

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KVASINKY KOLONIZUJÍCÍ POVRCHY LISTŮ A JEJICH IDENTIFIKACE

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

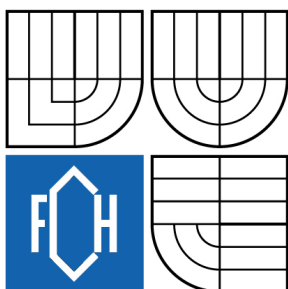
Bc. KAMILA BĚLOCHOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# KVASINKY KOLONIZUJÍCÍ POVRCHY LISTŮ A JEJICH IDENTIFIKACE

YEASTS COLONIZING THE LEAF SURFACES AND THEIR IDENTIFICATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

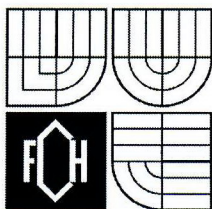
Bc. KAMILA BĚLOCHOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0220/2008**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bělochová Kamila, Bc.**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**  
Konzultanti diplomové práce:

Akademický rok: **2008/09**

### Název diplomové práce:

Kvasinky kolonizující povrchy listů a jejich identifikace

### Zadání diplomové práce:

1. Literární přehled na zadané téma
2. Realizace vhodného postupu izolace DNA z kvasinek
3. Realizace metody PCR-RFLP na řešený problém
4. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bělochová Kamila, Bc.  
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.  
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci a využití molekulárně-biologické metody PCR-RFLP k identifikaci a taxonomickému zařazení kvasinek kolonizujících povrchy listů, přičemž srovnává a nahrazuje postupy identifikace kvasinek stanovené na základě fyziologických a morfologických vlastností organismů.

PCR-RFLP využívá schopnosti termostabilních polymeráz mnohonásobně amplifikovat specifický úsek v rDNA, který může být následně štěpen vhodnými restričními endonukleázami na charakteristické polymorfni fragmenty. Srovnáním délek fragmentů a výskytu štěpných míst, které jsou typické pro každý druh, byly získány požadované výsledky, které jsou přehledně shrnuty v závěrečné části práce.

Teoretická část objasňuje a popisuje cytologii a morfologii kvasinek, taxonomii jako vědu, podrobněji se zabývá charakteristikou zkoumaných kvasinek rodu *Cryptococcus*, *Rhodotorula* a *Saccharomyces* a detailně popisuje metodiku PCR-RFLP.

## ABSTRACT

This diploma thesis is focused on optimization and employing the PCR-RFLP method, based on the molecular biology principles, for an identification and taxonomy of the yeasts which colonize the leaf surfaces. Simultaneously the yeasts identification techniques based on physiological and morphological attributes are compared and replaced.

PCR-RFLP takes advantage of thermostable polymerases' ability to amplify the specific segment in the rDNA, which can be split by restriction endonucleases to characteristic polymorphical fragments. Comparing these fragments and restriction's positions which are for each species unique, demanded results were obtained. They're summarized in the conclusion part.

The theoretical part describes the morphology and cytology of the yeasts, taxonomy as a science, genres of examined yeasts *Cryptococcus*, *Rhodotorula* a *Saccharomyces* are covered more thoroughly and the method of PCR-RFLP is described in detail.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, listy stromů, PCR-RFLP, identifikace

## KEYWORDS

Yeasts, leaves of trees, PCR-RFLP, identification

BĚLOCHOVÁ, K. *Kvasinky kolonizující povrchy listů a jejich identifikace*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 62 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

*Poděkování:*

*Děkuji Mgr. D. Vránové Ph.D za  
všestrannou pomoc, ochotu a  
odborné rady při realizace této  
diplomové práce.*

# OBSAH

1. ÚVOD .....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	9
2.1 Kvasinky.....	9
2.1.1 Morfologie kvasinek .....	9
2.1.2 Cytologie kvasinek.....	10
2.1.2.1 Buněčná stěna.....	10
2.1.2.2 Cytoplazmatická membrána.....	10
2.1.2.3 Cytoplazma.....	11
2.1.2.4 Vakuola.....	11
2.1.2.5 Mitochondrie .....	12
2.1.2.6 Cytoskelet.....	12
2.1.2.7 Jádro.....	12
2.1.3 Chemické složení buněčné hmoty kvasinek.....	13
2.1.4 Rozmnožování kvasinek .....	13
2.1.4.1 Vegetativní rozmnožování .....	13
2.1.4.2 Pohlavní rozmnožování.....	15
2.1.5 Kultivace a uchovávání kvasinek.....	16
2.1.6 Výskyt a využití kvasinek .....	17
2.2 Taxonomie.....	18
2.2.1 Historie a současnost.....	18
2.2.2 Taxonomie kvasinek.....	19
2.2.3 Ascomycetes (Endomycetes).....	19
2.2.3.1 Rod <i>Saccharomyces</i> .....	19
2.2.4 Basidiomycetes.....	20
2.2.4.1 Rod <i>Rhodotorula</i> .....	21
2.2.4.2 Rod <i>Cryptococcus</i> .....	22
2.3 Metoda PCR a její aplikace v praxi.....	23
2.3.1 DNA - deoxyribonukleová kyselina.....	23
2.3.1.1 Struktura DNA.....	23
2.3.1.2 Biosyntéza DNA.....	23
2.3.1.3 Stabilita a denaturace DNA.....	24
2.3.1.4 Izolace DNA.....	25
2.3.2 Polymerázová řetězová reakce .....	25
2.3.2.1 Princip PCR.....	25
2.3.2.2 Primery pro PCR.....	27
2.3.2.3 DNA polymeráza.....	28
2.3.2.4 Nukleotidy a reakční pufr pro PCR.....	29
2.3.2.5 Faktory ovlivňující PCR.....	29
2.3.3 Restrikční analýza produktu PCR .....	29
2.3.3.1 Princip PCR-RFLP.....	30
2.3.3.2 Struktura, funkce a stabilizace enzymů.....	30
2.3.3.3 Restrikční endonukleázy.....	31
2.3.3.4 Podmínky digesce s restrikčními endonukleázami.....	32

2.3.4	Varianty a modifikace PCR.....	32
2.3.4.1	Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD).....	32
2.3.4.2	Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP).....	33
2.3.5	Separace fragmentů po RFLP gelovou elektroforézou .....	34
2.3.5.1	Princip elektroforézy nukleových kyselin.....	34
2.3.5.2	Uspořádání elektroforézy.....	34
2.3.5.3	Vizualizace separovaných fragmentů DNA.....	35
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1	Chemikálie, přístroje a pomůcky .....	36
3.1.1	Chemikálie .....	36
3.1.2	Přístroje a pomůcky.....	36
3.1.3	Suroviny .....	36
3.2	Izolace DNA.....	37
3.2.1	Izolace DNA pomocí Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) .....	37
3.3	Amplifikace izolované DNA metodou PCR.....	37
3.3.1	Příprava vzorků k amplifikaci .....	37
3.3.2	Teplotní a časový profil PCR.....	38
3.4	Elektroforetická detekce fragmentů po PCR.....	38
3.4.1	Příprava roztoku ethidium bromidu .....	38
3.4.2	Příprava Tris-borátového pufru (TBE).....	38
3.4.2.1	Příprava zásobního roztoku TBE (10xTBE) .....	38
3.4.2.2	Příprava pracovního roztoku TBE (1xTBE) .....	38
3.4.3	Příprava 0,7% agaróзовého gelu.....	39
3.4.4	Příprava délkového standardu o délce 100 bp.....	39
3.4.5	Příprava délkového standardu o délce 20 bp.....	39
3.4.6	Průběh elektroforézy .....	39
3.4.6.1	Podmínky elektroforézy .....	39
3.5	Restrikční analýza s PCR produkty.....	40
3.5.1	Příprava 3 M octanového pufru.....	40
3.5.2	Úprava PCR produktu pro restrikční analýzu .....	40
3.5.3	Restrikční analýza .....	40
3.5.4	Detekce restrikčních fragmentů pomocí elektroforézy .....	40
3.5.4.1	Příprava 2% agaróзовého gelu.....	40
3.5.4.2	Postup a podmínky elektroforézy.....	41
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	42
4.1	Izolace DNA z kvasinek kolonizujících povrchy listů.....	41
4.2.	Aplikace metody PCR.....	41
4.2.1	Použité primery.....	41
4.2.2	Způsob a provedení PCR.....	42
4.3	RFLP analýza s restrikčními enzymy.....	44
4.3.1	Elektroforeogramy po restrikční analýze.....	45
4.3.2	Další testované restrikční endonukleázy.....	50
4.4	Vyhodnocení restrikční analýzy.....	51
5.	ZÁVĚR.....	52

6. POUŽITÉ ZDROJE .....	54
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	58
8. SEZNAM PŘÍLOH .....	59
9. PŘÍLOHY .....	60

## 1. ÚVOD

Kvasinky jsou bezpochyby jednou z nejdůležitějších skupin mikroorganismů, jejichž přítomnost je nezbytná pro přípravu fermentovaných potravin a alkoholických nápojů a k těmto účelům kvasinky byly a stále jsou využívány již po tisíciletí.

Kvasinky jsou však také nedílnou součástí ekosystému a tvoří hlavní součást populací vyskytujících se na listech a jehličí, kde vytváří přirozenou bariéru vůči rostlinným patogenům. Skutečnost, že povrchy listů slouží jako přirozené prostředí pro růst kvasinek, je známa mnohem déle, než samotná fyziologie vyšších rostlin, přesto se studie pro identifikaci a taxonomii jednotlivých kvasničných kmenů kolonizujících povrchy listů, začaly realizovat až v posledních letech.

Identifikační metody prošly během 20. století četnými změnami a s jejich vzrůstajícím počtem byl klasifikační systém kvasinek mnohokrát přeorganizován. Původně se identifikace a zařazování kvasinek provádělo na základě morfologických studií, srovnáváním fyziologických a výživových vlastností a pomocí konvenčních genetických technik. Určitá fyziologická odchylnost byla pokládána za druhové rozlišení, ale později bylo zjištěno, že dané mikroorganismy jsou totožné s jinými. K těmto nedostatkům docházelo na základě neúplných popisů. Proto se v určitých časových úsecích systém mikroorganismů reviduje.

Způsob, kterým je možné se vyhnout nepřesnostem v zařazení kvasinek vzniklých na základě nedostatečných popisů, je chemická analýza deoxyribonukleové kyseliny (DNA). K potvrzení správnosti identifikace a taxonomického zařazení kvasinek odebraných z povrchu listů, které bylo provedeno právě na základě tradičních identifikačních metod, byla aplikována molekulárně-biologická metoda PCR-RFLP. Jejím provedením bylo možné kvasinky úspěšně identifikovat a zhodnotit správnost dosavadního taxonomického zařazení. [19]

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotické jednobuněčné mikroorganismy, rozmnožující se zpravidla pučením nebo dělením příhrádkami, náležící do říše hub – *Fungi*. Na rozdíl od rostlin, houby neobsahují chlorofyl, a proto nejsou schopné využívat energii slunečního záření pro tvorbu organických molekul. S živočichy mají společné heterotrofní zpracování uhlíkatého zdroje. Za předchůdce hub jsou považovány fotosyntetizující řasy, které ztratily schopnost tvořit chlorofyl. Kvasinky hrají důležitou roli při produkci fermentovaných potravin a alkoholických nápojů díky schopnosti většiny z nich zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Mohou také produkovat významné sekundární metabolity jako jsou antibiotika a vitaminy. [2, 3]

#### 2.1.1 Morfologie kvasinek

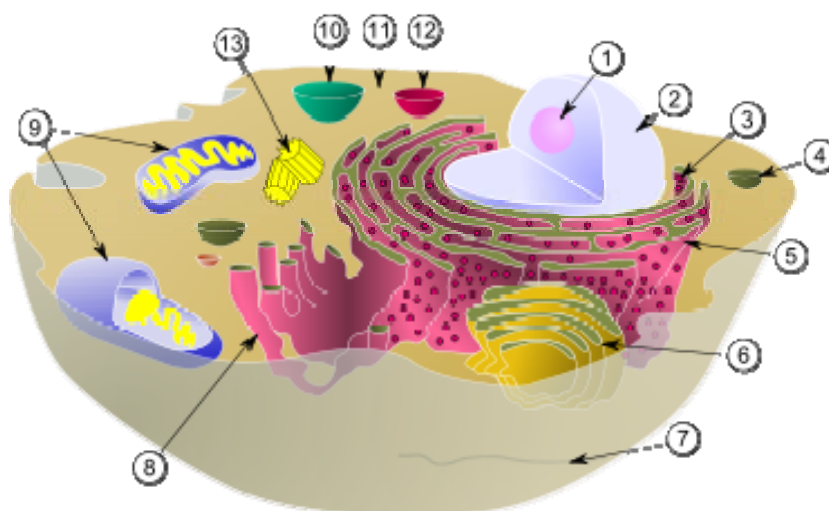
Základní tvar buněk kvasinek je odvozen od rotačního elipsoidu, ale obecně tvary kvasinek bývají velmi rozmanité a souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování. Nejčastěji se můžeme setkat kromě elipsoidní buňky (*Saccharomyces*) s tvarem vejčitým až kulovitým (*Rhodotorula*). Některé rody tvoří dlouze protáhlé buňky, vyskytuje se však i tvar citronovitý, trojúhelníkovitý (*Trigonopsis*) a válcovitý (*Schizosaccharomyces*). Tvary buněk se také mohou měnit v průběhu stádií vývoje. Šířka buněk většiny kvasinek je v rozmezí 3-6  $\mu\text{m}$ .

Některé rody kvasinek vytvářejí protáhlé buňky, které pučí pouze na pólech a zůstávají po pučení spojeny v dlouhá zaškrcovaná vlákna tzv. pseudomycelium, které se dělí na chomáčovitě, přeslenovitě a nepravidelně větvené. Po jeho stranách nebo na konci řetězce vznikají kratší elipsoidní buňky schopné rozmnožovat se pučením tzv. blastospory. Pseudomycelium se vytvoří ve zvýšené míře tam, kde je výživa kvasinek omezená a metabolismus kultury je nějakým způsobem brzděn. Za určitých okolností se může vytvořit v kterékoliv kultuře. Kvasinka tvoří bohatší pseudomycelium tam, kde se stýká se vzduchem, tedy na povrchu agaru nebo tekutiny. U některých rodů kvasinek se vytváří tzv. pravé mycelium, tj. vlákno vznikající příčným dělením buněk. Na myceliu vznikají podobné svazky buněk jako na pseudomyceliu a nazývají se blastokonidie. Tvorba pravého mycelia a pseudomycelia je charakteristická hlavně pro rody se silným aerobním metabolismem. Některé rody kvasinek tvoří hyfy rozpadající se na pravidelné válcovité buňky nazývané artrokonidie, které slouží k rozšiřování druhů v přírodě. Před nepříznivými podmínkami jsou odolné tzv. chlamydostry, které se tvoří na konci hyf, volně v prostředí nebo uprostřed hyfy.

Morfologické znaky mají v systematicce kvasinek stále velký význam. Pomocí morfologických znaků, jako je typ pučení, vzhled a tvar buněk, uspořádání asků, tvar askospor či basidií, jsme obvykle schopni určit jednotlivé rody. [2, 3, 4]

## 2.1.2 Cytologie kvasinek

Strukturu vegetativních kvasinkových buněk tvoří buněčná stěna, cytoplazmatická membrána, cytoplazma, ve které je přítomen variabilní membránový systém, odpovídající endoplazmatickému retikulu vyšších rostlin a živočichů. Tento systém bývá spojen s ribozomy. Dále se v kvasinkách vytvářejí váčky s enzymy a prekurzory buněčné stěny analogické Golgiho aparátu buněk vyšších rostlin. Kvasinková buňka obsahuje dále vakuoly, mitochondrie a jádro. Pohybové orgány, tj. bičíky, vegetativní buňky kvasinek nemají. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní spory, které však mají fyziologické vlastnosti odlišné od vlastností endospor bakterií. [2]



Obr. 1: Schematický model kvasničné buňky: 1 – jadérko, 2 – jádro, 3 – ribozom, 4 – vezikula, 5 – drsné endoplazmatické retikulum, 6 – Golgiho aparát, 7 – cytoskelet, 8 – hladké endoplazmatické retikulum, 9 – mitochondrie, 10 – vakuola, 11 – cytosol, 12 – lysozom, 13 – centriola [46]

### 2.1.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu, která dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před osmotickým šokem.

Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, především glukany, popřípadě mannany, jež představují 80 % sušiny stěny. Mají strukturu vláken, z nichž tvoří hustou pevnou spleť. Tuto spleť vyplňují bílkoviny, jejichž zastoupení v sušině stěny činí 6 – 10 %. Ve stěně kvasinek je také přítomno kolísavé, ale většinou malé množství lipidů a fosfolipidů a dále fosforečnanů, vázaných esterovými vazbami na polysacharidy. Tyto fosfátové zbytky spolu se skupinami -COOH bílkovin dávají buňkám kvasinek negativní náboj, který ovlivňuje adsorpci látek z živného prostředí.

Na povrchu stěny kvasinek zůstává po oddělení dceřiné buňky na obou buňkách jizva. Na mateřské buňce zůstává jizva po pučení a na dceřiné jizva zrodu. Obě jizvy po pučení jsou bohaté na obsah chitinu. Vzhledem k tomu, že buňky některých druhů kvasinek nikdy nepučí

ve stejném místě, počet jizev současně určuje i stáří buňky. Jizvy můžeme pozorovat fluorescenční technikou po obarvení primulinem.

Stěnu kvasinek lze rozložit působením enzymů trávicího traktu hlemýždě *Helix pomatia* nebo enzymů získaných z některých bakterií. [2, 3, 4]

### **2.1.2.2 Cytoplazmatická membrána**

Cytoplazmatická membrána kvasinek, obklopující cytoplazmu, je složená z lipidů a proteinů, vytváří četné vychlípeniny vybíhající do cytoplazmy. Má důležitou úlohu při kontrole transportu látek do buňky, při syntéze složek buněčné stěny a při vylučování enzymů. Tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Na rozdíl od prokaryotických buněk, v cytoplazmatické membráně kvasinkových buněk neprobíhají oxidační reakce. Její šířka je přibližně 7,5-8 nm.

### **2.1.2.3 Cytoplazma**

Cytoplazma tvoří kapalnou výplň buňky, která obklopuje všechny orgány a vytváří pro ně prostředí nutné pro jejich činnost. Cytoplazma kvasinek je koloidní tekutina o pH 6,2-6,4. Koloidní charakter zapřičiňují rozpustné bílkoviny, glykogen a jiné rozpustné makromolekulární látky. U mladých buněk se cytoplazma jeví jako průhledná homogenní hmota, u starších buněk se objevují zrníčka a vakuolizace.

V elektronovém mikroskopu je patrné, že cytoplasma kvasinek obsahuje morfologicky variabilní systém, který má podobné složení jako endoplazmatické retikulum buněk rostlin a živočichů. Je to systém dvojité membrány, které uzavírají vrstvu vodnaté kapaliny tzv. enchylému. V buňce tvoří různé nádoby a oddělení, obsahující enzymy a rezervní látky. V blízkosti jádra splývá endoplazmatické retikulum s vnější membránou, na jejíž povrch přisedají ribozomy, v nichž se syntetizují bílkoviny. Vnitřní povrch je hladký a podílí se na produkci lipidů a na modifikaci a transportu bílkovin syntetizovaných v drsném ER. Ve vnitřních prostorech ER se shromažďují peptidy.

Dalším membránovým útvarem v cytoplazmě kvasinek je Golgiho aparát, který má tvar plochého měchýřku nebo několika plochých měchýřků anebo cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Předpokládá se, že funkcí tohoto aparátu je transportovat prekurzory buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu.

Kromě membránových útvarů (dále vakuoly, mitochondrie) se v cytoplazmě kvasinek nacházejí zřetelná zrníčka rezervních látek, především volutinu a glykogenu, dále ribozomy, ribonukleové kyseliny, enzymy, nukleotidy, meziprodukty metabolismu včetně některých vitaminů a zásoby aminokyselin, některé anorganické ionty apod. [2, 3, 7]

### **2.1.2.4 Vakuola**

Vakuola patří k nejnápadnějším složkám cytoplazmy. Je to většinou kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou, zvanou tonoplast, která často vysílá úzké výběžky do cytoplazmy. Zpravidla se v buňce nachází jedna velká vakuola nebo několik menších vakuol.

Objem vakuoly se mění s růstem buněk. Pro stacionární fázi je charakteristický obsah jedné nebo dvou vakuol.

Vakuola obsahuje roztok propouštějící světlo, a proto má ve světelném mikroskopu stejný odstín jako pozadí zorného pole. Uvnitř vakuol jsou uloženy hydrolytické enzymy, proto jsou tyto útvary místem, kde dochází k rozpadu těch struktur buňky, které se neustále v buňce rozkládají a obnovují. Kromě toho obsahují vakuoly polyfosfáty a velkou zásobu draselných iontů, aminokyselin a purinů, jsou tedy rezervoárem látek, jež se právě neúčastní metabolismu.

#### **2.1.2.5 Mitochondrie**

Mitochondrie kvasinek jsou strukturně podobná organelám, které byly nalezeny u vyšších eukaryot. Jsou složeny hlavně z bílkovin, lipidů a fosfolipidů.

Mitochondrie kvasinek je obklopena dvěma membránami. Vnější membrána má bradavčitý povrch. Vnitřní membrána tvoří hluboké vchlípeniny dovnitř mitochondrie, zvané kristy a obsahuje cytochromy dýchacího řetězce. Mezi vnější a vnitřní membránou vzniká mezimembránový prostor vyplněný matrixem, který obsahuje enzymy  $\beta$ -oxidace a citrátového cyklu.

Mitochondrie jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace, takže jejich funkce spočívá zejména v aerobních energetických přeměnách. Kromě toho zde probíhá syntéza některých mitochondriálních bílkovin, proto zde nalézáme také tRNA, mRNA a ribozomy. [2, 3, 7]

#### **2.1.2.6 Cytoskelet**

Cytoskelet kvasinek je síť proteinových vláken, která se nachází v cytoplazmě a v jádře. Skládá se z mikrotubulů a mikrofilament. Hlavním stavebním materiálem je bílkovina tubulin. Mikrotubuly obvykle vycházejí z jednoho místa a jejich volné konce se podle potřeby rozkládají a obnovují.

Slouží k udržování tvaru buněk a umožňuje pohyb buněčných organel prostřednictvím bílkovinných komplexů s ATPázovou aktivitou. [2, 3, 4]

#### **2.1.2.7 Jádro**

Jádro kvasinek je kulatá laločnatá organela, která je umístěna přibližně ve středu buňky. Od cytoplazmy je odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry, jejichž velikost a množství se mění s růstovými podmínkami a s fází buněčného cyklu. Na rozdíl od většiny eukaryotických buněk, se jaderná membrána kvasinek během mitózy nerozpadá.

V jaderné hmotě lze odlišit opticky hustší jádérko srpkovitého tvaru, ve kterém je obsažena přibližně jedna pětina RNA celého jádra a opticky řidší karyoplazmu. Kondenzovaná základní hmota jádra se nazývá chromatin. Obsahuje nukleozomální histony H2A, H2B, H3 a H4 a základní genetickou informaci, kterou nese DNA. Chromatin se organizuje do struktur zvaných chromozomy, jejichž počet se u jednotlivých druhů kvasinek liší. Určitý úsek DNA

chromozomů hraje důležitou roli při dělení chromozomů a jejich segregaci během dělení jádra. Tento úsek se nazývá centroméra. V koncových úsecích chromozomu, tzv. telomérách se vyskytují příčné vazby mezi oběma řetězci DNA.

V jádře kvasinek je také zřetelné pólové tělísko vřetenka. Má tvar disku a vycházejí z něj vlákna zvaná mikrotubuly, které spolu s tělískem hrají důležitou roli při dělení jádra během rozmnožování buněk. V jádře tedy probíhá jeden z nejdůležitějších procesů, a to dělení buněk kvasinek. [2, 3, 4, 34]

### **2.1.3 Chemické složení buněčné hmoty kvasinek**

Složení buněčné hmoty kvasinek je velmi variabilní v závislosti na druhu kvasinek, stáří buněk a kultivačních podmínkách. Na tuto variabilitu má také vliv změna nativního stavu kvasinky chemickým nebo fyzikálním zásahem.

Hlavní část buněčné hmoty tvoří voda. Její obsah se pohybuje obvykle od 65 do 85 %. Voda se rozděluje na intercelulární, nacházející se mezi buňkami a intracelulární, obsaženou v buňkách. Nejvíce vody obsahuje cytoplazma, šťávy vakuol, potom jádro, buněčná stěna a spory.

Hlavní podíl sušiny kvasinek tvoří bílkoviny a dále sacharidy. V buňce se vyskytují jako jednoduché sacharidy, deriváty sacharidů, polymery nebo jako složené sacharidy. Podstatnou část buněčné stěny tvoří polysacharid glukán a chitin. V cytoplazmě jsou přítomny glykogen a mannan. Kromě nich se v buňkách kvasinek nacházejí v malém množství trehalosy a některé methylderiváty pentos. Nukleové kyseliny představují 10 % sušiny. Jsou v buňkách vázány na bílkoviny a tvoří komplexy zvané nukleoproteiny. Asi 8 % sušiny tvoří popel, jehož hlavní složkou je oxid fosforečný. Z iontů kovů je v největším množství v buňce zastoupen draslík, méně pak hořčík, vápník a sodík.

Z organických sloučenin vyskytujících se v nízkých koncentracích mají z nutričního hlediska význam především vitaminy skupiny B, provitamin D a u některých rodů také provitamin A. [1, 3, 5]

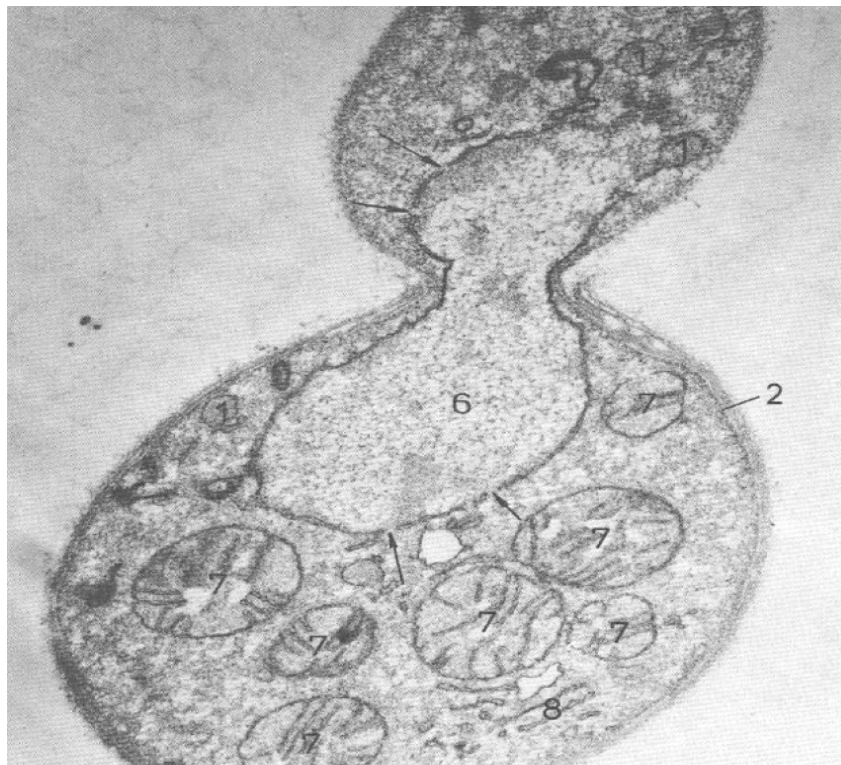
### **2.1.4 Rozmnožování kvasinek**

Rozmnožování může u kvasinek probíhat dvěma způsoby. Většina rodů se rozmnožuje vegetativně, nepohlavně. Některé rody však upřednostňují pohlavní rozmnožování. Kvasinky, u nichž byla zjištěna pohlavní forma rozmnožování, nazýváme jako perfektní, telemorfni. V opačném případě, tedy při asexuálním rozmnožování, jsou kvasinky označovány jako imperfektní, anamorfni.

#### ***2.1.4.1 Vegetativní rozmnožování***

Vegetativní neboli asexuální rozmnožování, obecně označované jako konidiogeneze, probíhá u kvasinek pučením nebo přehrádečným dělením. Při těchto procesech dochází k mitotickému dělení jádra.

Pučení je nejběžnější způsob vegetativního rozmnožování kvasinek. Z mateřské buňky vyrůstá buňka dceřiná, která se po dosažení určité velikosti oddělí. Před pučením dochází ke splývání blan endoplazmatického retikula a pak k jeho dělení, dále k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií v dlouze protáhlé. Po počátku tvorby pupenu do něj vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně probíhá syntéza DNA chromozomů, z nichž každý se zdvojuje ve dvě chromatidy spojené centromérou. Po skončení syntézy DNA začíná mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. Během mitózy dochází k protáhnutí vřeténka, chromozomy se rozdělí podél centroméry a mikrotubuly vřeténka táhnou sesterské chromatidy k opačným pólům vřeténka. Pak se vřeténko přetrhne a polární tělíska dají vznik dvěma samostatným jádrům, z nichž každé má jedno polární tělísko s mikrotubuly a stejný počet chromozomů jako mělo původní jádro. S jádrem přecházejí do nově vytvořeného pupenu také další složky cytoplazmy. Pak se cytoplazmatickou membránou uzavře kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou a v pupenu se intenzivně syntetizuje a rozšiřuje endoplazmatické retikulum. Po vytvoření buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinou buňkou, vzrůstu velikosti pupenu a spojení drobných vakuol ve vakuolu jedinou je pučení ukončeno. Většinou se dorostlá dceřiná buňka od buňky mateřské ihned oddělí. V některých případech však buňky zůstanou spojeny i po několikerém dělení a vytvoří tzv. buněčné svazky. Celý cyklus je pod kontrolou více než stovky genů, z nichž některé mají regulační funkci a za optimálních růstových podmínek trvá kolem dvou hodin. [2, 3, 4, 17]



Obr. 2: Řez pučící buňkou *Rhodotorula glutinis*: 1 – vakuola, 2 – cytoplazmatická membrána, 6 – jádro, 7 – mitochondrie, 8 – endoplazmatické retikulum [47]

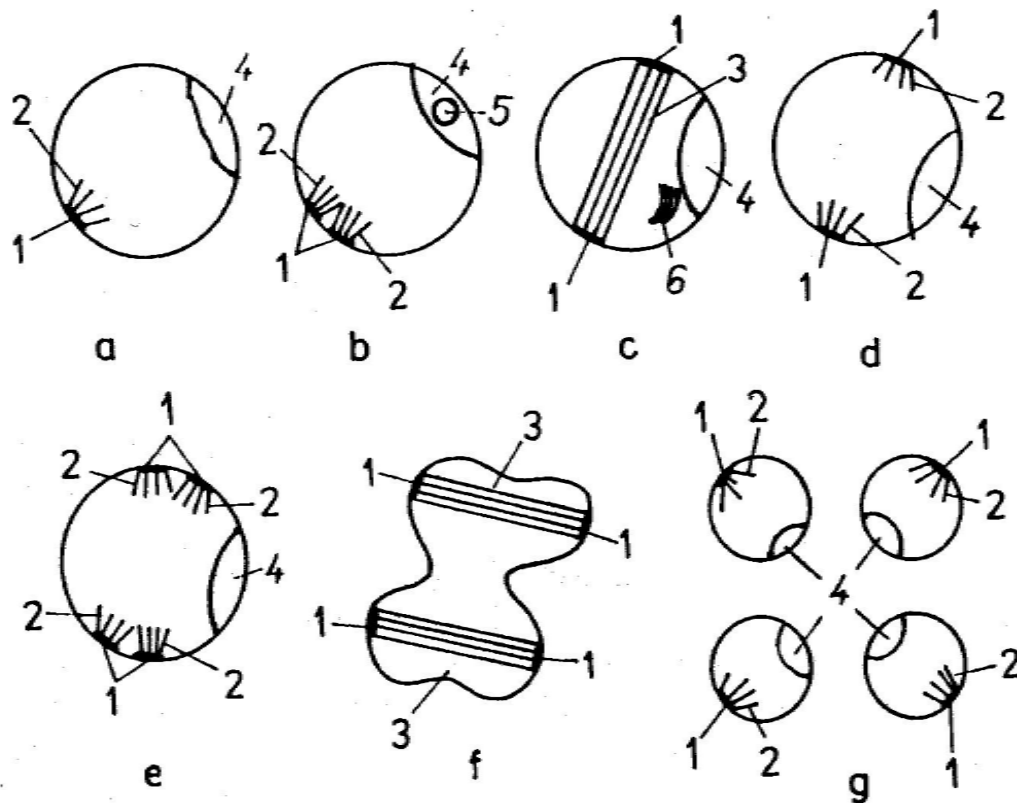
Při rozmnožování přehrádečným dělením, avšak bez tvorby mycelia, dochází ke zdvojení vegetativních buněk prostřednictvím septa (příhradky) rostoucího dovnitř buněčné stěny. Po přepůlení podélné osy buňky se mateřská a dceřinná buňka od sebe oddělí. Tyto nově odštěpené buňky, arthrokonidie, si ponechávají obdélníkový tvar se zakulacenými rohy, postupně se prodlužují a proces se opakuje.

#### **2.1.4.2 Pohlavní rozmnožování**

Většina kvasinek má schopnost rozmnožovat se pohlavně. Výsledkem pohlavního rozmnožování je tvorba charakteristických buněk, ve kterých probíhá meióza a vznikají tak pohlavní spory. Podle typu pohlavních spor dělíme kvasinky na *Ascomycotina* a *Basidiomycotina*. Většina kvasinek se řadí do první skupiny, tvoří jako pohlavní spory askospory, což jsou endospory, umístěné v asku. Rody kvasinek řadících se do druhé skupiny tvoří pohlavní exospory vznikající z protáhlé buňky zvané bazidie.

Pohlavní proces začíná sblížením dvou buněk opačného párovacího typu, zpravidla označovaných  $\alpha$  a  $\alpha$  a jejich splynutím (konjugací). Splynutí má dvě fáze. Při první fázi, tzv. plazmogamii, se dvě pohlavně různá haploidní jádra dostanou po spojení dvou buněk do společné cytoplazmy. Během druhé fáze, tzv. karyogamie, dochází ke splynutí obou jader v jedno, které je v důsledku toho diploidní. V této fázi se zvětšuje jaderná hmota a tím i genetický materiál. Diploidní jádro se poté dělí meiózou.

Při meióze dochází k rozdělení polárního tělíska vřeténka ve dvě a k vytvoření vřeténka. V první fázi meiózy se také uplatňují orgány odpovědné za párování chromozomů diploidního jádra v rovníkové rovině jádra. Tyto orgány vznikají pravděpodobně z kulovitého tělíska, které se objevuje při prvním dělení polárního tělíska. Potom mikrotubuly vřeténka táhnou po jednom chromozomu z páru k opačným pólům jádra, čímž dochází k segregaci chromozomů. Každý chromozom je v té době již rozdělen ve dvě chromatidy držené spolu centromérou, takže syntéza DNA je již dokončena. Na pólech jádra dojde opět k rozdělení polárních tělísek, k vytvoření nových vřetének a k putování jednotlivých chromatid k opačným pólům vřeténka. Při rozpadu těchto dvou vřetének vznikají čtyři jádra, z nichž každé obsahuje jedno polární tělísko s mikrotubuly a haploidní počet chromozomů. Tato jádra jsou buď základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak teprve vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se tedy pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk. [2, 3, 4, 17, 33]



Obr. 3: Fáze meiózy u *Saccharomyces cerevisiae*: a – diploidní jádro, b – rozdělení pólóvého tělíska, c – vytvoření vřeténka, d – rozpad vřeténka, e – rozdělení obou pólóvých tělísek, f – vytvoření dvou vřetének, g – rozpad vřetének a vytvoření čtyř haploidních jader, 1 – pólóvé tělísko, 2 – mikrotubuly, 3 – vřeténko, 4 – jadérko, 5 – kulovité tělísko, 6 – polykomplexní tělísko [47]

Při spájení dvou haploidních buněk askosporogenních kvasinek dochází ke vzniku diploidní buňky zvané zygota. Pokud se spájejí dvě přibližně stejně velké buňky, jedná se o izogamní spájení. Jde-li o spájení velké buňky s malou, hovoříme o heterogamním spájení. Příkladem tohoto typu je spájení mezi buňkou a jejím vegetativním potomstvem, které je ale možné pouze u tzv. homothalických kmenů. Některé druhy kvasinek však tvoří tzv. heterothalické kmény, tj. kmény pohlavně rozlišené, u nichž se spájejí buňky jednoho párovacího typu s buňkami opačného párovacího typu. [2, 3, 4, 17, 33]

### 2.1.5 Kultivace a uchovávání kvasinek

Kvasinky potřebují pro svůj růst a rozmnožování správnou výživu. Výživu přijímají ze živného média, jehož složení vyplývá z elementárního složení biomasy. Základními složkami výživy jsou voda, která má funkci rozpouštědla, umožňuje pohyb rozpuštěných látek v buňce a také intracelulární enzymovou aktivitu, zdroj uhlíku a dusíku, kyslík, fosfor, vitaminy a růstové látky.

Nejpřístupnějším zdrojem uhlíku je uhlík ve formě sacharidů, které využívají aerobně, ale i anaerobně. K základním sacharidům patří hexosy, D-glukosa, D-fruktosa a D-manosa, tyto

sacharidy včetně disacharidů sacharosy a maltosy využívají kvasinky za přístupu i nepřístupu kyslíku. Jako zdroj dusíku využívají kvasinky nejčastěji organické sloučeniny, jako živné médium slouží pepton, kvasničná voda, sladina apod. Amonné soli ve formě fosfátů, síranů dusičnanů mohou kvasinky také využívat. Růstové látky jsou organické sloučeniny potřebné jen v nízké koncentraci, které plní specifickou úlohu, ale nejsou využívány jako zdroj energie. Růstové látky zahrnují: vitaminy, puriny a pyrimidiny, nukleosidy a nukleotidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, steroly a další různorodé sloučeniny.

Většina kvasinek je aerobních. Potřebují kyslík jako konečný akceptor elektronů při dýchání, ale také jako nezbytný růstový faktor pro biosyntézu mastných kyselin a sterolů. Optimální pH pro růst je v rozmezí 4,5-6,5.

Po kultivaci na živném médiu s narostlou kulturou ihned dále pracujeme (izolace buněk, DNA apod.) nebo ji uchováme pro pozdější použití. Úspěšné uchování mikrobiální kultury přitom vyžaduje, aby buňky byly udržovány ve stavu vysoké životaschopnosti.

Krátkodobě lze kvasinky uchovávat přímo na kultivačních miskách nebo ve zkumavkách na šikmých agarech v lednici při 4°C. Pro askomycetní kvasinky se často používá agar z glukosy, peptonu a kvasničného extraktu (GPYA), zatímco pro basidiomycetní se používá spíše bramborovo-dextrosový agar (PDA).

Pro dlouhodobější uchovávání lze šikmý agar převrstvit sterilním glycerolem a rovněž uchovávat v lednici. Pro dlouhodobé skladování je nejvhodnější zmrazit buňky při -70°C v přítomnosti glycerolu nebo kapalného dusíku. Dlouhodobé uchovávání se aplikuje také v oficiálních sbírkách mikroorganismů, které udržují typové kultury, aby měli porovnávací materiál na určování nových kmenů, produktivní kultury, zajímavé mutanty, domácí izoláty a patentované kmeny. [1, 2, 7, 33, 34]

### 2.1.6 Výskyt a využití kvasinek

Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířeny. Můžeme je nalézt prakticky všude; na rostlinách, stromech, v půdě, ve vzduchu, ve vodě, ve střevním traktu lidí a zvířat. V květních nektarech jsou nejčastěji přítomny oxidační typy jako *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, na povrchu měkkého ovoce převládají hlavně kvasné typy jako např. *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*. Jako vzdušná kontaminace se nejčastěji vyskytuje *Rhodotorula*. Vzhledem k jejich sacharolytickým schopnostem se vyskytují hlavně na materiálem obsahujících cukry, například na ovoci a na cukernatých potravinách, z čehož plyne i jejich uplatnění především v kvasném průmyslu.

Významným prostředím pro růst kvasinek jsou procesy tradičních biotechnologií jako je výroba vína, moštu, piva a jiných alkoholických nápojů. Hojně se kvasinky vyskytují ve fermentovaných asijských potravinách, ve fermentovaných mléčných produktech, v kakau, kávě a tabáku. Dalšími zdroji kvasinkových izolátů jsou melasa, cukr, med, maso, nakládaná zelenina a ocet, a pekařské produkty.

Vzhledem k tomu, že výskyt kvasinek je podmíněn fyziologickými vlastnostmi prostředí, nepomnožují se ve větší míře například na maso a bílkovinném materiálu, vzhledem k jejich neschopnosti štěpit bílkoviny. Méně kvasinek se také vyskytuje v odpadních vodách, aktivovaném kalu, splašcích, blátě, asfaltových půdách a v ropných skvrnách. [1, 2, 3]

Dalším faktorem, ovlivňujícím výskyt kvasinek, je nízká tepelná odolnost. Většina kvasinek je usmrcena při 2-5 minutovém zahřívání na 56 °C. Kromě těchto faktorů se při výskytu kvasinek uplatňuje kyselost prostředí, osmotický tlak, potřeba cukru a jiné.

Kvasinky tvoří jednu z nejdůležitějších skupin mikroorganismů, jež jsou využívány pro komerční účely. Hrají důležitou roli ve sféře potravinářského a farmaceutického průmyslu, dále v oblasti ekologie, medicíny a zemědělství.

Kvasinky jsou zdrojem ekonomicky hodnotných produktů a jejich přítomnost je nezbytná pro přípravu fermentovaných potravin, alkoholických nápojů a některých mléčných produktů. K těmto účelům byly kvasinky využívány po tisíciletí. S rozvojem kvasného průmyslu v minulém století se však začaly uplatňovat také při produkci užitečných sekundárních metabolitů jako antibiotik či vitaminů. Z kvasinkových buněk se pro komerční využití izolují enzymy, koenzymy, nukleotidy apod. Kromě klasických biotechnologií je fermentačních vlastností kvasinek využíváno při zpracování odpadních materiálů, např. celulózy.

Kromě pozitivního významu se kvasinky uplatňují i v negativním smyslu. Pokud není množství, růst a vývoj kvasinek dostatečně kontrolován, může dojít ke kontaminaci, která je příčinou kažení potravinářských výrobků, např. kompotů, ovocných moštů, slazených limonád a minerálních vod. Kontaminace cizími kvasinkami se negativně projevuje také v droždářství, pivovarství a vinařství, kde může nepříznivě ovlivnit chuť výrobku. Nejzávažnější negativní účinek kvasinek vyplývá z činnosti patogenních druhů (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), které způsobují nemoci člověka, zvířat nebo rostlin. [1, 2, 3, 13]

## 2.2 Taxonomie

### 2.2.1 Historie a současnost

Taxonomie je věda, která se zabývá rozdělováním především organismů podle určitých pravidel do skupin tak, aby jejich uspořádání vytvářelo hierarchický systém. Tento systém poté napomáhá při určování nově izolovaných kmenů.

V prvním období taxonomie (asi do roku 1960) se identifikace a zařazování kvasinek provádělo na základě morfologických studií, srovnáváním fyziologických a výživových vlastností a pomocí konvenčních genetických technik. Zpočátku byly k taxonomickým účelům využívány jen reakce kvasinek na limitující množství uhlíku a dusíku. Dnes tyto tradiční postupy zahrnují 60 - 90 testů, založených na schopnosti zkvašet různé sacharidy (glukosu, laktosu, sacharosu, melibiosu aj.), na schopnosti utilizace uhlíku a dusíku z různých zdrojů. Dalšími charakteristikami jsou požadavky kvasinek na vitaminy, teplotu, pH, rezistence k cykloheximidu, test hydrolýzy močoviny a další.

Druhé období v systematice kvasinek (od 1960 - 2000) souvisí s objevem struktury DNA, se zavedením elektronových mikroskopů, molekulárních technik a s aplikací biochemických kritérií. Velký pokrok v taxonomii přinesly také chemické analýzy DNA, především složení purinových a pyrimidinových bází.

V současné době se tradiční metody identifikace založené na morfologických, fyziologických a biochemických testech příliš nepoužívají, neboť jsou pracné, časově náročné a selhávají při klasifikaci na poddruhové úrovni. Navíc jsou fenotypové charakteristiky do

jisté míry závislé na kultivačních podmínkách a zjištěné údaje mohou být zkreslené a nepřesné. Metody založené na DNA mají oproti fenotypovým metodám jisté výhody - nejsou závislé na kultivačních podmínkách a umožňují rozlišení na úrovni kmenů. K těmto metodám řadíme DNA-DNA hybridizaci, elektroforézu celobuněčných proteinů, elektroforetickou karyotypii, analýzu a profilování mastných kyselin. Nevýhodou těchto technik je jejich časová náročnost a komplikovanost, pro které nejsou v běžné praxi příliš aplikovány. V tomto ohledu se jako nejvhodnější nástroj pro rychlou identifikaci kvasinek jeví moderní molekulární metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). [1, 3]

## 2.2.2 Taxonomie kvasinek

U kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů rozlišujeme dvě velké skupiny: Ascomycetes a Basidiomycetes lišící se způsobem pohlavního rozmnožování. Formy, u nichž se neprokázalo pohlavní rozmnožování, jsou anamorfní formy jedné nebo druhé skupiny. Takové organismy řadíme do pomocné skupiny Deuteromycetes.

Někdy se zařazují askogenní kvasinky do vlastní třídy Endomycetes, která je na stejné hierarchické úrovni jako třída Ascomycetes. Endomycetes vytvářejí primitivní aska, a byli proto označovány jako Hemiascomycetes. Od Ascomycetes se zásadně odlišují tím, že Endomycetes netvoří askogenní hyfy.

Experimentální část této práce je věnována ověření taxonomického zařazení tří rodů kvasinek – rodu *Saccharomyces*, *Rhodotorula* a *Cryptococcus*, které se vyskytují v hojné míře na různých typech stromů. [1, 3]

## 2.2.3 Ascomycetes (Endomycetes)

Ascomycetes nebo Endomycetes vytváří endospory, mycelia bez příhrádek, neprodukují ureázu, zkvašují sacharidy, pučí holoblasticky, buněčná stěna je třívrstvá a převažuje glukan a mannan, jsou nepigmentované a biomasa se nezbarvuje diazoniovou modří B na červeno.

### 2.2.3.1 Rod *Saccharomyces*

Mezi Ascomycetes řadíme i rod *Saccharomyces*, který připadá mezi jednobuněčné pučící kvasinky čeledě *Saccharomycetaceae*. Zařazení je následovné:

#### 1. Ascomycetes

##### 1.1 Kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkovité organismy s pravým myceliem

#### 1.2 Jednobuněčné pučící kvasinky

1.2.1 Apikulární kvasinky čeledě *Saccharomycodaceae* (př. rod *Saccharomyces*)

1.2.2 Lipidotvorné kvasinky čeledě *Lipomycetaceae* (př. rod *Lipomyces*)

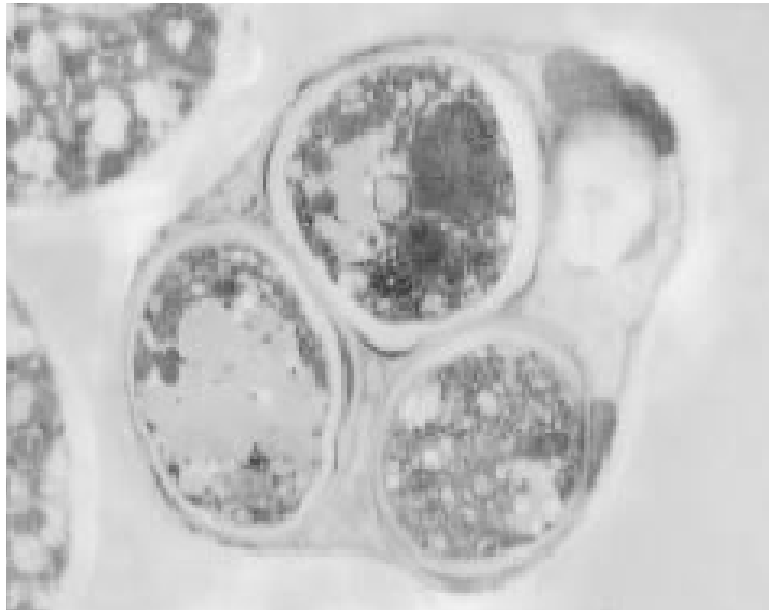
#### 1.2.3 Kvasinky čeledě *Saccharomycetaceae*

##### 1.2.3.1 Rod *Saccharomyces*

1) Druhy zkvašující jen glukosu (*S. unisporus*)

- 2) Druhy zkvašující glukosu a sacharosu (*S. kluyveri*, *S. chevalieri*)
- 3) Druhy zkvašující glukosu a maltosu (*S. norbensis*, *S. oleaginosus*)
- 4) Druhy zvašující maltosu a sacharosu (*S. heterogenicus*, *S. cerevisiae*)

Rod *Saccharomyces* byl poprvé definován v roce 1870 a patří mezi jedny z prvních objevených kvasinek. Druhy rodu *Saccharomyces* se vegetativně rozmnožují multilaterálním pučením, holoblasticky. Buňky mají kulovitý, elipsoidní nebo cylindrický tvar. Mohou tvořit pseudomycelium, ne však pravé mycelium. Konjugace nastává při tvorbě spor nebo těsně po vytvoření spor, čímž mohou vzniknout i diploidní spory. Askospory jsou kulovité nebo mírně oválné a v asku jsou zpravidla jedna až čtyři. Intenzivně zkvašují sacharidy.



Obr. 4: Askus se sporami [47]

Nejdůležitější druh je *S. cerevisiae*, který se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, pivovarská či vinařská kvasinka. Má elipsoidní až kulovité buňky, vytváří stromečkové pseudomycelium. V kapalinách tvoří sediment a na okrajích prstenec. Zkvašuje glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a částečně nebo úplně rafínosu. Tento druh slouží jako modelový organismus a je neprostudovanější kvasinkou. [1, 2, 16]

#### 2.2.4 Basidiomycetes

Basidiomycetes vytváří exospory, mycelia jsou příhrádkovitá, buněčná stěna je často pigmentovaná, v povrchových vrstvách slizovitá, převládá v ní chitin a mannan. Vyznačují se produkcí ureázy, zbarvováním biomasy diazoniovou modří B a vysokým obsahem guaninu a cytozinu v DNA. [1]

### 2.2.4.1 Rod *Rhodotorula*

Rod *Rhodotorula* řadíme mezi červené kvasinkovité mikroorganismy. Vyznačuje se produkcí karotenoidů, které jsou lokalizované na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a vytvářejí se poměrně složitým biomechanizmem. Pro tvorbu karotenoidů potřebují kvasinky světlo a kyslík, proto lze tvorbě pigmentů jednoduše zabránit tmou a látkami brzdícími oxidační procesy.

Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou zařazeny následovně:

## 2. Basidiomycetes

### 2.1 Červené kvasinkovité organismy

#### 2.1.1 Rody *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* a *Cystofilobasidium*

2.1.2 Karotenoidní kvasinky produkující balistokonídie (př. druh *Sporidiobolus*)

2.2 Krémové, pleťové, světležluté druhy (př. rod *Cryptococcus*)

2.3 Černé kvasinkovité organismy (př. rod *Moniliella*)

2.4 Kvasinky pučící na sterigmách (př. rod *Sterigmatomyces*)

2.5 Sněťovité organismy (př. rod *Tilletia*)

2.6 Slizovité bazidiomycetové organismy (př. rod *Apiotrichum*)

2.7 Slizovité kvasinkovité organismy rodu *Candida* bazidiomycetového původu (př. druh *Candida aquatica*)

Rod *Rhodotorula* byl objeven v roce 1852 a počet druhů a variet v rodě nebyl dosud jednoznačně stanoven. Mezi sdružené druhy rodu *Rhodotorula* patří druhy *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis* a *Rhodotorula hasegawae*. Všechny čtyři druhy vytváří sediment a prstenec zpravidla světlé, krémové až světle růžové barvy. Kolonie na agarovém médiu jsou korálově červené, pomerančové, lososové, což závisí na složení živné půdy. Kolonie jsou hladké, lesklé, slizovité. Produkují ureázu a jsou lipidotvorné. Vyčištěné lipidy *Rh. glutinis* obsahují přibližně 84 % neutrálních lipidů, 13 % glykolipidů a 3 % fosfolipidů. Mastné kyseliny neutrálních lipidů zahrnují kyselinu olejovou, linolovou, stearovou, palmitovou, linolenovou, arachidonovou, behenovou a linocerovou. Kromě obsažených mastných kyselin, které lze dále využít je biomasa po extrakci lipidů zdrojem cenných proteinů a aminokyselin. [1, 5, 37, 38]



Obr. 5: Kolonie *Rhodotorula glutinis* na Petriho misce [48]

#### 2.2.4.2 Rod *Cryptococcus*

Rod *Cryptococcus* ředíme mezi kvasinky, jejichž kolonie jsou zbarvené krémově případně do žluta. Pokud vytvářejí karotenoidní látky, jsou ze skupiny ketokarotenoidních derivátů a xantinů. Rod *Cryptococcus* se řadí také mezi Basidiomycetes:

### 2. Basidiomycetes

#### 2.1 Červené kvasinkovité organismy (rod *Rhodotorula*)

#### 2.2 Krémové, pleťové, světležluté druhy (př. rod *Cryptococcus*)

##### 2.2.1 Rod *Bullera* a telemorfni formy

##### 2.2.2 Rody *Cryptococcus*, *Filobasidiella* a *Filobasidium*

##### 2.2.3 Rod *Tremella*

##### 2.2.4 Rod *Leucosporidium*

#### 2.3 Černé kvasinkovité organismy (př. rod *Moniliella*)

#### 2.4 Kvasinky pučící na sterigmách (př. rod *Sterigmatomyces*)

#### 2.5 Sněťovité organismy (př. rod *Tilletia*)

#### 2.6 Slizovité bazidiomycetové organismy (př. rod *Apiotrichum*)

#### 2.7 Slizovité kvasinkovité organismy rodu *Candida* bazidiomycetového původu (př. druh *Candida aquatica*)

První přesnější definice rodu *Cryptococcus* byla podána roku 1970 a popisovala buňky jako kulovité nebo elipsovité, amébovité nebo polymorfni, které se rozmnožují multilaterálním pučením. Mohou tvořit rudimentární pseudomycelium, ale nevytváří askospory, teliospory ani balistokonidie. Většina kmenů tvoří kapsule, obsahující polysacharid podobný škrobu. Karotenoidní pigment může být produkován, kultury ale pigmentované nejsou. Růst v kapalném prostředí je omezený na tvorbu prstence a usazeniny. Nezkvašují sacharidy a všechny druhy využívají inozitol.

Druhy rodu *Cryptococcus* se řadí mezi parazity, kteří se vyskytují také na lidech a zvířatech. Do styku s mikroorganismy lze přijít všude, kde se vyskytují ptačí exkrementy. Choroby, které *Cryptococcus* zapříčiňuje se nazývají kryptokokózy a mohou mít projevy kožní, oční, plicní nebo napadat centrální nervový systém. [1, 2, 41]

## 2.3 Metoda PCR a její aplikace v praxi

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je enzymová metoda sloužící k syntéze přesně definovaného úseku DNA. Probíhá zcela v podmínkách *in vitro*, tedy mimo buňku a pomocí této metody lze během krátké doby mnohonásobně amplifikovat, namnožit, požadovaný úsek DNA. Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce využívána například při analýze genetických chorob.

### 2.3.1 DNA - deoxyribonukleová kyselina

Molekula DNA je nositelkou dědičné informace, která je kódována do struktury DNA a je dána sekvencí nukleotidů v řetězci. Model sekundární struktury DNA vytvořili v roce 1953 Watson a Crick.

#### 2.3.1.1 Struktura DNA

DNA je makromolekulární látka, která se skládá ze dvou polynukleotidových vláken složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek. Obě tato vlákna jsou spojena vodíkovými můstky do pravotočivé dvoušroubovice.

Nukleotidy jsou v případě DNA tvořeny pětiuhlíkatým monosacharidem deoxyribózou, zbytkem kyseliny trihydrogenfosforečné a organickými bázemi, které mohou být buď purinové (adenin – A, guanin – G) nebo pyrimidinové (cytosin – C a thymín – T). Tyto deoxyribonukleotidy jsou navzájem propojeny 3',5'- fosfodiesterovou vazbou mezi třetím uhlíkem (C3') deoxyribózy jednoho nukleotidu a pátým uhlíkem (C5') deoxyribózy dalšího nukleotidu. Báze se nepárují náhodně, ale adenin se váže s thymínem a cytosin s guaninem. Toto komplementární párování bází umožňuje párům bází zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvoušroubovice. Množství A v dvouřetězcové DNA je stejné jako množství T, množství G je stejné jako množství C a celkové množství purinových bází se rovná celkovému množství pyrimidinových bází. Báze se mohou spolu párovat jen v případě, že jsou oba řetězce vůči sobě antiparalelní, což znamená, že polarita jednoho řetězce je opačná k polaritě druhého řetězce DNA. [5, 8, 10, 11]

#### 2.3.1.2 Biosyntéza DNA

Genetická informace uložená v nukleotidové sekvenci DNA slouží dvěma účelům. Je zdrojem informace pro syntézu všech proteinů buňky a poskytuje informace děděné dceřinou buňkou. Strukturální podmínkou je, že při vzniku nových dvoušroubovic musí být stále

zachováno typické párování přilehlých bází, což zaručuje dodržení nezměněného pořadí nukleotidů v obou vláknech obou kopií DNA v dceřiných buňkách a tím i zachování genetické informace.

Schopnost obou vláken fungovat jako templát pro syntézu komplementárního vlákna umožňuje buňce kopírovat, neboli replikovat své geny před rozdělením na dvě dceřiné buňky. Replikace DNA dává vzniku dvěma novým dvoušroubovicím, které pocházejí z mateřského helixu. Jedno z vláken mateřské molekuly je zachováno v dceřiné molekule. Tato metoda replikace je známa jako semikonzervativní replikace.

Replikace začíná ve specifických místech chromosomu. Místům, kde je struktura dvoušroubovice DNA nejdříve narušena se říká replikační počátky a jsou určeny speciální nukleotidovou sekvencí. V jednoduchých buňkách jako jsou kvasinky, jsou tyto replikační počátky určeny přibližně 100 páry bází. Tato místa jsou tvořena specifickými sekvencemi nukleotidů, které jsou jednak rozpoznávány iniciačními proteiny a snadno zde dochází k rozestupu komplementárních DNA-řetězců vlivem přerušení vodíkových vazeb mezi nimi. V replikačních počátcích se typicky vyskytují sekvence s vysokým obsahem adeninu a thyminu, které lze relativně snadno rozpojit. V těchto místech se tedy dvoušroubovice DNA rozpletením rozevře a nabývá tvaru vidlice.

Nejdůležitějším enzymem replikačního aparátu je DNA polymeráza III, která katalyzuje vznik nového polynukleotidového řetězce polymerací, která musí začít vždy od krátkého oligonukleotidu, od jehož 3'- konce syntézu zahájí. Krátký oligonukleotid poskytující akceptorovou skupinu 3'-OH pro zahájení syntézy polydeoxyribonukleotidového řetězce se označuje jako primer. Polynukleotidový řetězec je prodlužován na 3'-konci, tak že na 3'-OH-skupinu tohoto konce jsou napojovány vždy nukleosid-5'-monofosfáty, které jsou odnímány z nukleosid-5'-trifosfátů. DNA polymeráza III se neodděluje od DNA po každém přidání nukleotidu, ale zůstává navázána na DNA a během polymerace se podél ní pohybuje.

Obecně DNA polymerázy patří mezi transferázy, které katalyzují přenos aktivovaných nukleotidů na polynukleotidový řetězec, na který je krok za krokem připojují fosfodiesterovou vazbou. Syntéza polynukleotidového řetězce probíhá vždy ve směru 5' → 3'.

Dceřiné vlákno, které roste od iniciačního bodu směrem k vidlici, se syntetizuje kontinuálně a nazývá se vedoucí vlákno. Vlákno syntetizované v opačném směru, s 5'-konci orientovanými směrem k místu rozplétání, se syntetizuje po částech a jde o tzv. opožděvané vlákno. Jedno z nově tvořených vláken DNA se tedy netvoří kontinuálně podél celé délky mateřského vlákna, ale vzniká po malých fragmentech, zvaných Okazakiho fragmenty. [4, 5, 8, 10, 11, 29, 32]

### **2.3.1.3 Stabilita a denaturace DNA**

Důležitou vlastností dvoušroubovice je její schopnost rozplétat se, a tak zpřístupnit genetickou informaci v ní uloženou. Při zvýšené teplotě dochází k uvolňování vodíkových vazeb, které přispívají ke stabilizaci dvoušroubovicového uspořádání DNA. Zhroutlí se nativní struktura a vznikají volné polydeoxyribonukleotidové řetězce, jež zaujmají konformaci náhodného klubka. Tento proces se nazývá denaturace DNA a teplota, při které k ní dochází, se nazývá teplota tání –  $T_m$  (melting temperature). Teplota tání je závislá na různých faktorech. Je to především obsah G a C v DNA. S jejich rostoucím molárním poměrem roste i teplota nutná k denuraci. Příčinou toho je, že mezi G a C jsou tři vodíkové vazby a k jejich

přerušení je tedy potřebná vyšší teplota, než k přerušení dvou vodíkových vazeb mezi A a T. Mezi další faktory ovlivňující teplotu tání patří pH, iontová síla roztoku, povaha rozpouštědla.

K denuraci může dojít i působením dalších vlivů, které ruší vzájemné interakce mezi řetězci, jako jsou například organická rozpouštědla, tenzidy apod.

#### **2.3.1.4 Izolace DNA**

Izolace DNA je prvním krokem, který ovlivňuje úspěch celé PCR analýzy. DNA musí být získána v dostatečném množství a kvalitě. Kvalita je určena délkou fragmentů a stupněm poškození, které může být způsobeno vyššími teplotami, nízkým pH prostředí nebo působením nukleáz. Izolovaná DNA také nesmí obsahovat inhibitory enzymové amplifikační reakce, např. ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , uhlovodíky, těžké kovy, tanin, fenoly a soli

Nukleové kyseliny lze izolovat z nejrůznějších biologických materiálů. Izolace zahrnuje lyzi buněčných membrán, inaktivaci buněčných nukleáz a separaci nukleových kyselin od zbytků buněk.

Po dokonalém rozrušení buněčných struktur biologického materiálu přechází nukleové kyseliny spolu s dalším obsahem buňky do vodného roztoku. Ten zpravidla obsahuje pufr s přísadkou tenzidů (k uvolnění vazby nukleových kyselin s bílkoviny), deproteinačních činidel (např. fenol, chloroform, chloristan sodný) a inhibitorů nukleáz (enzymy štěpící nukleové kyseliny). Závěrečná fáze izolace zahrnuje několik přečišťovacích kroků, které jsou zaměřeny na odstranění bílkovin a lipidů. Vzorek nukleové kyseliny je poté uchováván při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pro izolaci se používá celá řada komerčně vyráběných souprav, které značně zjednoduší celý postup izolace. [5, 6, 10, 11, 27]

### **2.3.2 Polymerázová řetězová reakce**

Zavedení polymerázové řetězové reakce v roce 1985 znamenalo pro molekulární biologii stejný přínos jako objev restrikčních endonukleáz nebo zavedení sekvencování DNA. Výhodou PCR je hlavně to, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech.

#### **2.3.2.1 Princip PCR**

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru  $5' \rightarrow 3'$  prostřednictvím DNA polymerázy. Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich  $3'$ -konce směřují proti sobě. Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů.

Reakční směs pro PCR musí obsahovat: 2 oligonukleotidové primery komplementární k 3'-koncovým sekvencím obou komplementárních řetězců úseku, jenž má být amplifikován, úsek izolované dvojřetězcové DNA, která slouží jako templát, směs všech čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů, DNA polymerázu, vhodný pufr obsahující  $Mg^{2+}$  ionty a vysoce čistou deionizovanou vodu.

PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (templátu) (94 °C)
2. připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65 °C)
3. syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy (65-75 °C)

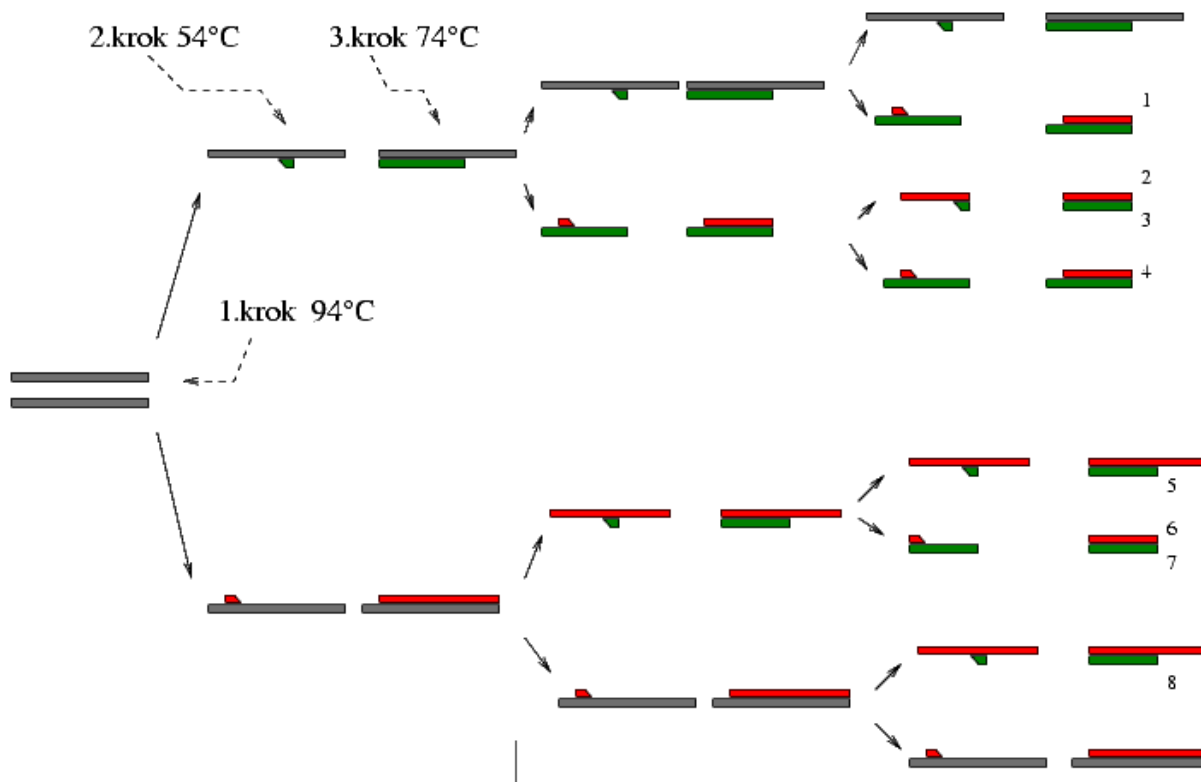
Vlivem vysoké teploty dochází při denaturaci k rozrušení vodíkových vazeb v dvouřetězcové DNA, což vede k jejímu rozpletení na jednotlivá vlákna. Obvykle je dostatečná denaturace při teplotě 94°C po dobu 20-30 s. Relativně krátké naamplifikované fragmenty denaturují snadněji než komplexní DNA. Jestliže je denaturační teplota příliš nízká, nedojde k úplné denaturaci molekuly DNA a její struktura se vrací do původního stavu, který neumožňuje připojení primerů k vláknu DNA. Doba denaturace by neměla být příliš dlouhá, protože by mohlo dojít k renaturaci DNA polymerázy a tím ke snížení její aktivity (resp. ke zvýšení nesprávných inkorporací nukleotidů během PCR).

Po denaturaci je reakční roztok ochlazen a primery, které jsou přítomny v nadbytku, se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Pravděpodobnost a specifita připojení primerů závisí na teplotě, čase, na templátu DNA a na primeru samotném. Volba teploty připojení primerů je nejkritičtější faktorem, jež ovlivňuje specifitu PCR. Je-li teplota příliš vysoká, nedojde k připojení primerů, ale pokud je příliš nízká, může se značně zvýšit počet nespecifických interakcí primerů s templátem DNA. Hodnotu připojovací teploty lze zjistit podle vztahu pro výpočet teploty tání primerů:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25,$$

avšak obecně užívaným pravidlem pro stanovení  $T_a$  je snížení teploty  $T_m$  o 5 °C. Připojení primerů trvá většinou 20 – 40 sekund.

Při teplotě 72°C zahajuje DNA polymeráza elongaci, tzn. že dochází k enzymové syntéze DNA od 3'-konců připojených primerů, jež ohraničují amplifikovaný úsek DNA. Syntéza probíhá při optimální teplotě rychlostí 60 bází/s po dobu 45 – 90 s. Doba syntézy závisí na délce amplifikovaného fragmentu a její výtěžek je závislý na vhodných reakčních podmínkách. [6, 8, 12, 14, 26, 36]



Obr. 6: Průběh PCR a schéma po třech cyklech: 1. krok – denaturace DNA, 2. krok – připojení primerů, 3. krok – prodlužování řetězců DNA [49]

Na konci polymerázové řetězové reakce se doba pro prodlužování primerů upravuje. Konečná extenze probíhá při teplotě 72 °C po dobu 5 – 15 min, aby došlo k dosyntetizování částečně prodloužených produktů a k renaturaci jednovláknových produktů.

Reakce se provádějí v zařízení zvaném termocycler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech.

Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Jelikož výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA. [6, 8, 12, 14, 26, 36]

### 2.3.2.2 Primery pro PCR

Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Pro genom o velikosti 3 miliardy bp je teoreticky postačující sekvence primeru o délce 16 nukleotidů. Sekvence o této délce by měla být v genomu uvedené velikosti jedinečná a měla by se proto vázat specificky jen k jedinému místu. Genomy organismů však nemají náhodné sekvence, a proto se primery navrhuje zpravidla delší. Při návrhu primerů pro standardní PCR je třeba brát v úvahu několik důležitých pravidel:

- délka zpravidla 18-25 nukleotidů,

- obsah G+C 40 % až 60 %
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,
- teplota  $T_m$  alespoň 50 °C,
- podobná teplota  $T_m$  u obou primerů,
- specifickost primerů – na matricové DNA nesmí být nespécifická vazebná místa,
- absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů,
- zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-konech primerů pro zajištění přesné vazby na templát.

Komerčně dostupné primery poskytují dostatečnou čistotu a primery běžných velikostí mohou být používány při PCR bez přečištění. Pro návrh primerů v analyzovaných oblastech sekvence DNA existuje řada počítačových programů, které umožňují zohlednit výše uvedená pravidla.

Za účelem amplifikace kvasinkové DNA byly vyvinuty specifické SC1, SC2 a nespécifické ITS1, ITS4 primery. Amplifikace ribosomální ITS oblasti použitím univerzálního primeru se obecně používá pro houby. ITS oblast kvasinkové ribosomální DNA je vysoce proměnlivá sekvence, která je velice důležitá při rozlišování kvasinkových druhů PCR analýzou. V současnosti je ITS nejvíce sekvenovanou oblastí DNA u hub, a to vzhledem k vysokému stupni proměnlivosti, než jaký je u jiných genových oblastí rDNA.

[6, 10, 19, 24, 30, 39, 40]

### 2.3.2.3 DNA polymeráza

DNA polymeráza je termostabilní enzym izolovaný z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, žijícím v horkých pramenech Yellowstonského národního parku, a proto nese název *Taq* DNA polymeráza. Tento nemodifikovaný enzym optimálně replikuje DNA při 74 °C a má poloviční životnost po 40 min při 94 °C. Je stabilní při mnohem vyšších teplotách než eukaryotní DNA polymerázy, není proto během PCR denaturován a nemusí se po každém cyklu k reakční směsi přidávat. Zavedení termostabilní *Taq* DNA polymerázy znamenalo výrazný pokrok z hlediska automatizace PCR metody.

*Taq* DNA polymeráza je však enzym, který má pouze 5' → 3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3' → 5' exonukleázovou aktivitu, což znamená, že není schopna opravovat chyby vzniklé při replikaci. Správnost syntézy pomocí *Taq* DNA polymerázy závisí na koncentraci volných iontů  $Mg^{2+}$ , na rovnováze všech nukleotidů ve směsi, na pH, na tepelné denaturaci templátu DNA a na přítomnosti inhibitorů v roztoku. Koncentrace polymerázy je další z důležitých faktorů, které je nutno pro konkrétní postup optimalizovat, neboť zvýšená koncentrace enzymu může vést ke snížení specifity reakce.

Mimo *Taq* DNA polymerázy jsou používány také *Pwo* a *Pfu* DNA polymerázy (*Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*), které mají kromě polymerázové aktivity také 3' → 5' exonukleázovou aktivitu. Frekvence chyb je u těchto polymeráz 2-6krát nižší než u *Taq* DNA polymerázy, ale jejich rutinní použití je obtížné, protože jejich 3'-exonukleázová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. DNA polymerázy s 3'-exonukleázovou aktivitou však našly úspěšné uplatnění v kombinaci s *Taq* DNA polymerázou v modifikacích PCR určených pro amplifikaci dlouhých úseků DNA. [5, 6, 8, 36]

#### **2.3.2.4 Nukleotidy a reakční pufr pro PCR**

Nukleotidy jsou stavebními složkami DNA. Při PCR se obvykle používají roztoky o koncentraci  $10 \text{ mmol.l}^{-1}$ , v nichž jsou obsaženy všechny nukleotidy v ekvimolárním množství. Nevyvážený poměr nukleotidů ve směsi může snížit účinnost *Taq* DNA polymerázy a zvýšit tím počet nepřesných spojení při navazování primerů. Optimální koncentrace směsi nukleotidů závisí na délce amplifikovaného produktu, na koncentraci  $\text{MgCl}_2$  a na koncentraci primerů. Nukleotidy ovšem snižují koncentraci volných iontů  $\text{Mg}^{2+}$ , čímž negativně ovlivňují aktivitu polymerázy a omezují přisedání primerů. *Taq* DNA polymeráza katalyzuje připojování nukleotidů s vyšší přesností při nižších koncentracích nukleotidů.

Reakční pufr, jehož pH se pohybuje v rozmezí 8,3 – 9, vytváří během PCR prostředí vhodné pro aktivitu DNA polymerázy. Jeho hlavními složkami jsou  $\text{MgCl}_2$ , Tris-HCl a KCl, dále pak obsahuje aditiva zvyšující specifitu a efektivitu. Při nadbytku  $\text{Mg}^{2+}$  může docházet k nespecifické vazbě primerů. Naopak při nízké koncentraci dochází ke snížení výtěžku požadovaného produktu. [6, 8, 10]

#### **2.3.2.5 Faktory ovlivňující PCR**

PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA polymerázu. Avšak i ta katalyzuje prodlužování primerů při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů, zejména při nízkých koncentracích templátové DNA.

Vysoká specifita a citlivost metody PCR s sebou přináší také nežádoucí zvýšené riziko kontaminace. Kontaminace i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA postačuje pro získání falešného signálu. Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků jsou doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávovaných roztoků, separaci používaných PCR reagensů od templátové DNA a produktů PCR, používání UV světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, používání jednorázových rukavic a přidávání DNA do reakce jako poslední složku. Jako zdroj kontaminace DNA je nejčastěji uváděn přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR a vzájemná kontaminace zdrojových materiálů.

### **2.3.3 Restrikční analýza produktu PCR**

Díky vývoji PCR metody se naskytly nové možnosti, které umožnily vývoj nových diagnostických metod. Tyto molekulárně-biologické metody jsou založené na PCR a umožňují detekovat různé sekvence DNA s extrémní citlivostí. Navzájem se liší použitím dalších enzymatických reakcí a také způsoby detekce produktů PCR.

Pro identifikaci kvasinek kolonizujících povrchy listů byla použita metoda stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů produktů PCR (PCR-RFLP), která je vhodným nástrojem k odlišení kvasinkových druhů, ale i k odlišení a identifikaci jednotlivých kvasinkových kmenů s podobnými fyziologickými vlastnostmi.

### **2.3.3.1 Princip PCR-RFLP**

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. Pomocí polymorfizmu délky restrikčních fragmentů (RFLP) se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa. Pomocí této metody hledáme polymorfismus v restrikčních místech nejrůznějších endonukleáz a následně ho interpretujeme jako příbuznost či nepříbuznost organismů.

Reakční směs pro štěpení PCR produktu se skládá z pufru pro restrikční endonukleázu, enzymu restrikční endonukleázy a příslušného množství destilované H<sub>2</sub>O. Teplota inkubace (digesce) se nastavuje podle dodavatele konkrétní restrikční endonukleázy, většinou 37 °C. Při digesci dochází k enzymatickému štěpení specifických míst sekvence DNA, které rozpoznává daný enzym zvaný restrikční endonukleáza. Vzniklé fragmenty o různé délce lze od sebe oddělit elektroforézou. Počet i délka fragmentů je pro daného jedince specifická. [6]

### **2.3.3.2 Struktura, funkce a stabilizace enzymů**

Enzymy jsou molekuly většinou bílkovinného původu, které katalyzují chemické přeměny v živých organismech. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí. Aktivita enzymů, spočívající v ovlivnění rychlosti chemických reakcí snižováním jejich aktivační energie, je závislá zejména na koncentraci substrátu, teplotě, pH, aktivátorech a inhibítorech.

Katalytickou funkci může vykonávat buď jednoduchá nebo složená bílkovina. Enzymy se strukturou složených bílkovin, jichž je mezi známými enzymy převaha, se nazývají holoenzymy a skládají se z bílkovinné části - apoenzymu a z nebílkovinného kofaktoru. Kofaktor volně vázaný na apoenzym nekovalentní vazbou se nazývá koenzym, naopak tzv. prosthetické skupiny jsou vázány na apoenzym pevně, obvykle kovalentně.

Katalytická aktivita enzymů závisí na jejich konformaci, tj. na jejich prostorovém uspořádání. Změny prostorové struktury mohou mít za následek snížení nebo úplnou ztrátu enzymové aktivity. Vyplývá to ze skutečnosti, že enzymová reakce začíná vytvořením komplexu enzym-substrát, přičemž se substrát váže na místo na apoenzymu, jež se nazývá aktivní centrum pro vazbu substrátu. Konformace aktivního centra odpovídá za specifitu enzymu, neboť se do něho mohou vázat jen substráty, které mu konformačně odpovídají (Fischerova teorie klíče a zámku) nebo které po přiblížení k aktivnímu místu způsobí jeho vhodnou orientaci pro vazbu (Koshlandova teorie indukovaného přizpůsobení).

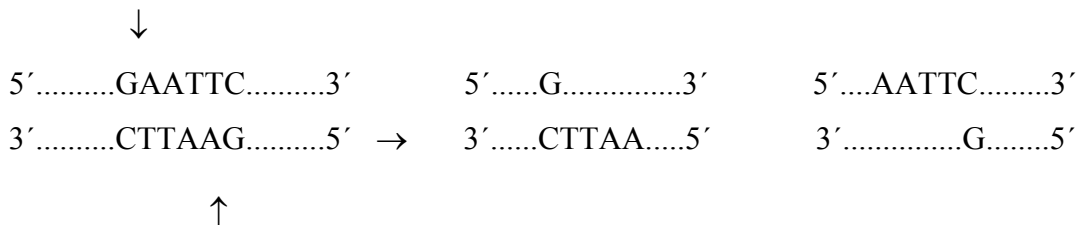
Stabilita enzymu je schopnost bílkovinných molekul zachovat si svou katalytickou aktivitu po určitou dobu i ve změněných podmínkách, tj. v podmínkách, které neodpovídají podmínkám jejich přirozeného výskytu. Při stabilizaci enzymu se využívají prostředky, které brání změnám jeho terciární ev. kvartérní struktury. Jedním z nejjednodušších způsobů stabilizace je přidavek různých solí, substrátů, kofaktorů, inhibitorů apod. Dále se využívá přidavku komplexotvorných látek, bílkovin, polyelektrolytů a jiných rozpustných polymerů. Stabilizačního efektu je dosahováno fixací terciární struktury enzymu a zejména schopností udržet v okolí enzymu určité pH. [4, 5, 11, 23]

### 2.3.3.3 Restriční endonukleázy

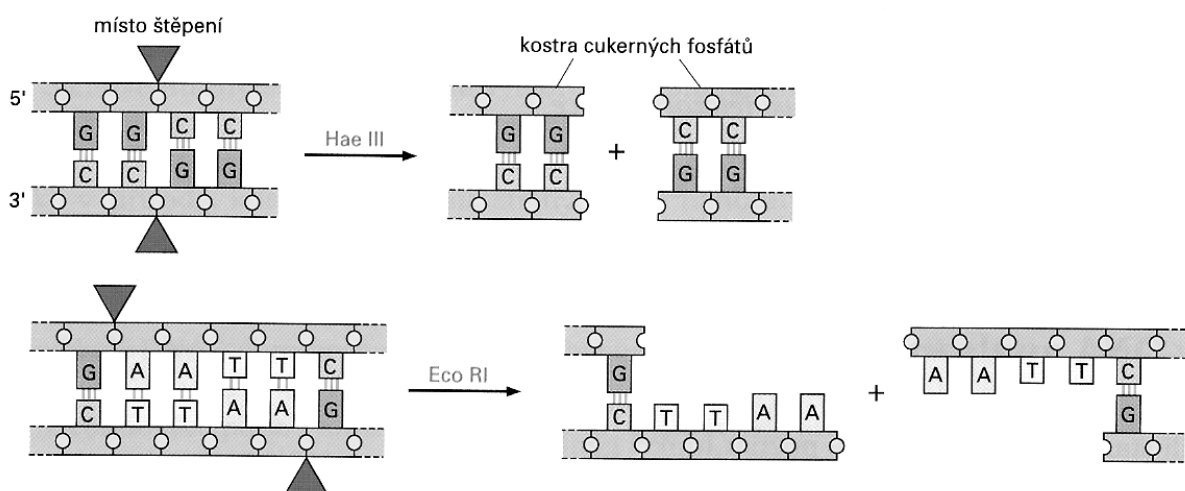
Enzymy, které štěpí fosfodiesterové vazby polynukleotidového řetězce se nazývají nukleázy. Nukleázy, které štěpí vnitřní vazby, jsou endonukleázy a ty, které odštěpují koncové nukleotidy, se označují jako exonukleázy.

Restriční endonukleázy jsou součástí tzv. restričně modifikačních mechanismů bakterií. Tento systém je zajišťován dvěma druhy enzymových aktivit. Methylační aktivita slouží ke specifické modifikaci vlastní, buněčné DNA, čímž ji označuje jako materiál, který má být chráněn před degradací vlastními enzymy. Restriční aktivita katalyzuje štěpení cizorodé DNA, která není tímto způsobem v příslušných sekvencích modifikována.

Restriční endonukleázy rozpoznávají krátké sekvence dvouřetězcové DNA a štěpí ji v těchto specifických místech nebo poblíž nich. Většinou se jedná o palindromické sekvence, které mají stejné pořadí nukleotidů čtené ve směru od 5' konce na obou dvou vlákních DNA. Například u enzymu *EcoRI* je rozpoznávací sekvence 5'GAATTC 3' a specifické štěpné místo má sekvenci 5'G 3'.



Délka těchto sekvencí určuje četnost, se kterou bude enzym štěpit molekulu DNA. Frekvence výskytu delší sekvence (např. CCCGGG) bude ve stejné molekule DNA méně častá než kratší úsek (např. CCGG). Je také třeba přihlídnout k faktu, že některé sekvence, byť stejně dlouhé, se obecně vyskytují méně často než jiné. Volbou restriční endonukleázy lze tedy ovlivnit délku vznikajících úseků. [4, 5, 8, 12, 21, 31]



Obr. 7: Rozpoznávací sekvence a specifické štěpné místo enzymů *HaeIII* a *EcoRI*. [32]

Enzym Hae III štěpí oba řetězce DNA proti sobě, takže obě výsledné molekuly mají zarovnané neboli tupé konce, ale u *Eco* RI dochází ke štěpení mezi nukleotidy, které neleží proti sobě a tak vznikají na jednom z řetězců přesahující jednovláknové úseky (tzv. kohézní, lepidivé konce).

Různé restriktivní endonukleázy mají různá rozpoznávací tzv. rekogniční místa. Existují však také některé sekvence, které jsou štěpeny více enzymy. Enzymy, jejichž cílové sekvence jsou totožné, se nazývají izoschizomery.

Význam endonukleáz spočívá tedy hlavně v tom, že umožňují specificky štěpit různé DNA sekvence a vzhledem k jejich velkému množství máme mnoho možností k získání žádaných úseků DNA. [4, 5, 8, 35, 45]

#### **2.3.3.4 Podmínky digesce s restriktivními endonukleázami**

Při použití restriktivních enzymů je vždy vhodné řídit se pokyny výrobce, který udává základní informace, jako je optimální teplota, stabilita, příp. inhibice při štěpení methylových sekvencí. S enzymem je vždy dodáván i pufr v desetinásobné koncentraci, zajišťující po zředění podmínky pro maximální aktivitu enzymu. Všechny restriktivní enzymy vyžadují  $Mg^{2+}$  jako kofaktor a většina enzymových funkcí pracuje v pufru s pH v oblasti 7,2 – 7,6. Optimální teplota pro většinu digescí je 37 °C.

Kritickým parametrem při štěpení restriktivními endonukleázami je čistota použité DNA. Nečistoty, které mohou být přítomny po její izolaci, nebo vysoká koncentrace solí mohou inhibovat aktivitu enzymu. Někdy je možné zlepšit výsledek zvětšením reakčního objemu, což má za následek zředění nečistot. Může být také prodloužena reakční doba (pokud je enzym stabilní) nebo použito větší množství enzymu.

Restriktivní enzymy se většinou uchovávají při -20°C. V důsledku přítomnosti solí a glycerolu zůstávají roztoky i při této teplotě kapalné a mohou být pipetovány. Objem přidaného enzymu by měl být vždy menší než 1/10 celkového objemu reakční směsi, neboť glycerol ve vyšší než 1% koncentraci může inhibovat reakci. [5, 6]

#### **2.3.4 Varianty a modifikace PCR**

Polymerázová řetězová reakce je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba amplifikovat templáty s nízkým počtem kopií, detekovat sekvenční polymorfizmy, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Pro přehled uvádím další dvě techniky použitelné pro taxonomické zařazování kvasinek.

##### **2.3.4.1 Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)**

Náhodná amplifikace polymorfní DNA neboli náhodná PCR (AP-PCR) je rychlá a jednoduchá technika pro fingerprinting DNA, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomových DNA mikroorganismů a některých rostlin.

Metoda používá obvykle jeden nebo více krátkých primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primeru. Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomové nebo plazmidové DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálená a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou a rozdílným molárním množstvím, v závislosti na izolátu, ze kterého genomová DNA pochází. Použitelnost oligonukleotidových primerů může být zhodnocena pouze empiricky a informace o sekvenci templátové DNA není nezbytná.

Přes svou vysokou účinnost jsou při RAPD problémy s reprodukovatelností a s nedostatkem shodných pravidel pro interpretaci rozdílů vzorů.

Metoda se v praxi používá pro identifikační postupy a taxonomické studie. [6, 20, 22]

#### **2.3.4.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**

AFLP představuje metodu pro charakterizaci celkové genomové DNA, která poskytuje vysoké rozlišení a dobrou reprodukovatelnost.

Metoda zahrnuje čtyři základní kroky:

- úplné rozštěpení extrémně malého množství genomové DNA jednou nebo dvěma restričními endonukleázami, z nichž jedna mívá zpravidla méně cílových míst,
- ligaci genomové DNA s oligonukleotidovými adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restričního místa; ligace probíhá za přítomnosti restriktáz, takže nedochází ke spojování restričních fragmentů,
- selektivní amplifikaci sady restričních fragmentů pomocí jednoho nebo dvou selektivních AFLP primerů,
- gelovou elektroforézu amplifikovaných fragmentů v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Použitím AFLP je tedy možno vizualizovat sadu restričních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. K amplifikaci a prodloužení primeru dochází pouze v případě komplementárního párování 3'-konce AFLP primeru. Tímto způsobem dochází k selektivnímu výběru pouze malé části z velkého počtu až desetitisíců fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA, takže výsledný fingerprint lze snadno vyhodnotit a reprodukovat. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restričních míst a je analogický s polymorfismem RFLP.

Zdokonalením metody je použití fluorescenčního značení u jednoho z primerů a separace vzniklých produktů na automatickém sekvenátoru (fAFLP).

AFLP je velmi účinnou typizační metodou pro DNA libovolného původu a stupně komplexity, využívanou jak v diagnostice, tak pro fylogenetické a taxonomické studie, v dnešní době je hojně využívána i při klasifikaci kvasinek. [6, 18]

### 2.3.5 Separace fragmentů po RFLP gelovou elektroforézou

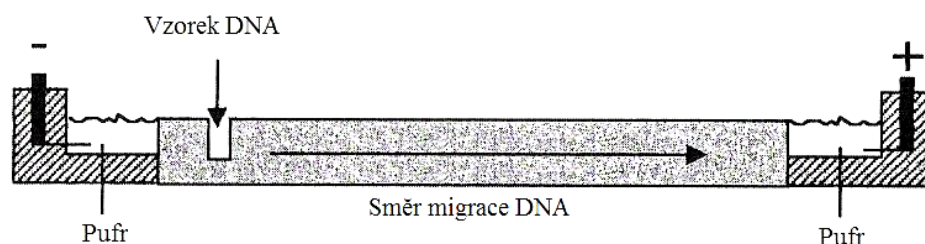
Fragmenty DNA vzniklé štěpením restrikními endonukleázami nebo PCR reakcí jsou běžně analyzovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

#### 2.3.5.1 Princip elektroforézy nukleových kyselin

Elektroforéza představuje orientovaný pohyb elektricky nabitých částic na vhodném nosiči, vynucený stejnosměrným elektrickým polem. Toto elektrické pole se vytváří vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Prostředí mezi elektrodami je tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému.

Nosičem bývá obvykle gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kb, polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry.

Nukleové kyseliny se obvykle dělí podle velikosti, neboť specifický náboj všech molekul DNA je stejný a je určen přítomností zbytků kyseliny fosforečné. Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako elektroforetická pohyblivost je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, které se označují jako standardy velikosti nebo hmotnostní standardy. Těmi bývají většinou restrikní fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním DNA. [6, 9, 15, 28]

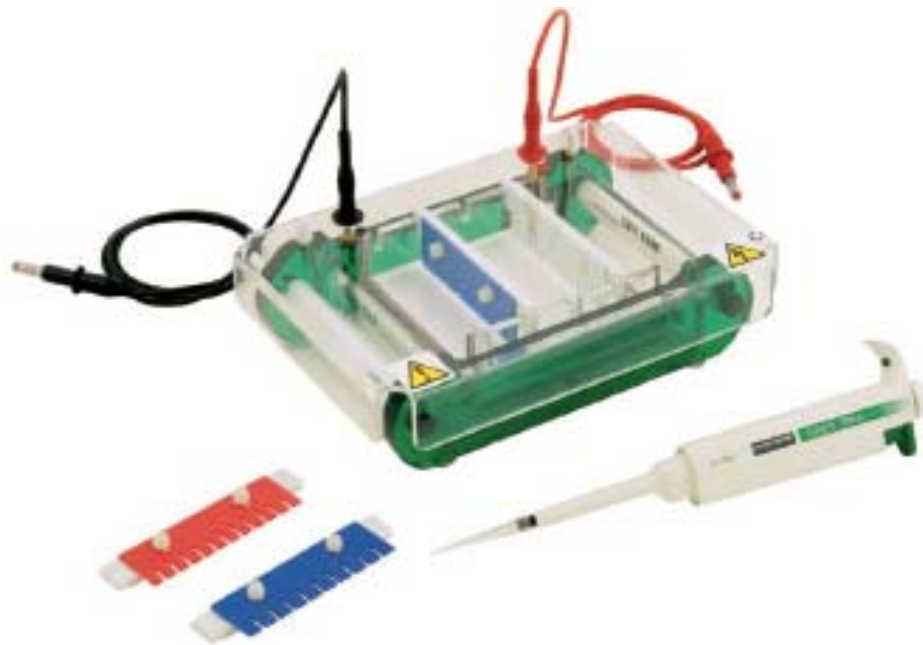


Obr. 8: Princip horizontální gelové elektroforézy [29]

#### 2.3.5.2 Uspořádání elektroforézy

Uspořádání klasické elektroforetické sestavy předpokládá použití elektroforetické vany se dvěma oddělenými zásobníky separačního pufru (katodický a anodický prostor), tyto

elektrolyty jsou vodivě spojeny s plochou, na které dělení probíhá. Do prostoru s elektrolytem jsou vloženy elektrody (katoda, anoda), na něž je ze zdroje vkládáno stejnosměrné elektrické napětí. Odvod vznikajícího tepla bývá obvykle zajištěn chlazením spodní části desky se separačním mediem. [6, 9, 15]



*Obr. 9: Komerční zařízení pro horizontální gelovou elektroforézu [50]*

### **2.3.5.3 Vizualizace separovaných fragmentů DNA**

Po dokončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji je používán etidium bromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří v ní komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. Ethidium bromid je silný mutagen a potenciální karcinogen a teratogen. Je proto nutné s ním pracovat opatrně, vždy používat rukavice a příslušně dekontaminovat vše, co jej obsahuje nebo s ním přišlo do styku.

Namísto etidium bromidu může být pro barvení nukleových kyselin použita také skupina fluorescenčních kyaninových barviv s komerčním označením SYBR. [6, 28]

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Chemikálie, suroviny a přístroje

##### 3.1.1 Chemikálie

Agaróza (ELISABETH PHARMACON, ČR), agaróza (SERVA, Německo), ethanol 96 % (LACHEMA, ČR), ethidium bromid (SERVA, Německo), EDTA (SERVA, Německo), hydroxid sodný (LACHEMA, ČR), kyselina boritá (SERVA, Německo), nanášecí pufr (Fermentas, Litva), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (SERVA, Německo), Taq DNA polymeráza (ELISABETH PHARMACON, ČR), 10x Taq DNA pufr (ELISABETH PHARMACON, ČR), dNTP mix (Invitek, Německo), primery (SC1, SC2) (ELISABETH PHARMACON, ČR), délkové standardy: Ultra Clean 20 bp Ladder (ELISABETH PHARMACON, ČR), Ultra Clean 100 bp Ladder (ELISABETH PHARMACON, ČR), Komerční souprava pro izolaci DNA Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA)

Restrikční endonukleázy: *TaqI*, *Hinfi*, *Eco88I*, *HhaIII*, *HaeIII*, *TruI*, *EcoRI* (FERMENTAS, Litva)

##### 3.1.2 Přístroje a pomůcky

Digitální pH-metr OP-211/1 (Radelkis, Maďarsko), mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR), mikropipety Nichpetex (Nichrio, Japonsko), minicentrifuga National LABNET C-1200 (Biotech s.r.o., ČR), centrifuga eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Německo), termostat IP 100-U LTE SCIENTIFIC, (Velká Británie), termocyklér PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research, Inc, USA), vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR), PCR box- AURA MINI (Bioair instruments, Itálie), elektroforetická vana (Owl separation systeme, model – B2, Biotech s.r.o., ČR), zdroj napětí – SAVANT PS 250 (Biotech s.r.o., ČR), mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR), analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko), předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko), transluminátor (Ultra. Lum. INC, USA), software Scion, Image (Biotech s.r.o., ČR), spektrofotometr DU 7400 (Beckman, USA), exsikátor, parafilm (American Nacional Can<sup>TM</sup>, USA), laboratorní sklo, sterilní box pro mikrobiologickou práci, bakteriologické kličky, plastový stojan, kahan, špičky, mikrozkuhavky Eppendorf, buničitá vata, parafin, plastové Petriho misky, lepící páska, nůžky

##### 3.1.3 Suroviny

Bylo vybráno 24 vzorků kvasinek, které byly odebrány z povrchu listů a jehličí. Sada prvních 12ti vzorků pocházela z lesních listnatých a jehličnatých stromů, druhá sada byla původem z listů ovocných stromů. Obě sady pocházejí ze sbírky kvasinek uložené na

Chemickém ústavu SAV v Bratislavě. Jednotlivé vzorky byly označeny čísly 1-24 (viz Příloha 1).

## 3.2 Izolace DNA

### 3.2.1 Izolace DNA pomocí Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)

Ke 300  $\mu\text{l}$  rozbíjecího roztoku v mikrozkušavce o objemu 2 ml byla z živné půdy na Petriho miskách přidána část kvasinkové kultury o objemu asi dvou rýžových zrn. Vzniklá suspenze byla přenesena do rozbíjecí mikrozkušavky a bylo k ní přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku MD1. Mikrozkušavky byly v horizontální poloze vortexovány při maximální rychlosti po dobu 10-ti min. Poté byly zkumavky centrifugovány při 10 000 x g po dobu 30-ti sekund. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku MD2. Směs byla vortexována 5 sekund, inkubována při 4 °C po dobu 5-ti min a centrifugována 1 minutu při 10 000 x g. Veškerý supernatant byl přenesen do čisté 2 ml zkumavky a bylo k němu přidáno

900  $\mu\text{l}$  roztoku MD3. Po krátkém vortexování byla část získaného roztoku (asi 700  $\mu\text{l}$ ) přenesena na membránu mikrokolony a centrifugována 30 s při 10 000 x g. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a do mikrozkušavky byl přidán zbytek získaného roztoku. Znovu byla provedena centrifugace za stejných podmínek a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Na mikrokolonu bylo nanášeno 300  $\mu\text{l}$  roztoku MD4. Opět byla provedena centrifugace za stejných podmínek a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Po další centrifugaci (10 000 x g po dobu 1 min) byla mikrokolona opatrně přenesena do nové 2 ml mikrozkušavky a bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku MD5. Po centrifugaci (10 000 x g po dobu 30 s) byla mikrokolona odstraněna a v mikrozkušavce zůstala připravená DNA. Takto získanou DNA byla skladována při -20 °C.

## 3.3 Amplifikace izolované DNA metodou PCR

### 3.3.1 Příprava vzorků k amplifikaci

Vzhledem k vysoké koncentraci DNA po izolaci bylo nezbytné DNA 50krát zředit. Pro každý vzorek byla namíchána reakční směs jednotlivých složek pro PCR, tzv. mastermix o celkovém objemu 150  $\mu\text{l}$ .

Mastermix v sobě zahrnuje: 126,5  $\mu\text{l}$  sterilní deionizované vody, 15  $\mu\text{l}$  PCR pufru, 0,5  $\mu\text{l}$  primeru ITS<sub>1</sub>, 0,5  $\mu\text{l}$  primeru ITS<sub>4</sub>, 1,5  $\mu\text{l}$  dNTP mixu (směs všech čtyř nukleotidů), 3  $\mu\text{l}$  izolované zředěné DNA a 3  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA polymerázy. Takto připravené mastermix byly vortexovány, centrifugovány a vloženy do termocykléru, v němž následně proběhla polymerázová řetězová reakce. [19]

### 3.3.2 Teplotní a časový profil PCR

*Tab. 1: Teplotní a časový profil PCR*

Denaturace	94 °C	4 min
Annealing - 25 cyklů	94 °C	60 s
	48 °C	30 s
	72 °C	60 s
Elongace	72 °C	10 min

Po amplifikaci byly analyzované vzorky uschovány při teplotě  $-20\text{ °C}$ , popř. byly hned identifikovány elektroforézou v agarózovém gelu. [19]

### 3.4 Elektroforetická detekce amplifikovaných fragmentů

#### 3.4.1 Příprava roztoku ethidium bromidu

Do mikrozkušavky bylo naváženo 10 mg ethidium bromidu, který byl rozpuštěn v 1 ml destilované vody.

#### 3.4.2 Příprava Tris-borátového pufru (TBE)

##### 3.4.2.1 Příprava zásobního roztoku TBE (10 x TBE)

Bylo naváženo 108 g Tris-báze a 55 g kyseliny borité. Pak bylo přidáno 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a v odměrné baňce bylo vše doplněno vodou na 1 litr.

0,5 M roztok EDTA o pH 8,0 byl připraven tak, že bylo naváženo 9,36 g EDTA, k ní byla přidána část vody a pH roztoku bylo upraveno na 8,0 pomocí nasyceného roztoku NaOH. Pak byl roztok v odměrné baňce doplněn vodou do 50 ml. Z takto připraveného roztoku bylo na přípravu pufru odebráno 40 ml.

##### 3.4.2.2 Příprava pracovního roztoku TBE (1 x TBE)

Ze zásobního roztoku TBE bylo odebráno 100 ml a doplněno v odměrné baňce vodou na 1 litr. Do 1 litru 1 x TBE bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  připraveného roztoku ethidium bromidu.

### **3.4.3 Příprava 0,7% agarózového gelu**

Do 500 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 2,1 g agarózy. Agaróza byla zalita 300 ml pracovního TBE pufru bez ethidium bromidu a dokonale rozpuštěna v mikrovlnné troubě při výkonu 40 %. Po zchladnutí přibližně na 60 °C bylo odměřeno 30, 40 nebo 65 ml agarózy (podle rozměrů vaničky) a přidáno 3, 4, nebo 6,5 µl roztoku ethidium bromidu o koncentraci 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Takto připravený roztok agarózy byl nalit do vyvážené vaničky a byl do něj vložen hřebínek na vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po 30-ti min tuhnutí při pokojové teplotě a dalších 30-ti min v lednici je gel připraven k detekci amplifikovaných fragmentů.

### **3.4.4 Příprava délkového standardu o délce 100 bp**

Bylo smícháno 1,6 µl roztoku 100 bp a 2,5 µl délkového pufru. Vše bylo doplněno do 15 µl sterilní deionizovanou vodou.

### **3.4.5 Příprava délkového standardu o délce 20 bp**

Bylo smícháno 1,25 µl roztoku 100 bp a 2,5 µl délkového pufru. Vše bylo doplněno do 15 µl sterilní deionizovanou vodou.

### **3.4.6 Průběh elektroforézy**

Připravený gel s vaničkou byl přenesen do elektroforetické komory a byl přelit 1 x TBE pufrem obsahujícím ethidium bromid. Poté byly do jamek napipetovány vzorky DNA smíchané se vzorkovým pufrem. Aparatura byla překryta víkem a byl spuštěn zdroj proudu. Po elektroforéze byly analyzované fragmenty DNA zviditelněny ozářením UV světlem v transiluminátoru a vyfoceny v programu Scion Image. Hledané fragmenty DNA byly porovnány s délkovým standardem. Délka fragmentů amplifikované DNA kvasinek je 1320 bp.

#### ***3.4.6.1 Podmínky elektroforézy***

Elektroforéza probíhala v horizontálním uspořádání v 0,7 % agarózovém gelu a v 1xTBE pufrem. Délkový standard byl smíchán se vzorkovým pufrem (délkový standard:vzorkový pufr = 4:1) a na gel bylo aplikováno 5 µl této směsi. 10 µl každého analyzovaného vzorku bylo smícháno se 2 µl vzorkového pufru a 10 µl této směsi bylo napipetováno na gel. Pro porovnání délek fragmentů byly do dvou jamek naneseny délkové standardy o velikostech 20 a 100 bp. Fragmenty DNA byly děleny při konstantním napětí 80 V po dobu dvou hodin.

### **3.5 Restrikční analýza s PCR produkty**

#### **3.5.1 Příprava 3 M octanového pufru**

2,46 g CH<sub>3</sub>COONa bylo naváženo do kádinky a rozpuštěno v destilované vodě. Pomocí HCl bylo upraveno pH roztoku na 5,5. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky 10 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Připravený 3 M octanový pufr byl před použitím uchováván při teplotě 4 °C.

#### **3.5.2 Úprava PCR produktu pro restrikční analýzu**

Do mikrozkušavky bylo napipetováno 20 µl amplifikované DNA (PCR produktu). Po přidání 2 µl octanového pufru byla směs promíchána. Dále bylo přidáno 60 µl čistého ethanolu vychlazeného na -20 °C. Směs v mikrozkušavce byla důkladně zvortexována a centrifugována při 4 °C a 15 000 otáčkách po dobu 30-ti minut. Supernatant byl dekantován a ke sraženině bylo přidáno 60 µl 80 % ethanolu vychlazeného na -20 °C a znovu byla provedena centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl opět dekantován a zbytky ethanolu byly odsáty v exsíkátoru během 30-ti minut. Tímto způsobem byl získán vzorek pro restrikční analýzu.

#### **3.5.3 Restrikční analýza**

K přečištěné a vysušené DNA bylo přidáno 13 µl destilované vody, 1,5 µl restrikčního pufru a 0,5 µl restrikční endonukleázy. Tato směs byla ponechána v termocykléru 16 hodin při teplotě 37 °C, poté byla teplota zvýšena na 65 °C po dobu 20-ti minut, aby došlo k inaktivaci enzymu. Směsi vzniklých restrikčních fragmentů všech analyzovaných vzorků byly uschovány při teplotě -20 °C, popř. byly ihned identifikovány elektroforézou v agarózovém gelu.

#### **3.5.4 Detekce restrikčních fragmentů pomocí elektroforézy**

##### **3.5.4.1 Příprava 2% agarózového gelu**

6 g agarózy bylo naváženo do 500 ml Erlenmayerovy baňky a zalito 300 ml pracovního TBE pufru bez ethidium bromidu. a dokonale rozpuštěna v mikrovlnné troubě při výkonu 40 %. Po zchladnutí přibližně na 60 °C bylo odměřeno 30, 40 nebo 65 ml agarózy (podle rozměrů vaničky) a přidáno 3, 4 nebo 6,5 µl roztoku ethidium bromidu. Takto připravený roztok agarózy byl nalit do vyvážené vaničky a byl do něj vložen hřebínek na vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Po 30-ti min tuhnutí při pokojové teplotě a dalších 30-ti min v lednici je gel připraven k detekci po restrikční analýze.

#### ***3.5.4.2 Postup a podmínky elektroforézy***

Elektroforéza probíhala v horizontálním uspořádání v 2% agarózovém gelu a v 1 x TBE pufru. K 10  $\mu$ l každé směsi restrikčních fragmentů byly přidány 2  $\mu$ l vzorkového pufru a 10  $\mu$ l takto vzniklého roztoku bylo napipetováno na gel. Do jedné z jamek byl nanesen kontrolní vzorek DNA po amplifikaci (pozitivní kontrola). Pro porovnání délek restrikčních fragmentů byl do dvou jamek aplikovány také délkové standardy o velikostech 20 a 100 bp. Fragmenty DNA byly děleny při konstantním napětí 80 V po dobu 2 hod a poté zviditelněny ozářením UV světlem v transiluminátoru a vyfoceny v programu Scion Image.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Účelem této diplomové práce bylo potvrdit identifikaci kvasinek odebraných z listů stromů, užitím metody PCR-RFLP. Experimentální část zahrnovala následující kroky:

- 1) výběr vhodného postupu izolace DNA z kvasinek kolonizujících povrchy listů
- 2) optimalizace podmínek pro aplikaci metody PCR, amplifikace specifického úseku DNA
- 3) RFLP analýza s několika druhy restričních enzymů
- 4) srovnání elektroforeogramů a zhodnocení výsledků

### 4.1 Izolace DNA z kvasinek kolonizujících povrchy listů

Vzorky jednotlivých kvasinek odebraných z povrchu listů lesních i ovocných stromů, byly získány ze sbírky kvasinek Chemického ústavu SAV v Bratislavě. Obdržené preparáty byly předem identifikovány na základě fyziologických a morfologických testů. Metoda PCR-RFLP měla posloužit k molekulární diagnostice a k potvrzení správnosti taxonomického zařazení.

Pro izolaci DNA bylo nutné získané vzorky kvasinek, uchovávané na šikmých agarech, nakultivovat na Petriho miskách. Délka kultivace na sladidlovém agaru byla asi 10 dní.

K izolaci DNA (část 3.2.1) byla využita komerční soustava DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories). Tímto způsobem bylo získáno 50  $\mu$ l roztoku mikrobiální rDNA připravené k dalším analýzám.

### 4.2 Aplikace metody PCR

Pomocí polymerázové řetězové reakce byl získán specifický fragment DNA kvasinek v dostatečném množství pro analýzu RFLP.

#### 4.2.1 Použité primery

V rámci optimalizace metody PCR byla DNA amplifikována s použitím několika druhů primerů. Nejprve byly použity primery SC<sub>1</sub> a SC<sub>2</sub>. Primer SC<sub>1</sub> (U) leží v oblasti NTS<sub>2</sub> (Non Transcribed Spacer), zatímco primer SC<sub>2</sub> (L) pochází z oblasti ETS (External Transcribed Spacer). Jejich sekvence je následující:

SC<sub>1</sub> - 5' - AAC GGT GCT TTC TGG TAG -3'

SC<sub>2</sub> - 5' - TGT CTT CAA CTG CTT T - 3'

Tato kombinace primerů se však pro amplifikaci DNA testovaných druhů kvasinek neosvědčila a byly tedy použity další sady primerů a to SC<sub>1</sub>, SC<sub>4</sub> a SC<sub>2</sub>, SC<sub>3</sub>. Výsledky po amplifikaci byly v obou případech opět neuspokojivé. [25]

S pomocí literárních zdrojů byla nalezena další varianta primerů vhodná pro PCR DNA použitých kvasinek. Jednalo se o primery ITS<sub>1</sub> a ITS<sub>4</sub>, které mají sekvenci:

ITS<sub>1</sub> 5'- TCCGTAGGTGAACC GCGG-3'  
ITS<sub>4</sub> 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

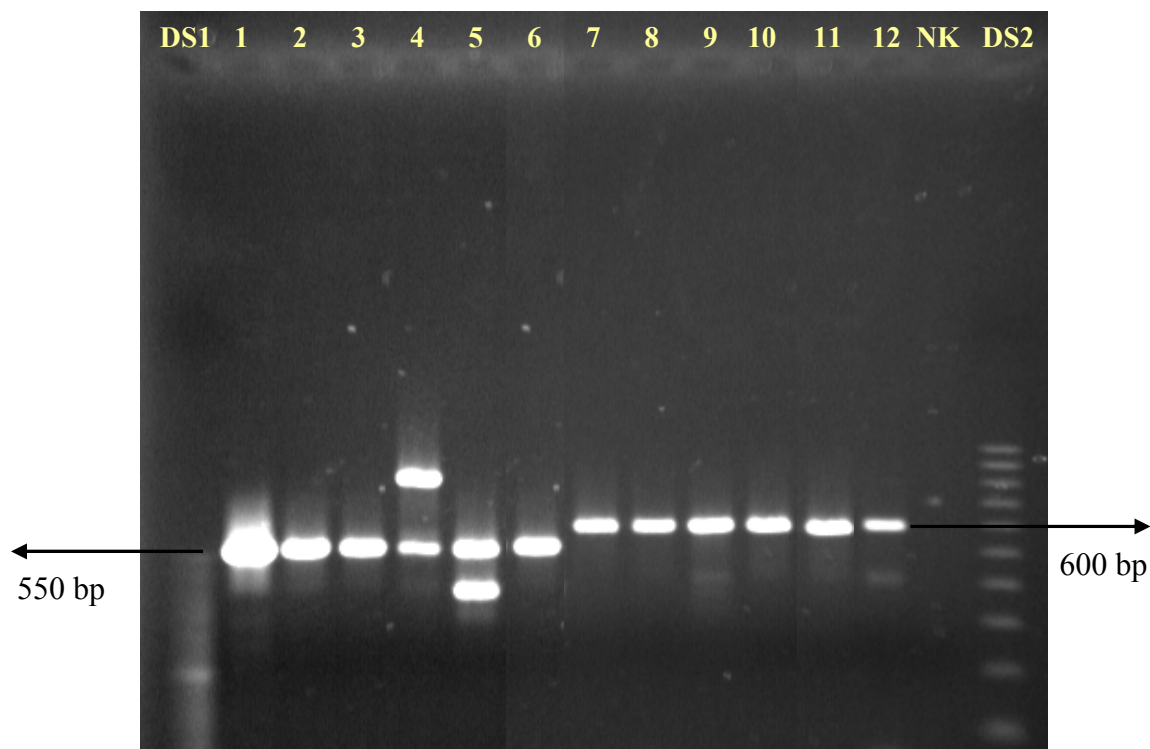
Tyto primery se prokázaly jako vhodné pro testované druhy kvasinek a byly použity pro amplifikaci DNA metodou PCR. [30, 41, 42, 43]

#### 4.2.2 Způsob a provedení PCR

DNA získaná izolací z kvasinek byla vysoce koncentrovaná. Vzhledem k tomu, že vysoké koncentrace DNA mohou vést k negativním výsledkům při PCR, bylo nezbytné izolovanou DNA pro mastermix 50krát naředit.

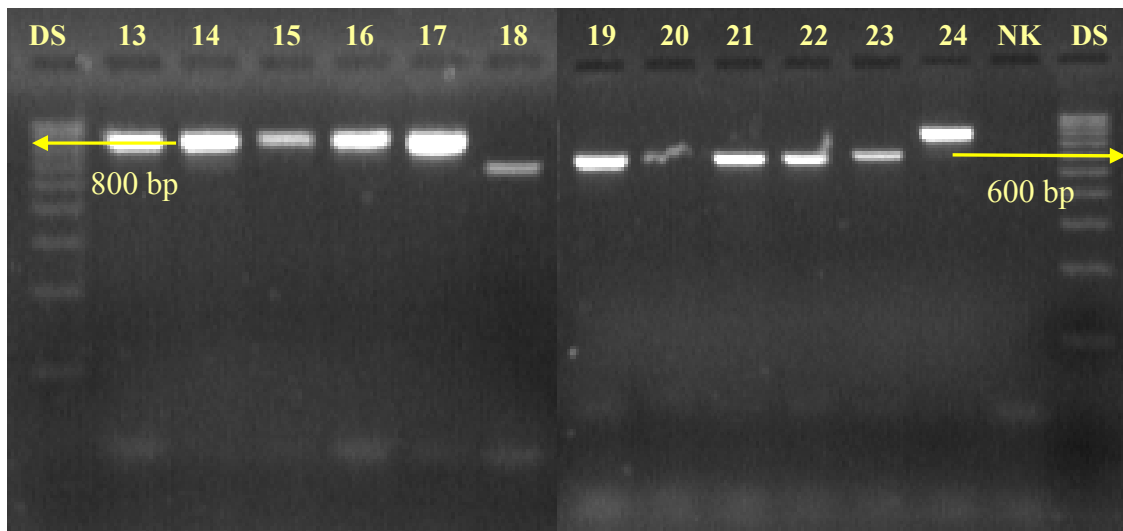
Po přibližně dvou hodinách teplotně řízeného procesu v termocykléru byla amplifikace skončena.

Namnožení segmentu a správné provedení PCR bylo ověřeno elektroforeticky v 0,7% agarosovém gelu. Při kontrole byly kromě PCR produktů na gel aplikovány i délkový standard a negativní kontrola, která v mastermixu při amplifikaci obsahovala místo DNA sterilní deionizovanou vodu (viz obrázky 10 a 11).



Obr. 10: Elektroforeogram po PCR:

DS1 – délkový standard 20 bp, 1 – 5 *Cryptococcus laurentii*, 6 – *Cryptococcus laurentii* typový, 7 – 10, 12 *Rhodotorula glutinis*, 11 – *Rhodotorula glutinis* typový, NK – negativní kontrola, DS2 - délkový standard 100 bp



Obr. 11: Elektroforeogram po PCR:

DS – délkový standard 100 bp, 13 – 17 *Saccharomyces cerevisiae*, 18 – 21 *Rhodotorula glutinis*, 22 – *Rhodotorula glutinis* typový, 23 – *Rhodotorula mucilaginosa*, 24 – *Saccharomyces cerevisiae* typový, NK – negativní kontrola, DS – délkový standard 100 bp

Na elektroforeogramech po PCR je zřetelné, že u kvasinek *Cryptococcus laurentii* byl amplifikován fragment délky 550 bp, u kvasinek *Rhodotorula glutinis* fragment délky 600 bp a u *Saccharomyces cerevisiae* byl amplifikován fragment délky 800 bp. U vzorků číslo 4 a 5 se vyskytují dva fragmenty, což nasvědčuje tomu, že se jedná o směsné kultury.

### 4.3 RFLP analýza s restričními enzymy

Poté, co byla elektroforeticky ověřena účinnost polymerázové řetězové reakce, byla amplifikovaná DNA, po důkladném přečištění, použita pro restriční analýzu. Přečištění PCR produktů bylo nezbytné pro odstranění přebývajících složek mastermixu a pro získání čisté DNA. Jako účinné látky byly použity ethanol a octanový pufr. Takto získaná vysrážená a vysušená DNA byla vystavena působení celkem šesti různých restričních endonukleáz s různými cílovými sekvencemi (viz *tabulka 2*). [19, 40, 43, 44]

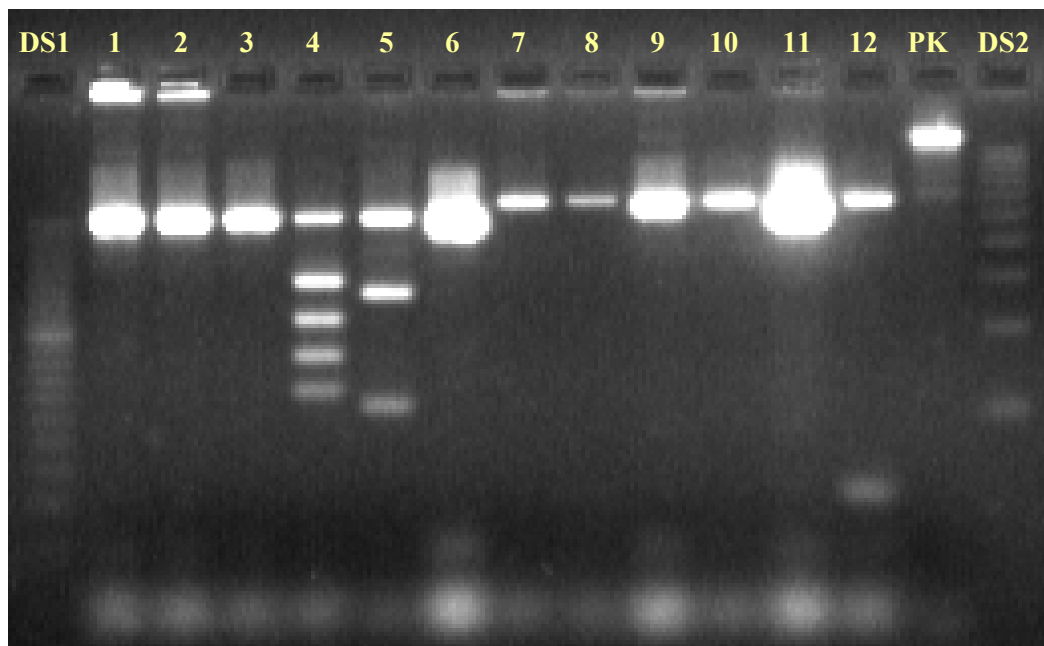
Pro digesci s jedním restričním enzymem bylo z reakční směsi po PCR odebráno 20  $\mu$ l. Ke vzorku DNA byla přidána sterilní deionizovaná voda, restriční pufr a restriční endonukleáza, která během 16-ti hodin při teplotě 37 °C rozštěpila amplifikovaný úsek na specifické délkové fragmenty, které byly detekovány elektroforézou ve 2 % agarózovém gelu a zviditelněny v transiluminátoru UV světlem.

Identifikace kvasinkových kmenů byla provedena na základě porovnání délek restričních fragmentů typových vzorků ze sbírky kvasinek CCY na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě s délkami restričních fragmentů testovaných vzorků.

*Tab. 2: Přehled použitých restričních endonukleáz*

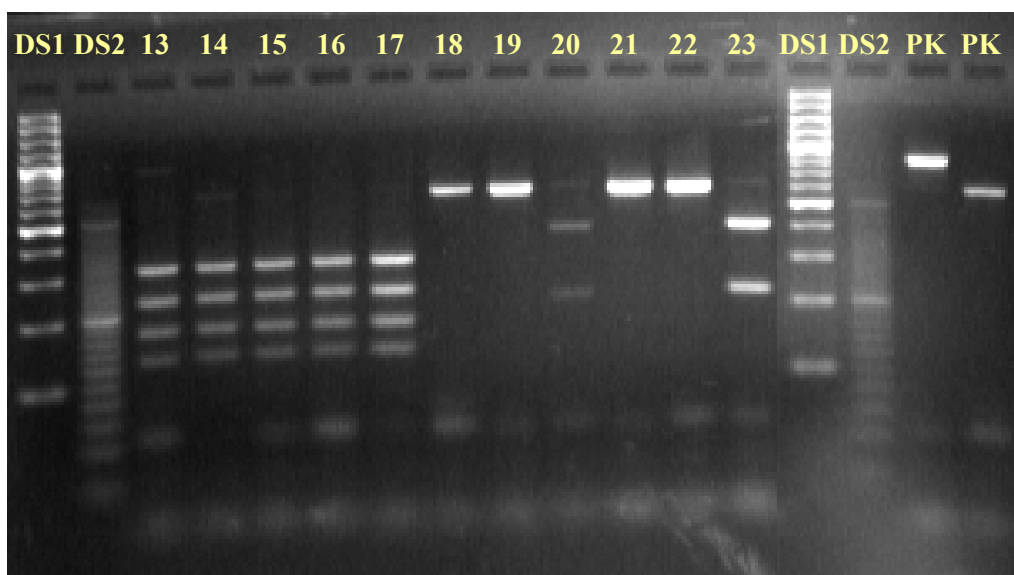
Název enzymu	Cílová sekvence
<i>Hin</i> I	G <sup>^</sup> ANTC
<i>Tru</i> I	T <sup>^</sup> TAA
<i>Taq</i> I	T <sup>^</sup> CGA
<i>Hha</i> I	G <sup>^</sup> CGC
<i>Hae</i> III	GG <sup>^</sup> CC
<i>Eco</i> 88I	C <sup>^</sup> YCGRG

### 4.3.1 Elektroforeogramy po restrikční analýze



Obr. 12: Elektroforeogram po digesci s enzymem HaeIII:

DS1 – délkový standard 20 bp, 1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, PK – pozitivní kontrola, DS2 - délkový standard 100 bp



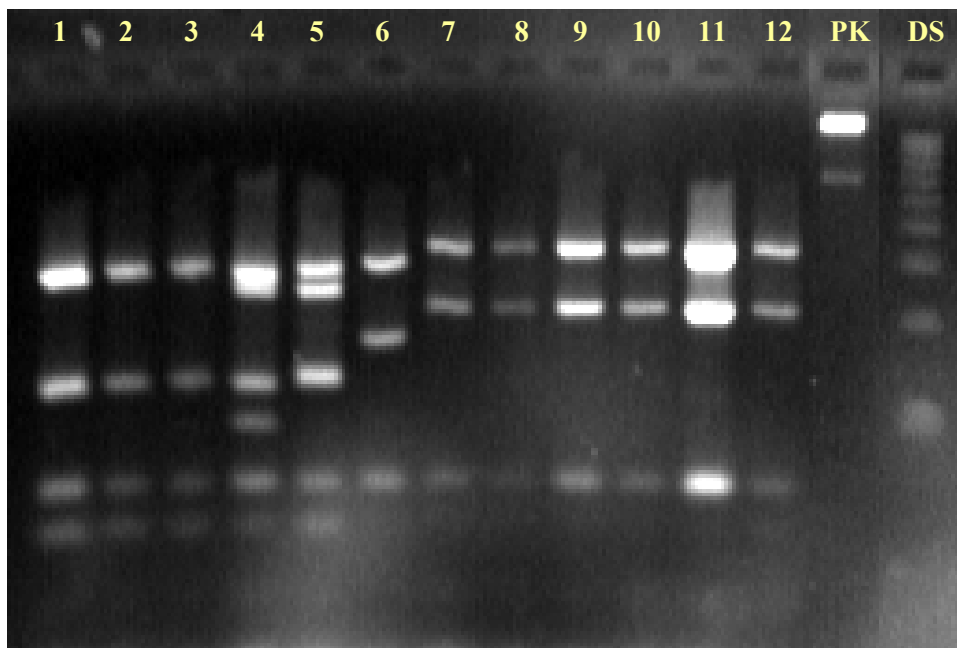
Obr. 13: Elektroforeogram po digesci s enzymem HaeIII:

DS1 – délkový standard 100 bp, DS2 – délkový standard 20 bp, 13 – 17 *Saccharomyces cerevisiae*, 18 – 22 *Rhodotorula glutinis*, 23 – *Rhodotorula mucilaginosa*, DS1, DS2, PK – pozitivní kontrola

Po restrikci enzymem *HaeIII* (viz obrázky 12, 13) u vzorků č. 1, 2, 3, 6 (*Cr. laurentii*) a 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 21, 22 (*Rh. glutinis*) nedošlo ke štěpení, to znamená, že fragment amplifikovaný pomocí primerů ITS1 a ITS4 neobsahuje sekvenci, kterou tento enzym specificky štěpí.

Výjimku tvoří vzorek č. 4, u kterého došlo k vytvoření čtyř štěpných míst a vzorek č. 5, kde jsou patrná dvě štěpná místa. U obou vzorků bylo elektroforetickou kontrolou amplifikace po PCR zjištěno, že se jedná o směsné kultury *Cr. laurentii* s jinými kmeny. Vzhledem k podobnosti fragmentů se lze domnívat, že u vzorku č. 4 se jedná o kontaminaci druhem *S. cerevisiae* a u vzorku č. 5 o kontaminaci druhem *Rh. mucilaginosa*.

K odlišné fragmentaci došlo také u vzorku č. 20, kde jsou patrná dvě štěpná místa shodná se vzorkem č. 23, který byl identifikován jako *Rh. mucilaginosa*. Vzorky č. 13, 14, 15, 16, 17 mají shodná čtyři restrikční místa.

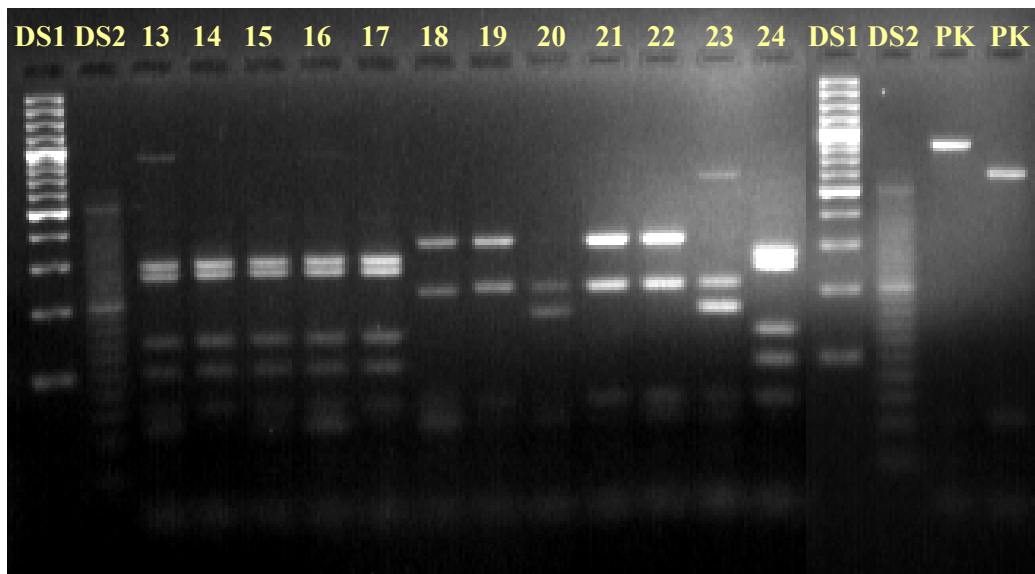


Obr. 14: Elektroforeogram po digesci s enzymem *TaqI*:

1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, PK – pozitivní kontrola, DS - délkový standard 100 bp

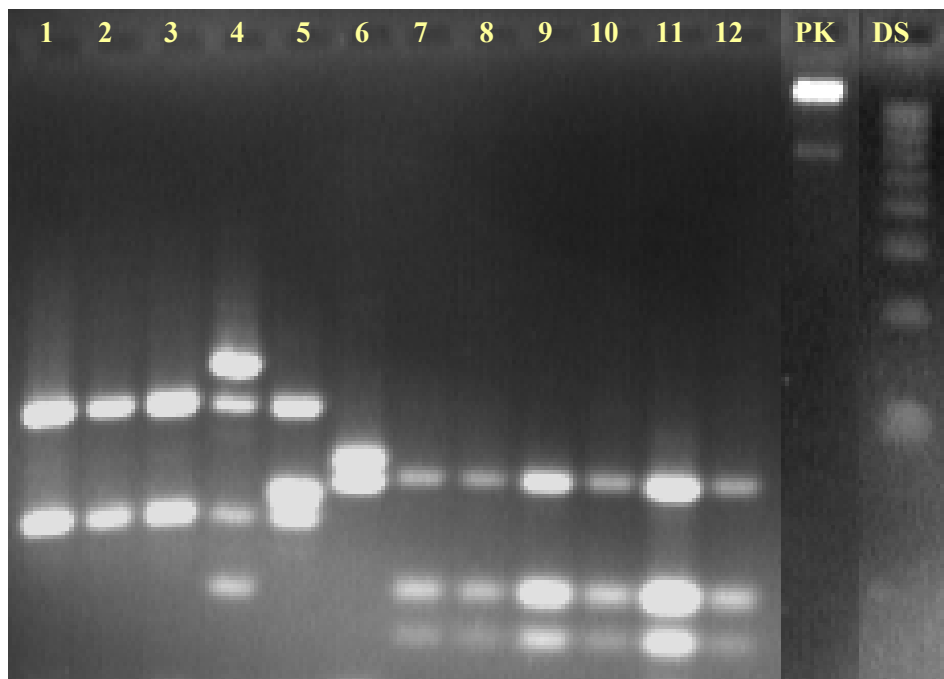
V případě enzymu *TaqI* (viz obrázky 14, 15) lze díky fragmentaci opět vidět zřetelné odlišení všech tří rodů testovaných kvasinek. Odlišné počtem fragmentů jsou opět vzorky č. 4 a 5 (kde se jedná o směsnou kulturu). Vzorek č. 6, přesto že se jedná o typovou kulturu, má odlišnou délku kratšího fragmentu, než ostatní vzorky *Cr. laurentii*.

Vzorek č. 20 se liší od ostatních vzorků *Rh. glutinis* a jeho fragmentace je opět téměř shodná se vzorkem č. 23, z čehož plyne, že původní zařazení jako *Rh. glutinis* je pravděpodobně nesprávné. Všechny vzorky *S. cerevisiae* mají shodně čtyři restrikční místa.



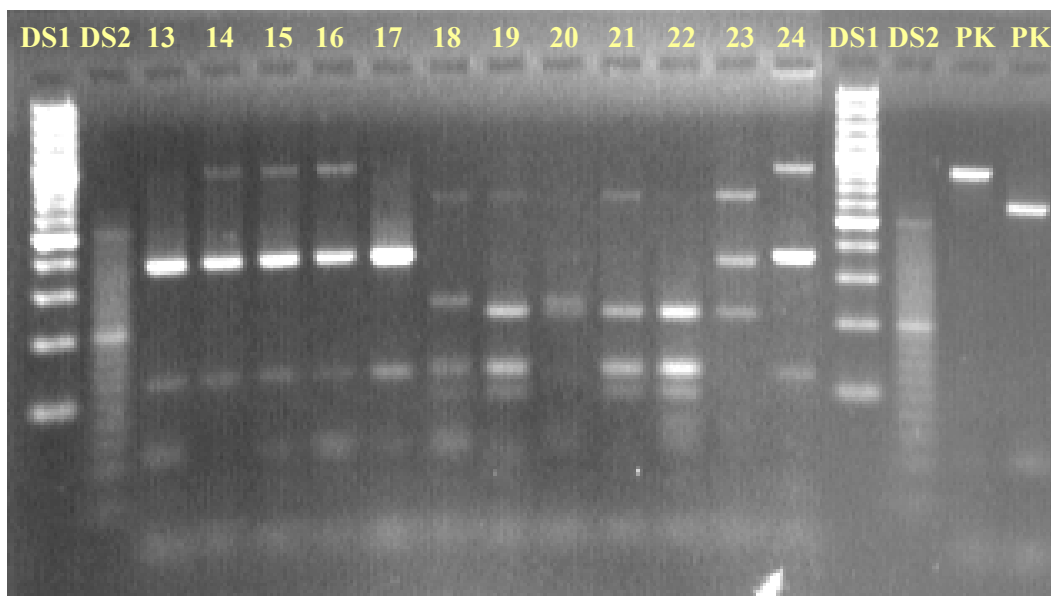
Obr. 15: Elektroforeogram po digesci s enzymem TaqI:

DS1 – délkový standard 100 bp, DS2 – délkový standard 20 bp, 13 – 17 *Saccharomyces cerevisiae*, 18 – 22 *Rhodotorula glutinis*, 23 – *Rhodotorula mucilaginosa*, 24 – *Saccharomyces cerevisiae*, DS1, DS2, PK – pozitivní kontrola



Obr. 16: Elektroforeogram po digesci s enzymem HinfI:

1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, PK – pozitivní kontrola, DS - délkový standard 100 bp



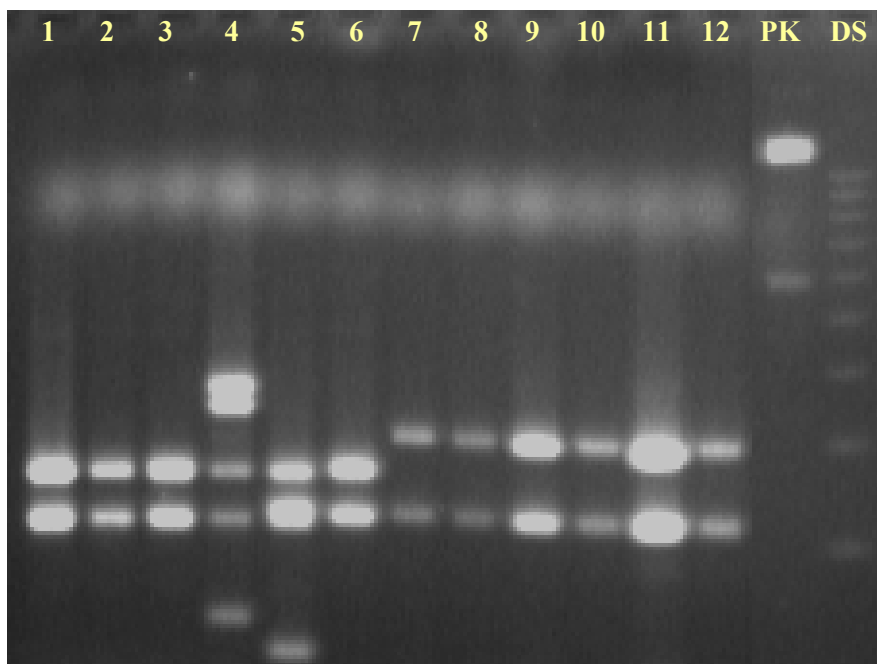
Obr. 17: Elektroforeogram po digesci s enzymem *HinfI*:

*DS1* – délkový standard 100 bp, *DS2* – délkový standard 20 bp, 13 – 17 *Saccharomyces cerevisiae*, 18 – 22 *Rhodotorula glutinis*, 23 – *Rhodotorula mucilaginosa*, 24 – *Saccharomyces cerevisiae*, *DS1*, *DS2*, *PK* – pozitivní kontrola

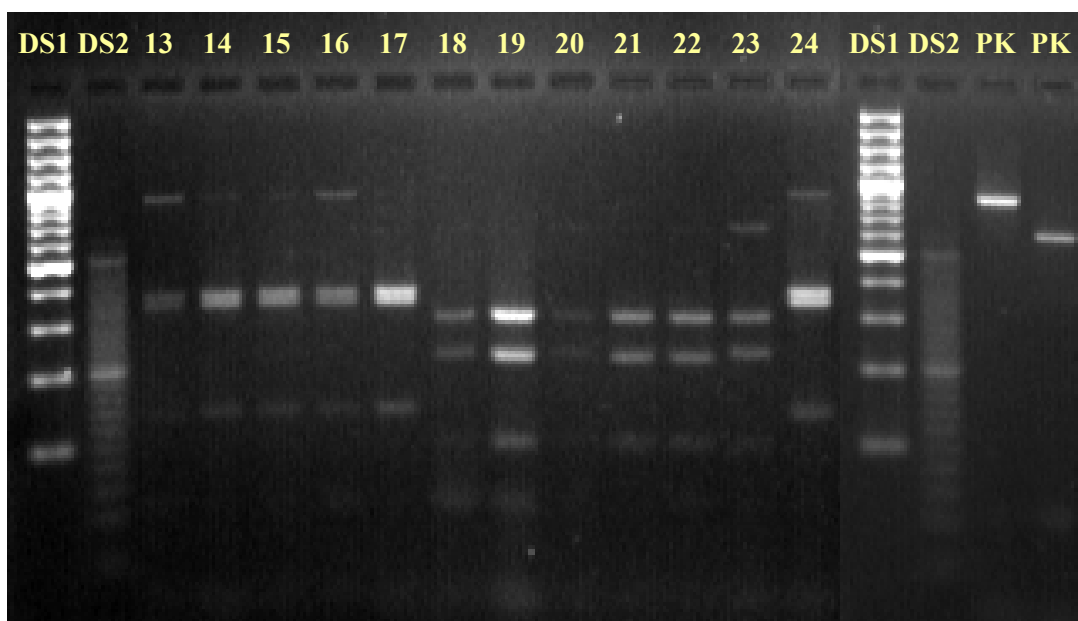
Po digesci s enzymem *HinfI* (viz obrázky 16, 17) se ze skupiny vzorků *Cr. laurentii* opět zřetelně liší vzorky č. 4, 5 a i typový vzorek č. 6., z čehož jednoznačně plyne potřeba revize taxonomického zařazení této kvasinky.

Všechny vzorky *Rh. glutinis* mají tři shodná štěpná místa, výjimku tvoří vzorek č. 20, který v tomto případě není jednoznačně shodný se vzorkem č. 23, ale ani se vzorky *Rh. glutinis*. Vzorky *S. cerevisiae* tvoří se dvěmi štěpnými místy totožnou skupinu.

Působením enzymu *HhaI* (viz obrázky 18, 19) se u většiny vzorků vytvořily dvě charakteristická štěpná místa. Odlišné fragmenty tvoří pouze vzorky č. 4 a 5 stejně jako u všech restrikčních endonukleáz. Je zajímavé, že v tomto případě se typový vzorek č. 6 shoduje s ostatními vzorky zařazenými jako *Cryptococcus laurentii*.



Obr. 18: Elektroforeogram po digesci s enzymem *HhaI*:  
 1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, PK – pozitivní kontrola,  
 DS - délkový standard 100 bp



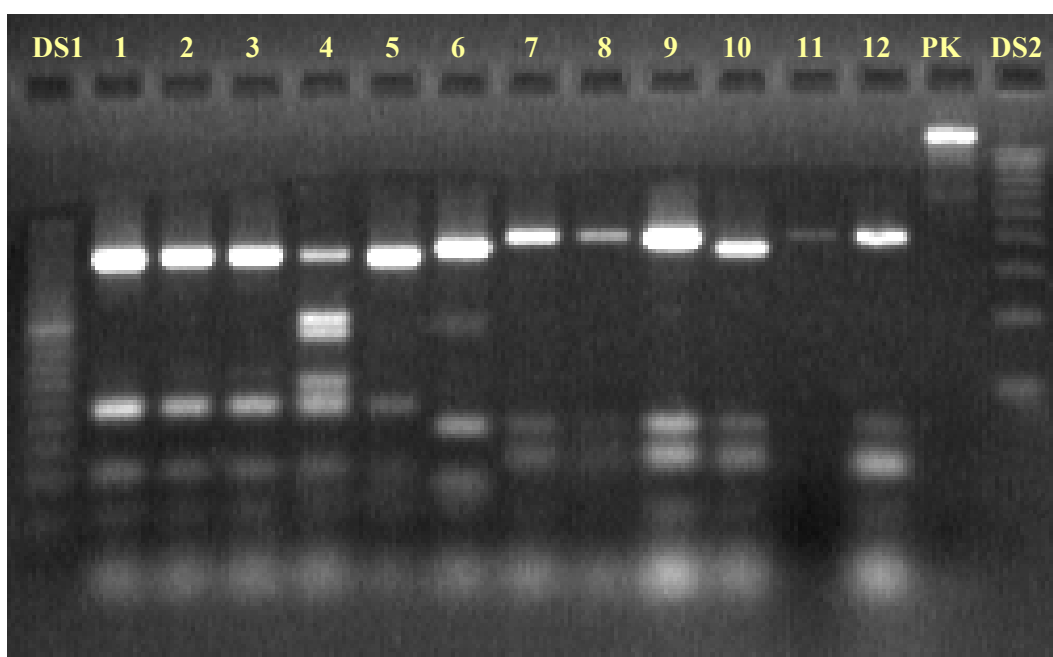
Obr. 19: Elektroforeogram po digesci s enzymem *HhaI*:  
 DS1 – délkový standard 100 bp, DS2 – délkový standard 20 bp, 13 – 17  
*Saccharomyces cerevisiae*, 18 – 22 *Rhodotorula glutinis*, 23 – *Rhodotorula*  
*mucilaginosa*, 24 – *Saccharomyces cerevisiae*, DS1, DS2, PK – pozitivní kontrola

### 4.3.2 Další testované restriční endonukleázy

Pro získání informací o vhodnosti použití dalších restričních enzymů, byly provedeny digesce s enzymy *TruI* a *Eco88I* pouze u prvních dvanácti vzorků, a to z omezených časových důvodů.

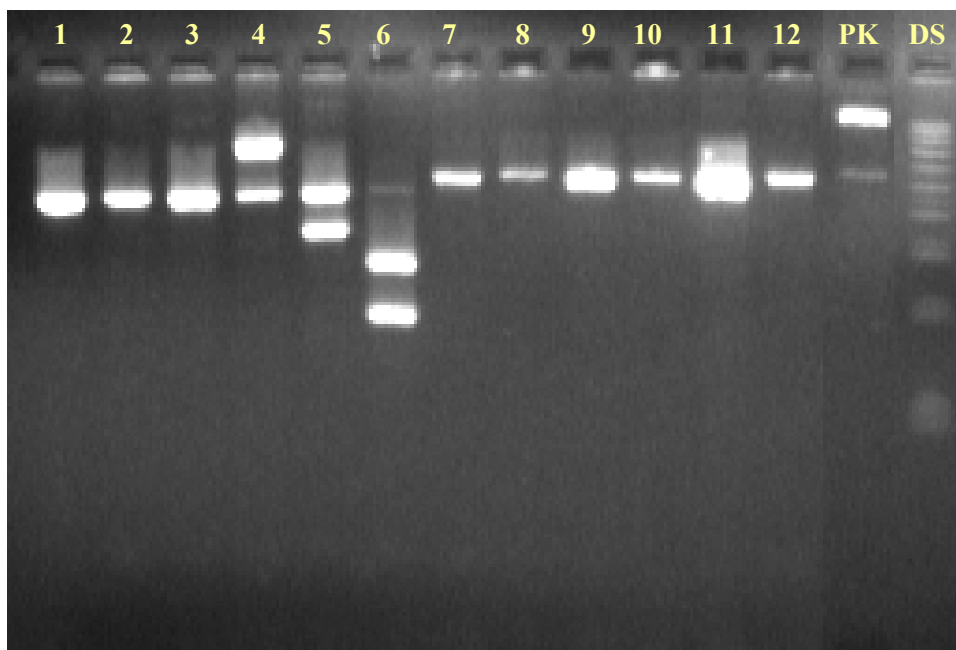
Použitím enzymu *TruI* (viz obrázek 20) dochází k odlišnému štěpení u vzorků č. 4 a č. 6 (typový), u ostatních vzorků dochází ke štěpení na 3 fragmenty a je možné i tímto enzymem odlišit rody *Cryptococcus* a *Rhodotorula*.

U enzymu *Eco88I* (viz obrázek 21) byla situace odlišná. Ke štěpení docházelo pouze u vzorku č. 6. Ostatní vzorky neobsahovaly specifickou štěpnou sekvenci. Odlišná fragmentace u typového vzorku č. 6 opět poukazuje na možnost nepřesné původní identifikace a zařazení kvasinky. Tento enzym není vhodný k odlišení testovaných rodů.



Obr. 20: Elektroforeogram po digesci s enzymem *TruI*:

*DS1* – délkový standard 20 bp, 1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, *PK* – pozitivní kontrola, *DS2* - délkový standard 100 bp



Obr. 21: Elektroforeogram po digesci s enzymem *Eco88I*:  
 1 – 6 *Cryptococcus laurentii*, 7 – 12 *Rhodotorula glutinis*, PK – pozitivní kontrola,  
 DS - délkový standard 100 bp

#### 4.4 Vyhodnocení restrikční analýzy

Aplikací metody PCR-RFLP měla být potvrzena původní identifikace izolátů kvasinek, která byla stanovena na základě fyziologických a morfologických vlastností. Analyzováno bylo 24 vzorků obsahujících tři rody (viz příloha 1), které zahrnovaly také typovou kulturu pro každý rod. Ta sloužila ke srovnávání restrikčních fragmentů jednotlivých vzorků po digesci s restrikčními endonukleázami a ke snadnějšímu zhodnocení výsledků (viz příloha 2).

První skupina zahrnovala šest vzorků *Cryptococcus laurentii* včetně typového vzorku. Již po elektroforetické kontrole po PCR bylo zřejmé, že u vzorků č. 4 a 5 se nejedná o čistou kulturu, ale směsnou kulturu *Cryptococcus laurentii* s dalším kmenem. Restrikční analýzy tento předpoklad potvrdily. Z časových důvodů však nebylo možné tyto vzorky přesněji identifikovat. Odlišná fragmentace také byla pozorována u typové kultury *Cr. laurentii*, která se od ostatních tří vzorků ze skupiny lišila délkou i počtem fragmentů s jednou výjimkou u všech digescí. Z toho lze usoudit, že je nutná revize původního zařazení této kvasinky.

Druhou skupinu tvořily druhy *Rhodotorula glutinis* a *Rhodotorula mucilaginosa*. Z elektroforeogramů po restrikčních analýzách bylo zjištěno, že u vzorku č. 20 se nejedná o druh *Rh. glutinis*. Vzhledem ke shodnosti fragmentace se vzorkem č. 23 označeným jako *Rh. mucilaginosa* jej však lze zařadit také jako druh *Rh. mucilaginosa*.

Třetí skupinou byl druh *Saccharomyces cerevisiae*. U všech šesti vzorků byla shodná fragmentace s typovým vzorkem, což svědčí o správném taxonomickém zařazení.

## 5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na srovnání dvou způsobů identifikace kmenů kvasinek kolonizujících povrchy listů, a to identifikace na základě fyziologických a morfologických vlastností kvasinek a identifikace založené na DNA diagnostice. K dispozici bylo 24 vzorků kvasinek, které byly taxonomicky zařazeny na základě první metody identifikace. K potvrzení či vyvrácení tohoto zařazení byla aplikována molekulárně-biologická metoda PCR-RFLP.

Samotné analýze předcházela kultivace kvasinek na živných médiích a postupy izolace kvasničné DNA. Princip metody PCR, která poté následovala, spočívá v mnohonásobné amplifikaci specifického nekódujícího úseku rDNA. Tento úsek byl po důkladném zbavení možných nečistot vystaven analýze RFLP s několika druhy restričních endonukleáz, které specificky rozštěpily amplifikovaný úsek DNA na charakteristické fragmenty. Tyto fragmenty byly poté vzájemně porovnávány, což vedlo k získání výsledků, které jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Vzorky byly odebrány z povrchů listů a jehličí a byly rozděleny do dvou skupin podle toho, zda se jednalo o stromy lesní či ovocné. Rod *Rhodotorula* se vyskytuje na obou typech stromů a patří mezi v přírodě se nejčastěji vyskytující kvasinky. Rod *Cryptococcus* byl izolován pouze z lesních stromů a naopak rod *Saccharomyces* pouze ze stromů ovocných. Z toho lze usuzovat, že listy ovocných stromů jsou kolonizovány kvasinkami zkvašujícími sacharidy (ovoce) více, než kvasinkami basidiomycetními.
2. Polymerázové řetězové reakci předcházela izolace DNA jednotlivých vzorků kvasinek. Tato DNA byla poté využita k amplifikaci druhově specifického fragmentu o velikosti 550 bp u *Cryptococcus laurentii*, 600 bp u *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a 800 bp u *Saccharomyces cerevisiae*.
3. V rámci optimalizace metody PCR bylo nezbytné navrhnout a otestovat nejvhodnější primery. Po třech neúspěšných amplifikacích s použitím kombinací primerů SC<sub>1</sub> - SC<sub>2</sub>, SC<sub>1</sub> - SC<sub>4</sub> a SC<sub>2</sub> - SC<sub>3</sub>, se jako nejvhodnější, plně amplifikující primery osvědčily ITS<sub>1</sub> a ITS<sub>4</sub>.
4. Elektroforetická kontrola průběhu amplifikace po PCR a následné restriční analýzy prokázaly, že v případě dvou vzorků zařazených jako *Cr. laurentii* se jedná o směsné kultury *Cr. laurentii* s jiným druhem, který z časových důvodů nebylo možné blíže identifikovat. Předpokládáme však, že se jedná o kontaminaci *S. cerevisiae* a *Rh. mucilaginosa*.
5. K analýze PCR-RFLP sloužilo 24 vzorků kvasinek, zahrnující tři odlišné rody, z nichž každý rod měl pro srovnání restričních map typovou kulturu. Typová kultura druhu *Cryptococcus laurentii* podávala po restričních analýzách odlišné výsledky než ostatní vzorky zařazené do stejného druhu, což vede k závěru, že tato typová kultura je nepřesně taxonomicky zařazená a je možné, že se jedná o jiný druh rodu *Cryptococcus*, případně jiný rod.

6. Analýzou PCR-RFLP bylo dále zjištěno, že vzorek identifikován jako *Rhodotorula glutinis* tvoří odlišné fragmenty jako typová kultura i jako ostatní vzorky tohoto druhu, naopak tvoří stejné restriční fragmenty jako *Rhodotorula mucilaginosa* a lze tedy usuzovat, že se jedná také o *Rh. mucilaginosa* a původní identifikace byla nepřesná.
7. U vzorků kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byla bez výjimky potvrzena původní identifikace a taxonomické zařazení.
8. Metodou PCR-RFLP byla potvrzena identifikace kvasinek u 20 vzorků. U zbývajících čtyř vzorků byla identifikace na základě klasických metod nesprávná či nepřesná. To poukazuje výhody PCR-RFLP, kterými jsou přesnost, jednoduchost, časová nenáročnost, což také poukazuje na široké využití této metody.
9. Použitelnost PCR-RFLP se odvíjí pouze od výběru primerů, jak už bylo zmiňováno a také restričních enzymů. Z použitých šesti endonukleáz se jako nejvhodnější pro naše účely prokázaly *TaqI* a *HinfI*. Naopak jako méně vhodný byl označen enzym *Eco88I* z toho důvodu, že fragment amplifikovaný pomocí primerů ITS<sub>1</sub> a ITS<sub>4</sub>, ve většině případů, neobsahuje sekvenci, kterou tento enzym specificky štěpí a k restrikci téměř nedocházelo.

## 6. POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Kocková-Kratochvílová, A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmů*. 1. vydání. Vydavatelství Alfa Bratislava, 1990. 66-70 s. ISBN 80-05-00644-6
- [2] Kocková, A., Kratochvílová: *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1.vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 488 s.
- [3] Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře*. 3. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 19-21, 57-83, 294-295, 303-305 s. ISBN 80-200-1024-6
- [4] Rozsypal, S. a kolektiv autorů: *Nový přehled biologie*. Praha: Scienta spol.s.r.o., 2003. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [5] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. opravené vydání (soubor) Praha: Academie 1999. ISBN 80-200-0438-6.
- [6] Šmarda, J.: *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1
- [7] Demnerová, K.: *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. 3.vyd. přepracované Praha: VŠCHT, 2001. 179 s. ISBN 80-7080-415-7.
- [8] Rozsypal, S.: *Úvod do molekulární biologie díl první*. 1.vyd. Brno: Stanislav Rozsypal, 1996. 304 s.
- [9] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.: *Bioanalytické metody*. 3.vyd. přepracované Praha: VŠCHT, 2001. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [10] Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, V.: *Genové inženýrství*. 1.vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [11] Klouda, P.: *Základy biochemie*. 1.vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2000. ISBN:80-86369-00-5.
- [12] Dlačny, D., Tornai-Lehoczki, J., Péter, G.: *Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification*. System. Appl. Microbiol., 2003,22, 445-453 p.
- [13] Boeckhout, T., Robert, V.: *Yeast in food*. Cambridge England: Woodhead publishing limited, 2003. ISBN 0-8493-1926-9.

- [14] Hiero, N., Gonzáles, Á., Mas, A., Guillamón, J.M.: *New PCR-based methods for yeast identification*. Journal of Applied Mikrobiology, 2004, 97, 792-801 p.
- [15] Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. 1.vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 348 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [16] Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y.: *Saccharomyces sensu stricto: Systematics, genetic Diversity and Evolution*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, Vol.96, No. 1, 1-9 p.
- [17] Nečas, O., Streiblová, E., Vondrejs, V.: *Buněčný cyklus mikroorganismů*. 1. vyd. Praha: Academia, 1981. 252 s.
- [18] Perpéte, P., Van Cutsem, P., Boutte, C., Colson-Corbisier, A.-M., Collin, S.: *Amplified fragment-length polymorphism, a new method for analysis of brewer's yeast DNA polymorphism*. American Society of Brewing Chemists 59. 195-200 s. 2001.
- [19] Sláviková, E., Vadkertiová, R., Vránová, D.: *Yeasts colonizing the leaves of fruit trees*. Annals of Microbiology, 2009, Vol.59 (3), 419-424 p.
- [20] Vaughan-Martini, A.: *Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology and medicine*. Int Microbiol 6. 175-182 s. 2003.
- [21] Las Heras-Vazquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M., Rodriguez-Vico, F.: *Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers*. FEMS Yeast Research 3. 3-9 s. 2003.
- [22] Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G., Dellaglio, F.: *Rapid identification and differentiation of Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus and their hybrids by multiplex PCR*. Letters in Applied Microbiology 38. 239-244 s. 2004.
- [23] Bílková, K., Králová, B.: *Izolace biomakromolekul*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 1997. 142, 159 s. ISBN 80-7080-288-X.
- [24] Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Querol, A.: *Analysis of the genetic variability in the species of the Saccharomyces sensu stricto complex*. Yeasts 20. 1213-1226 s. 2003.

- [25] Nguyen, H.V., Gaillardin, C.: *Two subgroups within the Saccharomyces bayanus species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-Transcribed Spacer 2 in the ribosomal DNA unit*. System. Appl. Microbiol. 20. 186 - 294 s. 1997.
- [26] Meyer, R.: *PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components*. Leubesm.-Wiss.u.-Technol 29. 1-9 s. 1996.
- [27] *Your Complete Guide for DNA Separation and Analysis*. Příručka firmy FMC. BioProducts, Rockland.
- [28] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2.vyd. upravené a doplněné Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [29] Walker, J.M., Rapley, R.: *Molecular biology and biotechnology*. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 563 p. ISBN 0-85404-606-2.
- [30] Leaw, S.N., Chang, H. Ch.: *Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. Vol. 44, No. 3, 693-699 p.
- [31] <[http://genetika.wz.cz/rekombinantni\\_dna.htm](http://genetika.wz.cz/rekombinantni_dna.htm)>
- [32] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Roberts, K., Raff, M.: *Základy buněčné biologie*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s.r.o. ISBN 80-902906.
- [33] Špický, M.: *Genetika kvasiniek*. 1.vyd. Bratislava: Veda, 1992. 315 s. ISBN:80-224-0396-2.
- [34] Walker, G. M.: *Yeast Physiology and biotechnology*. Chichester John Wiley and Sons Ltd., 1998. 350 p. ISBN 0-471-96446-8.
- [35] Wuczkowski, M., Prillinger, H.: *Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria*. Microbiological Research 159. 263-275 s. 2004.
- [36] Newton, C.R., Graham, A.: *PCR*. Oxford: Bios Scientific Publisher Limited, 1994. 161 p. ISBN 1-872748-82-1.
- [37] Gadanho, M., Sampaio, J.P.: *Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus Rhodotorula: Rh. glutinis sensu stricto and Rh. dairenensis comb. nov.* FEMS Yeast Research 2, 2002. 47-58 p.

- [38] Heidenreich, M.: *Russet of Apple Fruit Caused by Aureobasidium pullulans and Rhodotorula glutinis*. The American Phytopathological Society, 1997. Vol. 81, No. 4. 337-342 p.
- [39] Chen, Y. C., Eisner, J.D.: *Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphism in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. Vol. 38, No. 6, 2302-2310 p.
- [40] Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., Typas, M.A.: *Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece*. Journal of Applied Microbiology, 2000. Vol. 89, 236-248 p.
- [41] Playford, E. G., Kong, F, Sun, Y, Wang, H.: *Simultaneous Detection and Identification of Candida, Aspergillus and Cryptococcus Species by Reverse Line Blot Hybridization*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. Vol. 44, No. 3, 876-880 p.
- [42] Petersen, K., Moller, P. L., Jespersen, L.: *DNA typing methods for differentiation of Debaryomyces hansenii strains and other yeasts related to surface ripened cheeses*. International Journal of Food Microbiology, 2001. Vol. 69, 11-24 p.
- [43] Espinosa, J. C., Fernandez-Gonzales, M., Ubeda, J., Briones, A.: *Identification of Wine Yeasts by PCR-RFLP without Previous Isolation on Plate*. Food Technol. Biotechnol., 2000. Vol. 40, 157-160 p.
- [44] Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A.: *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. Vol. 49, 329-337 p.
- [45] Egli, Ch. M., Heinick-Kling, T.: *Identification of Brettanomyces/Dekkera Species Based on Polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer Region*. Journal of Applied Microbiology, 2001. Vol. 98, 971-979 p.

Zdroje obrázků:

- [46] <[http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Biological\\_cell.svg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Biological_cell.svg)>
- [47] <<http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/mikrobiologie/Kvasinky.pdf>>
- [48] <<http://images.google.cz/images?hl=cs&lr=&um=1&q=rhodotorula+glutinis&sa=N&start=0&ndsp=21>>
- [49] <<http://robotika.cz/articles/gerda/en>>
- [50] <[http://www.merci.cz/katalog/life-science/1322\\_zarizeni-pro-elektroforezu](http://www.merci.cz/katalog/life-science/1322_zarizeni-pro-elektroforezu)>

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenin
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
ATP	adenosintrifosfát
C	cytosin
CCY	Czechoslovak Collection of Yeasts
CH <sub>3</sub> COONa	octan sodný
DNA	2-deoxyribonukleová kyselina
rDNA	ribosomální 2-deoxyribonukleová kyselina
dNTP	nukleotidy
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
ITS	internal transcribed spacer
G	guanin
HCl	kyselina chlorovodíková
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaOH	hydroxid sodný
NTS	non transcribed spacer
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	záporný logaritmus H <sub>3</sub> O
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	polymorfismus délek restričních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
SAV	Slovenská akademie věd
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
T	thymin
Taq	termostabilní DNA polymeráza
TBE	tris-borátový pufr
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Y	jakýkoliv nukleotid

## **8. SEZNAM PŘÍLOH**

1. Seznam použitých izolátů a jejich původ
2. Přehled a porovnání výsledků po PCR-RFLP

## 9. PŘÍLOHY

*Příloha 1: Seznam použitých izolátů a jejich původ*

Číslo vzorku	CCY	Název	Původ
1	6b	<i>Cryptococcus laurentii</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
2	14 <sub>1</sub>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
3	16	<i>Cryptococcus laurentii</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
4	27 <sub>1</sub>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
5	10	<i>Cryptococcus laurentii</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
6	17-3-2	<i>Cryptococcus laurentii</i> (typový)	lesní strom (Železná Studnička, SK)
7	3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
8	40a	<i>Rhodotorula glutinis</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
9	16b	<i>Rhodotorula glutinis</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
10	38 <sub>1</sub>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
11	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i> (typový)	lesní strom (Železná Studnička, SK)
12	22	<i>Rhodotorula glutinis</i>	lesní strom (Železná Studnička, SK)
13	109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
14	235	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
15	242	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
16	244	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
17	250	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
18	18	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
19	227	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
20	259	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
21	292	<i>Rhodotorula glutinis</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
22	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i> (typový)	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
23	20-1-35	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)
24	21-4-96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (typový)	ovocný strom (Malé Leváre, Zálužie, SK)

Příloha 2: Přehled a porovnání výsledků po PCR-RFLP

Číslo vzorku	CCY	Původní identifikace	Identifikace PCR-RFLP
1	6b	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
2	14 <sub>1</sub>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
3	16	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
4	27 <sub>1</sub>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	směsná kultura <i>C. laurentii</i>
5	10	<i>Cryptococcus laurentii</i>	směsná kultura <i>C. laurentii</i>
6	17-3-2	<i>Cryptococcus laurentii</i> (typový)	druh rodu <i>Cryptococcus</i> ?
7	3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
8	40a	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
9	16b	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
10	38 <sub>1</sub>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
11	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i> (typový)	<i>Rhodotorula glutinis</i>
12	22	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
13	109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
14	235	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	242	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
16	244	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17	250	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
18	18	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
19	227	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
20	259	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
21	292	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
22	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i> (typový)	<i>Rhodotorula glutinis</i>
23	20-1-35	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
24	21-4-96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (typový)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>