



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SLEDOVÁNÍ VLIVU STRESOVÝCH FAKTORŮ NA KVASINKY RODU METSCHNIKOWIA POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH TECHNIK

MONITORING THE INFLUENCE OF STRESS FACTORS ON YEASTS OF THE GENUS METSCHNIKOWIA
USING MOLECULAR TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Kuljovská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1708/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Tereza Kuljovská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Sledování vlivu stresových faktorů na kvasinky rodu *Metschnikowia* pomocí molekulárních technik

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Rešerše na dané téma – využití molekulárně biologických metod k charakterizaci kvasinek, možnosti provedení PFGE a DGGE metod.
- 2) Využití vybraných kvasinkových kmenů rodu *Metschnikowia* kultivovaných za přítomnosti různých stresových faktorů.
- 3) Optimalizace izolace a analýzy DNA.
- 4) Sledování vlivu stresových faktorů na integritu kvasinkového genomu.

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. Tereza Kuljovská
studentka

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Molekulární techniky jsou v současné době široce používanými zejména při identifikaci různých druhů mikroorganismů a poskytují spolehlivé a přesné výsledky v poměrně krátkém časovém intervalu.

Tato práce se zabývá charakterizací kvasinek rodu *Metschnikowia* vystavených různým stresovým faktorům a sledováním jejich genomové DNA metodami PCR-DGGE a PFGE. Práce byla soustředěna na analýzu ribosomální rDNA, konkrétně úseky ITS1 a 5,8-ITS2 a genů kódujících D1/D2 domény, jež jsou součástí velké ribosomální podjednotky 26S rDNA, které se běžně užívají při charakterizaci fungálních eukaryotických společenstev.

Pro experimenty byly vybrány tři druhy stresových faktorů: osmotický stres (prostředí s obsahem NaCl), oxidační stres (přídavek H₂O₂ do kultivačního média) a nutriční stres (přídavek konopné mouky/listů a květů jako zdroj uhlíku). Analýza byla provedena pro kmeny *Metschnikowia andauensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *M. chrysoperlae*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis* a *M. zizyphicola*.

Výsledky prokázali, že ani přidávkem výše zmíněných látek o vyšších koncentracích do produkčních médií nedochází k narušení ribosomální DNA při detekci metodou PCR-DGGE a nedošlo k projevům mutace při srovnání těchto kmenů s kvasinkami kultivovanými za optimálních podmínek. Analýza karyotypů pomocí PFGE ukázala, že navzdory stresovým faktorům DNA některých druhů kvasinek nevykazuje poškození a zůstává intaktní, což ale neplatí pro všechny kmeny, které byly analyzovány.

Vzhledem k těmto okolnostem lze konstatovat, že vysoká adaptabilita těchto druhů na stresové prostředí z nich činí slibné biotechnologické producenty a mají potenciál pro využití například i v zemědělství jako nástroje biokontroly ovoce či révy vinné.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky *Metschnikowia*, PCR-DGGE, PFGE, stresové faktory, rDNA

ABSTRACT

Molecular techniques are used widely nowadays, especially in the identification of various species of microorganisms, and provide reliable and accurate results in a relatively short period of time.

This work deals with the characterization of *Metschnikowia* yeasts exposed to various stress factors and the monitoring of their genomic DNA by PCR-DGGE and PFGE methods. The work was focused on the analysis of ribosomal rDNA, specifically the ITS1 and 5,8-ITS2 regions and genes encoding the domains D1/D2, that are part of the large 26S rDNA ribosomal subunit, which are commonly used in the characterization of fungal eukaryotic communities.

Three types of stress factors were selected for the experiments: osmotic stress (NaCl environment), oxidative stress (addition of H₂O₂ to the medium) and nutritional stress (addition of hemp flour / leaves and flowers as a carbon source). The analysis was performed for particular strains *Metschnikowia andauensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *M. chrysoperlae*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis* and *M. zizyphicola*.

The results showed that addition of the NaCl, H₂O₂ and hemp components at higher concentrations to the production media does not disrupt the ribosomal DNA when detected by PCR-DGGE. Mutations have not been observed by comparing these strains with yeast that was cultivated under optimal conditions. Despite stress factors, PFGE analysis of karyotypes showed that DNA of some yeast species does not prove any damage and remain intact. Remaining strains proved certain degree of damage, and bands were not detected on the gel for these strains.

In the given circumstances, it can be stated that the high adaptability of these species to a stress environment makes them promising biotechnology producers. These yeasts have great potential for usage in agriculture as a tool for biocontrolling of fruit or vines.

KLÍČOVÁ SLOVA

Metschnikowia yeasts, PCR-DGGE, PFGE, stress factors, rDNA

KULJOVSKÁ, Tereza. *Sledování vlivu stresových faktorů na kvasinky rodu Metschnikowia pomocí molekulárních technik*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139091>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Andrei Němcové Ph.D., za ochotu a vsřícný přístup, za odborné rady a konzultace během celé doby vykonávání diplomové práce. Mé poděkování patří i celému ústavu CHPBT za umožnění vykonávání práce v prostorách FCH VUT, doc. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za poskytnutí prostoru pro měření v laboratoři Genových technologií a RNDr. Aleši Kovaříkovi, CSc. za zapůjčení aparatury PFGE z AVČR. Děkuji taky svým nejbližším, kteří při mně stáli po celou dobu studia a podporovali mě.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Kvasinky a jejich význam	10
2.2	Základní charakteristiky kvasinek	10
2.2.1	Identifikace.....	10
2.2.2	Buněčná organizace.....	10
2.2.3	Genetický aparát.....	11
2.2.4	Reprodukce.....	12
2.2.5	Metabolismus	12
2.2.6	Obecné růstové požadavky.....	13
2.2.7	Vliv prostředí na růst kvasinek.....	14
2.2.8	Mutace u mikroorganismů	17
2.3	Vybrané kvasinkové kmeny	17
2.3.1	Kvasinky rodu <i>Metschnikowia</i>	17
2.3.2	Kvasinky <i>Metschnikowia</i> jako nástroje biokontroly	21
2.4	Využití molekulárních technik pro charakterizaci kvasinek	22
2.4.1	Extrakce nukleových kyselin	22
2.4.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	24
2.4.3	Modifikace PCR reakce	27
2.4.4	Analýza ampliconů denaturační gradientovou gelovou elektroforézou DGGE	27
2.4.5	Volba primerů pro analýzu DNA pomocí DGGE	29
2.4.6	Aplikace PCR-DGGE	29
2.4.7	Separční techniky popisující karyotyp kvasinek	30
2.4.8	Princip pulzní gelové elektroforézy PFGE.....	31
2.4.9	PFGE v homogenním poli s hexagonální elektrodou (PFGE-CHEF).....	31
2.4.10	Faktory ovlivňující PFGE	32
2.4.11	Aplikace pulzní gelové elektroforézy	33
2.5	Současný výzkum kvasinek <i>Metschnikowia</i> pomocí molekulárních technik	34
3	CÍLE PRÁCE	36
4	EXPERIMENÁLNÍ ČÁST	37

4.1	Použité chemikálie	37
4.1.1	Chemikálie pro izolaci kvasinkové genomové DNA.....	37
4.1.2	Chemikálie pro PCR, DGGE, GE	37
4.2	Použitý materiál a přístroje	38
4.2.1	Materiál a přístroje určené pro izolaci genomové DNA	38
4.2.2	Materiál a přístroje určené pro analýzu DNA pomocí PFGE	38
4.2.3	Materiál a přístroje pro PCR, GE a DGGE	38
4.3	Kmeny kvasinek použité k analýze DNA	38
4.4	Příprava roztoků pro izolaci kvasinkové DNA.....	39
4.5	Příprava roztoků pro PFGE, DGGE a agarózovou gelovou elektroforézu	39
4.5.1	Výběr kvasinek vystavených stresovým podmínkám	40
4.5.2	Izolace intaktní kvasinkové DNA	40
4.5.3	Analýza intaktní kvasinkové DNA pomocí pulzní gelové elektroforézy PFGE	41
4.5.4	Izolace kvasinkové DNA komerční soupravou DNeasy® UltraClean® Microbial Kit pro další molekulární aplikace	42
4.5.5	Stanovení čistoty a koncentrace DNA spektrofotometricky	42
4.5.6	Nested PCR genomové DNA oblastí ITS1 a 5,8-ITS2 a D1/D2 26S rDNA	43
4.5.7	Příprava reakčních komponent.....	44
4.5.8	Průběh amplifikace.....	46
4.5.9	Detekce PCR produktů pomocí horizontální gelové agarózové elektroforézy ..	46
4.6	Přečistění PCR produktů po druhé amplifikaci	46
4.7	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	47
4.7.1	Průběh DGGE	47
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	50
5.1	Výběr kvasinek vystavených stresovým podmínkám.....	50
5.2	Izolace DNA z vybraných druhů kvasinek vystavených stresovým podmínkám pro potřeby PCR.....	50
5.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty kvasinkové DNA	50
5.4	Nested PCR oblastí ITS1 a ITS2-5,8 rDNA pro vybrané stresové faktory	51
5.4.1	Nested PCR pro kvasinky vystavené osmotickému stresu.....	51

5.4.2	Nested PCR pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu.....	53
5.4.3	Nested PCR pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu	54
5.5	Nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA pro vybrané stresové faktory	55
5.5.1	Nested PCR pro kvasinky vystavené osmotickému, nutričnímu a oxidačnímu stresu (D1/D2).....	55
5.6	Analýza PCR produktů oblastí ITS1, ITS2-5,8 rDNA a D1/D2 26S rDNA pomocí metody DGGE	59
5.6.1	DGGE produktů PCR po druhé amplifikaci – oblast ITS1	60
5.6.2	DGGE produktů PCR po druhé amplifikaci – oblast 5,8-ITS2 rDNA.....	61
5.7	Analýza PCR produktů D1/D2 oblasti 26S rDNA	63
5.8	Karyotypová charakterizace kvasinek rodu <i>Metschnikowia</i> vystavených stresovým faktorům.....	66
5.8.1	Analýza karyotypu kvasinek vystavených osmotickému stresu	67
5.8.2	Analýza karyotypu kvasinek vystavených nutričnímu stresu	70
5.8.3	Analýza karyotypu kvasinek vystavených oxidačnímu stresu.....	71
6	ZÁVĚR.....	74
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	82

1 ÚVOD

Identifikace celé řady mikroorganismů je dnes považována již za rutinou analýzu a v současnosti jsou využívány zejména molekulární metody soustředící se na genetický aparát a analýzu nukleových kyselin DNA/RNA těchto organismů. Tyto metody však vyžadují pečlivý přístup a vysokou koncentraci pracovníka, zejména kvůli možným kontaminacím, práci s malými objemy či aseptické prostředí. Jestli tyto zásady nejsou dodržovány, dochází občas k nepřesným interpretacím získaných výsledků. Při správných zásadách však tyto techniky podávají velice přesné výsledky s dobrou reprodukovatelností.

K analýze kvasinkových společenstev se běžně užívá molekulárních metod jako polymerázová řetězová reakce (PCR), kdy cílovým místem pro amplifikaci často bývá úsek mezi velkou (LSU) a malou (SSU) ribosomální podjednotkou. Primery NL1 a NL4 se využívají k amplifikaci genů kódujících D1/D2 domény, které jsou součástí velké ribosomální podjednotky 26S rDNA a pro regiony vnitřních mezerníkových oblastí ITS (Internal Transcribed Spacer) primery ITS1 a ITS4. K specifitější a citlivější amplifikaci se zvykne využívat „hnízdové“ PCR s vnějšími a vnitřními primery.

Na základě přítomnosti konzervovaných i variabilních oblastí je možné rozlišovat mezi jednotlivými rody či druhy případně sledovat rozdíly v sekvencích u mutantních kmenů s využitím metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE), která je však závislá na předešlé PCR reakci, proto je nutné vyloučit jakékoliv rušící substance a v mnoha případech přistoupit k purifikaci produktů, jelikož DGGE vykazuje vysokou míru citlivosti.

Někdy je potřeba analyzovat i celou genomovou DNA nejen určité krátké úseky jako v případě PCR. K tomuto účelu lze využít i karyotypovou metodu pulzní gelové elektroforézy (PFGE) umožňující separaci jednotlivých chromozomů či zpracování DNA restrikčními enzymy. Pomocí PFGE je možné klasifikovat různé kmeny kvasinek či bakterií a určovat i velikosti separovaných frakcí chromozomů vzhledem k velikostnímu standardu.

Tato práce se zabývá sledováním kvasinek vystavených stresovým podmínkám pomocí výše zmiňovaných molekulárních technik. Soustředí se na vliv stresových faktorů na kvasinky rodu *Metschnikowia* a analyzuje genomovou DNA různými metodami. Pro analýzu kvasinkové DNA byl vybrán osmotický, oxidační a nutriční stres a analyzované kmeny byly *Metschnikowia andauensis* CCY 029-002-129, *Metschnikowia andauensis* NA1657 11-1241, *Metschnikowia chrysoperlae* CBS 9803 11-1158, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-145, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-147, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-149, *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 11-1250, *Metschnikowia sinensis* CBS 10357 11-1244, *Metschnikowia zizyphicola* CBS 10358 11-1247.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky a jejich význam

Kvasinky jakožto zástupci eukaryotických jednobuněčných mikrohub, jsou široce rozšířenými organismy v přirozeném prostředí. V současnosti je známo asi 1 000 druhů kvasinek, což ale představuje pouze zlomek skutečné biologické rozmanitosti kvasinek na Zemi ².

Využití kvasinek nachází své uplatnění zejména v potravinářském průmyslu. Kvasinky se používají při výrobě chleba, vína a piva již od starověku. První mikroskopické pozorování mikrobiálních buněk a popis vzhledu kvasinek bylo provedeno v roce 1680 A. van Leeuwenhoekem. Jejich fermentační aktivita byla pak popsána Pasteurem a první čisté kultury pivovarských a vinařských kvasinek byly získány Hansenem a Müller-Thurgauem na konci 19. století. Od té doby se aplikace kvasinek jako startovacích kultur využívá v kvasném průmyslu nejen pro potraviny a nápoje, ale také pro další škálu produktů, která vyžaduje jejich přítomnost ³. Kromě toho, že jsou kvasinky široce využívány při výrobě potravin, nápojů a léčiv, hrají také významnou roli v podobě modelových mikroorganismu, které nám pomáhají při rozšiřování znalostí v biologických a biomedicínských vědách.

Studium kvasinek tak poskytuje nejen pohled na to, jak funguje jednoduchá eukaryotická buňka, ale vede i k pochopení několika lidských nemocí a dědičných poruch ².

2.2 Základní charakteristiky kvasinek

2.2.1 Identifikace

Kvasinky lze identifikovat a charakterizovat na základě morfologie buněk, fyziologie, imunologie a pomocí technik molekulární biologie ⁴.

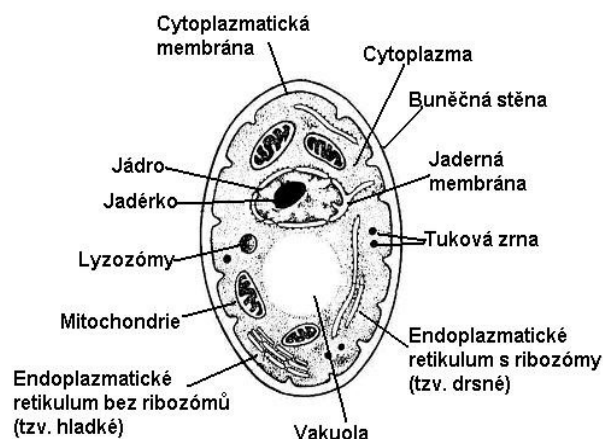
Přesná identifikace druhů je nezbytná pro pochopení interakcí v ekosystému. Tradiční identifikační metody, které jsou založeny na zkoumání fenotypu, jsou často nepřesné, což vede k nejistým interpretacím interakcí jednotlivých druhů ⁵.

Kvůli efektivní analýze velkého množství genomických údajů na úrovni různých druhů, je nutné správně identifikovat a fylogeneticky kvasinky klasifikovat. Identifikace a klasifikace kvasinek je nyní hluboce ovlivněna pokroky v molekulární biologii. Zpočátku byla prováděna identifikace kvasinek a jiných hub pomocí fenotypových znaků, jako je fermentace cukrů, růst na různých organických sloučeninách a přítomnost diagnostických morfologických vlastností. Toto je však často nejistý způsob identifikace, a aby se tento problém vyřešil, taxonomové začaly používat molekulární srovnání ⁶.

2.2.2 Buněčná organizace

Většina organismů v říši hub je mnohobuněčná; kvasinky však řadíme mezi jednobuněčné organismy. Jedna kvasinková buňka měří v průměru asi 5–10 μm a obvykle má sférický, válcovitý nebo oválný tvar ⁷.

V ideálním případě, jsou u kvasinek přítomny následující struktury: buněčná stěna, periplazma, cytoplazmatická membrána, pučící jizva, cytosol, jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, sekreční tělíska, vakuola, peroxizomy apod^{8,9}.



Obrázek 1 – zjednodušená struktura kvasinkové buňky (upraveno dle¹)

2.2.3 Genetický aparát

Pučící kvasinky, stejně jako ostatní eukaryota, nesou svou genetickou informaci na chromozomech, které jsou od jiných buněčných komponent odděleny dvojitou membránou, která ohraničuje jádro¹⁰.

U kvasinek představuje jádro kulatou laločnatou organelu o průměru přibližně 1,5 μm , která je oddělena od cytosolu dvojitou membránou obsahující póry o průměru 50 až 100 nm. Jádro obsahuje matici zvanou nukleoplazma a zrnitou hmotu, jadérko. Jádro obsahuje genomovou DNA, která je spolu s histony a nehistonovými částmi uspořádána do chromatinu. Kvasinkové chromozomy se tvoří a replikují během mitózy (nebo meiózy), ale chovají se při použití mikroskopických technik prakticky neviditelně. Metody pulzní gelové elektroforézy (PFGE) poskytují pohodlné nástroje pro separaci chromozomů a karyotypizaci kvasinek. Jádro ve skutečnosti řídí a reguluje všechny buněčné aktivity^{9,11}.

Kromě genomového materiálu obsahují kvasinková jádra veškerý aparát pro replikaci DNA, opravu DNA, transkripci a zpracování RNA společně s nezbytnými substráty a také regulační faktory, jakož i podíl kvasinkových proteazomů⁹.

Dále může být v jádrech kvasinek přítomno několik nechromozomálních genetických prvků (2 μm DNA; toxické plazmidy: dsRNA a lineární DNA)^{8,9}.

Eukaryotické genomy jsou obecně organizovány do více chromozomů. Například genom kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byl kompletně sekvenován a obsahuje 12 068 kilobází (kbp) s 5 885 potenciálními geny kódujícími proteiny, přibližně 140 genů specifických

ribosomální RNA, 40 genů pro malé molekuly jaderné RNA a 275 genů transferové RNA. Kompletní sekvence navíc poskytuje informace o organizaci vyššího rádu – DNA reprezentovaná 16 chromozomy – a umožňuje taky náhled do evoluční historie kvasinek. Genom vykazuje značné množství zjevné genetické redundance a jedním z hlavních problémů, které je třeba řešit během dalších fází projektu kvasinkového genomu, je objasnění biologických funkcí všech těchto genů ¹².

2.2.4 Reprodukce

Kvasinky jsou klasifikovány jako houby, jejichž primární morfologická forma je jednobuněčná, a rozděluje se pučením nebo dělením. Vegetativní buňky mnoha druhů kvasinek, které patří do čeledi *Sacharomycetaceae* nebo blízkých rodů, mají podobné elipsoidní nebo sférické tvary o průměru několika mikrometrů a dělí se pučením. Tyto buňky lze snadno mikroskopicky detekovat kvůli velkému rozdílu indexu lomu mezi vnějším povrchem buňky a vnitřním prostorem buňky. Zralé buňky nazývané „matky“ vytváří své „dcery“ tvorbou pupenů obvykle na jednom z protilehlých pólů sférických buněk. Pupeny rostou, aby dosáhli průměru, který je obvykle menší než průměr matky (u *Saccharomyces cerevisiae* zhruba 2/3 mateřské buňky) před fyzickým odpojením jejich cytoplazmat v procesu zvaném cytokineze.

Tato metoda buněčného dělení, kdy se dceřina buňka tvoří v sousedství mateřské buňky, která se sama během procesu reprodukce nemění, je pravděpodobně hlavní sjednocující charakteristikou kvasinkových druhů. Představuje extrémní verzi asymetrického buněčného dělení a jako taková kontrastuje s „klasičtější“ buněčným dělením, které zahrnuje rozdělení původní buňky na dvě stejné buňky nacházející se v mnoha jiných organismech, včetně bakterií, mnoha savčích buněk a také v dalším důležitém modelu kvasinek, příčně dělicí se *Schizosaccharomyces pombe*. Potřeba oddělit buněčný obsah z mateřského kompartmentu do pupenu v každém buněčném dělení učinila *S.cerevisiae* také důležitým modelem pro studium asymetrického buněčného dělení ¹³.

2.2.5 Metabolismus

Metabolismus je souhrn látkových přeměn, které se odehrávají jak v kvasinkových buňkách samotných, tak i v prostředí, kde rostou a množí se. Pro mikroorganismy je charakteristická vysoká intenzita metabolismu, která je silně ovlivněna vnějšími podmínkami. Dostatečný přísun živin, vhodná teplota a pH prostředí vedou k intenzivnímu metabolismu a rychlé syntéze buněčné hmoty. Ta se za optimálních podmínek u *Saccharomyces cerevisiae* zdvojnásobí už zhruba za 2 hodiny ¹⁴.

Kvasinky jsou heterotrofní organismy, ve kterých je uhlíkový metabolismus propojen a anabolismus je spojen s katabolismem. Kvasinky přednostně metabolizují cukry, které se převádějí hlavně na ethanol a oxid uhličitý, ale mohou využívat různé zdroje uhlíku, jako aminokyseliny a organické kyseliny, polyoly, alkoholy, mastné kyseliny a další sloučeniny,

v závislosti na druhu. Podle procesu používaného k výrobě energie (dýchání a/ nebo kvašení) je lze klasifikovat jako:

- nefermentativní kvasinky pouze s respiračním metabolismem;
- obligátně-fermentativní kvasinky schopné metabolizovat pouze glukózu alkoholovou fermentací
- fakultativně-fermentativní kvasinky, které mají buď plně respirační nebo fermentační metabolismus, nebo dokonce oba ve smíšeném metabolismu v závislosti na podmínkách růstu, typu a koncentraci zdroje uhlíku a /nebo dostupnosti kyslíku.

Hlavními dusíkatými substráty, jež kvasinky využívají během růstu v potravinách, jsou anorganické amonné sloučeniny a volné aminokyseliny. Dekarboxylace aminokyselin vede k produkci aminů, zatímco metabolismus argininu a citrulinu poskytuje močovinu, prekursor potenciálního karcinogenu ethylkarbamátu. Zatímco kvasinky produkují organické kyseliny, přičemž hlavní kyselinou produkovanou během fermentace cukrů jsou kyselina jantarová a kyselina octová, některé druhy kvasinek mohou za podmínek hladu využívat kyselinu octovou a mléčnou a slabé monokarboxylové kyseliny ¹⁵.

2.2.6 Obecné růstové požadavky

Jednotlivé kvasinky se odlišují v požadavcích na růst, ale lze provést určitá zobecnění. Kvasinky jsou aerobní a fakultativně anaerobní organismy. Některé kvasinky disponují i extrémním aerobním či oxidativním metabolismem. Tyto oxidační kvasinky rostou na povrchu kapalin a jsou známé jako kvasinky tvořící filmy. Kvasinky, které jsou aerobní a fakultativně anaerobní, mohou růst oběma způsoby. Při aerobním růstu kvasinky produkují především biomasu, tedy více kvasinkových buněk. Při anaerobním růstu mají kvasinky fermentační metabolismus a produkují oxid uhličitý a ethanol. Z velké části jsou pro kvasinky cukry nejlepším zdrojem energie, ale kvasinky tvořící filmy mohou oxidovat organické kyseliny a alkohol produkovat tak energii. Kvasinky mohou využívat jednoduché dusíkaté sloučeniny, jako je amoniak, močovina a aminokyseliny. Některé kvasinky mohou také hydrolyzovat proteiny a polypeptidy ¹⁶.

Kvasinky vyžadují o něco méně vlhkosti než bakterie, ale více než plísně. Pokud jde o a_w , spodní hranice pro většinu kvasinek jsou 0,88–0,94. Některé kvasinky, známé jako osmofilní kvasinky, mohou růst v přítomnosti vysokých koncentrací cukrů nebo soli při a_w až 0,62–0,65. Každá kvasinka bude mít svůj vlastní charakteristický optimální a_w a rozsah a_w , přes který může růst. Minimální a optimální a_w pro danou kvasinku se může měnit v závislosti na vnějších faktorech, jako je výživa, pH, teplota, kyslík a přítomnost inhibitorů ¹⁶.

Optimální teplota pro růst kvasinek je v mezofilním rozmezí 25–30 °C. Kvasinky obecně mohou růst v rozmezí teplot od 0 °C do 47 °C. Kvasinky dobře rostou v kyselých podmínkách, při pH 4,0–4,5. Mohou růst při nižším pH než většina bakterií, ale nerostou dobře v alkalických podmínkách ¹⁶.

2.2.7 Vliv prostředí na růst kvasinek

Všechny typy buněk, dokonce i jednotlivé buňky v mnohobuněčných organismech, mají schopnost reagovat na změny v podmínkách okolitého prostředí. Takové reakce vyžadují komplexní síť snímání a přenosu signálu vedoucího k adaptacím buněčného růstu a proliferace, jakož i k úpravám programu genové exprese, metabolických aktivit a dalších vlastností buňky. Podmínky prostředí, které mohou ohrozit přežití buňky, nebo alespoň zabránit jejímu optimálnímu fungování, se běžně označují jako buněčný stres.

Jednobuněčné organismy žijící volně v přírodě, například kvasinky, čelí velkému množství změn, které se týkají jejich přirozeného prostředí. Rychle úřadující adaptační mechanismy jsou klíčovými pro přežití těchto buněk jako odpověď na nárazové environmentální změny. Tyto mechanismy jsou dostatečně silné a nezbytné pro udržení jejich schopnosti proliferace. Změny prostředí mohou mít fyzikální nebo chemický charakter, jmenovitě: teplota, tlak, radiace, koncentrace rozpuštěné látky a vody, přítomnost určitých iontů, toxických látek, pH a dostupnost nutrientů ¹⁷.

2.2.7.1 Nutriční stres

Dostupnost klíčových živin, jako jsou cukry, aminokyseliny a sloučeniny dusíku, určuje vývojové programy a rychlosti růstu kvasinkových buněk. Řada překrývajících se signalizačních sítí – například ty, které jsou zaměřeny na Ras/protein kinázu A, AMP aktivovanou kinázu a cíl rapamycinového komplexu I – informují buňky o dostupnosti živin a ovlivňují transkripční, translační, posttranslační a metabolické profily buněk, stejně jako jejich vývojová rozhodnutí ¹⁷. Kvasinkové buňky umí pozměnit svůj růst a chování v souladu s dostupnými živinami. Mohou upravit svou rychlost růstu v reakci na své nutriční prostředí změnou délky svého buněčného cyklu alespoň v desetinásobném rozsahu ¹⁸. Jsou schopny se adaptovat na úbytek živin zapojením jednoho z řady alternativních vývojových programů v závislosti na konkrétních nutričních podmínkách. Tyto programy zahrnují například pohyb směrem od rychlého mitotického růstu v bohatých médiích, po vláknitý růst umožňující hledání potravy za omezených podmínek, až po různé odlišné klidové stavy, které reverzibilně vypnou buňku v reakci na hladovění. Vrchol představuje extrémní stav biologické stagnace následovanou sporulací při těžkém hladovění ¹⁷.

2.2.7.2 Osmotický stres

Na substrátech, jako jsou ovoce a květiny, jsou kvasinky vystaveny velmi proměnlivému prostředí, pokud jde o dostupnost a kvalitu živin, teplotu, pH, záření, přístup ke kyslíku a zejména aktivitu vody ¹⁹. Aktivita vody je definována jako chemický potenciál volné vody v roztoku. Nízká aktivita vody omezuje růst kvasinek, což je fakt, který se po staletí používá k uchovávání ovoce v suché formě nebo s velmi vysokou hladinou cukru, například v marmeládách ²⁰. V přirozeném prostředí kvasinek se aktivita vody může rychle měnit, a to jak z vnějších vlivů, tak z činnosti samotné kvasinky. Aby se zachoval vhodný objem buněk a

poměr volné a vázané vody příznivé pro biochemické reakce, musí být aktivita cytosolu a jeho organel nižší než aktivita okolního média. Tímto způsobem se udržuje konstantní síla, která tlačí vodu do buňky podél jejího koncentračního gradientu. Proti této síle působí tlak turgoru, který je dán omezenou schopností expanze plazmatické membrány a zejména buněčné stěny^{21, 22}. Schopnost přežít náhlou změnu aktivity vody musí vycházet z vnitřních vlastností buňky, což znamená, že za všech podmínek jsou k dispozici vhodné systémy přežití. Mechanismy přežití musí fungovat během prvních sekund po náhlém osmotickém posunu, protože k pasivní ztrátě nebo k absorpci vody dochází velmi rychle^{21, 23, 24}.

Z pohledu kvasinek mohou nastat (přinejmenším) dvě situace:

- a.) přežití náhlých změn týkajících se vodní aktivity a získání tolerance k nízké vodní aktivitě, tj. k vysoké vnější osmolaritě. Například kvasinky ve vodní kapce na bobulích hroznů mohou být najednou vystaveny vysokým hladinám cukru, když se bobule poruší vlivem aktivity zvířat nebo plísní. Pak kvasinkové buňky zažívají hyperosmotický šok (nebo osmotický posun nahoru), doprovázeny rychlým odtokem vody a zmenšováním buněk.
- b.) na druhé straně mohou být buňky přizpůsobené vysokým hladinám cukru při sušení ovoce nebo květin odplaveny dešťovou vodou do prostředí o téměř čisté destilované vodě. Takový hypoosmotický šok zvyšuje gradient koncentrace vody a vede k rychlému přílivu vody, bobtnání buněk, a tím ke zvýšení tlaku turgoru²⁵.

2.2.7.3 Oxidační stres

Je obecně známo, že většina živých organismů je závislá na kyslíku, který jim zabezpečuje přežití. Organismy však také musely vyvinout velké množství antioxidantní obrany, aby chránily své buňky před toxickými vlastnostmi kyslíku, které vyplývají hlavně z jeho sklonu k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Tyto ROS obvykle vznikají z důvodu úniku elektronů z transportního řetězce na molekulu kyslíku (O_2) během aerobní respirace. Expozice těžkým kovům, ultrafialovému záření (UV), herbicidům, látkám znečišťujícím ovzduší, xenobiotikům a dalším exogenním faktorům může také vyvolat významnou generaci ROS. Selhání buněčné antioxidantní obrany, které brání akumulaci ROS, nevyhnutelně vede k oxidačnímu stresu, což je stav obecně definovaný jako nerovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty, ve prospěch prooxidantů. To potenciálně vede k situaci, kdy důležité buněčné biomolekuly trpí vážným oxidačním poškozením, což ohrožuje životaschopnost buněk²⁶.

Akumulace ROS v kvasinkách obvykle pochází z vnitřních metabolických procesů spojených s dýcháním, ale může být také vyvolána stresovými podněty prostředí^{27, 28}. Akumulace buněčných ROS nevyhnutelně vede k oxidačnímu poškození důležitých buněčných biomolekul, jako jsou proteiny, DNA a lipidy. Neschopnost zabrzdit takového poškození je nakonec spojeno s buněčnou smrtí²⁹.

Buňky kvasinek exprimují omezené zásoby antioxidantů, které je dostatečně chrání před ROS. Tyto konstitutivní obrany však nemohou chránit buňky před náhlými oxidačními poškozeními. Kvasinky proto musely vyvinout vlastní schopnost vnímat agresivní stresové podněty a generovat rychlé adaptivní odpovědi na zvýšenou akumulaci ROS. Nástup oxidačního stresu v kvasinkových buňkách obecně vyvolává časnou reakci, kdy již existující antioxidační obrana poskytuje okamžitou ochranu před počáteční subletální akumulací ROS. Existuje také časný přenos stresových signálů a následná aktivace transkripčních faktorů, které podporují syntézu dalších antioxidačních obranných látek^{30, 31}. To vede k pozdní reakci zahrnující syntézu a aktivaci nových antioxidačních obranných látek, které zachycují ROS, opravují oxidované biomolekuly a obnovují buněčnou redoxní rovnováhu²⁹.

2.2.7.4 Teplotní stres

Stres z vysoké teploty (tepelný šok nebo hypertermie) / stres z nízké teploty (šok z chladu) je způsoben vystavením buněk teplotě, která je vyšší/nížší než teplotní optimum pro jejich růst, tedy supraoptimální/suboptimální teplota. Rozsahy teplot, které lze definovat jako supra/suboptimální, se odlišují v závislosti na druhu kvasinek a také na jejich normálním růstu^{32, 33}. Organismy reagují na zvýšení teploty prostředí zvýšenou expresí souboru proteinů. První studie této reakce na teplotní šok identifikovaly základní soubor silně exprimovaných genů, které byly nazvány proteiny tepelného šoku. Některé z nich jsou molekulární *chaperony*, které zabraňují nebo zvracejí nespecifickou agregaci jiných proteinů³⁴. U kvasinek, zejména u nejvíce zkoumaného druhu, *Saccharomyces cerevisiae*, náhlá změna teploty způsobí značné dočasné změny v proteosyntéze³⁵.

Kvasinky reagují na cytotoxický tepelný stres prostřednictvím aktivace programu genové exprese řízeného vyhrazenými transkripčními faktory reagujícími na stres. Rychlá syntéza proteinů tepelného šoku slouží k ochraně proteinů a buněčných funkcí před škodlivými účinky tepla³⁶.

Tabulka 1 – Přehled nejčastějších stresových faktorů u kvasinek (upraveno dle³⁷)

Prostředí vyvolávající stres
a) Teplotní šok (zvýšení teploty)
b) Ethanolový šok
c) Extrémní pH (kyselé/alkalické prostředí)
d) Oxidační/redukční stres (H ₂ O ₂ , menadion, diamid, Cd, DTT)
e) Hyperosmotický šok (sorbitol, KCl, NaCl)
f) Nutriční stres (nedostatek aminokyselin, N, P, Zn; stacionární fáze)
g) DNA poškozující činidla (alkylační činidla, ionizující záření)

2.2.8 Mutace u mikroorganismů

Mutace je jakákoliv změna v sekvenci genomu organismu nebo je to proces, který tuto změnu indukuje. Rozsah mutací se liší, mohou to být změny pouze na úrovni jedné báze nebo také megabázové delece, inserce, duplikace či inverze.

Mutace mohou probíhat spontánně nebo mohou být indukované záměrně v různých mikroorganismech. V přírodě jsou známé mutace náhodné nebo nepravidelné bez ohledu na podmínky prostředí. Spontánní mutace probíhají bez přítomnosti jakéhokoliv činidla, o kterém je známo, že mění genetický materiál. Indukované mutace jsou vyvolávány chemickými či fyzikálními činidly, která jsou označována jako mutageny. Zahrnují také analogy bází, alkylační činidla, deaminační činidla, akridinové deriváty, RTG paprsky, gama záření a UV záření ³⁸.

Klasická evoluční teorie tvrdí, že rychlost mutace není v daném organismu ovlivněna prostředím, v kterém se organismus nachází. Tento názor byl však zpochybněn, když byla indukována mutageneze vlivem stresových faktorů. Bylo zjištěno, že míra mutací u bakterií má tendenci stoupat, když buňky hladovějí, když je na ně aplikováno antibiotikum nebo při aplikacích jiných stresových podmínek. Podobný trend byl také zaznamenán v studiích, které se zabývaly studováním eukaryotických buněk ³⁹.

U mikrobiálních kmenů může vést mutace ke zlepšení určitých vlastností při současném oslabení jiných vlastností. Mutace s benefičním účinkem jsou využívány již od dob Alexandra Fleminga, kdy koncem roku 1920 bylo pomocí UV záření produkováno až 1000násobně víc penicilinu plísni *Penicillium chrysogenum*.

Mutace jsou trvalé, někdy přenosné změny genetického materiálu buňky, které jsou způsobeny chybami při kopírování genetického materiálu během buněčného dělení anebo vystavení buněk záření, chemikáliím nebo virům. Mutageneze vykazuje potenciál k narušení nebo odstranění nežádoucích vlastností a zlepšení příznivých vlastností mikrobů ³⁸.

2.3 Vybrané kvasinkové kmeny

2.3.1 Kvasinky rodu *Metschnikowia*

Kvasinky rodu *Metschnikowia* jsou v přírodě poměrně rozšířené. Bylo definováno více než 35 druhů tohoto rodu kvasinek. Ty byly izolovány z různých zdrojů, jako jsou květiny a ovoce nebo z těl bezobratlých, hmyzu nebo dokonce z lidské kůže. Některé druhy se také volně vyskytují v přírodě, na základě čehož je lze rozdělit na vodní a suchozemské druhy. Potenciál pro použití kvasinek rodu *Metschnikowia* je relativně vysoký. Některé druhy tohoto rodu se vyznačují svou antimikrobiální aktivitou, což je činí vhodnými pro použití v zemědělství, zejména jako prevence proti chorobám po sklizni ovoce, např. *M. pulcherrima* nebo *M. fructicola*. Některé z kvasinek *Metschnikowia* mohou také produkovat průmyslově důležité látky, jako je například kyselá proteáza ⁴⁰⁻⁴².

Podle taxonomického prohlížeče NCBI zahrnuje čeleď *Metschnikowiaceae* v současné době pět různých rodů, jmenovitě *Aciculoconidium*, *Clavispora*, *Kodamaea*, *Metschnikowia* a *Nectaromyces*. Většina rodů *Metschnikowia* není ekologicky rozšířena, ale vykazuje vysoký stupeň specializace ^{43, 44}. Členové druhu *M. pulcherrima* se zdají být spojovány s hmyzem živícím se ovocem. V prostředí souvisejícím s vinicemi a vínem byly nalezeny druhy *M. pulcherrima*, *M. fructiola* a *M. vitiola* ⁴⁵.

Z vinných kvasinek nezahrnujících rod *Saccharomyces*, je *Metschnikowia* jedním z nejvíce zkoumaných rodů kvůli svému rozšířenému výskytu a vlivu na vinařství a byl nalezen ve vinných révách, na površích těl ovocných mušek, v hroznech a při kvašení vína jako součást mikrobioty ve vinařství a vinařských zařízeních. Všestrannost, která umožňuje použití některých druhů *Metschnikowia* k výrobě vína, závisí na schopnosti růst v kombinaci s jinými druhy kvasinek, jako je *S. cerevisiae*, během prvních fází kvašení vína, čímž moduluje syntézu sekundárních metabolitů během kvašení, které vedou ke zlepšení sensorického profilu vína. Rod *Metschnikowia* má mírnou fermentační sílu a obsahuje také enzymatický aparát zahrnující syntézu aromatických a barevných prekurzorů, a vyznačuje se také potenciální antimikrobiální aktivitou proti kvasinkám a houbám způsobujících kažení, což má za následek, že jsou tyto kvasinky považovány za zajímavý nástroj pro použití při zlepšování kvality vína. Výše uvedené vlastnosti byly většinou předmětem studií zaměřujících se o druhy *Metschnikowia pulcherrima*. Nicméně, *M. fructicola* a *M. viticola* byly také nedávno studovány jako součást vinařských kultur zahrnující výrobu vína ⁴⁶.

Tabulka 2 – ukázka výskytu kvasinek rodu *Metschnikowia* na rozličných plodech ovoce (upraveno dle ⁴⁷)

Druh kvasinky	Místo výskytu	Databáze GenBank D1/D2 26S rDNA
<i>Metschnikowia sinensis</i>	Plody aronie a červeného rybízu	DQ367881_ <i>Metschnikowia sinensis</i> _XY103
<i>Metschnikowia sinensis</i>	Plody třešní a černého rybízu	JQ921015_ <i>Metschnikowia sinensis</i> _D146_4
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Plody borůvek, jablek, červeného rybízu	HM627099_ <i>Metschnikowia pulcherrima</i> _D146
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Plody třešní	KC878450_ <i>Metschnikowia pulcherrima</i> _IMBC02
<i>Metschnikowia fructiola</i>	Plody rakytníku, jablek	JN083815_ <i>Metschnikowia fructiola</i> _CEC_F2
<i>Metschnikowia shanxiensis</i>	Plody třešní, černého rybízu	KY108503_ <i>Metschnikowia shanxiensis</i> _CBS

2.3.1.1 *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia andauensis*

Metschnikowia pulcherrima je okrouhlá/elipsoidní kvasinka, kterou nelze mikroskopicky odlišit od kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Někdy lze v buňce pozorovat jednu velkou, vysoce transparentní kapičku oleje. *M. pulcherrima* je teleomorfní kvasinka patřící do třídy ascomycetes. Její anamorfní forma se nazývá *Candida pulcherrima* ⁴⁸.

Metschnikowia pulcherrima je všudypřítomná kvasinka, která se často objevuje při spontánních fermentacích. Nízká fermentační síla *M. pulcherrima* však vyžaduje následné nebo smíšené použití se *Saccharomyces cerevisiae* k úplnému zkvašení hroznových moštů ⁴⁸.

M. pulcherrima se využívá jako biologický prostředek, díky své schopnosti produkovat přírodní antimikrobiální sloučeniny, konkrétně pulcherrimin, nerozpustný červený pigment s antifungální aktivitou. Tato osobitá antimikrobiální aktivita je dána spotřebováváním železa v médiu skrze srážení železitých iontů a následnou interakcí s kyselinou pulcherriminovou, prekurzor pulcherriminu. Tímto způsobem se životní prostředí stává nehostinné pro jiné mikroorganismy, které vyžadují železo na jejich růst. Pulcherrimin prokázal účinnou inhibiční aktivitu vůči několika kvasinkám: *Candida tropicalis* a *Candida albicans*, také i *Brettanomyces* / *Dekkera*, *Hanseniaspora* a *Pichia genera*; a také proti plísním: *Botrytis cinerea*, rody *Penicillium*, *Alternaria* a *Monilia spp* ⁴⁸.

Za další nadějný druh je považován méně známý druh kvasinky *Metschnikowia andauensis*, která produkuje pulcherrimin. Tento druh má také velký potenciál pro biologickou kontrolu.

Metschnikowia andauensis vykazuje morfologickou i fyziologickou podobnost s druhem *Metschnikowia pulcherrima*. Buňky jsou charakteristické kulovitým až oválním tvarem, přičemž se mohou vyskytovat buď jednotlivě anebo ve dvojicích. Na tuhých živných půdách tvoří bílé až krémové kolonie s hladkým povrchem ⁴⁹.

Kmeny *M. andauensis* byly hodnoceny z hlediska jejich biologické kontrolní aktivity proti nejvýznamnějším posklizňovým patogenům ovoce, jako jsou plísně *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea* a *Rhizopus stolonifer*, *R. oryzae*, *Alternaria alternata* a *Verticillium cinnabarinum* nebo proti houbám zapojeným do kažení plodin a/nebo potravin a *M. andauensis* inhibují růst těchto druhů.



Obrázek 2 – nátěr kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* na agarové plotně ⁵⁰

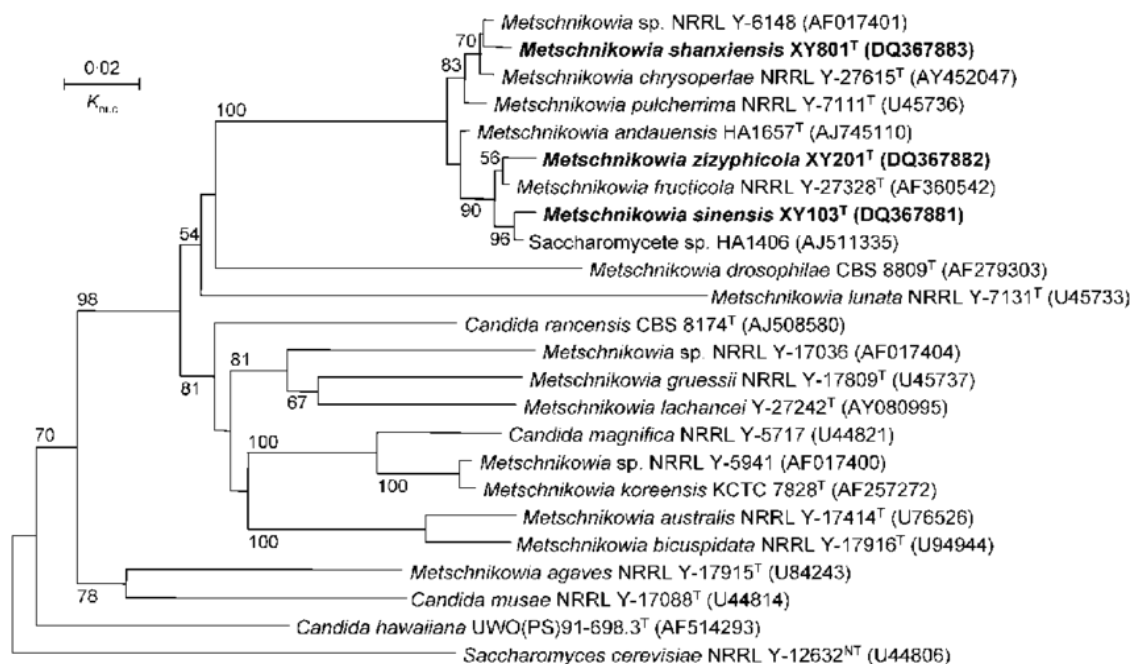
2.3.1.2 *Metschnikowia chrysoperlae*

Kvasinky náležící druhu *Metschnikowia chrysoperlae* vytvářejí kulovité až oválné buňky a mohou se vyskytovat buď jako jednotlivé buňky nebo v párech. U těchto kvasinek nejsou přítomny pseudohyfy, avšak je přítomné hojné množství chlamydozor. Rostou na selektivním YM médiu a vytvářejí bílé, viskózní kolonie s hladkými povrchy.

Existují specifické vztahy mezi kvasinkami a některými druhy hmyzu jako síťokřídli, přičemž kvasinky jako *M. chrysoperlae* byly izolovány právě z vajíček dospělých jedinců, avšak z larev tohoto hmyzu dosud izolovány nebyly, což naznačuje možnost vertikálního přenosu⁵¹.

2.3.1.3 *Metschnikowia shanxiensis*, *Metschnikowia ziziphicola*, *Metschnikowia sinensis*

Druhy *M. shanxiensis*, *M. ziziphicola* a *M. sinensis* jsou dle fylogenetické analýzy (analýza D1/D2 domén, které jsou součástí velké ribosomální podjednotky 26S) seskupeny v jednom klastru také s jinými druhy jako *M. fructicola*, *M. andauensis*, *M. pulcherimma*, *M. chrysoperlae*. Tyto druhy byly izolovány z povrchu ovoce jujube (*Ziziphus jujuba*) v čínských provinciích Shanxi a Shandong⁵².



Obrázek 3 – zařazení druhů *Metschnikowia shanxiensis*, *Metschnikowia ziziphicola* a *Metschnikowia sinensis* do fylogenetického stromu⁵³

2.3.2 Kvasinky *Metschnikowia* jako nástroje biokontroly

Existuje skupina užitečných mikroorganismů, které představují poměrně velkou skupinu. Díky své schopnosti zasahovat do růstu rostlinných patogenů a taky schopnosti pozitivně ovlivňovat rostliny, jsou považované za potenciálně bezpečné biopesticidy. Vývoj biopesticidů zaznamenal významný pokrok především kvůli působivému pokroku v izolaci a charakterizaci nových kmenů mikroorganismů, které splňují hlavní požadavky BCA (biocontrol agents) ⁵⁴.

Kvasinkové kmeny *Metschnikowia sp.*, jsou mimořádně zajímavé, nejen díky vlastnostem jako konkurenční boj o živiny s jinými mikroorganismy nebo vysoké tolerance k stresovým vlivům, ale jsou jedinečné, protože působí jako biokontrolní činidla produkující kyselinu pulcherriminovou a jsou schopny komplexně vázat železité ionty. Kromě toho tyto kvasinky umí vylučovat i extracelulární lytické enzymy, jako chitináza a glukozidáza, které přispívají k celkovým antifungálním účinkům. Antagonistický účinek namířený proti jiným mikrobům je způsoben tím, že kyselina pulcherriminová jako metabolit těchto kvasinek po chelataci železitých iontů odčerpá železo nevyhnutné pro růst patogenů. Dle Sipiczkeho (2006), je antibakteriální a antifungální aktivita *M. pulcherrima* závislá na vazbě železa v růstovém médiu. Proto jsou kmeny *M. pulcherrima* produkující vysoké množství pulcherriminu zajímavé jako inhibitory růstu proti patogenním mikroorganismům ⁵⁴.

2.4 Využití molekulárních technik pro charakterizaci kvasinek

Kvasinkové kmeny představují rozmanitou skupinu mikroorganismů zvláště ve spojitosti s výskytem v potravinách či nápojích. Obvykle je tato rozmanitost popisována za pomoci využití kultivačních technik například kultivace na agarových plotnách. Kolonie kvasinek jsou následně počítány, izolovány a identifikovány pomocí standardních morfologických, biochemických i fyziologických testů, nicméně v poslední době se pro rychlejší a konečnou identifikaci využívá metod molekulárních ⁵⁵.

Metody molekulární biologie jsou používané dnes již běžně a užívají se pro rychlou identifikaci, taxonomické a fylogenetické zařazení kvasinek, jsou výhodné, protože nejsou závislé a ovlivnitelné podmínkami vnějšího prostředí. Nejčastěji se používají metody založené na analýze ribozomální DNA, což je metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a analýze genomové DNA, tedy metoda pulzní gelové elektroforézy (PFGE) ^{56, 57}. PCR-DGGE se ukázala jako vhodná metoda, protože není závislá na předchozí kultivaci a umožňuje taky charakterizaci mikroorganismů z různých ekosystémů, z potravin či nápojů včetně vína ⁵⁵.

Jelikož byl zaznamenán obrovský pokrok v technikách souvisejících s molekulární biologii, jsou známé i jiné metody založené na identifikaci DNA, jmenovitě: DNA-DNA hybridizace, elektroforetická karyotypizace, metody RFLP charakterizující chromosomální DNA, či mitochondriální DNA a také sekvenování ribosomální DNA. V rámci těchto molekulárních technik umožňují metody založené na PCR jak vnitrodruhovou diferenciaci, tak druhovou identifikaci izolátů kvasinek. Většina těchto metod je rychlá a jednoduchá ⁵⁸.

Užitečnou metodou identifikace kvasinek je i restriční analýza různých oblastí genů ribozomální RNA. Tato technika má dva kroky: nejprve je amplifikována oblast rRNA a poté je štěpen produkt PCR. Tato technika je pomalejší než některé současné metody PCR, které dosahují identifikace a typizace pouze pomocí produktu PCR ⁵⁸.

2.4.1 Extrakce nukleových kyselin

Extrakce DNA je proces, ve kterém je DNA separována od jiných buněčných komponent, jako jsou proteiny, membrány a další buněčný materiál. Izolace DNA představuje většinou jednu z nejnáročnějších částí analýzy DNA a vyžaduje pečlivé zacházení s biologickým materiálem s cílem zabránit kontaminaci analyzovaného vzorku ⁵⁹.

Hlavním příspěvkem pro izolaci DNA bylo využití lytických enzymů a fyzikálně-chemických vlastností extrakčních roztoků či chaotropních činidel, které umožňují uvolnění nukleové kyseliny a následné navázání na povrch aktivních železnatých kuliček ⁶⁰.

Při výběru metody extrakce je třeba vzít v úvahu mnoho aspektů jako například čistota nukleových kyselin, efektivita izolačního postupu, doba expozice nebezpečným chemikáliím či dobu trvání izolace. Bez ohledu na to, odkud byla DNA získána, nebo pro jaký účel bude používána, jsou cíle extrakční metody vždy stejné: uvolnění genetického materiálu z jeho zdroje (tekutina, tkáň nebo mikrob), stabilizace nukleových kyselin vůči degradaci, odstranění inhibitorů amplifikace apod ⁶¹.

2.4.1.1 Metody izolace DNA

Existují tři hlavní extrakční metody, přičemž každá z nich vykazuje jistá omezení i výhody. První metoda je manuální izolace DNA s využitím chemikálií jako fenol, chloroform a ethanol, které mají za úkol DNA izolovat a srážet. Tyto metody mají historický význam a jsou standardizovány, i když se obecně nehodí pro klinické aplikace kvůli jejich zdlouhavé a manuální povaze. Metoda obsahuje mnoho transferových kroků, které mohou vést ke kontaminaci a potenciální expozici fenolu.

Druhou kategorií představují komerčně dostupné manuální soupravy, které jsou úspěšně používány už řadu let a jsou vhodné i pro klinické aplikace. Zahrnují několik typů izolace nukleových kyselin včetně srážení solemi, buněčnou lyzi se srážením proteinů, křemičité kolonky nebo magnetické kuličky. I když jsou obecně méně náročné na práci, jsou finančně nákladnější, protože obsahují patentovaná činidla a speciální plasty.

Poslední kategorii tvoří automatizované laboratorní extraktory, které se poprvé objevili na přelomu tisíciletí, což je relativně krátká doba jejich používání. Tyto metody jsou spolehlivé, zvyšují reprodukovatelnost v rámci vzorků, zkracují celkový čas potřebný pro extrakci a jsou velice účinnými nástroji v klinické a laboratorní praxi ⁶¹.

2.4.1.2 Izolace genomové DNA kvasinek

Pro extrakci genomové DNA bylo vyvinuto již několik metod s ohledem na to, jaká další molekulárně genetická/ taxonomická technika bude molekulu DNA analyzovat ⁶².

Buněčná stěna představuje hlavní překážku pro rychlou a snadnou lyzi kvasinkových buněk, a proto musí být narušena, aby bylo možné účinně získat genomovou DNA (gDNA). Konvenční metody pro přípravu gDNA z kvasinkových buněk využívají buď enzymatickou degradaci, nebo bušení skleněnými kuličkami, obvykle následované lyzí buněk detergentem a extrakcí gDNA fenol-chloroformem. Při analýze velkého počtu vzorků jsou tyto metody časově náročné a relativně drahé. Pro rychlou genotypizaci lze buňky lyzovat také opakovanými cykly zmrazování a rozmrazování v pufru obsahujícím Triton X-100 a SDS, následované extrakcí gDNA chloroformem. Ačkoli je tato metoda podstatně rychlejší než konvenční metody přípravy gDNA, vyžaduje přenos vzorku do nové zkumavky po extrakci chloroformem, což zpomaluje celou extrakci a činí jej nepohodlným pro současnou manipulaci s velkým počtem vzorků. Alternativně lze gDNA připravit v jedné zkumavce jednoduchým ošetřením SDS ⁶³.

2.4.1.3 Čistota a koncentrace DNA

Kromě účinných postupů extrakce DNA je pro její následovné využití nutné přesně stanovit koncentraci a čistotu. Někdy je potřeba znát přesnou koncentraci DNA ve vzorku, čím se například zvyšuje reprodukovatelnost, taky následná amplifikace může být přesnější. Nepřesná kvantifikace vede k snižování spolehlivosti výsledků.

Standardně se DNA kvantifikuje pomocí ultrafialové (UV) spektrofotometrie. UV záření prochází skrz křemennou kyvetu, kde je vzorek obsahující DNA umístěn a proměřuje se absorbance při vlnových délkách A_{260} , což je specifická vlnová délka pro absorpci záření nukleovými kyselinami a A_{280} pro měření kontaminace proteiny ve vzorku. Na základě naměřených hodnot absorbance se pak určí koncentrace DNA ve vzorku a z poměru A_{260}/A_{280} se stanoví čistota DNA.

Pro stanovení se taky někdy využívá vylepšené technologie v podobě přístroje NanoDrop, který pracuje na podobném principu jako klasická UV spektrofotometrie a vyžaduje pouze malé množství vzorku (1-2 μ l). Po zadržení vzorku na optickém vláknu dochází k proměřování absorbance ve rozsahu vlnových délek od 220-750 nm ⁶¹.

2.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je základní molekulární technika používaná pro amplifikaci cílových sekvencí z templátu DNA exponenciálním způsobem. Metoda využívá tepelného zahřívání a ochlazování za pomoci tzv. thermocycleru. Při tomto procesu dochází v roztoku obsahujícím DNA k tepelné denaturaci molekuly DNA a následnému nasedání krátkých fragmentů nazývaných primery (typicky uměle navržené oligonukleotidy) na komplementární úsek DNA. Dochází k enzymatické replikaci za spoluúčasti tepelně odolné DNA polymerázy – Taq polymerázy ⁶⁴.

Jednou z výhod technologie PCR je rychlost a jednoduchost, se kterou lze techniku provádět. PCR reakci lze nastavit v krátkém čase a lze taky snadno manipulovat s více vzorky. Komponenty amplifikační reakce (templátová DNA, DNA polymeráza, oligonukleotidové primery, pufr) jsou přidávány do amplifikační nádoby ⁶⁵.

Mezi základní komponenty polymerázové řetězové reakce zařazujeme:

2.4.2.1 Templátová DNA

Jednou z výhod PCR je, že DNA z relativně čistých vzorků nemusí být vysoce purifikována, aby mohla být použita jako templát pro amplifikaci. Prakticky může být jako templát použita jakákoliv forma DNA včetně plasmidů, kosmidů, fágů, genomové DNA i jiných dalších zdrojů. Ačkoli je možné amplifikovat jedinou molekulu DNA, typická PCR používá jako templát 10^5 - 10^6 kopií cílové DNA. V praxi to znamená přidání ~ 1 μ g eukaryotické genomové DNA, 10 ng kvasinkové DNA nebo 1 ng bakteriální DNA. Koncentrace DNA však není pro většinu aplikací kritická a PCR reakce bude fungovat se širokým rozsahem koncentrací templátu ⁶⁵.

2.4.2.2 DNA polymeráza

Pro potřeby PCR je k dispozici široká škála DNA polymeráz. Nejčastěji se používá klonovaná tepelně stabilní DNA polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus* (Taq DNA polymeráza). U jiných enzymů, jako je DNA polymeráza z *Pyrococcus furiosus* (Pfu DNA polymeráza) nebo *Thermococcus litoralis* (Vent™ DNA polymeráza, New England Biolabs), bylo zjištěno, že mají nižší chybovost než Taq polymeráza a mohou být pro některé aplikace výhodné. Typicky se používá 0,5–2,5 jednotek enzymu na 50 µl reakce ⁶⁵.

2.4.2.3 PCR primery

PCR primery jsou krátké oligodeoxyribonukleotidy nebo oligomery, které jsou navrženy tak, aby byly komplementární s koncovou sekvencí cílového amplikonu. Primery se většinou skládají z 15–25 nukleotidů a mají vyvážený obsah G/C a A/T páru (přibližně 50 - 60%), protože každý ze dvou primerů je komplementární k různým částem cílové sekvence amplikonu ⁶⁶.

2.4.2.4 Deoxynukleotid-trifosfáty (dNTPs)

Deoxynukleotidy-trifosfáty (dNTP) se typicky používají v koncentraci ~200 µmol/l z každého dNTP v reakci PCR. Příliš vysoké koncentrace podporují tvorbu nespecifických produktů. Modifikované dNTP se někdy používají ke značení produktů PCR radioaktivními nebo fluorescenčními markery nebo hapteny, jako je biotin, fluorescein nebo digoxigenin ⁶⁵.

2.4.2.5 Pufrové složky

Pro amplifikaci DNA pomocí PCR bylo popsáno několik činidel obsahujících pufr s ionty, monovalentní soli a dvojmocné kationty potřebné pro polymerázovou aktivitu. Nejpoužívanější pufr se skládá z 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3 při pokojové teplotě) a 50 mmol/l KCl. Při teplotě prodlužování řetězce (72 °C) pH tohoto Tris pufru klesne na 7,2, což je blízko k optimální hodnotě pro Taq DNA polymerázu. Široce se používají také pufrы obsahující sírany, jako je 20 mmol/l Tris-SO₄ (pH 8,5–9,0 při pokojové teplotě) a 20 mmol/l (NH₄)₂SO₄. Monovalentní kationty (K⁺ nebo NH₄⁺) jsou zahrnuty pro úpravu iontové síly. DNA polymerázy vyžadují ke své aktivitě také dvojmocné kationty a reakční směsi obsahují MgCl₂ (1–5 mmol/l). Obecně platí, že vyšší koncentrace MgCl₂ podporují nespecifické nasedání primerů a nespecifickou amplifikaci produktu ⁶⁵.

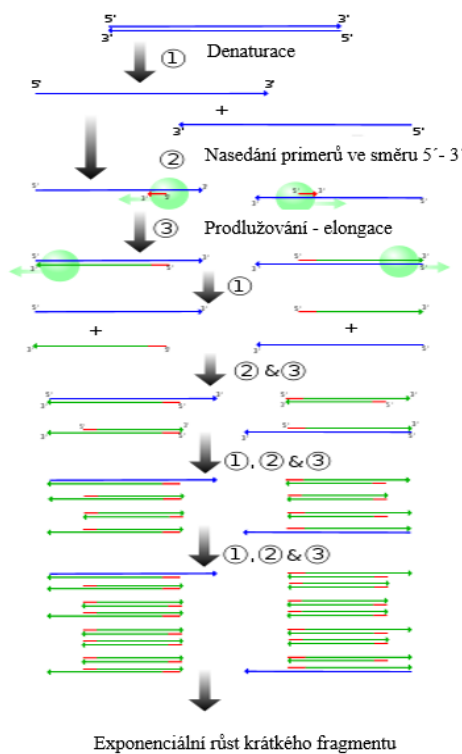
2.4.2.6 Proces PCR

Typicky PCR sestává ze série 20–40 opakovaných teplotních změn, nazvaných teplotní cykly, každý cyklus obvykle sestává ze dvou nebo tří oddělených teplotních kroků. Cyklické syntéze

často předchází delší denaturace DNA při velmi vysoké teplotě ($> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$), následuje dlouhá závěrečná elongace pro prodloužení konečného produktu, nebo inkubace při nízké teplotě pro krátké skladování. Použité teploty a doba jejich aplikace v každém cyklu závisí na různých parametrech, včetně enzymu použitého pro syntézu DNA, koncentraci dvojmocných iontů a dNTP v reakci a teplotě tání (T_m) primerů ⁶⁷.

Jednotlivé kroky společné pro většinu metod PCR jsou následující:

- **Iniciace** (10 min, $96\text{ }^{\circ}\text{C}$) – předehřátí reakční směsi na $94\text{--}98\text{ }^{\circ}\text{C}$, krok je potřebný při použití konkrétních DNA polymeráz, které jsou extrémně termostabilní a tímto krokem jsou aktivované.
- **Denaturace** (30 s, $96\text{ }^{\circ}\text{C}$) – počáteční krok cyklu, reakční směs je zahřátá na vysokou teplotu, při které disociují dvě vlákna dvoušroubovice DNA.
- **Nasedání** (30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) – nasedání primerů.
- **Polymerace** (1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$) – DNA polymeráza syntetizuje novou DNA v směru $5' - 3'$: nasedá na primery a dále syntetizuje dle templátové DNA.
- **Elongace** (10 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$) – čas a teplota, při které má DNA polymeráza možnost dosyntetizovat případné nedosyntetizované jednovláknové úseky DNA.
- **Ukončení** ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) – reakční směs se na konci PCR reakce schladí a při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ může být krátkou dobu skladovaná ⁶⁸.



Obrázek 4 – Průběh polymerázové řetězové reakce (upraveno dle ⁶⁹)

2.4.3 Modifikace PCR reakce

2.4.3.1 *Nested (hnízdová) PCR*

Nested PCR je modifikací konvenční PCR, která byla navržena pro zlepšení citlivosti a specificity reakce. Nested PCR zahrnuje použití dvou sad primerů a dvou po sobě jdoucích reakcí PCR ⁷⁰. U hnízdové PCR se dva páry primerů zaměřují na jeden lokus. První pár amplifikuje cílový fragment jako u konvenční PCR. Druhý pár nasedá na místa v prvním amplikonu a amplifikuje vnitřní (kratší) sekvenci. Je samozřejmé, že pro navržení vhodných primerů musí být známa sekvence celého amplikonu ⁷¹.

První pár primerů se typicky používá v prvním kole PCR reakce, u které se počet cyklů běžně pohybuje v intervalu 15-30. Produkty první amplifikace jsou následně podrobeny amplifikaci druhé, kde se využije druhé sady primerů. Ty jsou schopny nasedat na vnitřní sekvenci, která byla předtím amplifikována první sadou primerů. Zvýšená citlivost je dána vysokým počtem opakujících se cyklů, zvýšená specifita pak nasedáním druhé sady primerů na sekvence, které byly součástí prvního PCR produktu. Hlavní nevýhodou nested PCR je vysoká míra kontaminace, ke které může dojít během přenosu produktů naamplifikovaných v první části do druhé zkumavky, kde se odehrává další amplifikace. Tomu lze zabránit fyzickým oddělením amplifikačních směsí z prvního a druhého kola pomocí ošetření vrstvou vosku či oleje ⁷⁰.

2.4.3.2 *Nested PCR pro identifikaci kvasinkových mikroorganismů*

Pro práci s kvasinkovými organismy se široce uplatňuje využití primerů s vnitřními transkripčními sekvencemi (ITS), konkrétně ITS1 a ITS4, které amplifikují vysoce variabilní ITS1 a ITS2 regiony ohraničující sekvenci kódující 5.8S rRNA. Tyto oblasti jsou obklopeny sekvencemi kódujícími malou podjednotku (SSU) a velkou podjednotku (LSU) ribosomálního operonu. ITS regiony kvasinkové ribosomální DNA (rDNA) jsou vysoce variabilní sekvence, které mají význam při rozlišování jednotlivých druhů kvasinek metodou PCR, naproti tomu, geny úseku 5.8S jsou velice konzervativní ^{72 73}. Geny malé a velké ribosomální podjednotky (SSU/18S a LSU/28S) ribosomálního operonu jsou relativně konzervované a primárně se používají pro rozsáhlou fylogenetickou inferenci a systematiku ⁷⁴. Pro oblasti velké ribosomální podjednotky D1 a D2 jsou využívány primery NL1 a NL4 v první části ⁷⁵ a po rozdělení na D1/D2 segmenty primery NL1 a LS2 ⁷⁶.

2.4.4 Analýza amplikonů denaturační gradientovou gelovou elektroforézou DGGE

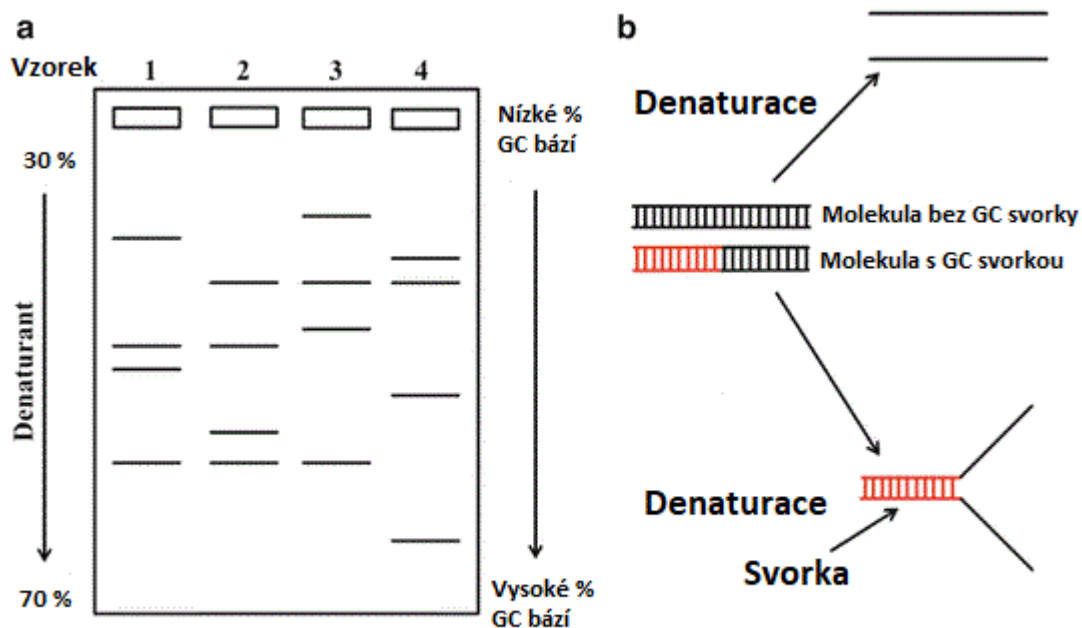
Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je molekulární metoda, označována taky jako „metoda otisku prstu“. Jedná se o separační techniku, která odděluje DNA produkty vzniklé předešlou amplifikací pomocí PCR. Protože je velikost produktů PCR přibližně stejná, separace pomocí agarózové gelové elektroforézy by nám neposkytla informace o sekvenčních rozdílech. Toto omezení lze překonat právě aplikací DGGE na PCR produkty,

kdy mohou být jednotlivé sekvence vzájemně odlišeny z důvodu rozdílných denaturačních charakteristik DNA. Každý band v gelu tedy teoreticky představuje odlišnou populaci mikroorganismů přítomných v společenství. Pro určení mikrobiálních strukturních rozdílů lze tyto otisky prstů nahrát do databáze a určovat tak společné či rozdílné charakteristiky. Široká dostupnost různých primerů nám pak umožňuje zkoumat fylogenezi nebo cílové organismy jako jsou například patogeny ^{76, 77}.

2.4.4.1 Princip DGGE

DGGE je rychlá metoda umožňující analýzu mikrobiální diverzity z velkého množství vzorků. U DGGE lze oddělit fragmenty DNA se stejnou délkou, ale různými sekvencemi (dokonce i s rozdílem pouze jedné báze). Tyto sekvence částečně denaturované DNA vykazují odlišné teploty tání a taky odlišnou elektroforetickou mobilitu. DGGE je metoda založená na předešlé PCR reakci. DNA je extrahována ze vzorku a následně je amplifikován cílový úsek pomocí specifických primerů ⁷⁸. Někdy se využívá i přidání GC svorky na 5' konec sekvence primeru zabraňující úplné denuraci molekul DNA během analýzy DGGE. Tato technika detekuje variace malých fragmentů DNA (~200–700 bp), které se liší pouze o jednu substituovanou bázi ⁷⁹. Úspěšně amplifikované produkty PCR reakce jsou podrobeny vertikální DGGE analýze, kde představuje separační prostředí polyakrylamidový gel s lineárně vzrůstajícím gradientem denaturantů ⁷⁸.

V typickém systému DGGE je udržována konstantní teplota a denaturační prostředí je tvořeno lineárním denaturačním gradientem z močoviny a formamidu. Roztok 100 % denaturantu se skládá ze 7 M močoviny a 40 % formamidu. Obvykle se připraví gradient 0–100 % denaturantu v 6–10 % polyakrylamidu. Koncentrace polyakrylamidu závisí na velikosti fragmentu ⁸⁰. Při denuraci dochází k oddělení vláken dvouřetězcové DNA při specifické koncentraci denaturantu a molekula DNA se zastaví na určité pozici v gelu. Optimálního rozlišení se dosáhne, pokud molekuly nedenaturují úplně, protože by nedošlo k jejich zastavení a procházeli by gelem jako jednovláknová DNA. Fragmenty obsahující GC svorku při průchodu gelem vytváří tvary podobné písmenu Y, tento fragment poté přilne ke gelu, když dosáhne bodu denaturace. Po obarvení gelu budou jednotlivé bandy indikovat genetickou rozmanitost původních vzorků ⁸¹.



Obrázek 5 – jednoduché schéma DGGE (upraveno dle ⁸²⁾)

2.4.5 Volba primerů pro analýzu DNA pomocí DGGE

Vzhledem k tomu, že DGGE je silně závislá na předchozí PCR amplifikaci, je nutno zohlednit výběr adekvátních primerů pro přesnou charakterizaci mikrobiálních komunit.

Pro identifikaci bakteriálních společenstev jsou běžně využívány primery pro amplifikaci úseku malé ribosomální podjednotky 16S rDNA a pro kvasinkové či houbové organismy primery amplifikující sekvence na úrovni malé ribosomální podjednotky 18S rDNA, ITS regiony a sekvence 28S rDNA. Vysoce konzervované oblasti mohou být vhodnými místy pro nasedání univerzálních primerů, zatímco středně a vysoce variabilní oblasti umožňují rozlišování mezi jednotlivými druhy organismů ⁸¹.

2.4.6 Aplikace PCR-DGGE

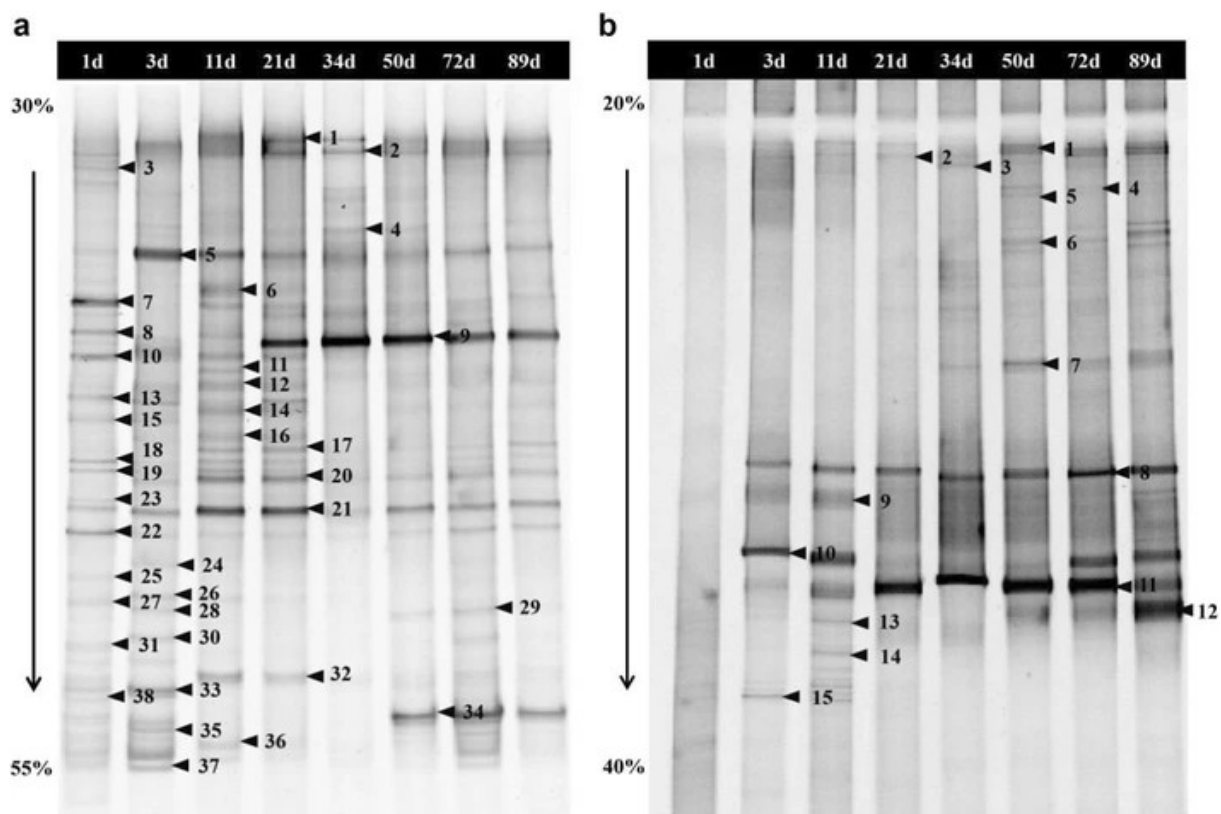
Technika DGGE se uplatňuje jako tzv. metoda otisku prstu a umožňuje tak zkoumat rozdíly u jednotlivých komunit mikroorganismů či dynamiku těchto systémů. Metoda je rychlá a cenově dostupná a umožňuje pracovat s více vzorky najednou ⁸³.

DGGE se široce používá pro studie související s rozmanitostí organismů, jako je mikrobiální biodiverzita, kvasinková společenství, genomy virových kmenů, forenzní aplikace či polymorfismy u rostlinného genomu ⁷⁹.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza nachází své uplatnění taky v potravinářském průmyslu. Pomocí PCR-DGGE je možné detekovat například houby produkující významné mykotoxiny. Geny zapojené do biosyntetické dráhy, která mykotoxiny produkuje mohou

poskytnout dokonalý základ pro přesnou detekci mykotoxigenních hub buďto v zemědělských komoditách, v potravinách nebo v krmivech pro zvířata ⁸⁴.

Další uplatnění PCR-DGGE spočívá v analýze mikrobiálních fermentací během zrání potravin, charakterizování mikrobiálních společenstev v potravinářských produktech a analyzování dynamických vlastností společenstev při reakcích na vnější prostředí. Tato metoda byla využita například i při sledování hygienické kvality minerálních vod, kde byly nalezeny mikroorganismy z komerčně balených minerálních vod a tyto nebylo možné kultivovat běžným způsobem ⁷⁶.



Obrázek 6 – ukázka profilů bakteriálních a houbových společenstev v odlišných časech fermentace s využitím metody PCR-DGGE ⁸⁵

2.4.7 Separační techniky popisující karyotyp kvasinek

Elektroforéza je technika, která umožňuje separaci a analýzu nabitých molekul v elektrickém poli. Gelová elektroforéza se nejčastěji používá pro separaci a čištění proteinů a nukleových kyselin, které si odlišují svou velikostí, nábojem nebo konformací. Typicky se pro tvorbu gelu využívá chemikálií jako polyakrylamid nebo agaróza. Agaróza je vhodná pro separaci fragmentů DNA o velikosti od několika set párů bází do přibližně 20 kbp. Polyakrylamid je

zas výhodnější pro separaci proteinů a menších fragmentů DNA. Pohyblivost DNA v elektrickém poli je konstantní za definovaných podmínek. Tyto podmínky jsou charakterizovány elektrickými parametry (proud a napětí) a faktory, jako je složení pufru, koncentrace agarózy a teplota ⁸⁶.

Konvenční elektroforéza na agarózovém gelu využívá statické pole a může separovat fragmenty DNA pouze do 50 kilobází (kbp), i když v praxi fragmenty větší než 20 kbp migrují za podmínek, které se obvykle používají. Zavedením pulzu nebo změnou směru elektrického pole, lze oddělit fragmenty velké až 10 megabází (Mbp). Čas potřebný k tomu, aby se fragmenty DNA různých velikostí přeorientovaly na nové elektrické pole, je úměrný jejich molekulové hmotnosti, a právě tento faktor umožňuje separaci a zaostření fragmentů DNA ⁸⁷.

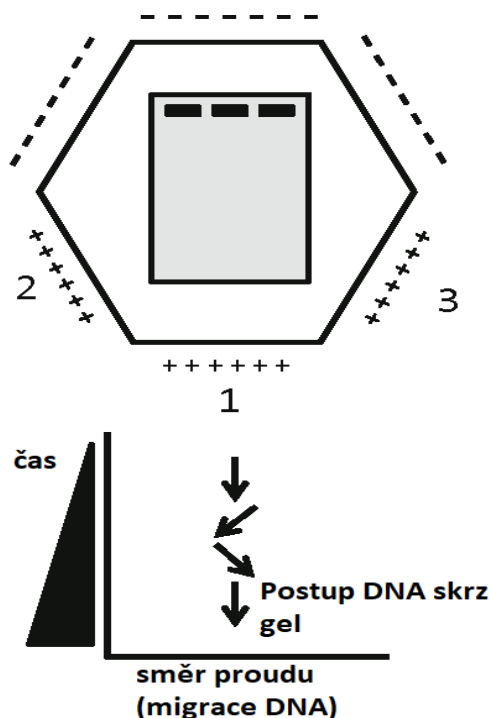
PFGE technika používá 1,5 % agarózový gel, 10 až 20 mikrogramů DNA na jamku a pufru s nízkou iontovou silou. Využívá střídavě pulzní, kolmo orientovaná elektrická pole, z nichž alespoň jedno je nehomogenní. Trvání aplikovaných elektrických pulzů se mění od 1 s do 90 s, aby se dosáhlo optimálního oddělení pro DNA s velikostí od 30 do 2 000 kbp ⁸⁸.

2.4.8 Princip pulzní gelové elektroforézy PFGE

Princip separace pomocí pulzní gelové elektroforézy je následovný. Když je na gel aplikováno první elektrické (E1), molekuly DNA začnou migrovat v gelu ve směru působení elektrického pole. Pak je první elektrické pole odstraněno a je aktivováno druhé elektrické pole (E2) v konkrétním úhlu k prvnímu elektrickému poli. Molekula DNA musí změnit svou konformaci a přeorientovat se tak, aby mohla migrovat k elektrickému poli (E2). Čas potřebný k její reorientaci je velice variabilní a závisí na tom, jak je molekula velká (molekulová hmotnost). Větším molekulám DNA trvá obecně delší čas, než se přeorientují po přepnutí elektrického pole, protože pro ně agaróza představuje větší fyzickou bariéru než pro malé molekuly. Molekuly s rostoucí velikostí proto musí strávit větší část cyklu přeorientováním, než začnou migrovat gelem ⁸⁹.

2.4.9 PFGE v homogenním poli s hexagonální elektrodou (PFGE-CHEF)

CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field) je metoda gelové elektroforézy s pulzním polem, která umožňuje rozlišení velkých fragmentů DNA, které nelze separovat prostřednictvím klasické gelové elektroforézy. Postup zahrnuje aplikaci řízených elektrických polí, která mění směr v předem stanoveném úhlu, na vzorky DNA. Tyto vzorky jsou skladovány v gelové matici s agarózou a štěpeny pomocí restrikčních endonukleáz. Úprava podmínek elektroforézy umožňuje separaci fragmentů DNA s velikostí od 10 kbp do 9 Mbp. V tomto systému je přesně řízena velikost, umístění, koordinace, stabilita a kontinuita elektrického pole, což umožňuje separaci fragmentů DNA s různou velikostí ^{90, 91}.



Obrázek 7 – schéma PFGE v homogenním poli s hexagonální elektrodou (upraveno dle ⁹²)

2.4.10 Faktory ovlivňující PFGE

Separace pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) je velice senzitivní na celou řadu faktorů. Mezi hlavní faktory ovlivňující PFGE patří molekulární vlastnosti DNA, doba pulzu, vlastnosti elektrického pole, složení gelu, vkládané napětí, reorientační úhel či teplota ⁹³.

2.4.10.1 Pulzní čas

Pulzní časy jsou vybírány tak, aby molekuly DNA o určité velikosti strávili většinu času reorientací než pohybem v gelu. K frakcionaci větších molekul tento čas odpovídá obvykle dnům nebo týdnům. Například chromozomální DNA kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* o délce 10 Mbp vyžaduje delší dobu separace, přibližně jeden týden. Když dochází k přepínání mezi jednotlivými elektrodami, tak velkým molekulám DNA trvá delší čas, než se přeorientují a mají tím pádem méně času na pohyb skrz gelovou matici. Z toho vyplývá, že větší molekuly migrují gelem mnohem pomaleji než malé fragmenty ⁹⁴.

2.4.10.2 Teplota

Při konvenční gelové elektroforéze molekuly DNA migrují gelem za standardní laboratorní teploty. U metody PFGE je však zapotřebí teplotu snížit, protože to výrazně ovlivňuje

mobilitu molekul DNA v gelu. Uvádí se, že by měla být soustava chlazená na teplotu 14-15 °C. Vliv teploty je pak pozorován i při proměrování vlnové délky λ , kdy byl prokázán efekt teploty 34 °C jako negativní vzhledem k poklesu rozlišení ⁹⁵.

2.4.10.3 Napětí

Volba správného vloženého napětí se liší vzhledem k velikosti separované DNA. K separaci molekul o velikosti 1 Mbp lze použít napětí 6-10 V/cm, pro větší molekuly se obecně ale vyžaduje snižování napětí. Jestli je ale gradient vkládaného napětí nižší, je nutno prodloužit intervaly mezi přepínáním pulzů ⁹⁶.

2.4.10.4 Koncentrace agarózy

Koncentrace agarózy významně ovlivňuje separaci molekul DNA. Migrace menších molekul se volí obecně nižší koncentrace agarózy v gelu. Například DNA monomer o velikosti 48,5 kbp migruje o 50 % rychleji v gelu s koncentrací agarózy 0,6 % než při koncentraci 1,0 %. Se vzrůstající koncentrací agarózy dochází k snižování rychlosti pohybu molekul skrz gelovou matici ⁹⁶.

2.4.10.5 Reorientační úhel

Rozšíření reorientačního úhlu by mělo přinášet vizuálně ostřejší bandy a taky lepší rozlišení. U kvasinkových chromozomů se setkáváme s tím, že separace je téměř identická, když je nastaven reorientační úhel v intervalu od 105-165 °. Nicméně, když pracujeme s molekulami o velikosti 200-3000 kbp, a využíváme tohoto intervalu k separaci menších fragmentů, byly pozorovány až 4násobné rozdíly v rychlosti migrace molekul DNA ⁹³.

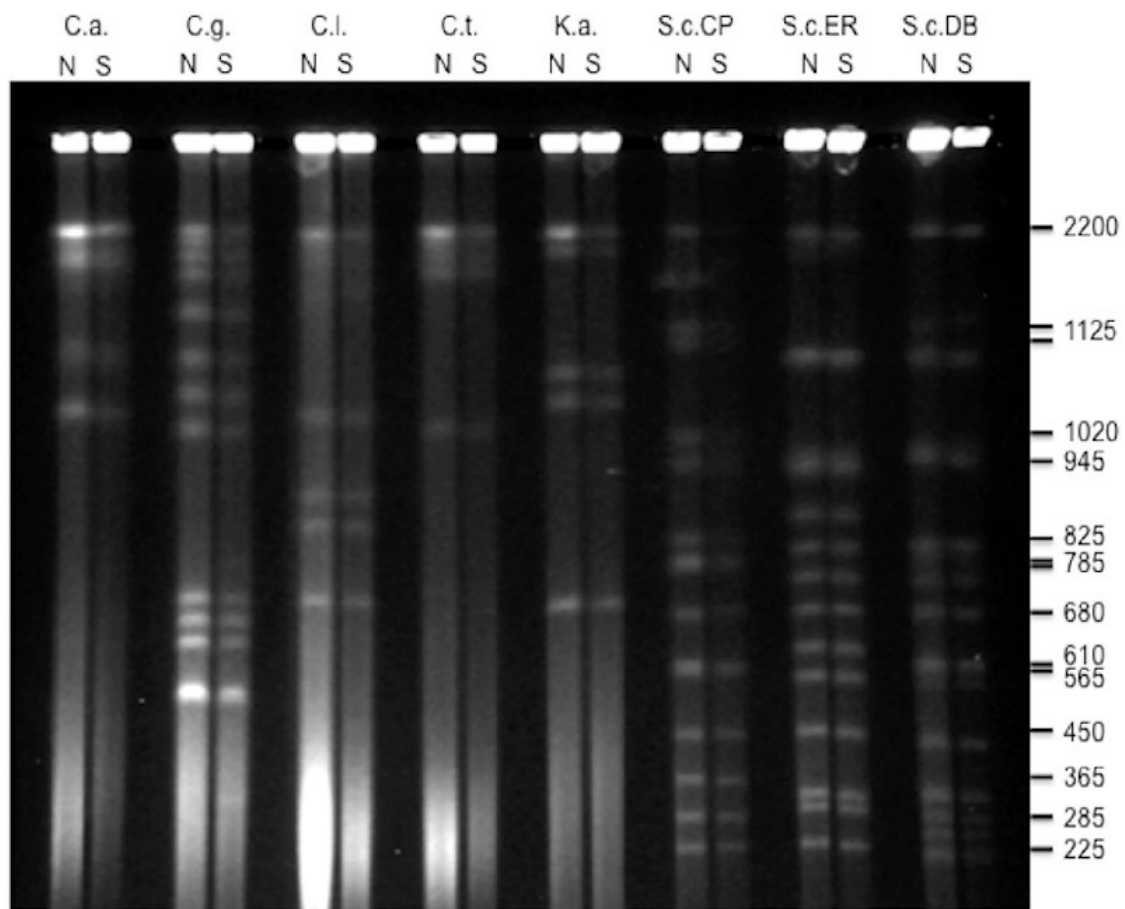
2.4.11 Aplikace pulzní gelové elektroforézy

Tato technologie hraje klíčovou roli v moderní genomice, protože umožňuje manipulace s celou chromozomální DNA, nebo velkých fragmentů DNA ⁹⁷. Je to také velmi užitečný nástroj v epidemiologických studiích a mapování genů u mikrobiálních a savčích buněk, nebo při studování bakteriálních a kvasinkových umělých chromozomů ⁹¹.

Metoda PFGE umožnila identifikovat intaktní chromozomální DNA u jednobuněčných eukaryot, jako jsou houby, kvasinky a paraziti prostřednictvím tvorby elektroforetických karyotypů.

U nižších eukaryot jako jsou kvasinky a trypanosomy, jsou chromozomy poměrně malé a mohou být rozlišovány jako individuální bandy. U vícero druhů totiž chromozomy nejsou kondenzované, a tudíž i viditelné prostřednictvím mikroskopických metod, proto se nabízí využití PFGE jako vhodné karyotypizační metody umožňující charakterizovat tyto chromozomy velmi pohodlně.

I po více než 30 letech vývoje a zavedení PFGE, jsou tyto metody pořád populární v mnoha zemích a umožňují studium a identifikaci patogenů a jsou považovány za zlatý standard při identifikaci některých bakterií ⁹⁸.



Obrázek 8 – ukázka kvasinkových chromozomů kvasinek rodu *Candida* a *Saccharomyces* s využitím standardních a nových způsobu izolace : N-new; S-standard ⁹⁹

2.5 Současný výzkum kvasinek *Metschnikowia* pomocí molekulárních technik

Při determinaci a fylogenetické analýze kvasinkových kmenů se často studuje sekvence ribosomální rDNA domény D1/D2, která je součástí velké ribosomální podjednotky (SSU). Kurtzman a Robnett prokázali u askomycétních kvasinek, že kmen lišící se více než jedním procentem substitucí na doméně D1/D2 představuje samostatný druh. Nedávno popsáný druh *M. fructiola* byl od sesterského druhu *M. pulcherrima* oddělen na základě pozorovaných substitucí na doméně D1/D2 v 2,2 %. Oblasti D2 všech druhů kvasinek *Metschnikowia* nakonec nejsou ve skutečnosti homologní ⁴⁹.

U kvasinek rodu *Metschnikowia* intragenomická diverzita domén D1/D2 26S rDNA brání jejich taxonomickému oddělení navzájem od sebe a od příbuzných druhů pomocí sekvenování této oblasti. Jelikož D1/D2 a ITS oblasti kvasinek *M. fructiola* a *M. andauensis* nevykazují

homogenitu nelze použít sekvenování pro barcoding těchto druhů. Bylo prokázáno, že rDNA kmene *M. fructiola* je fragmentovaná a obsahuje pseudogeny ⁴⁴.

M. pulcherrima, jako zástupce těchto kvasinek, bývá také často analyzována pomocí konvenční PCR. U tří kmenů *M. pulcherrima* (UMY12, UMY14 a UMY15) byl získán PCR produkt o velikosti přibližně 400 bp s využitím primerů ITS1 a ITS4. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analýza sekvence regionu ITS1-5,8s rDNA-ITS2 těchto tří druhů kvasinek vykazovala 93-94 % podobnost s dříve izolovanými druhy MECH1, BIO126, ZY6, MB513 a MN510 ¹⁰⁰.

3 CÍLE PRÁCE

Práce je zaměřena na studium kvasinkové DNA pomocí různých molekulárních technik a zkoumáním vlivu stresového prostředí na její genom. Hlavními úkoly, které měli být splněny jsou následující:

- 1) Rešerše na dané téma – využití molekulárně biologických metod k charakterizaci kvasinek, možnosti provedení PFGE a DGGE metod
- 2) Využití vybraných kvasinkových kmenů rodu *Metschnikowia* kultivovaných za přítomnosti různých stresových faktorů
- 3) Optimalizace izolace a analýzy DNA
- 4) Sledování vlivu stresových faktorů na integritu kvasinkového genomu

4 EXPERIMENÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro izolaci kvasinkové genomové DNA

- Agaróza low melting, Serva (SRN)
- Beta-merkapt ethanol, Serva (SRN)
- D-sorbitol, Sigma-Aldrich (SRN)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- DNeasy® UltraClean® Microbial Kit, QIAGEN (USA)
- Hydroxid sodný, Lach-Ner s.r.o. (ČR)
- Chelaton 3 (EDTA) p.a., Lachema (ČR)
- Kyselina citrónová, Sigma-Aldrich (SRN)
- Kyselina chlorovodíková 35 % p.a., Lach-Ner (ČR)
- Lytikáza (≥ 2000 units/mg protein), Sigma-Aldrich (SRN)
- Proteináza K, Sigma-Aldrich (SRN)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Penta, (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro PCR, DGGE, GE

- Agaróza Premium, Serva (SRN)
- Akrylamid 99 %, Sigma Aldrich (SRN)
- Bromfenolová modrá, Serva (SRN)
- DNA marker FastGene 50 bp, Nippon Genetics (SRN)
- DNA marker FastGene 100 bp, Nippon Genetics (SRN)
- Ethanol p.a. Lachema (ČR)
- Ethidium bromid, Serva (SRN)
- Formamid p.a., Penta (ČR)
- High Pure PCR Product Purification Kit, Version 19, Roche (Germany)
- CHEF DNA Size Marker *H. wingei*, Bio-Rad (ČR)
- Interkalační látka Gel-Red, TopBio, Praha (ČR)
- Kyselina boritá, Chemapol (ČR)
- Kyselina octová 99,8 % p.a., Lach-Ner (ČR)
- Močovina p.a., Penta (ČR)
- N,N'-metylenbisakrylamid, Serva (SRN)
- N,N'-tatrathylendiamin (TEMED), Serva (SRN)
- Oligonukleotidové primery, Generi biotech (ČR)
- PCR voda, TopBio, Praha (ČR)
- Persíran amonný (APS), Serva (SRN)
- PPP Master Mix, TopBio, Praha (ČR)
- Trix(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Penta (ČR)

4.2 Použitý materiál a přístroje

4.2.1 Materiál a přístroje určené pro izolaci genomové DNA

- Analytické váhy Boeco (SRN)
- Centrifuga Eppendorf 5430/5430 R, Eppendorf (ČR)
- Detekční systém pro dokumentaci gelu (Azure biosystems C200, Dublin, Irsko)
- Mikroskop L II ooA, Intraco Micro (SRN)
- Mikrovlnná trouba Professor (ČR)
- Třepačka IKA Yellow Line (SRN)
- Vodní lázeň, model TW2, Julabo Labortechnik (SRN)
- Vortex Genie 2, Mo Bio Lab (USA)

4.2.2 Materiál a přístroje určené pro analýzu DNA pomocí PFGE

- Gene Navigator, Pharmacia Biotech (SWE)
- GN Controller, Pharmacia Biotech (SWE)
- Programmable Power Supply, MP-500 V (SWE)
- Sestava PFGE, Pharmacia Biotech (SWE)
- Vodní lázeň, model TW2, Julabo Labortechnik (SRN)

4.2.3 Materiál a přístroje pro PCR, GE a DGGE

- DGGE aparatura DCode™, Universal Mutation Detection Systém, Bio-Rad (USA)
- Detection Systém, Bio-Rad (USA)
- Horizontální elektroforetická vana Owl, model B2, Owl Separation Systems (USA)
- Kompaktní mikrocentrifuga HERMLE Z-100M, Labortechnik (SRN)
- Nanodrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- Thermocycler MyCycler™, Bio-Rad
- Zdroj napětí pro elektroforézu MP-300N, Major Science (USA)

4.3 Kmeny kvasinek použité k analýze DNA

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

4.4 Příprava roztoků pro izolaci kvasinkové DNA

- **CPES pufr (40mM kyselina citrónová, 120 mM Na₂HPO₄, 1,2 M sorbitol)**

Bylo naváženo 2,843 g kyseliny citrónové, 109,302 g sorbitolu a 21,488 g Na₂HPO₄. Směs chemikálií byla rozpuštěna v 500 ml redestilované vody a promíchána. Následně bylo upraveno pH roztoku pomocí 0,1 M HCl / 0,1 M NaOH na hodnotu 6. Pro rozpuštění enzymu lytikázy byl vyžít roztok CPES s upraveným pH na 7,5.

- **TE pufr (10 mmol/l Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1 mmol/l EDTA)**

Do 500 ml redestilované vody bylo přidáno 0,6 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu a 0,185 g EDTA a pH roztoku bylo upraveno na 8,0. Chemikálie byly rozpuštěny a roztok byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

- **Lyzační pufr (50 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l EDTA, 3 % SDS)**

Bylo naváženo 9,306 g EDTA, 15,0 g SDS a 3,0275 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu. Chemikálie byly postupně rozpuštěny v 500 ml redestilované vody. Po rozpuštění byl lyzační roztok uchovávan v lednici při teplotě 4 °C.

4.5 Příprava roztoků pro PFGE, DGGE a agarózovou gelovou elektroforézu

- **TBE pufr 5 ×**

Bylo naváženo 50 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu, 27,5 g kyseliny borité a 3,72 g EDTA. Chemikálie byly rozpuštěny v 1 dm³ redestilované vody. Dle potřeby byl roztok ředěn na koncentraci 0,5 × TBE a použit pro gelovou agarózovou elektroforézu.

- **TAE pufr 50 ×**

Bylo naváženo 242 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu, odměřeno 57,1 ml kyseliny octové a 100 ml 0,5 M EDTA. Směs byla rozpuštěna v 1 dm³ redestilované vody. Dle potřeby byl roztok naředěn na koncentraci TAE 1×.

4.5.1 Výběr kvasinek vystavených stresovým podmínkám

Pro potřeby molekulární analýzy pomocí PFGE i PCR-DGGE byly vybrány některé kmeny kvasinek rodu *Metschnikowia* (viz Kapitola 5.1), které byly vystavené osmotickému, nutričnímu a oxidačnímu stresu. Kvasinky byly po kultivaci uchovávány v centrifugačních zkumavkách ve fyziologickém roztoku při teplotě -20 °C.

4.5.2 Izolace intaktní kvasinkové DNA

K izolaci kvasinkové DNA byly použity zmražené buňky kvasinek ve fyziologickém roztoku. Tyto byly následně rozmrazeny, důkladně promíchány a zkumavka byla doplněna na 50 ml pomocí redestilované vody. Z takto připravené kultury bylo odebráno 100 µl do Eppendorfovy zkumavky a každá zkumavka obsahující kvasinkovou kulturu byla doplněna 900 µl redestilované vody. Z takto připraveného roztoku bylo opět odebráno 100 µl do nové do Eppendorfovy zkumavky a ta byla doplněna 900 µl redestilované vody. Tímto způsobem byl připraven roztok s ředěním 10^{-2} . Počítání buněk bylo provedeno v Bürkerově komůrce, která se skládá ze silného podložního skla s vyrytou sítí čtverečků přesně známých rozměrů a krycího skla, které se pokládá na boční lišty, a tak vzniká mezi sklíčky prostor o přesně definované hloubce. Do této komůrky bylo kápnuto malé množství kvasinkové suspenze a plocha s roztokem byla stabilizována krycím sklem. Po 5 minutách bylo při 40x zvětšení provedeno počítání buněk ve 20 čtvercích. Takto probíhalo počítání u jednotlivých kvasinkových kmenů. Pro každou kvasinku byly hodnoty z 20 čtverců zprůměrovány.

Průměrná hodnota byla pak dosazena do příslušného vztahu $x = MO \cdot z \cdot X \cdot 1000$, kde MO je průměrný počet mikroorganismů v jednom čtverci, z představuje použité ředění, X přepočten na 1 mm^3 a faktor 1000 slouží k přepočtu z mm^3 na ml.

Po dosažení do vztahu bylo možné z každé zkumavky odebrat příslušné množství biomasy, které obsahuje $1,3 \cdot 10^9$ buněk. Kvasinková kultura byla pipetována do centrifugačních zkumavek. Buňky byly centrifugovány po dobu 5 minut při 5000 rpm za laboratorní teploty. Buňky následně byly promyty 5 ml redestilované vody a opět centrifugovány. Supernatant byl odstraněn a buňky byly rozsuspendovány v 1,4 ml TE pufru a doplněny 2,1 ml redestilované vody. Následně byl k směsi pipetován beta-merkptoethanol o objemu 17,5 µl. Zkumavky byly následně inkubovány po dobu 30 minut při 30 °C za mírného třepání. Po inkubaci byly buňky opět centrifugovány a následně rozsuspendovány v 4 ml CPES pufru, pH 6. Následovala další centrifugace a odlití supernatantu. K buňkám byl přidán roztok lytikázy (0,015 g/1 ml CPES pufru, pH 7,5) o objemu 75 µl, přičemž enzym byl dostatečně rozsuspendován v CPES. K směsi bylo pak přidáno 425 µl CPES pufru, pH 7,5.

Směs byla jemně protřepána a inkubována po dobu 30 minut při teplotě 25 °C. Po ukončení inkubace bylo ke všem vzorkům napipetováno 0,5 ml 2 % roztoku Low melting agarózy v CPES pufru (0,2 g/10 ml CPES pufru, pH 6). Takto připravené vzorky byly rozpipetovány do předem vychlazených a vysterilovaných formiček na přípravu bločků a umístěny do lednice, kde došlo k tuhnutí bločků. Tyto byly po ztuhnutí vyňaty a vloženy do 1 ml lyzačního

pufu obsahujícího proteinázu K. Následně byly bločky inkubovány 24 hodin při teplotě 50 °C. Po 24 hodinách byla tekutina z bloček odlita a bločky byly 3 x promyty pomocí 2 ml TE pufu, pH 8. Bločky byly inkubovány po prvním, druhém i třetím promytí 20 minut při teplotě 50 °C. Takto připravené bločky byly uskladněny v lednici pro další použití.

4.5.3 Analýza intaktní kvasinkové DNA pomocí pulzní gelové elektroforézy PFGE

Byl připraven 1,0 / 0,8 % gel rozpuštěním 1,1 g agarózy pro molekulární aplikace v 110 ml 0,08 M / 0,5 × TBE pufu. Roztok byl následně rozvařen v mikrovlnné troubě (celkem 3x) a po ochlazení na 60 °C nalit do gumové formy, do které byl vložen hřebínek. Po 20 minutách byl hřebínek vyňat a do gelu byly zavedeny bločky obsahující kvasinkovou DNA a taky bloček CHEF standardu kvasinky *Hansenula wingei*. Takto připravený gel byl vložen do předem vychlazené elektroforetické vany a zalit 2,5 dm³ 0,08 M TBE pufu. Následně byla vložena na PFGE aparaturu HEX elektroda a byly nastaveny podmínky pro pulzní časy, dobu separace a vložené napětí na přístroji Gene Navigator. Posledním krokem bylo spuštění elektroforézy na příslušný čas.



Obrázek 9 – pohled na aparaturu PFGE

4.5.3.1 Vizualizace fragmentů DNA

Po ukončení analýzy kvasinkové DNA pomocí PFGE byl gel umístěn do ploché nádoby obsahující 250 ml redestilované vody a 50 µl barviva ethidiumbromidu o koncentraci 10 mg/ml. Gel byl ponechán v barvicí lázni po dobu 20-30 minut za současného třepání. Po ukončení byl gel promyt destilovanou vodou a umístěn do zařízení Azure biosystems c200 určeného k vizualizaci. Byla pořízena fotografie gelu a gel byl následně bezpečně odstraněn.

4.5.4 Izolace kvasinkové DNA komerční soupravou DNeasy® UltraClean® Microbial Kit pro další molekulární aplikace

Kvasinková kultura ve fyziologickém roztoku byla rozmrazena a pak z ní bylo odebráno 1,8 ml suspenze, která byla umístěna do sběrné mikrozkušavky a centrifugována při 10 000 ref po dobu 30 sekund. Supernatant byl odstraněn a sedimentované buňky byly rozpuštěny v 300 μ l PowerBead roztoku, který obsahuje soli a pufr. Takto připravený roztok byl vortexován až do momentu, kdy byla suspenze dokonale promíchána a směs byla následně přesunuta do speciální mikrozkušavky obsahující drobný písek, který slouží k mechanické dezintegraci buněk. Do směsi byl přidán další speciální roztok SL o objemu 50 μ l, který obsahuje činidla umožňující lýzi buněk a SDS. Následovala desetiminutová inkubace při 65 °C a pak vortexování zkumavek s pískem na speciálním adaptéru MO Bio Vortex Adapter® po dobu 10 minut v horizontální poloze. Dalším krokem byla centrifugace po dobu 30 sekund při 10 000 ref.

Supernatant obsahující DNA byl přesunut do nové sběrné mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 100 μ l roztoku IRS, který sráží organické i anorganické nečistoty. Roztok byl krátce vortexován a ponechán 5 minut v lednici při teplotě 4 °C. Následovala centrifugace za stejných podmínek jako v předešlém případě. Supernatant byl znovu přenesen do nové mikrozkušavky a bylo k němu napipetováno 900 μ l SB roztoku s vysokým obsahem soli, který je odpovědný za navázání DNA na speciální filtr. Suspenze obsahující DNA byla přesunuta do speciální filtrační mikrozkušavky ve dvou krocích. V první fázi bylo na filtr nalito cca 700 μ l a obsah v mikrozkušavkách byl scentrifugován, kdy kapalina prošla filtrem byla odstraněna a na filtr byl nalit zbylý roztok s DNA. Opět byla prošlá kapalina odstraněna a na filtr bylo pipetováno 300 μ l CB roztoku obsahujícího ethanol, který je schopný rozpustit případné kontaminanty DNA. V dalším kroku byl roztok centrifugován po dobu 30 sekund při 10 000 ref a filtr s navázanou DNA byl opatrně vyjmut a přesunut do nové zkumavky. Eluce DNA byla provedena přidávkem elučního pufru EB o objemu 50 μ l. Po finální centrifugaci byla DNA eluována do činidla a skladována v mrazáku při teplotě -20 °C pro další aplikace.

4.5.5 Stanovení čistoty a koncentrace DNA spektrofotometricky

Koncentrace a čistota izolované DNA byla proměřena na přístroji NanoDrop 2000. Nukleová kyselina byla rozmrazena a po vyblankování přístroje bylo na platformu kápnuto asi 1-2 μ l DNA, kdy obsah zkumavky byl pomocí pipety důkladně promíchán před každým proměřením. Po uzavření ramena byla proměřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220-330 nm. Absorbance A_{260} zprostředkovala informaci o koncentraci DNA a z poměru hodnot A_{260}/A_{280} bylo možné stanovit čistotu DNA, kdy čistá DNA má tento poměr 1,8-2,0.

4.5.6 Nested PCR genomové DNA oblastí ITS1 a 5,8-ITS2 a D1/D2 26S rDNA

Pro hnízdovou PCR rDNA oblastí genomové DNA byla použita jako templát DNA kvasinek, která byla izolována pomocí komerční soupravy DNeasy® UltraClean® Microbial Kit.

Nested PCR v obou případech zahrnovala 2 amplifikační kroky, kdy produkty první PCR reakce byly detekovány klasickou agarózovou gelovou elektroforézou a produkty druhé PCR reakce nejprve horizontální gelovou elektroforézou a následně pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy DGGE, jelikož metoda DGGE má své omezení při detekci produktů a separace bývá účinná pro produkty <500 bp. Pro lepší rozlišení fragmentů PCR byly využity primery obsahující GC-svorky. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulka 3 a Tabulka 4. Primery byly dodány v lyofilizovaném stavu, proto bylo nutné doplnění pomocí sterilní PCR vody na příslušnou koncentraci doporučenou výrobcem. Následně byly primery rozpipetovány do alikvotních podílů a uchovávány v mrazáku.

Tabulka 3 – sekvence použitých primerů pro oblast D1/D2 26S rDNA (GC-svorka je podtržena)

Nested PCR pro oblast D1/D2 26S rDNA		
	Primery	Sekvence primeru (5'-3')
1. amplifikace	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
2. amplifikace	NL1-GC	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG</u> GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
	LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACTC

Tabulka 4 - sekvence primerů pro oblast ITS1 a 5,8-ITS2 rDNA (GC-svorka je podtržena)

Nested PCR pro oblast ITS1 a 5,8-ITS2 rDNA		
	Primery	Sekvence primeru (5'-3')
1. amplifikace	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
2. amplifikace ITS2-5,8 rDNA	ITS1-GC	<u>CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGG</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
	ITS4-GC	<u>CGCCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGG</u> TCCTCCGCTTATTGATATGC

4.5.7 Příprava reakčních komponent

Jednotlivé komponenty pro PCR byly v první části rozmrazeny, promíchány a krátce centrifugovány. PCR směs byla připravována v boxu, který byl minimálně 30 minut sterilován pomocí UV záření. Jednotlivé komponenty byly pipetovány v daném pořadí do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a reakční směs bez DNA byla pak rozpipetována do 200 µl PCR zkumavek, ke kterým byla přidána templátová DNA naředěná na koncentraci 10 ng/µl. Obdobním způsobem byla připravena negativní kontrola, kdy byla namísto DNA do směsi přidána PCR voda, aby byla ověřena čistota komponent a případná kontaminace. Koncentrace jednotlivých komponent pro reakční směs a příslušné objemy jsou uvedeny v Tabulka 5.

Pro 1. amplifikaci byla připravena PCR směs, kde konečný objem činil 25 µl. Amplikon, který byl syntetizován, byl následně použit pro 2. amplifikaci a reakce probíhala v dvojnásobném objemu tj. 50 µl. Bylo využito ředění 1 µl PCR produktu na 99 µl PCR vody.

Tabulka 5 - složení reakční směsi pro nested PCR

Komponenta	Koncentrace komponent ve směsi	Objemy komponent v reakční směsi	
		25 μ l	50 μ l
Voda pro PCR	-	11,24 μ l	22,48 μ l
PPP MasterMix	2 \times	12,5 μ l	25,0 μ l
Primer 1 (přímý)	520 nmol/l	0,13 μ l	0,26 μ l
Primer 2 (reverzní)	520 nmol/l	0,13 μ l	0,26 μ l
Matrice DNA	10 ng/ μ l	1,0 μ l	2,0 μ l

Tabulka 6 – teplotní programy pro nested PCR oblastí D1/D2 26S rDNA; ITS1, 5,8-ITS2 rDNA

	D1/D2 26S rDNA oblast		ITS1, 5,8-ITS2 rDNA oblast		
	1. amplifikace	2. amplifikace	1. amplifikace	2. amplifikace	2. amplifikace
Primery	NL1 NL4	NL1-GC LS2	ITS1 ITS4	ITS1-GC ITS2	ITS3 ITS4-GC
Prodloužená denaturace	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
Denaturace DNA	95 °C / 40 s	95 °C / 45 s	95 °C / 40 s	95 °C / 45 s	95 °C / 45 s
Hybridizace primerů	52 °C / 50 s	51 °C / 60 s	50 °C / 30 s	56 °C / 60 s	56 °C / 60 s
Syntéza nových řetězců	72 °C / 50 s	72 °C / 60 s	72 °C / 45 s	72 °C / 60 s	72 °C / 60 s
Dosyntetizování DNA	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min	72 °C / 7 min
Počet cyklů	33	30	33	30	30

4.5.8 Průběh amplifikace

Takto připravené zkumavky byly umístěny do thermocycleru MyCycler, kde byl nastaven vhodný teplotní profil jak pro oblast D1/D2 26S rDNA tak pro ITS regiony.

Teplota nasedání primerů, trvání cyklů a počet cyklů byl převzat z publikace, kde byly analyzovány odlišné kmeny kvasinek rodu *Metschnikowia* než kmeny využívané v této práci. Nicméně, teplota nasedání primerů se většinou při konvenční PCR stanovuje obecně pro všechny druhy stejného rodu ^{40-42, 55 101, 102}.

Hybridizace primerů byla ověřena taky výpočtem příslušným softwarem (*NEB Tm Calculator*), který zohledňuje i použité komponenty jako typ DNA polymerázy, koncentraci primeru v jedné PCR reakci, reakční pufr apod.

Teplotní profily, trvání cyklů, počet cyklů pro jednotlivé PCR reakce jsou součástí Tabulka 6.

4.5.9 Detekce PCR produktů pomocí horizontální gelové agaróзовé elektroforézy

Po ukončení PCR reakce byly produkty 1. a 2. amplifikace vizualizovány gelovou agarózovou elektroforézou. Pro 1. amplifikaci byl připraven 1,2 % gel, kdy bylo naváženo 1,2 g agarózy a odměřeno 100 ml 0,5 × TBE pufru. Pro druhou amplifikaci bylo z důvodu naamplifikování menších fragmentů naváženo 1,5 g agarózy na 100 ml 0,5 × TBE pufru.

Takto připravený roztok byl ohříván v mikrovlnné troubě cca 3x, až do úplného rozpuštění agarózy. Po zchladnutí roztoku na 50-60 °C bylo přidáno do baňky 10 µl interkalačního barviva GelRed®. Takto připravená suspenze byla opatrně nalita do předpřipravené formy, do které byl následně vložen hřebínek. Tuhnutí gelu probíhalo 25-30 minut. Poté byl opatrně vyjmut hřebínek a do jamek byly pipetovány vzorky obsahující produkty PCR o objemu 10 µl a velikostní standard DNA marker FastGene 100 bp, Nippon Genetics o objemu 5 µl. Barvení vzorků nebylo realizováno, protože PPP Master Mix obsahuje barvivo pro přímou vizualizaci PCR produktů.

Vanička s gelem byla umístěna do elektroforetické vany a přelita 0,5 × TBE puftrem asi 1 cm nad výšku gelu. Po připojení ke zdroji napětí bylo zkontrolováno správné zapojení k anodě/katodě a byla spuštěna elektroforéza, která trvala 1,5-2 hodiny při konstantním napětí 75-80 V podle potřeby. Po ukončení byl vypnut zdroj napětí a konektory byly vyjmuty, roztok TBE byl vylit a gel byl vyfotografován pod zdrojem UV záření na přístroji Azure biosystems c200.

4.6 Přečistění PCR produktů po druhé amplifikaci

K přečistění PCR produktů byla použita komerční sada High Pure PCR Product Purification Kit. Produkty PCR obsahující zbytky nukleotidů či primerů a polymerázy bylo žádoucí přečistit. Každá zkumavka s amplikony byla doplněna na objem 100 µl pomocí sterilní PCR vody. Následně do ní byl napipetován speciální pufr o objemu 500 µl, který umožnil navázání DNA na membránu. Zkumavka byla šetrně promíchána. Do prázdných sběrných zkumavek

byly nasazeny filtry s membránou a promíchaný PCR produkt s pufrem byl opatrně nalit na vrchní rezervoár. V dalším kroku byly zkumavky centrifugovány na nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Roztok prošlý membránou byl odstraněn a sběrná zkumavka byla opětovně nasazena na filtr. Následovalo promytí pomocí promývacího pufru, a to celkem 2x. Nejdříve objemem 500 μ l a pak objemem 200 μ l. Po každém promytí byly zkumavky centrifugovány po dobu jedné minuty na maximálních otáčkách a roztok, který prošel membránou byl vždy odlit. Poté byl filtr umístěn na novou sběrnou zkumavku a eluce DNA byla zahájena přidáním elučního pufru o objemu 50 μ l. Takto přečištěný produkt byl následně umístěn v mrazáku k dalšímu použití.

4.7 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Produkty druhé amplifikace byly dále analyzovány pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Tato metoda je schopna detekovat pouze fragmenty do velikosti maximálně 500 bp, a proto byly využity produkty specifické reakce „nested“ PCR s využitím vnitřních primerů.

4.7.1 Průběh DGGE

4.7.1.1 Příprava akrylamidového gelu s lineárním gradientem

V první části byl připraven 40 % polyakrylamidový gel v poměru 19:1 (38 g akrylamidu a 1,07 g bisakrylamidu na 100 ml redestilované vody), který byl dále využíván po celou dobu experimentu. Zásobní roztok byl uchováván v chladu při teplotě 4 °C. Pro analýzu PCR produktů, které dosahovaly velikosti 150-350 bp, byl připravován 10 % polyakrylamidový gel. Na základě současně probíhající práce, byl zvolen vhodný gradient denaturačních činidel a to 20 % a 40 %, jež se ukázal jako vhodný pro analýzu produktů PCR pro kvasinky rodu *Metschnikowia*. Složení vlastního gelu s rozsahem denaturantů je naznačeno v Tabulka 7.

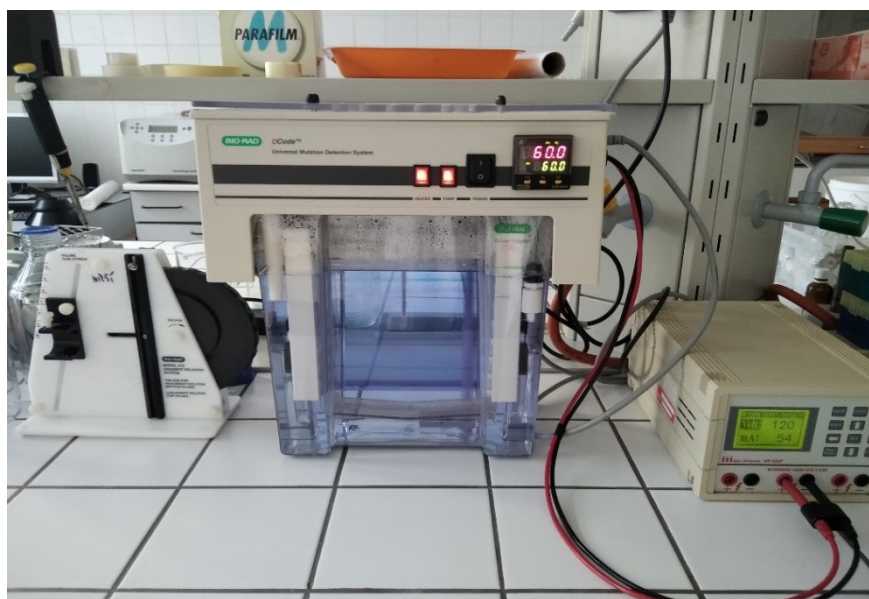
Tabulka 7– složení polyakrylamidového gelu

Koncentrace denaturantů v 10 % roztoku akrylamidu					
Komponenta pro tvorbu gelu	0 %	20 %	25 %	35 %	40 %
40 % AA/BIS (ml)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
50 × TAE pufř (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Formamid (ml)	-	8,0	10,0	14,0	16,0
Močovina (g)	-	8,4	10,5	14,7	16,8
Celkový objem (ml)	100	100	100	100	100

Takto namíchaný gradient pro tvorbu gelu byl uchovávan při teplotě 4 °C k dalšímu použití. Pro přípravu gelu byl nejprve využit 0 % roztok bez obsahu denaturačních činidel, který posloužil k zafixování spodní části, aby nedošlo k vylévání gelu mimo prostor skleněných desek. Po zatuhnutí této vrstvy byl nalit do formy gel s denaturačním gradientem, přičemž tyto roztoky byly nejprve ultrazvukovány, protože přítomné vzduchové bubliny by mohly narušit integritu gelu a nemuselo by dojít k správnému polymerizování. Po odstranění bublin byl do obou kádinek s denaturačními činidly přidán katalyzátor TEMED (N,N'-tetramethyldiamin) o objemu 15 µl a následně iniciátor polymerace persíran amonný (100 mg persíranu na 1 ml redestilované vody) o objemu 90 µl. V tomto okamžiku již byla zahájena polymerizace gelu a bylo nutno pracovat rychle, protože by mohlo dojít k zatuhnutí gelu v injekčních stříkačkách. Do dvou stříkaček následně bylo rychle nasáno zvlášť 15 ml 20 % denaturačního prostředí a 15 ml 40 % denaturačního prostředí. A po odstranění bublin byly stříkačky uchyceny na zařízení k tvorbě gradientu. Pomocí otočného kola byl mezi skleněné desky nalit roztok každého denaturantu a došlo k tvorbě požadovaného gradientu, kdy spodní vrstva představuje nejvyšší gradient (40 %) a vrchní vrstva nejnižší gradient (20 %). Do zalité skleněné formy byl následně vložen hřebínek a gel byl ponechán k polymerizování.

4.7.1.2 Nanášení vzorků a vlastní průběh DGGE

Po polymeraci gelu byl hřebínek z formy vyňat a jamky byly propláchnuty 1 × TAE pufrem a gely byly vloženy do speciální aparatury obsahující 7 l 1 × TAE pufru, přičemž teplota pufru byla vytemperována předem na 60 °C. Do jamek bylo pipetováno 10 µl produktu PCR smíchaného s 2-3 µl nanášecí barvičky, která umožnila vizualizaci při nanášení vzorků. Následovalo připojení aparatury k zdroji napětí na předem nastavený profil mA, V, W. Bylo aplikováno napětí o 120 V a separace byla tímto krokem zahájena.



Obrázek 9 - pohled na aparaturu DGGE s nanesenými vzorky

4.7.1.3 Detekce fragmentů DGGE

Detekce fragmentů byla provedena následovně. Po ukončení vlastní separace byly gely opatrně odděleny od skleněných desek pomocí speciální špachtličky a vloženy do vany obsahující 250 ml 1 × TAE pufru s 50 µl ethidium bromidu (10 mg/ml). Vana byla ponechána k třepání po dobu 20-25 minut a gel byl následně odbarvován po dobu 5 minut. Následovalo pořízení fotografie pod UV zářením v speciální vizualizační komoře a bezpečné odstranění gelu do speciálních nádob.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr kvasinek vystavených stresovým podmínkám

Pro molekulární charakterizaci byly vyselektovány kmeny kvasinek *Metschnikowia andauensis* CCY 029-002-129, *Metschnikowia andauensis* NA1657 11-1241, *Metschnikowia chrysoperlae* CBS 9803 11-1158, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-145, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-147, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-149, *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 11-1250, *Metschnikowia sinensis* CBS 10357 11-1244, *Metschnikowia zizyphicola* CBS 10358 11-1247, které byly kultivovány za různých stresových podmínek. Kultivace probíhaly jako součást jiné souběžně prováděné diplomové práce, jež se zabývá produkcí významných lipidových metabolitů a jejich nadprodukcí. Pro potřeby této práce byly vybrány faktory: osmotický stres (prostředí s vysokou koncentrací NaCl), nutriční stres (zdroj uhlíku představuje konopná mouka / konopné listy a květy) a oxidační stres (přídavek peroxidu vodíku H₂O₂ do produkčního média).

Byly vybrány pouze limitní koncentrace NaCl (12 a 14 % w/v) i H₂O₂ (100 a 200 mM), při kterých ještě kultury vykazovali vitalitu, ale současně docházelo k poklesu buněk o několik řádů. Tyto buňky byly tedy vhodné pro molekulární analýzu, kdy může být patrná změna na úrovni DNA vlivem těchto faktorů. Analyzované byly i buňky kvasinek vystavených nutričnímu stresu, kdy zdrojem glukózy pro růst buněk byla konopná mouka a konopné listy/květy.

5.2 Izolace DNA z vybraných druhů kvasinek vystavených stresovým podmínkám pro potřeby PCR

Pro potřeby nested PCR byla DNA izolována pomocí komerční soupravy DNeasy® UltraClean® Microbial Kit. Tato souprava umožňuje rychlou a pohodlnou extrakci nukleových kyselin z mikrobiálních buněk a poskytuje poměrně čistou DNA pro další analýzu. Výtěžky DNA byly ale nižší a někdy byla koncentrace DNA hraniční pro potřeby PCR, avšak k amplifikaci docházelo i za těchto okolností.

5.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty kvasinkové DNA

Čistota a koncentrace kvasinkové DNA byla ověřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop 2000c. Dále byly analyzovány pomocí PCR i kmeny kvasinek s prahovou koncentrací DNA (pod 10 ng/μl). Využívána koncentrace byla obvykle 10 ng/μl, kdy DNA o vyšších výtěžcích byla vhodně naředěna pomocí EB pufru. Toto množství vyhovuje polymerázové řetězové reakci a je považováno za standardní.

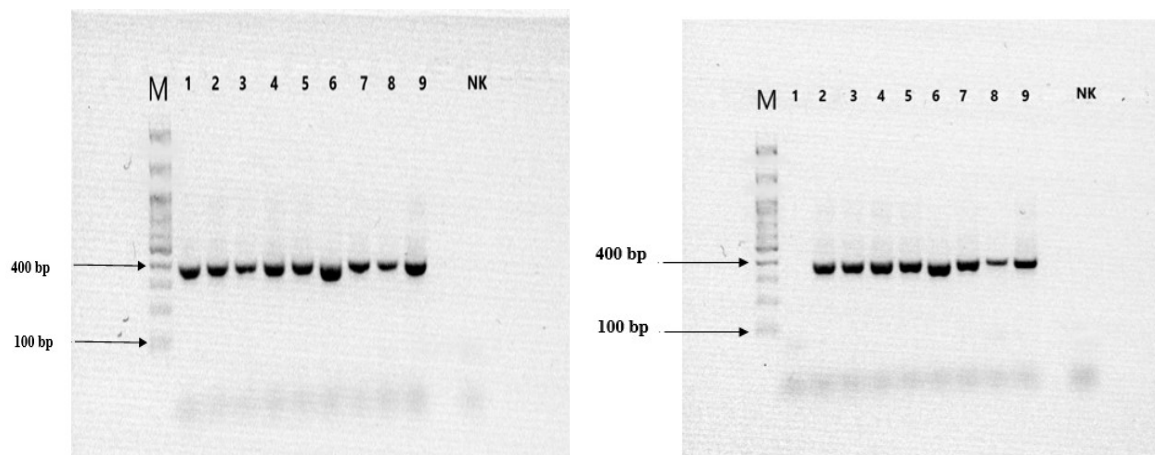
5.4 Nested PCR oblasti ITS1 a ITS2-5,8 rDNA pro vybrané stresové faktory

Pro vyšší citlivost a specifitu byla využívána pro molekulární analýzu dvoukroková nested (hnízdová) PCR. V první části byly pro amplifikaci ITS1 a ITS2 oblastí využity primery ITS1 a ITS4. Teplota nasedání primerů byla stanovena na základě publikací (viz Kapitola 4.5.8) a ověřena pomocí speciálního softwaru, který je schopný přesně stanovit tuto teplotu s ohledem na koncentraci konkrétního primeru v jedné PCR reakci, použití reakčního pufru i druhu Mastermixu. Tato metoda se uplatnila jako spolehlivá, protože vysoce specifikuje průběh reakce a PCR produkty detekované následnou gelovou elektroforézou vykazovali intenzivní charakter po vizualizaci UV světlem. V druhém amplifikačním kroku byly využity dva páry primerů: ITS1-GC/ITS2 pro oblast ITS1 a pro oblast ITS2 5,8-rDNA primery ITS3/ITS4-GC. Tento postup byl zobrazen pro všechny amplifikace kvasinkových kmenů, které byly vystaveny různým stresovým podmínkám.

5.4.1 Nested PCR pro kvasinky vystavené osmotickému stresu

5.4.1.1 Koncentrace NaCl v médiu 12 % w/v a 14 % w/v

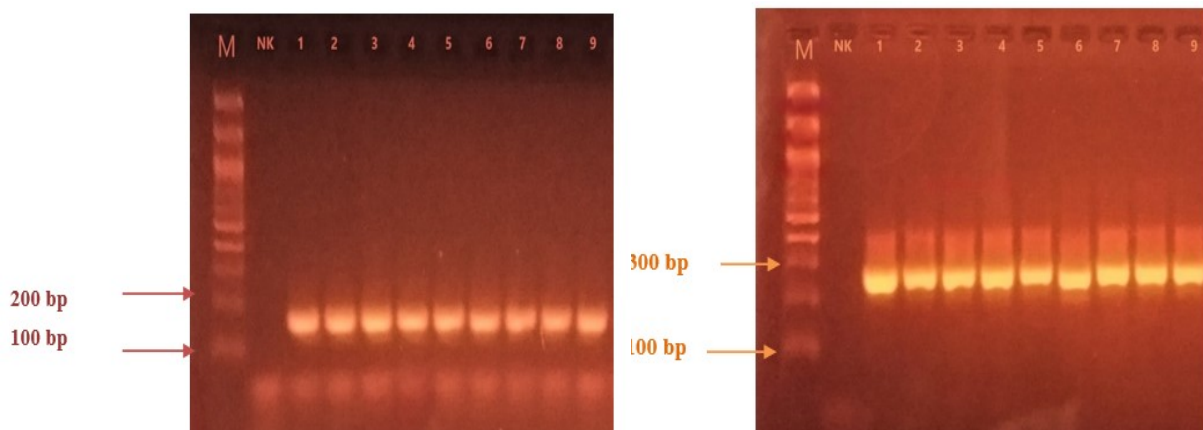
Byla provedena amplifikace oblastí ITS1 a ITS2. V první reakci byl produktem amplikon o velikosti přibližně 350-380 bp vzhledem k velikostnímu markeru, který obsahuje fragmenty od 100-3000 bp. U všech kmenů kvasinek vystavených solnímu stresu byl tento produkt přibližně stejně velký. Pro kontrolu čistoty komponent byla vždy zařazena taky negativní kontrola bez matrice DNA. Označení *M* u každého gelu představuje velikostní standard DNA, zkratka *NK* představuje negativní kontrolu



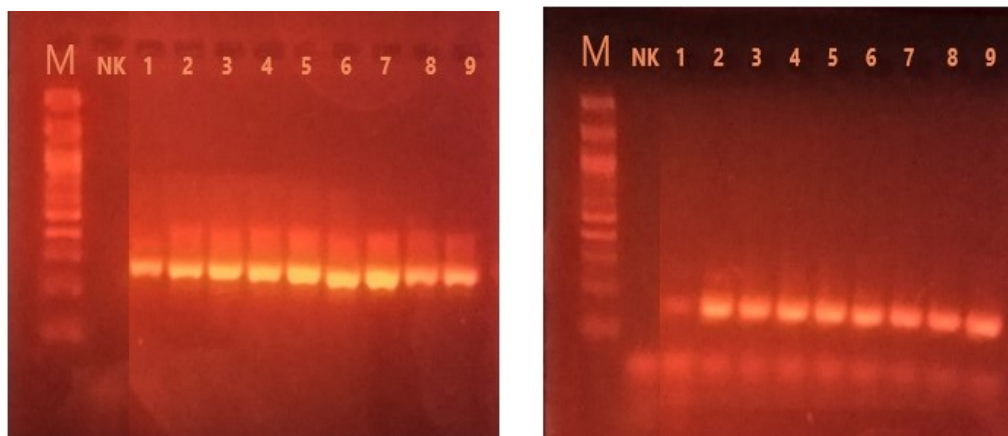
Obrázek 10 – ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky rodu *Metschnikowia*; gel vlevo koncentrace NaCl 12 %, gel vpravo koncentrace NaCl 14 %, vzorky v pořadí 1-9 pro kmeny *M. zizyphicola* (1247), *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. pulcherrima* (147), *M. shanxiensis* (1250), *M. chrysoperlae* (1158), *M. sinensis* (1244), *M. pulcherrima* (145)

U kvasinky *M. pulcherrima* byl detekován produkt o velikosti cca 350-400 bp dle Türkela a Enerové ¹⁰⁰, což nasvědčuje tomu, že amplifikace byla provedena pro tyto kmeny správně a s obdobným výsledkem.

Druhá amplifikace byla realizována s využitím dvou párů primerů, kdy došlo k rozdělení na oblast ITS1 s využitím primerů ITS1-GC/ITS2 a produktem této reakce byl ampikon o velikosti 150 bp. V druhé reakci byla amplifikována i oblast ITS2 5,8-rDNA a produkt PCR reakce dosahoval velikosti přibližně 220-250 bp. Tento produkt vykazoval podobné velikosti v obou případech; jak pro koncentraci NaCl 12 % w/v i 14 % w/v. Produkty druhé amplifikace jsou znázorněny na Obrázku 11.



Obrázek 11 – ověření PCR produktů 2. amplifikace pro kvasinky rodu *Metschnikowia* (12 % NaCl); vzorky v pořadí 1-9 pro kmeny *M. zizyphicola* (1247), *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. pulcherrima* (147), *M. shanxiensis* (1250), *M. chrysoperlae* (1158), *M. sinensis* (1244), *M. pulcherrima* (145)

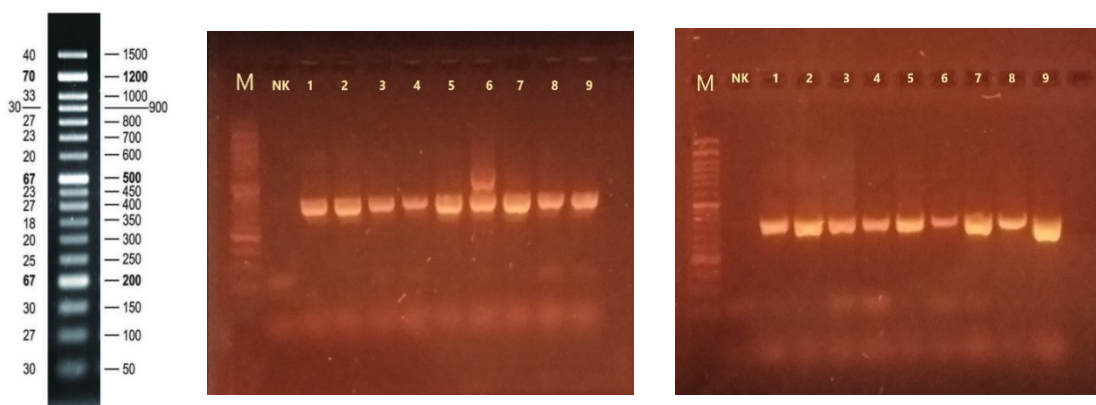


Obrázek 12 – ověření PCR produktů 2. amplifikace pro kvasinky rodu *Metschnikowia* (14 % NaCl); vzorky v pořadí 1-9 pro kmeny *M. zizyphicola* (1247), *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. pulcherrima* (147), *M. shanxiensis* (1250), *M. chrysoperlae* (1158), *M. sinensis* (1244), *M. pulcherrima* (145)

5.4.2 Nested PCR pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu

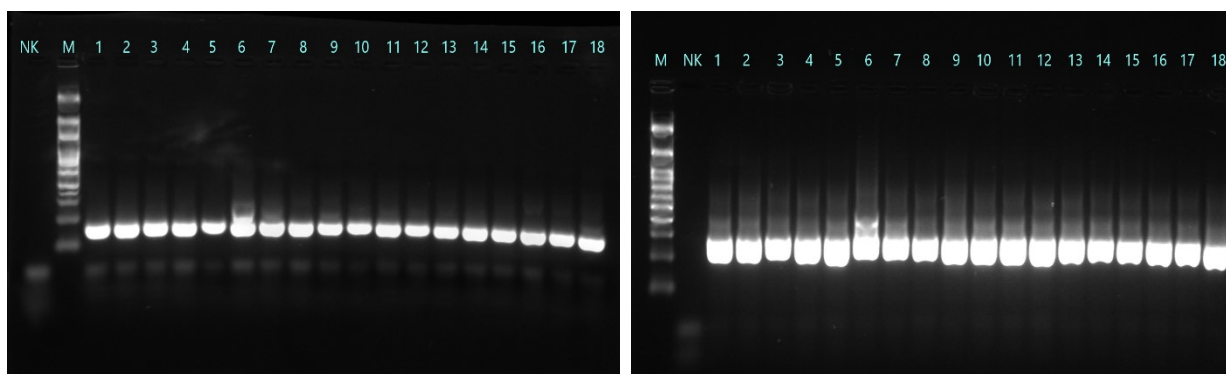
5.4.2.1 Přídavek konopných listů/květů a konopné mouky do produkčního média

U kvasinek vystavených nutričnímu stresu byla rovněž amplifikována ITS1 a ITS2 5,8-rDNA oblast, přičemž produkty první amplifikace dosahovaly podobných velikostí jako v případě osmotického stresu. Byl zvolen DNA marker s dělením 50 bp, který se ukázal jako nevhodný, protože jeho migrace gelem, který dosahoval koncentrace 1,5 %, způsobila rozmytí jeho fragmentů. Na gelu jsou viditelné v některých případech také dimery primerů v spodní části, které mohly vzniknout v důsledku jejich nadbytku v PCR reakci nebo nedostatečně specifické teploty hybridizace primerů.



Obrázek 13 – ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky rodu *Metschnikowia*; gel vlevo nutriční stres L/K, gel vpravo konopná mouka; vzorky jsou v pořadí 1-9 pro kmeny *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. chrysoperlae* (1158), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250)

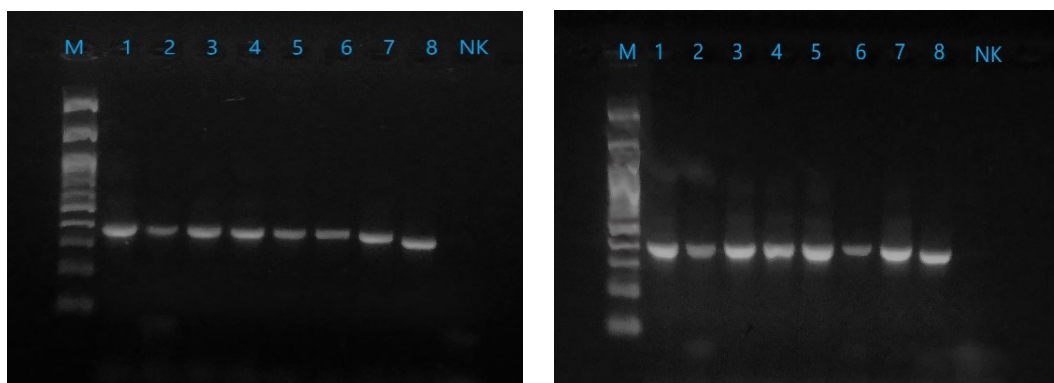
Produkty druhé amplifikace dosahovali stejné velikosti jako v případě analýzy kvasinek vystavených osmotickému stresu. Po rozdělení na oblast ITS1 produkty měli velikost cca 150 bp, u oblasti ITS2 5,8-rDNA dosahovala velikost amplikonů přibližně 250 bp.



Obrázek 14 – ověření PCR produktů horizontální elektroforézou (pořadí 1-9 vzorky konopí list/květ; 10-18 vzorky konopné mouky, pořadí kmenů je shodné jako na Obrázku 13)

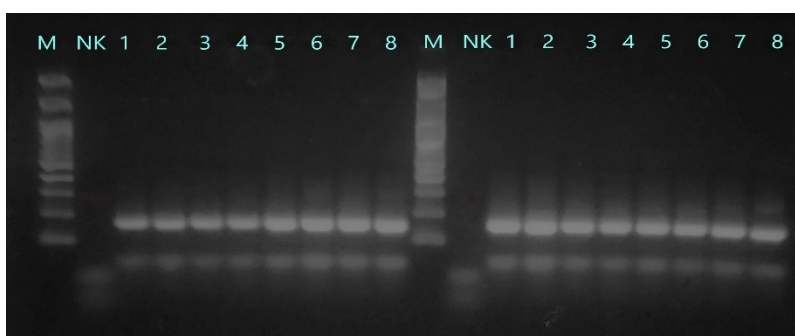
5.4.3 Nested PCR pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu

Pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu byla rovněž provedena nested PCR, a to pro koncentrace peroxidu vodíku H_2O_2 v médiu 100 mM a 200 mM. První amplifikace s vnějšími primery ITS1/ITS4 byla srovnatelná s předešlými experimenty a produkt této reakce dosahoval velikosti přibližně 350-380 bp.

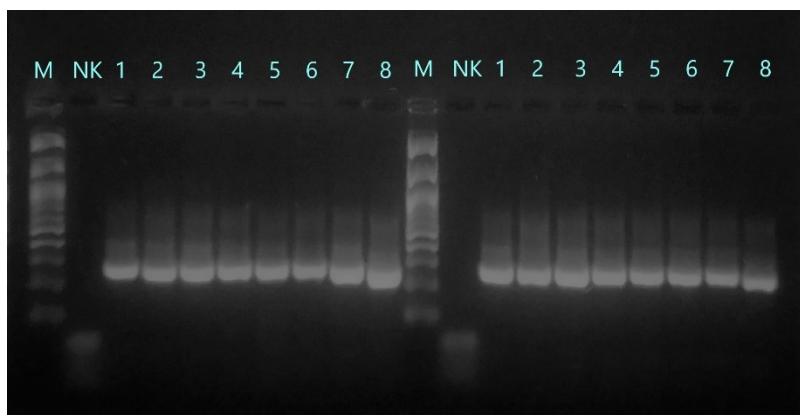


Obrázek 15 - ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky rodu *Metschnikowia*; gel vlevo 100 mM H_2O_2 , gel vpravo 200 mM H_2O_2 ; vzorky jsou v pořadí 1-8 pro kmeny *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250)

Produkty druhé PCR reakce s vnitřními primery dosahovaly dle přiloženého velikostního standardu 150 bp s použitím ITS1-GC/ITS2 a přibližně 250 bp s použitím primerů ITS3/ITS4-GC. Při oxidačním stresu byly PCR produkty srovnatelné velikosti jako u nutričního/osmotického stresu.



Obrázek 16 - PCR produkty 2. amplifikace oblasti ITS1 v pořadí 1-8 pro kmeny *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), vlevo koncentrace H_2O_2 100 mM, vpravo koncentrace H_2O_2 200 mM



Obrázek 17 - PCR produkty 2. amplifikace oblasti ITS2-5,8 rDNA v pořadí 1-8 pro kmeny *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), vlevo koncentrace H_2O_2 100 mM, vpravo koncentrace H_2O_2 200 mM

5.5 Nested PCR D1/D2 oblasti 26S rDNA pro vybrané stresové faktory

U kvasinek rodu *Metschnikowia* vystavené stresovým podmínkám, byla rovněž analyzována oblast 26S rDNA, konkrétně úsek s geny kódujícími D1/D2 domény. Pro reakci byly vybrány univerzální eukaryotické primery NL1 a NL4, které jsou využívány standardně pro analýzu kvasinkových a fungálních společenstev¹⁰³.

Průběh amplifikace byl realizován za stejných podmínek jako při analýze oblasti ITS1 a ITS2, tedy ve dvoukrokovém uspořádání zabezpečujícím specifický průběh reakce. DNA vyizolovaná komerčním kitem byla použita pro první PCR reakci jako templátová matrice. Pro následnou analýzu s vnitřními primery byl použit produkt první amplifikace a k primeru NL1 byla zaražena GC svorka, druhý přímý primer, který se zúčastnil reakce byl LS2.

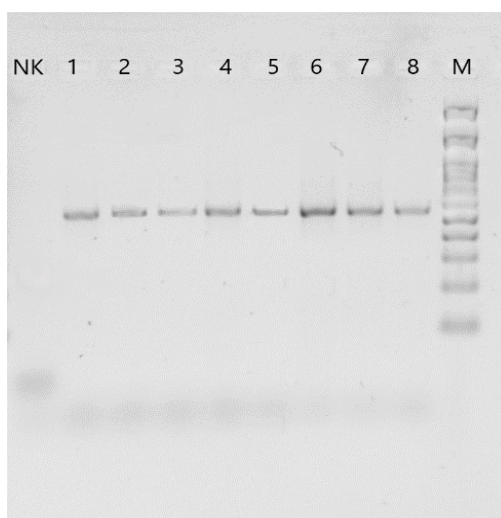
5.5.1 Nested PCR pro kvasinky vystavené osmotickému, nutričnímu a oxidačnímu stresu (D1/D2)

Po první amplifikaci byla velikost PCR produktů ověřena pomocí horizontální gelové agarózové elektroforézy. Výsledný amplikon dosahoval velikosti přibližně 500-550bp, co koresponduje s publikacemi, kde byl tento produkt stejně velký při analýze DNA kvasinek rodu *Metschnikowia*, kde velikost amplikonu byla stanovena na 517 bp¹⁰⁴. Nebyla provedena PCR reakce pro různé koncentrace soli či peroxidu jako v případě analýz oblasti ITS regionů, byly uvažovány pouze nejvyšší koncentrace, jelikož se na úrovni DNA v předchozích případech nepředkázaly signifikantní změny při srovnání s kvasinkami nepodléhajícími stresovým podmínkám (produkty PCR-DGGE). U nutričního stresu byly analyzovány kmeny kvasinek, kdy do média byly přidány konopné listy a květy.

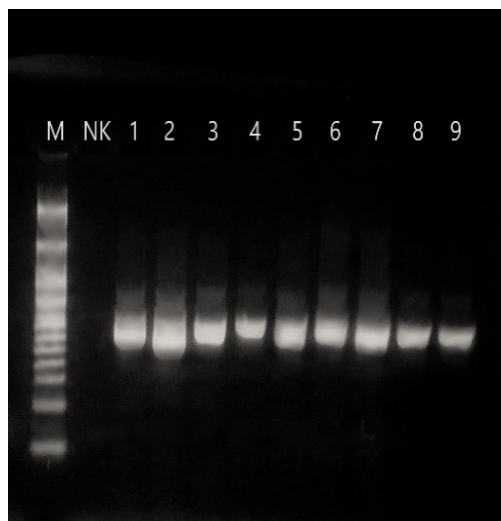
Amplifikace byla úspěšná již po prvním provedení, proto nebylo nutné optimalizovat podmínky reakce jako annealingová teplota apod. Produkty první amplifikace jsou součástí Obrázku 18, 19, 20. Pořadí jednotlivých kmenů, jež jsou součástí gelů jsou uvedeny v Tabulka 8.

Tabulka 8 – pořadí kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia* na agarózovém gelu

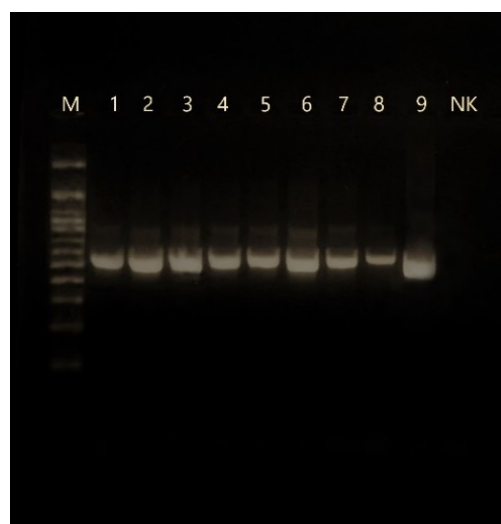
1	<i>Metschnikowia andauensis</i> CCY 029-002-129
2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CCY 029-002-145
3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CCY 029-002-147
4	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CCY 029-002-149
5	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i> CBS 9803 11-1158
6	<i>Metschnikowia andauensis</i> NA1657 11-1241
7	<i>Metschnikowia sinensis</i> CBS 10357 11-1244
8	<i>Metschnikowia zizyphicola</i> CBS 10358 11-1247
9	<i>Metschnikowia shanxiensis</i> CBS 10359 11-1250
M	Velikostní marker Fast Gene 100 bp
NK	Negativní kontrola



Obrázek 18 – ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu (H_2O_2 200 mM)

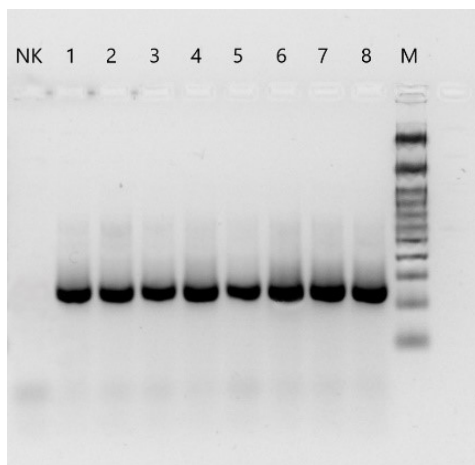


Obrázek 19 – ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu (list/květ)

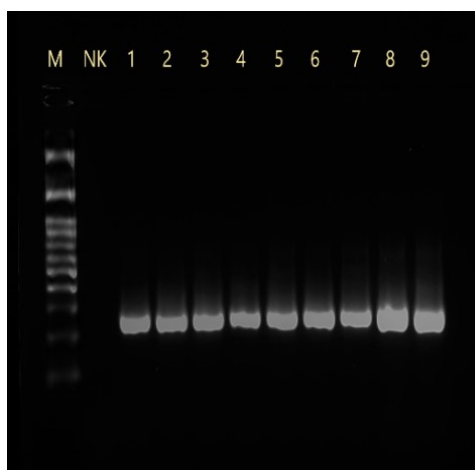


Obrázek 20 – ověření PCR produktů 1. amplifikace pro kvasinky vystavené osmotickému stresu (NaCl 14 % w/v)

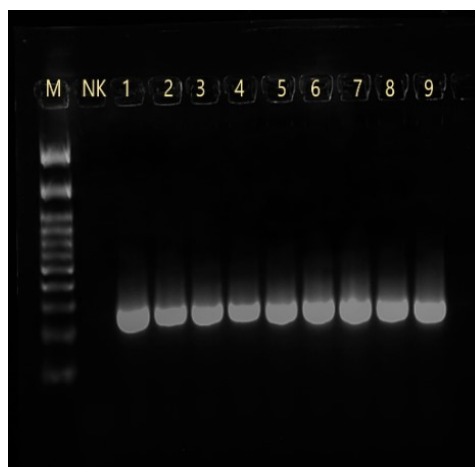
Následně byly tyto produkty první amplifikace použity jako templátové DNA fragmenty pro druhou amplifikaci k specifičtější analýze. Výsledkem jsou PCR produkty velikosti 200-250 bp u všech analyzovaných kmenů kvasinek vystavených různým stresovým podmínkám. Pro obě amplifikace byl připraven agarózový gel o koncentraci 1,5 %, který se osvědčil jako nejvhodnější vzhledem k uspokojivé separaci velikostnímu standardu. Pořadí jednotlivých kmenů (1-9) je identické jako v případě první amplifikace (viz Tabulka 8).



Obrázek 21 – ověření PCR produktů 2. amplifikace pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu (H_2O_2 200 mM)



Obrázek 22 – ověření PCR produktů 2. amplifikace pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu (konopí list/květ)



Obrázek 23 – ověření PCR produktů 2. amplifikace pro kvasinky vystavené osmotickému stresu (NaCl 14 % w/v)

5.6 Analýza PCR produktů oblastí ITS1, ITS2-5,8 rDNA a D1/D2 26S rDNA pomocí metody DGGE

Pro detekci PCR produktů z 2. amplifikace byla využita molekulární technika DGGE, která představuje velice přesnou metodu pro identifikaci mikrobiálních společenstev. Jelikož produkty druhé amplifikace dosahovali velikosti 150-250 bp, je tato metoda vhodnou pro jejich analýzu. Podmínky separace byly stanoveny v současně probíhající práci zabývající se optimalizací této metody na kvasinky kultivované za optimálních podmínek. Tyto podmínky byly využity pro kvasinky vystavené stresovým podmínkám, protože se jedná o stejné kvasinkové kmeny. V první fázi byly připravovány polyakrylamidové gely s rozsahem gradientu denaturačních činidel 20-40 %. Tento gradient byl po několika měřeních ještě zúžen na koncentraci denaturačních činidel 25-35 %, aby bylo možné pozorovat případné změny u kvasinek vystavených stresovým faktorům. Pro názornější ukázkou jsou vždy vedle sebe řazeny vzorky reference (optimalizované podmínky kultivace) a příslušný kmen kvasinky vystavené danému stresovému faktoru. Směr řazení těchto kmenů je vždy zleva doprava (129→1250).

Optimální trvání separace fragmentů bylo zvoleno na 6 hodin.

DGGE nebyla provedena pro všechny koncentrace stresových faktorů, pouze pro limitní koncentrace soli, peroxidu a pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu (konopné listy/květy).

Tabulka 9- značení kvasinkových kmenů na polyakrylamidovém gelu

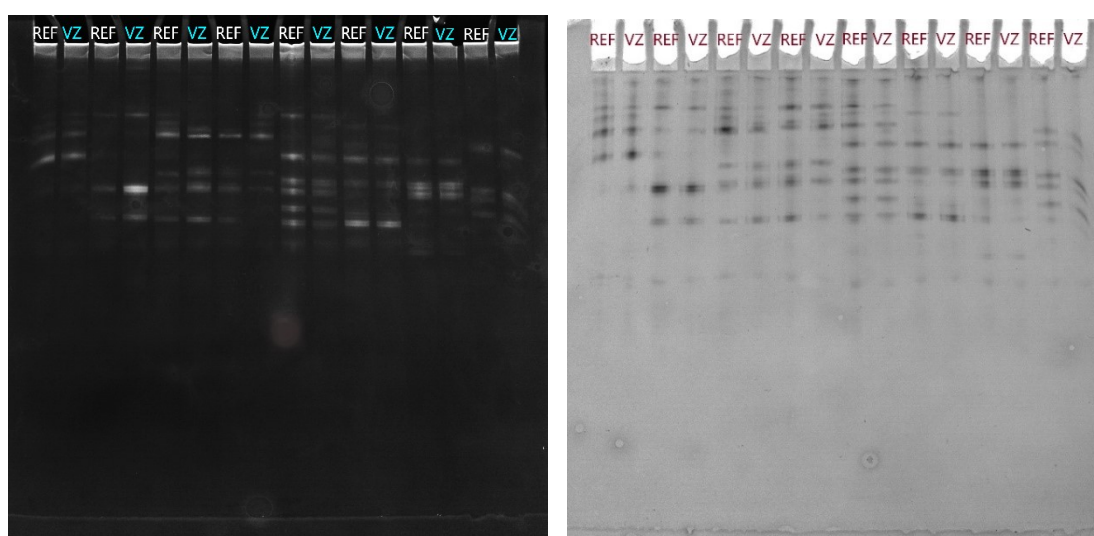
Vzorek (VZ)	Reference (REF)
<i>M. andauensis</i> 129	<i>M. andauensis</i> 129
<i>M. pulcherrima</i> 145	<i>M. pulcherrima</i> 145
<i>M. pulcherrima</i> 147	<i>M. pulcherrima</i> 147
<i>M. pulcherrima</i> 149	<i>M. pulcherrima</i> 149
<i>M. andauensis</i> 1241	<i>M. andauensis</i> 1241
<i>M. sinensis</i> 1244	<i>M. sinensis</i> 1244
<i>M. zizyphicola</i> 1247	<i>M. zizyphicola</i> 1247
<i>M. shanxiensis</i> 1250	<i>M. shanxiensis</i> 1250

5.6.1 DGGE produktů PCR po druhé amplifikaci – oblast ITS1

Tento experiment byl realizován až ve finální části analýz regionů ribosomální DNA z důvodů přítomnosti většího množství bandů, než je při těchto analýzách obvyklé. Jelikož se ani po vícenásobném přečištění PCR produktů neprokázalo, že by existovaly souvislosti mezi produktem obsahujícím zbytky primerů, dimerů primerů a mezi množstvím těchto bandů, bylo vzhledem k těmto skutečnostem zkoumáno, jaká opodstatnění mohou tyto bandy mít. Sekvence jsou v každém ohledu však velice příbuzné, a je možné, že by se v případě aplikování velkého rozsahu gradientu ani neukázaly jako jednotlivé frakce nýbrž jako jeden diskrétní band.

V dostupné literatuře se uvádí, že v některých případech může nastat situace, kdy se produkty amplifikace oblasti ITS1 u eukaryotických společenstev vyskytují i u stejného taxonomického druhu ve vícero divergentních kopiích. Toto vysvětlení lze považovat za relevantní, protože v amplifikační části nebyly pozorovány žádné mnohonásobné frakce, které by indikovaly nesprávné podmínky PCR reakce. Jelikož i purifikační souprava dokáže od PCR produktu oddělit i primery i jiné zbytky po PCR reakci, není pravděpodobné, že by docházelo k rušení z těchto důvodů^{105, 106}. Další zajímavou skutečností je, že se u jednotlivých kvasinkových kmenů neopakuje stejný vzorec, co se týče interpretace bandů na gelu a je tedy možné, že každý tento kmen obsahuje v této oblasti kopie o odlišném zastoupení jednotlivých bází. V každém případě, porovnáním referenčního kmenu se vzorkem sledované kvasinky vystavené stresovému faktoru jsou tyto podobnosti sekvencí vysoké. Dle Sipiczkeho se při analýzách oblastí ITS1 a ITS2 pomocí sekvenování u klonů kvasinek *M. fructiola* a *M. andauensis* ITS1 úsek jevil jako mnohem rozmanitější než ITS2 segmenty⁴⁴.

Tyto poznatky by mohly být dobrým základem pro výzkum této oblasti u kvasinek rodu *Metschnikowia* v navazujících pracích. Pro specifitější průběh reakce by bylo vhodné navrhnout primery pro tyto úseky s využitím dostupných databází a nahradit tak univerzální primery pro identifikaci fungálních eukaryotických společenstev.

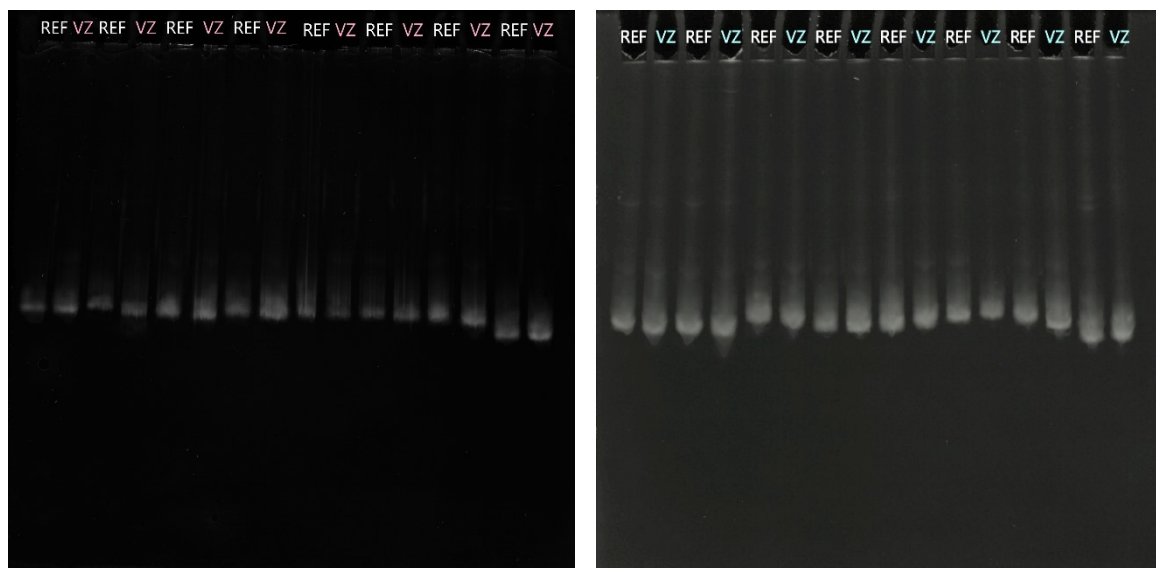


Obrázek 24 – ukázka ITS1 regionů u kvasinek vystavených osmotickému stresu (vlevo) a nutričnímu stresu (vpravo), 120 V, 90 mA, 6 hodin

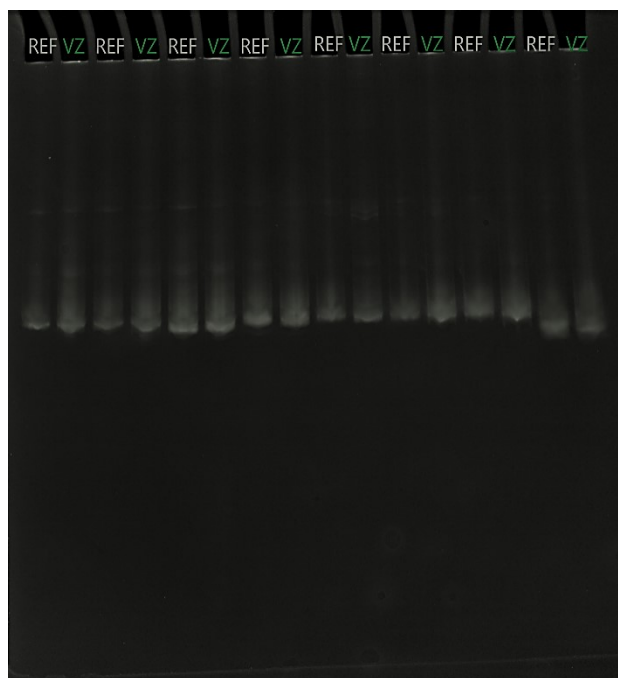
5.6.2 DGGE produktů PCR po druhé amplifikaci – oblast 5,8-ITS2 rDNA

Oblast 5,8-ITS2 představuje delší úsek než výše zmíněná oblast ITS1 a produkty PCR reakce dosahovaly přibližně 250 bp, proto se nabízí také využití této metody k bližší a specifitější analýze sekvencí. Bylo využito 8 kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia* (viz výše) ve stejném uspořádání referenčních vzorků a vlastních vzorků. Podmínky reakce byly následovny: gradient 20-40 % resp. 25-35 %, 120 V, 90 mA, délka separace 6 hodin.

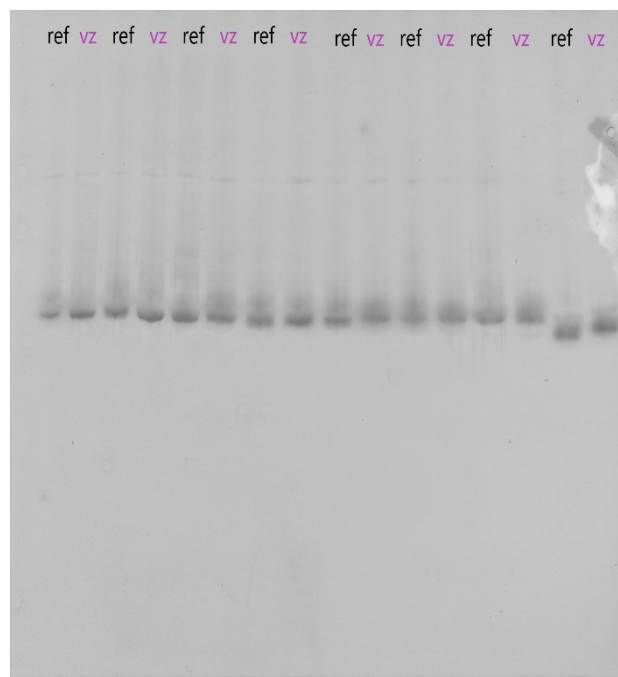
Na Obrázku 25 je možné pozorovat oblast 5,8-ITS2 rDNA kvasinek vystavených osmotickému stresu. Je zřejmé, že při použití gradientu 20-40 % nelze jednotlivé druhy od sebe odlišit, proto byl následně aplikován na další stresové faktory užší gradient 25-35 %, který umožnil vzájemné odlišení těchto kmenů. Sekvence jsou velice příbuzné, ale je patrné, že se minimálně o jednu bázi odlišují. Region 5,8-ITS2 rDNA vykazuje relativně vysokou variabilitu v rámci jednotlivých druhů a pomocí analýzy této oblasti by mělo být možné tyto druhy od sebe vzájemně odlišit ¹⁰⁷. Ve srovnání s oblastí ITS1 zmíněné v předešlé kapitole, nejsou v tomto případě přítomné mnohonásobné frakce bandů a kvasinky jsou si velice příbuzné. Pro popis je tedy analýza této oblasti názornější a spolehlivější jako v případě ITS1. Nebyly detekovány žádné změny ve srovnání s referenčními kvasinkami stejných kmenů, proto lze konstatovat, že tato oblast nebyla vlivem stresových faktorů narušena a produkty PCR reakce mají stejné sekvence jak v případě nutričního, tak oxidačního i osmotického stresu. Kvasinky *Metschnikowia* lze proto považovat za velice odolné a adaptabilní druhy na stresové prostředí. Je možné, že došlo k změnám v jiných částech genomu, analýza jiných částí genomu však nebyla náplní této práce. Při první analýze byly ještě studovány i nižší koncentrace peroxidu (100 mM), v dalších experimentech však již nižší koncentrace nebyly využívány, protože se změny neprojevovali ani při nejvyšších koncentracích stresového faktoru.



Obrázek 25 – DGGE oblastí 5,8-ITS2 rDNA, vlevo koncentrace H_2O_2 100 mM, vpravo koncentrace H_2O_2 200 mM



Obrázek 26 - DGGE oblastí 5,8-ITS2 rDNA, nutriční stres (konopné listy a květy)



Obrázek 27 - DGGE oblastí 5,8-ITS2 rDNA, osmotický stres NaCl (14 % w/v)

5.7 Analýza PCR produktů D1/D2 oblasti 26S rDNA

Pro analýzu vysoce konzervativních oblastí velké ribosomální podjednotky (D1/D2 úsek) byly vybrány limitní koncentrace stresových faktorů působících na kvasinky rodu *Metschnikowia*. Součástí prvního experimentu bylo vhodně aplikovat vybraný gradient a usoudit, zda je postačující pro další analýzy. V předchozích experimentech bylo zjištěno, že i prostředí s vysokou koncentrací soli/peroxidu či suplementací nutrientu, nedochází ke změnám na úrovni genomové DNA při amplifikaci oblastí ITS1 a ITS2-rDNA, proto byly vybrány jenom limitní koncentrace.

Na produkty PCR o velikosti cca 220-250 bp byl aplikován tentýž gradient (25-35 %) jako při předchozích experimentech a tento se osvědčil jako vhodný. Doba trvání separace PCR fragmentů v prostředí denaturačních činidel byla taky realizována po dobu 6 hodin. Značení je analogické jako v předchozích pokusech při analýze ITS regionů, tedy vzorek reference a následně vlastní vzorek kvasinky vystavené stresovému faktoru.

POZN: REF-referenční kmen kvasinky kultivované za optimálních podmínek, VZ-vlastní vzorek

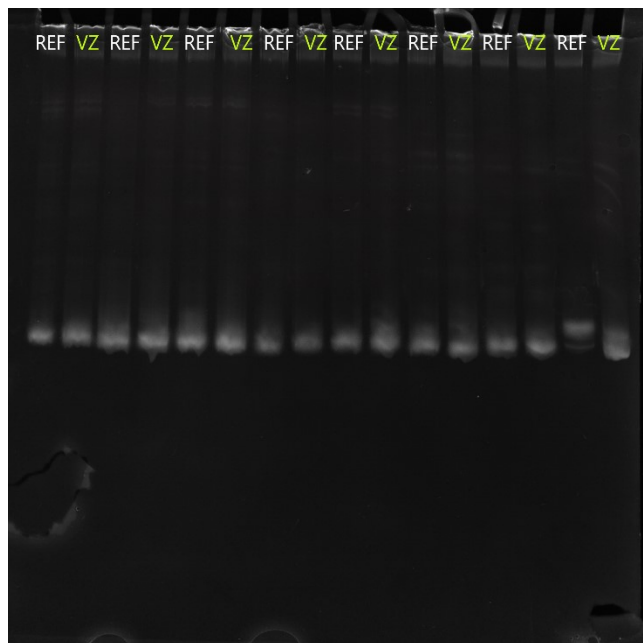
Tabulka 10 - značení kvasinkových kmenů na polyakrylamidovém gelu

Vzorek (VZ)	Reference (REF)
<i>M. andauensis</i> 129	<i>M. andauensis</i> 129
<i>M. pulcherrima</i> 145	<i>M. pulcherrima</i> 145
<i>M. pulcherrima</i> 147	<i>M. pulcherrima</i> 147
<i>M. pulcherrima</i> 149	<i>M. pulcherrima</i> 149
<i>M. andauensis</i> 1241	<i>M. andauensis</i> 1241
<i>M. sinensis</i> 1244	<i>M. sinensis</i> 1244
<i>M. zizyphicola</i> 1247	<i>M. zizyphicola</i> 1247
<i>M. shanxiensis</i> 1250	<i>M. shanxiensis</i> 1250

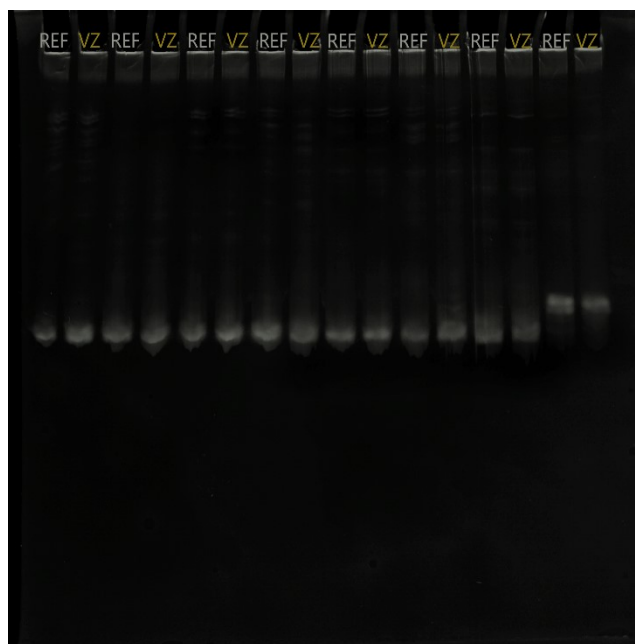
Geny kódující D1/D2 domény představují vysoce konzervativní oblasti a jsou vhodné k analýze mikrobiálních společenstev na úrovni rodů. Vzhledem k této skutečnosti je možné konstatovat, že všechny druhy kvasinek, které byly analyzovány, vykazují vysokou podobnost, což dokládá Obrázek 28, 29, 30. Jediným druhem, který vykazuje odlišnost je kvasinka *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 11-1250. Není zřejmé, proč tato kvasinka ve všech experimentech při analýze D1/D2 26S rDNA vykazovala jistou odlišnost od jiných druhů. Jelikož se tato změna projevuje i u kmenu rostoucího za optimálních podmínek, nelze to považovat za mutaci vlivem stresového faktoru a pravděpodobně se tento kvasinkový druh odlišuje od ostatních kvasinek právě v této oblasti. Podle přiloženého obrázku se dá konstatovat, že denaturace molekuly DNA/PCR produktu nastala v prostředí s gradientem 30 % denaturačních činidel. Byly pozorovány i jiné bandy v nízké koncentraci, které ale nejsou součástí interpretace ohledně kvasinek rodu *Metschnikowia*. Mohlo se jednat o dimery primerů, jelikož jejich velikost by v případě zařazení GC svorky tomu odpovídala. Všechna tvrzení uvedená výše se vztahují i na kvasinky vystavené nutričnímu i osmotickému stresu, proto nebyly v práci komentovány odděleně. Na další straně jsou znázorněny fotografie polyakrylamidových gelů s PCR produkty výše zmíněného úseku D1/D2 26S rDNA.



Obrázek 28 – DGGE PCR produktů D1/D2 oblastí pro kvasinky vystavené oxidačnímu stresu (H_2O_2 200 mM), 120 V, 90 mA, 6 hodin pořadí viz Tabulka 10



Obrázek 29 – DGGE PCR produktů D1/D2 oblastí pro kvasinky vystavené nutričnímu stresu (konopné listy a květy), 120 V, 90 mA, 6 hodin Tabulka 10



Obrázek 30 – DGGE PCR produktů D1/D2 oblastí pro kvasinky vystavené osmotickému stresu (NaCl 14 %), 120 V, 90 mA, 6 hodin Tabulka 10

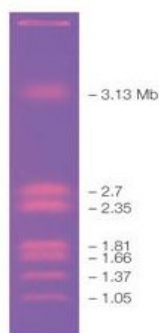
5.8 Karyotypová charakterizace kvasinek rodu *Metschnikowia* vystavených stresovým faktorům

Analýza karyotypu kvasinek rodu *Metschnikowia* byla realizována pomocí pulzní gelové elektroforézy pro vybrané kvasinky vystavené stresovým faktorům. Karyotyp těchto kvasinek ještě není kompletně vyřešen a doposud byly popsány pouze některé druhy, přičemž počty chromozomů i jejich velikosti jsou značně odlišné. Podle databáze NCBI se podařilo u kvasinky *Metschnikowia reukaufii* separovat 8 haploidních chromozomů, ale předpokládá se, že jich může být i větší množství. Uvádí se, že velikost jejich genomu se může dostat až na 30 Mbp.¹⁰⁸

Pro tyto experimenty byl využit izolační postup založený na předešlých pracích, které se věnují charakterizaci těchto kvasinek pomocí PFGE, které byly kultivovány za optimálních podmínek. Kvasinky vystavené stresovým faktorům mohou vykazovat jiné vlastnosti, zejména mohou ve stresových podmínkách zapojit své obranné mechanismy a neumožnit pak narušení buněčné stěny, jako u kvasinek, rostoucích za optimálních podmínek. Buňky se mohou adaptovat na stresové prostředí a nemusí dojít k dezintegraci buněčné stěny, nebo naopak, může dojít k narušení integrity genomové DNA či fragmentaci.

Pro izolaci genomové DNA bylo využito optimální množství $1,0-1,3 \cdot 10^9$ jednotlivých buněk. Podmínky byly pro kvasinky upravovány, až dokud nebylo dosaženo uspokojivé separace chromozomů. Po několika neúspěšných experimentech byla zapůjčena hexagonální elektroda i s aparaturou z Akademie věd ČR. Následující separace byly pak už efektivnější, ale pořád nedocházelo k separaci jednotlivých chromozomů. Z tohoto důvodu byl připravován agarózový gel s koncentrací 0,8 %, jež se ukázal jako vhodný pro migraci molekul DNA. Upraveno bylo také prostředí pro rozpuštění agarózy a byl využit $0,5 \times$ TBE pufr. Za těchto podmínek byly pak realizovány všechny experimenty. Na základě dostupné literatury bylo z odhadované velikosti genomu kvasinek rodu *Metschnikowia* přizpůsobeno napětí na 50 V, což představuje poměrně nízkou hodnotu ve srovnání se separacemi jiných kvasinek¹⁰⁹. Výše zmíněné optimalizace umožnili uspokojivou separaci chromozomů navzdory působícím stresovým podmínkám.

Ke srovnání velikosti chromozomů byl využit CHEF DNA Size Marker kvasinky *Hansenula wingei* obsahující 7 chromozomů o velikostech 3,13 Mb, 2,7 Mb, 2,35 Mb, 1,81 Mb, 1,66 Mb, 1,37 Mb a 1,06 Mb.



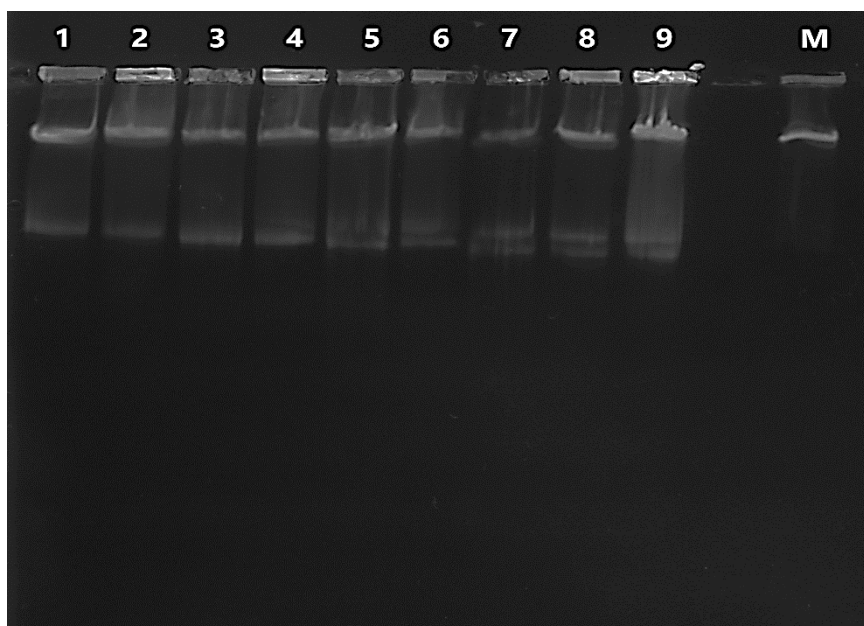
Obrázek 31– velikostní standard kvasinky *H. wingei*

5.8.1 Analýza karyotypu kvasinek vystavených osmotickému stresu

První experiment byl realizován pro kvasinky vystavené nízké koncentraci NaCl (8 %), aby bylo možné ověřit, zda lze použít běžný izolační postup jako pro kvasinky kultivované za optimálních podmínek. Bylo využito 9 kmenů kvasinek rodu *Metschnikowia* (viz Kap. 4.3). Analýza pomocí PFGE byla realizována za podmínek uvedených v Tabulka 11.

Tabulka 11 - podmínky separace pomocí PFGE (osmotický stres)

Doba separace [h]	Doba trvání pulzu [s]	Vložené napětí [V]
24	2 400	60
23	3 000	60
23	3 300	60



Obrázek 32 – PFGE pro kvasinky vystavené stresovým podmínkám (8 % NaCl), v pořadí kmenů 1-9, *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. chrysoperlae* (1158), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), M – velikostní marker chromozomů *H. wingei*, koncentrace agarózového gelu 1,0 %

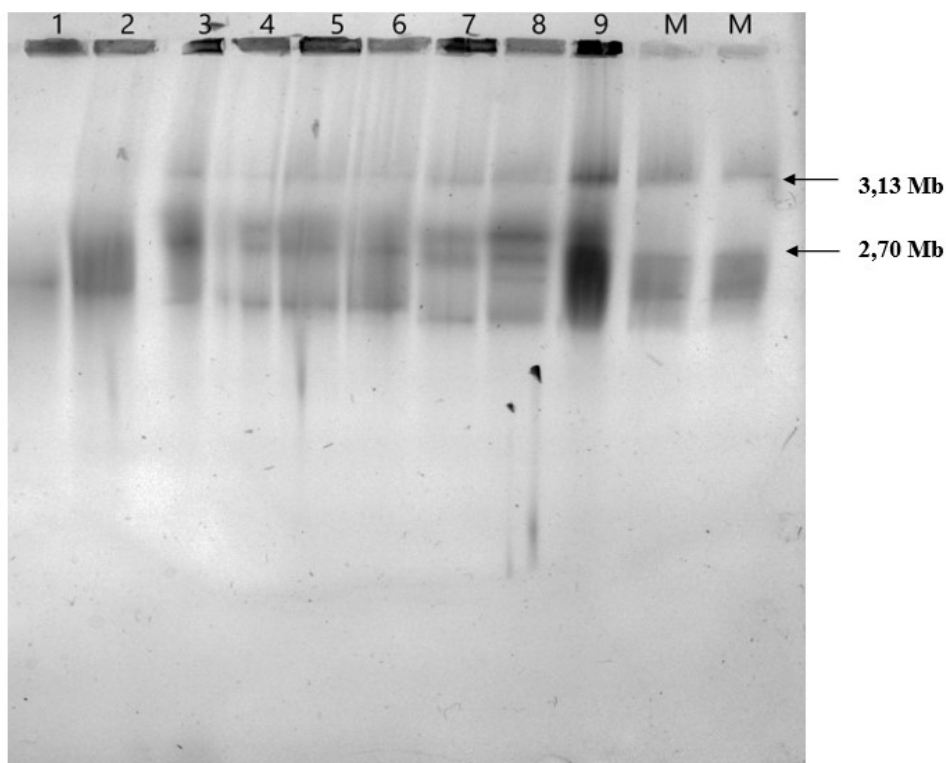
Z Obrázku 32 je možné konstatovat, že v drahách 1-4 byly separovány za daných podmínek pouze dvě frakce chromozomů, u drah 5-9 můžeme pozorovat tři chromozomy. Jelikož jsou chromozomy o větší velikosti intenzivnější svítivosti, lze uvažovat krátký čas pro separaci a tím pádem jejich nedostatečné rozdělení v gelu. Nedošlo taky k rozdělení chromozomů u velikostního standardu, a proto jsou tyto podmínky považovány za nevhodné a nebyly dále

aplikovány. Vzhledem k tomu, že standard nebyl rozdělen, není tedy možné určit ani velikost kvasinkových chromozomů.

V dalším z pokusů byly využity tytéž kmeny kvasinek vystavené slabému osmotickému stresu (8 % NaCl) a separace chromozomů byla mnohem efektivnější. Pro karyotypovou analýzu byl namíchán 0,8 % gel s nižší koncentrací agarózy, který umožnil lepší migraci molekul DNA gelem. Bylo rovněž aplikováno nižší napětí a doba separace byla prodloužena na 118 hodin (podmínky viz Tab). V drahách 3-9 lze pozorovat největší chromozom vzhledem k velikostnímu standardu o velikosti přibližně 3,13 Mb. U kmenů *M. andauensis* (129) a *M. pulcherrima* (145) tento chromozom není pozorován. Dále je z obrázku možné konstatovat, že se chromozomy kvasinek v běžích 3-9 nacházejí v oblasti mezi 3,13 a 2,70 Mb, v tomto případě není zcela jasné, jaká by mohla být jejich velikost. Vzhledem k standardu *H. wingei* je pozorován další chromozom u kvasinek v drahách 7-8, který dosahuje velikosti 2,7 Mb. Standard však nebyl dostatečně rozdělen a pro další experimenty byl pořízen nový standard tytéž kvasinky *H. wingei*, protože tyto standardy mají omezenou skladovatelnost a DNA může postupně degradovat. Celkem je tedy možné pozorovat od 1-5 chromozomů. Kvasinky, u kterých je přítomnost pouze 1 chromozomu nebo šmouhy, mohly být vlivem stresových faktorů již ovlivněny a nemuselo tedy dojít k zachování intaktnosti jejich DNA.

Tabulka 12 – podmínky separace pomocí PFGE (osmotický stres)

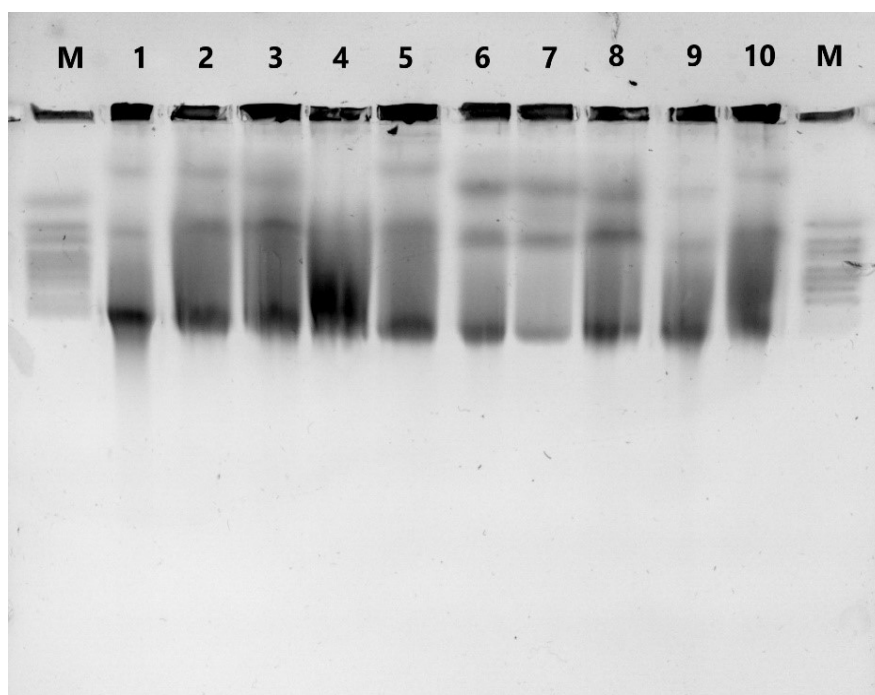
Doba separace [h]	Doba trvání pulzu [s]	Vložené napětí [V]
48	2 400	50
35	3 000	50
35	3 300	50



Obrázek 33 - PFGE pro kvasinky vystavené stresovým podmínkám (8 % NaCl), v pořadí kmenů 1-9, *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. chrysoperlae* (1158), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), M – velikostní marker chromozomů *H. wingei*, koncentrace agarózového gelu 0,8 %

Byl proveden i experiment s vyššími koncentracemi NaCl (12 a 14 % w/v) s vybranými kvasinkovými druhy. Jako zástupci byly vybrány kmeny *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. chrysoperlae* (1158), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250). Podmínky separace byly stejné jako u kvasinek vystavených 8 % osmotickému stresu (viz Tabulka 12). Na Obrázku 34 možno pozorovat u téměř všech kvasinek po 3 chromozomy, přičemž na pátém běhu lze pozorovat i posun, který by mohl indikovat změnu ve velikosti chromozomů. Protože ale byl standard umístěn i na poslední pozici, a posun je patrný i v rámci něho, tato skutečnost tak ztrácí své opodstatnění a souvisí pravděpodobně se stářím elektrody nebo nehomogenitou elektrického pole udělujícího pulzy soustavy.

Dle velikostního markeru frakce chromozomů dosahují velikosti větší než 3,13 Mb, dále byly pozorovány chromozomy odpovídající přibližně velikosti cca 2,35-2,7 Mb. Nejmenší detekovaný chromozom dosahuje velikosti přibližně 1,05 Mb u všech studovaných kmenů (kromě kvasinky v dráze 4), které byly vystaveny silnějšímu osmotickému prostředí.



Obrázek 34 – PFGE pro kvasinky vystavené osmotickému stresu; 1-5 koncentrace NaCl 12 % v pořadí *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. chrysoperlae* (1158), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250); 6-10 koncentrace NaCl 14 %, pořadí kmenů analogicky, M-velikostní marker *Hansenula wingei*

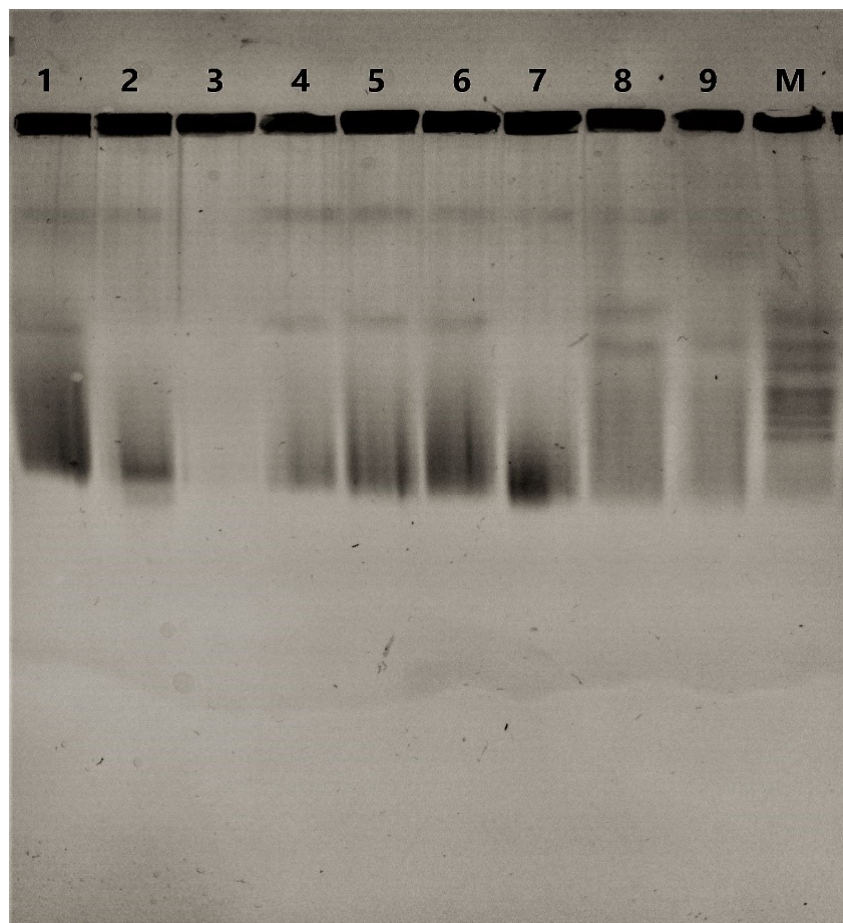
5.8.2 Analýza karyotypu kvasinek vystavených nutričnímu stresu

Pro karyotypovou analýzu kvasinek rodu *Metschnikowia* byly vybrány kvasinky vystavené nutričnímu stresu a izolace genomové intaktní DNA byla provedena pro ty druhy, které rostly v médiu s přidavkem konopných listů a květů. Z Obrázku 34 je patrné, že DNA u některých kmenů vykazuje známky degradace, dokonce v běhu 3 není detekovatelný žádný band. Z toho plyne, že tento kmen kvasinky se buď přizpůsobil stresovému faktoru a nedošlo k dezintegraci buněčné stěny z důvodu využití ochranných faktorů buňky, anebo došlo k narušení integrity DNA, a tudíž se nedala detekovat ve formě diskrétních chromozomů.

U ostatních kvasinek je možné pozorovat chromozomy větší než maximální velikost chromozomu u standardu *H. wingei*, který dosahuje 3,13 Mb. Na úrovni 3,13 Mb byly pozorovány chromozomy přibližně tytéž velikosti u drah 1,4,5,6 a 8. Dále byly na gelu detekovány chromozomy o velikosti 2,7 Mb, konkrétně u kmenů *M. zizyphicola* (číslo 8) a *M. shanxiensis* (číslo 9). U kvasinky *M. pulcherrima* v dráze 2 je patrný ještě chromozom dosahující menší velikosti než nejmenší chromozom velikostního standardu (<1,05 Mb). V drahách jsou přítomny také tmavé šmouhy, které mohou zkreslovat výsledky a není zřejmé, zda se v těchto oblastech nenachází také chromozomy. V tomto experimentu byl také navýšen čas separace na 166 hodin, čímž došlo taky k efektivnější separaci chromozomů u velikostního standardu. Podmínky pro separaci intaktní DNA jsou uvedeny v Tabulka 13.

Tabulka 13 – podmínky separace pomocí PFGE (nutriční stres)

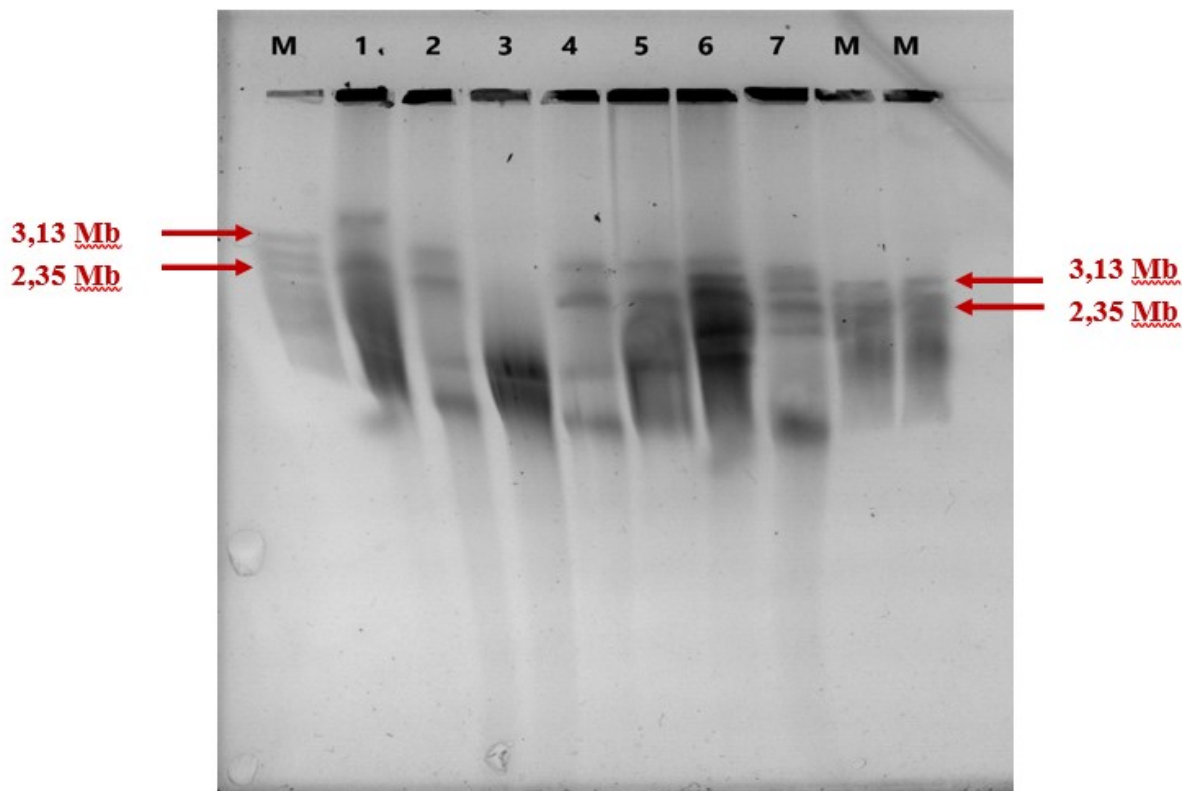
Doba separace [h]	Doba trvání pulzu [s]	Vložené napětí [V]
48	2 400	50
35	3 000	50
35	3 000	50
48	3 300	50



Obrázek 34 - PFGE pro kvasinky vystavené stresovým podmínkám (konopí L+K), v pořadí kmenů 1-9, *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. chrysoperlae* (1158), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), M – velikostní marker chromozomů *H. wingei*, koncentrace agarózového gelu 0,8 %

5.8.3 Analýza karyotypu kvasinek vystavených oxidačnímu stresu

Pulzní gelové elektroforéza byla využita i na popis DNA kvasinek vystavených oxidačnímu stresu (prostředí s koncentrací H_2O_2). Pro tento experiment byly vybrány kvasinky, které byly kultivovány v prostředí s koncentrací H_2O_2 200 mM. U druhů *M. pulcherrima* CCY 029-002-145 a *M. chrysoperlae* CBS 9803 11-1158 nebyly již pod mikroskopem nalezeny žádné buňky kvasinek, a tudíž nebyla provedena izolace DNA, nepřítomnost kvasinek v médiu byla pravděpodobně způsobena příliš agresivním prostředím peroxidu a buňky se nenacházely ve zkumavkách ani ve formě sedimentu po centrifugaci. Byly aplikovány stejné podmínky separace jako v případě předchozích experimentů: 118 hod, 50 V, 0,8 % agarózový gel, délka trvání pulzů analogicky (viz. výše).

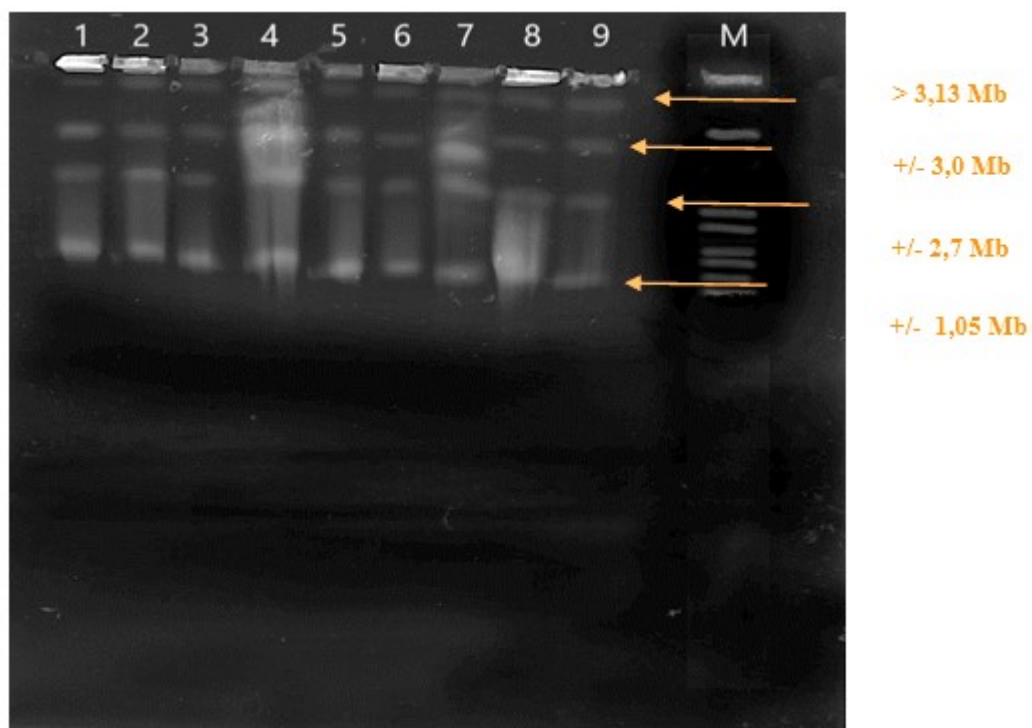


Obrázek 35 - PFGE pro kvasinky vystavené osmotickému stresu (H_2O_2 200 mM), v pořadí kmenů 1-7, *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), M – velikostní marker chromozomů *H. wingei* (2x), koncentrace agarózového gelu 0,8 %

Z Obrázku 33 vyplývá, že na pozici 2 došlo patrně k posunu, který může být zapříčiněn opotřebovaností elektrody a celé soustavy PFGE. Proto budou komentovány první dva běhy zvlášť. Tato skutečnost byla potvrzena zařazením standardů i na poslední dvě dráhy. Podle velikostního markeru na pozici M lze konstatovat, že kvasinka *M. andauensis* 129 v dráze 1 má jeden chromozom větší než maximální velikost chromozomu kvasinky *H. wingei*, tudíž > 3,13 Mb. Další přítomný chromozom v této dráze dosahuje velikosti cca 2,35 Mb. Byly detekovány i chromozomy slabší intenzity s velikostí kolem 1,0 Mb. Interpretace v běžích 2 a dál je následující: u všech kmenů kromě kvasinky *M. pulcherrima* 149 byly pozorovány chromozomy o velikosti nad 3,13 Mb, stejně jak tomu bylo i v prvním případě při kvasince *M. andauensis* 129. V drahách 6 a 7 byly pozorovány i frakce odpovídající velikosti 3,13 Mb. V běžích 2,4,5,6,7 byly dále přítomny chromozomy o velikosti cca 2,35 Mb a menší chromozomy, u kterých není možné přesně určit velikost, nicméně odhadem se tyto velikosti pohybují mezi 0,5-2,0 Mb. Putování molekul DNA gelem prokazuje, že při aplikování například dvojnásobného času separace (10 dní a více) by pravděpodobně byly chromozomy odděleny ještě lépe.

Pro názornější představu byl přiložen i gel kvasinek, které byly kultivovány za optimálních podmínek, aby bylo možné charakterizovat rozdíly u kvasinek vystavených stresovému prostředí. Mezi základní rozdíly možno zařadit částečnou fragmentaci u některých druhů kvasinek vystavených stresovému faktoru a taky narušení intaktnosti DNA některých druhů, kde nebylo možné pozorovat žádné chromozomy pouze nedetekovatelnou šmouhu. Nejhorší separace pomocí metody PFGE bylo dosaženo při charakterizaci kvasinek rostoucích na konopných listech a květech, což nasvědčuje tomu, že pro kvasinky využívající konopné části jako zdroje uhlíku by mohlo souviset se změnami na úrovni metabolismu nebo zapojením adaptačních či obranných funkcí buněk na toto prostředí. Za úspěšnou separaci ale lze považovat například rozdělení chromozomů u osmotického i oxidačního stresu, kde se podařilo detekovat i 5 chromozomů u některých kvasinkových druhů. Z Obrázku 36 lze konstatovat, že bylo detekováno u všech kvasinek po čtyřech chromozomech, přičemž velikosti vykazují podobné jako v případě kvasinek vystavených stresovým podmínkám (viz výše).

POZN: Tento snímek byl součástí souběžně probíhající diplomové práce zaměřené na optimalizační metody při charakterizaci kvasinek rodu Metschnikowia



Obrázek 36 - PFGE pro kvasinky rostoucí na optimálních médiích, v pořadí kmenů 1-9, *M. andauensis* (129), *M. pulcherrima* (145), *M. pulcherrima* (147), *M. pulcherrima* (149), *M. chrysoperlae* (1158), *M. andauensis* (1241), *M. sinensis* (1244), *M. zizyphicola* (1247), *M. shanxiensis* (1250), M – velikostní marker chromozomů *H. wingei*, koncentrace agarózového gelu 0,8 %

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce měla za úkol analyzovat genomovou DNA kvasinek rodu *Metschnikowia*, které byly vystavené vybraným stresovým podmínkám, pomocí vícerych molekulárních metod. Byly vybrány kmeny kvasinek *Metschnikowia andauensis* CCY 029-002-129, *Metschnikowia andauensis* NA1657 11-1241, *Metschnikowia chrysoperlae* CBS 9803 11-1158, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-145, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-147, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-149, *Metschnikowia shanxiensis* CBS 10359 11-1250, *Metschnikowia sinensis* CBS 10357 11-1244, *Metschnikowia zizyphicola* CBS 10358 11-1247. Pro potřeby této práce byly vyselektovány 3 odlišné stresově působící činitele (osmotický stres, nutriční a oxidační stres), v kterých byly kvasinky kultivovány. Experimenty byly realizovány tak, že byly primárně vybrány stresové faktory v odpovídajících koncentracích a teprve pak byla zahájena izolace kvasinkové genomové DNA a její analýza.

Prvním cílem bylo vyizolovat DNA a tu využít jako templát v jedné z možných verzí PCR – Nested PCR, která poskytuje vysoce specifické produkty a vykazuje vysokou míru citlivosti. Při analýze ITS regionů byl v první amplifikaci získán produkt o velikosti cca 350 bp, který byl následně v dalším kroku amplifikován s dvěma páry primerů a produkty dosahovaly velikosti 150 a 250 bp. Tyto produkty byly následně detekovány metodou DGGE, přičemž oblast ITS1 rDNA u kvasinek rodu *Metschnikowia* vykazovala vysokou míru divergence a bylo možné pozorovat fragmenty ve vícero divergentních kopiích (větší množství bandů), co může v některých případech nastat, protože ITS1 oblast představuje velice variabilní úsek ribosomálního operonu, což bylo v práci doloženo i aktuálními publikacemi, v kterých byly tyto skutečnosti demonstrovány. Tyto skutečnosti nebyly ovlivněny stresovým prostředím, protože fragmentace byla pozorována i u referenčních kmenů kvasinek nevystavených stresovým faktorům. Jelikož i oblast 5,8S-ITS2 představuje poměrně variabilní úsek, bylo možné od sebe odlišit jednotlivé kvasinkové kmeny, i když změna nebyla tak výrazná a sekvence byly velice příbuzné a bylo možné je pozorovat jenom v úzkém rozsahu denaturačních činidel 25-35 %. Nejvíce odlišný kmen představovala kvasinka *M. shanxiensis* CBS 10359 11-1250. Na oblastech ITS1 a 5,8S-ITS2 nebyly tudíž vlivem stresových faktorů vyvolány žádné změny, kde by došlo k záměně bází nebo změnám v sekvencích. V další části byl zkoumán vysoce konzervativní úsek ribosomální DNA obsahující geny kódující D1/D2 domény. Protože je tento úsek velice konzervovaný, jednotlivé druhy již nebylo možné od sebe odlišit, avšak kvasinka *M. shanxiensis* CBS 10359 11-1250 opět vykazovala jedinou změnu a její sekvence byla odlišná i v případě analýzy D1/D2 26S rDNA. Opět nebyly pozorovány žádné změny u kvasinek vystavených stresovému prostředí ani v případě vystavení silnému osmotickému či oxidačnímu prostředí.

Další náplní práce bylo provedení karyotypové analýzy kvasinek rodu *Metschniowia* pomocí PFGE a zkoumání vlivu stresových faktorů na integritu genomové DNA. Pro všechny typy vybraných stresů byla provedena separace chromozomů kvasinek *Metschnikowia* s různými výsledky. V některých případech nebyly pod mikroskopem pozorovány žádné vitální buňky, a proto s těmito kmeny nebylo dále pracováno. Podmínky PFGE byly optimalizovány a k efektivní separaci chromozomů docházelo při koncentraci agarózového gelu 0,8 %, napětí 50 V a době separace 118 hodin. Největší počet chromozomů se podařilo detekovat u kvasinky *Metschnikowia zizyphicola* CBS 10358 11-1247 a to celkem 5, jak v případě osmotického stresu (NaCl 8 %), tak v případě oxidačního stresu (H₂O₂ 200 mM). U různých kmenů se počet chromozomů lišil a bylo pozorováno od 0-5 diskrétních chromozomů.

Velikost byla srovnávána s markerem kvasinky *Hansenula wingei*, přičemž byly pozorovány v některých případech i větší chromozomy než 3,13 Mb, kvasinky se tedy počtem a velikostí chromozomů mohou lišit vlivem stresového prostředí.

Nejméně uspokojivá separace byla pozorována při působení nutričního stresu (přídavek konopných listů a květů do média). Z toho lze konstatovat, že buňky vystavené nutričnímu stresu se buď adaptovali na prostředí a vytvořili silnou mechanickou bariéru pro vstup lyzačních enzymů, nebo naopak došlo k fragmentaci DNA a narušení její intaktnosti. Přítomné šmouhy v některých drahách indikují právě narušení DNA, která byla pravděpodobně ovlivněna a některé kmeny mohou vykazovat vyšší citlivost na stresové prostředí. Tato situace byla pozorována u kmenů *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-145, *Metschnikowia pulcherrima* CCY 029-002-147.

Z výše uvedených skutečností lze závěrem konstatovat, že kvasinky rodu *Metschnikowia* představují poměrně adaptabilní druhy na stresové prostředí, které bylo reprezentováno několika odlišnými faktory. Vzhledem k tomu, že se tyto populace vyskytují často ve volné přírodě na různých površích v různých klimatech, musely v evoluci vyvinout řadu obranných mechanismů, aby tak chránily nejen svou DNA, ale taky integritu buněk. Jejich potenciál pro různé aplikace tak v budoucnu může mít obrovský význam.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Walker, G. M., and Stewart, G. G. (2016) *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages, *Beverages* 2, 30.
- [2] Walker, G. M. (2009) Yeasts, In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (Schaechter, M., Ed.), pp 478-491, Academic Press, Oxford.
- [3] Türker, M. (2014) Yeast biotechnology: Diversity and applications, In *Proceedings of 27th VH Yeast Conference*, pp 1-26.
- [4] Monroy Salazar, H., A.Z.M, S., Kholif, A., Monroy, H., Pérez, L. S., Zamora, J. L., and Gutiérrez, A. (2016) YEAST: DESCRIPTION AND STRUCTURE
- [5] Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. (2006) Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology, In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, pp 11-30, Springer.
- [6] Kurtzman, C. P., and Piškur, J. (2006) Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts, In *Comparative Genomics: Using Fungi as Models* (Sunnerhagen, P., and Piškur, J., Eds.), pp 29-46, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [7] Boulton, C., and Quain, D. (2008) *Brewing Yeast and Fermentation*, Wiley.
- [8] Walker, G. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*.
- [9] Feldmann, H. (2012) *Yeast: Molecular and Cell Biology: Second Edition*.
- [10] Taddei, A., and Gasser, S. M. (2012) Structure and function in the budding yeast nucleus, *Genetics* 192, 107-129.
- [11] Talaro, K. P., and Chess, B. (2018) *Foundations in microbiology*.
- [12] Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes, *Science (New York, N.Y.)* 274, 546, 563-547.
- [13] Knop, M. (2011) Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations, *Comptes Rendus Biologies* 334, 599-606.
- [14] Vodrážka, Z. (2002) *Biochemie*, Academia.
- [15] Tofalo, R., and Suzzi, G. (2016) Yeasts, In *Encyclopedia of Food and Health* (Caballero, B., Finglas, P. M., and Toldrá, F., Eds.), pp 593-599, Academic Press, Oxford.
- [16] Tudor, E. A., and Board, R. G. (1993) 12 - Food-Spoilage Yeasts, In *The Yeasts (Second Edition)* (Rose, A. H., and Stuart Harrison, J., Eds.), pp 435-516, Academic Press, San Diego.
- [17] Broach, J. R. (2012) Nutritional Control of Growth and Development in Yeast, *Genetics* 192, 73-105.
- [18] Brauer, M. J., Huttenhower, C., Airoidi, E. M., Rosenstein, R., Matese, J. C., Gresham, D., Boer, V. M., Troyanskaya, O. G., and Botstein, D. (2008) Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast, *Molecular biology of the cell* 19, 352-367.
- [19] Mager, W. H., and Hohmann, S. (1997) "Introduction: Stress response: Mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." In *Yeast stress responses*. (Hohmann, S., and Mager, W. H., Eds.), pp 1 - 6, Mol. Biol. Intelligence Units, R.G. Landes Company.
- [20] Rahman, M. (1999) *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekkers, Inc., New York, USA.
- [21] Blomberg, A., and Adler, L. (1992) Physiology of Osmotolerance in Fungi | This review is dedicated to Professor Birgitta Norkrans who introduced us to this field of science, In *Advances in Microbial Physiology* (Rose, A. H., Ed.), pp 145-212, Academic Press.

- [22] Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors, *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 63, 230-262.
- [23] Brown, A. D. (1976) Microbial water stress, *Bacteriological reviews* 40, 803-846.
- [24] Brown, A. (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*, John Wiley & Sons.
- [25] Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H., and Klis, F. M. (1999) Cell wall dynamics in yeast, *Current opinion in microbiology* 2, 348-352.
- [26] Farrugia, G., and Balzan, R. (2012) Oxidative stress and programmed cell death in yeast, *Frontiers in oncology* 2, 64.
- [27] Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast (Chichester, England)* 14, 1511-1527.
- [28] Perrone, G. G., Tan, S. X., and Dawes, I. W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochimica et biophysica acta* 1783, 1354-1368.
- [29] Costa, V., and Moradas-Ferreira, P. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases, *Molecular aspects of medicine* 22, 217-246.
- [30] Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Molecular biology of the cell* 11, 4241-4257.
- [31] Temple, M. D., Perrone, G. G., and Dawes, I. W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species, *Trends in cell biology* 15, 319-326.
- [32] Piper, P. W. (1993) Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS microbiology reviews* 11, 339-355.
- [33] Lepock, J. R. (1997) Protein Denaturation During Heat Shock, In *Advances in Molecular and Cell Biology* (Bittar, E. E., and Willis, J. S., Eds.), pp 223-259, Elsevier.
- [34] Mühlhofer, M., Berchtold, E., Stratil, C. G., Csaba, G., Kunold, E., Bach, N. C., Sieber, S. A., Haslbeck, M., Zimmer, R., and Buchner, J. (2019) The Heat Shock Response in Yeast Maintains Protein Homeostasis by Chaperoning and Replenishing Proteins, *Cell Reports* 29, 4593-4607.e4598.
- [35] Mager, W. H., and Ferreira, P. M. (1993) Stress response of yeast, *Biochemical Journal* 290, 1-13.
- [36] Trott, A., and Morano, K. A. (2003) The yeast response to heat shock, In *Yeast Stress Responses* (Hohmann, S., and Mager, W. H., Eds.), pp 71-119, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [37] Hohmann, S., and Mager, W. H. (2007) *Yeast stress responses*, Vol. 1, Springer Science & Business Media.
- [38] Soni, S. K. (2007) *Microbes : a source of energy for 21st century*, New India Pub. Agency, New Delhi.
- [39] Liu, H., and Zhang, J. (2019) Yeast Spontaneous Mutation Rate and Spectrum Vary with Environment, *Current Biology* 29, 1584-1591.e1583.
- [40] Kang, Y. M., Choi, J. E., Komakech, R., Park, J. H., Kim, D. W., Cho, K. M., Kang, S. M., Choi, S. H., Song, K. C., Ryu, C. M., Lee, K. C., and Lee, J. S. (2017) Characterization of a novel yeast species *Metschnikowia persimmonesis* KCTC 12991BP (KIOM G15050 type strain) isolated from a medicinal plant, Korean persimmon calyx (*Diospyros kaki* Thumb), *AMB Express* 7, 199.
- [41] Lachance, M. A. (2016) *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth, *Yeast (Chichester, England)* 33, 563-574.
- [42] Manso, T., and Nunes, C. (2011) *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases, *Postharvest Biology and Technology* 61, 64-71.

- [43] Guzmán, B., Lachance, M. A., and Herrera, C. M. (2013) Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: have yeast and angiosperm lineages co-diversified?, *Molecular phylogenetics and evolution* 68, 161-175.
- [44] Sipiczki, M., Horvath, E., and Pfliegler, W. P. (2018) Birth-and-Death Evolution and Reticulation of ITS Segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA Repeats, *Front Microbiol* 9, 1193.
- [45] Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., and Santos, A. (2016) Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species, *Front Microbiol* 7, 12.
- [46] Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., and Benito, S. (2020) The Genus *Metschnikowia* in Enology, *Microorganisms* 8, 1038.
- [47] Melvydas, V., Svedienė, J., Skridlaite, G., Vaičiūnienė, J., and Garjonyte, R. (2020) In vitro inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by *Metschnikowia* spp. triggered by fast removal of iron via two ways, *Brazilian Journal of Microbiology* 51.
- [48] Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J. M., Bañuelos, M. A., and Suárez-Lepe, J. A. (2019) Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in Wine Biotechnology, *Fermentation* 5, 63.
- [49] Molnár, O., and Prillinger, H. (2005) 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* 28, 717-726.
- [50] Kántor, A., Hutková, J., Petrová, J., Hleba, L., and Kacaniova, M. (2015) Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species, *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* 5, 282-285.
- [51] Suh, S. O., Gibson, C. M., and Blackwell, M. (2004) *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), *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, 1883-1890.
- [52] Xue, M. L., Zhang, L. Q., Wang, Q. M., Zhang, J. S., and Bai, F. Y. (2006) *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* 56, 2245-2250.
- [53] Xue, M.-L., Zhang, L.-Q., Wang, Q.-M., Zhang, J.-S., and Bai, F.-Y. (2006) *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* 56, 2245-2250.
- [54] Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., and Kregiel, D. (2019) Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates, *Antonie van Leeuwenhoek* 112, 1425-1445.
- [55] Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., and Heard, G. M. (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes, *FEMS Yeast Research* 4, 865-877.
- [56] Mueller, G. M., Bills, G. F., and Foster, M. S. (2004) Biodiversity of fungi : inventory and monitoring methods.

- [57] Daniel, H. M., and Meyer, W. (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts, *International journal of food microbiology* 86, 61-78.
- [58] Hierro, N., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2004) New PCR-based methods for yeast identification, *Journal of Applied Microbiology* 97, 792-801.
- [59] Elkins, K. M. (2013) Chapter 4 - DNA Extraction, In *Forensic DNA Biology* (Elkins, K. M., Ed.), pp 39-52, Academic Press, San Diego.
- [60] Boom, R., Sol, C., Salimans, M., Jansen, C., Wertheim-van Dillen, P., and Van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *Journal of clinical microbiology* 28, 495-503.
- [61] Boesenberg-Smith, K. A., Pessaraki, M. M., and Wolk, D. M. (2012) Assessment of DNA Yield and Purity: an Overlooked Detail of PCR Troubleshooting, *Clinical Microbiology Newsletter* 34, 1-6.
- [62] Cardinali, G., Bolano, A., and Martini, A. (2001) A DNA extraction and purification method for several yeast genera, *Annals of microbiology* 51, 121-130.
- [63] Lõoke, M., Kristjuhan, K., and Kristjuhan, A. (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications, *BioTechniques* 50, 325-328.
- [64] Maloy, S. R. H. K. (2013) Brenner's encyclopedia of genetics.
- [65] Wages, J. M. (2005) POLYMERASE CHAIN REACTION, In *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C., Eds.), pp 243-250, Elsevier, Oxford.
- [66] Bermingham, N., and Luettich, K. (2003) Polymerase chain reaction and its applications, *Current Diagnostic Pathology* 9, 159-164.
- [67] Rychlik, W., Spencer, W. J., and Rhoads, R. E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro, *Nucleic acids research* 18, 6409-6412.
- [68] Au - Lorenz, T. C. (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies, *JoVE*, e3998.
- [69] Madprime. (2007) Diagram of PCR reaction to demonstrate how amplification leads to the exponential growth of a short product flanked by the primers, Wikipedia.
- [70] Carr, J., Williams, D. G., and Hayden, R. T. (2010) Chapter 24 - Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses, In *Molecular Diagnostics* (Grody, W. W., Nakamura, R. M., Strom, C. M., and Kiechle, F. L., Eds.), pp 289-300, Academic Press, San Diego.
- [71] Marmiroli, N., and Maestri, E. (2007) Chapter 6 - Polymerase chain reaction (PCR), In *Food Toxicants Analysis* (Picó, Y., Ed.), pp 147-187, Elsevier, Amsterdam.
- [72] Hillis, D. M., and Dixon, M. T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference, *The Quarterly review of biology* 66, 411-453.
- [73] Martin, K. J., and Rygiel, P. T. (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts, *BMC Microbiology* 5, 28.
- [74] Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., De Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y. J. K., Sanli, K., Eriksson, K. M., Vik, U., Veldre, V., and Nilsson, R. H. (2013) Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data, *Methods in Ecology and Evolution* 4, 914-919.
- [75] Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. (2002) An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk, *International Dairy Journal* 12, 407-411.

- [76] Ercolini, D. (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food, *Journal of microbiological methods* 56, 297-314.
- [77] Muyzer, G., and Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- [78] Zhang, Y., Wu, G., Jiang, H., Yang, J., She, W., Khan, I., and Li, W. (2018) Abundant and rare microbial biospheres respond differently to environmental and spatial factors in Tibetan hot springs, *Frontiers in microbiology*, 2019.
- [79] Turaki, A. A., Bömer, M., Silva, G., Kumar, P. L., and Seal, S. E. (2017) PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm, *Viruses* 9, 181.
- [80] El Sheikha, A. F., Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D. D., Loiseau, G., and Montet, D. (2009) Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt, *Yeast (Chichester, England)* 26, 567-573.
- [81] Duarte, S., Cassio, F., and Pascoal, C. (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology - Insights from Freshwaters.
- [82] Strathdee, F., and Free, A. (2013) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), In *DNA Electrophoresis*, pp 145-157, Springer.
- [83] Green, S. J., Leigh, M. B., and Neufeld, J. D. (2015) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis, In *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols*, pp 77-99, Springer.
- [84] El Sheikha, A. F. (2019) Molecular Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods: The Case for Using PCR-DGGE, *Food Biotechnology* 33, 54-108.
- [85] Liang, H., Yin, L., Zhang, Y., Chang, C., and Zhang, W. (2018) Dynamics and diversity of a microbial community during the fermentation of industrialized Qingcai paocai, a traditional Chinese fermented vegetable food, as assessed by Illumina MiSeq sequencing, DGGE and qPCR assay, *Annals of Microbiology* 68, 111-122.
- [86] Isbir, T., Kirac, D., Demircan, B., and Dalan, B. (2013) Gel Electrophoresis, In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (Maloy, S., and Hughes, K., Eds.), pp 165-167, Academic Press, San Diego.
- [87] Kaufmann, M. E. (1998) Pulsed-field gel electrophoresis, *Methods in molecular medicine* 15, 33-50.
- [88] Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 37, 67-75.
- [89] Birren, B., and Lai, E. (2012) *Pulse Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide*.
- [90] Schwartz, D. C., and Cantor, C. R. (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *Cell* 37.
- [91] Parizad, E. G., Parizad, E. G., and Valizadeh, A. (2016) The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies, *J Clin Diagn Res* 10, DE01-DE04.
- [92] Sharma-Kuinkel, B. K., Rude, T. H., and Fowler, V. G. (2016) Pulse Field Gel Electrophoresis, *Methods in molecular biology* 1373, 117-130.
- [93] Nsofor, C. (2016) <http://s-o-i.org/1.15/ijcrms-2016-2-2-5> Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE): Principles and Applications in Molecular Epidemiology: A Review, 2, 38-51.
- [94] Cantor, C. R., Smith, C. L., and Mathew, M. K. (1988) Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules, *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 17, 287-304.

- [95] Lai, E., Birren, B. W., Clark, S. M., Simon, M. I., and Hood, L. (1989) Pulsed field gel electrophoresis, *BioTechniques* 7, 34-42.
- [96] Pal, P. (2015) Pulsed-field gel electrophoresis as a molecular tool for characterizing genomes of certain food-borne bacterial isolates - a review, *International Letters of Natural Sciences*.
- [97] Nasonova, E. S. (2008) Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application, *Cell and Tissue Biology* 2, 557.
- [98] Anand, R. (1986) Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules, *Trends in Genetics* 2, 278-283.
- [99] Hicks, L. D., van der Graaf, C. M., Childress, J., Cook, E., Schmidt, K., Rosenzweig, F., and Kroll, E. (2018) Streamlined preparation of genomic DNA in agarose plugs for pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Biological Methods* 5.
- [100] Türkel, S., and Ener, B. (2009) Isolation and Characterization of New *Metschnikowia pulcherrima* Strains as Producers of the Antimicrobial Pigment Pulcherrimin, *Zeitschrift für Naturforschung C* 64, 405-410.
- [101] Valente, P., Gouveia, F. C., Lemos, G. A., Pimentel, D., Mendonca-Hagler, L. C., and Hagler, A. N. (1997) PCR-amplified ITS length variation within the yeast genus *Metschnikowia*, *The Journal of general and applied microbiology* 43, 179-181.
- [102] Marshall, M. N., Cocolin, L., Mills, D. A., and VanderGheynst, J. S. (2003) Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost, *Journal of Applied Microbiology* 95, 934-948.
- [103] Lachance, M.-A., Wijayanayaka, T. M., Bundus, J. D., and Wijayanayaka, D. N. (2011) Ribosomal DNA sequence polymorphism and the delineation of two ascosporic yeast species: *Metschnikowia agaves* and *Starmerella bombicola*, *FEMS Yeast Research* 11, 324-333.
- [104] Bao, J., Jiang, H., Shen, H., Xing, Y., Feng, C., and Chen, Q. (2021) First description of milky disease in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* caused by the yeast *Metschnikowia bicuspidata*, *Aquaculture* 532, 735984.
- [105] Liu, B., and Lowes, F. (2013) Multiple Divergent ITS1 Copies Were Identified in Single Tomato Genome Using DGGE Analysis, *Plant Molecular Biology Reporter* 31, 272-279.
- [106] Liu, J., Yu, Y., Cai, Z., Bartlam, M., and Wang, Y. (2015) Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR-DGGE, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1387-1395.
- [107] Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., and Chen, S. (2010) Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals, *PloS one* 5.
- [108] Dhama, M. K., Hartwig, T., and Fukami, T. (2016) Genetic basis of priority effects: insights from nectar yeast, *Proceedings. Biological sciences* 283.
- [109] Mathew, M. K., Smith, C. L., and Cantor, C. R. (1988) High-resolution separation and accurate size determination in pulsed-field gel electrophoresis of DNA. 1. DNA size standards and the effect of agarose and temperature, *Biochemistry* 27, 9204-9210.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ZKRATKA	VÝZNAM
AA/BIS	akrylamid/N,N-methylen-bis-akrylamid
AMP	adenosinmonofosfát
BCA	biokontrolní činidlo
bp	páry bází
CBS	sbírka Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCY	sbírka Culture Collection of Yeasts
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleosidtrifosfáty
dsRNA	dvouvláknová RNA
gDNA	genomová DNA
ITS	Internal transcribed spacer
LSU	velká ribosomální podjednotka
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
rDNA	ribosomální DNA
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribosomální RNA
SDS	dodecylsírán sodný
SSU	malá ribosomální podjednotka
TEMED	N,N'-tetramethylethylendiamin
UV	ultrafialové záření