



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH TECHNIK K CHARAKTERIZACI
KVASINEK RODU METSCHNIKOWIA**

USE OF MOLECULAR TECHNIQUES TO CHARACTERIZE YEASTS OF THE GENUS METSCHNIKOWIA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Nicole Schneiderwindová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1655/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Nicole Schneiderwindová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití molekulárních technik k charakterizaci kvasinek rodu *Metschnikowia*

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše – možnosti provedení a využití molekulárních metod k charakterizaci kvasinek, aplikace metod v biotechnologii případně potravinářství.
- 2) Optimalizace izolace DNA a podmínek analýzy vybranými molekulárními technikami.
- 3) Analýza genomu vybraných kvasinek rodu *Metschnikowia*.
- 4) Srovnávací charakterizace genomu kvasinek rodu *Metschnikowia*.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.
Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Nicole Schneiderwindová
studentka

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi provedení a využití molekulárních metod k charakterizaci kvasinek rodu *Metschnikowia* a také aplikací metod v biotechnologiích případně v potravinářském průmyslu. V teoretické části je zaměřena na stručný popis kvasinek, zejména vybraných druhů, které se používaly během praktické části, možnosti jejich využití, a především na detailní popis všech použitých molekulárních technik. V praktické části se zaměřuje na optimalizaci použitých molekulárních metod, konkrétně metody pulzní gelové elektroforézy (PFGE) a metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE).

Na začátku byla provedena kultivace kvasinek za optimálních podmínek, které jsou pro tento rod specifické. Dále byla pomocí izolačních technik izolována jejich DNA, která byla následně podrobena zpracování pomocí metod PFGE a PCR–DGGE.

Nejvíce bylo třeba optimalizovat postup izolace DNA. Bylo provedeno několik optimalizací koncentrace lyzačních enzymů, zejména pak enzymu lytikázy. Také bylo potřeba stanovit správný poměr low-melting agarosy a izolované DNA, což bylo zásadní pro správnou konzistenci izolovaných DNA bločků a pro jejich další uplatnění při PFGE analýze. Nakonec byla provedena optimalizace metody PFGE, která přinesla správné rozdělení chromozomů, díky čemuž bylo možné jednotlivé chromozomy popsat dle jejich velikosti podle použitého standardu CHEF kvasinky *Hansenula wingei*.

Pro správnou optimalizaci samotného procesu DGGE analýzy bylo třeba nejdříve izolovat kvasinkovou DNA pomocí kitu, tato DNA byla následně použita jako templát pro PCR reakci. Byla optimalizována také teplota annealingu pro jednotlivé skupiny použitých primerů. Amplikony, které byly získány pomocí této reakce byly separovány pomocí metody DGGE. U této techniky bylo zapotřebí především optimalizace základních parametrů jako je rozsah denaturačního gradientu či celkový čas separace.

Dle výsledků měření lze určit, že postup izolace DNA kvasinek a jejich následná analýza pomocí molekulárních metod pulzní gelové elektroforézy a denaturační gradientové gelové elektroforézy byla úspěšná. Podařilo se nám alespoň částečně popsat genom a určit počet chromozomů u všech použitých druhů kvasinek rodu *Metschnikowia*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, *Metschnikowia*, DNA, biotechnologie, PFGE, PCR, DGGE

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the possibilities of implementation and use of molecular methods for the characterization of yeasts of the genus *Metschnikowia* and the application of methods in biotechnology or the food industry. The theoretical part focuses on a brief description of yeast, specially selected species that were used during the practical part of the work, the possibilities of their use, and especially on a detailed description of all molecular techniques used. The practical part focuses on the optimization of the molecular methods, namely the method of pulsed gel electrophoresis and the method of denaturing gradient gel electrophoresis.

Initially, yeast was cultured under optimal conditions that are specific to this genus. Furthermore, their DNA was isolated using isolation techniques, which were subsequently processed using PFGE and PCR–DGGE methods.

The DNA isolation procedure needed to be optimized the most. Several optimizations of the concentration of lysis enzymes, especially the lyticase enzyme, were performed. It was also necessary to determine the correct ratio of low-melting agarose and isolated DNA, which was essential for the correct consistency of the isolated DNA blocks and their further application in PFGE analysis. Finally, the PFGE method was optimized, which brought the correct distribution of chromosomes, and it was possible to describe the individual chromosomes according to their size according to the standard used CHEF of the yeast *Hansenula wingei*.

To properly optimize the DGGE analysis process itself, it was first necessary to isolate the yeast DNA using a kit, then it was used as a template for the PCR reaction. The annealing temperature was also optimized for the individual groups of primers. The amplicons obtained by this reaction were separated by the DGGE method. This technique mainly required the optimization of basic parameters such as the range of the denaturation gradient or the total separation time.

According to the measurement results, it can be determined that the process of yeast DNA isolation and their subsequent analysis using molecular methods of pulsed gel electrophoresis and denaturing gradient gel electrophoresis was successful. We were able to describe the genome and determine the number of chromosomes in all used yeast species of the genus *Metschnikowia* at least partially.

KEYWORDS

Yeast, *Metschnikowia*, DNA, biotechnology, PFGE, PCR, DGGE

CITACE

SCHNEIDERWINDOVÁ, Nicole. *Využití molekulárních technik k charakterizaci kvasinek rodu Metschnikowia*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139089>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především vedoucí mé diplomové práce Ing. Andrei Němcové, Ph.D. za její čas a také profesionální a odborný přístup k mému vedení během zpracovávání experimentální části diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat dr. Kovaříkovi z Akademie věd ČR za zapůjčení PFGE přístroje, který nám pomohl dotáhnout práci do konce. V neposlední řadě patří mé poděkování prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc., jakožto ředitelce Ústavu chemie potravin a biotechnologií za umožnění vytváření této diplomové práce na jejím ústavu. Jedno velké poděkování bych chtěla na závěr směřovat k mé rodině, která pro mě byla vždy největší oporou během celého mého studia.

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1	Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy.....	10
1.1.1	Rozmnožování kvasinek	10
1.1.2	Genetika kvasinek	11
1.2	Biotechnologicky významné rody kvasinek	11
1.2.1	Rod <i>Metschnikowia</i>	12
1.2.1.1	Druh <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	12
1.2.1.2	Druh <i>Metschnikowia andauensis</i>	14
1.2.1.3	Druh <i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	15
1.2.1.4	Druh <i>Metschnikowia shanxiensis</i> , <i>Metschnikowia zizyphicola</i> a <i>Metschnikowia sinensis</i>	16
1.3	Kultivace a růst mikroorganismů	16
1.3.1	Živná média	16
1.3.2	Kultivace mikroorganismů.....	17
1.3.2.1	Způsoby kultivace.....	18
1.4	Molekulární charakteristiky kvasinek	18
1.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
1.4.1.1	Princip polymerázové řetězové reakce	19
1.4.1.2	Komponenty pro PCR	20
1.4.1.2.1	Termostabilní DNA polymeráza	20
1.4.1.2.2	Oligonukleotidové primery	20
1.4.1.2.3	Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs)	21
1.4.1.2.4	Templátová DNA	21
1.4.1.2.5	Reakční pufr s hořčnatými kationty	21
1.4.1.3	Termocykler.....	22
1.4.1.4	Modifikace PCR používané pro detekci kvasinek.....	22
1.4.2	Denaturační gelová gradientová elektroforéza (DGGE).....	23
1.4.2.1	Princip metody DGGE.....	23
1.4.2.2	Průběh metody DGGE v praxi.....	25
1.4.3	Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)	26
1.4.3.1	Princip metody PFGE	26
1.4.3.2	Použití metody PFGE v praxi	28
1.4.4	Dosavadní dosažené výsledky v charakterizaci kvasinek rodu <i>Metschnikowia</i> pomocí molekulárních metod	29

1.4.5	Aplikace použitých molekulárních metod	31
2	CÍLE PRÁCE	33
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1	Použité chemikálie a materiály	34
3.1.1	Chemikálie použité při realizaci experimentální části diplomové práce	34
3.2	Použité přístroje a pomůcky	35
3.2.1	Pomůcky použité při realizaci experimentální části diplomové práce	35
3.3	Použité kmeny kvasinek	36
3.4	Analýza DNA kvasinek pomocí metody pulzní gelové elektroforézy	36
3.4.1	Kultivace kvasinek	36
3.4.1.1	Kultivační médium	36
3.4.2	Postup izolace kvasinkové DNA	37
3.4.3	Metoda pulzní gelové elektroforézy	39
3.4.4	Vizualizace výsledků na připraveném gelu	39
3.5	Analýza DNA kvasinek pomocí metody PCR a denaturační gradientové gelové elektroforézy	40
3.5.1	Postup izolace DNA pomocí kitu DNeasy UltraClean Microbial Kit	40
3.5.2	Nested PCR	41
3.5.2.1	Příprava reakční směsi pro nested PCR	41
3.5.2.2	Průběh amplifikace	42
3.5.3	Kontrola PCR produktů pomocí horizontální gelové elektroforézy	43
3.5.4	Přečištění PCR produktů pomocí ethanolu	44
3.5.5	Denaturační gradientová gelová elektroforéza	44
3.5.5.1	Příprava polyakrylamidového gelu s denaturačním gradientem	44
3.5.5.2	Příprava vzorků pro DGGE a její samotné provedení	46
3.5.5.3	Obarvení DGGE gelu	46
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	47
4.1	Optimalizace metody PFGE	47
4.1.1	Optimalizace izolačního postupu DNA do gelových bločků	47
4.1.2	Optimalizace podmínek metody PFGE	47
4.2	Optimalizace nested PCR reakce	53
4.2.1	Zpracování a kontrola čistoty izolované templátové DNA	53
4.2.2	První amplifikační krok	54
4.2.3	Druhý amplifikační krok	55
4.2.4	Elektroforetická detekce fragmentů produktů PCR reakce	55

4.2.4.1	První amplifikace nested PCR oblasti ITS1	55
4.2.4.2	Druhá amplifikace nested PCR oblastí ITS1 a 5,8–ITS2 rDNA	57
4.2.4.3	První amplifikace nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA	59
4.2.4.4	Druhá amplifikace nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA.....	60
4.3	Optimalizace metody DGGE.....	61
4.3.1	Optimalizace denaturačního gradientu	61
4.3.2	Optimalizace délky trvání separace fragmentů.....	63
4.3.3	Vlastní analýza referenčních kmenů kvasinek rodu <i>Metschnikowia</i>	64
4.3.3.1	Fragmenty oblasti 5,8–ITS2 rDNA	66
4.3.3.2	Fragmenty D1/D2 oblasti 26S rDNA	68
ZÁVĚR.....		70
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		72
LITERATURA		73

ÚVOD

Kvasinky patří mezi nejdůležitější modelové organismy díky jejich relativně jednoduché stavbě buňky, snadné manipulaci, možnosti sekvenování genomu a také kultivaci. Mají velký význam v potravinářském, biotechnologickém i farmaceutickém průmyslu. Mezi tyto významné organismy, které mají velký potenciál v biotechnologickém uplatnění patří i kvasinky rodu *Metschnikowia*. Jejich výjimečnost tkví v jejich antifugálním charakteru, který může sloužit jako ochrana plodů či květů ovoce, čímž dokážou přispět k udržení biodiverzity ovoce a uchránit ho před plesnivěním při pěstování i dlouhých transpotech.

Tradiční metody kultivace a popisu mikroorganismů zahrnují až 90 různých testů, proces jejich identifikace je časově velmi náročný a také složitý. Výsledky jsou v tomto případě nejisté, jelikož mohou obsahovat velké množství chyb. Největší omezení těchto tradičních kultivačních metod je, že se velmi těžko dají napodobit reálné podmínky, při kterých mikroorganismy rostou v přírodě. Proto se v dnešní době snažíme především o zlepšení a zjednodušení metod identifikace kvasinek. Zásadní pro toto zlepšení bylo zavedení molekulárních metod.

Tato diplomová práce se zabývá zejména použitím metod pulzní gelové elektroforézy a metody denaturační gradientové gelové elektroforézy. Jsou to metody, které se používají k separaci kvasinkového genomu, jeho zpracování a následnému pozorování změn genomu jako celku, ale také velice konkrétních úseků DNA. Konkrétně metoda denaturační gradientové gelové elektroforézy slouží k detekci jednonukleotidových záměn v molekulě DNA. Předchází jí nested PCR reakce, která má za úkol DNA rozštěpit na jednotlivé fragmenty. Metody svým rozsahem na kvasinkový genom činí tento výzkum tolik specifickým a důležitým pro položení základů při pozorování tohoto zatím nedostatečně popsaného kvasinkového rodu.

Cílem diplomové práce je optimalizace použitých molekulárních technik pro kvasinky rodu *Metschnikowia*. Vychází z literární rešerše zaměřené na princip a aplikace použitých metod, stejně jako na vybrané druhy těchto kvasinek. Zaměřuje se také na biotechnologické využití kvasinek a jejich aplikace v potravinářském průmyslu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotické mikroorganismy, které se systematicky zařazují mezi *Fungi*. Lze je charakterizovat jako organismy, které tvoří jednotnou taxonomickou skupinu. Nejčastěji se vyskytují v půdě, rostlinách a také v potravinách. Jejich přirozené prostředí je pro ně zdrojem živin a poskytuje jim útočiště, kde mohou volně růst a rozmnožovat se. Taxonomicky se rozdělují dle způsobu rozmnožování podle toho, zda je pohlavní či nepohlavní.

Souhrnně se označují pohlavně se rozmnožující kvasinky jako teleomorfní organismy, které dělíme mezi *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Kvasinky, které se rozmnožují nepohlavně se označují jako *Deuteromycetes*. Dle taxonomie lze charakterizovat i tzv. kvasinkovité mikroorganismy, což jsou organismy se složitějším životním cyklem, v němž má přesto dominantní zastoupení právě kvasinková fáze, která se vyznačuje rozmnožováním formou pučení [1, 2].

Jsou to mikroskopické organismy, které dosahují délky 3-15 μm , jsou tedy větší než bakterie. Tvar jejich buněk je velmi rozmanitý, jelikož je obvykle závislý na vnějších podmínkách, které buňky obklopují a také na jejich vlastní funkci. V čisté kultuře se také mění v závislosti na stádiu vývoje. Je zde vysoká škála tvarů od kulatých, vejcovitých, podlouhlých až po vláknité. Buňky mají typickou eukaryotickou strukturu, která se skládá z několika segmentů. Prvním segmentem je silná buněčná stěna obklopující povrch buňky. Pod ní se nachází cytoplazmatická membrána, která zakrývá vnitřní struktury membránových organel – jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly, ribozomy, protoplasty a Golgiho aparát. Ve vnitřních strukturách jsou také obsažena zrníčka zásobních látek např. glykogenu, polymetafosfátu či tuku [3, 4, 5, 6].

1.1.1 Rozmnožování kvasinek

Jsou to organismy, které rostou převážně v koloniích z jednotlivých buněk, mohou se tedy množit dvěma způsoby – pohlavně (sexuálně) a nepohlavně (vegetativně).

A. *Pohlavní* – redukční dělení z diploidní buňky při němž vzniká askus, ve kterém se vytváří askospory a bazidiospory. Askospory jsou umístěny v asku a mohou mít různý tvar, bazidiospory jsou naopak umístěny na vnější straně spórovitých buněk. Pro jejich základní

rozlišení se používá test schopnosti produkovat ureázu nebo barvení nárůstu biomasy diazoniovou modří [7, 8].

B. Nepohlavní – je spousta způsobů, kterými se mohou kvasinky nepohlavně rozmnožovat, velkou mírou tento způsob ovlivňuje tvar buňky. Většina kvasinek se rozmnožuje klasickým pučením, ale mohou se rozmnožovat také jednoduchým zaškrcením či dělením. Některé rody vytváří protáhnuté buňky pučící pouze na pólech, které zůstávají spojené v dlouhá zaškrcená vlákna tzv. pseudomycelium. Mohou tvořit i pravé mycelium, které vzniká příčným dělením protáhnutých buněk [7].

1.1.2 Genetika kvasinek

U genetiky kvasinek jsou nejvíce podstatné dva druhy genetické informace – jaderná a mitochondriální DNA, v nich jsou uloženy všechny podstatné vlastnosti kvasinek, které se projevují při jejich kultivaci a charakterizaci. Mezi tyto vlastnosti patří informace o struktuře buněčných proteinů a molekul RNA, které se účastní syntézy proteinů a hrají důležitou roli v metabolismu kvasinek. Uložené geny se obvykle nemění vlivem vnějšího prostředí [9].

Jaderná genetika je zásadní, jelikož v jádře se nachází většina genetické informace, která je uložená v chromozomech. Počtem chromozomů se mezi sebou následně odlišují i jednotlivé druhy kvasinek, čímž se zabývá i tato diplomová práce, která se snaží na základě počtu chromozomů od sebe odlišit a popsat jednotlivé druhy kvasinek rodu *Metschnikowia*. Kromě chromozomů mohou být v jádře také obsaženy plazmidy či cirkulární molekuly DNA. Mitochondriální genetika je zaměřená na mitochondriální DNA, které buňka kvasinek obsahuje většinou mezi 20 a 100 molekulami a u jednotlivých druhů kvasinek se liší svou velikostí jednotlivých molekul. Proměnlivý počet mitochondriálních buněk je způsoben různými fázemi buněčného cyklu či rozdílnými kultivačními podmínkami [10].

1.2 Biotechnologicky významné rody kvasinek

Pro to, abychom mohli kvasinky klasifikovat jako biotechnologicky významné je třeba nejdříve porozumět jejich výživě, procesu fungování a ovlivňování jejich metabolismu, jejich růstu, rozmnožování a také jejich buněčné smrti [11].

Hrají významnou roli v potravinářství, kde se používají k výrobě dochucovadel, enzymů, barviv, aditiv atd. Nesmíme opomenout také jejich tradiční aplikace při výrobě lihových nápojů

či pekařského droždí, kde se kvasinky považují za prapředky dnešních průmyslových fermentačních procesů. V dnešní době již kvasinky zdaleka nenachází své využití pouze jako mikroorganismy pro kvasné procesy, mohou se geneticky modifikovat a využívat ve farmaceutickém průmyslu pro produkci léčiv, vakcín, probiotik, hormonů či krevních faktorů. Využívají se také v environmentálních technologiích, kde se zkoumá jejich účinek při procesech bioremediace, likvidace odpadů a v neposlední řadě při ochraně sklizně kde nachází své uplatnění právě kvasinky rodu *Metschnikowia*. Používají se rovněž jako modelové organismy v buněčné a molekulární biologii při klinickém výzkumu genotoxicity, léčby rakoviny nebo nemoci AIDS [11].

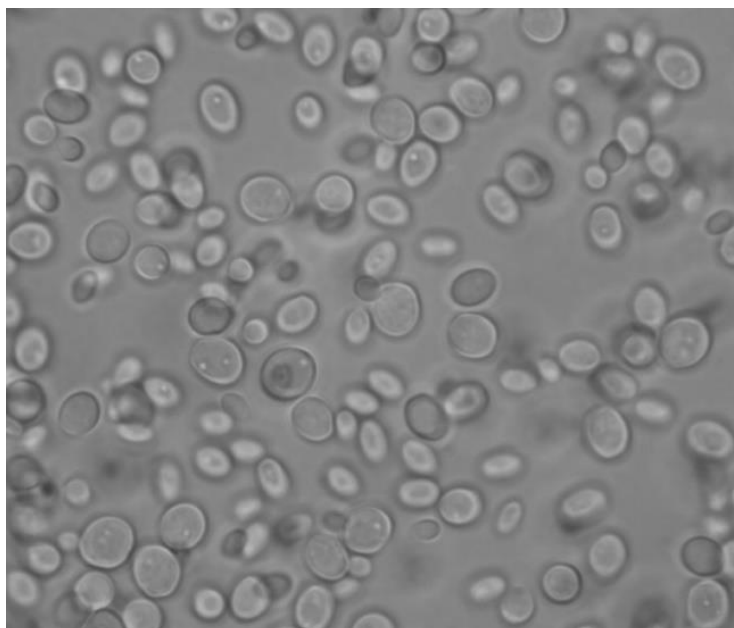
1.2.1 Rod *Metschnikowia*

Kvasinky patřící do čeledě *Metschnikowiaceae* je rod tvořený mnoha různými druhy kvasinek, bohužel zatím není jejich taxonomie dostatečně prozkoumána a je jich tedy zatím známo asi 40 druhů, které se vyskytují volně v přírodě i ve vodním prostředí. V přírodě je možné kvasinky izolovat nejčastěji z ovoce, květů nebo hmyzu a mají většinou pozitivní vliv na své přirozené prostředí. Naopak vodní druhy mají většinou spíše negativní až patogenní účinky na své přirozené prostředí a vyskytují se v tělech ryb či řasách. Jejich buňky mají také velkou škálu tvarů, které vytváří, nejčastěji tvar hruškovitý či sférický. Pro svůj růst potřebují především zdroj uhlíku, který je pro ně nepostradatelný, můžou k tomu využívat například maltózu, sacharózu či sorbózu. Jejich jedinečným poznávacím znakem je jehlovitý tvar askospory v prodloužených askech [12, 13, 14].

1.2.1.1 Druh *Metschnikowia pulcherrima*

Metschnikowia pulcherrima je velmi rozšířený druh kvasinek patřící do čeledě *Metschnikowiaceae*, který se vyznačuje produkcí pigmentu pulcherriminu. Vyskytuje se na mnoha druzích ovoce, květech, nektaru či dokonce v droždí, nejčastěji ji však můžeme hledat na zkvašeném ovoci. Z něj jsou následně kvasinky roznášeny hmyzem, kterému slouží jako zdroj potravy. Její buňky mají vejcovitý až elipsoidní tvar a za standardních podmínek jsou takřka nerozlišitelné od buněk *Saccharomyces cerevisiae*. K tomu, abychom je mohli mikroskopicky rozlišit je třeba stresových podmínek (např. nedostatek N), při stresových podmínkách totiž *Metschnikowia pulcherrima* vytváří na začátku sporulačního procesu uvnitř buňky tukovou kuličku. Je schopná růst při nízkých teplotách (15–20 °C) a velmi kyselém pH

(3-6), nedaří se jí na YPD ani dusičnanovém médiu a jako zdroj uhlíku využívá glukózu, fruktózu a další cukry kromě laktózy [15, 16, 17].

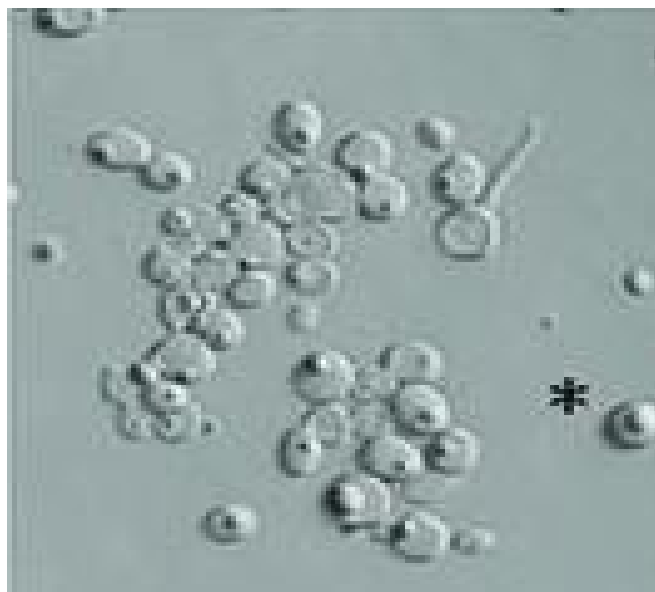


Obrázek 1: Buňka kvasinky rodu *Metschnikowia pulcherrima* [18]

Její největším potenciálem pro biotechnologické využití je schopnost fermentovat v kombinaci s jinými druhy kvasinek a modulovat syntézu sekundárních metabolitů fermentace ke zlepšení sensorického profilu vína. Její fermentační účinnost sice není tak velká jako u jiných druhů, ale *Metschnikowia pulcherrima* vyniká spíše svými specifickými vlastnostmi při fermentaci. Také má potenciál jako biokontrolní činidlo omezující konkurenci ve fermentačním médiu s ostatními druhy kvasinek, což se ukazuje jako velká výhoda ve vinařském průmyslu, kde by mohla řešit problém s nadměrným obsahem alkoholu ve víně. V poslední době se také začíná zkoumat jako možná náhrada palmového oleje, tento proces je stále ve fázi výzkumu, avšak výsledky se zatím ukazují jako slibné. Složení mikrobiálních lipidů je totiž velmi podobné rostlinným olejům a některé oleogenní kvasinky jsou dokonce schopny produkovat lipidy s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin. Připravuje nám to také cestu k ekonomické výrobě biopaliv, díky produkci antimikrobiálních sloučenin spojené s růstem při nízké teplotě je totiž umožněná kultivace olejnatých kvasinek v laciných a nesterilních podmínkách. Zájem o tyto kvasinky úzce souvisí s rostoucími cenami fosilních paliv a jejich negativním dopadem na životní prostředí [15, 16, 17, 19].

1.2.1.2 Druh *Metschnikowia andauensis*

Kvasinka je morfologickou i fyziologickou stavbou velmi podobná druhu *Metschnikowia pulcherrima*. Buňky mají kulovitý až oválný tvar a mohou se vyskytovat samostatně nebo ve dvojicích. Také podobně jako *M. pulcherrima* vytváří bílé až krémovité kolonie s hladkým povrchem, kultivuje se na tuhém živném médiu a jako zdroj uhlíku využívá monosacharidy (glukózu), disacharidy (maltózu), oligosacharidy (celobiózu) či glykosidy (salicin) [20].



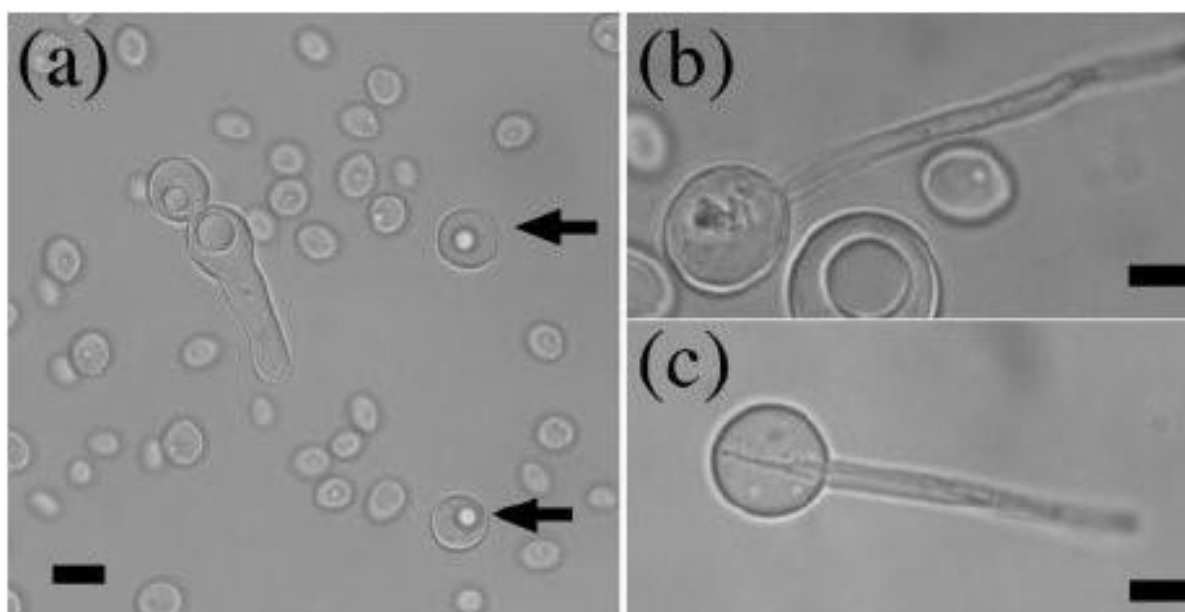
Obrázek 2: Buňka kvasinky rodu *Metschnikowia andauensis* [20]

Má antagonistické účinky, což znamená, že při společném vývoji organismů, jeden druh inhibuje růstový potenciál druhého druhu. Díky svým antagonistickým vlastnostem se využívá v biotechnologiích jako biokontrolní činidlo, v této formě se vyskytuje i v přírodě. Ukázala vynikající ochranu u jader citrusových plodů nebo jablek a je studována i u dalších druhů ovoce. U některých druhů jablek jako Golden Delicious či Bravo byla stanovena minimální účinná koncentrace *M. andauensis* proti *Penicillium expansum* na 1×10^6 cfu/ml. Její aplikace ovšem významně inhibovala růst patogenu při všech testovaných koncentracích, které byly i menší než minimální účinná. Ovšem obecně platí, že zvýšení koncentrace počtu buněk na mililitr snížilo výskyt a závažnost patogenů v médiu. Čili je lepší volit obecně vyšší koncentrace pro dostatečnou ochranu. Tato vlastnost kvasinek *M. andauensis* by mohla vést k vyřešení velkého problému s chemickými postřiky a pesticidy, které jsou dodnes využívány ve velké míře a je velký tlak na jejich omezení, ne-li úplný zákaz používání. Pokud se podaří prokázat dostatečný biokontrolní účinek i na jiných druzích ovoce či zeleniny, mohl by se kvasinkový izolát začít využívat jako bezpečná a účinná alternativa těchto nebezpečných

fungicidů. Kvasinka se využívá v biotechnologiích také díky jejím dobrým senzorickým vlastnostem, mezi ně patří zejména chuť a sladkost [20, 21, 22].

1.2.1.3 Druh *Metschnikowia chrysoperlae*

Buňky jsou kulovité, subkulovité nebo oválné, vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích. Tvoří bílé viskózní kolonie hladké na povrchu podobně jako *M. andauensis*. Hojně vytváří chlamydospory, ale vůbec ne pseudohyfy. Patří mezi symbiotické kvasinky, které byly izolovány z vajíček a dospělých jedinců hmyzu „lacewings“, kteří se řadí mezi *Chrysopidae* [20].



Obrázek 3: Ukázka buněk rodu *Metschnikowia chrysoperlae* na obrázku a-c, na obrázku b-c můžeme vidět zvětšené pučící buňky a začínající chlamydospory [20]

Buňky se podařilo izolovat z každé části tohoto hmyzu kromě larev, což by mohlo značit možnost vertikálního přenosu. Jsou s nimi údajně spojeny díky jejich zelené barvě a zkoumá se také jejich možný specializovaný vztah kvasinek a hostitele. Byly vyhledány na základě BLAST jako další možné příbuzné kvasinky poté, co se podařilo u stejného druhu hmyzu izolovat jiné druhy kvasinek rodu *Metschnikowia*. Od ostatních se však tyto kvasinky liší nejen genotypově, ale poměrně značně i z hlediska morfologického a fyziologického. Mezi její možné biotechnologické využití patří biologické kontroly, například při likvidaci mšic [20].

1.2.1.4 Druh *Metschnikowia shanxiensis*, *Metschnikowia zizyphicola* a *Metschnikowia sinensis*

Z povrchu ovoce jujuba sesbíraných v čínských provinciích Shanxi a Shandong bylo izolováno osm kvasinkových kmenů, které za vhodných podmínek produkovaly jehlovité askospory, ale pouze 3 samostatné skupiny se díky porovnání sekvencí rDNA a oblasti interního transkripčního spaceru (ITS) ukázaly jako nové druhy kvasinek rodu *Metschnikowia*. Mezi ně patří druhy *Metschnikowia shanxiensis*, *Metschnikowia zizyphicola* a *Metschnikowia sinensis*. Buňky těchto druhů jsou kulovité nebo oválné a vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích, jako tomu bylo u předchozích druhů kvasinek. Při jejich kultivaci se vytváří kroužek a sediment, barva jejich kolonií je máslová, konzistence krémová a tvar je hladký a vypouklý. Na rozdíl od jiných druhů nejen, že netvoří hyfy, ale velmi ojediněle tvoří i askospory. Od ostatních druhů se odlišují také konvenční a chemotaxonomickou charakterizací, například schopností asimilovat D-xylózu při asimilačních reakcích s D-glukosaminem a ethylaminem či svou neschopností asimilovat citrát a růst na médiu bez vitamínů. Jejich potenciální využití v biotechnologiích je aplikace na ovocné rány, kde se prokázalo, že dokážou ránu ochránit před infikováním patogeny [23].

1.3 Kultivace a růst mikroorganismů

Účelem kultivace mikroorganismů v laboratorních podmínkách je vypěstovat čisté kultury. Čistá kultura je populace milionů buněk stejného druhu, která vznikla množením z jedné buňky. Tyto kultury mají velký rozsah použití: používají se k diagnostickým metodám, ke zjištění růstových, biochemických či antigenních vlastností. Dále se používají k identifikaci a rozlišení jednotlivých druhů, ke genetickým studiím a v neposlední řadě k zajištění biotechnologických výrob. Jednotlivé mikroorganismy mají velmi různorodý metabolismus, díky němu mají také různé nároky na kultivaci a musíme tak používat různé složení a formu kultivačních živných půd [24].

1.3.1 Živná média

Mikroorganismy se nejčastěji kultivují v laboratorních podmínkách na sterilních živných médiích. Složení média se určuje podle druhu kultivovaného organismu a musí vyhovovat všem jeho požadavkům na výživu, pH, osmotický tlak a další fyzikálně-chemické podmínky. Aby byl zajištěn dobrý růst kultury na médiu je třeba, aby byly živiny ve správné koncentraci, není vždy pravdou, že vyšší koncentrace živin zajistí lepší růst, může to být často spíše

kontraproduktivní. Důležitý je také poměr kationtů a aniontů, jelikož při nadbytku některého z nich může docházet k inhibici transportu jiných iontů přes cytoplazmatickou membránu nebo může být účinek některého z iontů zastaven. Při sestavování živného média začínáme s vytvořením tzv. základního média z minerálních solí, které zajišťuje požadavky daného organismu na anorganické látky. Toto základní médium obsahuje ve velké míře vodu, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \times 7 H_2O$, $CaCl_2$ a stopové prvky jako Mn, Cu, Mo, Zn atd. K tomuto základnímu médiu se dále přidává zdroj C, N a energie, popřípadě se mohou přidávat růstové látky [24].

Živná média můžeme dělit dle několika kritérií:

– **podle původu a složení:**

- a) *Přirozené* – jsou to přirozené substráty, které jsou vhodné na krátkodobou kultivaci nebo izolaci z přírodních zdrojů,
- b) *Polosyntetické* – nejsou přesně chemicky definované, jako zdroj uhlíku a dusíku se přidávají proteiny a peptidy ve formě hydrolyzátů, peptonů či extraktů,
- c) *Syntetické* – jsou přesně chemicky definované, přidávají se do nich aminokyseliny, vitamíny nebo růstové faktory.

– **podle růstu mikroorganismů:**

- a) *Univerzální* – jejich složení vyhovuje širokému spektru mikroorganismů,
- b) *Selektivní* – jejich složení zvýhodňuje růst určité skupiny či druhu mikroorganismů díky obsahu inhibičních látek, které potlačují růst ostatních druhů,
- c) *Selektivně–diagnostické* – jejich složení vyhovuje pouze velmi malé skupině mikroorganismů, jejich růst se následně projeví charakteristickou biochemickou reakcí [7].

1.3.2 Kultivace mikroorganismů

Pojem kultivace označuje pěstování mikroorganismů při laboratorních podmínkách, tedy proces, který zahrnuje naočkování inokula do živného média a jeho inkubaci při optimální teplotě po různou dobu, která odpovídá výběru kultivovaného organismu [9, 25].

1.3.2.1 Způsoby kultivace

Kultivaci dělíme na tři základní druhy:

- a) *Statická* – mikroorganismy jsou naočkovány buď do tekutého nebo na povrch tuhého média. Během jejich růstu dochází k vyčerpání živin a hromadění zplodin metabolismu, které často mají inhibující vliv na růst,
- b) *Submerzní* – zde jsou mikroorganismy naočkovány do tekutého média, které je neustále protřepáváno a provzdušňováno, za těchto podmínek probíhá růst rychleji. Nevýhodou stejně jako u statické kultivace je problém se správnou specifikací růstových podmínek a zajištěním jejich konstantnosti,
- c) *Kontinuální* – u kultivace kontinuální je principem přitékání živin k rostoucí kultuře a odvod stejného objemu média s již narostlými organismy. Zvolením vhodných parametrů dosáhneme stavu rovnováhy, při kterém se stav v kultivačním tanku nemění a je tak udržovaný konstantní počet buněk. Je tedy ze zmíněných způsobů kultivace jediným, který se nejvíce přibližuje přirozeným podmínkám růstu mikroorganismů [7].

1.4 Molekulární charakteristiky kvasinek

Identifikace a charakteristika kvasinek v posledních letech prošla značnými změnami. Dříve bylo taxonomické zařazování založeno na morfologických, fyziologických a biochemických vlastnostech. Tato zastaralá metodologie zahrnovala cca 60–90 testů, proces byl složitý a časově náročný a nesliboval jisté a přesné výsledky. Z tohoto důvodu byly zavedeny nové metody taxonomického zařazování, které jsou nyní založeny na molekulárních metodách. Tyto metody směřují ke snadné a rychlé identifikaci kvasinek. Jsou to metody založené na podobnosti a odlišnosti DNA, RNA nebo proteinů [26].

Metody molekulární biologie jsou výhodné, protože nejsou závislé a ovlivnitelné vnějšími podmínkami. Nejčastěji se v dnešní době používají metody založené na analýze ribozomální DNA či analýze genomové DNA, mezi tyto metody se řadí právě metody PCR, DGGE a PFGE, kterými se tato literární rešerše zabývá [27, 28].

1.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o enzymatickou metodu využívanou k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*. V dnešní době probíhá tento proces v termocykleru, který měří teplotu v požadovaných intervalech. Důležitou podmínkou pro použití této metody je sekvenční analýza nukleové

kyseliny, která se pomocí PCR analyzuje. Na základě ní se vytvoří komplementární oligodeoxyribonukleotidy, které ohraničují zmnožovanou oblast a slouží jako primery následné polymerázové reakce. Základem této metody je enzymově katalyzovaná reakce, během této reakce dochází k exponenciálnímu růstu kopií daného úseku DNA, který potřebujeme analyzovat. Již během několika hodin se získává potřebné množství amplikonu. Jedná se o metodu, která je mimořádně citlivá v mezích detekce a díky tomu ji lze použít i pro zjištění jediné molekuly DNA ve vzorku. Je však třeba dávat pozor na molekuly exogenní či neznámé DNA, jelikož mohou kontaminovat vzorek a tím přispět k získání falešného signálu. Abychom tyto falešné signály a výsledky odstranili je možné využít několika doporučených standartních postupů. Tyto postupy zahrnují například použití UV světla, které odstraňuje exogenní nukleové kyseliny na pracovní ploše, samozřejmostí je používání jednorázových rukavic a také přidání DNA do reakce až jako poslední [29, 30, 31].

1.4.1.1 Princip polymerázové řetězové reakce

Základním principem je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace samostatných řetězců obsahujících specifické nukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy následně slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Amplifikace DNA probíhá v neustále se opakujících cyklech [29].

Každý cyklus se skládá ze tří kroků, které se opakují až 40x:

1. *Denaturace* – DNA se zahřeje na teplotu 95 °C, díky tomu se rozpadnou vodíkové můstky mezi jednotlivými vlákny DNA a dsDNA se rozdělí na ssDNA,
2. *Hybridizace* – probíhá při teplotě kolem 50–60 °C, čímž se molekuly DNA ochladí a dojde k opětovné renaturaci. Je třeba, aby ve směsi byly v nadbytku potřebné oligonukleotidy, které následně hybridizují se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, které by měly být ve směsi v mnohem nižší koncentraci. Teplota musí být specificky nastavená pro použitý pár primerů, pokud by byla příliš nízká mohly by primery nasedat na sekvence, které jsou komplementární jen z části a vytvoří se nespecifický produkt. Pokud by byla naopak příliš vysoká mohly by primery být málo hybridizovány a nevytvořil by se pak dostatek produktu,
3. *Elongace, extenze, syntetická fáze* – probíhá při teplotě 65–75 °C, dochází k syntéze nových řetězců pomocí oligonukleotidů, které dosedly na jednořetězcovou DNA neboli templát v předchozím kroku PCR. Tyto oligonukleotidy slouží jako primery pro DNA-polymerasu. Syntéza nového řetězce komplementárního s templátem probíhá od 3'-konce primerů [29].

Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA zdvojnásobí. V dalším cyklu mohou pak jako templáty sloužit i nově vytvořené řetězce, z čehož vyplývá, že se může syntetizovat dvojnásobné množství. Při opakujících se cyklech roste množství nově syntetizovaných řetězců exponenciálně, zatímco množství delších řetězců pouze lineárně. Po 30 cyklech tohoto procesu se vytvoří asi 10^9 více specifického produktu, než ostatních úseků DNA čili je jejich podíl ve výsledné směsi prakticky zanedbatelný [29].

1.4.1.2 Komponenty pro PCR

Reakční směs, v níž se standardní PCR provádí musí obsahovat následujících 6 komponent: termostabilní DNA polymeráza, oligonukleotidové primery, deoxyribonukleotidtrifosfát (dNTP), templátová DNA, reakční pufr s Mg^{2+} ionty, deionizovaná voda [32].

1.4.1.2.1 Termostabilní DNA polymeráza

Je klíčovým enzymem pro syntézu nových řetězců DNA. Velmi důležitá je její teplotní stabilita především z hlediska denaturace DNA, která probíhá při teplotě až 95 °C. Její dostatečnou aktivitu po celou dobu amplifikace zajišťuje Taq-polymeráza, která je během denaturačního kroku aktivní a nemusí se tak přidávat po každém denaturačním cyklu. Amplifikační cykly a kroky jsou tak řízeny pouze postupným střídáním teplot. Teplotní optimum pro Taq-polymerázu je 75 °C, při 95 °C po 40 minutách dochází k inaktivaci. Za velkou výhodu je považována schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA o délce 10 kbp [33].

1.4.1.2.2 Oligonukleotidové primery

Oligonukleotidové primery jsou synteticky připravené oligonukleotidy o délce až 30 bp, přičemž dvojice primerů je navrhnutá, aby ohraničovala oblast DNA, která má být amplifikována. Je velmi důležité, aby byly primery správně navrženy, jelikož jejich návrh je kritický pro úspěšné namnožení specifické DNA sekvence. Je podstatné, aby cílová DNA a nukleová sekvence primerů byly homologické, jelikož bez toho nemůže dojít k bezproblémovému nasednutí primerů na místa lemující DNA oblast. Pokud by byly primery navzájem komplementární, docházelo by k tvorbě dimerů. Aby hybridizace obou těchto primerů s komplementární sekvencí DNA probíhala bez problému je potřeba, aby probíhala při stejné teplotě. Pro návrh primerů se používají vhodné zásady. Orientačně se doporučuje, aby primery obsahovaly 18-24 nukleotidů, neměly by obsahovat sekundární struktury a obsah G/C bází v primeru by se měl pohybovat v rozsahu 40-60 %. Důležitý je také poměr G/C ku A/T

párům bází, měl by být správně vyvážený, aby primery plnily svoji funkci. Finální koncentrace primerů se doporučuje mezi 0,1-0,6 μM . Zároveň jejich teplota tání musí být přijatelná, aby celý proces mohl fungovat bez komplikací [34, 35, 36].

1.4.1.2.3 Deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTPs)

Mají funkci stavebních kamenů pro syntézu nových řetězců DNA podle templátu. Směs, která se používá konkrétně pro PCR reakci obsahuje čtyři deoxyribonukleotidtrifosfáty-dATP, dCTP, dGTP a dTTP. Tyto 4 složky se vždy přidávají v ekvimolárním množství, aby dosáhly optimální koncentrace pro úspěšnou amplifikaci, která se pohybuje od 20 do 200 μM . Koncentrace je výrazně ovlivněna množstvím hořčnatých kationtů, ale také složením i délkou výsledného produktu. Pro množství hořčnatých kationtů a množství dNTPs platí přímá úměra, pokud dojde ke snížení množství jednoho musí i druhého [37].

1.4.1.2.4 Templátová DNA

Templátová DNA je DNA, která obsahuje cílovou sekvenci a přidává se do PCR směsi v jednořetězcové či dvouřetězcové formě. Tato DNA může být buď purifikovaná nebo získaná z hrubých buněčných lyzátů. Nejdůležitějším faktorem je její kvalita a čistota, jelikož ovlivňuje celý průběh a také výtěžek PCR reakce. Velikost jednotlivých amplifikovaných fragmentů je v rozmezí 100–1000 bp [38].

1.4.1.2.5 Reakční pufr s hořčnatými kationty

Reakční pufr zajišťuje optimální prostředí pro průběh celé PCR reakce. Jeho složení je pro průběh reakce velmi podstatné a je závislé na použití DNA polymerázy, kterou jsme zvolili již v předchozích krocích. Jeho pH by mělo být v rozmezí 8,3–8,4, tedy spíše zásadité. Jeho hlavní složky jsou chlorid draselný a Tris-kyselina chlorovodíková. Hořčnaté kationty slouží jako kofaktory DNA polymerázy a tvoří komplex s primery, produkty PCR reakce, templátem, a především s dNTPs. Jejich ideální koncentrace se pohybuje mezi 0,5–5 mM. Pokud je jejich koncentrace nízká, vede k nízkému výtěžku, a naopak pokud je koncentrace vysoká tvoří se nespecifické produkty. Proto je velmi důležité zachovat ideální koncentraci těchto kationtů během celého průběhu PCR reakce [39].

1.4.1.3 Termocykler

Je přístroj, který automatizovaně zajišťuje střídání cyklické teploty reakční směsi, v podstatě se jedná o programovatelný termostat, který přesně udržuje tři inkubační teploty a musí mezi jednotlivými teplotami přecházet. V termocykleru jsou uloženy mikrozkušavky s reakční směsí v kovovém bloku, jehož cyklické teploty jsou již nastaveny předem. Použité zkušavky musí být tenkostěnné, aby byla možná rychlá změna teplot. Díky tomuto přístroji je vlastně celý průběh PCR reakce umožněn, jelikož v něm probíhá a automatizuje ji [36, 40].

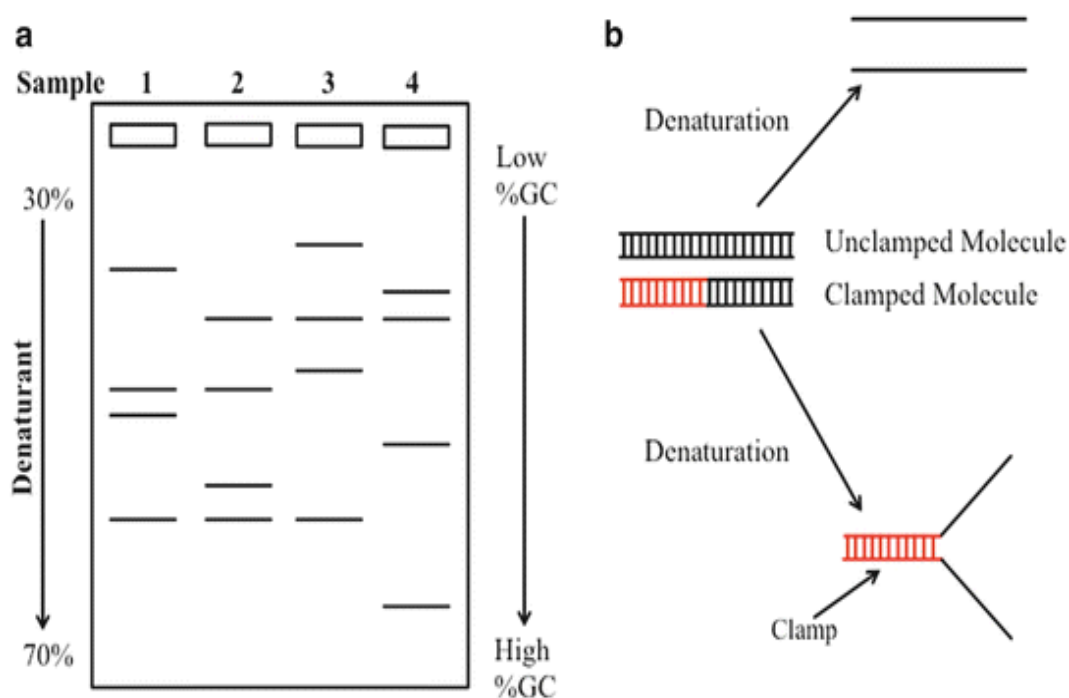
1.4.1.4 Modifikace PCR používané pro detekci kvasinek

PCR reakce se využívá v mnoha odvětvích a oborech od diagnostiky infekčních onemocnění či dědičných chorob až po namnožení konkrétního úseku DNA pro použití v dalších biotechnologických metodách. V našem případě se PCR využívá především pro svou rychlost a vysokou citlivost, výhodou také je, že se dá různě modifikovat podle cíleného produktu, ale stále je založená na své původní formě. Tyto modifikace PCR se rozlišují na základě toho, zda chceme provádět molekulární identifikaci či typizaci organismů nebo provádět modifikace sekvencí nukleových kyselin. Jednotlivé varianty metody PCR se pak od sebe rozlišují: použitím specifických sekvencí primerů, různou detekcí PCR produktů, přísností podmínek pro amplifikaci a v neposlední řadě použitím dalších enzymatických reakcí kromě amplifikace DNA polymerázou [41].

Nejčastějšími modifikacemi metody PCR, které se využívají pro analýzu DNA kvasinkových mikroorganismů jsou: RAPD, která se zaměřuje na PCR s krátkými primery do 10 nukleotidů. AFLP, která se zaměřuje na štěpení DNA pomocí dvou specifických restričních endonukleáz, vzniklé molekuly jsou amplifikovány pomocí PCR s využitím specifických AFLP-primerů. PCR-RFLP, která se také zaměřuje na štěpení izolované DNA pomocí restričních endonukleáz, ale v tomto případě metoda využívá takové, které štěpí palindromické sekvence, což jsou sekvence se stejným pořadím bází. Používá se také nested PCR, což je modifikace PCR, která využívá dva sady primerů, které se amplifikují ve dvou krocích, používá se z důvodu lepší citlivosti a specifičnosti metody, než je standardní jednokroková PCR [41].

1.4.2 Denaturační gelová gradientová elektroforéza (DGGE)

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) je metoda, která se používá při identifikaci mikroorganismů a také k vyhledávání mutací. Slouží k detekci jednonukleotidových změn v molekule DNA. Lze ji využít také při fylogenetické charakterizaci, kterou ale stěžuje díky schopnosti rozlišit pouze specifické PCR produkty do velikosti 500 bp, někdy maximálně 1000 bp. Jedná se o metodu tzv. otisku prstu a její podstata spočívá v postupné denaturaci vodíkových můstků mezi vlákny DNA. Užívá se zde polyakrylamidový gel s denaturačním gradientem, který obsahuje denaturační látky – formamid a močovinu, jejichž koncentrace se postupně zvyšuje. Tyto látky denaturují vodíkové vazby mezi nukleotidovými páry dsDNA. Rozlišuje se také denaturace mezi AT a GC páry, AT páry jsou totiž spojeny dvěma vodíkovými můstky a GC páry třemi, z toho důvodu lze lépe denarovat úseky bohaté na AT páry. Předchází jí amplifikace požadovaných úseků DNA pomocí PCR, při níž jsou použity speciální primery s tzv. GC svorkami, ty obsahují několik GC párů, které se velmi těžce denaturují a drží tak oddělené ssDNA, aby netvořily rozmazané proužky [42].



Obrázek 4: Ukázka průběhu DGGE [52]

1.4.2.1 Princip metody DGGE

Jejím principem je separace amplifikovaných fragmentů rDNA s přibližně stejnou velikostí, ale rozdílnou sekvencí neboli teplotou topení T_m . Separace je založená na klesající pohyblivosti fragmentů v polyakrylamidovém gelu, který je elektroforetickým médiem v této technice.

Tento gel je tvořený základním monomerem akrylamidem a N,N-methylen-bis-akrylamidem, který se náhodně zabudovává do lineárního řetězce polymeru a slouží jako činidlo tvořící síťovanou strukturu gelu. Následná polymerizace gelu je radikálovou reakcí, která probíhá v prostředí TAE pufru při laboratorní teplotě. Pro správný průběh polymerizace je třeba, aby bylo zajištěno správné pH reakční směsi a odstranění vzduchových bublin. Pokud by bylo příliš nízké či by nebylo zamezeno přístupu kyslíku k reakční směsi, polymerizace by se neuskutečnila [44, 45].

Ve vytvořeném gelu dochází k růstu lineárního gradientu denaturantů. Koncentrace polyakrylamidového gelu se liší dle velikosti separovaných DNA fragmentů a určuje také jeho mechanické vlastnosti. Abychom dosáhli optimálního rozlišení fragmentů v gelu je třeba vzájemně upravit poměr akrylamidu ku N,N-methylen-bis-akrylamidu dle potřeby metody. Rychlost denaturace a tím i elektroforetická pohyblivost fragmentů následně závisí na typu, distribuci a množství dusíkatých bází mezi vodíkovými vazbami dsDNA. Denaturační podmínky v průběhu celé DGGE metody jsou zajištěny kombinací stabilní teploty mezi 50–60 °C a lineárního gradientu tvořeného močovinou a formamidem. Molekula putuje gelem tak dlouho, dokud nedosáhne určité koncentrace denaturantů, v ten moment se začne rozplétat a vytvářet větvené struktury s lokálními jednořetězcovými oblastmi. Následně dochází ke konformační změně terciální struktury DNA, která migraci fragmentu nejprve zpomalí, a nakonec úplně zastaví [43, 44, 45, 46, 47, 48].

Denaturační gradient může být vytvořený kolmo nebo paralelně ke směru elektroforézy. V případě kolmých gradientových gelů, u kterých gradient vzrůstá kolmo ke směru elektroforézy se používá široký rozsah gradientu od 0 % až ke 100 %. Tento experiment slouží ke zjištění optimálního rozsahu gradientu u jediného vzorku (například směs ampliconů). Při nízkých koncentracích denaturantů v gelu si fragmenty DNA zachovají dvouřetězcovou strukturu čili se nerozpletou a na gelu následně nejsou detekovány lokální jednořetězcové oblasti. Naopak při vysokých koncentracích je molekula kompletně denaturována a migrace fragmentu se úplně zastaví. Je tedy zřejmé, že optimalizace rozsahu gradientu je pro správné provedení DGGE experimentu naprosto klíčová. U paralelních gradientových gelů vzrůstá gradient ve směru elektroforézy, díky čemuž jsou vhodné pro analýzu více vzorků. Rozsah gradientu zde není tolik rozsáhlý jako u kolmých variant, čímž se zabezpečí lepší separace fragmentů analyzovaného vzorku [46, 47, 48].

Kvalita experimentu však nezávisí pouze na správné volbě denaturačního rozmezí, je zde mnoho dalších faktorů, které mohou kvalitu provedení DGGE experimentu ovlivnit. Mezi další faktory patří přítomnost nespecifických produktů, existence více variant sledovaného genu v genomu a samozřejmě také správná velikost analyzovaných PCR produktů, jelikož jak zde již bylo popsáno, limity detekce velikosti molekuly DNA jsou u denaturační gradientové gelové elektroforézy maximálně do velikosti 500 bp [72, 73].

Tato technika se dá zdokonalit přidáním takzvané GC-svorky, což je sekvence bohatá na GC páry připojená na 5'-konec jednoho z primerů, který byl použitý při reakci PCR. Je obvykle tvořená 30–50 nukleotidy, které jsou koamplifikované s cílovou sekvencí a jsou tak spolu s GC-svorkou začleněny do výsledného amplikonu. Jejím použitím se dá zamezit úplně disociaci dsDNA na jednořetězcové formy, čímž se zvýší rozlišovací schopnost DGGE metody, která umožní detekci téměř všech změn v DNA sekvenci [43, 46].

Optimální čas elektroforézy je také velmi důležitým faktorem, může být určený pomocí tzv. *time travel experimentu*, při kterém jsou různé vzorky nanášeny na gel v určitých konstantních časových intervalech. Pokud proces trvá příliš dlouho může docházet k nestabilitě denaturačního gradientu, díky příliš dlouhé inkubaci gelu v prostředí se zvýšenou teplotou. Výsledkem je tak zkreslená separace jednotlivých fragmentů a nesprávná interpretace DGGE profilu získaného procesem, z tohoto důvodu by měl být čas elektroforézy minimalizovaný s ohledem na optimální rozlišení použitých fragmentů [46, 47, 49].

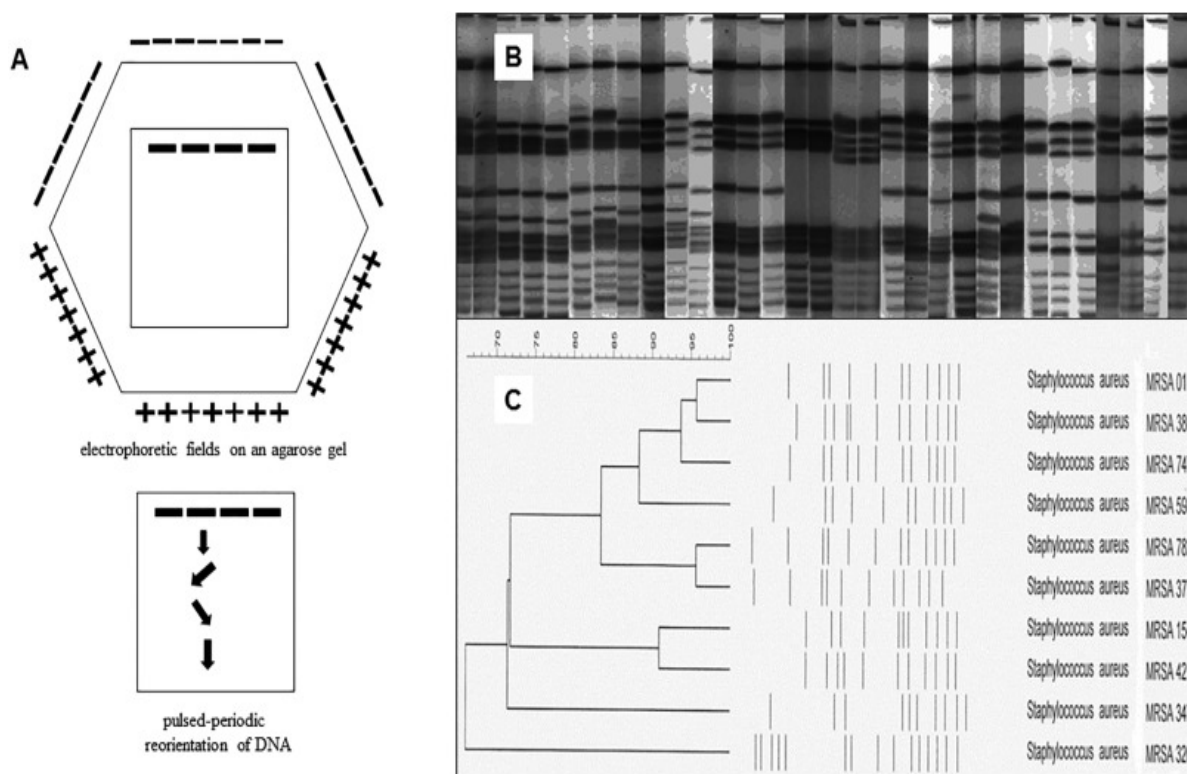
1.4.2.2 Průběh metody DGGE v praxi

Tato technika se uplatňuje zejména v mikrobiologických odvětvích, kde je její hlavní předností možnost přímé extrakce DNA z reálných vzorků např. různých druhů potravin. Prvním krokem je izolace komplexní DNA směsi, tato směs se dále používá jako templát v PCR amplifikaci konkrétních variabilních úseků DNA, které umožňují rozlišení mezi jednotlivými druhy mikroorganismů. Výsledkem PCR reakce je směs amplikonů několika druhů organismů, které jsou přítomny v analyzovaném vzorku. Všechny tyto amplikony mají stejnou velikost, ale odlišné sekvence čili mohou být separovány pomocí DGGE metody. Konečným výsledkem je tak fingerprint neboli DNA otisk mikrobiální komunity daného prostředí, který je specifický pro daný analyzovaný vzorek. Po separaci DGGE metodou je možné pozorovat v gelu DNA fragmenty, které mohou být z gelu izolovány, reamplifikovány s použitím podobných podmínek a PCR primerů či sekvenovány a porovnány se sekvencemi dostupnými

v databázích. Celým tímto postupem je možné určit identitu původně neznámého fragmentu [47, 50].

1.4.3 Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Principem klasické elektroforézy je přímočarý plynulý pohyb molekul DNA v gelu ve směru od katody k anodě. Rychlost pohybu těchto molekul je závislá na jejich velikosti, z čehož vyplývá, že menší molekuly putují gelem rychleji a z toho důvodu je umožněná jejich separace. Tento princip se však uplatňuje pouze u menších molekul do velikosti 50 kbp. Abychom mohli separovat větší molekuly je třeba právě pulzní gelové elektroforézy, bez jejího použití by molekuly uvízly uvnitř gelu v síťovité struktuře a nerozdělily by se. Metoda PFGE umožňuje separovat až 12 milionů párů bází [32, 43, 51].



Obrázek 5: Znázornění průběhu PFGE [52]

1.4.3.1 Princip metody PFGE

U této metody se analyzovaná DNA agarosovým gelem nepohybuje pouze jedním směrem, ale periodicky ho mění v pravidelných pulzech, což je umožněno aplikací dvou nebo více elektrických polí do systému. Molekuly DNA mění svůj směr podle toho, které elektrické pole je aplikované, ale musí nejdříve změnit svou orientaci, než se začnou pohybovat směrem

druhého elektrického pole. Vždy musí být jedno deaktivované a druhé k němu musí být aplikované v 90–180° úhlu. Při aktivaci prvního pole se molekuly nejdříve srovnají do správného směru a začnou se pohybovat gelem, následně se toto působení přeruší a začne aktivace druhého elektrického pole, čímž jsou molekuly donuceny změnit směr pohybu, nejdříve ale musejí změnit svou orientaci. Čas, který je potřebný k jejich reorientaci, je závislý na velikosti jednotlivých molekul. Větší molekuly potřebují ke změně směru více času a díky tomu je možná jejich separace. PFGE dokáže separovat molekuly DNA s délkou řetězce do 10 Mbp, užívá se tedy k separaci celých chromozomů. Přístroj určený k této metodě se skládá ze dvou nebo více párů elektrod, které jsou uloženy okolo desky s gelem a postupně jsou na ně přiváděny napěťové pulzy. Tato analýza však závisí na mnoha faktorech, jako je např. doba separace, pulzní čas, velikost elektrického napětí, running time, koncentrace gelu a pufru atd. [53, 54].

Parametry pulzní gelové elektroforézy:

- a) *Pulzní čas* – pulzním časem lze regulovat velikost molekul tím, že ho během separačního procesu necháme konstantní nebo jej zvyšujeme. Lze tak však regulovat pouze molekuly, které se pohybují, jelikož jejich reorientační čas je nižší než doba pulzu. Molekuly, které nedosáhnou limitu daného rozmezím pulzních časů zůstanou po elektroforéze poblíž startu. Z toho vyplývá, že pokud chceme separovat menší molekuly používáme kratší pulzní časy (100–1000 s) a pokud větší molekuly tak delší pulzní časy (1–100 s) [43, 55].
- b) *Velikost napětí* – se zvyšujícím se elektrickým napětím stoupá mobilita molekul, aby bylo dosaženo maximální elektroforetické mobility je třeba, aby byly molekuly plně reorientovány potřebným směrem. Je však třeba dodržet optimální napětí pro daný druh izolované DNA. Platí, že pokud je napětí příliš vysoké je sice vysoká i mobilita, ale zóny bandů jednotlivých chromozomů jsou neostré a rozmazané. Velikost napětí také souvisí s pulzním časem a to tak, že pokud chceme izolovat menší molekuly je třeba zvolit vyšší napětí a kratší čas a opačně pro izolaci větších molekul je třeba nižšího napětí a delšího času [55, 56].
- c) *Čas běhu* – odvíjí se podobně jako pulzní čas od velikosti molekul, pro větší molekuly se volí delší časy (např. nad 2 Mb více než 17 hodin) a pro menší molekuly časy kratší (např. do 2 Mb minimálně 17 hodin) [57, 58].
- d) *Teplota* – je třeba nižších teplot od 4 do 15 °C, je velmi důležité tento parametr dodržovat, protože pokud je teplota vyšší klesá rozlišitelnost jednotlivých zón [64].

- e) *Reorientační úhel elektrických polí* – s tímto parametrem je také velmi úzce spjatá rozlišitelnost jednotlivých zón. Čím větší úhel měnicích se elektrických polí je, tím ostřejší jsou jednotlivé zóny [59].
- f) *Koncentrace agarosového gelu* – s ní souvisí především rychlost pohybu molekul, čím je koncentrace vyšší, tím se pohybují pomaleji. Je však třeba dodat, že při vyšší koncentraci je ostřejší rozlišení jednotlivých zón [59].

V *Tabulce 1* jsou zobrazeny parametry navržené výrobcem PFGE aparatury, které se používaly v experimentální části této diplomové práce.

Tabulka 1: Příklad doporučených parametrů PFGE aparatury [57]

Size (Mb)	0.01-0.05	<0.1	0.1-2	2-6	6-12
% agarose	1.2	1.2	1.2	0.6*	0.6*
Buffer (xTBE)	0.15	0.15/0.5	0.5	0.5	0.50
Temperature/°C - in MultiTemp II (set value)	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
- in elpho. unit	12-14	12-14	12-14	12-14	12-14
Voltage/V (HEX)	450	ca 300	165-200	40-100	25-50
Voltage (point)	450	ca 370	300-330	60-100	ca 30
Pulse time (s)	0.3-1.0	1-10	10-120	3-75 (min)	50-100 (min)
Run times (h)	1-4	1-6	17-24	24h-3 days	3-6 (days)

* 0.6 % agarose will give a faster separation at the cost of resolution

1.4.3.2 Použití metody PFGE v praxi

Metodě pulzní gelové elektroforézy předchází složitý proces izolace DNA, který se různí na základě použitých mikroorganismů. Konkrétně u kvasinek je problém s velikostí jejich molekul, jelikož je větší než 50 kbp. Z tohoto důvodu se přistupuje k jejich imobilizaci v agarosovém gelu ještě před samotnou izolací a také před odstraněním jejich buněčné stěny. Následně je třeba jejich buněčnou stěnu enzymaticky rozrušit například pomocí enzymu lytikázy. Po tomto kroku je třeba odstranit zbytek rušivých elementů pomocí inkubace ve směsi EDTA pufru a β -merkaptoethanolu, finálním krokem je přidavek proteinázy K, která odstraní celulární membrány, proteiny a RNA. Buňky jsou tak připraveny pro izolaci pomocí PFGE analýzy. Pro správný průběh metody je třeba nejdříve připravit agarosový gel, který se

obecně skládá z Tris-acetát-EDTA pufrových systémů a ponořených buněk. Pufr se nechá cirkulovat a vychladí se obvykle na teplotu 11 °C. Následně se vloží hexagonální elektroda do PFGE zařízení a nastaví se potřebné parametry pro správný průběh izolace. Např. u standardu kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* se vyžadují delší pulzní časy, protože její velikost chromozomů je nad 2 Mbp. Pro separaci kvasinkové DNA se užívá reorientačního úhlu elektrických polí 110 až 165 ° [53, 57, 58, 59, 60, 61].

1.4.4 Dosavadní dosažené výsledky v charakterizaci kvasinek rodu *Metschnikowia* pomocí molekulárních metod

Technika PFGE se dá použít kromě stanovení velikosti chromozomů také ke stanovení úplnosti replikace či opravy DNA, definici molekulárního karyotypu buněk, analýze chromozomálních přeskupení, přiřazení genů nebo konstrukcí konkrétním chromozomům a izolaci DNA od specifických chromozomů [62]. Ve výzkumech, které se doposud zabývaly analýzou kvasinek pomocí techniky PFGE byly popsány podmínky pro separaci a vizualizaci chromozomů mezi 0,5 a 6 Mbp a pro kratší chromozomální prvky mezi 50 a 600 kbp asi 530 kbp [62]. V prvotních výzkumech byla PFGE využita spíše pro měření reprezentativních kmenů kvasinek *Saccharomyces* z pivovarnictví či destilace. Později se však tato metoda ukázala vhodná také pro analýzu kvasinek rodu *Metschnikowia*, je ovšem třeba k tomu používat již definované standardy, například dobře známé a popsané kvasinky rodu *Saccharomyces*, nejčastěji se používá pro tyto účely *Schizosaccharomyces pombe*. Později se při výzkumech ukázala jako standard vhodná i kvasinka *Hansenula wingei* patřící rovněž mezi *Saccharomycetaceae*. Výše zmíněné kvasinky se používají při pulzní gelové elektroforéze díky svým elektroforetickým karyotypům [64]. Pro *M. pulcherrima* byla identifikována celková velikost genomu cca 16,1 Mb. U *M. fructicola* byla v nejnovějších studiích stanovena velikost jejího genomu na 26 Mbp a obsahuje 8 629 genových kódujících sekvencí. Výsledkem bylo vysoce kvalitní sestavení genomového profilu skládajícího se z 93 kontigů – nejdelší z nich má 2 548 689 bp – se 439násobným průměrným pokrytím genomu [67, 68, 69].

Výzkumem kvasinek rodu *Metschnikowia* jsem se zabývala také v praktické části mé bakalářské práce, která byla zaměřena na charakterizaci kvasinek pomocí pulzní gelové elektroforézy. Při mém experimentálním výzkumu jsem přišla na nové poznatky týkající se počtu chromozomů jednotlivých druhů kvasinek. Bohužel se ukázalo, že pro správnou separaci chromozomů kvasinek je jednoznačně potřeba delší doba separace, ale i tak se z dosažených výsledků dalo určit, že kvasinky rodu *Metschnikowia* mají pravděpodobně 4 až 5 chromozomů.

Tohoto výsledku jsme dosáhli na základě separace 4 až 5 bandů při zvolených podmínkách analýzy. Z důvodu použití nevhodného standardu nebo použití nesprávných separačních podmínek nebylo možné ideálně velikostně popsat separované chromozomy kvasinek rodu *Metschnikowia*. Na nápravu těchto skutečností včetně zavedení charakterizace kvasinek pomocí DGGE metody se zaměřuje právě tato diplomová práce [74].

Metoda PCR-DGGE byla aplikovaná na studii eukaryotických společenstev, které jsou velmi významné pro fermentační procesy v potravinářství. Ribozomální DNA kvasinek se skládá z malých podjednotek 18S rDNA a velkých podjednotek 26S rDNA. Spacery, což jsou konzervativní nekódující úseky vyplňují oblasti mezi těmito podjednotkami. Oblast ITS potom obsahuje sekvenci kódující oblast 5,8S rDNA, což je podjednotka o nejmenší velikosti. Rozlišení mezi jednotlivými druhy je založeno na velikosti polymorfismu amplikonů, aby bylo možné identifikovat a rozlišit kvasinkové druhy je třeba dosáhnout vyhovujícího stupně variability ITS oblasti mezi malou podjednotkou 18S a velkou podjednotkou 26S. Pro kvasinky se tak zprvu zdála tato metoda jako nevhodná, jelikož byl amplifikovaný úsek 18S rDNA., což je malá podjednotka a nestačí k identifikaci a vzájemnému rozlišení jednotlivých druhů kvasinek. Pro studium kvasinek byl tak vyvinut nový postup, který separuje amplifikované produkty variabilních úseků 26S rDNA z DNA kvasinek. Tento postup byl následně ověřený pro modelové organismy v laboratorních podmínkách, ukázalo se, že umožňuje detekci množství až 10^3 buněk/ml a identifikaci alespoň čtyř různých druhů kvasinek. Po ověření byl aplikovaný do průmyslových fermentačních procesů, zejména při výrobě vína, kde sloužil ke sledování kvasinkové populace. V každém stupni kvasného procesu byla profilována mikrobiální komunita, čímž byly identifikovány druhy kvasinek patřící k rodům *Metschnikowia*, *Candida* a *Pichia*, které se objevovaly zejména za začátku fermentace a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která se objevovala zejména v posledních stádiích fermentace. Podobně byla metoda aplikovaná pro určení diverzity kvasinek při fermentačních procesech, tato analýza potvrdila, že teplota kvasného procesu má významný vliv na růst kvasinek, jelikož při vyšších teplotách významně poklesl. Zajímavou skutečností zejména bylo, že i přesto, že *Metschnikowia pulcherrima* byla izolovaná v koncentracích 10^5 CFU/ml, tak amplikon příslušící tomuto druhu nebyl v DGGE profilu pozorován. Pravděpodobně z důvodu neúplné amplifikace použitím univerzálního páru primerů NL1/LS2 [47, 65, 66].

Dle nejnovějších studií zabývajících se rozdělením jednotlivých druhů kvasinek rodu *Metschnikowia* bylo zjištěno, že poměrně nový druh *Metschnikowia viticola* se snadno dá

rozlišit od druhů *M. pulcherrima* a *M. fructicola* z fylogenetického i fenotypového hlediska. Je však poměrně těžké rozlišit druhy *M. pulcherrima* a *M. fructicola* z hlediska jejich DNA pomocí částečného sekvenování ITS nebo 26S rDNA, přišlo se však na to, že se dají rozlišit vzájemně pomocí nukleotidové sekvence markeru EF2, který vykazuje přibližně 9 % sekvenční divergenci mezi těmito druhy. Úplné genomové sekvence různých kmenů *M. pulcherrima* a *M. fructicola*, izolované z různých prostředí (půda, hmyz, hrozny atd.), jsou již k dispozici [67, 68, 69].

Dle studie Akira S. Hario provedené v roce 2019 se z čmeláčího nektaru podařilo izolovat úplně nový druh kvasinek rodu *Metschnikowia*, který není doposud popsán. Získaný genom sestával z 20 114 833 bp ze 165 kontigů, s obsahem G+C 43,5 %. Nejdelší kontig byl dlouhý 1 028 286 bp a hodnota N50 byla 208 628 bp. Fylogenetický strom odhalil, že kmen byl odlišný od všech popsáných druhů *Metschnikowia*. Sekvence D1/D2 z kmene byla ověřena Sangerovým sekvenováním a vykazovala 6,3 % odchylku od sekvence blízkce příbuzného druhu *Metschnikowia lachancei*. Pro kvasinky představuje více než 1% divergence v oblasti D1/D2 práh používaný k rozlišení druhu, díky tomu je tento kmen velmi pravděpodobně novým druhem [70].

V poslední době se ukazuje obrovský význam těchto studií, jelikož mohou dát základ pro budoucí výzkum v oblasti transkripční regulace různých druhů kvasinek rodu *Metschnikowia*, což je základní krok pro jejich širší a kontrolovanější použití v různých odvětvích průmyslu. Každopádně to ukazuje na fakt, že tyto kvasinky jsou v dnešní době atraktivní nejen ve vinařském průmyslu, ale také pro vědeckou sféru, která se jimi zabývá postupně více a více [67, 68, 69, 70].

1.4.5 Aplikace použitých molekulárních metod

PCR-DGGE má velkou výhodu při aplikacích, jelikož je velmi přizpůsobivou a univerzální metodou. Díky tomu našla uplatnění v mnoha oblastech mikrobiální ekologie, kde se používá ke studiu struktury a vývoje mikrobiálních komunit z půdy, vody, gastrointestinálního traktu, bioreaktorů odpadních vod, hmyzu či klinických vzorků. Obrovský potenciál této metody se projevil při analýze přírodních vzorků, která byla následně podnětem k zavedení této metody při studiích mikrobiálních fermentací v potravinách a ekosystémech jim blízkých. Mezi nejvíce studované patří bakterie mléčného kvašení, konkrétní aplikace této metody je například

studování bakteriální diverzity v mléčných výrobcích či analýza acetobakterií v balzamikovém octu [47].

PFGE má široké uplatnění při analýze genomu všech živých organismů. K odlišení jednotlivých kmenů je nejčastěji používána kombinace štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz na malé množství fragmentů a analýzy pulzní gelovou elektroforézou. Jednotlivé kmeny se pak od sebe liší svými různými sekvencemi DNA. Ukázala velký potenciál v potravinářském průmyslu k přesné identifikaci používaných mikrobiálních kmenů, konkrétně v mléčném, pivovarském či vinném odvětví. Velmi významné využití našla tato technika také při přípravě geneticky modifikovaných potravin, používá se zde k analýze potravinového genomu a k přípravě transformantů, protože rostlinné chromozomy mají většinou vysoké molekulové hmotnosti. Příkladem je izolovaná DNA rajčete, která dosahuje velikosti více než 2 Mbp [71].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je pomocí vybraných molekulárních technik provést srovnávací charakterizaci genomu kvasinek rodu *Metschnikowia*, a to pomocí splnění následujících dílčích částí:

1. Vypracování rešerše na téma možností provedení a využití molekulárních metod k charakterizaci kvasinek, aplikace metod v biotechnologii případně potravinářství
2. Optimalizace izolace DNA a podmínek analýzy vybranými molekulárními technikami
3. Analýza genomu vybraných kvasinek rodu *Metschnikowia*
4. Srovnávací charakterizace genomu kvasinek rodu *Metschnikowia*

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a materiály

3.1.1 Chemikálie použité při realizaci experimentální části diplomové práce

Bakteriologický agar, Himedia (India)

Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát p.a., Lachema (ČR)

D-glukóza monohdrát p.a., Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)

Hydrogenfosforečnan didraselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)

Kvasničný autolyzát, Himedia (India)

Síran horečnatý p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)

Síran amonný p.a., Lachema (ČR)

Pepton aus Casein, Roth (SRN)

Agarosa low melting, Serva (SRN)

Agarosa Premium, Serva (SRN)

Beta-merkapt ethanol, Serva (SRN)

Ethanol, Lachema (ČR)

Chelaton 3 (EDTA) p. a, Lachema (ČR)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta (ČR)

Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)

Ethidium bromid, Serva (SRN)

Lytikáza, Sigma-Aldrich (SRN)

Proteináza K, Sigma-Aldrich (SRN)

PPP Master Mix, Top-Bio (ČR)

D-Sorbitol, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina citronová, Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina boritá, Sigma-Aldrich (SRN)

Akrylamid, Sigma (SRN)

Bis-akrylamid, Sigma (SRN)

Bromfenol blue, Serva (SRN)

Xylene cyanal, Serva (SRN)

Glycerol, Sigma-Aldrich (SRN)
Formamide, Sigma-Aldrich (SRN)
Urea, Sigma-Aldrich (SRN)
DNeasy UltraClean Microbial Kit, QIAGEN (ČR)
CHEF DNA Size Marker *H. wingei*, Bio-Rad (ČR)
DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder), Sigma-Aldrich (SRN)
Primery (NL1, NL1-GC, NL4, LS2, ITS1, ITS4, ITS1-GC, ITS4-GC, ITS2, ITS3), Generi Biotech (ČR) MQ voda, FCH VUT (ČR)

3.2 Použité přístroje a pomůcky

3.2.1 Pomůcky použité při realizaci experimentální části diplomové práce

Analytické váhy, Boeco (SRN)
Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
Plastové Petriho misky, Verkon (ČR)
Třepačka IKA, Yellow Line (SRN)
Centrifuga U-32R, Boeco (DE)
Vodní lázeň, TW2 Julabo Labortechnik GmbH (SRN)
Vortex, Labnet (USA)
Vortex Experion, Bio-Rad (USA)
Inkubátor s třepačkou, Heidolph (SRN)
Mikrovlnná trouba, MT1705 B Professor (CZ)
Thermostatic cooler Julabo, F12 Labortechnik GmbH, (SRN)
Software Scion Image, Biotech (ČR)
Transluminátor Ultra Viewer, Ultra Lum (USA)

Sestava pro PFGE analýzu:

- PFGE, Pharmacia Biotech (SWE)
- Gene Navigator, Pharmacia Biotech, (SWE)
- GN Controller, Pharmacia Biotech, (SWE)
- Programmable Power Supply, MP-500 V, (SWE)

Termocykler Palm Cycler TM, Corbett Research (Austrálie)
Detection System, Bio-Rad (USA)

DGGE aparatura DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad (USA)
28 Horizontální elektroforetická vana Owl, model B2, Owl Separation Systems (USA)
NanoPhotometer™ UV/VIS, Implen (SRN)
Software Scion Image, Biotech (ČR)
Transluminátor Ultra Viewer, Ultra Lum (USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu MP-300 N, Major Science (USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu SH-300, Shelton Scientific (USA)

3.3 Použité kmeny kvasinek

Pro realizaci experimentální části této diplomové práce byly použity následující kmeny kvasinek rodu *Metschnikowia*:

Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-145
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-147
Metschnikowia pulcherrima CCY 029-002-149
Metschnikowia andauensis CCY 029-002-129
Metschnikowia chrysoperlae CBS 9803 11-1158
Metschnikowia shanxiensis CBS 10359 11-1250
Metschnikowia zizyphicola CBS 10358 11-1247
Metschnikowia andauensis NA1657 11-1241
Metschnikowia sinensis CBS 10357 11-1244

3.4 Analýza DNA kvasinek pomocí metody pulzní gelové elektroforézy

3.4.1 Kultivace kvasinek

Všechny použité kmeny kvasinek byly kultivovány na optimálním tekutém médiu, jehož složení je uvedeno v *Tabulce 2*. Všechna média byla sterilována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut při teplotě 140 °C. Kultivace kvasinek probíhala submerzně v Erlenmeyerových baňkách za neustálého třepání při 110 rpm a laboratorní teplotě po dobu 24 hodin.

3.4.1.1 Kultivační médium

Před samotnou kultivací kvasinek bylo třeba připravit kultivační média o objemu 20–30 ml, do nichž byly za aseptických podmínek naočkovány tři očkovací kličky kultury jednotlivých druhů

kvasinek rodu *Metschnikowia* uchovaných na pevném médiu v Petriho miskách. Po zaočkování byla média umístěna na třepačku a ponechána ke kultivaci.

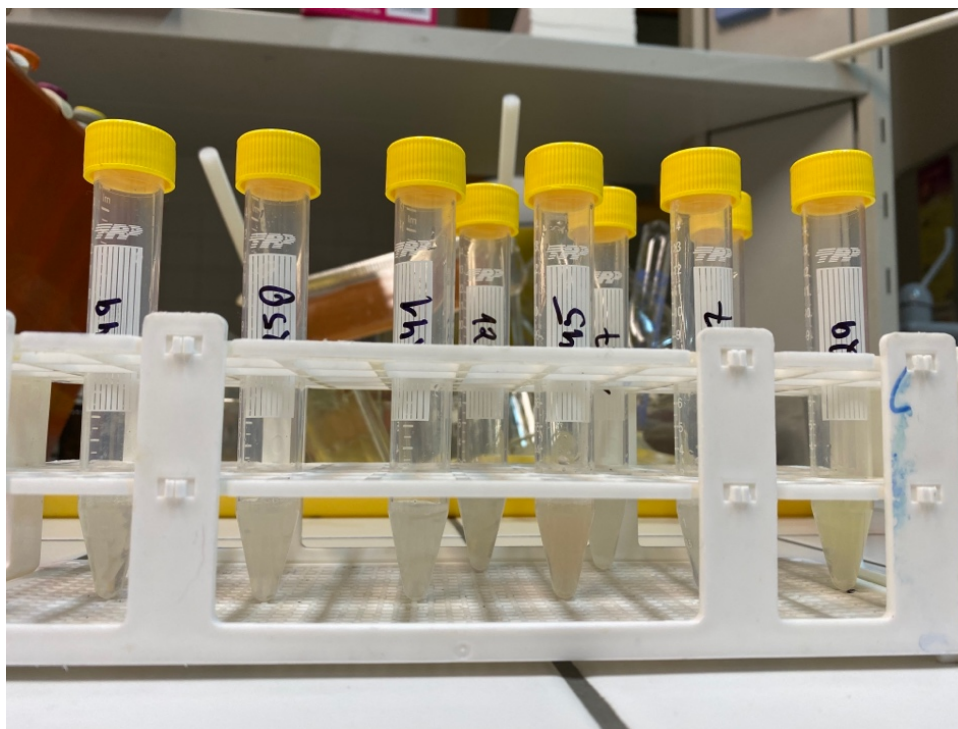
Tabulka 2: Složení kultivačního média

Složka	Množství
glukosa	2,00 g
bakteriologický pepton	0,50 g
kvasničný autolýzát	1,00 g
KH ₂ PO ₄	0,10 g
K ₂ HPO ₄	0,02 g
NaCl	0,01 g
CaCl ₂	0,01 g
MgSO ₄	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

3.4.2 Postup izolace kvasinkové DNA

Pro proces izolace DNA byly použity buňky kvasinek kultivované 24 hodin za podmínek, které jsou uvedeny v předešlé kapitole (3.4.1). Nejdříve bylo nutné stanovit počet buněk v médiu pomocí metody počítání buněk Bürkerovou komůrkou. Pomocí této metody bylo určeno, kolik ml média je třeba odebrat, abychom získali přesný počet buněk potřebný pro izolaci DNA. Roztok bylo třeba vhodně naředit, aby byl v jednotlivých čtverečcích optimální počet buněk, tedy 8-12 buněk na jeden čtverec. V tomto případě bylo použito ředění roztoku 10^{-2} , které bylo provedeno následujícím způsobem: ze vzorku byl odebrán 0,1 ml roztoku a byl přidán k 0,9 ml sterilní MQ vody, tímto způsobem bylo dosaženo ředění 10^{-1} . Z naředěného roztoku bylo opět odebráno 0,1 ml a přidáno k 0,9 ml sterilní MQ vody, čímž bylo dosaženo požadovaného ředění. Naředěný roztok se pomocí pipety kápnul do určeného prostoru Bürkerovy komůrky, krycí sklo se přichytilo pomocí dvou pružin a takto připravená komůrka se nechala asi 5 minut odstát. Následně se vložila pod mikroskop při zvětšení 40x a byly spočítány jednotlivé buňky ve 20 čtverečcích. Nakonec se pomocí vzorce $x = MO \cdot z \cdot X \cdot 1000$, kde MO je průměrný počet buněk v jednom čtverci, z je použité ředění, X je přepočet na 1 mm³ a číslo 1000 slouží k přepočtu z mm³ na ml, určil přesný počet buněk v roztoku. Požadovaný počet buněk $1,3 \cdot 10^9$ byl podělen počtem buněk v roztoku a tím byl vypočítán přesný objem, který bylo potřeba z roztoku odebrat pro další postup.

Za sterilních podmínek bylo odebráno $1,3 \cdot 10^9$ buněk kvasinkové kultury do centrifugačních zkumavek. Buňky byly zcentrifugovány po dobu 5 minut při 5000 rpm za laboratorní teploty. Následně byly buňky promyty 5 ml MQ vody a opět byly zcentrifugovány. Ze zkumavek byl odlit supernatant a buňky byly rozsuspendovány v TE pufru (100mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu, 100mM EDTA pufru), jehož pH bylo upraveno na pH 8. Zkumavky byly doplněny 2,1 ml MQ vody tak, aby byl výsledný objem 3,5 ml. K tomuto objemu bylo napipetováno 17,5 μ l beta-merkaptioethanolu. Tímto způsobem připravená směs byla následně inkubována při 30 °C po dobu 30 minut za mírného třepání. Po inkubaci byly buňky opět zcentrifugovány a následně rozsuspendovány ve 4 ml CPES pufru (40 mM kyseliny citronové, 120 mM Na_2HPO_4 , 20 mM EDTA pufru, 1,2 M sorbitolu) jehož pH bylo upraveno na pH 6. Po centrifugaci byly buňky rozsuspendovány v CPES pufru, jehož pH bylo upraveno na 7,5. K buňkám bylo přidáno 28,8 μ l roztoku enzymu lytikázy (≥ 2000 jednotek/mg proteinu), který byl čerstvě připraven. Směs byla mírně protřepána a následně inkubována za mírného třepání po dobu 30 minut při 25 °C. Po ukončení inkubace bylo ke všem vzorkům napipetováno 0,5 ml připraveného 2 % roztoku low melting agarosy v CPES pufru. Takto připravené vzorky byly napipetovány do formiček určených na přípravu bločků a následně byly umístěny do lednice, kde byly ponechány do úplného zatuhnutí. Jakmile došlo k zatuhnutí bločků, byly postupně vyloupávány do mikrozkušavek typu Eppendorf a zality 1 ml lyzačního pufru s Proteinázou K.



Obrázek 6: Ukázka hotových gelových DNA bločků

Následně byly bločky ponechány k inkubaci po dobu 24 hodin při teplotě 50 °C. Po uběhnutí doby inkubace byl lyzační pufr slit ze zkumavek a bločky byly promyty 2 ml TE pufru. Bločky s roztokem TE pufru se nechaly inkubovat po dobu 20 minut při 50 °C. Celý postup promývání TE pufrem byl proveden celkem třikrát. Jakmile byly bločky dostatečně promyty, byly uchovány v TE pufru v lednici pro další použití.

3.4.3 Metoda pulzní gelové elektroforézy

Pro spuštění pulzní gelové elektroforézy bylo nutné připravit 0,08 M TBE pufr (50 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 EDTA pufru a 1000 ml MQ vody). Takto připraveného pufru bylo odebráno 480 ml a následně byl doplněn do 3 l baňky sterilní MQ vodou. Asi 2,5 l takto připraveného pufru bylo nalito do elektroforetické vany, která byla chlazená vodní lázní nastavenou na 10 °C, pufr se nechal chladit. Mezitím byl připraven 1 % agarosový gel v 0,08 M TBE pufru, který byl připraven následovně: 1,1 g premium agarosu ve 110 ml 0,08 TBE pufru se nechalo celkem 3x prohřát v mikrovlnné troubě, po prohřátí se nechala agarosa vychladnout na 60 °C a byla nalita do formy s hřebenem na přípravu gelu. Po ztuhnutí gelu byly do drážek po hřebenu zavedeny bločky obsahující kvasinkovou DNA. Do gelu byl na předem vyznačené místo zaveden také standard velikostí separovaných chromozomů. V našem případě byl použit CHEF standard kvasinky *Hansenula wingei*. Takto připravená aparatura s gelem byla vložena do vychlazené elektroforetické vany a na sklo s gelem byla vložena hexagonální elektroda. Po nastavení optimalizovaných podmínek pro zapnutí na přístroji Gene Navigator, a nastavení vloženého napětí a proudu byla elektroforéza spuštěna.

3.4.4 Vizualizace výsledků na připraveném gelu

Po ukončení pulzní gelové elektroforézy byl gel s bločky umístěn do vodného roztoku, který obsahoval 50 µl ethidium bromidu o koncentraci 10 mg/ml a 250 ml destilované vody. V takto připraveném barvicím roztoku byl gel ponechán po dobu 30 minut za neustálého třepání a následně byl promyt destilovanou vodou. Na závěr byl gel přemístěn do komory vizualizačního zařízení Azure biosystems c200 a vyfotografován.

3.5 Analýza DNA kvasinek pomocí metody PCR a denaturační gradientové gelové elektroforézy

3.5.1 Postup izolace DNA pomocí kitu DNeasy UltraClean Microbial Kit

Z připravených kultivačních médií, které se kultivovaly po dobu 24 hodin bylo odebráno 1,8 ml kvasinkové kultury. Tento objem byl napipetován do mikrozkušavky Collection tube a zcentrifugován při 10000 x g po dobu 30 s a při laboratorní teplotě. Supernatant byl slit a centrifugace byla ještě jednou zopakována. K usazeným buňkám bylo přidáno 300 µl PowerBead solution, což je roztok obsahující soli a pufr. Buňky byly rozsuspendovány pomocí vortexu a přesunuty do další mikrozkušavky PowerBead tube obsahující drobný písek. Do roztoku bylo přidáno 50 µl Solution SL, který obsahuje SDS a jiná činidla potřebná k lýze buněk. Mikrozkušavky byly zahřívány při teplotě 65 °C po dobu 10 minut. Následně byly přesunuty na horizontální vortex, kde se vortexovali při maximální rychlosti po dobu 10 minut. Potom byly zcentrifugovány při 10000 x g po dobu 30 s.

Supernatant obsahující DNA byl přesunut do nové mikrozkušavky Collection tube a bylo k němu přidáno 100 µl Solution IRS, který sráží organické i anorganické nečistoty. Roztok byl vortexován asi 5 sekund a inkubován při 4 °C po dobu 5 minut. Následně byl opět centrifugován 1 minutu při 10000 x g. Supernatant byl přesunut do nové mikrozkušavky Collection tube a bylo k němu přidáno 900 µl Solution SB obsahujícího vysoce koncentrovaný roztok soli potřebný k navázání DNA na filtr. Roztok byl 5 sekund vortexován a byl přesunut do speciální mikrozkušavky MB Spin Column s filtrem. Následně byl centrifugován za stejných podmínek jako při předchozích centrifugacích. Tento postup byl opakován, dokud nebyl přefiltrován celý objem původního roztoku. Kapalina, která prošla filtrem neobsahovala DNA a mohla tak být odstraněna. Filtr byl dále přečištěn 300 µl Solution CB obsahujícím ethanol, který je schopen rozpustit případné kontaminanty DNA. Roztok byl centrifugován a filtr byl přesunut do nové mikrozkušavky. Ke sraženině DNA na filtru bylo přidáno 50 µl Solution EB, který obsahuje eluční pufr uvolňující sraženinu DNA z filtru. Po konečné centrifugaci byl prázdný filtr odstraněn a roztok obsahující DNA byl uskladněn v mrazáku při teplotě - 20 °C. Koncentrace a čistota vzorků byla určena pomocí přístroje NanoDrop 2000c, který určil koncentraci DNA v ng/µl a čistotu DNA pomocí poměrů absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm.

3.5.2 Nested PCR

DNA kvasinek vyizolovaná pomocí komerčně dodávaného kitu byla použita jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci. Reakce probíhala ve dvou amplifikačních krocích – tzv. nested PCR.

3.5.2.1 Příprava reakční směsi pro nested PCR

Reakční směs byla složena z komponentů uvedených v *Tabulce 3*. Každá složka reakční směsi byla před vlastním použitím krátce zvortexovaná. Všechny PCR komponenty byly smíchány v daném pořadí v očkovacím boxu, který byl řádně vysterilován ethanolem a UV zářením minimálně 30 minut před samotným mícháním směsi. Reakční směs byla připravená v příslušném objemu dle toho, zda se jednalo o první či druhou amplifikaci ve sterilní zkumavce typu Eppendorf a následně rozpipetovaná do 0,2 ml PCR zkumavek. Teprve na závěr byla do PCR zkumavek přidána i templátová DNA či vhodně naředěný produkt první amplifikace. Negativní kontrola byla připravená stejným způsobem, ale namísto templátové DNA byl přidán ekvivalentní objem PCR vody. Směs byla krátce zvortexována a vložena do termocykleru s předem nastaveným PCR profilem, který se lišil pro konkrétní páry přidávaných primerů.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR reakci

komponenty PCR směsi	objem pro první amplifikaci [μl]	objem pro druhou amplifikaci [μl]
sterilní PCR voda	11,24	22,48
mastermix	12,5	25
přímý primer	0,13	0,26
reverzní primer	0,13	0,26
templátová DNA	1	2
Celkový objem směsi [μl]	25	50

DNA byla naředěna, pokud to bylo možné na objem cca 10 ng/μl. Pro amplifikaci D1/D2 oblasti 26S rDNA i pro ITS oblasti rDNA byly použity univerzální eukaryotické primery. Sekvence těchto primerů jsou uvedeny v *Tabulce 4* a *Tabulce 5*. Pro ověření čistoty všech použitých komponentů byla do reakce zařazena také negativní kontrola, která měla stejné složení PCR směsi, ale neobsahovala templátovou DNA.

Tabulka 4: Sekvence primerů pro PCR reakci (1)

Nested PCR pro oblast D1/D2 26S rDNA		
	primer	sekvence
1. amplifikační krok	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'
2. amplifikační krok	NL1 -GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'

Tabulka 5: Sekvence primerů pro PCR reakci (2)

Nested PCR pro oblast ITS1 a 5,8-ITS2 rDNA		
	primer	sekvence
1. amplifikační krok	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
2. amplifikační krok ITS1 rDNA	ITS1 -GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGTCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
	ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
2. amplifikační krok 5,8-ITS2 rDNA	ITS4 -GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGTCTTCCGCTTATTGATATGC-3'

3.5.2.2 Průběh amplifikace

Připravená PCR reakční směs byla vložena do termocykleru, kde byl spuštěn nastavený vhodný teplotní profil pro oblast D1/D2 26S rDNA i pro ITS regiony. Teplota nasedání primerů, trvání jednotlivých cyklů a počet cyklů byl převzat z publikace, kde byly také analyzovány kmeny kvasinek rodu *Metschnikowia*, čili bylo možné tyto výzkumy využít i pro účely této práce, jelikož pro konvenční PCR se tyto parametry stanovují obecně pro všechny druhy jednoho rodu [22, 77]. Teploty annealingu pro jednotlivé oblasti DNA byly ověřeny výpočtem pomocí

příslušného softwaru NEB Tm Calculator, který zohledňuje použité komponenty jako typ DNA polymerázy, koncentraci primerů, která byla početně určena na 520 nM, reakční pufr apod. Veškeré parametry reakčních cyklů pro jednotlivé oblasti jsou uvedeny v *Tabulce 6*.

Tabulka 6: Přehled reakčních cyklů PCR reakce

	Teplota jednotlivých cyklů [°C] / doba trvání cyklu [s]				
	D1/D2 26S rDNA oblast		ITS1, 5,8-ITS2 rDNA oblast		
	1. amplifikační krok	2. amplifikační krok	1. amplifikační krok	2. amplifikační krok	2. amplifikační krok
Primery	NL1/NL4	NL1- GC/LS2	ITS1/ITS4	ITS1- GC/ITS2	ITS3/ITS4- GC
Počáteční denaturace	95/180	94/180	95/180	95/180	95/180
Denaturace	95/40	94/60	95/40	95/45	95/45
Annealing	52/50	51/60	50/30	56/60	56/60
Elongace	72/50	72/60	72/45	72/60	72/60
Závěrečná elongace	72/420	72/420	72/420	72/420	72/420
Počet cyklů	33	30	33	30	30

3.5.3 Kontrola PCR produktů pomocí horizontální gelové elektroforézy

Úspěšnost obou kroků amplifikace byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy v agarosovém gelu. Pro přípravu 1,2 % agarosového gelu bylo použito 1,2 g agarosu a 100 ml 0,5x TBE pufru, což je 10x naředěný 5x TBE pufr (50 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu, 27,5 g kyseliny borité, 20 ml 0,5 EDTA pufru a 1000 ml MQ vody), který se používá například také při PFGE. Agarosa byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě. Po ochlazení bylo do roztoku přidáno 10 µl GelRed činidla. Gel byl jemně promíchán a následně byl nalit do elektroforetické vany, vložil se hřeben pro vytvoření jamek a gel byl ponechán ke ztuhnutí při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po ztuhnutí gelu byl hřeben vyjmut a do vytvořených jamek byly nanесeny vzorky produktů PCR reakce spolu se standardem 100 bp DNA Ladder. Elektroforetická vana se vzorky byla zalita 0,5x TBE pufrem po vyznačenou rysku. Aparatura se přikryla víkem a k elektrodám byl připojen zdroj napětí. Elektroforéza byla spuštěna při podmínkách: **80 V, 90 mA po dobu 2 hodin**. Po skončení elektroforézy byl gel přesunut do

komory vizualizačního zařízení Azure biosystems c200 a vyfotografován. Pomocí UV světla se zviditelnily bandy sledovaných PCR produktů, které odpovídaly své velikosti.

3.5.4 Přečištění PCR produktů pomocí ethanolu

Ke 20 µl amplifikované DNA byla přidány 2 µl octanového pufru, směs byla zvortexována. Následně bylo přidáno 60 µl 96 % ethanolu vychlazeného na - 20 °C. Směs byla centrifugovaná při 15 000 otáčkách a 4 °C 30 minut. Po centrifugaci byl odlit supernatant. Bylo přidáno opět 60 µl, ale tentokrát 80 % ethanolu vychlazeného na - 20 °C, směs byla opět zvortexovaná a zcentrifugovaná za stejných podmínek. Opět byl odlit supernatant a zkumavky byly sušeny v exikátoru po dobu 15 minut. K pročištěné DNA bylo přidáno 20 µl sterilního TE pufru.

3.5.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Po provedení kontroly PCR produktů pomocí ELFO byly produkty druhé amplifikace, které byly podrobeny PCR reakci s využitím vnitřních primerů dále analyzovány pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Tato metoda je schopná detekce fragmentů pouze do velikosti 500 bp.

3.5.5.1 Příprava polyakrylamidového gelu s denaturačním gradientem

Pro DGGE byl používán 8 % a 10 % gel s koncentračním gradientem denurantů. Jako denuranty byly používány formamid a močovina. Nejdříve byl připraven 40 % AA/BIS v poměru 19:1 (38 g akrylamidu a 2 g bis-akrylamidu na 100 ml MQ vody přefiltrované přes filtrační papír). Dle *Tabulky 7* a *Tabulky 8* byly následně připraveny 0 %, 20 %, 30 %, 40 % a 60 % zásobní roztoky denurantů. Pro míchání roztoku byl také použit 50x TAE pufr (242 g Tris, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA pufru, pH 8 na 1 l MQ vody).

Tabulka 7: Složení zásobních roztoků pro 8 % polyakrylamidový gel

Složka denaturačního roztoku	0 % denaturantů [ml]	20 % denaturantů [ml]	30 % denaturantů [ml]	40 % denaturantů [ml]	60 % denaturantů [ml]
40 % AA/BIS	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
50x TAE pufr	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Formamid	–	8,0	12,0	16,0	24,0
Močovina	–	8,4	12,6	16,8	25,2
MQ voda	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml
Celkový objem	100,0	100	100,0	100,0	100,0

Tabulka 8: Složení zásobních roztoků pro 10 % polyakrylamidový gel

Složka denaturačního roztoku	0 % denaturantů [ml]	20 % denaturantů [ml]	30 % denaturantů [ml]	40 % denaturantů [ml]	60 % denaturantů [ml]
40 % AA/BIS	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
50x TAE pufr	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Formamid	–	8,0	12,0	16,0	24,0
Močovina	–	8,4	12,6	16,8	25,2
MQ voda	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml	doplněna do 100 ml
Celkový objem	100,0	100	100,0	100,0	100,0

Do připravených kádinek bylo nalito 15 ml jednoho z méně koncentrovaných denaturačních roztoků a 15 ml jednoho z koncentrovanějších denaturačních roztoků. Koncentrovanější roztok byl obarven 2 ml barvičky na zviditelnění gradientu (0,05g bromfenolblue, 0,05 g xylene cyanal a 10 ml 1xTAE pufru). Takto připravené roztoky se daly na 5 minut na ultrazvukovou čističku pro odstranění veškerých vzduchových bublinek. Do každého z roztoků bylo před použitím přidáno 15 µl TEMEDu (N, N'- tetramethylendiaminu) a 90 µl APS (0,1 g persíranu amonného v 1 ml MQ vody). Každý denaturační roztok byl jemně promíchán a nasán do injekční stříkačky, ze které byly následně vytěsněny bubliny a výsledný objem byl upraven na 14 ml. Injekční stříkačky byly upevněny po stranách aparatury na přípravu gradientu a hadičkami

připojeny k jehle, která byla zavedena mezi skleněné desky v nalévacím stojanu. Pomalým otáčením kolečka aparatury byl vytvořen lineární gradient denaturantů v gelu. Po napuštění těchto dvou roztoků byl nakonec přidán 0 % roztok denaturantů a vložen hřeben pro vytvoření jamek. Aparatura s gelem byla ponechána cca 1–2 hodiny v lednici k polymerizaci. Před samotným provedením elektroforézy byl hřeben vyňat a jamky se propláchly 1x TAE pufrem (140 ml 50x TAE pufrem, 6 860 ml MQ vody).

3.5.5.2 Příprava vzorků pro DGGE a její samotné provedení

Produkty z druhého amplifikačního kroku nested PCR reakce byly obarveny signální barvičkou PCR loading buffer v poměru 10:3 a následně nanесeny na gel. Elektroforetická vana byla naplněna 7000 ml 1x TAE pufrem a přikryta vrchním krytem, pomocí něhož bylo zapnuto zahřívání pufrem na 60 °C a také nepřetržité míchání. Skleněné desky s nalitým gelem byly přesunuty na kazetu. Do jamek vytvořených v gelu po vyjmutí hřebenu byly nanесeny vzorky o objemu 13 µl. Zahřívání pufrem bylo přerušeno a kazeta s gelem se vložila do elektroforetické vany. Přerušené zahřívání spolu s mícháním bylo opět zapnuto. Jakmile bylo dosaženo teploty 60 °C, aparatura byla připojena ke zdroji napětí. Podmínky, při kterých elektroforéza probíhala byly: **120 V, 90 mA po dobu 3–7 hodin.**

3.5.5.3 Obarvení DGGE gelu

Pro následnou vizualizaci separovaných fragmentů v DGGE gelu bylo použito barvení pomocí ethidium bromidu. Barvicí lázeň byla připravena následujícím způsobem: do 250 ml 1x TAE pufrem bylo přidáno 50 µl EtBr tak, aby jeho konečná koncentrace činila 20 µg/ml. Gel byl za pomalého třepání ponechán 15–20 minut v lázni. Následně byl vyjmut a propláchnut destilovanou vodou. Takto připravený gel byl přenesen do komory vizualizačního systému Azure biosystems c200 a vyfotografován.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace metody PFGE

4.1.1 Optimalizace izolačního postupu DNA do gelových bločků

Jako první bylo při izolačním postupu optimalizováno množství enzymu lytikázy, která má za úkol dezintegrovat buněčnou stěnu kvasinek. Výsledné množství bylo stanoveno na 28,8 μ l lytikázy (2000 U/mg bílkoviny), je však výsledkem několika optimalizací. Byly zkoušeny různé koncentrace enzymu lytikázy, aby došlo k potřebné dezintegraci. Nejdříve byly vyzkoušeny slabší koncentrace, k buňkám kvasinek tedy bylo přidáno 15 μ l enzymu lytikázy, toto množství se projevilo jako nedostatečné, jelikož nedošlo k uspokojivé dezintegraci buněk. Ve druhém pokusu bylo použito dvojnásobné množství enzymu tedy 30 μ l, toto množství se ukázalo jako dostatečné, ale buňky některých druhů kvasinek již byly dezintegrovány příliš. Množství enzymu tedy bylo optimalizováno na výsledných 28,8 μ l, jelikož se ukázalo jako nejlepší pro všechny použité druhy kvasinek.

Následně bylo optimalizováno také množství low melting agarosy, která se pipetuje v množství 0,5 ml ke vzorkům a tvoří základ pro výrobu gelových DNA bločků. Nejdříve byl použit 3 % roztok low melting agarosy a CPES pufru, což se ukázalo jako neoptimální. Dále byl vyzkoušen poměr low melting agarosy ku CPES pufru 1:1, který se ukázal jako dostačující, ale nepraktický při následné manipulaci při přípravě bločků. Následně byl použit 2 % roztok s CPES pufrem, který se ukázal jako správný, jelikož bločky velmi pěkně ztuhly a zároveň se daly bez problémů napipetovat do vzorků.

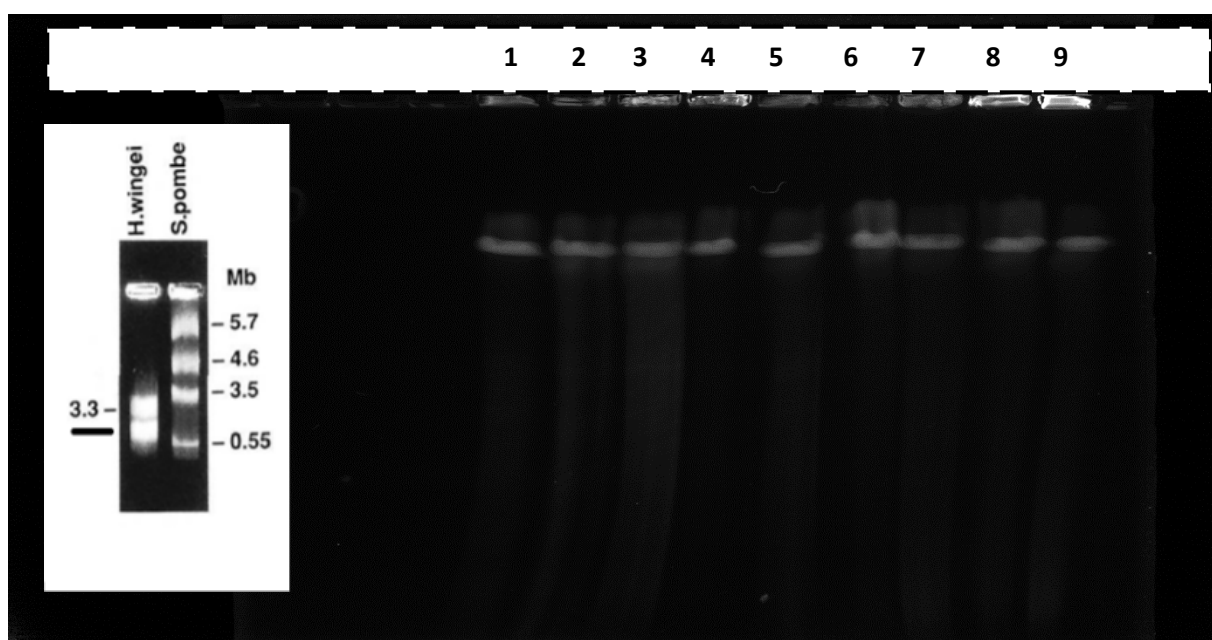
4.1.2 Optimalizace podmínek metody PFGE

Pro optimalizaci velikosti elektrického napětí a délky pulzních časů byla pulzní gelová elektroforéza spuštěna napřed s kratšími pulzními časy pro separaci malých chromozomů a následně s delšími pulzními časy pro separaci větších chromozomů. Srovnáním obou analýz se stanovily optimální podmínky separace molekul chromozomální DNA kvasinek rodu *Mestchnikowia*. Podmínky pro zapnutí PFGE byly optimalizovány několikrát, jelikož měření ovlivňovalo mnoho vnějších faktorů. Po několika měřeních se ukázalo, že se vzorky nedělí na gelu správně včetně standardu, což evokovalo chybu v přístroji nikoliv v izolačním postupu. Pro další měření byla tedy zapůjčena nová hexagonální elektroda od Akademie věd, která již

dokázala dodat dostatečné pulzy k rozdělení vzorků DNA na jednotlivé bandy. Po výměně a poměrně různé optimalizaci s využitím pufru 0,5x TBE namísto klasického 0,08 M TBE k tvorbě gelu, který byl vytvořen jako 0,8 % namísto klasického 1,1 % se finálně podařilo metodu PFGE optimalizovat na požadované vlastnosti.

Tabulka 9: Podmínky pro zapnutí PFGE při kontrolním screeningu s delší dobou separace

Doba separace [h]	Pulzní časy [s]	Vložené napětí 1. doby separace [V]	Vložené napětí 2. doby separace [V]	Vložené napětí 3. doby separace [V]
48	2400	80	80	80
35	3000	80	80	80
35	3000	80	80	80
48	3300	80	80	80



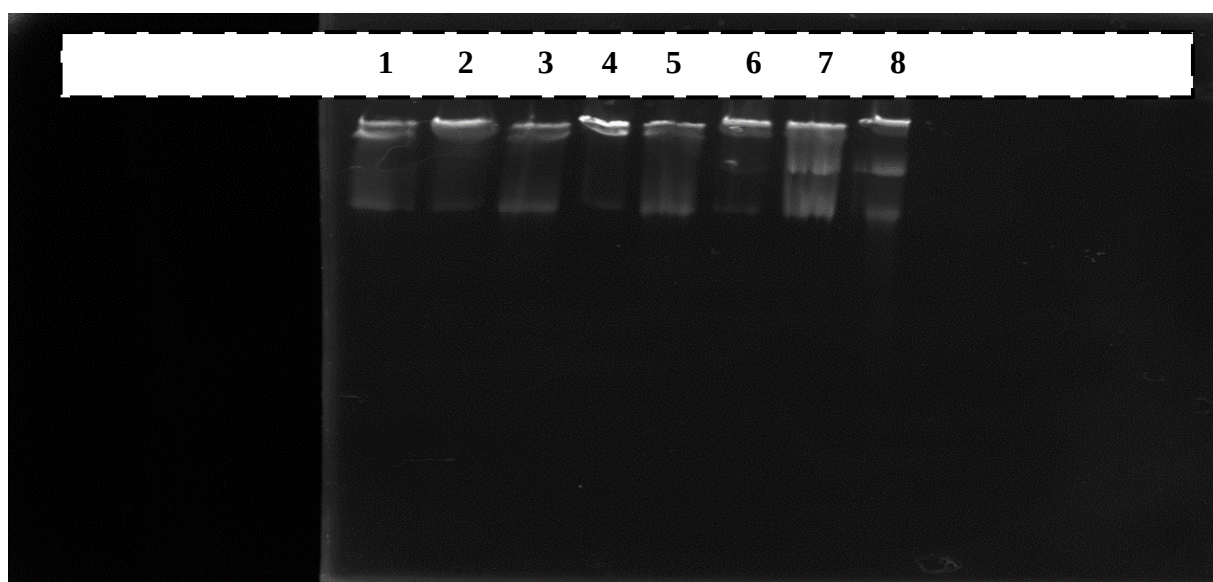
Obrázek 7: Kontrolní screening PFGE analýzy: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia chrysoperlae* 1158, číslo 6–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 7–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 8–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 9–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Při kontrolním screeningu byla PFGE spuštěna na 166 hodin a bez použití standardu, učinilo se tak z důvodu ověření správnosti izolační postupu DNA a zároveň se předpokládalo lepší rozdělení chromozomů o větší velikosti. Jak můžeme vidět na *Obrázku 7* chromozom o větší velikosti se izolovat podařilo. Při izolačním postupu bylo použito v tomto případě 15 μ l enzymu

lytikázy, což se ukázalo jako nedostatečné, jelikož se podařilo separovat pouze jednu frakci. Při dalším pokusu tedy byla koncentrace tohoto enzymu navýšena. Také zvolené napětí 80 V bylo zřejmě příliš vysoké, jelikož nejsou ostatní bandy na gelu zřetelně viditelné. Cílem však bylo ověřit funkčnost izolačního postupu a funkčnost PFGE aparatury, což se při této optimalizaci povedlo.

Tabulka 10: Podmínky pro zapnutí PFGE při analýze s kratší dobou separace

Doba separace [h]	Pulzní časy [s]	Vložené napětí 1. doby separace [V]	Vložené napětí 2. doby separace [V]	Vložené napětí 3. doby separace [V]
24	2400	65	65	65
23	3000	65	65	65
23	3300	65	65	65



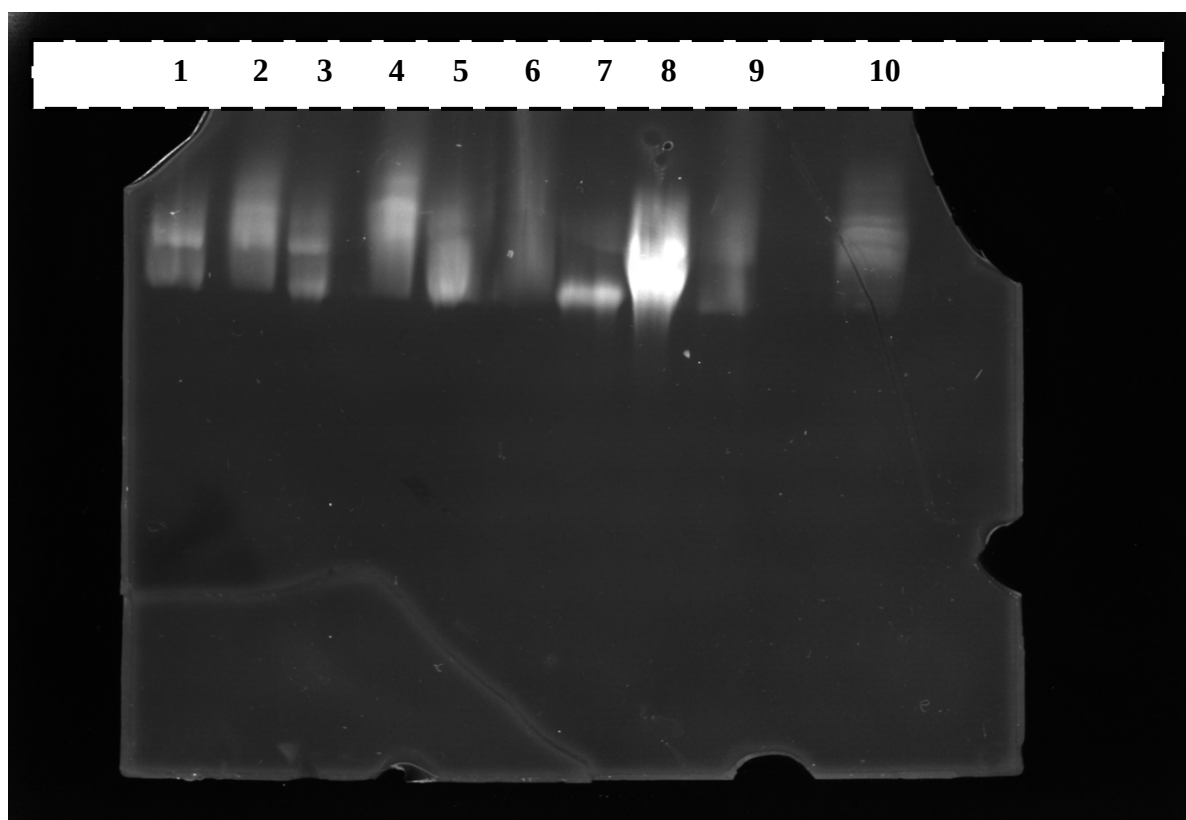
Obrázek 8: PFGE analýza s kratší dobou separace: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia chrysoperlae* 1158, číslo 6–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 7–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Po optimalizaci izolačního postupu DNA byla opět spuštěna zkušební PFGE, u níž byla celková doba separace snížena na 70 hodin z důvodu sledování správnosti izolačního postupu a také bylo sníženo napětí z 80 V na 65 V z důvodu lepší viditelnosti bandů. Z Obrázku 8 můžeme vidět, že se izolovaná DNA kvasinek rozdělila na několik bandů neboli chromozomů. U kvasinek *Metschnikowia andauensis* 1241, *Metschnikowia sinensis* 1244 a *Metschnikowia*

shanxiensis 1250 v bžích číslo 6, 7 a 8 se zřetelně podařilo izolovat 3 chromozomy. Díky snížené době separace se tak během tohoto experimentu podařilo rozdělit chromozomy o menších velikostech a také se ukázalo, že zvolené podmínky jsou pro separaci vhodné. Kvasinky v bžích 1–5 mají minimálně dva chromozomy.

Tabulka 11: Podmínky pro zapnutí PFGE při analýze s kratší dobou separace při použití CHEF standardu kvasinky *Hansenula wingei*

Doba separace [h]	Pulzní časy [s]	Vložené napětí 1. doby separace [V]	Vložené napětí 2. doby separace [V]	Vložené napětí 3. doby separace [V]
24	2400	65	65	65
23	3000	65	65	65
23	3300	65	65	65



Obrázek 9: PFGE analýza s kratší dobou separace: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia chrysoperlae* 1158, číslo 6–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 7–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 8–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 9–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 10–CHEF standard *Hansenula wingei*

Při této analýze byly zachovány podmínky z předešlé analýzy, jelikož se ukázaly jako vhodné pro separaci chromozomů o menších velikostech, které jsou potřebné k optimalizaci metody PFGE. Zde byla při přípravě gelu použita low melting agarosa jiného výrobce pro separaci PFGE, dle výsledků se však ukázala jako nevhodná. Na *Obrázku 9* nicméně můžeme pozorovat rozdělení DNA kvasinek na 2–3 frakce. Bohužel nelze určit velikost jednotlivých chromozomů, jelikož nedošlo k separaci standardu ani optimální separaci DNA jednotlivých kvasinek. K tomuto jevu mohlo dojít z důvodu použití nevhodné agarosy při přípravě gelu nebo poškození hexagonální elektrody, která nedodávala správně napětí a pulzy při PFGE experimentu, toto vysvětlení naznačuje především špatné rozdělení standardu, které nemůže souviset s optimalizačním procesem izolace DNA.

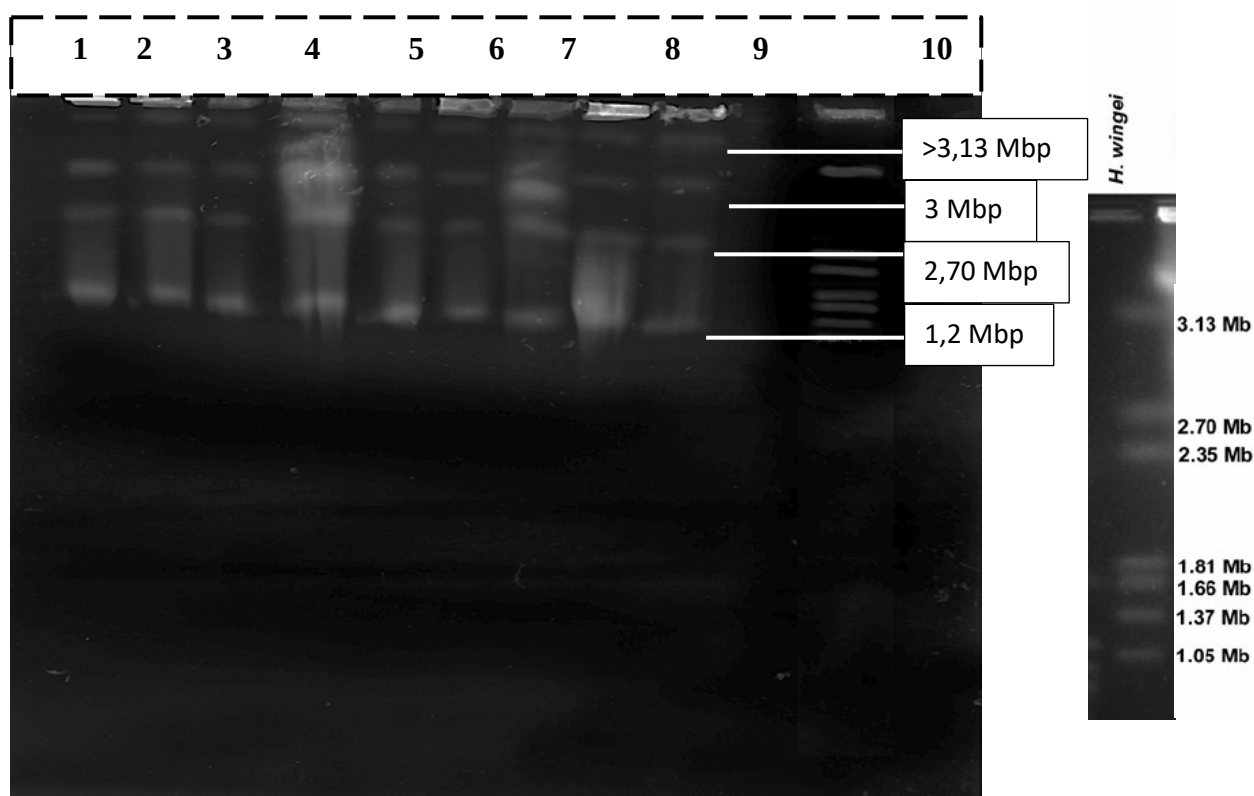
Tabulka 12: Podmínky separace při finální optimalizaci PFGE s použitím CHEF standardu kvasinky *Hansenula wingei*

Doba separace [h]	Pulzní časy [s]	Vložené napětí 1. doby separace [V]	Vložené napětí 2. doby separace [V]	Vložené napětí 3. doby separace [V]
48	2400	50	50	50
35	3000	50	50	50
35	3300	50	50	50

Pro finální optimalizaci PFGE metody byla použita nová PFGE hexagonální elektroda zapůjčená z Akademie věd ČR. Zároveň byly použity zcela nové postupy a podmínky separace, které vyplynuly z důkladného studia literatury. Byl zvolen čas separace 118 hodin, ukázal se jako optimální při porovnání výsledků z předchozích experimentů pro separaci jak malých, tak i velkých chromozomů. Napětí bylo sníženo na 50 V z toho důvodu, aby byla separační dráha chromozomů dostatečně dlouhá a zároveň, aby bandy byly zřetelné a tím pádem lépe identifikovatelné. Největší změna zde proběhla při přípravě gelu, jelikož byl namísto 0,08 TBE pufru použit 0,5x TBE pufr. Byl také použit 0,8 % agarosový gel namísto 1 % gelu. Pufr se velmi dobře osvědčil na přípravu gelu při klasické horizontální elektroforéze a také byl popsán jako optimální při použití u metody PFGE a kvasinek s většími chromozomy ve studii dle Mathew K. et al. Optimální podmínky doporučené studií pro dva nejpoužívanější standardy pro kvasinky s většími chromozomy, ze které bylo při této optimalizaci čerpáno jsou zobrazeny v *Tabulce 13* [75].

Tabulka 13: Doporučené parametry ze studie dle Mathew K. et al [75]

DNA sample	DNA size range [kb]	Pulse Time [min]	Run Time [h]	Voltage [V]	Buffer [xTBE]
<i>Hansenula wingei</i>	1000-3000	40/20	140	165	0,5
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3000-6000	75	160	36	0,5



Obrázek 10: Finální optimalizace PFGE s použitím CHEF standardu kvasinky *Hansenula wingei*: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia chrysoperlae* 1158, číslo 6–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 7–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 8–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 9–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 10–CHEF standard *Hansenula wingei*

Na Obrázku 10 je možné vidět, že finální optimalizace PFGE metody se jeví zatím jako nejzdařilejší pokus. Podařilo se nám u všech kvasinek izolovat 4 bandy, tedy chromozomy o různých velikostech. V běžích číslo 4 a 7 však můžeme vidět, že u druhů *Metschnikowia pulcherrima* 149 a *Metschnikowia sinensis* 1244 je náznak i pátého bandu, což by znamenalo

odlišnost jejich genomu od všech ostatních použitých druhů kvasinek. Jelikož jsou u těchto kvasinek chromozomy o větší velikosti intenzivnější svítivosti, je možné uvažovat, že separační doba byla krátká, a tím pádem došlo k jejich nedostatečnému rozdělení v gelu. Velikost tohoto bandu můžeme také identifikovat jako větší než 3,13 Mbp, stejně jako největší chromozom, který je společný pro všechny druhy kvasinek je větší než velikost použitého standardu. Nejmenší chromozom má dle použitého standardu *H. wingei* velikost 1,2 Mbp, další 2,70 Mbp a třetí cca 3 Mbp. Intenzivnější svítivost je možné sledovat i u nejmenšího chromozomu o velikosti přibližně 1,2 Mbp téměř u všech vybraných kmenů. Je tedy možné, že pokud by čas separace byl nastaven větší než 118 hod, mohlo by dojít jednak k lepší separaci, a také k detailnější charakterizaci jednotlivých kvasinkových kmenů. Z časových důvodů bohužel nebylo možné realizovat další optimalizace. V navazujících experimentech by bylo vhodné navýšit čas separace, jelikož by se mohlo podařit izolovat další velké chromozomy a navýšit tak počet dosud izolovaných chromozomů kvasinek rodu *Metschnikowia*. Také je možné vyzkoušet různé koncentrace agarosy v gelu nebo různé koncentrace TBE pufru.

4.2 Optimalizace nested PCR reakce

Pro vyšší citlivost a specifitu byla zvolena jako optimální pro molekulární analýzu dvoukroková nested PCR. Optimalizace nested PCR reakce byla velmi důležitá, jelikož byla klíčovým krokem k charakterizaci kvasinek metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy.

4.2.1 Zpracování a kontrola čistoty izolované templátové DNA

DNA, která byla izolována pomocí DNeasy UltraClean Microbial Kit byla po izolaci spektrofotometricky ověřena pomocí přístroje NanoDrop 2000c. Pomocí něj byla stanovena její koncentrace ve vzorku a zároveň její čistota pomocí poměru absorbancí při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Výsledky tohoto měření jsou zobrazeny v *Tabulce 14*. Kromě kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 149, jejíž poměr absorbancí je 1,09, což je značně pod hodnotou 1,8, která je optimální pro DNA, aby mohla být považovaná za dokonale čistou, jsou hodnoty ostatních druhů kvasinek této hodnotě blízké čili obecně lze izolovanou DNA považovat za poměrně čistou. Koncentrace DNA kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* 149 byla také nejnižší, což může být způsobeno několika faktory – mohlo dojít k poškození DNA během izolačního postupu, dále mohla být DNA nedokonale přečištěná, což by značilo kontaminaci nadměrným zbytkovým množstvím proteinů, také to však mohlo být způsobeno faktem, že

kvasinka v médiu, z něhož byla izolována ještě nedosáhla optimální fáze růstu, pro izolaci DNA. Z hlediska čistoty i koncentrace se nejlépe jevíly kvasinky *Metschnikowia andauensis* 129, *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia andauensis* 1241 a *Metschnikowia sinensis* 1244. Obecně tedy platí, že vyšší koncentrace DNA měly zároveň i vyšší čistotu.

Tabulka 14: Koncentrace a čistota DNA izolované pomocí komerčního kitu

Druh kvasinky	Koncentrace DNA [ng/μl]	A 260/280 [–]
MA 129	27,3	1,69
MP 145	39,1	1,85
MP 147	12,2	1,80
MP 149	1,4	1,09
MA 1241	21,5	1,77
MS 1244	32,8	1,72
MZ 1247	7,2	1,58
MS 1250	6,0	1,63

4.2.2 První amplifikační krok

Pro první amplifikaci nested PCR byla použita jako templát DNA izolovaná z čistých kultur kvasinek rodu *Metschnikowia*. Při prvním pokusu o první amplifikační krok byla DNA ponechána v koncentraci uvedené v *Tabulce 14*. Byl použit pár primerů ITS1/ITS4 pro oblast ITS1 a 5,8–ITS2 rDNA a NL1/NL4 pro oblast D1/D2 26S rDNA. Celkový objem vzorku v jedné zkumavce činil 25 μl. Po prvním pokusu o amplifikaci těchto primerů a kontrole pomocí horizontální gelové elektroforézy se ukázalo, že bude optimální vyšší koncentrace DNA naředit. Jako optimální se ukázala koncentrace 10 ng/μl. Při druhém pokusu o amplifikaci tedy vzorky, které měly koncentraci vyšší než 10 ng/μl byly naředěny PCR vodou právě na tuto koncentraci. Vzorky, které měly koncentraci nižší byly ponechány v původní koncentraci. Vhodně naředit bylo třeba také jednotlivé primery, dle jejich koncentrací bylo do mikrozkušavek přidáno adekvátní množství PCR vody. Teprve z těchto naředěných roztoků se odebíralo uvedené množství potřebné do PCR směsi.

4.2.3 Druhý amplifikační krok

Při druhé amplifikaci nested PCR byla koncentrace produktů první amplifikace naředěna 100x. Takto naředěný produkt byl použit jako templát pro druhý amplifikační krok. Pro druhou amplifikaci byly použity dva páry primerů ITS1-GC/ITS2 a ITS3/ITS4-GC pro oblast ITS1 a 5,8–ITS2 rDNA a NL1-GC/LS2 pro oblast D1/D2 26S rDNA. Celkový objem vzorku v jedné zkumavce činil 50 µl. Výsledky elektroforetické detekce fragmentů produktů první a druhé amplifikace PCR reakce jsou shrnuty v kapitole 4.2.4.

4.2.4 Elektroforetická detekce fragmentů produktů PCR reakce

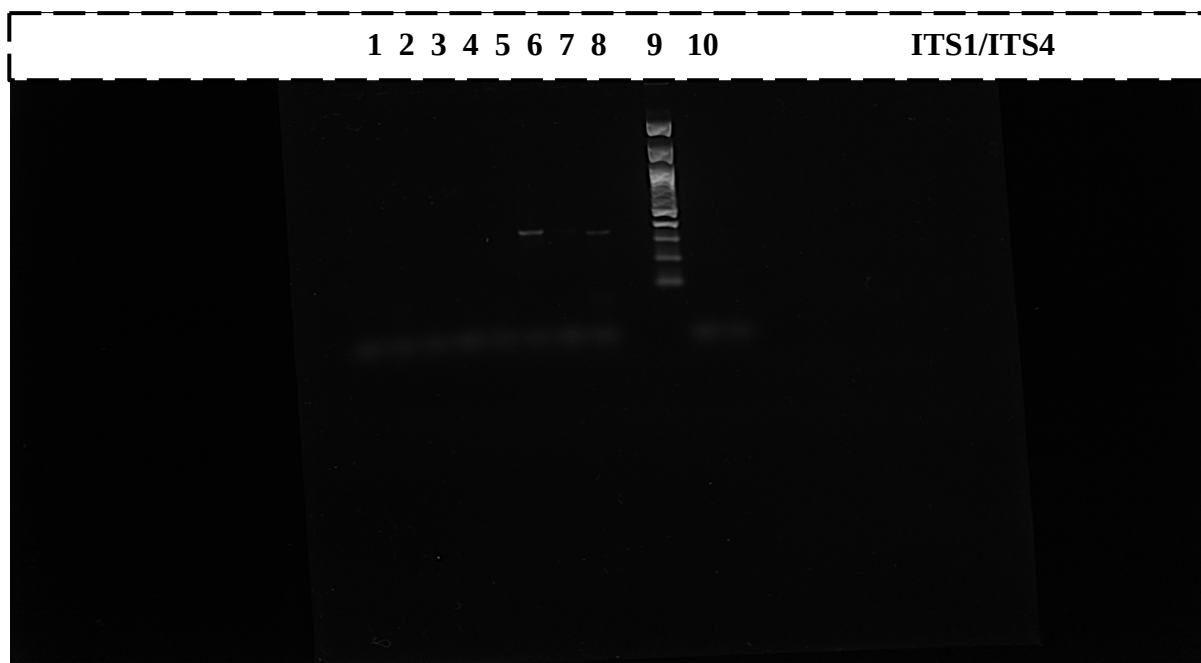
Úspěšnost amplifikace byla vždy po první i druhé amplifikaci ověřená elektroforetickou separací získaných PCR produktů. Podrobný popis této kontroly je uveden v kapitole 3.5.3. Podmínky, které byly použity pro zapnutí horizontální gelové elektroforézy při všech kontrolách jsou zobrazeny v *Tabulce 15*. Metoda horizontální gelové elektroforézy se pro kontrolu ukázala být vysoce specifická, jelikož PCR produkty detekované pomocí této metody vykazovaly intenzivní charakter po vizualizaci UV světlem.

Tabulka 15: Podmínky pro zapnutí horizontální gelové elektroforézy

Vložené napětí [V]	Vložený proud [mA]	Doba separace [h]
80	90	2

4.2.4.1 První amplifikace nested PCR oblasti ITS1

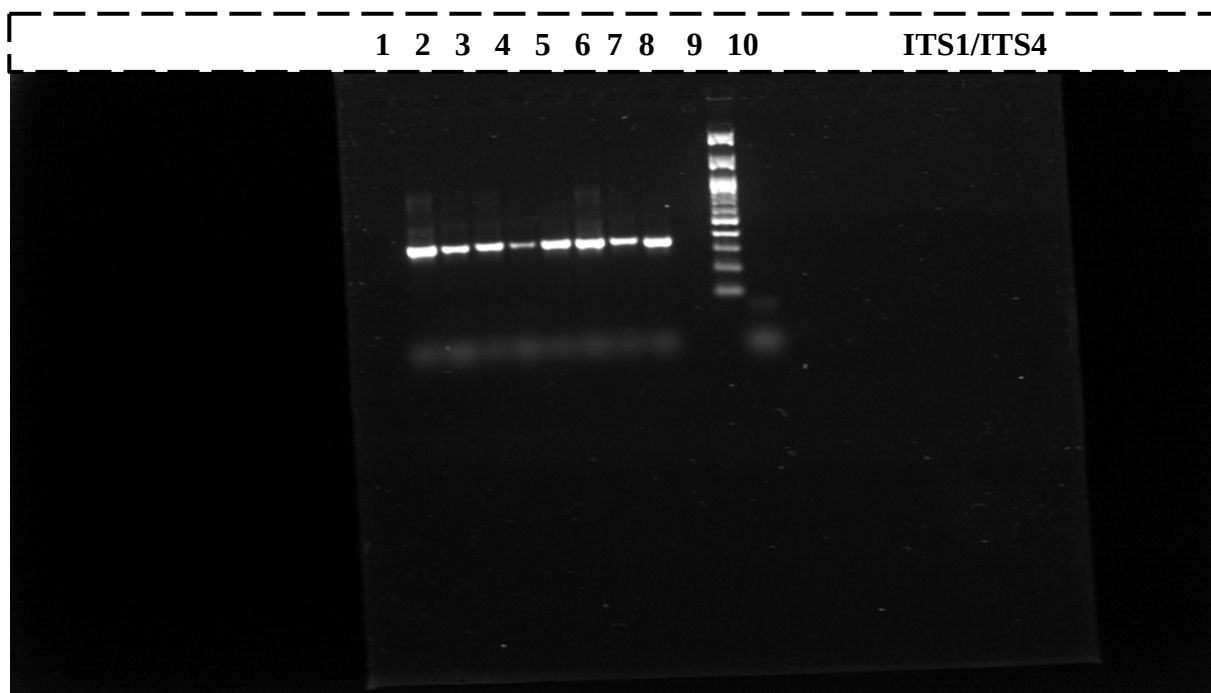
Jako první byla provedena elektroforetická kontrola první amplifikace oblasti ITS1 s využitím primerů ITS1/ITS4, šlo o první pokus o amplifikaci pomocí PCR reakce, účelem bylo především optimalizovat koncentraci izolované DNA, aby byla vhodná pro následnou amplifikaci jednotlivých oblastí. Pro kontrolu čistoty byla vždy zařazena také negativní kontrola, která neobsahuje DNA matici.



Obrázek 11: Ověření produktů PCR po prvním pokusu o amplifikaci ITS1/ITS4 primerů: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 9–standard 100 bp DNA Ladder , číslo 10–negativní kontrola

Na Obrázku 11 je možné vidět, že amplikon, který je produktem první amplifikace byl elektroforeticky zachycen pouze u vzorku číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244 a číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250. I tak se koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích ukázala jako velmi nízká, což mohlo být způsobeno špatnou optimalizací koncentrace DNA. Nicméně i díky vzorkům, u kterých se amplikon zdařilo elektroforeticky zachytit je možné díky velikostnímu standardu určit, že velikost produktů první amplifikace nested PCR pro ITS1 oblast je cca okolo 350 bp. Také se podařilo optimalizovat koncentraci DNA na 10 ng/μl u vzorků, u kterých nebyla koncentrace DNA pod touto hodnotou již po samotné izolaci. Negativní kontrola je v pořádku, jelikož se u jejího vzorku žádný band neobjevil, vzorky tedy nejsou kontaminovány.

Následně byl proveden druhý pokus o první amplifikaci oblasti ITS1 s využitím primerů ITS1/ITS4, koncentrace DNA vzorků již byla lépe optimalizována.



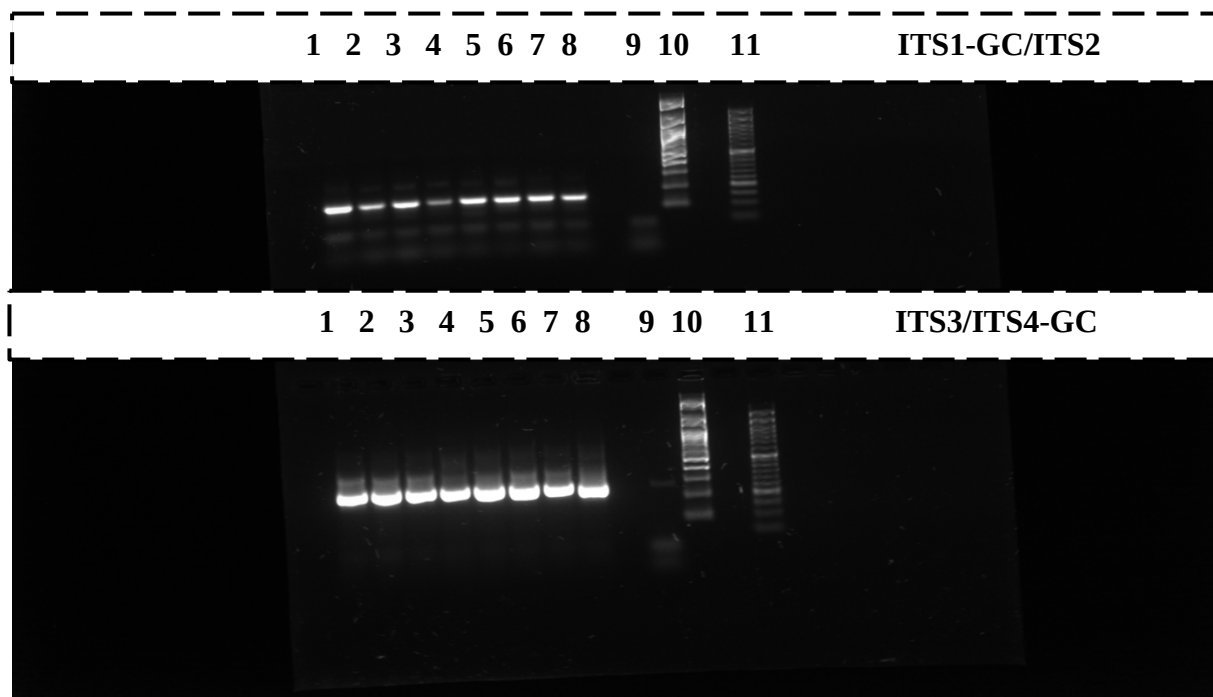
Obrázek 12: Kontrola pomocí ELFO po druhém pokusu o amplifikaci ITS1/ITS4 primerů: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 9–standard 100 bp DNA Ladder, číslo 10–negativní kontrola

Na Obrázku 12 je možné vidět, že při druhém pokusu o amplifikaci, kdy došlo k lepší optimalizaci vstupní koncentrace DNA a také naředění jednotlivých vzorků se zdařilo elektroforeticky zachytit amplikon, který je produktem první amplifikace ITS1 oblasti u všech druhů kvasinek. Stejně jako při prvním pokusu lze určit, že velikost amplikonu je dle použitého velikostního standardu 100 bp DNA Ladder okolo 350 bp. Tyto PCR produkty se tedy ukázaly jako vhodné pro použití při druhém amplifikačním kroku nested PCR, je však vidět část nespecifických produktů které budou muset být v následujících krocích odstraněny přečištěním PCR produktů. Negativní kontrola je v pořádku, jelikož se u jejího vzorku žádný band neobjevil, vzorky tedy nejsou kontaminovány.

4.2.4.2 Druhá amplifikace nested PCR oblastí ITS1 a 5,8–ITS2 rDNA

Jako další byla provedena elektroforetická kontrola druhého amplifikačního kroku oblastí ITS1 a ITS2 nested PCR, která byla realizována s využitím dvou párů primerů ITS1-GC/ITS2

a ITS3/ITS4-GC. Při využití páru primerů ITS1-GC/ITS2, které se účastní druhého amplifikačního kroku PCR reakce pro ITS1 oblast se stejně jako u první amplifikace této oblasti ukázaly části nespecifických produktů, které se budou muset odstranit v následujících krocích jejich přečištěním. U oblasti ITS2, která byla amplifikována s využitím primerů ITS3/ITS4-GC nejsou tyto nespecifické produkty tolik patrné, což může vypovídat o zvolené teplotě annealingu jako o více specifické pro oblast ITS2.

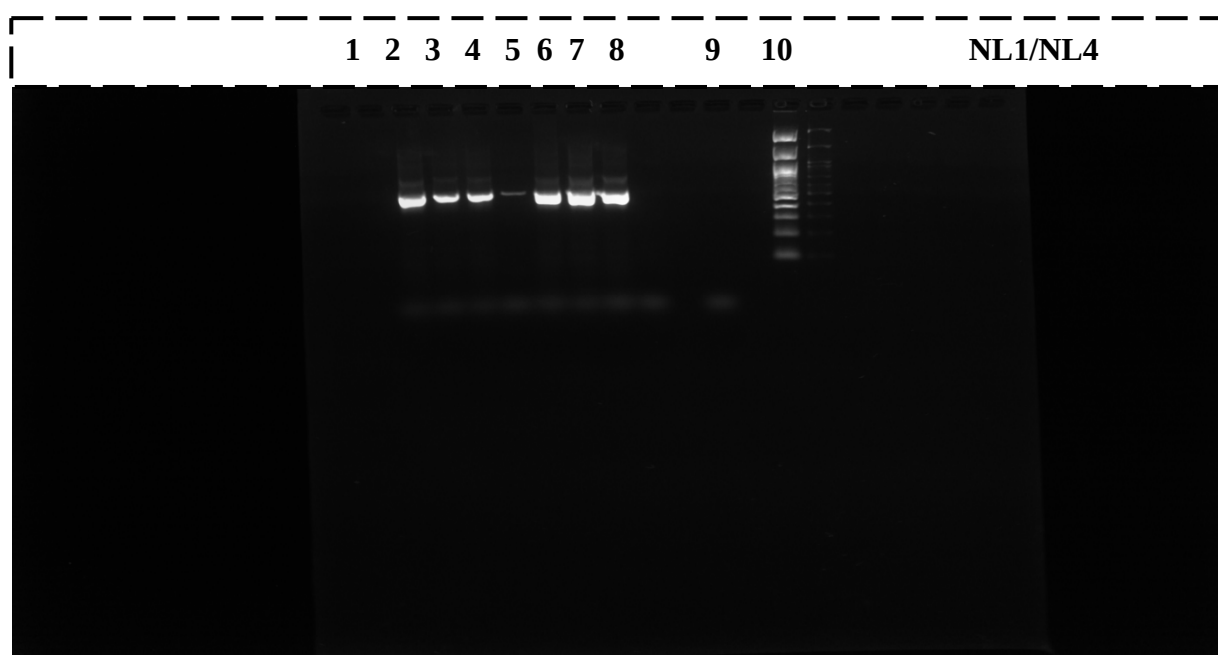


Obrázek 13: Kontrola pomocí ELFO druhé amplifikace DNA pro primery ITS1-GC/ITS2 a ITS3/ITS4-GC: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 9–negativní kontrola, číslo 10–standard 100 bp DNA Ladder, číslo 11–standard FastGene 50 bp DNA Marker

Z Obrázku 13 je zřejmé, že se podařilo správně amplifikovat všechny vzorky kvasinek pro oblast ITS1 a 5,8–ITS2 rDNA. Dle vložených velikostních standardů 100 bp DNA Ladder a FastGene 50 bp DNA Marker je možné určit, že velikost výsledných ampliconů je cca 150 bp při použití primerů ITS1-GC/ITS2 a cca 200–250 bp při použití primerů ITS3/ITS4-GC. Takto připravené produkty druhé amplifikace nested PCR jsou vhodné k dalšímu zkoumání pomocí metody DGGE.

4.2.4.3 První amplifikace nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA

Po dokončení amplifikací oblastí ITS1 a ITS2, byly zahájeny amplifikace oblasti 26S rDNA, konkrétně úsek s geny kódujícími D1/D2 domény. Pro PCR reakci byly využity univerzální eukaryotické primery NL1/NL4. Průběh amplifikace byl realizován za stejných podmínek jako při analýze oblastí ITS1 a ITS2, tedy ve dvou krocích nested PCR reakce. Amplifikace oblasti 26S se ukázala jako úspěšná, jelikož se pomocí elektroforetické kontroly podařilo stanovit přibližnou velikost produktů první amplifikace takřka u všech použitých druhů kvasinek. Nebyly také patrné části nespecifických produktů, což vypovídá o optimálně zvolené teplotě annealingu pro tuto oblast.



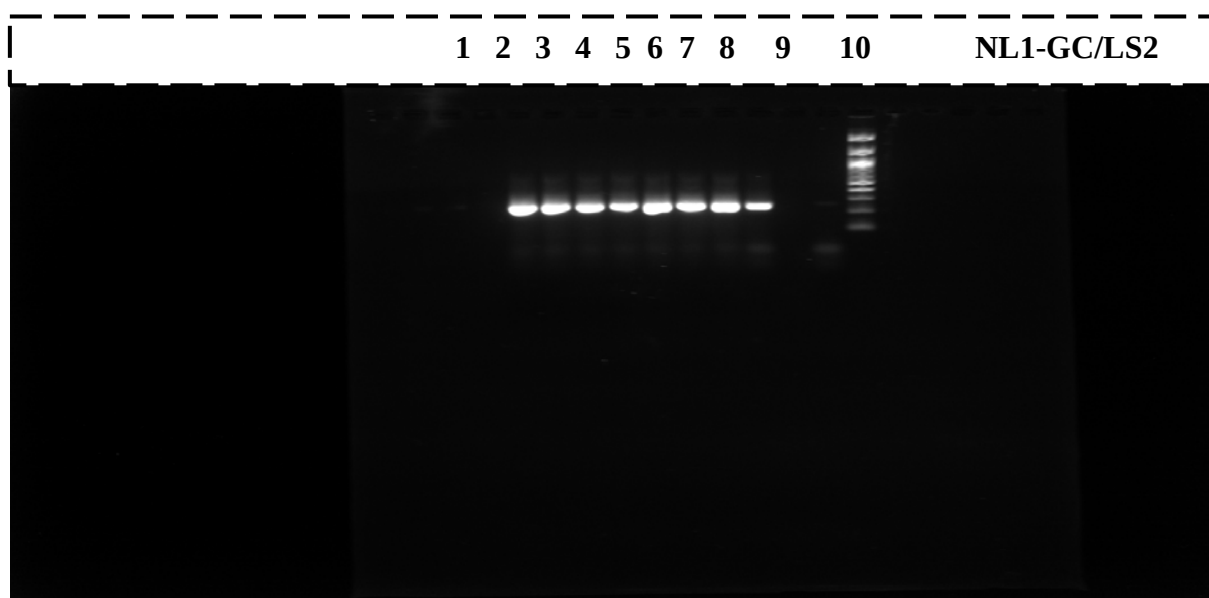
Obrázek 14: Kontrola pomocí ELFO první amplifikace DNA pro primery NL1/NL4: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 9–negativní kontrola, číslo 10–standard 100 bp DNA Ladder

Na Obrázku 14 je možné vidět, že při pokusu o první amplifikaci D1/D2 oblasti se podařilo amplifikovat správně všechny vzorky kromě vzorku v běhu číslo 8, který odpovídá *Metschnikowia shanxiensis* 1250. Po ověření koncentrace DNA na přístroji Nanodrop 2000c se však prokázalo, že DNA je ve vzorku přítomna čili vzorky jsou vhodné k použití ve druhém amplifikačním kroku PCR reakce. Díky použití velikostního standardu 100 bp DNA Ladder je

možné určit, že velikost výsledného amplikonu oblasti 26S rDNA se pohybuje cca mezi 500 až 600 bp. Negativní kontrola je v pořádku, jelikož se u jejího vzorku žádný band neobjevil, vzorky tedy nejsou kontaminovány.

4.2.4.4 Druhá amplifikace nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA

Ve druhém amplifikačním kroku nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA byl využit univerzální pár primerů NL1-GC/LS2. Amplifikace se ukázala jako úspěšná, jelikož se pomocí elektroforetické kontroly podařilo stanovit přibližnou velikost produktů druhé amplifikace u všech použitých druhů kvasinek. Nebyly také patrné části nespecifických produktů, což vypovídá o optimálně zvolené teplotě annealingu pro tuto oblast.



Obrázek 15: Kontrola pomocí ELFO druhé amplifikace DNA pro primery NL1-GC/LS2: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250, číslo 9–negativní kontrola, číslo 10–standard 100 bp DNA Ladder

Z Obrázku 15 je vidět, že se podařilo zdárně amplifikovat všechny použité vzorky kvasinek. Díky použití velikostního standardu 100 bp DNA Ladder je možné určit, že velikost výsledného amplikonu druhé amplifikace oblasti D1/D2 se pohybuje cca mezi 220 až 250 bp. Negativní

kontrola je v pořádku, jelikož se u jejího vzorku žádný band neobjevil, vzorky tedy nejsou kontaminovány.

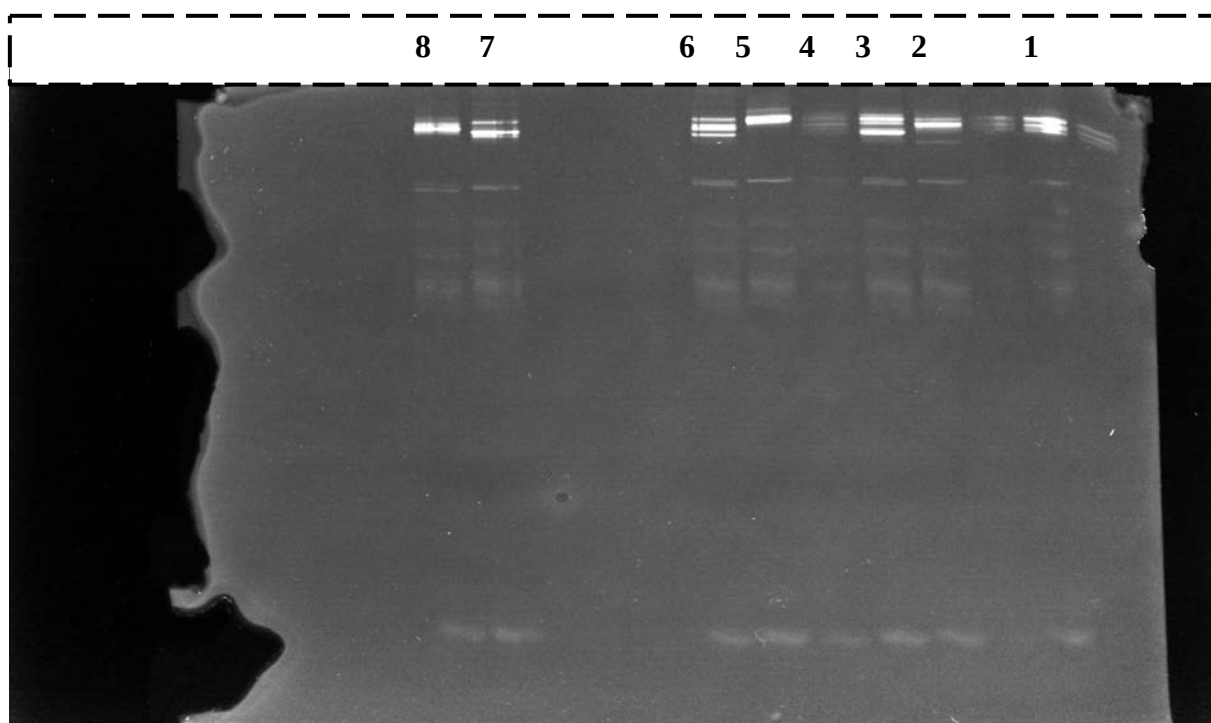
4.3 Optimalizace metody DGGE

Pro detekci produktů z druhého amplifikačního kroku nested PCR byla využita molekulární technika DGGE. Tato metoda je vhodná pro analýzu všech získaných produktů druhé amplifikace, jelikož jejich velikost nepřesahuje limit 500 bp, což je maximální velikost fragmentů, kterou je tato metoda schopná stanovit. Velikost jednotlivých amplikonů byla experimentálně stanovena mezi 150 a 250 bp. Optimální separace analyzovaných fragmentů metodou DGGE je možné dosáhnout optimalizací jednotlivých parametrů, které jsou pro metodu denaturační gradientové gelové elektroforézy klíčové. Mezi tyto parametry patří: rozsah denaturačního gradientu, celkový čas separace či také postup barvení gelu před finální vizualizací. Výrazný podíl na kvalitě provedení experimentu má také samotná amplifikace fragmentů při PCR reakci, jelikož může být velkým zdrojem chyb, které se do experimentu promítnou.

4.3.1 Optimalizace denaturačního gradientu

Dle publikací s aplikací techniky DGGE pro kvasinky byl výchozí denaturační gradient zvolen v rozsahu 30–60 %. Polyakrylamidový gel byl připraven ze zásobního roztoku AA/BIS v poměru 19:1, jelikož se vyznačuje vyšším podílem bis-akrylamidu, který slouží jako síťovací činidlo a je tak dosaženo menší velikosti pórů čili by měly být získané fragmenty lépe rozlišeny.

Byl připraven 8 % polyakrylamidový gel, který odpovídá velikosti produktů druhé amplifikace 200–400 bp.



Obrázek 16: DGGE profil s denaturačním gradientem 30–60 %, 8 % polyakrylamidový gel, 120 V, 3 hodiny, produkty 2. amplifikace oblasti ITS1: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Z přiloženého DGGE profilu na *Obrázku 16* je zřejmé, že zvolený denaturační gradient má příliš široké rozmezí, jelikož se nejvíce viditelné zóny fragmentů zachytily ve vrchní části gelu. Díky tomu, že jsou nejlépe viditelné jsou přisuzovány právě samotným kvasinkám. Každý referenční druh kvasinky je reprezentován několika fragmenty, je možné pozorovat celkově 5 až 6 zón, které jsou společné pro všechny dráhy. Tento jev mohl nastat ze dvou důvodů.

Prvním důvodem může být vzájemná kontaminace zdrojové DNA kvasinek při přípravě reakční směsi pro PCR reakci. Tato teorie je však velmi málo pravděpodobná z důvodu dodržení všech doporučených postupů pro zamezení kontaminace jako je práce ve sterilním očkovacím boxu, který byl předem vysvícen UV zářením, použití sterilních zkumavek a špiček na pipety a také použití samostatných špiček pro každý druh kvasinky.

Druhým důvodem, který je pravděpodobnější je, že teplota annealingu nebyla při PCR reakci zvolena dostatečně specificky a připojení primeru tak neproběhlo dokonale a v reakční směsi se vytvořily nespecifické produkty, které hybridizovaly nejen s cílovou sekvencí templátu, ale

také s podobnými sekvencemi, které se lišily párem nukleotidů. Méně viditelné fragmenty jsou tedy pravděpodobně fragmenty jednovláknové DNA, která migrovala gelem, aniž by se ukotvila v místě gradientu nebo také zbytky primerů, které se nenaamplifikovaly během PCR reakce.

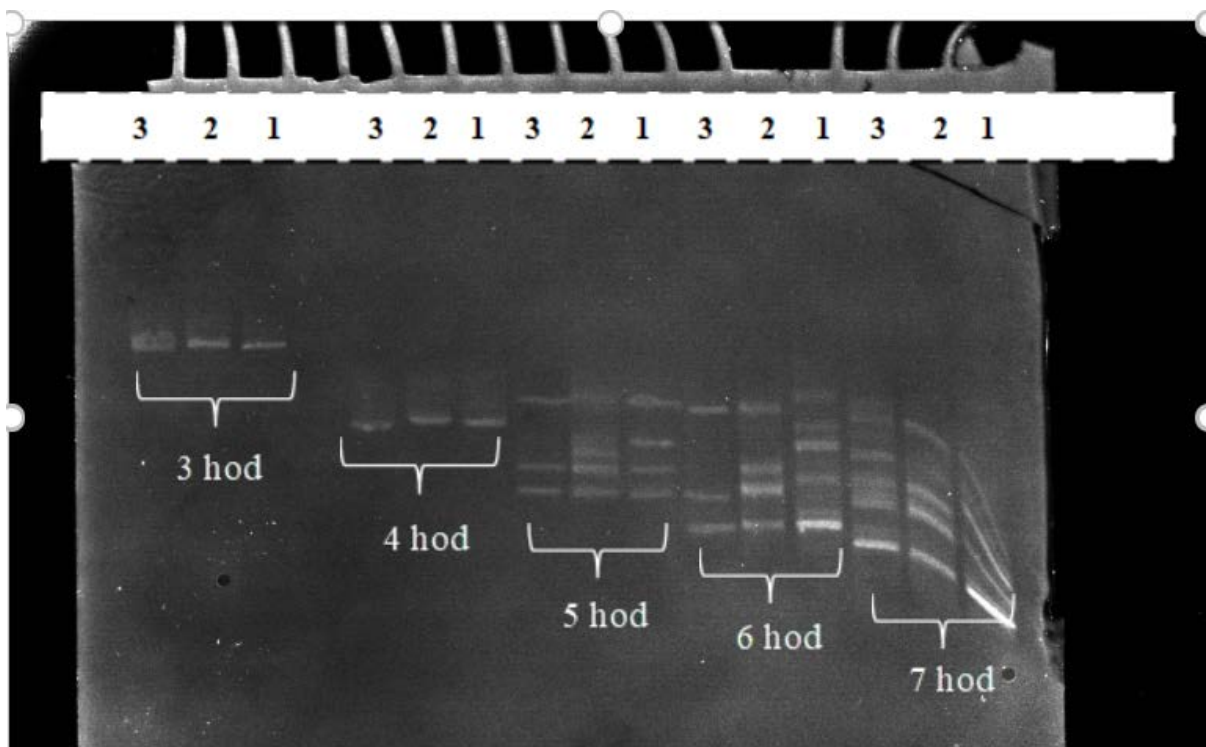
Díky této skutečnosti byl pro další optimalizaci zvolen denaturační gradient 20–40 % a také byl připraven 10 % polyakrylamidový gel namísto 8 %, jelikož lépe odpovídal rozmezí velikosti produktů druhé amplifikace PCR reakce. Toto rozmezí je 100–300 bp, což odpovídá lépe velikosti produktů obou ITS regionů. Nicméně jako optimalizační se experiment zdařil, jelikož se nám podařilo určit správné rozmezí denaturačního gradientu i jaký zvolit gel, optimalizace probíhala s použitím produktů druhé amplifikace regionu ITS1.

4.3.2 Optimalizace délky trvání separace fragmentů

Pro určení optimálního času elektroforetické separace pomocí metody DGGE byl uskutečněn tzv. time-travel experiment. V časových intervalech jedné hodiny byly na DGGE gel nanášeny vzorky v pořadí *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia sinensis* 1244 a jejich směs, která vznikla smícháním alikvotních objemů jejich amplikonů. Vzorky byly připraveny následovně: referenční vzorky 147 a 1244 byly klasicky smíchány 10 µl produktu PCR reakce s 3 µl barvičky PCR loading buffer a naneseny do jamek gelu, směs byla připravena smícháním 5 µl kvasinky 147 a 5 µl kvasinky 1244, k této směsi už byla přidána pouze barvička v objemu 3 µl a následně byl vzorek také napipetován do jamek gelu. Tyto dva druhy kvasinek byly vybrány, protože jsou nejvíce metabolicky odlišné a byla tak největší šance, že se prokáže rozdílná sekvence jejich DNA. Čas separace pro jednotlivé série vzorků se pohyboval v rozmezí 3 až 7 hodin. Optimalizace probíhala s použitím produktů druhé amplifikace regionu ITS1.

Z přiloženého DGGE profilu na *Obrázku 17* je možné vyčíst, že optimalizace gradientů byla úspěšná, jelikož se zóny fragmentů přesunuly z vrchní části gelu a také jsou od sebe lépe odděleny. Time-travel experiment nám rovněž umožnil určit jako optimální čas separace 6 hodin, jelikož při 7 hodinách již nebyly jednotlivé zóny tak ostré a začaly se jemně rozmývat, a naopak při méně hodinách se ještě nestihly správně nebo dostatečně od sebe odseparovat. Stejně jako již bylo popsáno v kapitole 4.3.1. se zde vyskytl jev, kdy každý referenční druh kvasinky je reprezentován několika fragmenty. Je možné pozorovat celkově 4 až 6 zón, které jsou společné pro časy 5–6 hodin, při 3–4 hodinách se tento jev nevyskytl zřejmě z důvodu nízkého času separace, kdy se fragmenty nestihly oddělit. Z důvodu výskytu nespecifických

produktů byl pro další experimenty zvolen před samotnou separací postup přečištění PCR produktů pomocí ethanolu.



Obrázek 17: Time-travel experiment DGGE metody: číslo 1–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 2–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 3–mix těchto dvou druhů kvasinek

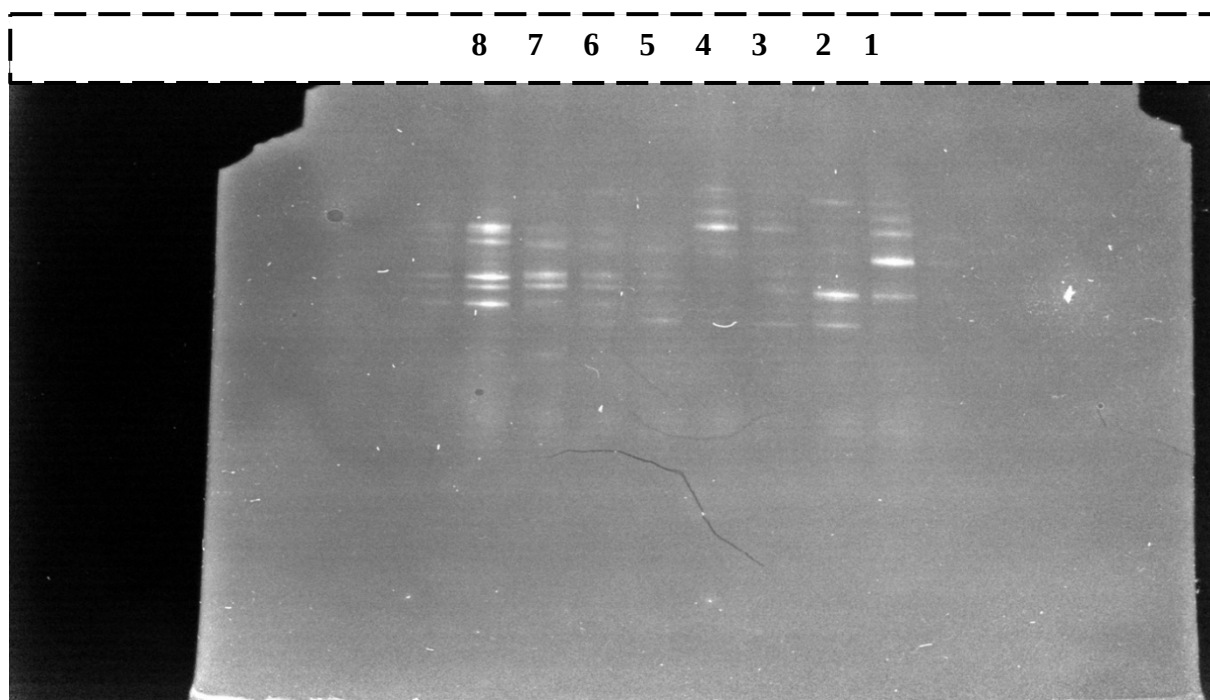
4.3.3 Vlastní analýza referenčních kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia*

Kvasinky rodu *Metschnikowia* byly podrobeny analýze pomocí DGGE metody. Před samotným provedením analýzy jednotlivých oblastí ITS1, 5,8–ITS2 i D1/D2 podjednotek prošla metoda optimalizací, aby tyto finální výzkumy jednotlivých oblastí již probíhaly v optimálně koncentrovaném gelu s optimálním rozhraní gradientů i časovém rozhraní experimentů, jak je uvedeno v kapitolách výše. Abychom byli schopni od sebe odlišit jednotlivé druhy kvasinek bylo třeba provést výzkum oblastí ITS1, 5,8–ITS2 i D1/D2 podjednotek.

4.3.3.1 Fragmenty oblasti ITS1 rDNA

Použitý univerzální pár primerů ITS1-GC/ITS2 spadá do regionu ITS, který se u eukaryot dělí na dva regiony ITS1 a ITS2 a má průměrnou délku 600 bp. Je to krátký úsek sekvence DNA používaný pro určování a objevování druhů, označuje se také jako čárový kód DNA. Primer ITS1-GC se nejčastěji kombinuje s ITS2 pro amplifikaci oblasti ITS1, kterou mají pokrýt.

Oblast ITS1 se nachází mezi geny 18S a 5,8S [76]. Oblast ITS1 je, jak již bylo zmíněno krátkým úsekem v rámci ITS regionu, velikost produktů PCR reakce dosahovala přibližně 150 bp. Již díky své malé velikosti se tato oblast jeví jako nepříliš vhodná k bližší a specifitější charakterizaci jednotlivých druhů kvasinek. Nicméně byly na tyto produkty aplikovány stejné podmínky jako při předchozích experimentech.



Obrázek 18: DGGE profil s denaturačním gradientem 20–40 %, 10 % polyakrylamidový gel, 120 V, 6 hodin, produkty 2. amplifikace oblasti ITS1: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Z přiloženého DGGE profilu na *Obrázku 18* lze určit přítomnost většího množství fragmentů, než je pro DGGE metodu běžné. Bohužel se ani po vícenásobném přečištění veškerých PCR produktů, které byly v této analýze použity nepodařilo prokázat souvislost mezi množstvím fragmentů a produktem obsahujícím zbytky použitých primerů či jejich dimerů. Jako neobvyklá skutečnost se však nejeví jen počet jednotlivých frakcí, ale také jejich vzorec interpretace bandů na gelu, který je odlišný pro každý použitý druh kvasinek, je tedy možné, že jednotlivé druhy v oblasti ITS1 mají na svých sekvencích zastoupené kopie o odlišném zastoupení bází. Sekvence jednotlivých druhů kvasinek se nicméně jeví jako velmi podobné, je možné, že pokud

by se snížil čas trvání experimentu na 3–4 hodiny, tak by se neprojevyly jako jednotlivé frakce, nýbrž jako jeden diskrétní band, což se prokázalo i při time–travel experimentu. Bylo snahou zjistit jaký je důvod rozdělení sekvencí kvasinek v oblasti ITS1 do tolika frakcí, vysvětlení bylo nalezeno po důkladném prostudování dostupné literatury.

Z dostupných publikací dle Lachance M. et al, Naumov G. et al či Boekhout T. et al je možné odvodit, že oblast ITS1 zřejmě není vhodná k odlišení jednotlivých druhů kvasinek rodu *Metschnikowia*. Oblast ITS1 se ukázala vhodná spíše k prvotnímu odlišení mezi skupinami kvasinek, tedy k rodové a druhové identifikaci. Je tomu tak díky velikosti sekvencí, která se může lišit v závislosti na druhu a rodu mikroorganismu čili u stejného rodu zůstává většinou totožná a také díky vyšší míře divergence, kdy se můžou vyskytovat ve vícero divergentních kopiích, nemusí tak být dostatečná k odlišení blízce příbuzných druhů, což v našem případě použité kvasinky jsou. Oblast je sice díky velkému počtu kopií na genom snadno amplifikovatelná, což je výhoda, ale v našem případě se nekódující ITS1 oblast kvůli tomu, že může poskytnout identifikaci pouze na úrovni rodů a druhů ukázala jako nevhodná [77, 78, 79].

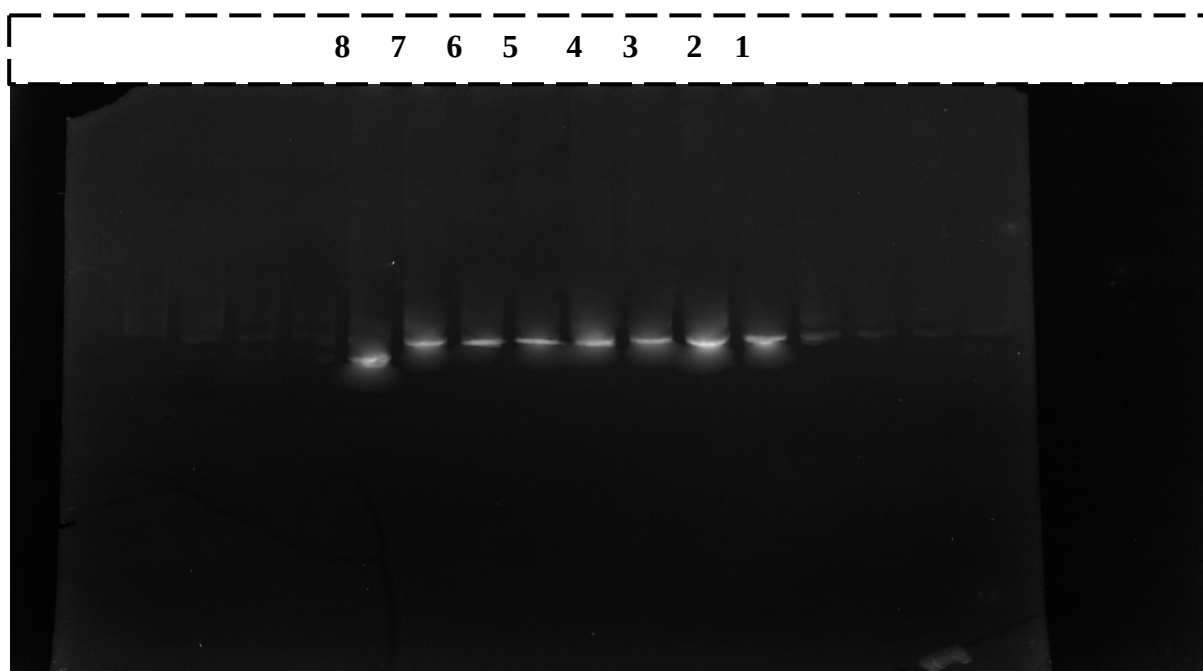
Vysvětlení, které uvádí dostupná literatura lze považovat za příčinu, zejména pokud se jedná o divergenci v rámci oblasti ITS1 pro stejný taxonomický druh. Již v amplifikační části bylo patrné při vizualizaci produktů amplifikace dané oblasti, že se na gelu vyskytují také další frakce, které však byly považovány za nespecifické produkty, které lze odstranit přečištěním pomocí ethanolu, které je schopné oddělit od PCR produktu zbytky primerů i další nečistoty.

4.3.3.2 Fragmenty oblasti 5,8–ITS2 rDNA

Primer ITS3 se nejčastěji kombinuje s ITS4 pro amplifikaci oblasti ITS2 operonu fungální rRNA. Oblast ITS2 se nachází mezi geny 5,8S a 28S rRNA. Tyto páry primerů byly v posledních dvaceti letech použity v mnoha odvětvích mykologického výzkumu a jsou také oblíbenými nástroji v nedávných studiích houbových komunit [80].

Oblast 5,8–ITS2 je delším úsekem rDNA než výše popsaná oblast ITS1, produkty její amplifikace PCR reakce dosahovaly velikosti 200–250 bp, díky tomu se jeví využití této metody jako vhodné pro specifitější charakterizaci sekvencí jednotlivých druhů kvasinek pro

danou oblast. Na produkty byly aplikovány stejné podmínky jako při předchozích experimentech.

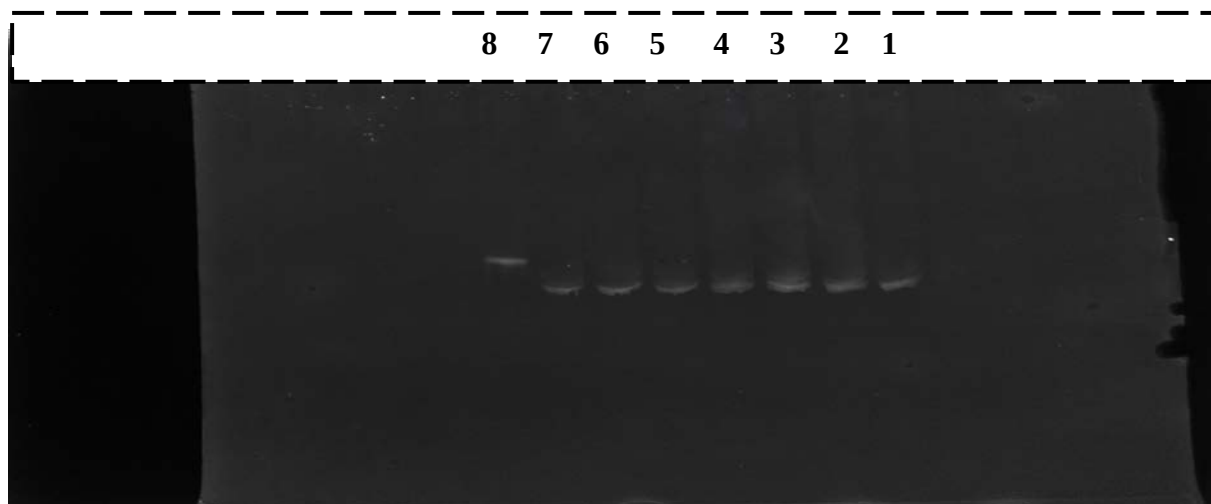


Obrázek 19: DGGE profil s denaturačním gradientem 20–40 %, 10 % polyakrylamidový gel, 120 V, 6 hodin, produkty 2. amplifikace oblasti 5,8–ITS2: číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Z výsledků DGGE analýzy na Obrázku 19 je patrné, že při použití rozmezí denaturačního gradientu 20–40 % lze od sebe jednotlivé druhy kvasinek odlišit jen těžce. Kvasinky jsou navzájem v rámci sekvencí svých DNA velice příbuzné nebo mají mezi sebou v oblasti 5,8–ITS2 minimální odlišnosti. K tomu, aby se rozdíly ještě více zviditelnily by bylo třeba zřejmě ještě užšího rozmezí denaturačního gradientu, který by mohl být zúžen ještě na 25–35 %. Ve srovnání s oblastí ITS1 nejsou však v tomto případě přítomné žádné mnohonásobné frakce bandů, což značí že pro charakterizaci jednotlivých druhů kvasinek je DGGE analýza této oblasti přesnější a spolehlivější. Co však můžeme z výsledků určit je, že kvasinka *Metschnikowia shanxiensis* 1250 má jasně rozdílnou sekvenci sledovaného úseku DNA a jako jediná se tedy i při rozmezí gradientu 20–40 % projevila jako druhově odlišná v oblasti 5,8–ITS2 od ostatních kvasinek rodu *Metschnikowia* použitých při tomto experimentu.

4.3.3.3 Fragmenty D1/D2 oblasti 26S rDNA

Univerzální pár primerů NL1-GC/LS2 spadá do regionu D1/D2, což je oblast o 600 nukleotidech na 5' konci velké podjednotky 26S rDNA. Studie Kurtzmanna a Robnetta ukázala, že většinu druhů kvasinek lze identifikovat na základě jejich sekvenční divergence právě na základě D1/D2 oblasti. Pro úplnou charakterizaci kvasinek metodou DGGE je třeba D1/D2 oblast doplnit také oblastmi ITS1 a ITS2, jelikož oblast D1/D2 se používá spíše pro identifikaci kvasinek na taxonomické a fylogenetické úrovni. Může se stát, že u jednoho z těchto regionů nebudou mezi jednotlivými druhy mikroorganismů odlišnosti. Je třeba je hodnotit jako celek, abychom byly schopni mikroorganismy, v našem případě kvasinky druhově rozlišit [81]. V předložené práci byla provedena DGGE analýza uvedené oblasti, produkty její amplifikace PCR reakce dosahovaly velikosti 220–250 bp, což je podobná velikost jako u oblasti 5,8–ITS2, což může i v rámci oblasti 26S rDNA značit specifitější charakterizaci sekvencí jednotlivých druhů kvasinek pomocí DGGE. Na produkty byly aplikovány stejné podmínky jako při předchozích experimentech.



Obrázek 20: DGGE profil s denaturačním gradientem 20–40 %, 10 % polyakrylamidový gel, 120 V, 6 hodin, produkty 2. amplifikace D1/D2 oblasti 26S rDNA : číslo 1–*Metschnikowia andauensis* 129, číslo 2–*Metschnikowia pulcherrima* 145, číslo 3–*Metschnikowia pulcherrima* 147, číslo 4–*Metschnikowia pulcherrima* 149, číslo 5–*Metschnikowia andauensis* 1241, číslo 6–*Metschnikowia sinensis* 1244, číslo 7–*Metschnikowia zizyphicola* 1247, číslo 8–*Metschnikowia shanxiensis* 1250

Dle Obrázku 20 je z výsledků DGGE analýzy patrné, že kvasinky v rámci svých sekvencí DNA nevykazují dostatečnou sekvenční divergenci, aby je bylo možné pomocí DGGE mezidruhově rozlišit. K tomu, aby se rozdíly ještě více zviditelnily by bylo třeba zřejmě ještě užšího rozmezí

denaturačního gradientu, které by mohlo být zúženo na 25–35 %. Co však můžeme z výsledků určit je, že kvasinka *Metschnikowia shanxiensis* 1250 má jasně rozdílnou sekvenci sledovaného úseku DNA a jako jediná se tedy i při rozmezí gradientu 20–40 % projevila jako druhově odlišná od ostatních kvasinek rodu *Metschnikowia* použitých při tomto experimentu. Ovšem dle přiložených výsledků můžeme poměrně jasně učit, že použité kvasinky jsou v rámci D1/D2 domény druhově velice příbuzné, což se projevuje na jejich sekvencích, které jsou jen minimálně odlišné.

Vzhledem k minimální druhové odlišnosti kvasinek, která se projevila u zkoumání pomocí DGGE metody by bylo vhodné kvasinky podrobit dále také metodě sekvenování, kde by se daly jednotlivé druhy kvasinek porovnat na úrovni primární struktury DNA mezi sebou a se sekvencemi stejných nebo podobných druhů kvasinek rodu *Metschnikowia* uvedených v databázi pro bližší identifikaci. Tato metoda by nám mohla přinést přesnější výsledky o jejich sekvenční divergenci a mohli bychom tak jednotlivé druhy mezi sebou lépe odlišit.

Také by se jako další metoda mohlo použít AFLP-PCR neboli amplified fragment length polymorphism PCR. Je to metoda založená na PCR, která využívá restrikční enzymy ke štěpení genomové DNA s následnou ligací adaptérů na konce restrikčních fragmentů. Následně se vybere podskupina restrikčních fragmentů, které budou amplifikovány. Aby bylo dosaženo optimální selekce musí být vybrány primery komplementární k sekvenci adaptéru, sekvenci restrikčního místa a také k nukleotidům uvnitř fragmentů restrikčního místa. Amplifikované fragmenty jsou podrobeny elektroforetické separaci na gelové matrici a následně vizualizovány pomocí fluorescenčních metodologií (např. fluorescenčně značená sonda) nebo pomocí automatizovaných kapilárních sekvenačních přístrojů. AFLP-PCR je vysoce citlivá a reprodukovatelná metoda, která se využívá pro identifikaci genetických variací u kmenů nebo velice blízce příbuzných druhů. Oproti jiným metodám uvedených v kapitole 1.4.1.4 má vyšší reprodukovatelnost, rozlišení a citlivost na úrovni celého genomu. Výsledkem této analýzy je dendrogram [82, 83]. Například D. Spadaro použili ve své studii techniku AFLP při hodnocení genetické diverzity kmenů *M. pulcherrima* z různých izolačních zdrojů a také k posouzení genetické diverzity skupiny antagonistických kmenů *M. pulcherrima*, které jsou účinné proti různým posklizňovým patogenům ovoce [84].

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací kvasinek rodu *Metschnikowia* pomocí molekulárních metod. Mezi použité molekulární metody patří nested PCR, horizontální gelová elektroforéza, denaturační gradientová gelová elektroforéza a pulzní gelová elektroforéza. Těmito technikami byly analyzovány kmeny kvasinek rodu *Metschnikowia*: *Metschnikowia andauensis* 129, *Metschnikowia pulcherrima* 145, *Metschnikowia pulcherrima* 147, *Metschnikowia pulcherrima* 149, *Metschnikowia chrysoperlae* 1158, *Metschnikowia andauensis* 1241, *Metschnikowia sinensis* 1244, *Metschnikowia zizyphicola* 1247 a *Metschnikowia shanxiensis* 1250.

K určení karyotypu kvasinek rodu *Metschnikowia* pomocí metody PFGE bylo třeba nejdříve optimalizovat postup izolace kvasinkové DNA, pro separaci jednotlivých chromozomů bylo třeba také optimalizovat parametry pro spuštění PFGE jako pulzní časy, doba separace, vložené napětí, koncentrace agarosového gelu či koncentrace použitého TBE pufru. Ideální podmínky separace, při nichž byly výsledky nejlepší a podařilo se izolovat největší počet chromozomů byly: doba separace 118 hodin, pulzní časy 2400 s/48 h, 3000 s/35 h, 3300 s/35 h; 0,8 % agarosový gel ve 0,5x TBE pufru, vložené napětí 50 V. Při těchto podmínkách bylo separováno 4–5 chromozomálních frakcí u všech použitých kmenů. Z výsledků separace je patrné, že se od ostatních druhů nejvíce lišily druhy *Metschnikowia pulcherrima* 149 a *Metschnikowia sinensis* 1244, u nichž byl náznak i páté chromozomální frakce, zatímco u ostatních byly pouze čtyři. Velikost jednotlivých frakcí byla dle standardu *H. wingei* od nejmenší 1,2 Mbp, 2,70 Mbp, třetí cca 3 Mbp a obě největší frakce, tedy čtvrtá a pátá přesahovaly maximální velikost použitého standardu čili jsou větší než 3,13 Mbp. Pro lepší rozdělení a analýzu karyotypů všech kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia* by měla být v příštích experimentech prodloužena doba separace, jelikož by se mohlo podařit izolovat další velké chromozomy a navýšit tak počet dosud izolovaných chromozomů kvasinek rodu *Metschnikowia*.

Spojení metod PCR a denaturační gradientové gelové elektroforézy bylo využito k analýze konzervovaných úseků rDNA, kterými byly regiony ITS1 a 5,8–ITS2 a také D1/D2 oblast velké ribozomální podjednotky 26S. Pro analýzu úseků rDNA byla nejdříve provedena optimalizace jednotlivých kroků nested PCR, zejména pak teplot annealingu, které musely být zvoleny tak, aby proběhla správná amplifikace dané oblasti za použití univerzálních eukaryotických primerů a zároveň, aby se nevytvářely nespecifické produkty amplifikace. Dále bylo třeba optimalizovat metodu DGGE pro rozlišení jednotlivých oblastí v denaturačním gradientu. Jako optimální

denaturační rozmezí bylo experimentálně stanoveno 20–40 % denaturační činidel a optimální doba separace při napětí 120 V na 6 hodin pro všechny analyzované oblasti rDNA.

Z výsledků DGGE vyplývá, že oblast ITS1 rDNA vykazovala vysokou míru divergence a bylo možné pozorovat fragmenty ve vícero divergentních kopiích, ITS1 oblast představuje velice variabilní úsek ribosomálního operonu, což bylo v práci doloženo publikacemi, kde byly tyto skutečnosti objasněny. Dle nejnovější studie M. Sipiczského, která se zabývá stejným tématem bylo zjištěno, že sekvence kvasinek rodu *Metschnikowia*, které byly podrobeny molekulárnímu fylogenetickému, genetickému a genomickému výzkumu, konkrétně se jednalo o skupinu označovanou jako klad *pulcherrima*, byly různé v segmentech ITS1, ale téměř identické v segmentech ITS2. Segmenty ITS1 byly prakticky nečitelné a plné nejednoznačných pozic vysokého počtu nukleotidů, v těchto sekvencích byly detekovány jednonukleotidové indely, které svým posunem během procesu sekvenování vedly k hromadným nejasnostem v konečných amplikonových sekvencích. Na základě těchto výsledků bylo stanoveno, že jednotlivé druhy od sebe nelze odlišit podle kritérií žádného z fenotypových ani fylogenetických konceptů biologických druhů [85]. Tato publikace tedy potvrzuje výsledky výzkumu oblasti ITS1 analyzované pomocí metody DGGE, které jsou součástí předložené práce. Pro ostatní analyzované oblasti 5,8–ITS2 a také D1/D2 oblast velké ribozomální podjednotky 26S vyplývá, že všechny analyzované kmeny kvasinek mají velmi podobnou sekvenci těchto oblastí. Výjimku tvoří pouze druh *Metschnikowia shanxiensis* 1250, který jediný vykazoval odlišnost od ostatních druhů kvasinek v oblasti 5,8–ITS2 i D1/D2 podjednotky oblasti 26S rDNA.

I když v předložené práci nebylo dosaženo úplně úspěšné charakterizace jednotlivých druhů a popsání jejich odlišností, jelikož se pomocí dostupných metod ukázalo, že všechny použité druhy kvasinek mají skutečně velmi podobný genom, pomocí jednotlivých optimalizací docházelo k postupnému zlepšení separací u všech použitých molekulárních metod. Práce tak představuje slibný základ pro navazující experimenty, ve kterých by bylo vhodné se zaměřit na delší dobu separace u PFGE a na lepší optimalizaci teploty annealingu pro ITS1 region u PCR-DGGE. Také by bylo vhodné výsledky dosažené v předložené práci doplnit o metodu sekvenování, která by byla schopná lépe popsat rozdíly sekvencí mezi jednotlivými druhy kvasinek, popřípadě se zaměřit i na jiné molekulární metody jako AFLP-PCR, která je díky své citlivosti a specifičnosti schopná identifikovat genetické variace i mezi velmi příbuznými druhy mikroorganismů.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid/N,N-methylen-bis-akrylamid
APS	persíran amonný
bp	páry bází (<i>anglicky</i> base pairs)
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
YPD	(<i>anglicky</i> yeast-extract-peptone-dextrose medium)
rDNA	ribozomální DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
ssDNA	jednovláknová deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytidintrifosfát
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
dTTP	deoxythymidintrifosfát
G-C	guanin-cytosinová vazba
A-T	adenin-thyminová vazba
RAPD	(<i>anglicky</i> random amplification of polymorphic DNA)
AFLP	(<i>anglicky</i> amplified fragment length polymorphism)
PCR-RFLP	(<i>anglicky</i> PCR-restriction fragment length polymorphism)
TEMED	N,N'-tetramethyldiamin
Mbp	mega páry bází (<i>anglicky</i> mega base pairs)
EDTA	polyaminokarboxylová kyselina
TAE	tris-acetátový pufr
UV	ultrafialové záření
EtBr	ethidium bromid

LITERATURA

- [1] Kalhotka, L. Mikromycety – vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky – v prostředí člověka. Mendelova univerzita v Brně, 2014. 78 s. ISBN 978-80-7375-943-8.
- [2] Kocková-Kratochvílová, A. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. 1.vyd. Bratislava: ALFA. 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6
- [3] Kocková-Kratochvílová, A. Kvasinky.1.vyd. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatury. 1957. 344 s.
- [4] Šašek, V. and G.E.Becker. 1969. Effect of different nitrogen sources on the cellular form of *Trigonopsis variabilis*. Journal of Bacteriology. 99.891-892.
- [5] Kocková-Kratochvílová, A. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. 1.vyd. Bratislava: ALFA. 1982. 488 s.
- [6] Šipický, M., Šubík, J. Genetika kvasiniek. 1. vyd. Bratislava: VEDA. 1992. 312 s. ISBN 80-224-0396-2
- [7] Veselá M.: Praktikum z obecné mikrobiologie, Brno: FCH VUT, 2004. 3. vyd. 99 s. ISBN 80-214-2567-9. a 15 B-8 Janderová
- [8] Florentina M., Brinduse E., Nicoale G., Tudorache A., Teodorescu R.: Yeast biodiversity evolution over decades in Dealu Mare-Valea Calugareasca vineyard. Romanian Biotechnological Letters, 2011, Vol. 16, No. 1, pp. 113-120.
- [9] Janderová, Blanka. Úvod do biologie kvasinek. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-990-1. Skripta. Univerzita Karlova.
- [10] Jovelín, Richard a Patrick C Phillips, 2009. Evolutionary rates and centrality in the yeast gene regulatory network. Genome Biology. 10(4). DOI: 10.1186/gb-2009-10-4-r35. ISSN 1465-6906. Dostupné také z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2009-10-4-r35>
- [11] Walker, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. Ilustrované vydání, dotisk. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. ISBN 0471964476
- [12] Kurtzman, Cletus P., Jack W Fell, and Teun Boekhout. The Yeasts: a Taxonomic Study. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. ISBN 978-0-444-52149-1.
- [13] Yaman, M. a R. Radek. Identification, distribution and occurrence of the ascomycete *Metschnikowia typographi* in the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans*. Folia Microbiologica [online]. 2008, 53(5), 427-432. DOI: 10.1007/s12223-008-0065-3. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-008-0065-3>

- [14] Mendonca-Hagler, L. C., A. N. Hagler a C. P. Kurtzman. Phylogeny of *Metschnikowia* Species Estimated from Partial rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1993, 43(2), 368-373. DOI: 10.1099/00207713-43-2-368. ISSN 0020-7713. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-43-2-368>
- [15] Oro, L., M. Ciani a F. Comitini. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, 116(5), 1209-1217. DOI: 10.1111/jam.12446. ISSN 13645072. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12446>
- [16] Pawlikowska, Ewelina a Dorota Kregiel. Enzymatic profiles and antimicrobial activity of the yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Acta Innovations*. 2017, 17(23), 17-24. ISSN 2300-5599.
- [17] Kluyver, A. J., van der Walt, J. P., & van Triet, A. J. Pulcherrimin, The Pigment of *Candida Pulcherrima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1953, 39(7), 583-93. <https://researchportal.bath.ac.uk/en/publications/fd0daae9-b2bd-48d7-bb84-61d17564d3b9>
- [18] Feng, Xinxin, Yumei HU, Yingying Zheng, et al. Structural and Functional Analysis of *Bacillus subtilis* YisP Reveals a Role of Its Product in Biofilm Production. *Chemistry & Biology* [online]. 2014, 21(11), 1557-1563 [cit. 2019-01-09]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.08.018. ISSN 10745521. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552114003226>
- [19] Němcová, Andrea, Martin Szotkowski, Ota Samek, Linda Cagánová, Matthias Sipiczki a Ivana Márová, 2021. Use of Waste Substrates for the Lipid Production by Yeasts of the Genus *Metschnikowia*—Screening Study. *Microorganisms*. 9(11). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9112295
- [20] Sung-Qui S., Gibson M.C., Blackwell M. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2004, 54(5), 1883-1890. DOI 10.1099/ijls.0.63152-0 Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8325989_Metschnikowia_chrysoperlae_sp_nov_Candida_picachoensis_sp_nov_and_Candida_pimensis_sp_nov_isolated_from_the_green_lacewings_Chrysoperla_comanche_and_Chrysoperla_carnea_Neuroptera_Chrysopidae

- [21] Molnár, Orsolya a Hansjörg Prillinger. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology [online]. 2005, 28(8), 717-726 [cit. 2019-01-11]. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.05.009. ISSN 07232020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202005000950>
- [22] Manso, T. a C. Nunes, *Metschnikowia Andaunensis*: A novel biocontrol agent of fruit postharvest diseases. Acta Horticulturae [online]. 2011, (905), 261-268 [cit. 2019-01-11]. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.905.28. ISSN 0567-7572. Dostupné z: https://www.actahort.org/books/905/905_28.htm
- [23] Xue M., Zhang L., Wang Q., Zhang J., *Metschnikowia sinensis* sp. Nov., *Metschnikowia zizyphicola* sp. Nov. And *Metschnikowia shanxiensis* sp. Nov., novel yeast species from jujube fruit. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [online]. 2006, 56(9), 2245-2250. DOI: 10.1099/ijms.0.64391-0 Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/6833382_Metschnikowia_sinensis_sp_nov_Metschnikowia_zizyphicola_sp_nov_and_Metschnikowia_shanxiensis_sp_nov_novel_yeast_species_from_jujube_fruit
- [24] Bednář, Marek, 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- [25] Spencer, J. F. T., and D. M. Spencer. 1997. Yeasts in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- [26] Esteve-Zarzoso, B.; Bellech, C.; Uruburu, F.; Querol, A.: *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999, vol. 49, pp. 329-337.
- [27] Mueller, Gregory M., Gerald F. Bills A Mercedes S. Foster, c2004. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Boston: Elsevier. ISBN 978-012-5095-518.
- [28] Daniel, H, Tuija Sarlin, Mari Raulio, Annika Wilhelmson, Erja Kotavita, Timo Huttunen a Riikka Juvonen, 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. International Journal of Food Microbiology. 86(1-2), 61-78. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00248-4. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503002484>
- [29] Mullis, Kary B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American. 262(4), 56-65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56. ISSN

0036-8733.Dostupné:

<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/scientificamerican0490-56>

- [30] Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J.: *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*, Karolinum, 1998, ISBN 80-8174-504-3.
- [31] Bown.T.A.: *Klonování genů a analýza DNA*, Univerzita Palackého, Olomouc 2007, ISBN 978-80-244-1719-6.
- [32] Králová, B.: *Bioanalytické metody*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2001, ISBN 80-7080-449-1.
- [33] Walker, J. M., Rapley, R.: *Molecular Biology and Biotechnology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2006, ISBN 0-85404-606-2.
- [34] Steffen, C.: *PCR Applications Manual*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 1999.
- [35] Bej, M., Atlas, R.: *Aplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications*. Biochemistry and Molecular Biology, 1991.
- [36] Ruml, T.; Rumlová, M.; Pačes, V.: *Genové inženýrství*, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2002, ISBN 80-7080-499-8.
- [37] Bartlett, J. M. S.; Stirling, D.: *PCR Protocols*. Humana Press, 2003, ISBN 0-89603-627-8.
- [38] Sambrook, J., Russel, D. W.: *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, New York 2001, ISBN 978-087-9695-774.
- [39] Chen, B. Y., Janes, H. W.: *PCR Cloning Protocols*. 2th ed. Totowa: Humana Press, 2002. 439 p. ISBN 0-89603-969-2.
- [40] Raclavský, V.: *Úvod do základních metod molekulární genetiky*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 1998, ISBN 80-7067-892-5.
- [41] Alcoba, J.: *Yeast molecular identification and typik*, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 2007.
- [42] Kocherginskaya, Svetlana A., Isaac K.O. Cann a Roderick I. Mackie: *Denaturing gradient gel electrophoresis. Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 119 [cit. 2017-05-19]. DOI: 10.1007/1-4020-3791-0_9. ISBN 1402037902. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-3791-0_9
- [43] Šmarda, Jan, et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova universita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1

- [44] Prakitchaiwattana J., Fleet G. H., Heard G. M.: Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 2004, Vol. 4, Issue 8, pp. 865-877
- [45] Univerzita Palackého Olomouc, Přírodovědecká fakulta. *Vybrané molekulární metody v mikrobiální ekologii vod* [online]. [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: <http://ekologie.upol.cz/ku/miev/mikekovod.htm>.
- [46] Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, Vol. 73, pp. 127-141.
- [47] Ercolini D.: PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, Vol. 56, Issue 3, pp. 297-314.
- [48] Manuál k DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad Laboratories, Inc.
- [49] Sigler W. V., Miniaci C., Zeyer J.: Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, Vol. 57, Issue 1, pp. 17-22.
- [50] Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A.: Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, Vol. 75, pp. 149-164.
- [51] Birren, Bruce W. a Eric Hon Cheong LAI. Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. San Diego: Academic Press, c1993. ISBN 01-210-1290-5.
- [52] Neoh, Hui-min, Xin-Ee Tan, Hassriana Fazilla Sapri a Toh Leong Tan, 2019. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*. **74**. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
- [53] Burmeister, Margit a Levy Ulanovsky. c1992. Pulsed-field gel electrophoresis. Totowa, N.J.: Humana Press, xiii, 481 p. ISBN 08-960-3229-9.
- [54] Melo, G. B., et al. Pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal bacterial DNA in the investigation of infectious endophthalmitis. *The British Journal of Ophthalmology*. 2006, 90, s. 916-929
- [55] Doi, Matsuko, et al. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *Journal of General Microbiology*. 1992, 138, s. 2243-2251
- [56] Herschleb, Jill; Ananiev, Gene; Schwartz, David C. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols*. 2007, vol. 2, no. 3, s. 677-684
- [57] Gene Navigator™ System, User manual, Amersham Biosciences, Sweden, 1997

- [58] Alaidan, Alwaleed, et al. Rapid PFGE method for fingerprinting of *Serratia marcescens* isolates. *Journal of Microbiological Methods*. 2009, 78, s. 238-241
- [59] Basim, Esin; Basim, Huseyin. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish Journal of Biology* 2001, 25, s. 405-418
- [60] Brody, Jonathan R. a Scott E. Kern. 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 83 [online]. Roč. 33, č. 1, s. 1-13 [cit. 2013-04-22]. DOI 10.1016/j.ab.2004.05.054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704004932>
- [61] Xiao, Edited by Wei. 2010. Yeast protocols. 2nd rev. ed. Totowa, NJ: Humana Press. ISBN 978-161-7375-699.
- [62] Pai, Chen-Chun, Carol Walker, Timothy C. Humphry Ji-Shu Zhang a Feng-Yan Bal. Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Analyze *Schizosaccharomyces pombe* Chromosomes and Chromosomal Elements: *Chrysopidae*). Cold Spring Harbor Protocols. 2018, 2018(4), 2245-2250. DOI: 10.1101/pdb.prot092023. ISSN 1940-3402. Dostupné také z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.prot092023>
- [63] Casey, Gregory P., Wei Xiao, G. H. Rank, Ji-Shu Zhang a Feng-Yan Bal. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study of chromosome XII and the. Electrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces*: *Chrysopidae*). *Journal of the Institute of Brewing*. 1988, 94(4), 239-243. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1988.tb04579.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1988.tb04579.x>
- [64] Boultonwood, Jacqueline, 1997. Gene Isolation and Mapping Protocols. New Jersey: Humana Press. ISBN 0-89-603-482-8.
- [65] Cocolin L., Bisson L. F., Mills D. A.: Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, Vol. 189, Issue 1, pp. 81-87.
- [66] Mills D. A., Johannsen E. A., Cocolin L.: Yeast diversity and persistence in Botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, Vol. 68, No. 10, pp. 4884-4893.
- [67] Vicente, Javier, Javier Ruiz, Ignacio Belda, Iván Benito-Vázquez, Domingo Marquina, Fernando Calderón, Antonio Santos a Santiago Benito, 2020. The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms*. 8(7). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms8071038
- [68] Piombo, Edoardo, Noa Sela, Michael Wisniewski, et al., 2018. Genome Sequence, Assembly and Characterization of Two *Metschnikowia fructicola* Strains Used as

- Biocontrol Agents of Postharvest Diseases. *Frontiers in Microbiology*. **9**(7). ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.00593
- [69] Venkatesh, Anjan, Anthony L. Murray, Adrian B. Boyle, et al., 2018. Draft Genome Sequence of a Highly Heterozygous Yeast Strain from the *Metschnikowia pulcherrima* Subclade, UCD127. *Genome Announcements*. **6**(25), e00550-18. ISSN 2169-8287. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00550-18
- [70] Hirao, Akira S., Ryosuke Imai, Rikiya Endoh, Moriya Ohkuma, Yousuke Degawa a Jason E. Stajich, 2019. Draft Genome Sequence of Novel *Metschnikowia* sp. Strain JCM 33374, a Nectar Yeast Isolated from a Bumblebee. *Microbiology Resource Announcements*. **8**(37), e00704-19. ISSN 2576-098X. Dostupné z: doi:10.1128/MRA.00704-19
- [71] Ganai, Martin W., et al. Pulsed field gel electrophoresis and physical mapping of large DNA fragments in the Tm-2a region of chromosome 9 in tomato. *Molecular and General Genetics*. 1989, Vol. 215, No. 3, s. 395-400
- [72] Innis, Michael A. c1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, xviii, 482 p. ISBN 01-237-2181-4.
- [73] Gel Electrophoresis – Advanced techniques, 2012. 1. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia: InTech. ISBN 978-953-51-0457-5. Dostupné z: www.intechopen.com
- [74] Schneiderwindová, Nicole. Studium genomu kvasinek rodu *Metschnikowia* pomocí molekulárních metod. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123943>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Andrea Němcová.
- [75] Mathew, Mathew K., Cassandra L. Smith a Charles R. Cantor, 2002. High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 2. Effect of pulse time and electric field strength and implications for models of the separation process. *Biochemistry*. **27**(26), 9210-9216. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00426a020
- [76] Wang, Xin-Cun, Chang LIU, Liang Huang, Johan Bengtsson-Palme, Haimei Chen, Jian-Hui Zhang, Dayong Cai a Jian-Qin LI, 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Molecular Ecology Resources*. **15**(3), 573-586. ISSN 1755098X. Dostupné z: doi:10.1111/1755-0998.12325
- [77] Lachance M., Daniel H., Meyer W., Prasad G., Gautam S. a Boundymills K., 2003. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species is unusually

- polymorphic. *FEMS Yeast Research*. **4**(3), 253-258. ISSN 15671356. Dostupné z: doi:10.1016/S1567-1356(03)00113-2
- [78] Naumov, G I, S A James, E S Naumova, E J Louis a I N Roberts, 2000. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**(5), 1931-1942. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-50-5-1931
- [79] Boekhout, Teun a Vincent Robert, 2003. *Yeasts in Food*. Sawson, UK: Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-706-8.
- [80] Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., Colpaert, J. V., Neilan, B., & Li, J. -Q. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *PLoS ONE*, 9(6), 573-586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097629>
- [81] Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 331–371 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- [82] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- [83] Mueller, U. G., Wolfenbarger, L. L. R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 14(10), 389-394. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01659-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01659-6)
- [84] Spadaro, D., Sabetta, W., Acquadro, A., Portis, E., Garibaldi, A., Gullino, M. L., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (2008). Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control: a new technique for DNA fingerprinting. *Microbiological Research*, 163(5), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.01.004>
- [85] Sipiczki, Matthias, 2022. Taxonomic Revision of the *pulcherrima* Clade of *Metschnikowia* (Fungi): Merger of Species. *Taxonomy*. **2**(1), 107-123. ISSN 2673-6500. Dostupné z: doi:10.3390/taxonomy2010009