

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

TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ KVASINEK RODU SACCHAROMYCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

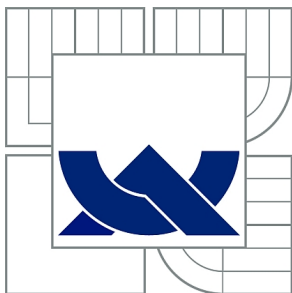
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

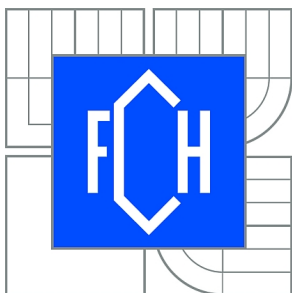
AUTHOR

Bc. KAMILA AUGUSTOVÁ

BRNO 2011



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

TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ KVASINEK RODU SACCHAROMYCES

TAXONOMY OF YEASTS OF THE GENUS SACCHAROMYCES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. KAMILA AUGUSTOVÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0450/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Kamila Augustová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Taxonomické zařazení kvasinek rodu *Saccharomyces*

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma.
2. Výběr metody pro experimentální část a její aplikace
3. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Kamila Augustová
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V teoretické části práce je rozebrána problematika kvasinek a jejich taxonomické zařazování pomocí metod tradičních i pomocí metod moderních. Detailněji se pak práce zabývá popisem moderních molekulárně-biologických metod.

V praktické části byla provedena analýza DNA pomocí PCR-fingerprintingu (rep-PCR) typových kvasinek, které jsme získaly z CCY a následně i analýza kvasinek získaných z odběrů vinných moštů. Jeden z moštů byl získán v roce 2009 (bílá odrůda hroznů) a druhý v roce 2010 (červená odrůda hroznů). Oba mošty pocházely jak integrované vinice, tak ekologické. Vzorky moštů byly získány z vinařství Holánek z Ivaně.

Vzájemným porovnáním obrazu PCR-fingerprintingu typových kvasinek a PCR-fingerprintingu vzorků kvasinek pomocí programu BioNumerics došlo k vyhodnocení výsledků a k vyvození závěru rozmanitosti kvasinkové mikroflóry ve vinném moštu.

ABSTRACT

The theoretical part discusses the yeasts and their taxonomic classification using traditional methods and using modern methods. Detail the work is concerned with descriptions of modern molecular-biology methods.

The practical part was analyzed DNA by PCR-fingerprinting (rep-PCR) type of yeasts, which we received from the CCY and subsequent analysis of yeast samples obtained from grape musts. One of the grape must was obtained in 2009 (white grape variety) and the second in 2010 (red grape variety). Both grape musts come as integrated vineyards and organic. Grape musts samples were obtained from the winery Holánek from Ivaně.

The cross-comparison of images PCR-fingerprint type yeasts and yeasts PCR-fingerprint samples using BioNumerics was to evaluate the results and conclude that the diversity of yeast flora in grape must.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, fermentace, vinné kvasinky, taxonomie, PCR-RFLP, PCR-fingerprinting

KEYWORDS

Yeasts, fermentation, wine yeasts, taxonomy, PCR-RFLP, PCR-fingerprinting

AUGUSTOVÁ, K. *Taxonomické zařazení kvasinek rodu Saccharomyces*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Daně Vránové za odborné vedení, všestrannou pomoc a velkou ochotu při realizaci mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Haně Šuranské za psychickou podporu a pomoc při vypracování praktické části diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat panu Ing. Holánkovi z Vinařství Holánek (obec Ivaň) za ochotu při odběru vzorků moštu.

OBSAH

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Kvasinky	8
2.1.1	Morfologie	8
2.1.2	Cytologie	9
2.1.2.1	Buněčná stěna	9
2.1.2.2	Cytoplasmatická membrána.....	10
2.1.2.3	Cytoplasma	10
2.1.2.4	Mitochondrie	10
2.1.2.5	Vakuola.....	10
2.1.2.6	Cytoskelet	10
2.1.2.7	Jádro	10
2.1.3	Rozmnožování.....	11
2.1.3.1	Vegetativní rozmnožování	11
2.1.3.2	Pohlavní rozmnožování	13
2.1.4	Metabolismus kvasinek – glykolýza a alkoholové kvašení	14
2.1.5	Kvasinky a jejich vliv na kvašení vína	16
2.2	Taxonomie	18
2.2.1	Tradiční metody k identifikaci kvasinek	20
2.2.1.1	Morfologické vlastnosti	20
2.2.1.2	Fyziologické vlastnosti	21
2.2.1.3	Výživa.....	22
2.2.1.4	Vliv okolního prostředí.....	23
2.2.1.5	Biofyzikální vlastnosti	23
2.2.1.6	Enzymy.....	24
2.2.2	Moderní metody k identifikaci mikroorganismů.....	25
2.2.2.1	PCR-RFLP.....	25
2.2.2.2	PCR s krátkými primery (PCR-fingerprinting).....	26
2.2.2.3	MULTIPLEX- PCR.....	26
2.2.2.4	NESTED-PCR	27
2.2.2.5	RAPD-PCR.....	27
2.2.3	Kvasinky rodu <i>Saccharomyces</i> a jejich taxonomické zařazení	27
2.3	Polymerázová řetězová reakce - PCR	30
2.3.1	Komponenty PCR směsi	30
2.3.2	Faktory ovlivňující průběh PCR.....	32
2.3.3	Princip PCR.....	34
2.3.4	Způsoby vyhodnocení PCR.....	35
2.3.5	Využití PCR v praxi	37
3	Experimentální část.....	39
3.1	Potřebné přístrojové vybavení, mikroorganismy a chemikálie	39
3.1.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	39
3.1.2	Chemikálie	39
3.1.3	Použité typové kvasinky z CCY a kvasinky izolované z vinného moštu	40

3.2	Použité postupy potřebné pro praktickou část.....	41
3.2.1	Příprava zásobních roztoků a potřebného materiálu.....	41
3.2.2	Izolace DNA.....	41
3.2.3	Příprava PCR Master mixů a teplotní profily použitých programů termocykléru.....	42
3.2.4	Gelová elektroforéza	43
3.3	Analýza typových kvasinek ze sbírky CCY.....	45
3.3.1	Analýza pomocí primeru M13	45
3.3.2	Analýza pomocí primeru (GAC) ₅	46
3.3.3	Analýza pomocí primeru (GAG) ₅	48
3.4	Vyhodnocení PCR-fingerprintingu typových kvasinek.....	49
3.5	Analýza kvasinek izolovaných z vinného moštu v roce 2009	50
3.5.1	Analýza pomocí primeru M13	51
3.5.2	Analýza pomocí primeru (GAC) ₅	52
3.5.3	Analýza pomocí primeru (GAG) ₅	53
3.6	Shrnutí analýzy kvasinek získaných z vinného moštu v r. 2009	53
3.7	Analýza kvasinek izolovaných z vinného moštu v roce 2010	54
3.7.1	Analýza pomocí primeru M13	55
3.7.2	Analýza pomocí primeru (GAC) ₅	56
3.7.3	Analýza pomocí primeru (GAG) ₅	57
3.8	Shrnutí analýzy kvasinek získaných z vinného moštu v r. 2010	57
4	Závěr	59
5	Literatura.....	61
6	Seznam zkratk.....	66
7	Seznam příloh.....	67

1 ÚVOD

Problematika produkce kvalitních vín je otázkou v poslední době často probíranou. Kvalitní víno není pouze záležitostí prestiže vinaře, ale jeho výroba je také legislativně ošetřeným procesem podléhajícím určitým normám. Přeměna hroznového moštu na víno je komplexní biochemický proces, který zahrnuje interakce mezi kvasinkami, bakteriemi a jinými mikroorganismy nacházejícími se ve vinném moštu. V tomto směru mají právě kvasinky nezastupitelný a zcela zásadní význam.

Nejčastějšími kmeny kvasinek vinařského průmyslu jsou kmeny tzv. skupiny *Saccharomyces sensu stricto*. Jejich dělení v rámci této skupiny se ukázalo jako značně problematické, hlavně z pohledu tradiční taxonomie. Ta využívá především morfologické fyziologické a biochemické vlastnosti daného mikroorganismu. Některé z těchto vlastností ale nejsou jednotné ani v rámci určitého druhu po dobu jeho životního cyklu a může tedy pomocí těchto metod docházet k chybnému zařazení. Za perspektivnější, přesnější a za celkově časově méně náročné jsou v současné době považovány tzv. moderní taxonomické metody, které vychází z analýzy genetické informace a studia příbuznosti. Mezi tyto metody pak řadíme například metodu PCR-RFLP, NESTED-PCR, MULTIPLEX-PCR, RAPD a PCR-fingerprinting (rep-PCR), která byla pro identifikaci kvasinek na úrovni druhů použita v této práci. Metoda byla vybrána na základě studia problematiky a odborných článků, ve kterých se tato metoda osvědčila a jevila se jako vhodná na druhové odlišení kvasinek rodu *Saccharomyces*.

V rámci této diplomové práce, jsme se pokusili pomocí vybraných krátkých primerů identifikovat různé druhy kvasinek rodu *Saccharomyces* izolovaných z vinných moštů. První odběr vinného moštu (bílá odrůda hroznů Sauvignon, vinařství Holánek, obec Ivaň) proběhl již v r. 2009 a jeho kvašení probíhalo v klimatizované laboratoři (18 °C) na Fakultě chemické VUT v Brně. Další odběry vinného moštu probíhaly v pravidelných intervalech přímo ve vinném sklepě (září - říjen 2010, vinařství Holánek, obec Ivaň), aby výsledky byly co nejobjektivnější. Jednalo se o mošt z hroznů odrůdy Rulanské modré z ekologického a integrovaného způsobu pěstování vinné révy. Metodou PCR-fingerprinting (rep-PCR) byly analyzovány jak kvasinky rodu *Saccharomyces* izolované z tohoto moštu, tak i kvasinky typové získané ze Sbírky kultur kvasinek v Bratislavě (CCY) a na základě podobnosti obrazů PCR-fingerprintingu proběhlo vyhodnocení.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky se od nepaměti využívají pro různé fermentační technologie. Prastará výroba piva a vína se datuje 6000 až 8000 let zpátky do minulosti. Poprvé byly kvasinky viděny a popsány až A. van Leeuwenhoekem v roce 1680. Jejich studiem v kvasné výrobě piva a vína se pak dále zabýval L. Pasteur (publikováno 1866 a 1876). Asi nejznámější rod *Saccharomyces* dostal svůj název odvozený přímo z řeckého *saccharos* = cukr, *mykes* = houba. Dnes se kvasinky využívají nejen při výrobě piva, vína, lihu, ale také k výrobě pekařského droždí, krmné biomasy, přípravě některých mléčných výrobků nebo k získání ergosterolu, jako prekursoru vitamínu D. Kvasinky jsou také výborným zdrojem vitamínů skupiny B, jsou využívány jako producenti některých enzymů nebo při biotransformační výrobě fenylacetylkarbinolu, prekursoru efedrinu.

Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy, které tvoří jednotnou taxonomickou skupinu. Řadíme je do rostlinného systému mezi vyšší houby. Podle způsobu rozmnožování je můžeme dále dělit na askomycety a basidiomycety (tzv. telomorfní kvasinky), třetí skupinou jsou deuteromycety (anamorfní kvasinky). Existuje také ještě skupina nazývaná kvasinkovité mikroorganismy, tj. organismy, které mají složitější životní cyklus, v němž ale má výrazné zastoupení fáze kvasinkovitá, tedy fáze, kdy se mikroorganismus rozmnožuje v jednobuněčné formě pučením.

Mikroorganismy, které jsou taxonomicky zahrnuté mezi kvasinky lze charakterizovat tím, že jde většinou o jednobuněčné mikroorganismy, rozmnožující se převážně pučením a zpracovávající zdroje uhlíku obvykle kvašením. Nelze ale říci, že to platí vždy. Některé kvasinky mohou za určitých specifických podmínek vytvářet mycelia (pak jde tedy o vícebuněčnou formu), rozmnožovat se přehradečným dělením či zpracovávat zdroj uhlíku oxidativně.

Kvasinky jsou obecně významné organismy a to hned z několika důvodů:

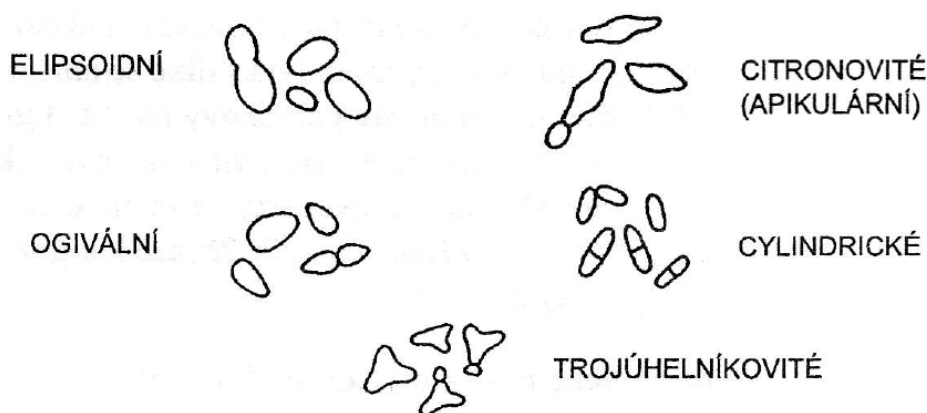
- Jde o mikroorganismy, které jsou nezbytné pro řadu kvasných výrob.
- Druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* patří mezi nejdůležitější modelové eukaryotní organismy.
- Některé z kvasinek jsou potenciálními patogeny pro člověka [1, 2, 3, 4, 5].

2.1.1 Morfologie

Kvasinky jsou charakteristické svou velkou tvarovou, velikostní či barevnou diverzitou. Proto se těchto znaků (spolu se způsobem rozmnožování) stále využívá k taxonomickému zařazení kvasinek a doposud nebyly tyto charakteristiky vytlačeny stále větší popularitou molekulárních metod.

Základním rozlišovacím znakem kvasinkovitých buněk oproti bakteriálním buňkám je velikost, čehož lze využít při základním rozpoznání pod mikroskopem (bakterie bývají většinou řádově menší). Kvasinky dosahují velikosti přibližně 3-15 μm . Tvar buňky závisí na několika faktorech, mezi které patří kultivační podmínky (dostatek živin, pH, teplota, aj.), rodová příslušnost dané kvasinky a v neposlední řadě i způsob rozmnožování. Buňky mohou nabývat kulatého, oválného ale také citronovitého, lahvovitého či vláknitého tvaru

(viz Obr. 1). Obecně lze ovšem říci, že nejběžnějším tvarem buněk kvasinek je rotační elipsoid (např. rod *Saccharomyces*) [1, 3].



Obr. 1: Příklad tvaru kvasinkových buněk [1].

2.1.2 Cytologie

Kvasinkovité buňky jsou buňkami eukaryotními s povrchovými strukturami, které jsou plazmatická membrána, buněčná stěna a popřípadě ještě s pouzdrém. Vnitrobuněčný obsah je pak představován různými organelami umístěných v cytoplazmě. Patří k nim:

2.1.2.1 Buněčná stěna

U kvasinek plní buněčná stěna stejné úlohy jako u bakterií, tedy zajišťuje ochranu buňky před mechanickými vlivy (jde o velmi pevnou strukturu), osmotickým šokem a udává jí tvar. Její tloušťka se pohybuje okolo 15 – 400 nm. Póry v buněčné stěně jsou poměrně velké, volně jimi projdou všechny sloučeniny kromě vysokomolekulárních látek, jakými jsou například sacharidy nebo bílkoviny. Bylo zjištěno, že u kvasinek rodu *Saccharomyces* tvoří stěnu tři vrstvy, které se mírně liší svým složením.

Hlavní zastoupení ve složení stěny mají polysacharidy (tvoří kolem 80 % sušiny stěny a až 30 % sušiny celé buňky). Mezi nejvýznamnější polysacharidy, které se vyskytují nejčastěji ve stěně buňky, patří glukany, manany, glukosamin a chitin. Vytváří vlákna a ty následně pevnou síť vyplněnou bílkovinami (ty tvoří 6 – 10 % sušiny stěny). Zbytek hmoty tvoří lipidy, fosfolipidy a fosforečnany. Náboj buňky kvasinek je dan přítomností fosfátových zbytků spolu s -COOH skupinou bílkovin.

To, čím je stěna buňky kvasinek charakteristická a odlišuje se tak od všech ostatních mikroorganismů, je tvorba tzv. jizev jako trvalých kruhovitých struktur vzniklých pučením. Jizva tedy vzniká v místě, kde se pupen oddělí od mateřské buňky. Tyto útvary lze i barvit a pozorovat pod mikroskopem. Kvasinky rodu *Saccharomyces* pučí multipolárně – pupen nevznikne dvakrát na jednom místě, lze pak určit, jak starou buňku pozorujeme.

Dalším typickým jevem pro kvasinkovité buňky, na kterém se podílí buněčná stěna, je flokulace buněk a jejich následná sedimentace. Jde o významný jev pro některé potravinářské produkce (např. výroba vína a piva), kde tento jev může být žádoucí či nežádoucí. U flokulace kvasinek jde o interakci lektinového typu, která probíhá mezi polysacharidem a proteinem za účasti Ca^{2+} iontů.

2.1.2.2 Cytoplasmatická membrána

Funkce a složení plazmatické membrány u kvasinek se téměř neliší od bakteriální. Její tloušťka je menší než u buněčné stěny, udává se obvykle v rozmezí 7,5 - 8,0 nm. V cytoplasmatické membráně jsou obsaženy především lipidy a proteiny. Hlavní funkce spočívají v propustnosti pro malé molekuly bez náboje, tvorbě osmotického rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Je sídlem transportních mechanismů látek – jak z vnějšího prostředí dovnitř, tak i směrem opačným. V cytoplasmatické membráně kvasinek nejsou obsaženy žádné dýchací enzymy ani systém oxidační fosforylace.

2.1.2.3 Cytoplasma

Cytoplazmu můžeme popsat jako homogenní průhlednou hmotu. U starších buněk pozorujeme v cytoplazmě tvorbu malých zrníček a postupnou vakuolizaci. Své místo zde má i systém dvojité membrány (stejně jakou u rostlinných a živočišných buněk) - endoplazmatické retikulum tvořící různé útvary, které slouží jako uložisko enzymů a různých rezervních látek. Z vnější strany endoplazmatického retikula jsou přichyceny ribozomy (syntéza bílkovin).

2.1.2.4 Mitochondrie

Další organelou v buňce kvasinek jsou mitochondrie. Ohraničená je dvěma membránami přičemž vnitřní tvoří hluboké vchlípeniny dovnitř – tzv. kristy. Hlavní zastoupení ve složení mitochondrií mají bílkoviny, lipidy a fosfolipidy, ale obsahují také RNA a malé množství DNA, která je nositelem mimojaderné dědičnosti kvasinek. Mitochondrie jsou zároveň i sídlem enzymů dýchání a systému oxidační fosforylace.

2.1.2.5 Vakuola

Velikost a počet vakuol v buňce závisí na mnoha faktorech (vnější prostředí, stáří buňky apod.), u mladších buněk se spíše vyskytují vakuoly menších rozměrů ve větším počtu než u starších, kde nejčastěji nacházíme jednu vakuolu větších rozměrů. Je ohraničená tenkou membránou a její funkce spočívá v ukládání látek momentálně nepotřebných pro metabolismus např. polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny a puriny. Uvnitř vakuoly v roztoku jsou obsaženy také hydrolytické enzymy, které slouží k degradaci vysokomolekulárních látek a buněčných struktur, které mají v buňce krátký poločas rozpadu.

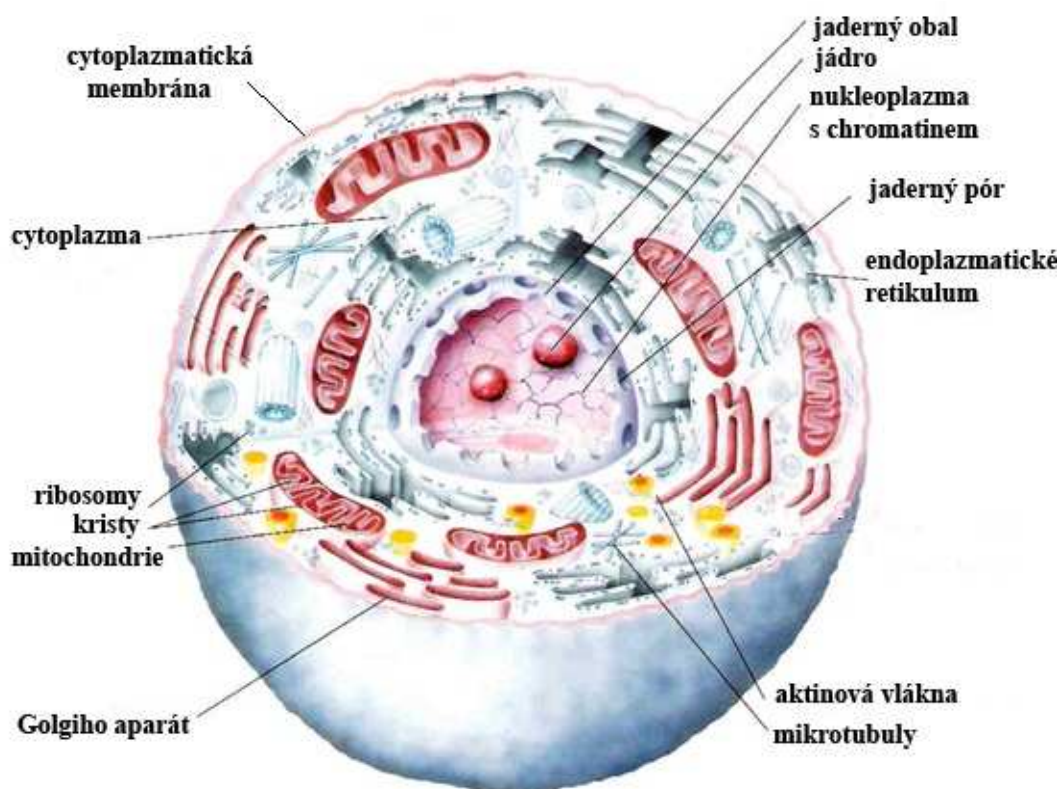
2.1.2.6 Cytoskelet

V případě cytoskeletu mluvíme o síti proteinových vláken, které protkávají celou buňku včetně jádra. Tuto síť tvoří mikrotubuly, aktinová políčka a filamenta. Cytoskelet umožňuje vnitrobuněčný pohyb organel a změnu tvaru buňky při pučení a konjugaci. Mikrotubuly u *S. cerevisiae* vycházejí z jaderného plaku a směřují jednak do jádra (jaderné mikrotubuly) a jednak do cytoplasmy (cytoplasmatické mikrotubuly). Jaderné mikrotubuly zajišťují pohyb chromosomů při mitóze, cytoplasmatické se uplatňují při migraci jádra během mitózy nebo při karyogamii, k níž dochází při konjugaci.

2.1.2.7 Jádro

Jádro kvasinek je od cytoplasmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry. Většinou bývá umístěno ve středu buňky. Počet chromosomů odvozujeme z genetických studií. U nejlépe prostudované kvasinky *S. cerevisiae* bylo zjištěno 16 chromosomů

v haploidním jádře (potvrzeno i sekvenováním). Diploidní jádro má dvojnásobný počet chromozomů. V odvrácené části jádra od pupenu se nachází jadérko, které obsahuje ribonukleoproteiny – prekursorů ribosomální RNA. Poslední důležitou součástí jádra jsou tzv. plazmidy, jde o nízkomolekulární DNA (přibližně 2 μm) uspořádanou do kruhu. Celkový přehled uspořádání organel v eukaryotické buňce viz Obr. 2 [3, 1, 6].



Obr. 2: Znázornění cytologie eukaryotické buňky [42].

2.1.3 Rozmnožování

2.1.3.1 Vegetativní rozmnožování

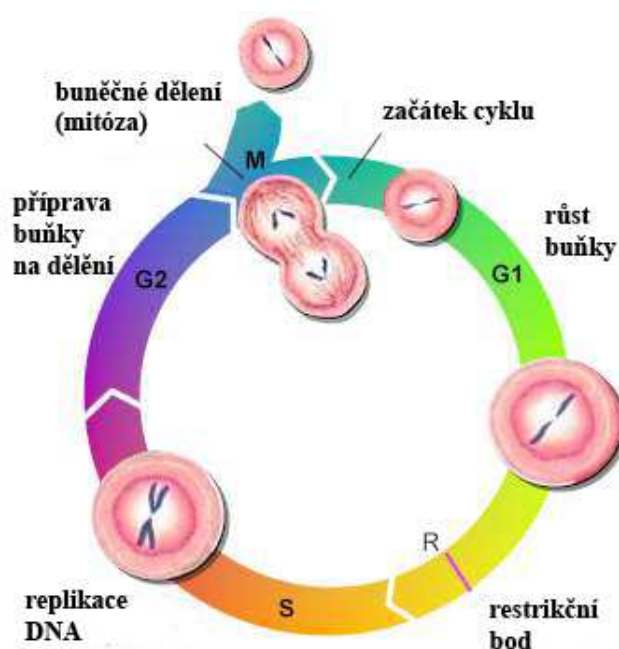
Buněčný cyklus u *S. cerevisiae* můžeme rozdělit do několika základních fází:

- S fáze - zahájení tvorby pupene a duplikace jaderného plaku
- přechod mezi S a G2 fází – rozchod jaderných plaků na opačné póly jádra
- M fáze – zahájení mitózy (protahování jádra), viz Obr. 4
- přechod mezi M a G1 fází – oddělení pupene

Po oddělení pupene od mateřské buňky vzniká buňka nová – dceřiná. Tato buňka je zpravidla menší a proto je její buněčný cyklus delší než u buňky mateřské, prodlužuje se G1 fází. Pro průchod hlavním regulačním místem buněčného cyklu – tj. startem, je nutné, aby měla buňka potřebnou velikost (pod kontrolou metabolické dráhy RAS/cAMP), jinak by časem při jejím předčasném dělení došlo ke smrti.

Start je interval v buněčném cyklu buňky, ve kterém se rozhoduje o přechodu z G1 fáze do fáze S a za standardních podmínek pak proběhnout i další fáze buněčného cyklu (průběh celého buněčného cyklu viz Obr. 3). Pokud nejsou splněny podmínky pro úspěšné dokončení cyklu, dojde k jeho zastavení. Může se rozběhnout tzv. alternativní program. Např. u haploidní buňky v dostatku C a N zdrojů a přítomnosti sexuálního partnera dochází ke konjugaci. Dále pak může být u diploidních buněk v nedostatku živin zahájena např. sporulace. Klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu hraje gen CDC28, který kóduje regulační protein – proteinkinázu p34. Interakcí fosforylované molekuly p34 s molekulou cyklinu a následnou defosforylací proteinkinázy vzniká aktivní komplex p34 s cyklinem, který je nezbytný pro průchod startem nebo mitózou.

V S fázi pak dochází k výrazné morfologické změně – růstu pupenu. Směrem k rostoucímu pupenu jsou směřovány cytoplazmatické mikrotubuly, aktinová políčka, sekreční váčky, dochází také ke změně tvaru mitochondrií v protáhlé útvary. V této fázi se zde objevují proteiny zodpovědné jak za růst pupene, tak i proteiny důležité při následné cytokinesi. Můžeme tedy pozorovat výraznou polarizaci mnoha buněčných procesů.

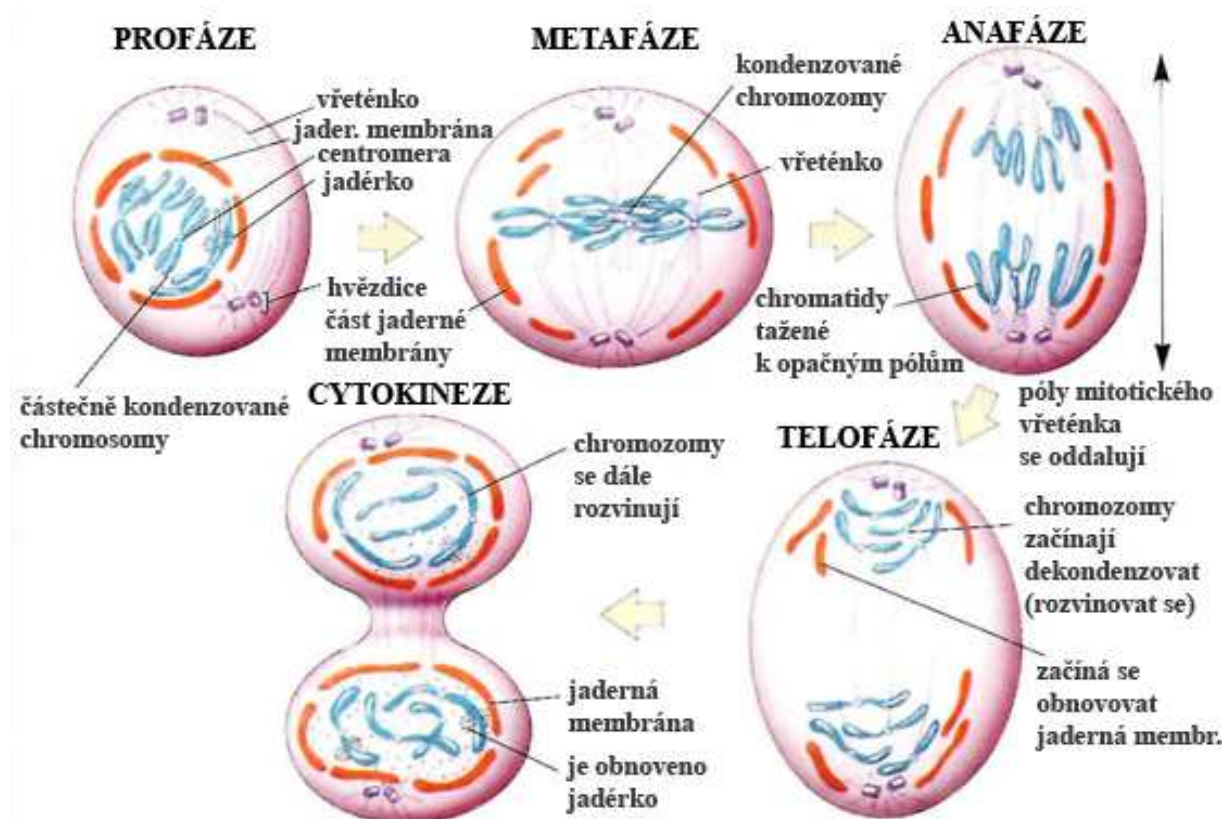


Obr. 3: Průběh buněčného cyklu kvasinek [43].

Pomocí mutantů – tj. buněk s poruchou buněčného cyklu (většinou poruchou tvorby pupenu nebo cytokinese), byly identifikovány geny, které jsou zodpovědné za kódování proteinů nezbytných pro výběr místa, kde bude založen pupen nebo za kódování proteinů podílejících se na polarizovaném růstu pupene. Zjednodušeně lze říci, že za správný výběr místa pro založení pupenu zodpovídají geny BUD. Diploidní buňky pučí bipolárně tj. nový pupen vzniká na pólů opačném k místu, kde došlo k oddělení dceřiné buňky od mateřské. Pro tento druh pučení jsou nezbytné geny BUD1, 2 a 5. Haploidní buňky vykazují tzv. axiální pučení (po oddělení dceřiné buňky se nový pupen zakládá v blízkosti toho oddělení – jizvy jsou blízko sebe v prstencích. Tuto změnu na axiální pučení má za následek přítomnost produktů genů BUD3 a 4.

Buňky diploidních kmenů *S. cerevisiae* při kultivaci za nestandardních podmínek mohou vytvářet podlouhlé buňky, které zůstávají spolu spojeny a tvoří tak pseudohyfy –

pseudomycelium. Lze pozorovat jistou podobnost s buněčným cyklem *Schizosacharomyces pombe* [1, 3, 6].

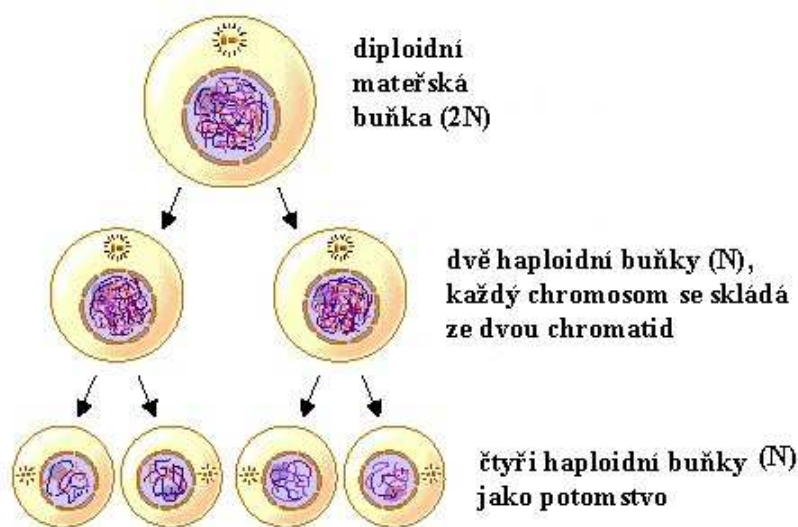


Obr. 4: Znáznornění průběhu mitózy [44].

2.1.3.2 Pohlavní rozmnožování

Vegetativní rozmnožování není jediné, kterým se kvasinky rozmnožují, vedle něj existuje také rozmnožování pohlavní, které bylo zjištěno u kvasinek zařazených do skupin askomycety a basidiomycety (u deuteromycet nebylo pohlavní rozmnožování zjištěno). U pohlavního rozmnožování může dojít k několika situacím. Za vhodných podmínek nastává konjugace haploidních buněk a vzniká diploidní zygota, která se pak může dále rozmnožit pučením (proběhne vegetativní rozmnožování), nebo dochází ke sporulaci, při které meiotickým dělením (redukční dělení) jádra vznikají opět haploidní buňky (viz Obr. 5). Většina kvasinek tvoří askospory, jedná se o endospory umístěné ve vřetku neboli asku. Tyto kvasinky řadíme do skupiny askomycety. Existují ale také exospory, což jsou spory umístěné vně sporotvorných buněk – této skupině kvasinek říkáme basidiomycety. V životním cyklu kvasinek se tedy pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk [1, 3, 6].

MEIÓZA



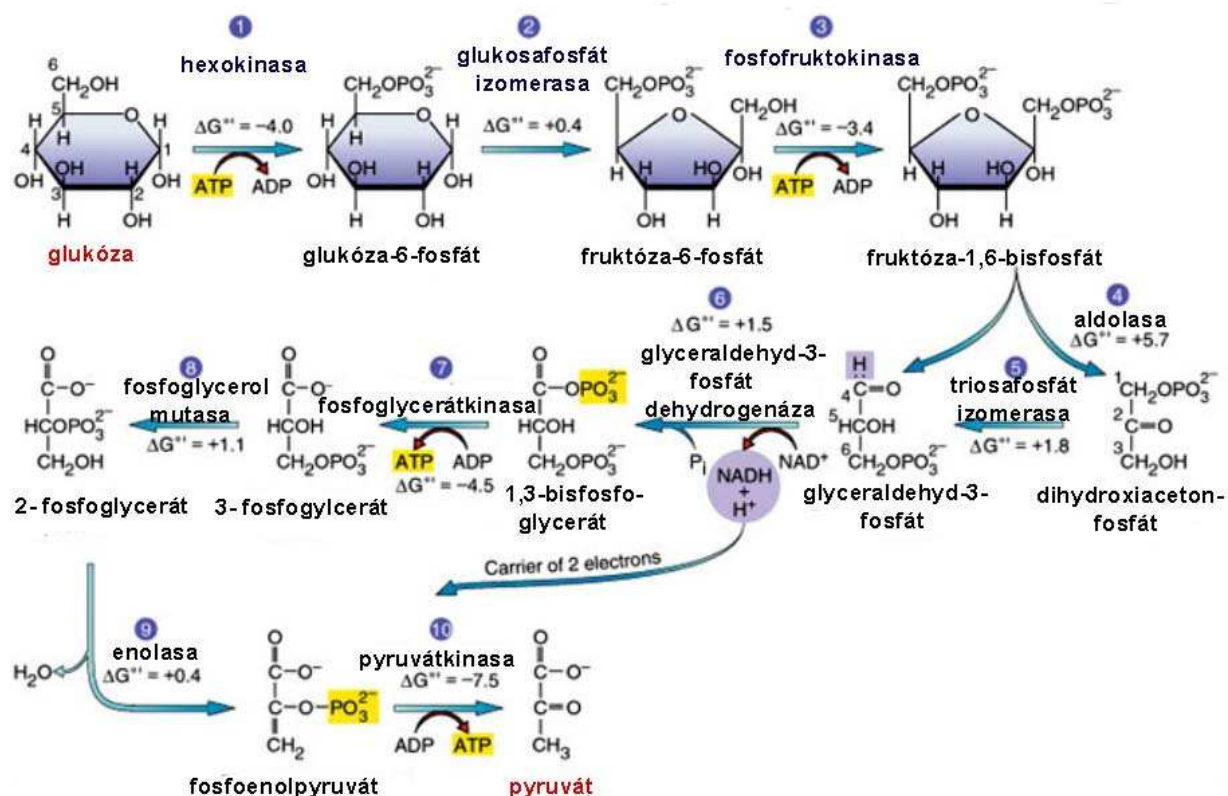
Obr. 5: Schématické znázornění průběhu meiózy [45].

2.1.4 Metabolismus kvasinek – glykolýza a alkoholové kvašení

Pro jakýkoli druh metabolismu je základní podmínkou transport metabolizovatelných látek (živin) do vnitřního prostředí buňky, tedy u kvasinek průchod živin skrz plazmatickou membránu a buněčnou stěnu. K selekci dochází pouze na plazmatické membráně, buněčnou stěnou procházejí veškeré živiny bez rozdílu. Bylo zjištěno, že skrz plazmatickou membránu projde i poměrně velká molekula. Míra průchodnosti membránou tedy není dána ani tak velikostí jako jinými dalšími faktory, jsou jimi např.: růstová fáze, ve které se kultura nachází, na náboji molekuly a na symetrii molekuly. Malé molekuly procházejí membránou bez účasti přenašeče (prostá difúze, průchod hydrofilními póry či přes lipofilní části membrány). Ostatní větší molekuly jsou přenášeny pomocí přenašečů, usnadněnou difúzí či aktivním transportem.

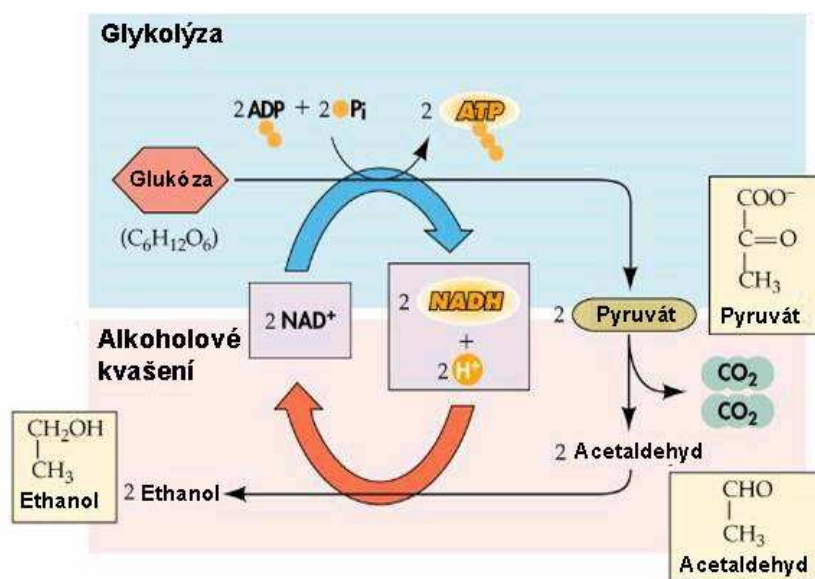
Průmyslově nejvyužívanějším a nejprostudovanějším metabolismem u kvasinek je anaerobní katabolický proces tzv. glykolýza neboli Embden-Meyerhoferova metabolická cesta. Základní schéma tohoto metabolismu spočívá v přeměně hexózy na pyruvát. Tento děj probíhá přes postupnou fosforylaci hexózy na fruktózu-1,6-bisfosfát, její štěpení na dva triózafosfáty a následnou oxidaci těchto triózafosfátů na 1,3-bisfosfoglycerát. V tomto kroku dochází k redukci koenzymu NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$ a pomocí fosfoglycerátkinázy pozorujeme přeměnu na 3-fosfoglycerát. Dochází k ukládání energie ve formě ATP. Fosfoesterová vazba 3-fosfoglycerátu je fosfoglycerátmutázou přenášena z třetího na druhý uhlík a vzniká 2-fosfoglycerát. Z 2-fosfoglycerátu enoláza odstraňuje molekulu vody, vzniká fosfoenolpyruvát a makroenergní fosfoenolová vazba. Makroenergní vazba vytvořená v předchozí reakci se přenesla na ADP za současné tvorby ATP a pyruvátkinázou dochází ke vzniku pyruvátu (celkové schéma viz Obr. 6). Glykolýza je tedy metabolická dráha přeměny glukózy na dvě molekuly pyruvátu za čistého výtěžku dvou molekul ATP a dvou molekul NADH.

Glykolýza



Obr. 6: Schématické znázornění průběhu glykolýzy [46]

U kvasinek je pyruvát pak postoupen k dalšímu zpracování. Nejdříve je dekarboxylován na acetaldehyd a ten pak za součinnosti redukováného kofaktoru NADH a příslušného enzymu redukován na ethanol. Tím vznikají z jedné molekuly hexózy dvě molekuly ethanolu a dvě molekuly oxidu uhličitého. Tento sled reakcí nazýváme alkoholové kvašení (schéma alkoholového kvašení viz Obr. 7) [3].



Obr. 7: Schématické znázornění průběhu alkoholového kvašení v návaznosti na glykolýzu [47].

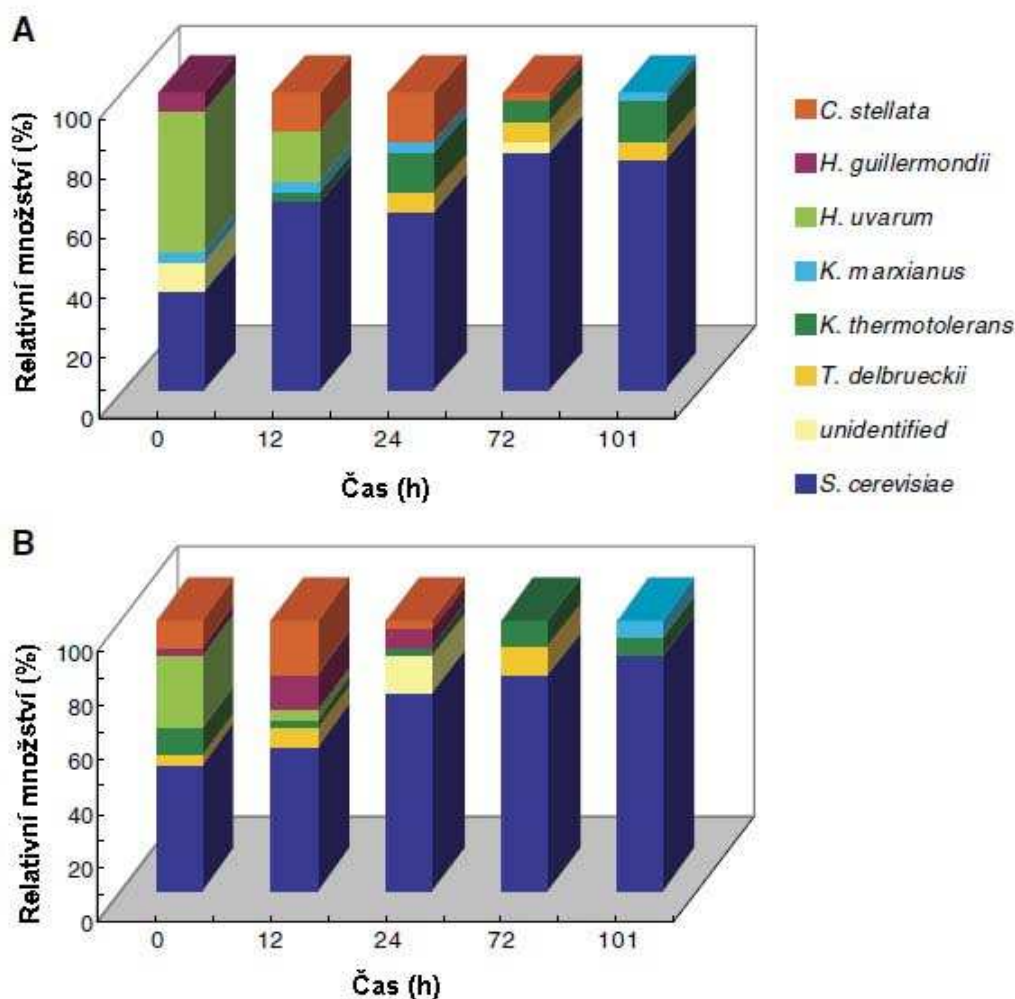
2.1.5 Kvasinky a jejich vliv na kvašení vína

Přeměna hroznového moštu na víno je komplexní biochemický proces, který zahrnuje interakce mezi kvasinkami, bakteriemi a jinými mikroorganismy. Přičemž kvasinky jsou primárně zodpovědné za alkoholové kvašení (viz kapitola 2.1.4 Metabolismus kvasinek – glykolýza a alkoholové kvašení) [7].

Existují dva potencionální přirozené zdroje kvasinek následně přítomných ve vinném moštu. Jedním z nich je přírodní naleziště kvasinek, čímž jsou bobule a listy hroznů, dalším zdrojem je pak samotné výrobní zařízení, se kterým přichází vinný mošt do styku. Jedna studie prokázala, že na bobulích jsou z 50 – 75 % přítomny kvasinky rodů *Hanseniaspora uvarum* a její anamorfní forma *Kloeckera apiculata*. V menší míře pak byla objevena přítomnost rodů *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* a *Hansenula*. Izoláty kvasinek rodu *Saccharomyces* z hroznů tvořily velmi nízké procento, naproti tomu stěry z výrobního zařízení prokázaly jejich přítomnost ve značném množství, což by mohlo naznačovat, že kvasinky rodu *Saccharomyces* se do vinného moštu dostávají i tímto způsobem [7, 8].

V současnosti je jedním z nejčastějších postupů očkování hroznového moštu kvasinkami zakoupenými z propagačních stanic. Tento postup totiž vinařům zajišťuje vyšší reprodukovatelnost jejich produktů, zkracuje lag fázi a snižuje riziko kažení vína. Na druhou stranu je ale nutné říci, že divoké kvasinky, vyskytující se přirozeně na bobulích a listech, dávají vínu osobitý styl a kvalitu vína. Použití kvasinek z propagačních stanic má nepříznivé účinky právě na tyto divoké kmeny kvasinek, protože v moštu potlačují jejich růst [7].

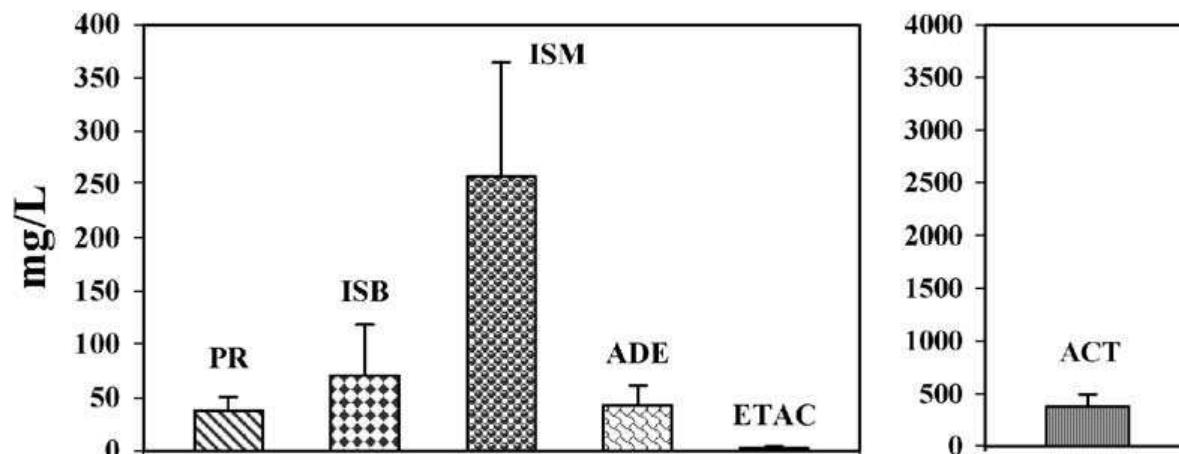
Při výrobě vína probíhá přírodní kvašení hroznové šťávy. V prvotní fázi tohoto kvašení převládají apikulátní kvasinky (divoké kvasinky, které se běžně vyskytují na bobulích hroznů, listech a půdě), jedná se o rody *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* a *Metschnikowia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*. Tyto kvasinky se vyznačují nižší fermentační aktivitou, proto jsou přítomny především jen v této prvotní fázi kvašení. V pozdějších fázích odumírají a jsou vystřídány ethanol-tolerantními kvasinkami zejména rodem *Saccharomyces* (grafické znázornění tohoto procesu je zachyceno na Obr. 8). Kvasinky rodu *Saccharomyces* začínají přerůstat ostatní rody, když koncentrace ethanolu stoupne ke 4-5 %. Během první fáze kvašení je spotřebováno až 40–50 % cukru. [9, 10, 11, 12, 13]. Rozmanitost, složení a vývoj kvasinkové mikroflóry v hroznovém moštu závisí na různých faktorech: zeměpisné umístění vinice, klimatické podmínky, věk vinice a samozřejmě na odrůdě hroznů [7, 9, 10, 11, 12, 13, 14].



Obr. 8: Grafické znázornění vývoje složení kvasinkové mikroflóry v průběhu kvašení; graf A zachycuje vývoj v moštu bílého, graf B zachycuje vývoj v červeném moštu [9].

Rozmanitost a složení kvasinek v hroznovém moštu významně přispívají k sensorickým vlastnostem vína. Růst jednotlivých druhů kvasinek se vyznačuje specifickou metabolickou aktivitou. Rody kvasinek z první fáze kvašení mohou dosáhnout velikosti populace 10^6 až 10^7 buněk/ml, jsou schopné anaerobního i anaerobního růstu a některé přežívají i podobu celého kvašení, svými sekundárními metabolity pak zásadně ovlivňují konečný bouquet vína. Pomocí moderních instrumentálních metod bylo prokázáno, že flavour (celkový chuťově-čichový vjem) vína dotváří přibližně 1000 sloučenin, přičemž 400 z nich produkují kvasinky během kvašení jako své metabolity. Tyto sloučeniny vznikají především během alkoholového kvašení a jablečno-mléčné fermentace (fermentační aroma). Dále je flavour tvořen sensoricky aktivními látkami pocházejících z hroznů (tzv. odrůdové aroma), sloučeninami, které vznikají při operacích souvisejících se sběrem a výrobou vína (pre-fermentační aroma) a v neposlední řadě je celkový flavour tvořen sloučeninami, které se objevují během procesu stárnutí (post-fermentační aroma). Hlavními a nejzastoupenějšími metabolity kvasinek ve víně jsou těkavý ethanol a oxid uhličitý, ty však tak výrazně nepřispívají k celkové chuti vína. Důležitější pro aroma vína jsou sekundární metabolity - organické kyseliny, vyšší alkoholy a estery, v menší míře pak acetaldehyd, ty představují skupinu látek tvořící hlavní bouquet vína (viz Obr. 9). Tento profil znázorněný

na obrázku, je tvořen nejčastěji se vyskytujícími se rody kvasinek - *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *C. stellata*, *S. ludwigii*, *Z. fermentati* [15].



Obr. 9: Grafické znázornění koncentrace vybraných sloučenin produkovaných kvasinkami do vinného moštu; PR – *n*-propanol, ISB – isobutanol, ISM – isoamylalkohol, ADE – acetaldehyd, ETAC – ethylacetát, ACT – kyselina octová [15].

Rozdíly ve složení vín vyrobených z různých druhů kvasinek se zdají být spíše kvantitativní než kvalitativní. Produkty kvašení jsou zpravidla totožné, ale relativní množství různých látek se liší mezi různými druhy kvasinek. Fermentační profil *C. stellata* je podobný jako u *H. uvarum*, tedy že produkují vyšší množství butanolu a ethylacetátu naopak méně vyšších alkoholů. *S. cerevisiae* se vyznačuje vysokou produkcí isoamylalkoholu a 2,3-butanediolu a nízkou produkcí butanolu. Profil *Z. fermentati* je charakteristický obecně nízkou produkcí sloučenin, výjimku tvoří zvýšená produkce 2,3-butanediolu. *S. ludwigii*, známý jako původce kažení vína, může být považován za hlavního a nadměrně produktivního producenta butanolu, ethylacetátu, isoamylalkoholu a isobutanolu. Metabolity tvořené kvasinkami mohou být rozděleny do dvou tříd. Za metabolity první třídy můžeme považovat vedlejší produkty vytvořené s minimální úrovní variace v rámci jednotlivých druhů. Naopak v rámci některých jiných druhů byl zaznamenán silný polymorfismus tvorby vedlejších produktů na úrovni kmenů. Tyto metabolity spadají do druhé třídy, sem spadají např. metabolity různých kmenů *S. cerevisiae* [15].

2.2 Taxonomie

Taxonomie patří k nejstarším biologickým vědním oborům a prochází neustálým vývojem a to i v současné době. Slovo taxonomie vzniklo původně složením ze dvou slov a to z řeckých – taxis, což znamená uspořádání a ze slova nomos – zákon. V dnešní době se také často používá výraz systematika. Cílem a smyslem taxonomie je klasifikace organismů podle určitých pravidel a jejich následné zařazení do biologických skupin (označovány jako taxon) seřazených v hierarchický systém. Systematika se nezabývá jen klasifikací organismů, ale i obecnými principy jejich variability (příčinám i důsledkům). Po úspěšné klasifikaci nově objeveného organismu dochází k vytvoření názvu, touto částí taxonomie se zabývá tzv. biologická nomenklatura.

Na pojmenování druhů, nejnižší kategorii v taxonomii, platí přesná pravidla. Uplatňuje se zde nomenklatura binomická. Název druhu (lat. species) se skládá ze dvou slov, a to ze jména rodu a jednoduchého druhového přívlastku – epiteta. Rodové názvy jsou podstatné jména, případně přídavné jména zastupující podstatné jméno, v jednotném čísle a píší se vždy velkým začátečním písmenem, na rozdíl od epiteta, které se píše vždy malým písmem. Druhové přívlastky jsou většinou přídavné jména gramaticky shodné se jménem rodu (např. *Kloeckera apiculata*) v menšině jde o substantiva (např. *Candida pini*). Druh je nejnižší základní taxonomická jednotka, ale může mít ještě vnitřní strukturu. Znamená to, že jej můžeme ještě rozdělit na poddruhy (lat. subspecies), variety (lat. varietas) anebo formy (lat. forma). V literatuře se jména druhů píší latinky a píší se kurzívou, subspecies, varieta a forma se píší stojatým písmem.

Tak jako je druh nejnižší taxonomickou jednotkou, tak říše (lat. regnum) je taxonomickou jednotkou nejvyšší. Nejdříve byly vytvořeny dvě základní říše - rostlinná a živočišná, toto rozdělení ale nebylo dostatečné a zařazení některých organismů bylo sporné, proto k nim přibyla třetí říše a to Prorista. Do této říše pak spadaly jednobuněčné organismy (po celou dobu svého životního cyklu), organismy, které tvoří kolonie, bakterie a sinice, nikdy organismy, které tvoří pravé pletivo. S postupným vývojem došlo k další změně (v 19. stol) a to rozdělení říše Prorista na dvě nové – Monera (prokaryota) a Protocista (eukaryota). V taxonomii se také využívá pomocná klasifikační skupina označovaná jako nadříše (lat. super-regnum) [4, 6]. V současné době platí rozdělení založené na studiu evolučních linií a tvoří jej rozdělení organismů do tří domén – Bakterie (Bacteria), Archea (Archea) a Eukaryota (Eukarya), přičemž do Bakterie spadá říše Eubakteria a do Archea spadá říše Archeabakteria a do Eukaryota patří říše: Protista, Fungi, Plantae a Animalia [16].

K třídění organismů a k jejich zařazení do taxonů je samozřejmě za potřebí použití metod, které by to umožňovaly. Lze použít metodu operativní, empirickou a numerickou. V operativní taxonomii se předpoklady a hypotézy můžou prověřovat pozorováními a pokusy. Vždy ale musí být stanovené i kritérium „blízkosti“. Empirická taxonomie vychází z mnohých pozorování a zaregistrování znaků. Taxony jsou pak vytvářeny na základě mnohých společných znaků. Tyto dvě metody nemusí být vždy ve shodě, protože empirická taxonomie nemusí být vždy operativní. Numerická taxonomie vyjadřuje číselné hodnocení podobnosti (Q- a R-technika). Nedílnou součástí moderní taxonomie je využívání tzv. moderních metod, které mívají při zařazení organismů v poslední době čím dál větší váhu.

Důležitou funkci pro taxonomické zařazení má „blízkost“ a „podobnost“. Velmi záleží, z jakého pohledu podobnost posuzujeme, existuje hned několik hledisek např. fenetické, fyletické, kladistické apod. Další neméně důležité hledisko, které se hojně využívá v taxonomickém zařazení, je studium fylogenetických vztahů, zabývající se historií a vývojem organismů a jejich příbuzností. Jako znázornění vztahů mezi různými taxony se využívají dendrogramy (tzv. fylogenetické stromy) [4, 6].

2.2.1 Tradiční metody k identifikaci kvasinek

Tradiční metody jsou založené na studiu morfologie, fyziologických a biochemických vlastností daného organismu. Pomocí výsledků těchto testů, pozorování a na základě podobnosti k vlastnostem organismů v určité taxonomické skupině (taxonu) je pak organismus do tohoto taxonu zařazen. Zde některé vybrané dříve používané testy tradiční taxonomie zaměřené na zařazení kvasinek:

2.2.1.1 Morfologické vlastnosti

Tyto vlastnosti jsou sledovány pomocí mikroskopu nebo přímým pozorováním. Testy se soustřeďují na tyto oblasti:

- **Morfologie buněk**

Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy se vyznačují tím, že tvoří jednotlivě pučící buňky rozmanitých tvarů. Nejčastěji se jedná o tvary elipsoidní, kulovité, mírně oválné i velmi protáhlé, válcovité anebo trojhranné, citonovitého i nepravidelných tvarů. Neméně důležitá je pak i velikost buněk a jejich vyrovnanost, to vše za stejných kultivačních podmínek.

Dále se ještě podrobněji morfologie buněk zabývá:

- měřením buněk
- tvarem kulovitých a elipsoidních buněk
- vyrovnaností buněk
- kvocientem povrch/objem (poměr P/O) buněk

- **Morfologie kolonií**

Nárůst kolonií se sleduje na předem připraveném sladinovém agaru nebo na agaru umělého složení (základem glukóza). Postup probíhá tak, že se připraví suspenze buněk tři dny staré kultury ve sterilní vodě, jedna kapka suspenze se pak přenesse na střed živného agaru na Petriho misce. Velké kolonie se kultivují 24 hodin při teplotě 28 °C, po této době se změří jejich průměr v mm, zamezí se vysychání a kultivace probíhá dál při teplotě 17-20 °C, kolonie se pak měří v intervalu po 1, 2, 3 a 4 týdnech.

Podrobněji se se morfologie kolonií zabývá:

- vzhledem kolonie
- periodicitou růstu kolonie
- rychlostí radiálního růstu kolonie

- **Mycelární útvary**

Často se na okraji kolonií vytváří řetězce protáhlých buněk, na kterých pučí kvasinkovité buňky, tzv. blastospory. Tyto útvary se pak nazývají pseudomycelium. Kvasinkovité mikroorganismy mohou ale vytvářet i pravé hyfy s přehrádkami – pravé mycelium. Závisí to od charakteru kmene, ale i od vnějších podmínek, či zda v kultuře převládá kvasinkovitá a nebo mycelární forma, v takovém případě se mluví o morfologickém dimorfizmu.

U mycelárních útvarů se v taxonomii zabýváme:

- tvorbou a charakterem pseudomycelia
- pravým myceliem a tvorbou přehrádek
- myceliem se spřežkami

- **Zvláštní (atypické) buňky**

V některých speciálních případech se vytváří abnormálně velké buňky, jejichž význam spočívá ve funkci teliospor, ochrany před nepříznivými vlivy nebo při rozmnožování rozpadáním hyf apod. Důkaz těchto buněk probíhá díky kultivaci na speciálních půdách.

U atypických buněk se soustředíme při zařazení na důkaz:

- chlamydospor (u *Candida albicans*)
- balistospor (u *Sporobolomyces*)
- teliospor (u *Rhodosporidium*)
- artrospor (u *Trichosporon*) [17]

2.2.1.2 Fyziologické vlastnosti

- **Kultivační teplota**

Sleduje se růst kultury při různých teplotách na sladinném nebo jiném plnohodnotném pevném nebo tekutém médiu.

Podrobněji se určujeme teploty:

- optimální teplotu pro růst mikroorganismu
- teplota minimální, při které mikroorganismus ještě roste
- teplota maximální, při které mikroorganismu ještě roste

- **Sporulace**

Sporulace kvasinek Askomysetes se indukuje použitím speciálních půd a kultivačních podmínek. Používá se například Fowellův agar (0,5 % octanu sodného, 0,23 % chloridu draselného a 2 % agaru) nebo mrkvový agar. Kultura se kultivuje tři dny ve sladinně při 28 °C. Potom se sladina oddělí a sediment se suspenduje v Rigerovu roztoku (7,5 g NaCl, 0,075 g KCl, 0,1 g NaHCO₃, 0,1 g CaCl₂ se doplní na 1000 ml destilovanou vodou). 2 ml této suspenze se sterilní pipetou nanese na povrch agaru v široké zkumavce a inkubuje se 10 dní při pokojové teplotě. Spory kvasinek jsou světlolomné tělíška pravidelných tvarů, takže je možné je pozorovat bez zvláštní techniky a barvení.

U sporulace dále podrobněji zkoumáme:

- sporulační aktivitu
- počet spor v asku
- uložení spor v asku
- tvar spor
- tvorbu basidií a bazidiospor
- pohlavní typy
- anastomózy

- **Barviva**

Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy jsou zpravidla bílé nebo krémové barvy. Některé rody však syntetizují i jiné barviva např. žluté, pomerančové, červené anebo černé.

Dále zkoumáme:

- flavinové pigmenty
- karotenoidní pigmenty
- melanoidní pigmenty

- **Polysacharidová pouzdra**

Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy vytváří extracelulární polysacharidy, někdy je produkují v takovém množství, že vytvoří pouzdro.

U polysacharidového pouzdra dále zjišťujeme:

- tloušťku pouzdra
- polysacharidy podobné škrobu [17]

2.2.1.3 Výživa

- **Potřeba vitamínů**

Zjišťuje se, zda dokáže kultura růst na umělém živném médiu bez vitamínů a pokud ne, jaké vitaminy potřebuje pro svůj růst, vývoj a rozmnožování.

Zkoumáme:

- růst v prostředí bez vitamínů
- potřebu jednotlivých vitaminů (kvalita)
- potřebu jednotlivých vitaminů (kvantita)

- **Kvašení cukrů**

Kvašení cukrů je jednou ze základních vlastností kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů a této vlastnosti se využívá i při jejich třídění.

Základní vlastnosti, které zkoumá taxonomie:

- kvašení jednotlivých cukrů (maltóza, glukóza, sacharóza, galaktóza, laktóza, rafinóza, popř. trehalóza)
- kvasné typy (podle kvašení maltózy a sacharózy)
- stupeň kvašení rafinózy

- **Růst v přítomnosti jediného zdroje uhlíku**

Zdroj uhlíku je další určující vlastností pro organismy obecně, proto i této vlastnosti se využívá k jejich rozpoznání, třídění a taxonomickému zařazení.

Znaky, na které se zaměřujeme podrobněji:

- cukry a cukerné alkoholy
- alkoholy

- **Růst v přítomnosti jediného zdroje dusíku**

Připraví se speciální N-agar (2 % glukóza, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1 % dusíkaté látky), ve kterém chybí zdroj dusíku. Tři dny stará kultura se rozsuspenduje v 1 ml sterilní vody a přimíchá do agaru a naleje do Petriho misky. Na povrch agaru se položí kroužky filtračního papíru nasáknutého 10% roztokem KNO_3 , L-lyzinu, kreatinu, L-tryptofanu a nebo D,L-tryptofanu. Inkubuje se při 28 °C. Pozoruje se, zda se v okolí jednotlivých filtračních kroužků objeví známky růstu kultury.

Důkladněji se zkoumá:

- důkaz redukce dusičnanu na dusitan

- **Asimilace maltotriózy a maltotetraózy**

Živná půda obohacená o maltotriózu a maltotetraózu se nalije do zkumavky a zaočkuje zkoumanou kulturou a nechá se dva týdny prokvášet, následuje chromatografický rozbor (na papíře) prokvašené půdy. Na chromatogramu se zjistí, zda se objeví skvrny maltotriózy

a maltotetraózy značí jejich stálou přítomnost v půdě, což by znamenalo, že danou kulturou nejsou asimilovány [17].

2.2.1.4 Vliv okolního prostředí

- **Zvýšený osmotický tlak v prostředí**

Vliv osmotického tlaku má zásadní vliv na životaschopnost a metabolické pochody v buňce.

Dále podrobněji zjišťujeme:

- chování v prostředí: 5% kvasničná voda anebo 0,4% sušeného kvasničného extraktu apod.
- růst v prostředí kvasničné vody a 60% sacharózy
- kvantitativní test (roztoky s různou koncentrací fruktózy)
- halofilitu

- **Tolerance vůči ethanolu**

Tolerance vůči ethanolu se stanovuje ve sladince, do které se před zaočkováním přidává odstupňované množství ethanolu. Inkubuje se při optimální teplotě a zaznamenává se koncentrace ethanolu v prostředí, při které kultura ještě roste.

- **Vliv aktidonu (cykloheximid)**

Cykloheximid je antibiotikum schopné inhibovat růst kvasinek. Podle účinku na jednotlivé kmeny, můžeme říci o některých, že jsou citlivé nebo rezistentní vůči účinku tohoto antibiotika. Existuje samozřejmě mnoho úrovní citlivosti (rezistentnosti). Test probíhá na sladinném agaru v Petriho miskách a probíhá obdobně jakou u testu asimilace maltotriózy a maltotetraózy (filtrační kroužky jsou nasáklé různou koncentrací aktidonu).

- **Vliv organických kyselin**

Tento faktor je důležitý zejména u kmenů používaných v průmyslu. Sleduje se vliv 2% kyseliny mléčné a 2% kyseliny vinné v 5% kvasničné vodě s 2 % glukózy [17].

2.2.1.5 Biofyzikální vlastnosti

- **Sedimentační rychlost**

Tento parametr je důležitý zejména z technologického hlediska (výroba piva, vína). Test začíná zaočkováním kvasinek do 50 ml sladinu a inkubují se při 20 – 22 °C 5 dní. Poté následuje odstředění a promytí 3% roztokem CaCl₂. pH roztoku se upraví na 4,5 a promyté kvasinky se rozsuspendují v 50 ml tohoto roztoku. Následuje odpipetování 15 ml suspenze do zkumavky o průměru 1,8 cm. Měřenou veličinou je zákal, odečet se provádí v 5-ti až 10-ti minutových intervalech (prvních 30 minut po 5 minutách, poté po 10 minutách, dokud kvasinky sedimentují).

- **Elektroforetická pohyblivost**

Také tato vlastnost je nejdůležitější pro produkční kmeny. Buňky zdravé a vitální nesou záporný náboj. Pro měření se používá speciální mikroměrka, do které vchází elektrický proud [17].

2.2.1.6 Enzymy

- **Ureáza**

Test na přítomnost ureázy se provádí v tekutém prostředí s fenolovou červenou (20 g močoviny, 9,1 g KH_2PO_4 , 9,5 g NaHPO_4 , 0,01 g fenolové červené a 0,1 g práškového kvasničného extraktu se rozpustí v 1000 ml destilované vody, pH se upravuje na 6,2) anebo už v komerčně připravených půdách. Zaočkovaná půda se inkubuje tři dny při 28 °C tři dny. Přítomnost ureázy se prokáže karmínově-červeným zbarvením.

- **Test s kyselinou fosfomolybdenovou**

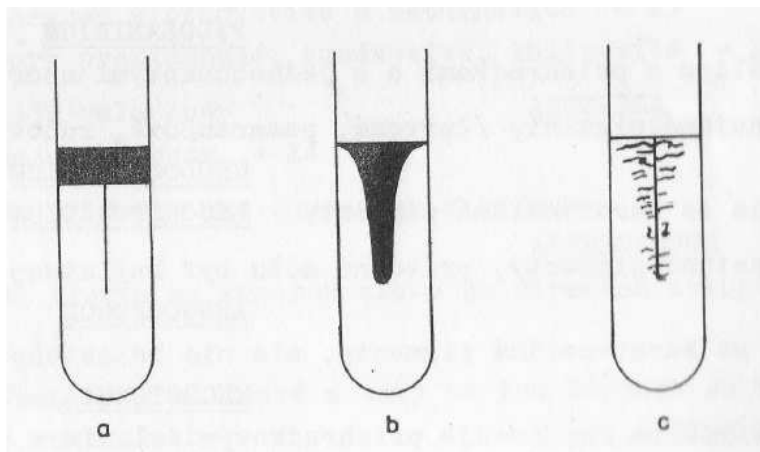
Nejdříve se připraví speciální půda: vysterilizuje se základní prostředí (1 % peptonu, 4 % sacharózy a 1,5 % agaru, pH se upravuje na 7,6) a po ochlazení se přidá 12,5% roztok kyseliny fosfomolybdenové (pH 1) – 1,5 ml na 1000 ml média. Po této přípravě se půda nalévá do Petriho misek a zaočkovává se tři dny starou kulturou. Inkubuje se při 28 °C. Zaznamenává se barva nátěru – bílá, bleděmodrá, tmavomodrá, hnědá, olivová apod. dále se sleduje i difúze barviva do agaru.

- **Kataláza**

Katalázová aktivita se měří pomocí kultury kvasinek (staří 1 – 2 dny) suspendovaných v 0,05 M roztoku fosforečnanového pufru o pH 7,2. Celková reakční směs pak obsahuje 7 ml 0,05 molárního pufru s kvasinkami a 5 ml 5 mM roztoku H_2O_2 . Inkubace probíhá při 40 °C. Reakce začíná smícháním suspenze kvasinek s roztokem peroxidu vodíku. Ze směsi se odebírají 2 ml v čase nule a pak po 30, 60, 90 a 120 minutách. Vzorek 2 ml se odpipetuje do zkumavky s roztokem titaničité reagenty, která zastavuje reakci a pomocí spektrofotometru se při vlnové délce 410 nm měří intenzita žlutého zbarvení, která odpovídá zbytkovému peroxidu.

- **Proteolytické enzymy**

U proteolytických enzymů se testy soustřeďují na rychlost autolýzy buněk kultury, výsledek testu se pak přepočítává na 100 mg sušiny kvasinek. V testu se využívá skutečnosti, že aminokyseliny uvolněné autolýzou tvoří s mědí rozpustné soli. Dále pak taxonomy zajímá schopnost kvasinek ztekucovat želatinu. Sladinová želatina a se nalije do zkumavky a jehlou se vpíchne tři dny stará kultura. Pozoruje se, zda želatina ztekucuje a jakým způsobem viz Obr. 10.



Obr. 10: Způsob ztekucování želatiny, a – celkové, b – vrstevnaté, c – stromečkové [17].

- **Štěpení tuků**

Na sterilní Petriho misku se v tenké vrstvě neleje hovězí tuk a nechá se v ledničce ztuhnout, přes něj se pak naleje tenká vrstva Gorodkova agaru s 0,1% CaCO_3 . Jestliže dochází ke štěpení tuku, můžeme pozorovat zákal.

- **Štěpení eskulinu a arbutinu**

Základem testu je 2% agaru v 5% kvasničné vodě a k tomu se přidá 0,5 % eskulinu nebo arbutinu, po sterilizaci se přidá 1 kapka 10% roztoku chloridu nebo citranu sodného. Takto připravená půda se naleje na Petriho misku a zaočkuje, pokud kultura dokáže eskulin nebo arbutin štěpit, pozorujeme hnědé zbarvení [17].

2.2.2 Moderní metody k identifikaci mikroorganismů

Moderní metody identifikace mikroorganismů mají v taxonomii mnohem kratší historii než metody tradiční. Jejich rozvoj a praktické využití je spjato s objevem PCR metody (v roce 1985 poprvé publikovaná v odborném časopise Science). Tato technika (podrobněji viz kapitola 2.3) spolu s celkovým pochopením všech dějů souvisejících s DNA tedy vedla k vytvoření nového směru napomáhajícímu taxonomickému zařazení organismů.

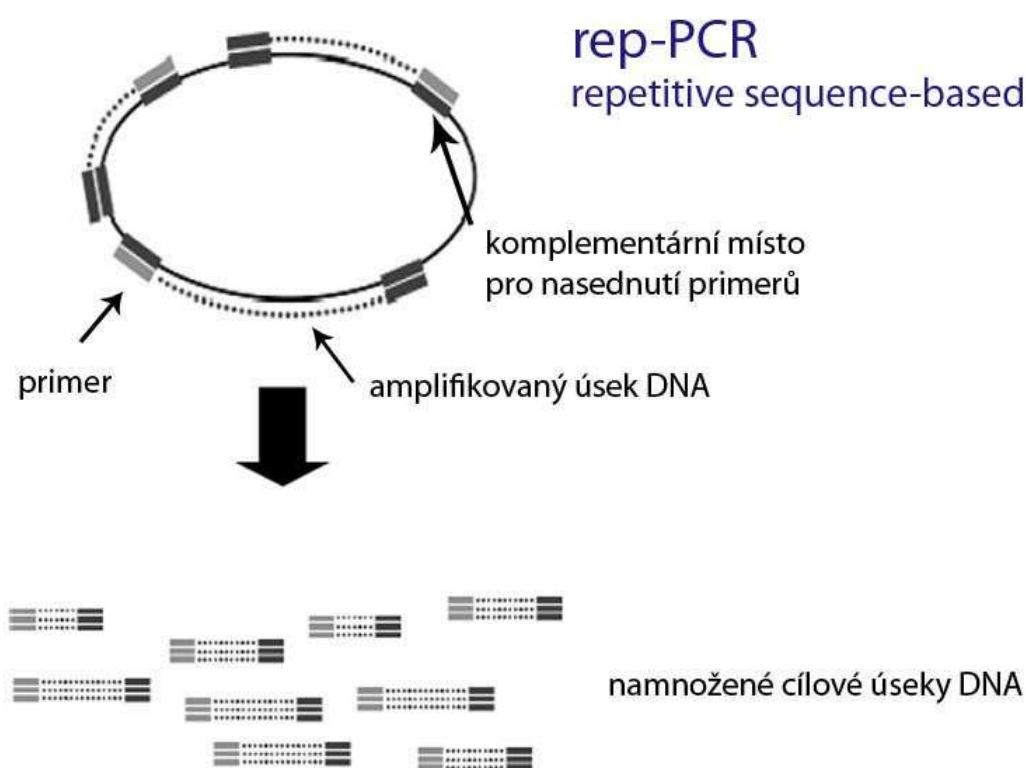
2.2.2.1 PCR-RFLP

PCR-RFLP se používá ke stanovení polymorfismu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR. PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. V závislosti na volbě primerů může být provedena analýza jakéhokoliv genu. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které se detekují elektroforeticky. Amplifikované produkty jsou štěpeny restrikční endonukleázou a poté opět analyzovány elektroforézou v agarozovém nebo polyakrylamidovém gelu. Vzorky jsou typizovány restrikčními spektry fragmentů amplifikované DNA. Podstatou polymorfismu jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozomů [18]. Počet i délka restrikčních fragmentů je pro daného jedince specifická [19].

Restrikční endonukleázy jsou ve své podstatě degradační enzymy a produkuje je asi 1500 různých bakteriálních kmenů. K přirozené restrikci dochází v důsledku toho, že bakterie produkují enzym, který cizorodou fágovou DNA degraduje dříve, než se může replikovat a řídit syntézu nových fágových částic. Vlastní bakteriální DNA, jejíž destrukce by samozřejmě vedla ke smrti buňky, je před napadením chráněna tím, že nese přídatné methylové skupiny, které blokují degradativní působení enzymu. Rozeznáváme tři různé skupiny restrikčních endonukleáz vyznačující se částečně odlišným působením. Typy I a III jsou složité, pro restrikční analýzu se příliš nehodí, a proto se téměř pro tyto účely nepoužívají. Typ II je naproti tomu ideální pro použití v této oblasti. Restrikční endonukleázy II typu se vyznačují především tím, že každý enzym rozeznává specifickou nukleotidovou sekvenci, v níž molekulu DNA štěpí, příslušný enzym pak štěpí DNA, buď přímo v této sekvenci, nebo někde jinde [20, 19].

2.2.2.2 PCR s krátkými primery (PCR-fingerprinting)

Princip PCR metody s krátkými primery, nazývaná také jako PCR-fingerprinting (rep-PCR), vychází z přítomnosti jednoduchých repetitivních sekvencí (někdy označované jako mikrosatelity) v DNA. Tyto mikrosatelity se nachází nahodile jak v kódujících oblastech DNA - exonech tak i v nekódujících - intronech. Pomocí krátkého nepárového primeru (označováno v anglické literatuře často jako SPAR) je pak tedy analyzována celá genomová DNA bez rozdílu [21]. Kostru těchto nepárových primerů tvoří obvykle sekvence (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n. Díky těmto krátkým primerům pak dostáváme jedinečný obraz fragmentů udávající různou velikost naamplifikovaného úseku DNA, tuto metodiku a následně vzniklý obraz nazýváme též jako PCR-fingerprinting [21, 22, 23, 24]. Tento DNA-fingerprinting se využívá pro rozlišování mikroorganismu na úrovni druhu a jedná se o relativně rychlou a nenáročnou metodu. [25].



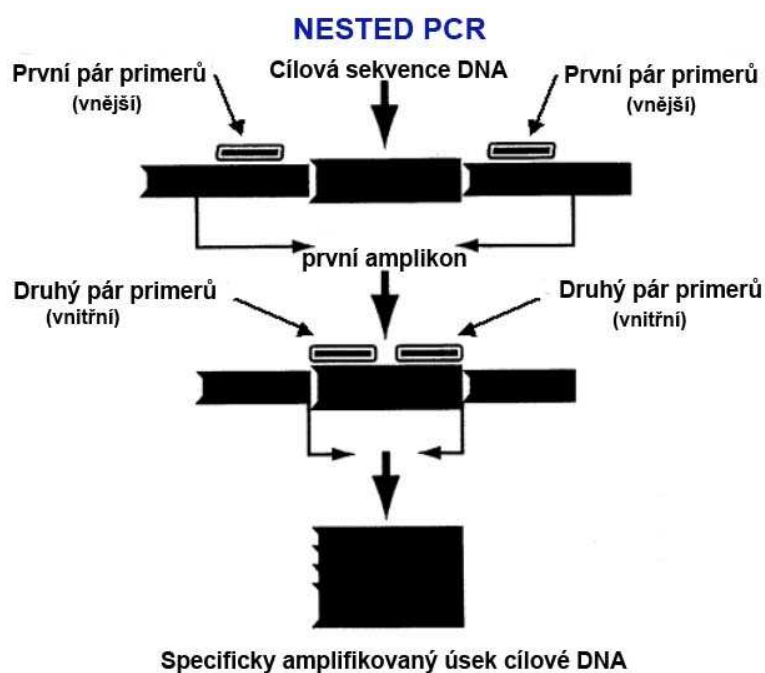
Obr. 11: Schématické znázornění principu rep-PCR využívající krátké primery kompetitivní k repetitivním sekvencím nacházejícím se v DNA [24].

2.2.2.3 MULTIPLEX-PCR

Metoda PCR má mnoho různých modifikací vyvinutých pro různé účely, mezi tyto různé varianty patří i mnohonásobná („multiplex“) PCR. Princip spočívá v tom, že do PCR směsi je přidáno více párů primerů rozpoznávající různé cílové sekvence, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Tímto postupem lze ušetřit čas, ale výhodou jsou také nižší cenové náklady. Pro tuto variantu PCR je ale nezbytná důkladná optimalizace metody [26, 18].

2.2.2.4 NESTED-PCR

Odstupňovaná PCR nebo také NESTED PCR je další možností obměny klasické PCR. NESTED je založena na využití vnějších a vnitřních primerů. Tato amplifikace probíhá ve dvou krocích. První krok zahrnuje přibližně 15-30 cyklů, ve kterých se využívá tzv. vnějších primerů. Z prvního kroku dostáváme produkt, který se ale dále přenesen do nové mikrozkušavky a je postoupen do druhého amplifikačního kroku. Tento krok opět zahrnuje přibližně 15 - 30 cyklů, kde se používají tzv. vnitřní primery, které jsou komplementární k vnitřní sekvenci naamplifikované v prvním kroku (princip viz Obr. 12). NESTED PCR je velmi citlivá, specifická a eliminuje chyby amplifikace nesprávného úseku nukleové kyseliny [26, 18].



Obr. 12: Princip NESTED PCR [48].

2.2.2.5 RAPD-PCR

Zkratka RAPD je odvozena z anglického Random Amplification of Polymorphic DNA. Jde o poměrně jednoduchou techniku fingerprintu, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci. Metoda využívá jeden tzv. arbitrární primer v délce obvykle 10 nukleotidů o libovolné sekvenci s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA. Při PCR reakci pak dochází k nasednutí tohoto primeru na více místech a u těch, která nejsou od sebe příliš vzdálená (max. 2000 bp) dochází k amplifikaci úseku mezi nimi. Výsledkem RAPD jsou pak tedy různé dlouhé amplifikované úseky DNA dávající jedinečný fingerprinting [18].

2.2.3 Kvasinky rodu *Saccharomyces* a jejich taxonomické zařazení

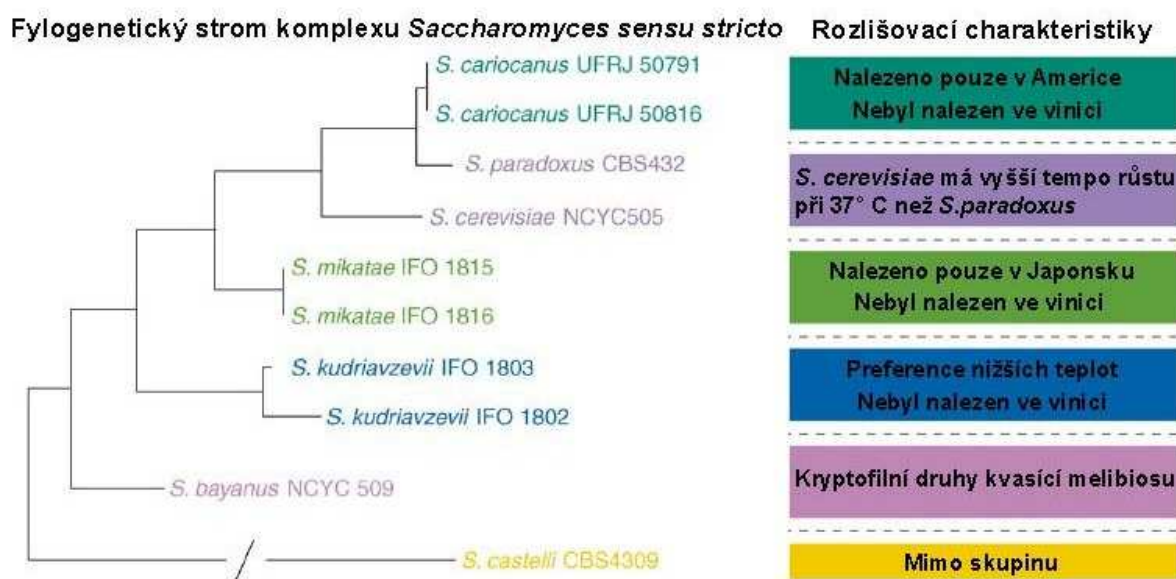
Tradiční metody používané pro taxonomické zařazení mají řadu nevýhod, jsou složité, časově náročné, výsledky nejsou vždy jednoznačné a některé výsledky získáme až za několik měsíců. Tyto konvenční metody používané pro identifikaci kvasinek značně spoléhají na fyziologické charakteristiky, jako je schopnost izolovaných kvasinek asimilovat různé zdroje uhlíku. Jak by se dalo očekávat, u velmi blízkých druhů kvasinek lze tuto metodiku

použít jen omezeně, protože tyto charakteristiky mají velmi podobné a tyto fyziologické rozdíly mohou být kódovány jen jediným proměnlivým genem [27]. Naproti tomu moderní metody se vyznačují jednoduchostí, rychlou identifikací a výsledky jsou řádově do několika dnů. Proto právě tyto metody zaznamenávají v současné době čím dál větší rozvoj. Tento trend se samozřejmě promítl i do identifikace kvasinek a v dnešní době jsou tyto metody určování používány přednostně.

V současné době jsou na základě počtu chromosomů v buněčném jádře, sekvence ribozomální DNA a velikosti a stability mitochondriální DNA rozlišovány v rámci rodu *Saccharomyces* tři druhové skupiny:

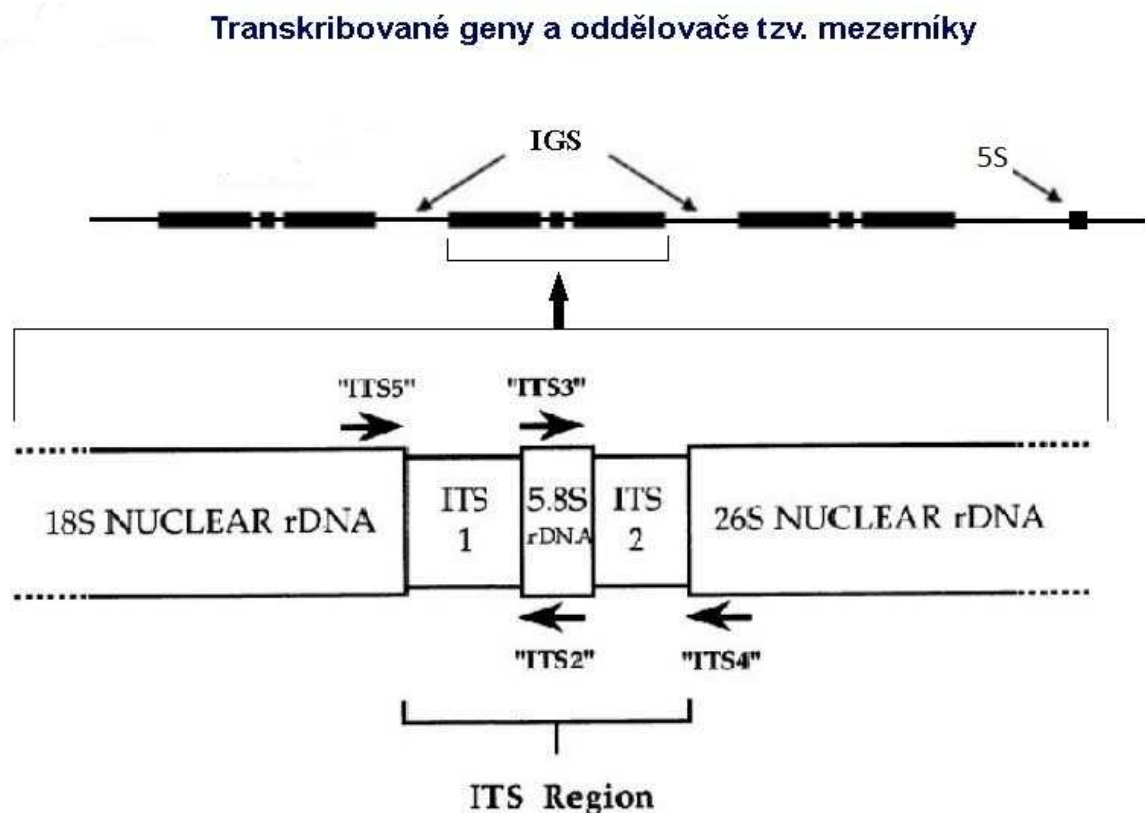
- Komplex *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces* v úzkém slova smyslu), který zahrnuje druhy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a *S. pastorianus*, využívané v kvasných technologiích a druhy *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* a *S. paradoxus* izolované z prostředí [2].
- Komplex *Saccharomyces sensu lato* (*Saccharomyces* v širším slova smyslu) je značně různorodou skupinou druhů *S. dairensis*, *S. castelli*, *S. exiguus*, *S. servazzii* a *S. unisporus*.
- Skupina tvořená jediným druhem – *S. kluyveri* [28, 29, 21]

Skupina *Saccharomyces sensu stricto* byla původně navržena na základě morfologických a fyziologických vlastností. Pomocí moderních identifikačních technik ale byly do komplexu *Saccharomyces sensu stricto* zařazeny výše vypsány rody. Nedávné odhady naznačují, že *S. cerevisiae* se rozchází s *S. paradoxus* a *S. cariocanus* od společného předka zhruba před 5-10 miliony lety a následně se rozchází i tyto dva rody. Odhady odlišnosti *S. cerevisiae* od *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* a *S. bayanus* naznačují, že tyto sourozenci jsou mnohem starší (přehledný fylogenetický strom komplexu *Saccharomyces sensu stricto* viz Obr. 13). Celkově tyto data ukazují, že komplex *Saccharomyces sensu stricto* je poměrně mladý a existuje důkaz, že nové druhy se stále objevují [30].



Obr. 13: Fylogenetický strom komplexu *Saccharomyces sensu stricto* [30].

U kvasinek rodu *Saccharomyces* jsou zastoupeny čtyři různé rDNA geny – 5S, 5, 8S, 18S a 26S, ty jsou určitým pravidelným způsobem seskupeny, opakují se a tvoří jeden klastr na chromosomu XII. 18S podjednotka a 26S podjednotka jsou odděleny ITS oblastí (internal transcribed spacer). V rámci podjednotky 26S se na 5' konci nachází ještě D1/D2 doména, která bývá také využívána k identifikaci. Jednotlivé geny jsou pak od sebe odděleny IGS oblastí (intergenic spacer). ITS a IGS jsou (s výjimkou 5, 8S a 5S) nekódovací oblasti (struktura genomu podrobněji viz Obr. 14). Amplifikací těchto úseků pomocí PCR metody lze detekovat polymorfismus, který pak lze využít pro taxonomické řazení kvasinek a studii fylogenetických stromů [27, 9, 31]. Kromě rDNA (ribosomální DNA) využívají moderní metody také mtDNA (mitochondriální DNA), RNA a další.



Obr. 14: Znáznornění struktury části genomu kvasinek rodu *Saccharomyces*; “ITS5“, “ITS3“, “ITS2“, “ITS4“ – primery komplementární k části DNA označené šipkou [49].

V praxi se řadí mezi nejvyužívanější metody na identifikaci kvasinek beze sporu PCR-RFLP (princip podrobněji viz kapitola 2.2.2.1 PCR-RFLP). Například ji lze využít na analýzu ITS1, ITS2 regionu – primery ITS1 a ITS4 a NTS regionu (nachází se v rámci IGS oblasti), nebo také na analýzu chromozomálního genu MET2, D1/D2 domény podjednotky 26S rDNA pomocí primerů NL-1 a NL-4 [32, 33, 34, 21]. Pro PCR s krátkými primery je na detekci vhodná opět oblast tzv. mezerníků, využití zde nacházejí primery M13, (GACA)₄, či (GTG)₅ [35, 36, 37, 21].

2.3 Polymerázová řetězová reakce - PCR

V 80. letech minulého století vrcholila revoluce v oblasti klonování genů, zájem o analýzu DNA byl nebývalý a právě v této době byl také objeven princip PCR – polymerase chain reaction. Do češtiny se tato zkratka překládá jako polymerázová řetězová reakce, název zároveň vystihuje i samotný princip této metody. PCR usnadnila řadu postupů v oblasti klonování genů, rozšířila také možnosti analýzy DNA a umožnila nalézt nové aplikace, jako je archeogenetika, molekulární ekologie, analýza DNA v soudním lékařství apod.

Základní rozdíl mezi PCR a klonováním genů spočívá v tom, že u PCR se nejedná o metodu vyžadující živé buňky. Polymerázová řetězová reakce se provádí v jedné mikrozkuhavce tím způsobem, že se vzorek DNA smíchá se sadou reakčních komponent a mikrozkuhavka se následně vloží do termocykléru, zařízení, které umožňuje inkubování směsi při potřebných teplotách v určitých cyklech. Experiment PCR může proběhnout v několika hodinách, kdežto izolace genu pomocí klonování trvá týdny i měsíce.

O polymerázové řetězové reakci tedy můžeme říci, že jde o velmi selektivní amplifikaci vybraných segmentů DNA. Pro praktickou realizaci je ale nutné znát přesnou oligonukleotidovou sekvenci okrajové části vybraného úseku DNA, pak si můžeme zvolit libovolnou část molekuly. PCR tedy probíhá pouze za podmínky, kdy dva krátké oligonukleotidy (primery) komplementárně nasedají každý na jedno vlákno dvoušroubovice, a tím tak ohraničí vybranou část DNA pro kopírování. Tento vybraný úsek bývá často označován jako templátová DNA. Amplifikaci provádí enzym DNA-polymeráza, který je izolován z termofilního organismu, aby odolala vysokým teplotám v termocykléru [20].

PCR má i některá omezení. Aby se primery připojily na správná místa (na oba konce příslušného úseku DNA) musíme znát přesné sekvence, kde mají nasednout na původní vlákno DNA. Metodou PCR lze také kopírovat pouze omezeně dlouhé úseky DNA. U úseků delších jak 40 kb se už obvykle musí použít klonování genů. Klonování genů je tedy stále jediný způsob, jak izolovat dlouhé úseky genů nebo geny, které nebyly předtím studovány.

2.3.1 Komponenty PCR směsi

Základními komponentami PCR směsi pro polymerázovou řetězovou reakci jsou:

1. dva oligonukleotidové primery (každý přibližně 20 oligonukleotidů)
2. templátová DNA
3. termostabilní DNA-polymeráza
4. dNTP (směs všech nukleotidů)
5. pufr obsahující Mg^{2+} ionty [38]
6. značení – sondy (pouze u kvantitativní PCR)/ethidium bromid
7. redestilovaná voda

• Primery

Primery jsou základem úspěšné PCR reakce. Pokud jsou primery navrženy správně, dojde k amplifikaci jediného správného úseku templátové DNA. Nezdařený experiment většinou svědčí o tom, že amplifikace neproběhla anebo, že se amplifikoval nesprávný úsek DNA a tím jsme získali nesprávné produkty. Hlavním předpokladem správné hybridizace primerů s templátovou DNA je, že primery s ní dokonale korespondují.

Délka primerů je dalším důležitým faktorem. Když budou příliš krátké, mohou hybridizovat s více cílovými místy na DNA a vznikne nám tedy celá skupina nežádoucích produktů. Například pokud bychom na PCR experiment s DNA lidského organismu (3 000 000 kb) použili primery o délce 8 nukleotidů, bude existovat 46 000 (4^8) možných míst, kde by mohlo dojít s hybridizací primeru na templátovou DNA. U primerů o délce 17 nukleotidů je už nanejvýš jedno hybridizační místo (4^{17}), zde bychom tedy měli získat jeden zcela specifický produkt. Delší primery (více jak 20-ti nukleotidový) pak už mají nepříznivý vliv na rychlost hybridizace – hybridizace probíhá výrazně pomaleji. Pak tedy v rámci reakčního cyklu nestihne dojít k hybridizaci k templátové DNA vůbec nebo k ní nestihne dojít v plné míře [20].

Pro konstrukce ideálních primerů pro daný experiment se v současné době využívá různých počítačových programů [38]. Pro návrh vhodných primerů platí několik zásad:

- obvykle se používají v délce 18 – 24 nukleotidů
- neobsahují sekundární strukturu
- mají vyvážený poměr G/C a A/T párů
- nejsou vzájemně komplementární (netvoří vzájemně dimery)
- vhodná teplota tání, která nebrání k připojení k templátové DNA (cca 55 °C – 65 °C)
- oba primery musí mít podobnou teplotu tání
- jejich ideální koncentrace ve směsi se pohybuje v rozmezí 0,1 – 0,6 μM, vyšší koncentrace obvykle vede ke zvýšení tvorby nespecifických produktů na 5' konci je možné přidat nekomplementární báze (např. pro zavedení restrikčního místa) [18]

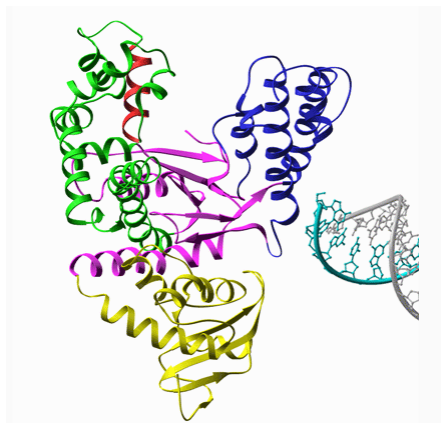
- **DNA-polymeráza**

Nejčastěji používanou DNA-polymerázou je *Taq* DNA-polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato bakterie se řadí mezi termofily, vyskytuje se a žije převážně kolem horkých vřídél, proto je její DNA-polymeráza odolná proti vysokým teplotám (denaturaci) a je tedy ideální pro použití v PCR metodě [18]. Jedním z kroků v PCR je totiž denaturace dvoušroubovice – oddělení vláken při 95 °C, pokud by tedy došlo k inaktivaci DNA-polymerázy, bylo by nutné po každém cyklu přidat novou aktivní polymerázu, což by činilo metodu velmi nákladnou. Teplotní optimum této termostabilní polymerázy se pohybuje okolo 75 °C a poločas inaktivace při 95 °C je přibližně 40 minut [38].

Všechny DNA-polymerázy dělají při syntéze nového vlákna chyby. Tyto chyby dokáží některé typy DNA-polymeráz zpětně opravit pomocí své korekturní (proofreading) aktivity, která je spojena s polymerázou nesoucí 3' → 5' exonukleázovou aktivitu. Tato aktivita ale u *Taq* DNA-polymerázy nebyla prokázána a předpokládá se, že ji nemá. K opravám chyb tedy nedochází a na nově syntetizovaném vlákně vzniká přibližně 1 chyba na 9 000 nukleotidů, po doběhnutí PCR (tedy přibližně po 30-ti cyklech) se 1 chyba objevuje již na každých 300 bp. Výsledný produkt PCR totiž obsahuje kopie kopií, takže polymerázou vnesená chyba se násobí a výsledné fragmenty obsahují kopie předchozích chyb a k tomu případně ještě nové chyby vnesené během posledního cyklu syntézy [20].

Kromě *Taq* DNA-polymerázy se používají také *Pwo* a *Pfu* DNA-polymerázy (izolované z *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*). Tyto enzymy mají mimo své polymerázové aktivity také 3' → 5' exonukleázovou aktivitu. Produkty těchto enzymů jsou syntetizovány s desetinásobně vyšší přesností ve srovnání s *Taq* DNA-polymerázou. Jejich nevýhodou však je jejich nižší procesivita (tj. schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA). V současné době

jsou k dispozici také komerčně dostupné směsi termostabilních DNA-polymeráz, které vykazují kombinaci výhodných vlastností tj. procesivity a přesnosti [38].



Obr. 15: *Taq* DNA-polymeráza [50].

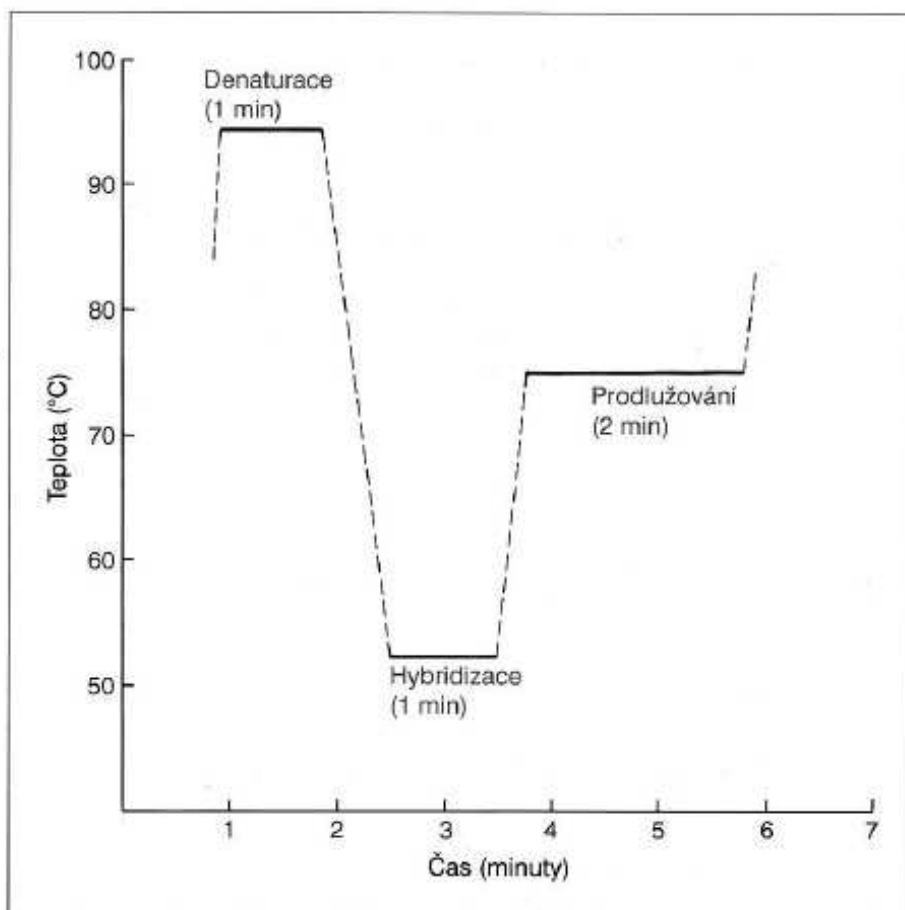
2.3.2 Faktory ovlivňující průběh PCR

PCR je automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA-polymerázu. Avšak i termostabilní DNA-polymeráza katalyzuje prodlužování primerů při laboratorní teplotě, což může být příčinou vzniku chyb a vzniku nespecifických produktů zejména při nízké koncentraci templátové DNA.

Vysoká citlivost a specifita PCR způsobuje, že kontaminace i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA postačuje pro získání falešného signálu. Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávovaných roztoků, používání UV světla, používání jednorázových rukavic apod. [38, 20].

Během každého cyklu PCR se třikrát změni teplota:

- Denaturační teplota – uvolnění jednotlivých vláken, 94 °C
- Hybridizační neboli annealing teplota – připojení primerů, 30-65 °C
- Extenzivní teplota – syntéza DNA, 65-75 °C



Obr. 16: Grafické znázornění typického teplotního profilu PCR reakce [20].

Hybridizační teplota je důležitým faktorem, protože na ní závisí přesnost reakce. Hybridizace DNA-DNA je jev závislý na teplotě. Jestliže je teplota příliš vysoká, k hybridizaci nedochází a primery a templáty zůstávají oddělené. Když je teplota příliš nízká, vznikají nesprávně spárované hybridy, ve kterých ne všechny báze vytvořily správné a stabilní páry. Ideální teplotu odhadneme z tzv. teploty tání (melting temperature, T_m) hybridu vytvořeného mezi primerem a templátem. Teplota 1 – 2 °C pod touto teplotou by měla být dostatečně nízká, aby umožnila správné vytvoření hybridu mezi primerem a templátem, a zároveň příliš vysoká, než aby byl hybrid s jediným nesprávným párováním stabilní. Teplotu T_m můžeme zjistit experimentálně, ale častěji se k jejímu stanovení používá jednoduchého vzorce:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Zde je $[G + C]$ je počet bází G a C v sekvenci primerů a $[A + T]$ je počet bází A a T. Hybridizační teplotu experimentu tedy zjistíme tak, že pro každý primer vypočítáme teplotu T_m a tuto hodnotu v experimentu snížíme o 1 – 2 °C. Tyto dva primery bychom měli navrhnout tak, aby měli stejnou T_m , jinak se může stát, že správná teplota může být jen pro jeden primer příliš vysoká, nebo pro druhý příliš nízká [20, 39, 26].

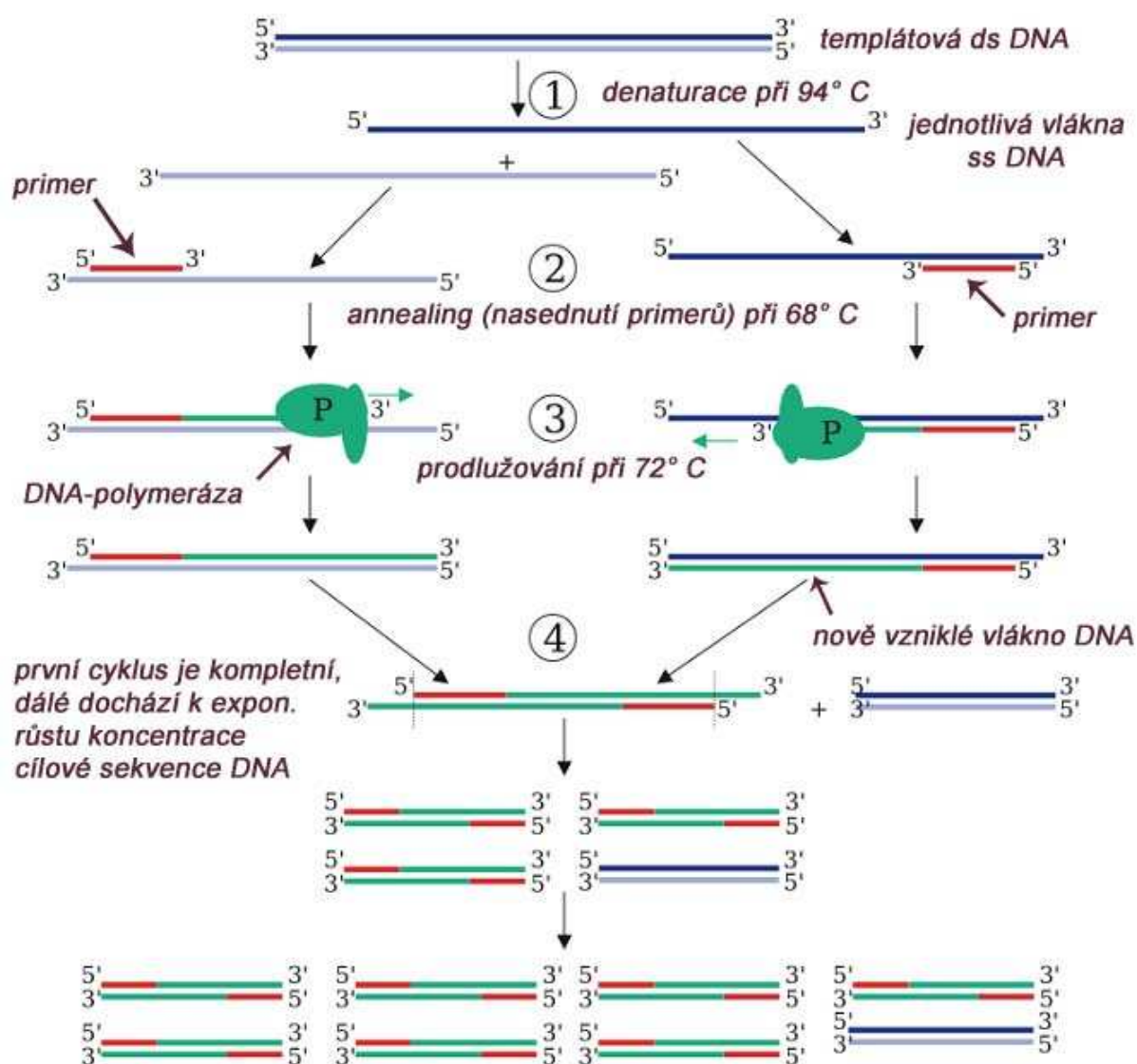
2.3.3 Princip PCR

Základní princip PCR spočívá v replikaci nukleových kyselin, resp. jejich vybraných úseků in vitro. Replikace nukleových kyselin jako taková je přitom základním kamenem pro všechny živé organismy a je nezbytná pro jejich přežití a rozmnožování. Podstatou metody PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců úseků DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ uskutečněna pomocí DNA-polymerázy. Tento amplifikovaný úsek DNA je vymezen z obou stran párem primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich $3'$ - konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů tedy probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně.

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

- V prvním kroku dochází k denaturaci dvouřetězcové DNA na dvě jednotlivá vlákna. Teplota v tomto kroku – 94°C .
- V dalším kroku na každé vlákno nasedne jeden z páru primerů, které jsou komplementární k určitému úseku na daném vlákně. Teplota v tomto kroku – $30\text{--}65^{\circ}\text{C}$.
- V posledním kroku dochází k samotné syntéze nových řetězců DNA za pomoci DNA-polymerázy. Teplota v tomto kroku – $65\text{--}75^{\circ}\text{C}$.

Tyto tři fáze se pak cyklicky opakují a konečným produktem je segment s konci definovanými primery. V prvním reakčním cyklu vznikají delší fragmenty, než odpovídá vzdálenosti vymezené zvolenými primery. Ve druhém cyklu poskytují tyto nově vzniklé molekuly již fragmenty DNA požadované délky, jejichž podíl exponenciálně roste v následujících cyklech reakce. Celé schéma PCR reakce vidíme na následujícím obrázku:



Obr. 17: Průběh PCR [51].

Vzhledem k vysoké citlivosti detekce produktů je možno tuto metodu použít pro velmi malé koncentrace původního vzorku DNA, teoreticky by postačovala i jedna jediná molekula DNA [38]. Celkový počet cyklů je přibližně 25 – 35, jejich počet se odvíjí od počáteční koncentrace templátové DNA. Tato koncentrace pak v každém dalším kroku roste exponenciálně a na konci procesu dostáváme miliardy kopií původního úseku [40]. Výsledný vzorek pak můžeme podrobit analýze v gelu pomocí elektroforézy. Amplifikovaný fragment DNA se po obarvení ethidium bromidem jeví jako samostatný proužek [41, 20].

2.3.4 Způsoby vyhodnocení PCR

Jedním ze způsobů vyhodnocení výsledků PCR metody je využití elektroforézy v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Jedná se o kvalitativní vyhodnocení [38]. Po obarvení vhodným barvivem se amplifikovaná DNA objeví jako pruh. Jestliže se očekávaný proužek neobjeví, nebo se objeví proužky jiné (odpovídající jiné molekulové hmotnosti než očekáváme), znamená to, že se někde stala chyba a experiment je nutně

zopakovat [20]. Elektroforéza patří mezi fyzikálně-chemické metody, k dělení molekul využívá jejich náboj, který umožňuje pohyb v el. poli. Využívá se tedy k separaci a purifikaci fragmentů DNA, ty se v elektrickém poli dělí na základě své molekulové hmotnosti - velikosti. Výhodou metody také je, že takto rozdělené fragmenty lze použít k dalším experimentům. Volbou velikosti částic a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností. Standardními agarosovými gely lze snadno separovat DNA velikostí 0,5 – 25 kb.

I jednotlivé formy DNA o stejné molekulové hmotnosti mají různou pohyblivost, která je pak dána především tvarem molekuly. Nadšroubovicová DNA forma je nejkompaktnější a tedy se v gelu pohybuje nejrychleji, další v pořadí rychlosti pohybu je pak lineární forma a nejpomalejším pohybem v gelu se vyznačuje otevřená cirkulární forma DNA. Dalšími faktory, které ovlivňují rychlost pohybu molekul jsou iontová síla pufru, vložené napětí, koncentrace ethidium bromidu apod.

Správné provedení experimentu začíná zvolením vhodné hustoty gelu, aby bylo zajištěno optimální rozdělení fragmentů na gelu. Vzorky DNA (produkty PCR) jsou aplikovány do jamek, které jsme utvořili při tunutí gelu pomocí tzv. „hřebínku“ při jednom z okrajů. Po vložení napětí začne pobíhat separace fragmentu na gelu podle jejich molekulové hmotnosti ve směru procházejícího napětí, v případě DNA od katody k anodě (DNA je záporně nabitou molekulou), nejkratší fragmenty doputují nejdále a největší molekuly zůstanou blíže startu. Délka jedné separace pomocí gelu trvá přibližně dvě – dvě a půl hodiny. Gel je barven ethidium bromidem, což je interkalační barvivo, které se váže do mezery mezi dvě vlákna DNA a červeno-oranžově fluoreskuje po ozáření UV zářením o vlnové délce 260 – 360 nm. Aby bylo možné fragmenty po proběhnutí elektroforetické separace vyhodnotit je nutné použít standard, který obsahuje fragmenty o přesně dané molekulové hmotnosti v daném rozpětí a tím lze provést porovnání velikostí fragmentů oproti standardu. Standard volíme podle velikosti dělených fragmentů [38].



Obr. 18: Vyhodnocení délky fragmentů pomocí gelové elektroforézy [52].

V dnešní době se i čím dál hojněji využívá kvantitativní vyhodnocení v reálném čase tzv. QP-PCR nebo také označována jako RT-PCR („real-time PCR“). Znamená to tedy, že produkt lze kvantifikovat přímo v průběhu reakce. Zjištění množství (koncentrace) nukleových kyselin je důležité pro detailní studium genové exprese nebo diagnostiku některých patogenů, využívá se také v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu bodových mutací, delecí nebo chromozomových aberací. RT-PCR se provádí prostřednictvím zařízení, které nejen cyklicky mění teploty, ale také umožňuje fluorescenční detekci v reálném čase a eliminuje tím vyhodnocení pomocí gelové elektroforézy. Kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR můžeme provést třemi různými metodami:

1. Využití interkalačního barviva vázajícího se do DNA.
2. Využití fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu.
3. Využití fluorescenčně značených primerů [18].

2.3.5 Využití PCR v praxi

Objev techniky PCR a její rozvoj umožnil vývoj mnohých nových experimentálních přístupů, které dříve nebylo možné realizovat. PCR zasáhla téměř do všech molekulárně-biologických odvětví. Pro každou aplikaci je nutné postup PCR optimalizovat a nastavit vhodné podmínky. Před oficiálním zavedením PCR do praxe a uznání metody jako průkazné, je nutné, aby prošla několika testy. Mezi nejčastější využití polymerázové řetězové reakce patří:

- detekce infekčních mikroorganismů a virů v prostředí a potravinách (*E. coli*, chlamydie, salmonela)
- kontrola potravinářských výrobků (zjišťování přítomnosti GMO, mikrobiologická kontrola jakosti apod.)
- mapování genomů
- charakterizace genů
- prenatalní diagnostika dědičných chorob
- preimplantační diagnostika a typizace
- průkaz identity v kriminalistice a při určování paternity a příbuznosti
- analýza alelických sekvenčních změn
- analýza DNA z prehistorických fosilií
- izolace určitého genu ze vzorku tkáně
- izolace DNA inkorporací změněných nukleotidů – příprava DNA sond pro hybridizaci
- příprava cDNA na základě zpětného přepisu mRNA pomocí RT-PCR
- získání fragmentů DNA pro přímé klonování úseků DNA
- příprava velkého templátu pro sekvencování
- oligonukleotidově řízená metageneze [38]

Z výčtu aplikací PCR lze vyvodit, že se jedná o metodu teď již zcela nepostradatelnou. Uplatnění nachází jak v základním výzkumu tak i aplikovaném genetickém výzkumu, v klinických disciplínách a i v takových odvětvích jako je archeologie či soudnictví.

Na příkladu si můžeme vysvětlit přínos PCR. Jednou z nejčastějších aplikací PCR je detekce bakteriálních a virových infekcí, dříve používané konvenční diagnostické metody jsou založeny na schopnosti kultivovat tyto patogenní organismy v kultuře nebo detekovat jejich přítomnost u pacienta pomocí protilátek. Kultivační techniky jsou ale často náročné (obtížné napodobení vhodných kultivačních podmínek pro daný organismus), zdlouhavé (až několik týdnů) a některé imunologické metody bývají málo citlivé. Naproti tomu detekce patogenů prostřednictvím PCR, která využívá amplifikaci konzervativní geonomové sekvence může detekovat již 10 bakterií mezi 10^6 eukaryotických buněk. Spolehlivá a citlivá diagnostika je zvláště důležitá například při detekci virů HIV [18, 26].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Potřebné přístrojové vybavení, mikroorganismy a chemikálie

3.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

Pomůcky a přístrojové vybavení, které jsem potřebovala pro svoji experimentální část:

- vortex LABNET VX 100, (Biotech s.r.o., ČR)
- vortex-Genie 2, MO Bio, (Biotech s.r.o., ČR)
- mikropipety Biohit, (Biotech s.r.o., ČR)
- termostat IP 100-U LTE, (SCIENTIFIC)
- termocyklér PTC-100TM, (MJ Research, Inc, USA)
- PCR box- AURA MINI, (Bioair instruments, Itálie)
- mikrovlnná trouba (ETA 1195, ČR)
- analytické váhy, (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- elektroforetická vana, Owl separation systeme, model - B2, (Biotech s.r.o., ČR)
- předvážky EK-600 H, A&D, (Instruments LTD, Japonsko)
- transluminátor, Ultra Lum. (INC, USA)
- software Scion Image, (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis, (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Qubit™ Fluorometer, (Invitrogen™)
- sterilní box pro mikrobiologickou práci
- lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- parafilm, (American Nacional Can™, USA)
- laboratorní sklo
- mikrozkuhavky Eppendorf
- plastové Petriho misky
- bakteriologické kličky
- buničitá vata
- kahan

3.1.2 Chemikálie

Ke své experimentální části jsem použila následující chemikálie:

- 10x KAPA Taq Buffer A – 1,5 mM, (KAPA BIOSYSTEMS)
- KAPA Taq – 5 U/μl, (KAPA BIOSYSTEMS)
- dNTP Mix – 12,5 mM, 500 μl, (JENA BIOSCIENCE)
- primer M13, (GAC)₅ a (GAG)₅ – 100 pmol/μl, (Elisabeth Pharmacon spol. s.r.o., ČR)
- komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit, (Elisabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- agaróza pro elektroforézu DNA, (SERVA Bitech, Německo)
- ethidium bromid, (SERVA Bitech, Německo)
- nanášecí pufr Loading buffer, (Fermentas, Litva)
- délkový standard 20 bp a 100 bp a 100 plus bp, (Elisabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- ethanol, EDTA, Tris, H₃BO₃, NaOH, CH₃COONa, HCl, Na₂CO₃
- sterilní a deionizovaná voda

3.1.3 Použité typové kvasinky z CCY a kvasinky izolované z vinného moštu

Ze Sbírký kultur kvasinek v Bratislavě – CCY byly získány kultury typových kvasinek (viz Tab. 1), které byly použity na srovnání s neznámými vzorky kvasinek izolovanými z vinného moštu získaného z vinařství Holánek (Ivaň).

Tab. 1: Seznam použitých typových kvasinek ze sbírky CCY

Pracovní označení	Rod	Druh	Označení podle sbírky
9	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	2-4-13
10	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-77
11	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-81
24	<i>Saccharomyces</i>	<i>mangini</i>	21-11-4
71	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-10
72	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-12
73	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-1
74	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-42-1
75	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-96
77	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-13-1
79	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-15-5
80	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	T
81	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-13
82	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus/pastorianus</i>	48-82
83	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-96
84	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-6
85	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-31-13
86	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-5
87	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	21-6-3
88	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-11-3
89	<i>Saccharomyces</i>	<i>oviformis</i>	21-21-43
90	<i>Saccharomyces</i>	<i>chevalieri</i>	21-11-1
91	<i>Saccharomyces</i>	<i>ocidans</i>	21-48-1
92	<i>Saccharomyces</i>	<i>steineri</i>	21-12-3
93	<i>Saccharomyces</i>	<i>aceti</i>	21-46-1
94	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	21-6-6
95	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-42-1
99	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-13
102	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus T</i>	21-6-7
104	<i>Saccharomyces</i>	<i>uvarum</i>	48-80
105	<i>Saccharomyces</i>	<i>uvarum</i>	48-79
106	<i>Saccharomyces</i>	<i>paradoxus</i>	21-53-2
114	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-26
115	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-15-2
116	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-15-5
117	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-21-2
118	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-21-16
119	<i>Saccharomyces</i>	<i>kluyveri</i>	21-5-1
120	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	21-6-1
121	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	21-6-4
122	<i>Saccharomyces</i>	<i>exiguus</i>	21-9-1

V experimentální části byly také použity nezařazené kvasinky rodu *Saccharomyces*, které byly získány odběry z vinného moštu v předloňském roce (odběr v září roku 2009) a loňském roce (r. 2010) z vinařství Holánek. Podrobněji viz kapitola 3.3 a 3.4.

3.2 Použité postupy potřebné pro praktickou část

3.2.1 Příprava zásobních roztoků a potřebného materiálu

- **Příprava 10×TBE pufru**

V prvním kroku musel být připraven 0,5 M roztok EDTA o pH 8. Roztok byl připraven převedením 9,36 g EDTA do 50 ml odměrné baňky. Na úpravu pH byl použit 0,5% roztok NaOH. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 40 ml do 1000 ml odměrné baňky, bylo přidáno 108,0 g Tris a 55 g H₃BO₃. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a odměrná baňka byla doplněna po rysku. Takto byl připraven zásobní roztok.

- **Příprava 1×TBE**

Ze zásobního roztoku (10×TBE pufru) bylo odebráno 100 ml do 1000 ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Tímto vznikl pufr na přípravu gelů pro gelovou elektroforézu.

- **Příprava EtBr**

Do mikrozkuhavky eppendorf bylo naváženo 0,0100 g ethidium bromidu a následně bylo toto množství rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Tento roztok byl používán na vizualizaci DNA fragmentů na gelu.

- **Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem**

K již připravenému roztoku 1×TBE (1000 ml odměrná baňka) bylo přidáno 100 µl ethidium bromidu. Tímto způsobem byl připraven roztok používaný jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci DNA fragmentů.

- **Příprava 1,4% gelu**

Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo 2,1 g agarózy a zalito 150 ml roztoku 1×TBE. Směs byla rozpuštěna v mikrovlné troubě. Po mírném vychladnutí gelu bylo přidáno odpovídající množství ethidium bromidu (na každých 10 ml gelu 1 µl ethidium bromidu) a tento gel byl pak nalit do elektrofotické vany a byl do něj zasazen „hřebínek“ na vytvoření jamek pro nanášení vzorků.

3.2.2 Izolace DNA

Izolace byla provedena pomocí komerčních kitů UltraClean™ Microbil DNA Isolation Kit od firmy MO BIO Laboratories, Inc. (Pharmakon spol. s r.o.)

Postup izolace:

- Buněčné pelety byly rozsuspendovány v 300 µl rozbíjecím pufru v rozbíjecí mikrozkuhavce, mírně vortexovány a následně bylo do rozbíjecí zkuhavky napipetováno 50 µl roztoku MD1.
- Mikrozkuhavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru k vortexu. Vortexováno probíhalo 10 minut.

- Mikrozkumavky byly vloženy do centrifugy, kde byly centrifugovány při 10 000 ot. 1 minutu.
- Supernatant byl přenesen do čisté 2 ml mikrozkumavky a bylo přidáno 100 µl roztoku MD2. Vortexováno 5 sekund a následně inkubováno 5 minut při teplotě 4 °C.
- V dalším kroku proběhla centrifugace při 10 000 ot. 1 minutu.
- Veškerý supernatant (kromě pelet) byl přenesen do čisté 2 ml mikrozkumavky a bylo k němu napipetováno 900 µl roztoku MD3. Vortexováno 5 sekund.
- 700 µl vzniklého roztoku bylo přepipetováno do mikrozkumavky s kolonkou a centrifugováno při 10 000 ot. 1 minutu. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Se zbylým roztokem byla provedena stejná operace.
- Do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a centrifugovalo se 1 minutu při 10 000 ot. Přefiltrovaný roztok byl opět odstraněn.
- Byla zopakována centrifugace při 10 000 ot. 1 minutu.
- Dále byla kolonka přenesena do čisté 2 ml mikrozkumavky (nutné zabránit kontaktu vnější strany kolonky s přefiltrovaným roztokem).
- Do středu kolonky (na střed bílé membrány) bylo přidáno 50 µl roztoku MD5. Centrifugace 1 minutu při 10 000 ot.
- Po odstranění kolony získáváme v mikrozkumavce DNA, která je dále připravena pro další aplikace.

3.2.3 Příprava PCR Master mixů a teplotní profily použitých programů termocykléru

Při přípravě PCR směsi bylo nutné dbát na sterilitu, aby se zabránilo jakékoli kontaminaci a tím i zkreslení výsledků. Komponenty se uchovávají v mrazicím boxu a byly vytahovány až těsně před použitím. Samotná příprava PCR směsi probíhá ve sterilním boxu za použití sterilního vybavení a rukavic. Komponenty se přidávaly v pořadí uvedeném v Tab. 2–3. Po připravení PCR směsi (1 vzorek - 48,8 µl směsi) k ní bylo (jednotlivě ke každému vzorku) přidáno ještě 1 µl templátové DNA vzorku a 0,2 µl Taq polymerázy. Ihned po přípravě celé PCR směsi byly vzorky vloženy do termocykléru a proběhla PCR reakce.

Postup pro přípravu PCR směsí na množství jednoho vzorku:

Tab. 2: PCR směs se dvěma primery

Komponenta	Množství [µl]
sterilní voda	42,3
pufr	5,0
dNTP	0,5
primer 1	0,5
primer 2	0,5
<i>Celkem směsi</i>	<i>48,8</i>
+	
templátová DNA	1,0
Taq polymeráza	0,2

Tab. 3: PCR směs s jedním nepárovým primerem

Komponenta	Množství [μ l]
sterilní voda	42,3
pufr	5,0
dNTP	1,0
primer	0,5
<i>Celkem směsi</i>	<i>48,8</i>
+	
templátová DNA	1,0
Taq polymeráza	0,2

Na přípravu PCR směsí byly použity celkem 3 primery, teplotní profil byl nastaven tedy vždy podle přidaného primeru v PCR směsi. V Tab. 4 a 5 vidíme jednotlivé kroky PCR reakce, přičemž krok 1. (initial T) probíhal jen jednou na začátku reakce a krok 5. (final extension) probíhal jako krok poslední a ukončuje PCR reakci. Kroky 2 – 4 se cyklicky opakují (příslušný počet opakování uveden vždy pod tabulkou).

Nastavení teplotního profilu termocykléru:

Tab. 4: Nastavení termocykléru pro primer – (GAG)₅ a (GAC)₅

Fáze cyklu	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
1. initial T	92	2
2. penetration	92	2
3. annealing	55	1
4. extension	72	3
5. final extension	72	5

počet cyklů – 35, celkový čas programu – 4 hodiny a 45 minut.

Tab. 5: Nastavení termocykléru pro primer M13

Fáze cyklu	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
1. initial T	95	5
2. penetration	93	0,75
3. annealing	50	1
4. extension	72	1
5. final extension	72	6

počet cyklů – 40, celkový čas programu – 3 hodiny a 25 minut

3.2.4 Gelová elektroforéza

Produkty vzniklé PCR reakcí byly následně podrobeny elektroforetické detekci na 1,4% agarózovém gelu. Na tuto detekci byla použita elektroforetická vana umožňující detekci 20 vzorků a dvě vany střední umožňující detekci 14 vzorků. Na velkou vanu bylo nutné připravit 60 ml gelu a na vanu střední 50 ml. K připravenému gelu se těsně před nalitím přidával ethidium bromid vždy v množství 1 μ l/10 ml gelu.

Vzorek byl na gel nanášen tak, že jeho množství 5 μ l bylo smícháno s 1 μ l nanášecího pufru a 5 μ l této směsi bylo naneseno do jamky gelu. Do první a poslední jamky byl nanášen standard 100 bp plus. Do předposlední jamky byla většinou nanášena negativní kontrola.

Velká elektroforetická vana – délka gelu 14 cm:

dělení fragmentů probíhalo při konstantním napětí 4,5 – 5 V na 1 cm gelu, v případě této elektroforetické vany bylo spočítáno napětí na 65 V, elektroforéza probíhala po dobu 4 hodin, použit standard 100 bp plus.

Střední elektroforetická vana – délka gelu 11 cm:

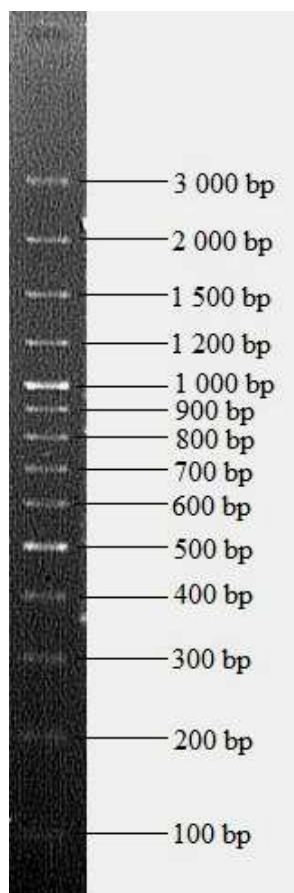
dělení fragmentů probíhalo při konstantním napětí 4,5 – 5 V na 1 cm gelu, v případě této elektroforetické vany bylo spočítáno napětí na 55 V, elektroforéza probíhala po dobu 4 hodin, použit standard 100 bp plus.

Malá elektroforetická vana – 8,5 cm:

dělení fragmentů probíhalo při konstantním napětí 4,5 – 5 V na 1 cm gelu, v případě této elektroforetické vany bylo spočítáno napětí na 45 V, elektroforéza probíhala po dobu 4 hodin, použit standard 100 bp plus.

Analyzované fragmenty PCR produktů byly na gelu zviditelněny pomocí UV transluminátoru a gel byl vyfocen prostřednictvím programu Scion Image.

Velikost jednotlivých fragmentů u vzorků neznámých kvasinek i u kvasinek typových byla určována podle standardu 100 plus bp, který v sobě zahrnoval fragmenty o velikosti 3 000 bp, 2 000 bp, 1 500 bp, 1 200 bp, 1 000 bp (výraznější bend), 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp (výraznější bend), 400 bp, 300 bp, 200 bp a 100 bp.

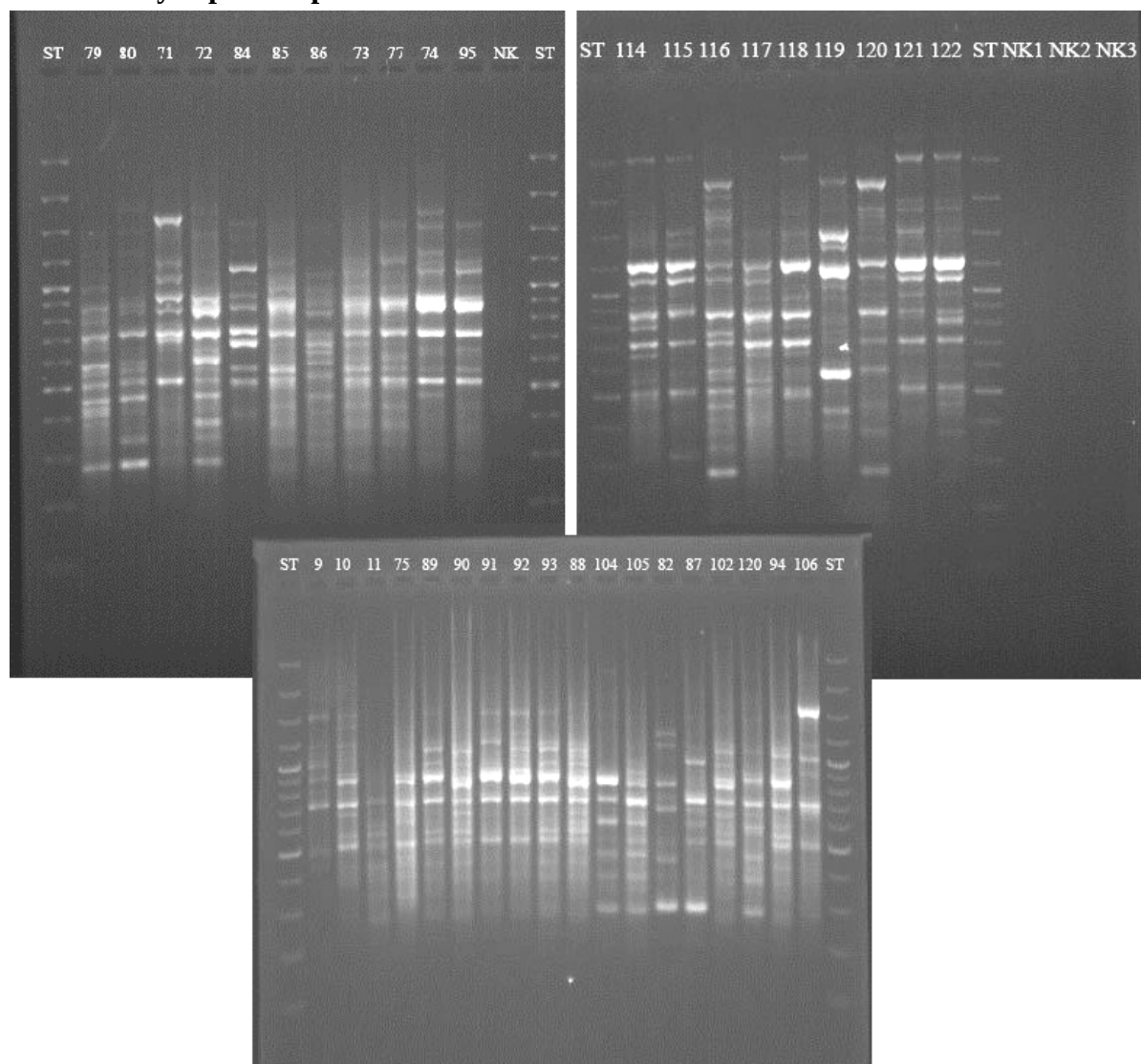


Obr. 19: Ukázka dělení standardu 100 plus bp.

3.3 Analýza typových kvasinek ze sbírky CCY

Níže jsou uvedené obrázky gelů (Obr. 20 – Obr. 28), z nichž bylo provedeno vyhodnocení typových kvasinek a vzorků kvasinek. Tyto obrázky gelů jsou odlišné velikosti, díky rozdílům ve velikosti elektroforetických van použitých na analýzu, a proto si na horizontální ose neodpovídají velikosti fragmentů. Pro vyhodnocení bylo nutné tyto fotografie gelů upravit do odpovídající velikosti, aby bylo zajištěno správné vyhodnocení analýzy - ukázka viz Příloha 1. K prokázání genetické podobnosti kvasinek byl použitý počítačový program BioNumerics. Vyhodnocení bylo provedeno na základě UPGMA klastrové analýzy s Jaccardovými koeficienty podobnosti s tolerancí 5% pro jednotlivé primery a dále byla využita funkce průměru všech experimentů pro všechny 3 použité primery. Výsledkem této analýzy jsou dendrogramy, podle kterých je možné hodnotit úroveň genetické podobnosti analyzovaných vzorků kvasinek.

3.3.1 Analýza pomocí primeru M13

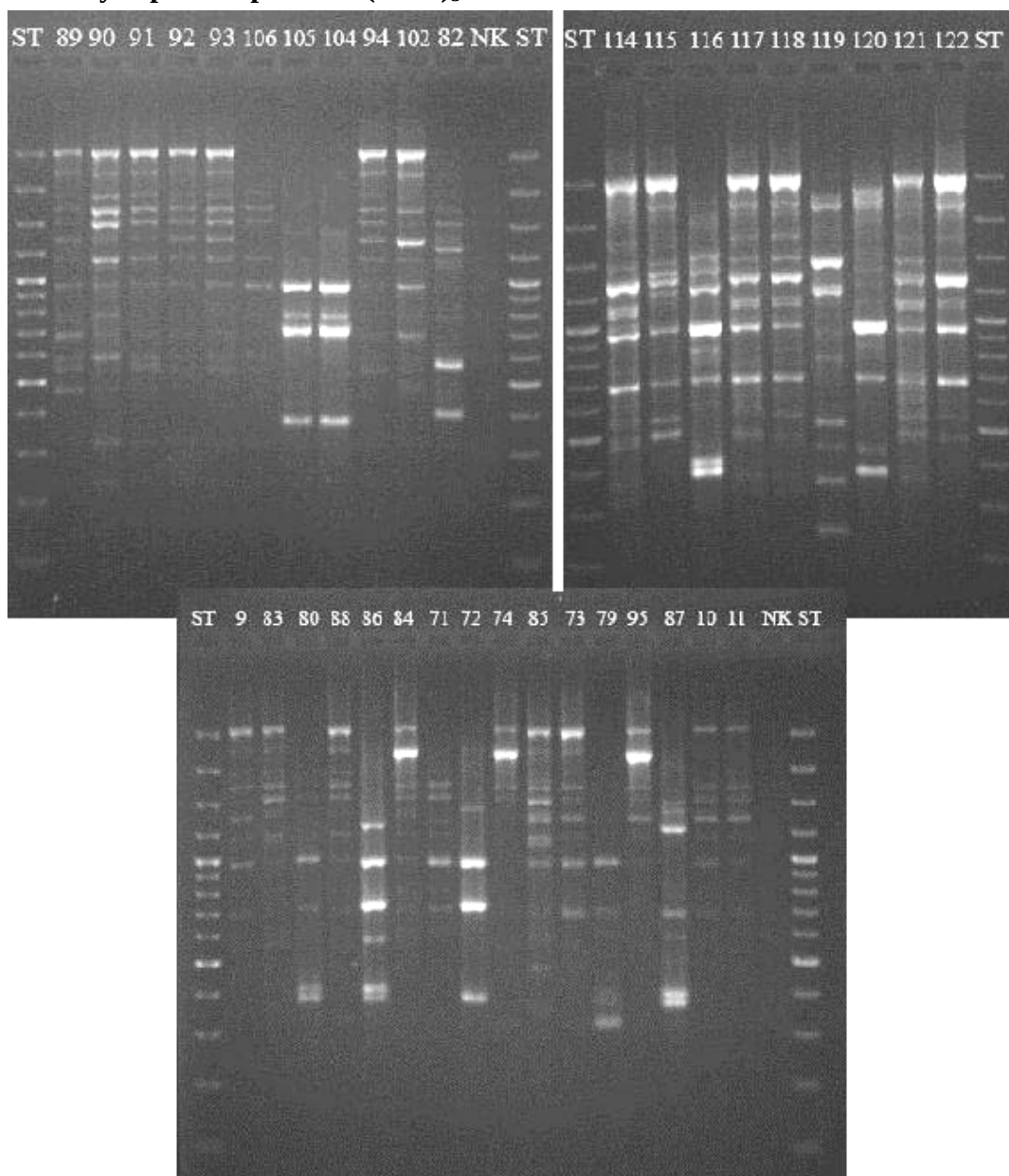


Obr. 20: Elektroforeogramy PCR fragmentů typových kvasinek získaný pomocí primeru M13, řady označené číselně značí vzorky typových kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

S použitím primeru M13 byl získán u druhu *Saccharomyces kluyveri* (vzorek č. 119) zcela specifický soubor fragmentů odlišný od všech ostatních. Vidíme zde výrazný fragment na úrovni 550 bp, který se nenachází u žádného jiného druhu kvasinek rodu *Saccharomyces*.

Saccharomyces bayanus (vzorek č. 72, 73, 74, 77, 95) naopak dává specifické fragmenty o velikosti přibližně 910 bp, 850 bp, 700 bp a 500 bp. Fragmenty o velikosti 1 200 bp, 1 150 bp, 840 bp a 700 bp jsou specifické pro *Saccharomyces cerevisiae* (vzorky č. 114, 115, 116, 117, 118). *Saccharomyces paradoxus* (vzorek č. 106) je typický svým fragmentem o velikosti 1 550 bp. Na těchto elektroforeogramech (stejně tak i u následujících) můžeme vidět, že i v rámci jednoho druhu kvasinek dostáváme mírně se lišící obrazy PCR-fingerprintingu, což je způsobeno různou kmenovou příslušností těchto druhových kvasinek.

3.3.2 Analýza pomocí primeru (GAC)₅



Obr. 21: Elektroforeogramy PCR fragmentů typových kvasinek získaný pomocí primeru (GAC)₅, řady označené číselně značí vzorky typových kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

Na první pohled je patrné, že vzorky č. 105 a 104 dávají zcela odlišný obraz od ostatních, jedná se *Saccharomyces uvarum*, jež dává po PCR reakci fragmenty o velikosti 1 000 bp, 800 bp, 750 bp a 400 bp.

Saccharomyces paradoxus (vzorek č. 106) poznáme podle fragmentů o velikosti 1 600 bp, 1 500 bp, 1 200 bp a 1 000 bp.

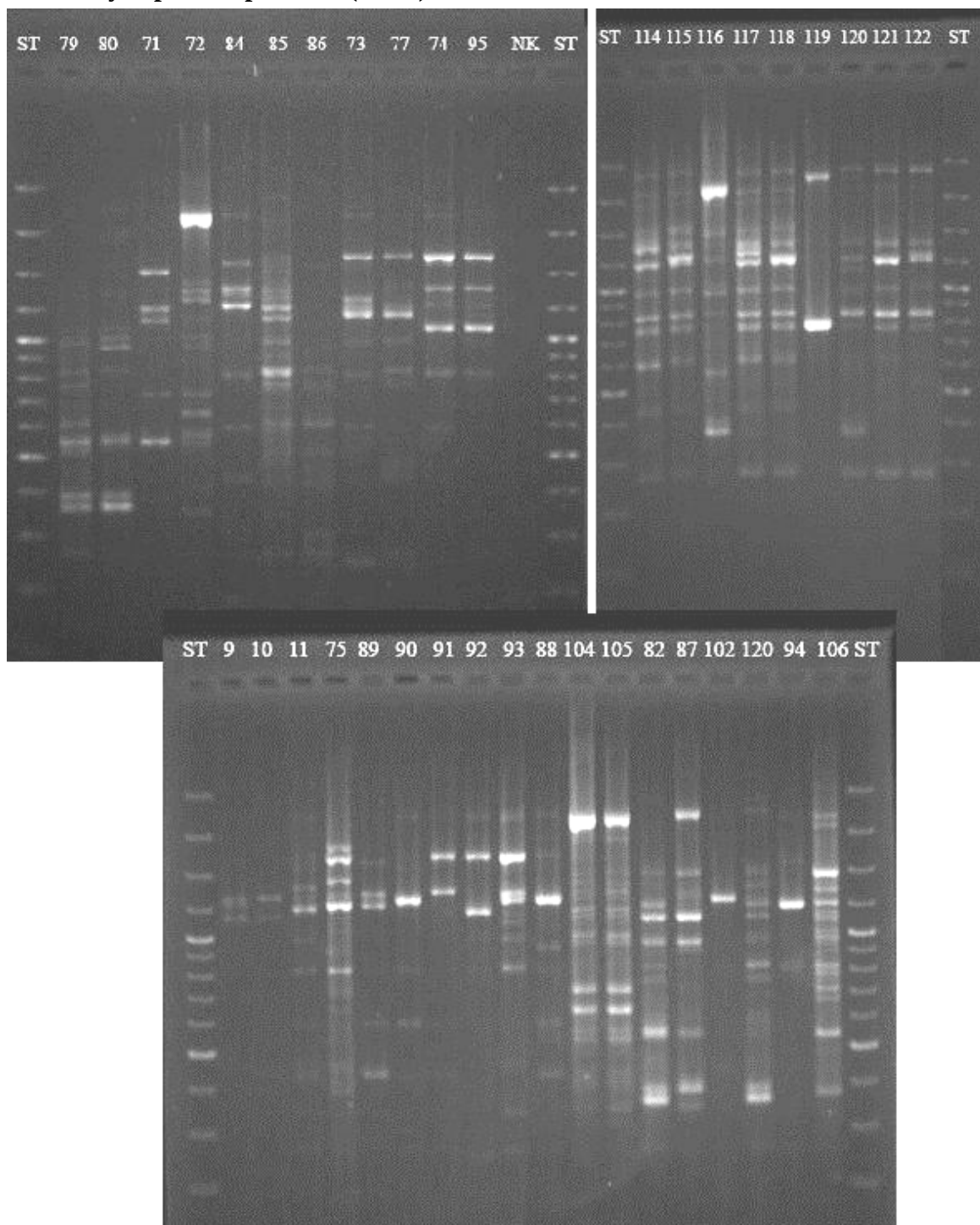
Za typické pro *Saccharomyces pastorianus* můžeme považovat fragmenty o velikosti 3 000 bp, 2 400 bp, 1 600 bp, 1 500 bp a 1 300 bp (vzorky č. 94, 102).

Saccharomyces cerevisiae poznáme podle fragmentů o velikosti 3 000 bp, 1 300 bp, 1 000 bp (vzorek č. 114, 115, 117, 118, 9, 88, 85, 10, 11).

Saccharomyces bayanus nám po tomto PCR-fingerprintingu poskytuje dva různé obrazy (vzorek č. 80, 86, 71, 72, 79) a (vzorek č. 84, 74, 73, 95).

Mírná rozmanitost obrazů, kterou jsme získali pomocí primeru (GAC)₅, a která se zde projevuje zejména u *Saccharomyces bayanus* ale i u dalších, je opět způsobena kmenovou rozmanitostí v rámci druhů.

3.3.3 Analýza pomocí primeru (GAG)₅



Obr. 22: Elektroforeogramy PCR fragmentů typových kvasinek získaný pomocí primeru (GAG)₅, řady označené číselně značí vzorky typových kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

Saccharomyces uvarum je svými fragmenty opět typický a zcela odlišný od ostatních druhů (vzorek č. 104, 105), u tohoto primeru získáváme výrazné fragmenty o velikosti 2 350 bp, 710 bp a 620 bp.

Fragmenty o velikosti 2 800 bp, 2 200 bp, 1 250 bp, 810 bp, 790 bp, 610 bp jsou pro změnu typické pro *Saccharomyces cerevisiae* (vzorek č. 114, 115, 117, 118).

Od předcházejícího druhu kvasinek se pak liší *Saccharomyces pastorianus* v nepřítomnosti fragmentu o velikosti 2 200 bp a 610 bp (vzorky č. 120, 121, 87).

Saccharomyces exiguus zde u tohoto primeru dává stejný obraz jako *Saccharomyces pastorianus*.

U *Saccharomyces paradoxus* (vzorek č. 106) pozorujeme výrazné fragmenty o velikosti 1 500 bp a 540 bp.

Saccharomyces bayanus nám poskytuje více obrazů. Jak už bylo napsáno u předešlých elektroforeogramů, rozmanitost obrazů je dána různou kmenovou příslušností kvasinek. Podrobné porovnání PCR-fingerprintingu a nalezení podobnosti v rámci druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* bylo prováděno u všech kvasinek pomocí programu BioNumerics.

3.4 Vyhodnocení PCR-fingerprintingu typových kvasinek

Vyhodnocení typových kvasinek probíhalo pomocí programu BioNumerics, jehož výstupem je dendrogram zohledňující podobnost fragmentů získaných pomocí gelové elektroforézy. Analýzou vytvořený dendrogram (viz Příloha 2) nám rozdělil typové kvasinky na několik skupin (klastřů), které se vzájemně liší na různé procentuální úrovni podobnosti. Jednou vyhraněnou skupinou jsou kvasinky rodu *Saccharomyces uvarum*, které se již při zběžném vyhodnocení obrazu PCR-fingerprintingu s primery (GAC)₅ a (GAG)₅ jevíly jako výrazně odlišné (vzorky č. 105 a 104).

Další dvě skupiny tvoří převážně typové kvasinky rodu *Saccharomyces bayanus*, přičemž jednu ze skupin tvoří *S. bayanus* poskytující obraz podobný typovým kvasinkám *S. cerevisiae*. Tato podobnost spočívá ve shodě v „horní“ části PCR-fingerprintingu – jedná se o fragmenty přibližně velikosti větší než 1 000 bp. Zde je možná bližší příbuznost s kvasinkami rodu *Saccharomyces cerevisiae*.

Druhá skupina *S. bayanus* (vzorek č. 86, 79 a 72) vytváří odlišný obraz, nenachází se u nich fragmenty nad 1 000 bp a naopak je patrná shoda ve „spodní“ části obrazu PCR-fingerprintingu – fragmenty o velikosti pod 1 200 bp. U těchto kvasinek rodu *S. bayanus* můžeme bližší příbuznost se *S. cerevisiae* vyloučit a tomuto tvrzení odpovídá i dendrogram, kde podobnost této skupiny k *S. cerevisiae* je na nižší procentuální úrovni než u skupiny předchozí.

Další dvě skupiny tvoří převážně kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Jednu z těchto skupin tvoří *S. cerevisiae* s dalšími rody – *S. steineri*, *S. aceti*, *S. oxidans*, *S. chevalieri*, *S. pastorianus*, *S. oviformis* a také s rodem *S. bayanus*. Druhou skupinu pak tvoří *S. cerevisiae* spolu s rody - *S. exiguus*, *S. kluyveri* a *S. pastorianus*.

Fenotypové vlastnosti, které jsou používány při taxonomickém zařazení kvasinek ve sbírkách kvasinek, nemusí nezbytně zohledňovat jejich genetickou příbuznost k jinému druhu. Následně tedy může dojít na základě fenotypových vlastností k nesprávnému zařazení kvasinek do jednotlivých taxonů, čemuž nasvědčují i výše uvedené analýzy. Jako vhodné řešení těchto rozporů se jeví revize zařazení typových kvasinek ve sbírce.

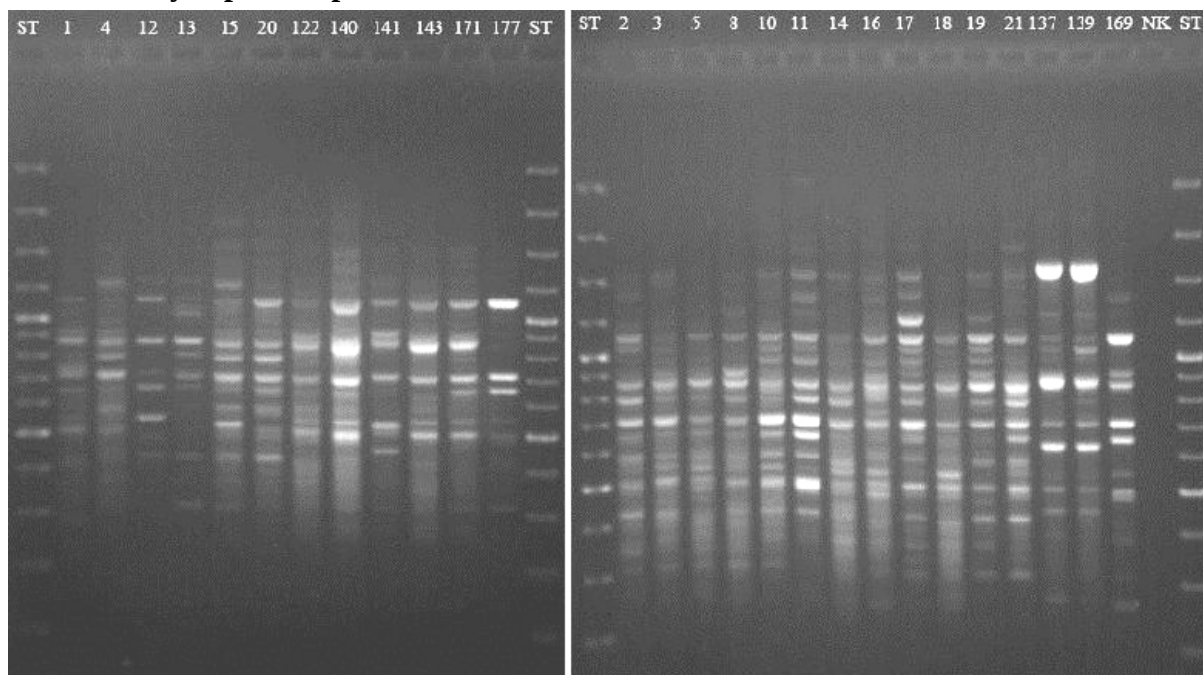
3.5 Analýza kvasinek izolovaných z vinného moštu v roce 2009

V roce 2009 byly z Vinařství Holánek (podoblast mikulovská) získány vzorky vinného moštu (září 2009) bílé odrůdy Sauvignon z ekologické i integrované vinice. Tyto vzorky moštů byly převezeny na Chemickou fakultu VUT v Brně, kde dále probíhalo jejich kvašení v klimatizované laboratoři (18 °C). V průběhu tohoto kvašení byly prováděny odběry vzorků moštů a z nich byly izolovány směsné kultury kvasinek. Směsné kultury byly několikrát přečištěny za účelem zisku čisté kultury. Z těchto kultur byla provedena izolace jaderné DNA pomocí izolačních kitů. Všechny tyto vzorky byly použity k PCR analýze (použity primery ITS1 a ITS4) a následně RFLP analýze pomocí enzymu Hae III (tento úsek práce je zpracován v rámci diplomové práce Vliv způsobu pěstování vinné révy na populaci kvasinek a Kontrola kvasného procesu vinného moštu). Z odborné literatury a vědeckých článků je známo, že analýzou oblasti 5,8 pomocí primerů ITS1 a ITS4 získáme u kvasinek rodu *Saccharomyces* specifický fragment o velikosti 880 bp. Kvasinky poskytující po PCR reakci tento fragment byly zařazeny do rodu *Saccharomyces* a dále byly v rámci této diplomové práce analyzovány pomocí tří rozdílných primerů - (GAG)₅, M13 a (GAC)₅. Kompletní přehled vzorků izolovaných kvasinek z moštu v roce 2009 nalezneme v Tab. 6.

Tab. 6: Kvasinky rodu *Saccharomyces* izolované z vinného moštu r. 2009

Kvasinky rodu <i>Saccharomyces</i> izolované z vinného moštu r. 2009	
<i>Ekologická vinice</i>	<i>Integrovaná vinice</i>
Pracovní označení	Pracovní označení
1	2
4	3
12	5
13	8
15	10
20	11
122	14
140	16
141	17
143	18
171	19
177	21
	137
	139
	169

3.5.1 Analýza pomocí primeru M13



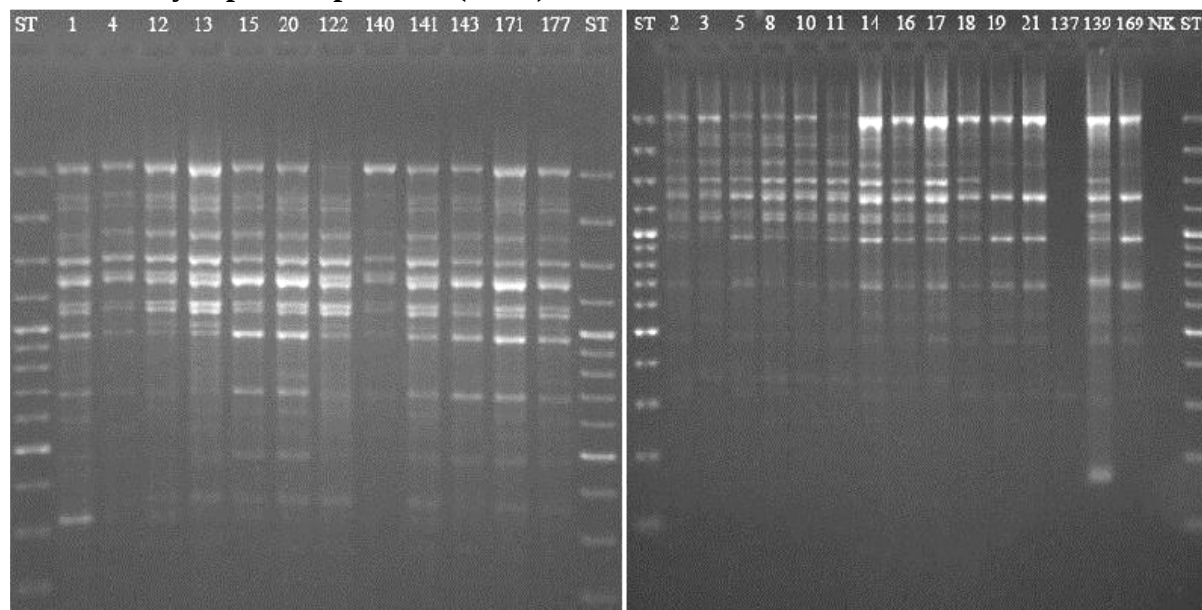
Obr. 23: Elektroforeogramy primeru M13 PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

U ekologické vinice (vlevo) můžeme pozorovat, že od ostatních vzorků se odlišuje vzorek č. 177, u integrované vinice pozorujeme odlišnost u vzorků 137, 139 a 169.

Vzorek č. 177 má stejné fragmenty jako vzorek č. 169. Tyto 4 vzorky se neshodují s žádnou typovou kvasinkou, a proto je není možné zařadit. V tomto případě bude nutné udělat s pomocí primeru M13 analýzu dalších typových kvasinek, abychom byli schopni tyto nezařazené kvasinky identifikovat.

Ostatní vzorky (jak u integrované vinice, tak i u ekologické) prokazují podobnost a proto lze předpokládat, že jedná o stejný druh. Podle typových kvasinek se jedná o *Saccharomyces cerevisiae*.

3.5.2 Analýza pomocí primeru (GAC)₅



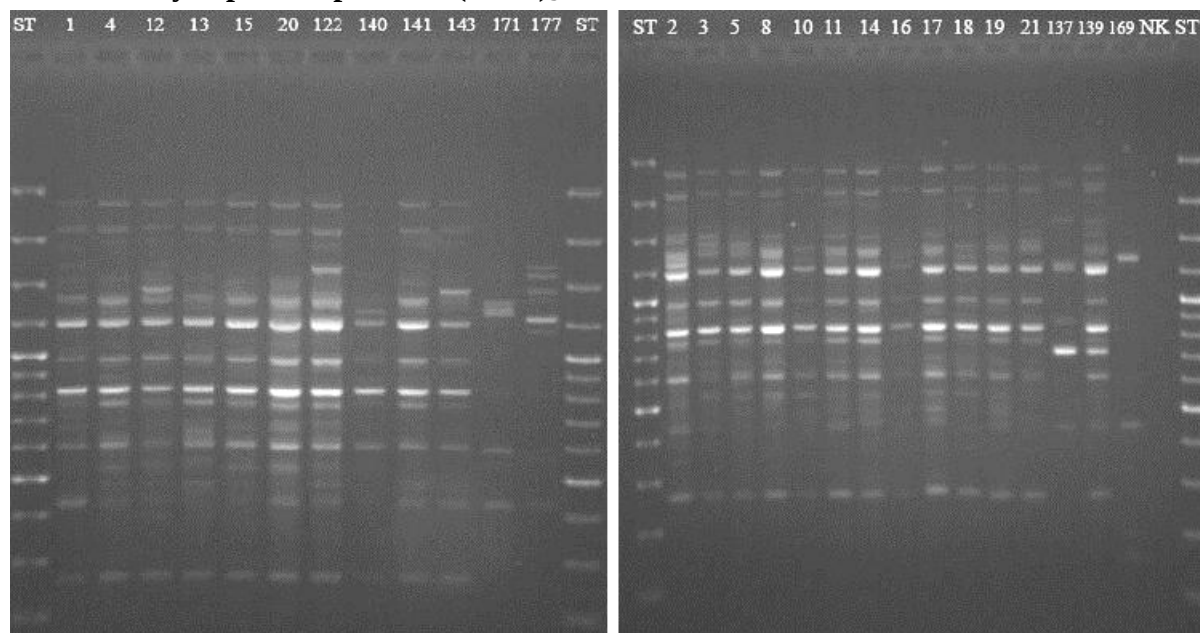
Obr. 24: Elektroforeogramy primeru (GAC)₅ PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

Na Obr. 24 vlevo – ekologická vinice můžeme vidět, že všechny vzorky dávají stejný obraz PCR-fingerprintingu. Porovnáním s typovými kvasinkami můžeme konstatovat, že tyto vzorky jsou *Saccharomyces cerevisiae*. Vzorek č. 140 dává slabší obraz, ale můžeme ho považovat za shodný s ostatními.

U vzorků integrované vinice pouze vzorky č. 137, 139, 169 opět poskytují mírně odlišný obraz od ostatních vzorků (chybí u nich 3 fragmenty). Zbytek vzorků je shodný s ostatními, a proto opět usuzujeme, že se jedná o jeden stejný druh – *Saccharomyces cerevisiae*.

V případě analýzy pomocí primeru (GAC)₅ je tedy možné konstatovat, že námi vyizolované vzorky, jak ekologické vinice tak integrované (kromě vzorků č. 137, 139 a 169), náleží k druhu *Saccharomyces cerevisiae*, zde se tak projevují i vzorky 171 a 177, které u předchozího primeru prokazovaly jistou odlišnost.

3.5.3 Analýza pomocí primeru (GAG)₅



Obr. 25: Elektroforeogramy primeru (GAG)₅ PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola.

PCR-fingerprinting ekologické vinice (viz Obr. 25) opět prokazuje odlišnost vzorků č. 171, 177 a u integrované vinice odlišnost vzorků č. 137, 139, 169.

Vzorek č. 169 je shodný s obrazem typové kvasinky 102 – *Saccharomyces pastorianus*. Ostatní vzorky kvasinek se jeví stejné a odpovídají obrazu typových kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Vzorky č. 171, 177, 137 a 139 se neshodují s žádnou typovou kvasinkou, ale délky fragmentů, které vznikly po PCR, se shodují s některými fragmenty, které mají ostatní vzorky zařazené k *Saccharomyces cerevisiae*. Proto můžeme předpokládat, že tyto neidentifikované vzorky kvasinek budou spadat pod skupinu kvasinek *Saccharomyces sensu stricto*.

3.6 Shrnutí analýzy kvasinek získaných z vinného moštu v r. 2009

Na základě vyhodnocení elektroforeogramů pomoci programu BioNumerics bylo zjištěno, že vzorky č. 137, 139 a 169 z integrované vinice jsou skutečně odlišné od ostatních vzorků. Přičemž vzorky č. 137 a 139 se rozcházejí s ostatními vzorky na úrovni podobnosti 63%, a v rámci sebe navzájem se rozcházejí na úrovni podobnosti 81,5 %, tyto vzorky zatím nemůžeme zařadit, protože se neshodují s žádným obrazem typové kvasinky. Pro jejich zařazení bude nutné primerem M13 analyzovat další typové kvasinky. Vzorek č. 169 prokazuje shodu s ostatními vzorky (kromě vzorků č. 137 a 139) do úrovně 74 % podobnosti, pak se již prokazatelně odděluje. Na základě vyhodnocení programem BioNumerics předpokládáme, že se jedná o druh *Saccharomyces pastorianus*. Ostatní vzorky z integrované vinice prokazovaly podobnost na úrovni minimálně 85,5 %, u některých dosahovala podobnost úrovně až 97,5 % (vzorky č. 8 a 5), zde tedy předpokládáme, že se jedná o jeden jediný druh – *Saccharomyces cerevisiae*, rozdíly v rámci tohoto druhu jsou dány různou kmenovou příslušností. Podrobnosti viz Příloha 3.

U ekologické vinice se programem BioNumerics potvrdilo, že vzorky č. 171 a 177 se od ostatních vzorků z této vinice liší. Všechny vzorky (včetně vzorků č. 171 a 177)

prokazují vzájemnou podobnost na úrovni 72 % a zde se vyčleňují právě vzorky č. 171 a 177, vzájemně pak dosahují podobnosti na úrovni 79 %. Zatím tyto dva vzorky nemůžeme druhově zařadit. Zbytek vzorků z ekologické vinice prokazuje podobnost na úrovni 86 – 96 %, kde pak dochází k postupnému rozčlenění do menších skupin. Diference mezi vzorky je dána díky kmenové rozmanitosti. Předpokládáme, že se jedná o jeden druh – *Saccharomyces cerevisiae*. Podrobnosti viz Příloha 4.

3.7 Analýza kvasinek izolovaných z vinného moštu v roce 2010

V této diplomové práci byly také zpracovány vzorky kvasinek rodu *Saccharomyces* získané z odběrů probíhajících v termínu září – říjen 2010. Odběry vinného moštu probíhaly přímo ve sklepě (na rozdíl od předchozího roku, kde kvašení probíhalo v laboratorních podmínkách) – ve vinařství Holánek (viniční podoblast mikulovská). Odběry probíhaly od konce září do konce října v intervalech přibližně tři dny. Mošt byl vyroben z červené odrůdy hroznů Rulanské modré – integ. vinice i eko. vinice. Vytřídění kvasinek rodu *Saccharomyces* probíhalo stejným postupem, jako u kvasinek izolovaných v roce 2009. Souhrnný výpis vzorků kvasinek rodu *Saccharomyces* izolovaných v roce 2010 viz Tab. 7. V Tab. 8 pak lze nalézt pořadí a intervaly, ve kterých probíhaly odběry vzorků vinného moštu, ze kterých byly pak izolovány jednotlivé vzorky neznámých kvasinek. V případě ekologické vinice můžeme vidět, že není zaznamenán odběr z 1., 3. a 5. dne, u integrované pak z 5. dne – v těchto dnech nebyly v moštu naší analýzou nalezeny žádné kvasinky rodu *Saccharomyces*.

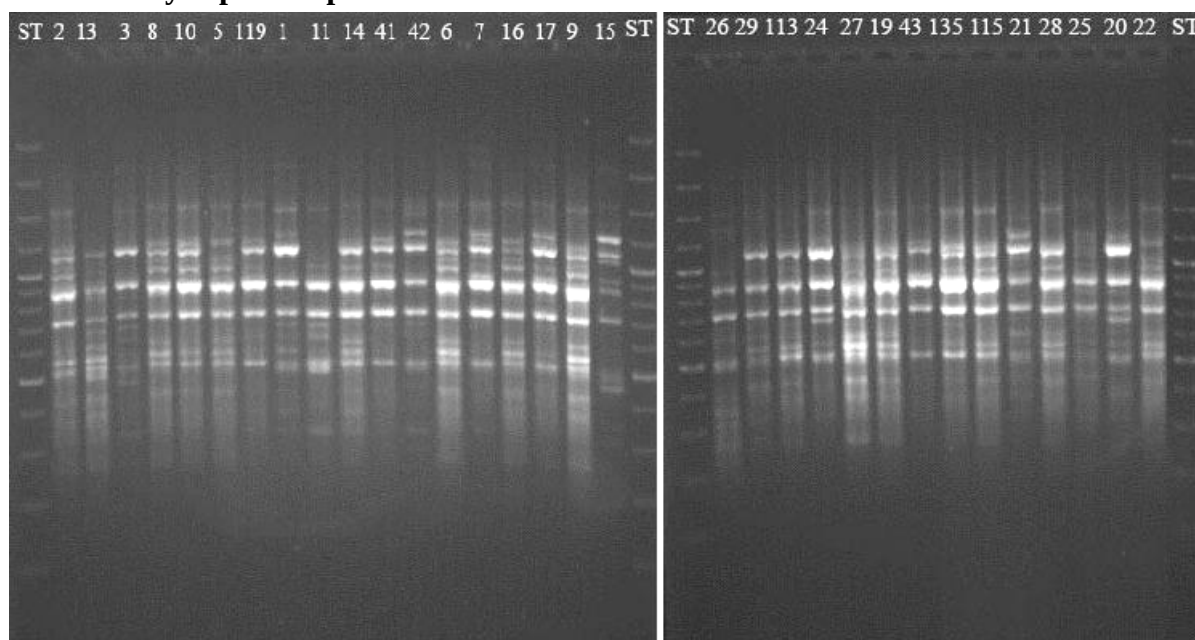
Tab. 7: Kvasinky rodu *Saccharomyces* izolované z vinného moštu r. 2010

Kvasinky rodu <i>Saccharomyces</i> izolované z vinného moštu r. 2010	
<i>Ekologická vinice</i>	<i>Integrovaná vinice</i>
Pracovní označení	Pracovní označení
1	19
2	20
3	21
5	22
6	24
7	25
8	26
9	27
10	28
11	29
13	43
14	113
15	115
16	135
17	
41	
42	
119	

Tab. 8: Tabulka znázorňující chronologii odběrů vinného moštu a následně izolované vzorky kvasinek – r. 2010

Pořadí odběrů vzorků moštu a následně získaných vzorků kvasinek 2010			
<i>Ekologická vinice</i>		<i>Integrovaná vinice</i>	
<i>Den odběru</i>	<i>Číslo vzorků</i>	<i>Den odběru</i>	<i>Číslo vzorků</i>
8. den	2, 13	1. den	26, 29
10. den	3, 8, 10, 5	3. den	113
12. den	119, 1, 11, 14	8. den	24, 27
15. den	41, 42, 6, 7, 16, 17	10. den	19, 43, 135, 115
19. den	9, 15	12. den	21, 28, 25
		15. den	20
		19. den	22

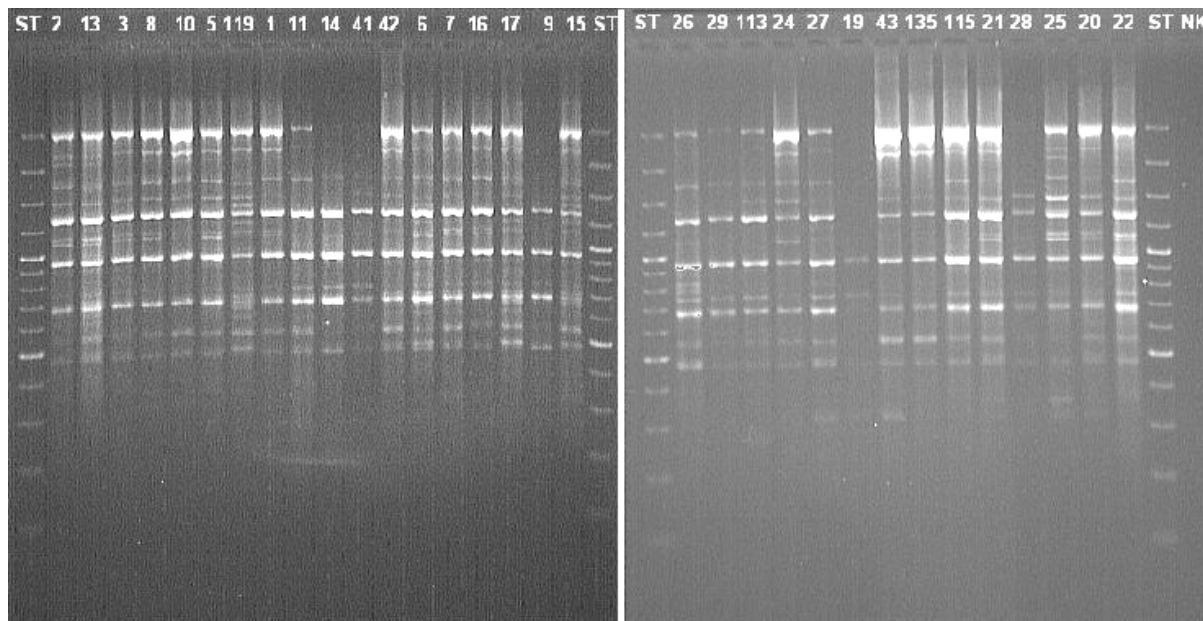
3.7.1 Analýza pomocí primeru M13



Obr. 26: Elektroforeogramy primeru M13 PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST – standard.

Na Obr. 26 sledujeme analýzu vzorků ekologické i integrované vinice. Analyzované vzorky se shodují s typovými kvasinkami druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Drobné odchylky od obrazu typových kvasinek tohoto druhu mohou být dány různou kmenovou příslušností analyzovaných vzorků.

3.7.2 Analýza pomocí primeru (GAC)₅



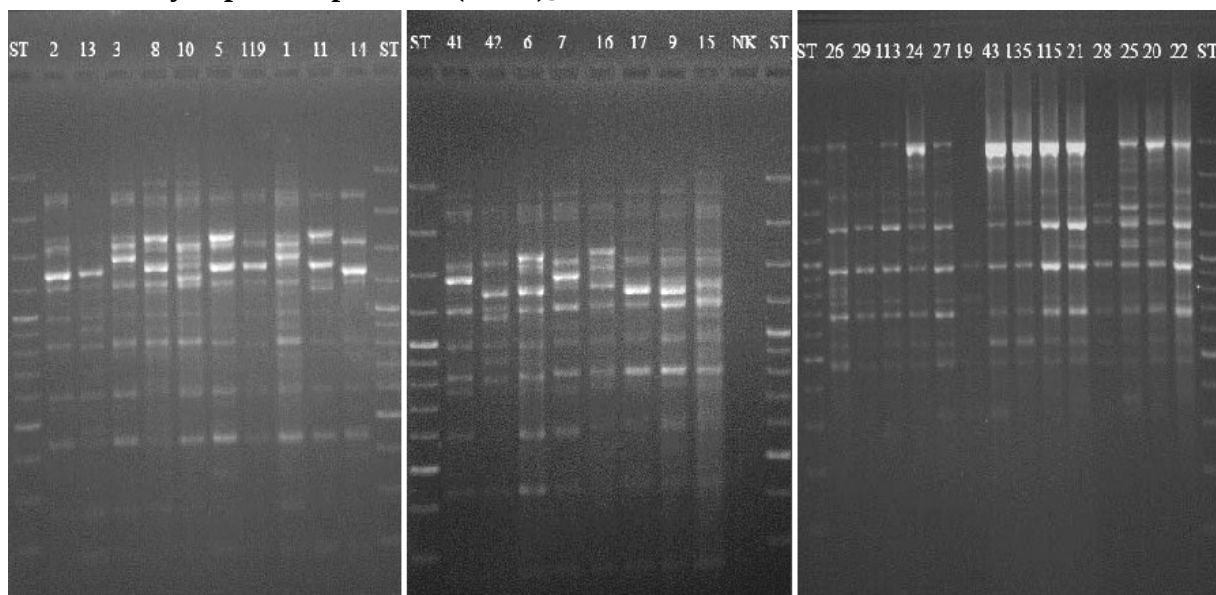
Obr. 27: Elektroforeogramy primeru (GAC)₅ PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola

Na Obr. 27 vpravo pozorujeme integrovanou vinici, kde u vzorků č. 19 a 28 byla analýza pomocí primeru (GAC)₅ opakována a potvrdila, že tyto vzorky poskytují naprosto shodný obraz se všemi ostatními vzorky z této vinice.

Vzorky ekologické vinice (vlevo) č. 14, 41 a 9 se zdají být mírně odlišné od zbytku vzorků, ale ve svém obraze obsahují čtyři fragmenty, které jsou typické i pro všechny ostatní vzorky z této ekologické vinice, u kterých se domníváme, že patří k rodu *Saccharomyces cerevisiae*.

Z analýzy pomocí primeru (GAC)₅ můžeme opět usuzovat, že všechny vzorky je možné zařadit jako druh *Saccharomyces cerevisiae*, protože poskytují shodný obraz s typovými kvasinkami právě tohoto druhu.

3.7.3 Analýza pomocí primeru (GAG)₅



Obr. 28: Elektroforeogram primeru (GAG)₅ PCR fragmentů kvasinek získaných z ekologické vinice (vlevo) a integrované vinice (vpravo), řady označené číselně značí vzorky kvasinek, ST - standard, NK - negativní kontrola

U všech vzorků ekologické i integrované vinice můžeme pozorovat jistou podobnost. Nacházíme zde shodnost fragmentů o velikosti přibližně 450 bp, 600 – 650 bp a 800 bp.

U vzorků integrované vinice nacházíme také shodnost fragmentů o velikosti přibližně 1 300 bp a 3 000 bp. Nejednoznačnou přítomnost těchto fragmentů u ekologické vinice můžeme vysvětlovat větší kmenovou diverzitou.

Z tohoto pohledu usuzujeme, že všechny vzorky (jak u integrované vinice tak ekologické) by mohly náležet pod jeden druh – *Saccharomyces cerevisiae*.

3.8 Shrnutí analýzy kvasinek získaných z vinného moštu v r. 2010

Po vyhodnocení gelů na základě vizuálního porovnání obrazů vzorků kvasinek, mezi kterými nebyly nalezeny výrazné odchylky, s obrazy PCR-fingerprintingů typových kvasinek (s použitými primery (GAC)₅, (GAG)₅ a M13) bylo konstatováno, že všechny vzorky jsou jednoho druhu - a to *Saccharomyces cerevisiae*.

Na základě vyhodnocení analýzy PCR-fingerprintingu ekologické vinice programem BioNumerics ovšem pozorujeme, že vzorky kvasinek jsou si podobny do úrovně podobnosti 75,5 %. Na této úrovni se vyčleňuje vzorek č. 15, o kterém tedy můžeme soudit, že by mohl patřit k jinému druhu než *Saccharomyces cerevisiae*.

K dalšímu rozčlenění vzorků dochází na úrovni podobnosti 81 % - vzorky č. 13, 14 a 11, tyto vzorky prokazují vzájemnou podobnost do úrovně 86 % a až dále dochází k jejich rozdělení. Předpokládáme, že je jedná o jeden druh (jiný než *Saccharomyces cerevisiae*) zastoupený třemi různými kmeny.

Na úrovni 81,5 % podobnosti se dále vyčlenil vzorek č. 1 a na úrovni 82,5 % vzorek č. 9. U ostatních vzorků ekologické vinice pozorujeme shodu až do úrovně 88 % a po srovnání těchto vzorků s typovými kvasinkami docházíme k závěru, že se jedná o druh *Saccharomyces cerevisiae*. U vzorků, které byly shledány jako druh odlišný od *Saccharomyces cerevisiae* (vzorky č. 15, 13, 14, 11, 1, 9) nebyla nalezena shoda se žádnou typovou kvasinkou a proto

nebyly taxonomicky zařazeny. Výsledky ekologické vinice z roku 2010 jsou podrobněji ukázány v Příloze 6.

U integrované vinice sledujeme podobnost všech vzorků do úrovně podobnosti 79,5 %, zde se již vyčleňuje vzorek č. 26. Na úrovni podobnosti 82,5 % se odlišují vzorky 19 a 27, které se rozcházejí až na úrovni 90,5 %. Docházíme tedy k závěru, že u těchto dvou vzorků se jedná o stejný druh zastoupený dvěma kmeny. Vzorky č. 26, 19 a 27 můžeme shledat jako odlišné od ostatních, ale nebyla u nich nalezena shoda s typovými kvasinkami, a proto nemohly být identifikovány.

Ostatní vzorky z integrované vinice dosahovaly vzájemné podobnosti obrazů do úrovně 87 % a po srovnání s typovými kvasinkami byly identifikovány jako *Saccharomyces cerevisiae*. Podrobněji viz Příloha 5.

4 ZÁVĚR

Teoretická část

- V rámci této diplomové práce byly shrnuty poznatky o kvasinkách. Pozornost byla soustředěna nejen na jejich morfologii, cytologii a rozmnožování ale také hlavně na jejich metabolismus a s tím související vliv na kvašení vína.
- Teoretická část se také zabývala taxonomií - její historií a dělením. Podrobně byly rozebrány tradiční taxonomické metody, které stále slouží k taxonomickému zařazení kvasinek. Stejná pozornost pak byla věnována metodám moderní taxonomie. Na závěr této kapitoly byla rozebrána problematika taxonomického zařazení kvasinek rodu *Saccharomyces*.
- V závěru teoretické části práce byl dopodrobna vysvětlen princip PCR reakce, ze které pak vychází téměř všechny moderní molekulárně-biologické metody. Je zde popsán průběh reakce, komponenty a faktory, které reakci ovlivňují. Najdeme zde také přehled širokého využití této metody.

Experimentální část

- V experimentální části byla provedena pomocí metody PCR-fingerprintingu (rep-PCR) a vybraných primerů – M13, (GAC)₅ a (GAG)₅ analýza typových kvasinek získaných z Bratislavské sbírky kvasinek (CCY), analýza vzorků kvasinek vyizolovaných z vinného moštu (bílá odrůda Souvignon, ekologická vinice i integrovaná vinice) v r. 2009 a analýza vzorků kvasinek vyizolovaných z vinného moštu (červená odrůda Rulanské modré, ekologická vinice i integrovaná vinice) v r. 2010.
- Vyhodnocení analýz bylo prováděno pomocí vizuálního srovnání obrazů PRC-fingerprintingu typových kvasinek s obrazy PCR-fingerprintingu vyizolovaných vzorků kvasinek z vinných moštů. Druhá část vyhodnocení byla provedena pomocí programu BioNumerics, jehož výstupem je dendrogram zachycující míru podobnosti obrazů PCR-fingerprintingu jednotlivých vzorků kvasinek.
- **Analýzou typových kvasinek** bylo zjištěno, že i v rámci jednoho druhu kvasinek může docházet k rozčlenění na více skupin. Tento jev je způsoben různou kmenovou příslušností v rámci druhu či velmi blízkou příbuzností jednotlivých druhů v rámci skupiny *Saccharomyces sensu stricto*. Další možností vysvětlující nejednotné obrazy PCR-fingerprintingu typových kvasinek je jejich možné nepřesné taxonomické zařazení na základě fenotypových vlastností.
- V praktické části byly podrobeny analýze vzorky kvasinek izolovaných z vinného **moštu v roce 2009**. U vzorků z ekologické vinice byly nalezeny dva vzorky, které se vyčlenily ze skupiny identifikované jako *Saccharomyces cerevisiae*. U těchto dvou vzorků nebyla určena druhová příslušnost, ale na základě porovnání obrazů předpokládáme, že spadají do některého rodu ze skupiny *Saccharomyces sensu stricto*. U integrované vinice nespádaly pod rod *Saccharomyces cerevisiae* tři vzorky. U jednoho z těchto vzorků se podařilo najít shodu s obrazem typové kvasinky a podařilo se ji tedy zařadit jako *Saccharomyces pastorianus*. U dalších dvou vzorků se podobnost s typovými kvasinkami nalézt nepodařilo a zůstaly nezařazené. Z těchto výsledků můžeme vyvodit závěr, že rozdíl mezi druhovou rozmanitostí u ekologické vinice a integrované je téměř zanedbatelný a mikroflóra kvasinek ve vinném moštu je reprezentována především druhem *Saccharomyces cerevisiae*.

Výsledkem analýzy moštu z roku 2009 z ekologické vinice je identifikace celkem tří různých druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* – jeden byl identifikován jako *Saccharomyces cerevisiae*, další dva nebyly identifikovány. U integrované vinice byla prokázána přítomnost celkem čtyř druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* – druh *Saccharomyces cerevisiae*, druh *Saccharomyces pastorianus* a zbylé dva druhy se nepodařilo identifikovat.

- Další oddíl praktické části se věnoval analýze PCR-fingerprintingu vzorků kvasinek izolovaných **z moštu v roce 2010**. Ve vzorcích z ekologické vinice se podařilo objevit celkem 5 různých druhů kvasinek, přičemž dva z těchto druhů se prokazovaly i různou kmenovou příslušností. Z těchto druhů se podařil zařadit pouze jeden (nejpočetněji zastoupený druh) – *Saccharomyces cerevisiae*. U zbylých čtyř se nepodařilo najít shodu s typovými kvasinkami. Na základě analýzy vzorků integrované vinice se zjistila přítomnost dvou druhů kvasinek, které nevykazovaly shodu s typovými kvasinkami a nebyly identifikovány a druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Celkově lze ke vzorkům kvasinek izolovaných z vinného moštu v roce 2010 říci, že ekologická vinice se vyznačuje větším druhovým zastoupením kvasinek (5 druhů kvasinek), než integrovaná (3 druhy).

Výsledkem analýzy moštu z roku 2010 z ekologické vinice je identifikace pěti různých druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* – druh *Saccharomyces cerevisiae*, zbylé čtyři se nepodařilo identifikovat. Vzorky integrované vinice lze rozdělit do tří různých druhů – *Saccharomyces cerevisiae*, zbylé dva se nepodařilo identifikovat.

- Ze srovnání vzorků kvasinek vinného moštu z r. 2009 a 2010 vyplývá, že ročník 2010 se vyznačuje větší druhovou rozmanitostí, na tuto skutečnost může mít vliv řada faktorů – klimatické podmínky, odrůda vína či doba odběru vzorků. Zásadní vliv také může mít fakt, že kvašení vinného moštu v r. 2009 probíhalo v laboratoři a kvašení vinného moštu v r. 2010 probíhalo ve vinném sklepě.
- Z výsledných dedrogramů je patrné, že hranice pro druhové odlišení kvasinek rodu *Saccharomyces* je 85,5 % - 88 %.
- Do budoucna by bylo potřeba se zaměřit na podrobnou studii typových kvasinek – přezkoumání správnosti jejich taxonomického zařazení a navýšit počet analyzovaných druhů. Na základě genetické klastrové analýzy jsme byli schopni u velké skupiny *Saccharomyces cerevisiae* pozorovat různé hodnoty podobnosti i na úrovni kmene. Co se týká vybraných primerů, jako nejvhodnější se jeví na druhovou analýzu primer (GAC)₅.

5 LITERATURA

- [1] JANDEROVÁ, Blanka; BENDOVIÁ, Olga. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1999. 108 s. ISBN 80-7184-990-1.
- [2] SANDRA RAINIERI, CARLO ZAMBONELLI and YOSHINOBU KANEKO: "Saccharomyces sensu stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution". *JOURNAL OF BOISCIENCE AND BIOENGINEERING*, vol. 96, 1-9 (2003).
- [3] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [4] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava : ALFA, 1990. 699 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [5] DRDÁK, Milan. *Základy potravinárských technológií*. 1. vyd. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [6] KNOZ, Jan . *Obecná zoologie 1. : Taxonomie, látkové složení, cytologie a histologie*. 4. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1990. 328 s. ISBN 80-210-0115-1.
- [7] BELTRAN, GEMMA; TORIJA, MARIA JESÚS; NOVO, MAITE. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: *SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY*. 2002, 25, s. 287–293.
- [8] FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. ; LÓPEZ, V.; RAMÓN, D. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques . *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 70, Issues 1-2, s. 1-10. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7K-44724S4-1&_user=10&_coverDate=10%2F22%2F2001&_alid=1210426346&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5061&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=62&_acct=C00050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=dfa5f4551b21dd506b111aba32525200>.
- [9] XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 108, s. 376–384.
- [10] TORIJA, Mar'ia Jes'us; ROZ`ES, Nicolas; POBLET, Montse. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001, 79, s. 345–352.
- [11] LE JEUNE, Christine; ERNY, Claude; DEMUYTER, Catherine. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to. *Food Microbiology*. 2006, 23, s. 709–716.

- [12] CLEMENTE-JIMENEZ, Josefa; MINGORANCE-CAZORLA, Lydia; MARTINEZ-RODRIGUEZ, Sergio. Molecular characterization and oenological properties of. *Food Microbiology*. 2004, 21, s. 149–155.
- [13] LOPES, Christian; RODRÍGUEZ, María; SANGORRÍN, Marcela. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2007, 34, s. 139–149.
- [14] FLEET, Graham H. . Yeast interactions and wine flavour . *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 86, Issues 1-2, s. 11-22. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7K-4903GTK-3&_user=10&_coverDate=09%2F01%2F2003&_alid=1210440941&_rdoc=2&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5061&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=1072&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=294859e483093e1ef41b976fa0563db1> .
- [15] ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* . 2003, 86, s. 169– 180.
- [16] ROZSYPAL, Stanislav, et al. *Nový přehled biologie*. Praha : Scientia, 2003. 797 s. ISBN 80-7183-268-5.
- [17] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna . *Katalóg kultúr kvasinek*. Bratislava : VEDA, 1977. 320 s. ISBN 71-033-77.
- [18] ŠMARDA, Jan; DOŠKAŘ, Jiří; PANTŮČEK, Roman. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [19] PRŮŠA, R.: Multimediální učebnice DNA diagnostiky [online]. 1.vyd. Praha : 2. lékařská fakulta UK, 1998 [cit. 2011-03-29]. Dostupné z WWW: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm>.
- [20] BROWN, T.A. *Klonování genů a analýza DNA*. 1. české vydání. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [21] DOS SANTOS, Scheila Karina Brito ; BASILIO, Anna Carla Moreira ; BRASILEIRO, Bereneuza Tavares Ramos Valente. *Identification of yeasts within Saccharomyces sensu stricto complex by PCR-fingerprinting*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007, no. 23, s. 1613-1620.
- [22] FORNŮSKOVÁ, Alena. *Mikrosatelity a jejich využití při studiu genetické struktury populací netopyrů*. Brno, 2007. 43 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: http://is.muni.cz/th/143906/prif_b/bakalarska_prace.doc.
- [23] ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 2002, 11, s. 1-16.

- [24] HEALY, Mimi; HUONG, Joe; BITTNER, Traci. Microbial DNA Typing by Automated. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 2005, vol. 43, no. 1, s. 199–207.
- [25] SILVA-FILHO, Eurípedes Alves; SANTOS, Scheila Karina; MONTE RESENDE, Alecsandra. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2005, 88, s. 13–23.
- [26] SACHSE, Konrad. Specifity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular biotechnology*. 2004, vol. 35, ?, s. 61-79.
- [27] MONTROCHER, Robert ; VERNER, Marie-Christine; BRIOLAY, Jérôme. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphis. *International journal of systematic bacteriology*. 1998, no. 48, s. 295-303.
- [28] MATOULKOVÁ, Dagmar. *Klasifikace a význam kvasinek*. Brno, 2010. 16 s. Rigorózní práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/67633/prif_r/Rigorozni_prace.pdf>.
- [29] NAUMOV, GI. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of industrial microbiology*. 1996, no. 17, s. 295-302.
- [30] REPLANSKY, Taissa; KOUFOPANOU, Vassiliki; GREIG, Duncan. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends in Ecology and Evolution*. 2008, vol. 23, no. 9, s. 494-501.
- [31] PULVIRENTI, Andrea; NGUYEN, Huu-Vang; CAGGIA, Cinzia. *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 192, s. 191-196.
- [32] CSOMA, H.; ZAKANY, N.; CAPECE, A. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 140, s. 239–248.
- [33] SEBASTIANI, Federico; BARBERIO, Claudia; CASALONE, Enrico. Crosses between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Research in Microbiology*. 2002, 153, s. 53–58.
- [34] RASPOR, Peter; MILEK, Damjana Miklič; POLANC, Juliana . Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, vol. 109, no. 1-2, s. 97-102.

- [35] ORLIC, Sandi; VOJVODA, Tanja; HUIC´ BABIC, Katarina. Diversity and oenological characterization of indigenous. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010, 26, s. 1483–1489.
- [36] NIKOLOU, Efstrations; ANDRIGHETTO, Christian; LOMBARDI, Angiolella. Heterogenecity in genetic and phenotypic charakteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. *Food Control.* 2007, no. 18, s. 1458-1465.
- [37] DLAUCHY, Dénes; TORNAI-LEHOCZKI, Judit; PÉTER, Gábor . Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as taxonimoc tool in yeast identification. *Systematic and applied microbiology.* 1999, no. 22, s. 445-453.
- [38] RUMML, Tomáš . *Genové inženýrství.* Vyd. 1. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [39] TOWBIN, Jeffrey A. Polymerase chain reaction and its uses as a diagnostic tool for cardiovascular disease. *Tutorial in molecular biology.* 1995, vol. 5, no. 5, s. 175-185. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T1D-3YVD607-6&_user=10&_coverDate=10%2F31%2F1995&_alid=1344671036&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4888&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=1665&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=19855c6274af11e2047771f917fd8003>.
- [40] OLIVOVÁ, Radana. *Optimalizace metody PCR-RFLP pro taxonomické zařazen kvasinek.* Brno, 2009. 92 s. Diplomová práce. VUT v Brně.
- [41] VANROMPAY, D. Advances in nucleic acid-based diagnosis. *Seminar in Avian and Exotic Pet Medicine.* 2000, vol. 9, no. 1, s. 2-13. Dostupný také z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B75K1-4K310D6-3&_user=10&_coverDate=01%2F31%2F2000&_alid=1344671256&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=13165&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=8467&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=28c9445eb8418ed1213eae7abb3b9ca0>.

Seznam použitých obrázků

- [42] Macháček, Tomáš, et al. Biomach : Přehledně uspořádané výpisky z biologie a ještě něco navíc [online]. 2010 [cit. 2011-04-13]. Dostupné z WWW: <http://biomach.wz.cz/obecnabiologie_eukaryotnibunka.htm>.
- [43] Are you Scicurious? [online]. 2003 [cit. 2011-04-13]. Scicurious. Dostupné z WWW: <<http://scicurious.wordpress.com/2010/07/14/aging-cancer-and-p53/>>.

- [44] Macháček, Tomáš, et al. Biomach : Přehledně uspořádané výpisky z biologie a ještě něco navíc [online]. 2010 [cit. 2011-04-13]. Dostupné z WWW: <http://biomach.wz.cz/img_ob_mitoza.jpg>.
- [45] PEARSON [online]. 2002 [cit. 2011-04-13]. The biology place. Dostupné z WWW: <http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/meiosis/overview.html>.
- [46] Zane's Blog [online]. 2011 [cit. 2011-04-13]. Glycolysis and gluconeogenesis concept map. Dostupné z WWW: <<http://movies-tatecalebzane.blogspot.com/2011/03/glycolysis-and-gluconeogenesis-concept.html>>.
- [47] BaileyBio [online]. 2008 [cit. 2011-04-13]. Alcoholic Fermentation. Dostupné z WWW: <<http://www.baileybio.com/plogger/?level=picture&id=953>>.
- [48] Institute for Viral Pathogenesis [online]. 2001-2005 [cit. 2011-04-13]. Detection of HHV-6, EBV and HTLV-2 Genomic DNAs by Nested PCR. Dostupné z WWW: <http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm>.
- [49] DNA laboratoř katedry botaniky PřF UK v Praze [online]. 2001 [cit. 2011-04-13]. ITS primery základní (White et al. 1990). Dostupné z WWW: <http://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=article&id=70:its-primery&catid=57:its-primery&Itemid=82>.
- [50] DNA [online]. 2000 [cit. 2011-04-13]. Structural and functional studies of DNA polymerase I enzymes. Dostupné z WWW: <<http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg54a/New/DNArep.htm>>.
- [51] NAVAJO [online]. 1999 [cit. 2011-04-13]. Polymerase řetězová reakce. Dostupné z WWW: <<http://polymerase-retezova-reakce.navajo.cz/>>.
- [52] Katedra molekulární biologie Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích [online]. 2008 [cit. 2011-04-13]. Od genu k proteinu. Dostupné z WWW: <<http://apendix.prf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio.htm>>.

6 SEZNAM ZKRATEK

ADP	Adenosin difosfát
ATP	Adenosin trifosfát
GMO	Geneticky modifikované mikroorganismy
<i>H.</i>	<i>Hanseniaspora</i>
<i>I.</i>	<i>Issatchenkia</i>
IGS	Vnější přepisovaná oblast (z angl. intergenic spacer refion)
ITS	Vnitřní přepisovaná oblast (z angl. internal transcribed spacer)
<i>K.</i>	<i>Kluyveromyces</i>
mtDNA	Mitochondriální DNA
NK	Negativní kontrola
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce
<i>R.</i>	<i>Rhodotorula</i>
RAPD	Polymorfismus náhodně amplifikované DNA
rDNA	Ribosomální DNA
rep-PCR	Interrepetitivní PCR (z angl. Repetitive extragenic palindromic PCR)
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	Riboxynukleová kyselina
rRNA	Ribosomální RNA
RT-PCR	PCR v reálném čase (z angl. real-time PCR)
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
ST	Délkový standard
<i>T.</i>	<i>Torulaspora</i>
UV	Ultrafialové záření
<i>Z.</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>

7 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Ukázka zobrazení gelů pro vyhodnocení

Příloha 2: Dendrogram typových kvasinek

Příloha 3: Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2009 (integrovaná vinice)

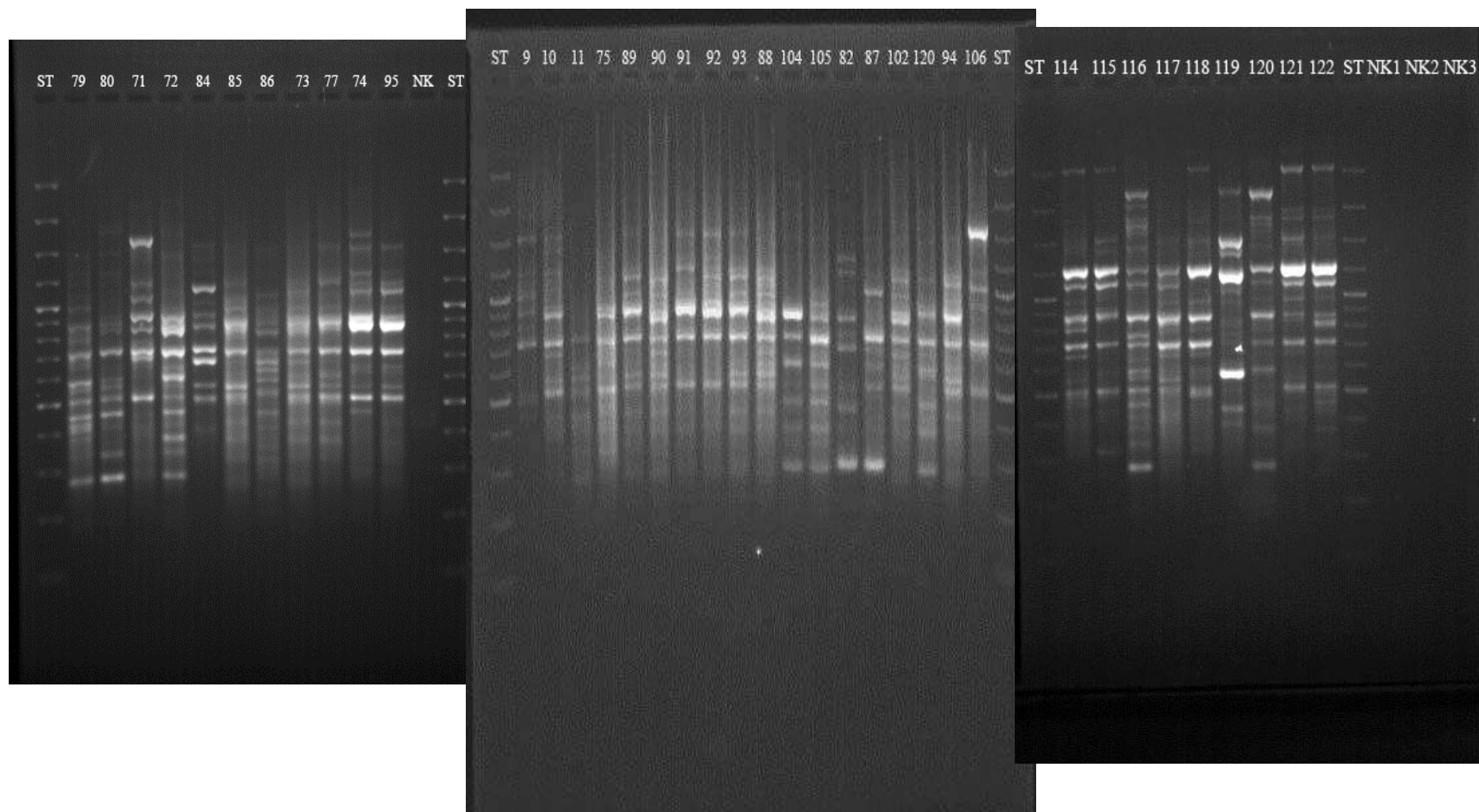
Příloha 4: Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2009 (ekologická vinice)

Příloha 5: Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2010 (integrovaná vinice)

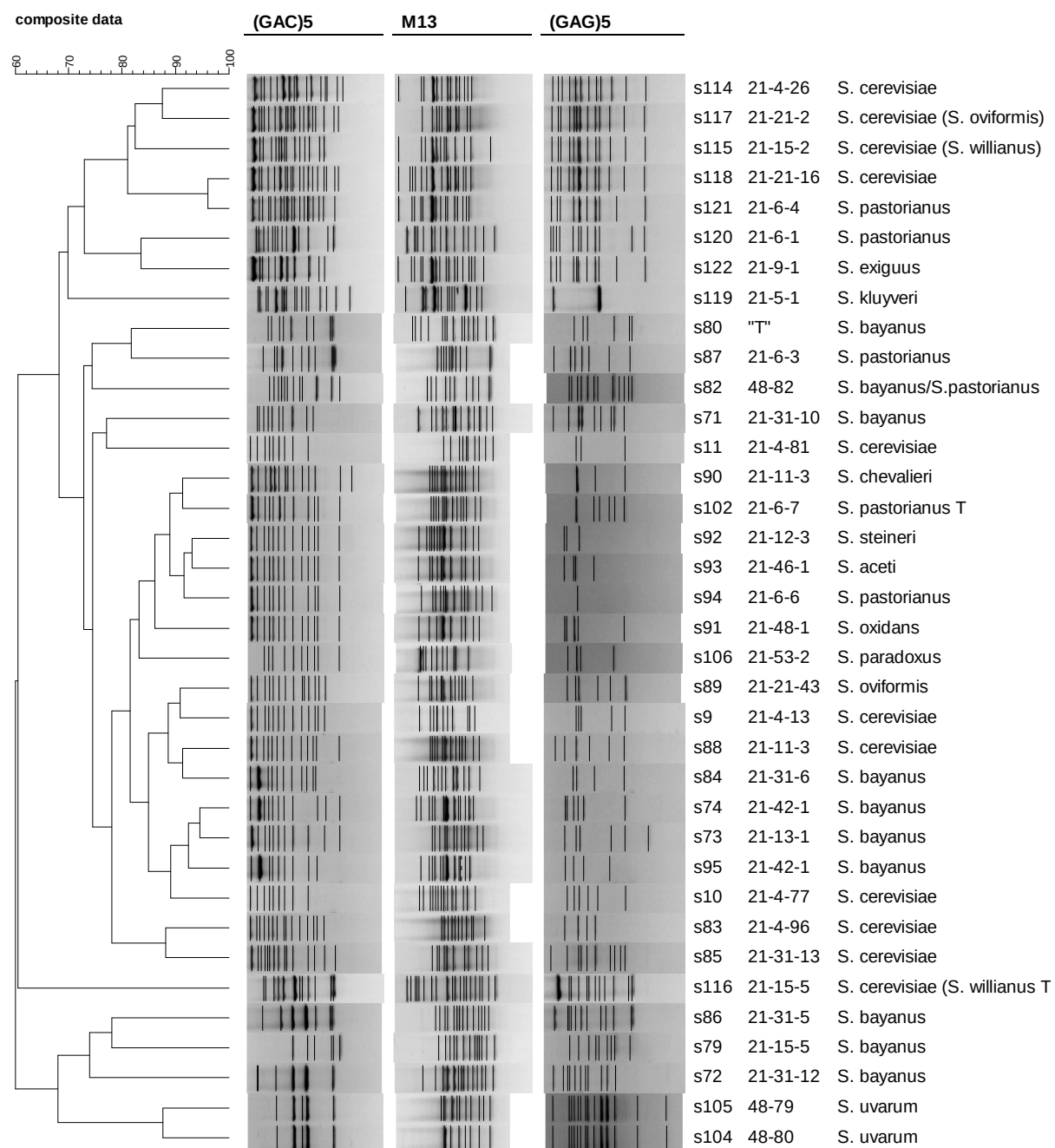
Příloha 6: Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2010 (ekologická vinice)

PŘÍLOHY

Příloha 1: Ukázka zobrazení gelů pro vyhodnocení

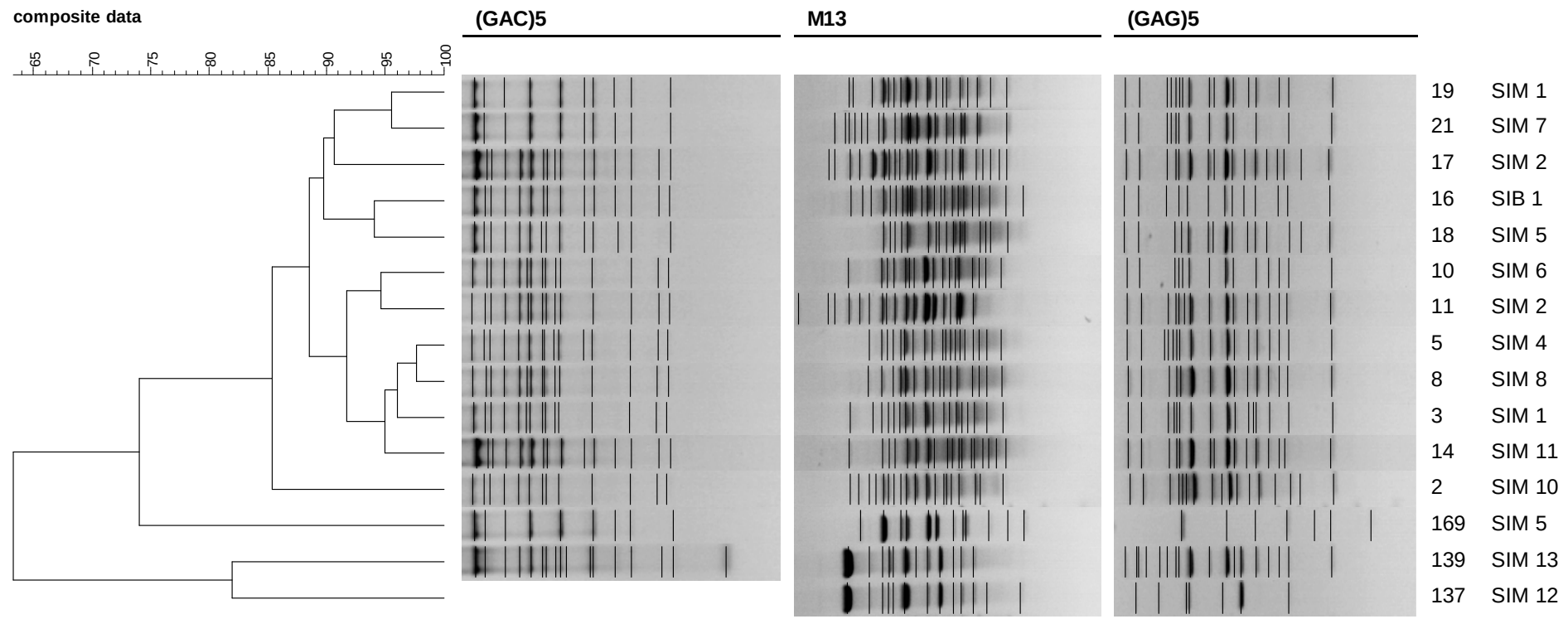


Příloha 2: Dendrogram typových kvasinek



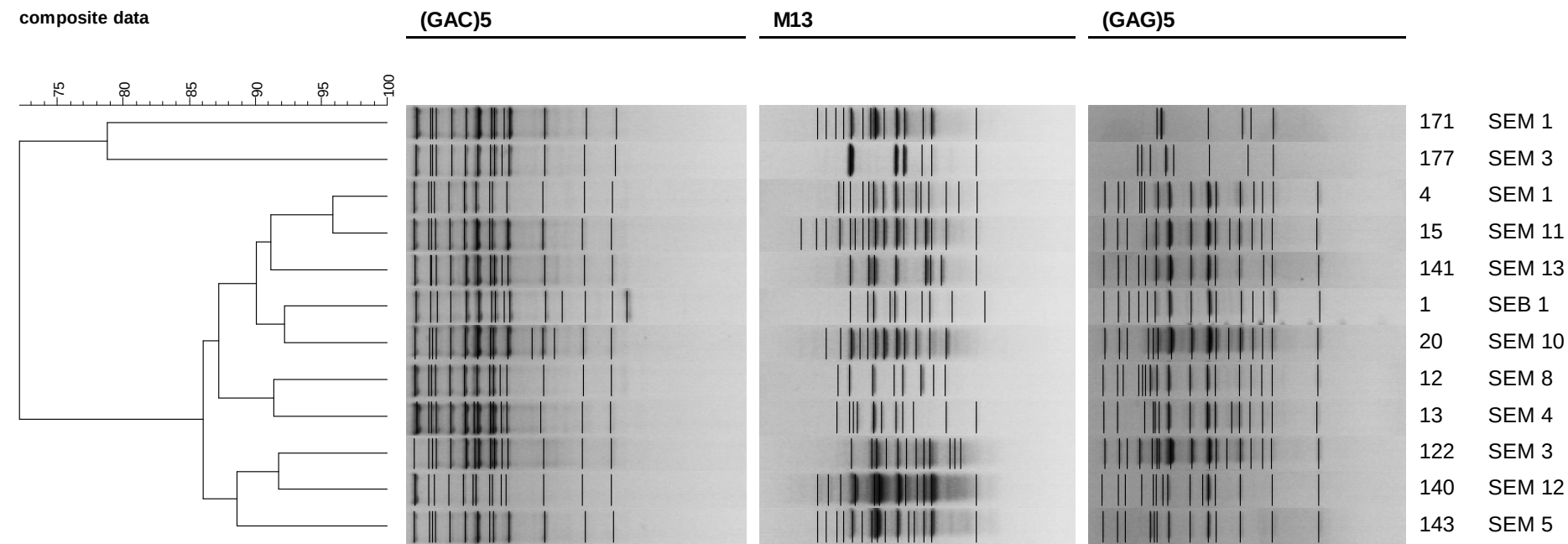
Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2009

Integrovaná vinice

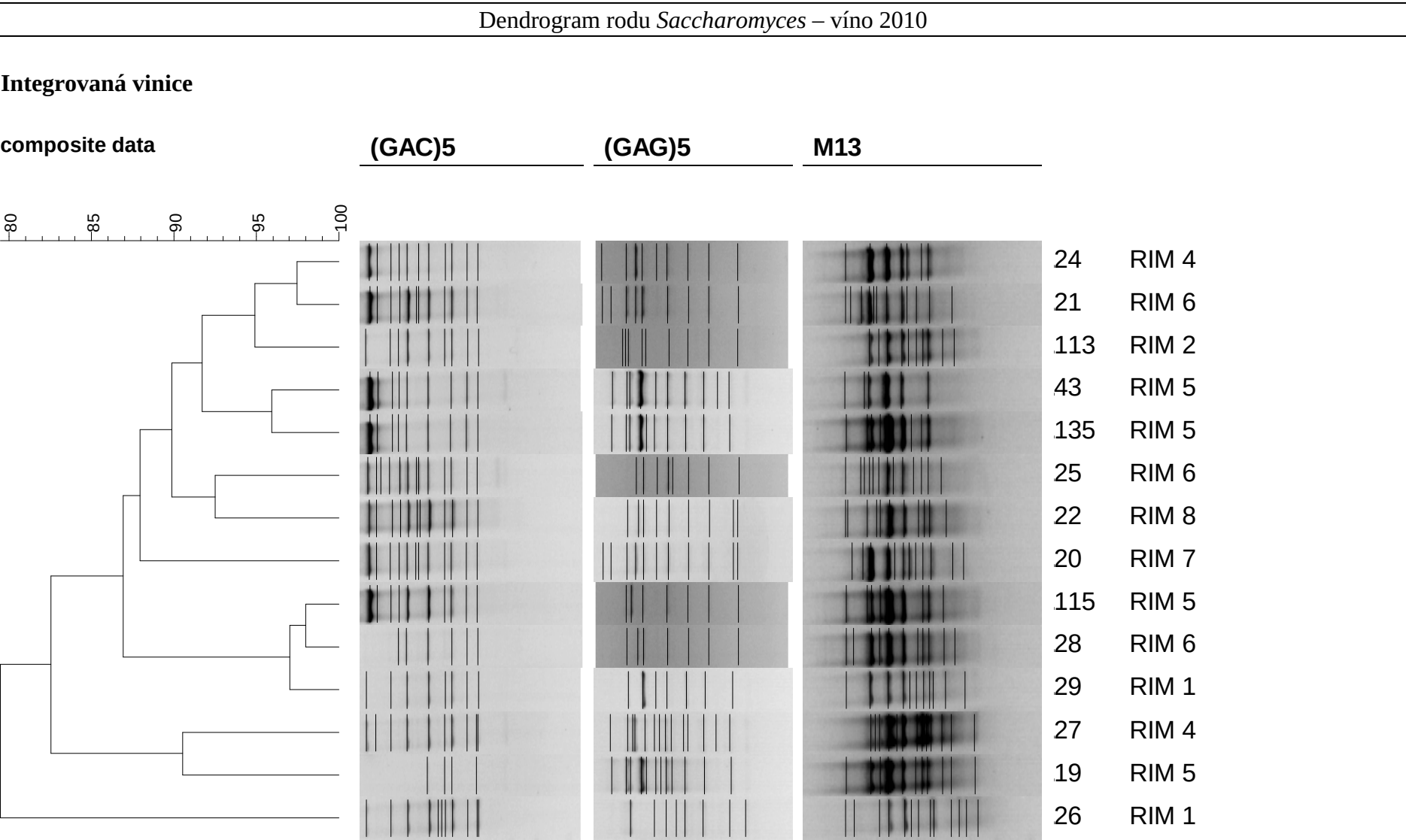


Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2009

Ekologická vinice



Příloha 5: Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2010 (integrovaná vinice)



Dendrogram rodu *Saccharomyces* – víno 2010

Ekologická vinice

