCTTGTTTATAGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. mellea      CGTTTGTCTTACCGAGTCTATGTCTATATAAACTTTTGTATGTTTAGAATGTCTTGTTTATAGGACGCAAGTC-TTTAAATGTTATACAACTTTCAACAA
               ********* ************* ********** ******** ***************** *********** ******* ******************
```

ITS oblast



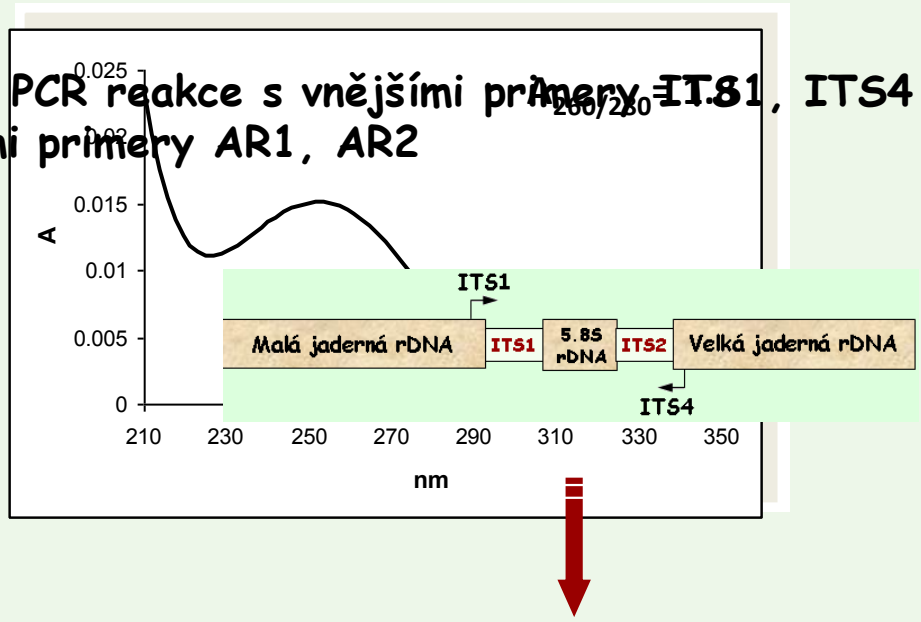
Primer	Sekvence (5'→ 3')	Délka	Amplikon (bp)	T_m (C)[b]
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC	23 b	690-724	59.94
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA	25 b		59.85

[b] T_m byla vypočtena programem Primer 3

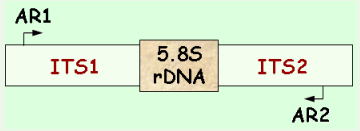
Identifikace václavek se vzorků půdy

- Izolace DNA z 0.5g půdy pomocí kitu (Mobio)
- Nested PCR reakce s vnějšími primery IT81, ITS4 a vnitřními primery AR1, AR2

1 krok



2 krok



Délky amplikonů a restrikčních fragmentů

Izolát	Délka amplikonu (bp)[d] ITS/AR	Restrikční fragmenty[e] *HinfI* (bp)
A. borealis A1[a]	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68
A. cepistipes 204[b]	868/711	293, 227, 43, 132
A. gallica 147 [b]	868/711	294, 227, 43, 63, 69
A. mellea 184 [b]	882/724	148, 159, 401
A. ostoyae C2 [a]	870/713	294, 228, 31, 75, 69
A. tabescens T3 [a]	847/690	295, 125, 93, 32, 129