

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
Katedra genetiky a šlechtění

Detekce mutací genu pro cytochrom *b* u *Venturia inaequalis* pomocí denaturační gelové elektroforézy

Vedoucí práce: Ing. Petr Sedlák, Ph.D.

Autor práce: Bc. Kateřina Mužíková

2010



## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Detekce mutací genu pro cytochrom *b* u *Venturia inaequalis* pomocí denaturační gelové elektroforézy“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne: 9.4.2010

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Petru Sedlákovi, Ph.D. za odborné vedení, přátelskou pomoc a cenné rady.

## Souhrn

Strupovitost jabloní způsobená houbou *Venturia inaequalis* Cke. je jednou z nejrozšířenějších houbových chorob jabloní v České republice i v zahraničí. Ačkoliv existují odrůdy rezistentní vůči *Venturia inaequalis*, stále je značné množství výsadeb, které rezistentní vůči této fytopatogenní houbě nejsou. V takových sadech se k ochraně proti *Venturia inaequalis* používá chemických látek, především strobilurinových fungicidů, které specificky inhibují elektronový transport přes mitochondriální membránu a tím zabraňují respirační výměně.

V posledních letech byl zaznamenán projev rezistence *Venturia inaequalis* k používaným strobilurinovým fungicidům. Odborné publikace ukazují, že polymorfismy, vzniklé v kódujících oblastech mitochondriálního genu pro cytochrom *b* (CYTB) různých fytopatogenních hub a oomycet, pozmění výsledný peptid, který zabrání navázání fungicidu a tím způsobí rezistenci vůči chemickým látkám na bázi strobilurinů. Z tohoto důvodu jsem se v diplomové práci zaměřila na identifikaci možných polymorfismů v mitochondriálním genu pro CYTB *Venturia inaequalis* pomocí molekulárně genetické metody, kterou je denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE).

K testování bylo použito izolátů DNA z monosporických i směsných kultur *Venturia inaequalis*, které byly vykultivovány z rostlinného materiálu pocházejícího z 10 lokalit České republiky, z nichž některé vykazovaly rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům.

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) bylo amplifikováno u 38 různých vzorků všech sedm exonů, které tvoří gen pro CYTB *Venturia inaequalis*. Účinnost amplifikace byla ověřena na gelové elektroforéze. Pro každý exon byla pomocí DGGE zjištěna koncentrace denurantu v akrylamidovém gelu, při které jsou nejlépe patrné velikostní odchylky mutovaných a nemutovaných PCR fragmentů. Tyto koncentrace byly použity pro konstantní denaturační gelovou elektroforézu (CDGE), která byla provedena pro každý exon u všech 38 vzorků. Bylo vybráno 55 vzorků vykazujících dle CDGE rozdílnou elektroforetickou mobilitu. Pro potvrzení možných polymorfismů byla u těchto vzorků provedena sekvenační analýza na automatickém sekvenátoru.

Porovnáním zjištěných sekvencí a známé sekvence genu pro CYTB *Venturia inaequalis* pomocí počítačových programů (Chromas Lite, Vector NT), byl potvrzen u dvou vzorků již dříve popsáný polymorfismus v exonu 4. U ostatních exonů, ve vzorcích vykazujících velikostní odchylky na CDGE, nebyly žádné další polymorfismy prokázány.

Ačkoliv se pomocí DGGE podařilo nalézt bodovou mutaci, nezdá se být tato metoda, pro odhalování polymorfismů v genu pro CYTB u *Venturia inaequalis*, ideální. Odchylky v elektroforetické mobilitě mutovaných a nemutovaných DNA fragmentů na konstantní denaturační gelové elektroforéze byly velmi málo patrné.

Klíčová slova: *Venturia inaequalis*, strobilurinové fungicidy, rezistence k fungicidům, gen pro cytochrom *b*, denaturační gradientová gelová elektroforéza, polymorfismus

## Summary

Apple scab, caused by the fungus *Venturia inaequalis* Cke., is one of the most widespread fungal apple diseases both in the Czech Republic and abroad. In spite of the fact that there are *Venturia inaequalis* resistant strains, there have still been a substantial number of plantings not resistant to this phytopathogenic fungus. In such orchards, chemicals are used for protection against *Venturia inaequalis*, including above all strobilurin fungicides. Those substances specifically inhibit electron transport via mitochondrial membrane and thus prevent respiratory exchange.

Recently, *Venturia inaequalis* resistance to used strobilurin fungicides was recorded. Scientific publications show, that in various phytopathogenic fungi and oomycota, polymorphisms arising in the coding mitochondrial gene regions for cytochrome *b* (CYTB) are able to change the resulting peptide. This prevents fungicide binding and thus causes the resistance to strobilurin-based chemicals. For this reason, my thesis aimed at identification of possible polymorphisms in the *Venturia inaequalis* mitochondrial gene for CYTB using a molecular genetic method, namely denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

For the testing, DNA isolates from both monosporic and mixed cultures of *Venturia inaequalis* were used, that were cultivated from plant material coming from 10 locations in the Czech Republic, and some of them showed resistance to strobilurin fungicides.

Using polymerase chain reaction (PCR), all seven *Venturia inaequalis* CYTB exons were amplified in 38 samples. Amplification efficiency was checked by gel electrophoresis. Using DGGE, the denaturant concentration in polyacrylamide gel was set for each exon, which differentiates in the best way the size variations of mutated and non-mutated PCR fragments. Those concentrations were used for constant denaturing gel electrophoresis (CDGE), which was performed for each exon in all 38 samples. Fifty-five samples showing different electrophoretic mobility in CDGE was selected and sequence analysis on automated sequencer was performed in all samples in order to verify possible polymorphisms.

Comparing the obtained sequences with the established *Venturia inaequalis* CYTB sequences using specialized software (Chromas Lite, Vector NT), a previously

described polymorphism in exon 4 was found in two samples. No other polymorphisms were found in samples showing size deviations.

Although DGGE enabled the finding of point mutation, this method does not seem ideal for polymorphism testing in *Venturia inaequalis* CYTB gene. The different electrophoretic mobility in mutated versus non-mutated DNA fragments were very weakly perceptible.

Key words: *Venturia inaequalis*, strobilurin fungicide, fungicide resistance, cytochrom *b* gene, Denaturing Gradient Gel Elektrophoresis, Polymorphysm



## Obsah

Obsah .....	9
1. Úvod .....	12
2. Cíl práce .....	13
3. Literární přehled .....	14
3.1. <i>Venturia inaequalis</i> .....	14
3.2. Strobilurinové fungicidy.....	16
3.2.1. Mechanismus účinku strobilurinových fungicidů .....	17
3.2.2. Mechanismy rezistence vůči strobilurinovým fungicidům.....	18
3.3. Mitochondriální DNA.....	18
3.4. Mitochondriální gen pro cytochrom <i>b</i> <i>Venturia inaequalis</i> .....	19
3.5. Metody analýzy molekulární struktury genů.....	21
3.5.1. Elektroforéza nukleových kyselin.....	21
3.5.1.1. Separace technologií LAB-ON-CHIP .....	21
3.5.1.2. Separace v polyakrylamidovém gelu .....	22
3.5.1.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza, princip a použití .....	23
3.6. Přímé určení sekvence pomocí sekvenátoru ABI PRISM.....	24
4. Materiál a metody .....	26
4.1. Biologický materiál.....	26
4.2. Primery a reakční podmínky polymerázové řetězové reakce (PCR) .....	27
4.2.1. Ověření účinnosti amplifikace .....	29
4.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) .....	29
4.4. Konstantní denaturační gelová elektroforéza (CDGE).....	31
4.5. Extrakce PCR produktů z akrylamidového gelu.....	33
4.6. Reamplifikace fragmentů DNA a ověření účinnosti reamplifikace .....	33
4.7. Purifikace PCR produktů .....	34
4.8. Sekvenační reakce .....	34
4.9. Sekvenační analýza.....	35
5. Výsledky a diskuze .....	37
5.1. Ekonomické dopady zvýšeného výskytu <i>Venturia inaequalis</i> v ČR .....	54
5.2. Opatření vhodná ke kontrole výskytu a rozšíření rezistentních populací <i>Venturia inaequalis</i> .....	54

5.3. Nové metody v diagnostice rezistentních populací fytopatogenů .....	55
6. Závěr .....	57
7. Seznam použité literatury .....	58
8. Seznam použitých zkratek.....	63

## **Seznam příloh**

- I. Seznam použitých chemikálií
- II. Seznam použitých přístrojů
- III. Seznam použitých laboratorních pomůcek
- IV. Obrazová příloha

## 1. Úvod

Jednou z nejrozšířenějších a nejzávažnějších chorob jabloní je strupovitost, způsobená houbou *Venturia inaequalis*. Tento fytopatogen způsobuje velké ztráty na výnosech oslabením jednotlivých rostlin během vegetace, což má za následek redukci nasazených plůdků, ale také deformace dozrávajících plodů a následně i defekty plodů skladovaných.

Ačkoliv existují odrůdy jabloní odolné vůči strupovitosti, je stále dost dalších odrůd ve výsadbách, které rezistentní vůči napadení *Venturia inaequalis* nejsou. V sadech s výsadbami odrůd k *Venturia inaequalis* náchylných se klade důraz na integrovanou ochranu, jejíž nedílnou součástí je ochrana chemická. Jednou skupinou chemických látek, kterých se standardně používá k ochraně proti *Venturia inaequalis* jsou strobilurinové fungicidy (Discus, Zato), které specificky blokují transport elektronů přes mitochondriální membránu, a tím blokují respirační metabolismus buněk patogena.

V důsledku opakovaného víceletého používání fungicidů se stejnými účinnými látkami, nebo účinnými látkami využívajícími stejný nebo podobný mechanismus působení, může dojít k postupnému vyselektování rezistentní populace. V několika lokalitách ČR již byly zaznamenány projevy rezistence *Venturia inaequalis* vůči strobilurinovým fungicidům.

Přestože mají mitochondrie vlastní genom, podílí se jaderná DNA velkou částí na syntéze mitochondriálních bílkovin a regulaci činnosti mitochondrií. Jedním z membránových proteinů mitochondrií, který je kódován pouze mitochondriální DNA je cytochrom *b*. Společně s dalšími proteiny tvoří cytochrom *b* komplex bc1, který hraje důležitou roli v elektronovém transportu přes mitochondriální membránu.

V zahraniční literatuře se objevily publikace popisující polymorfismus v exonu čtyři, genu pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis*. Tento polymorfismus vzniká záměnou cytosinu za guanin, čímž dochází ke změně kódované aminokyseliny (G143A). Tato záměna má za následek změnu peptidu, který neumožní navázání fungicidu na vazebné místo mitochondriální membrány.

## 2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- nalézt možné bodové mutace v mitochondriálním genu pro cytochrom *b* u *Venturia inaequalis* moderními molekulárně genetickými technikami
- vybrat takový sortiment vzorků, aby zahrnoval jak vzorky citlivé, tak vzorky vykazující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům
- namnožit cílovou sekvenci kódující DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) u vybraných vzorků
- vytipovat exony s potenciálními polymorfizmy pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE)
- analyzovat vybrané exony pomocí konstantní denaturační gelové elektroforézy (CDGE)
- vybrat DNA fragmenty s odlišnou elektroforetickou mobilitou (dle CDGE) a potvrdit přítomnost mutací pomocí sekvenační analýzy
- porovnat získané sekvence se sekvencí mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis* uloženou v genové databázi NCBI
- v případě detekované mutace zjistit zda mutace způsobuje změnu aminokyseliny, kódované tripletem bází dané sekvence a odhadnout možné následky takové mutace

### 3. Literární přehled

#### 3.1. *Venturia inaequalis*

*Venturia inaequalis* je vřeckatá houba způsobující jednu z nejrozšířenějších chorob jabloní – strupovitost. Napadá hlavně rody *Malus*, ale i rody *Crateagus*, *Sorbus* a *Pyracantha*. Dle Kaliny a Váni (2005) je řazena do:

říše: *FUNGI*

oddělení: *ASCOMYCOTA*

pododdělení: *PEZIZOMYCOTINA*

třída: *DOTHIDEOMYCETES*

řád: *PLEOSPORALES*

čeleď: *VENTURIACEAE*

Mycelium je hnědavé. Konidiofory vznikají na myceliu ve svazečcích a jsou většinou jednobuněčné, hladké. Konidie jsou vejčité až kyjovité, zprvu hyalinní, později žlutozelené, jednobuněčné až dvoubuněčné. Plodnice jsou kulovité, vyčnívající z odumřelého pletiva listu či plodu. V plodničce je několik desítek vřecek s 8 askosporami (SALAŠ a kol., 2003).

Dozrávání askospor je ovlivněno teplotou, uvolňování askospor z vřecek závisí na dešťových srážkách. Při navlhčení vřecko nabobtná a ve špičce praskne. Výtrusy jsou vymrštěny do vzduchu a roznášeny větrem do okolí, kde jsou zdrojem pro primární infekci. Pokud se výtrusy dostanou na vlhký list, začnou klíčit a prorůstají listovou pokožkou. Inkubační doba závisí na teplotě a době, kdy jsou listy ovlhčeny (BLAŽEK a kol., 1998).

Mezi příznaky infekce *Venturia inaequalis* patří zelenočerné skvrny, které se objevují nejprve na spodní, později na vrchní straně listů (obr. 1). V závislosti na odrůdě se pletivo může v okolí skvrn prosvětlovat a vyklenout nahoru nebo nekrotizovat. Na plodech vznikají tmavé ostrůvky korkovitého pletiva různé velikosti (obr. 2). Při silném napadení na jedné straně se plod deformuje a v pletivu vznikají trhliny (KAZDA a kol., 2003).

K nákaze plodů může dojít až těsně před sklizní, přičemž se symptomy projeví až během skladování. Hospodářsky může choroba negativně ovlivnit výnos, jeho snížením o 20 – 40 % a významně snížit kvalitu plodů (SALAŠ a kol., 2003).

**Obr. 1 – příznaky infekce *Venturia inaequalis* na listu**



**Obr. 2 – příznaky infekce *Venturia inaequalis* na plodu**



### **3.2. Strobilurinové fungicidy**

Strobilurinové fungicidy jsou původně přírodní látky, které vylučují některé vyšší bazidiomycety (např: rody *Strobilurus*, *Oudemansiella*) na obranu proti nižším houbám (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

Přímo v ochraně rostlin se však vzhledem k jejich fyzikálním vlastnostem používat nedaly. Úpravou z nich však vznikly látky stálejší, které již bylo možno použít jako fungicidy se širokým spektrem účinku v ochraně mnoha rostlin (Zato, Discus). Účinnými látkami strobilurinových fungicidů jsou kresoxim-methyl a trifloxystrobin. Mají kontaktní, translaminární a některé účinné látky i systémovou účinnost (azoxystrobin). Pokud jsou systémové, v rostlině se pohybují akropetálně. Působí preventivně i kurativně. Většina účinných látek má mezostemický účinek. Část účinné látky zůstává na povrchu a část je ukládána do voskového povlaku



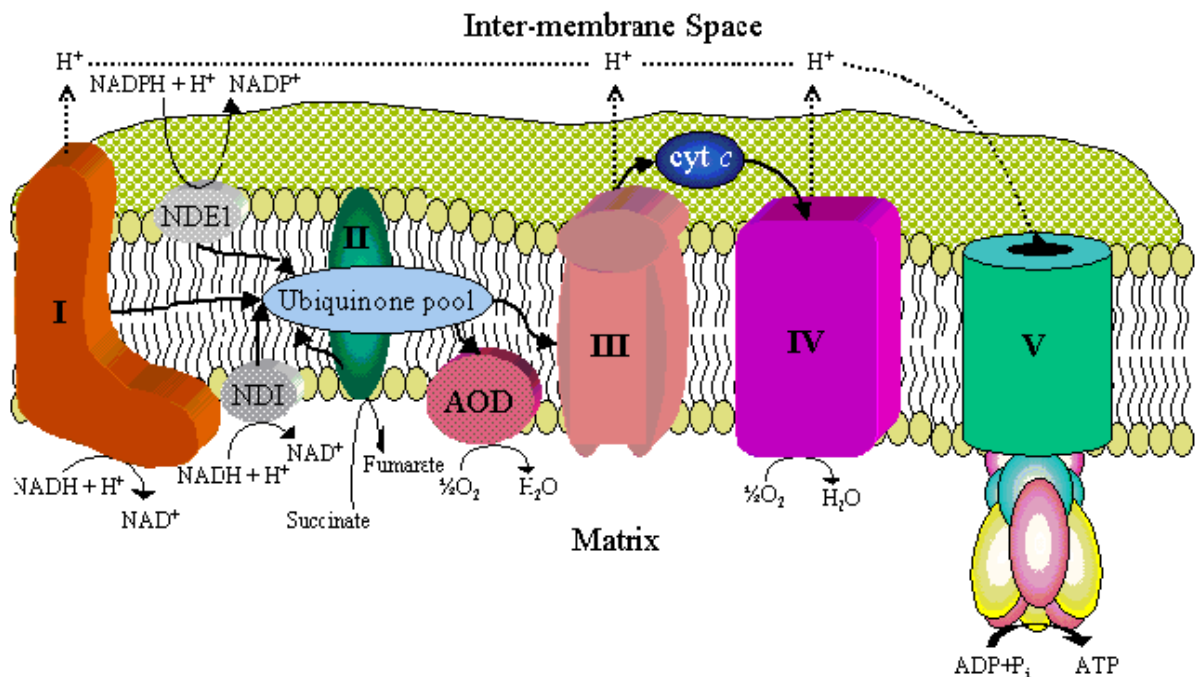
rostlinných částí (lipofilie). Následně proniká do rostlinných pletiv a je rozprostírána na ošetřených částech. Působí specificky, blokuje transport elektronů v mitochondriích buněk patogena (CHEN et al., 2007)

### 3.2.1. Mechanismus účinku strobilurinových fungicidů

Strobilurinové fungicidy mají schopnost inhibovat mitochondriální respirační řetězec fytopatogena. Váže se na vnější quinol-oxidační vazebné místo (Qo) enzymatického komplexu III (cytochrom *bc1* komplex), (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). Enzymatický komplex III (bc1 komplex), je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a je tvořen několika podjednotkami, z nichž nejdůležitější je cytochrom *b* a cytochrom *c*. Strobilurinové inhibitory, po navázání na Qo, blokuje elektronový transport mezi cytochromem *b* a cytochromem *c*, což vede k deficitu energie způsobené nedostatkem adenosin trifosfátu (ATP), (BARTLETT et al., 2002).

#### Obr. 3 – schéma mitochondriálního elektronového transportního systému

(autor obrázku Jack Kennell, Saint Louis University, dostupné na <http://pages.slu.edu/faculty/kennell/>)



### 3.2.2. Mechanismy rezistence vůči strobilurinovým fungicidům

Jedním z mechanismů rezistence vůči strobilurinovým fungicidům jsou mutace v genu pro cytochrom *b*. U několika fytopatogenních hub a oomycet byly popsány tři zásadní mutace a to záměna glycinu za alanin na pozici 143 (G143A), (tab. 1), záměna fenylalaninu za leucin na pozici 129 (F129L) a záměna glycinu za arginin na pozici 137 (G137R). Zatímco F129L a G137R způsobují částečnou rezistenci, mutace G143A má za následek rezistenci kompletní.

**Tab. 1 – Mutace na pozici 143 v genu pro cytochrom *b***

	<b>Sekvence nukleotidů</b>	<b>Sekvence aminokyselin</b>
<b>Sensitivní</b>	5' ... TGG <u>GGT</u> GCA ... 3'	... <u>WGA</u> ...
<b>Rezistentní</b>	5' ... TGG <u>GCT</u> GCA ... 3'	... <u>WAA</u> ...
<b>Pozice</b>	143	143

Dalšími mechanismy rezistence jsou alternativní respirace a „Eflux transporters“. Alternativní respiraci zajišťuje terminální oxidáza, která při respiraci poskytne elektrony z ubiquinolu a tak obejde komplex III. Tento mechanismus má nižší výkonnost než úplný respirační řetězec. „Eflux transporters“ umožňuje houbám přežít vystavení vysokých koncentrací toxických látek zabráněním jejich kumulaci uvnitř buněk pomocí transportních proteinů (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

### 3.3. Mitochondriální DNA

Genetické informace většiny eukaryotních buněk jsou uloženy především v buněčném jádře. Kromě jaderné DNA existuje deoxyribonukleová kyselina v dalších buněčných organelách a to v chloroplastech a mitochondriích.

Velikost, tvar a konformace mitochondriální DNA (mtDNA) je značně heterogenní a závisí na druhu organismu. Mitochondriální DNA je v mitochondriích přítomna ve formě volně uložených molekul a má strukturu cyklické dvoušroubovice. Mitochondriální DNA se obvykle nachází v mitochondriální matrix a občas je připojena k vnitřní mitochondriální membráně. Celý mitochondriální genom byl

klonován a sekvenován u velkého počtu organismů a bylo zjištěno, že mtDNA všech zkoumaných organismů kóduje podobné sady rRNA, tRNA a nejdůležitějších mitochondriálních proteinů (ROSYPAL a kol., 1997). U nižších eukaryot a hub kóduje mtDNA tři podjednotky cytochrom *c* oxidázového komplexu, cytochrom *b* podjednotku, dvě podjednotky  $F^0 H^+$ -ATPázy, 15S-rRNA a 21S – rRNA a tRNA. Houby kódují oproti ostatním organismům jeden protein podílející se na stavbě ribozomu (BURGER et al., 2003).

DNA mitochondrií je u některých organismů poměrně malá a má informační kapacitu kódovat maximálně několik desítek proteinů. Biochemické reakce, které v mitochondriích probíhají, ukazují, že mitochondrie potřebují větší počet proteinů. Tyto proteiny jsou kódovány jadernými geny a jsou dopravovány do mitochondrií z cytoplazmy (ROSYPAL a kol., 1997).

### **3. 4. Mitochondriální gen pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis***

Mitochondriální gen pro cytochrom *b* u *Venturia inaequalis* je tvořen sedmi exony (tab. 2) a šesti introny. Jeho velikost je 10,65 kbp. Exony kódují protein zahrnující 393 aminokyselin (ZHENG et KÖLLER, 1997).

**Tab. 2 - Sekvence jednotlivých exonů genu pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis***

Exon	Začátek	Konec	Sekvence	Délka exonu (bp)
1	46	204	atgcgaattttaaaaagtcactcactattgaga ttagccaattcttatataattgattccccacaac cctctaacataagttacctgtgaaatttcggttc ttattagcattctgtttagttatacaaattataact gggttacttttagcaatgcac	159
2	2637	2755	tacaatcctagtgctagaagcatttaattcc gttgagcatattatgcgagacgtaacaatgg atgattaatacगतatttacacgctaatactgct tcagcttcttctcatagt	119
3	4928	5054	ctattgcatatgggaagagggctatattacgg ttcttagagcacctagaacgtagtatgaac tttaggtgaattatctttatattaatgatagttac agccttcctgggttatgtttacct	127
4	5415	5515	tatggcaaatgagcctatggggtgcaactgt catcacaaccttatgagtctataccgtgaa taggacaagatatagtcgaatttctgtgggga ggctt	101
5	6717	6989	ttcagtgaacaacgctactttaaacagatTTTT gcactacattttgtactaccttcgtattagcagc actagctttaatgcacttaattgcattacatgac agtgcgggatcgggtaaccctttaggtgtgtc aggttaacttgacagactaccctttgctccttatt tcatattaaagatttaataactatcttttattat attaggattatctatctttgtttcttcgcaccta atattaggtgatagtgaaaattacgtggt	273
6	8991	9041	ttaaccgtgctaaccctatgcaaacaccacct gccatagtaccggagtga	51
7	10344	10702	atcttctccttttatgctatattaagatctatacc taataaattgtaggtgttagctatgtttgcag ctatagtgatcttattagttatgccatttactgatt aggtagaagtagaggtatacaatttagacca ttaagtaaaatagcttactatttctttatagcta ttttaattttaatgaaattaggtgctaaactgttg aatctccatttattgagtttgacaaattagtact gtttatactttctcactttgtgattattgtacctt gtatcattaatagagaatactttagtggacttac atcttcataatactttatcacttaaaaatgttttta a	359

### **3.5. Metody analýzy molekulární struktury genů**

#### **3.5.1. Elektroforéza nukleových kyselin**

Elektroforéza je klasická metoda, univerzálně používaná k rozdělení elektricky nabitých makromolekul. V elektrickém poli se makromolekuly s nenulovým elektrickým nábojem pohybují k jedné z elektrod v závislosti na své relativní molekulové hmotnosti, celkovém náboji a tvaru. DNA obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny. V elektrickém poli se fragmenty DNA pohybují od záporné elektrody směrem ke kladné. Fragmenty o stejné délce postupují stejně rychle a po vizualizaci vytvoří proužek o stejné velikosti. Nejkratší fragmenty tvoří čelo, dlouhé se drží blízko startu (ROSYPAL a kol., 1997).

Vizualizace se provádí např. obarvením elektroforetického gelu ethidium bromidem. Díky své chemické struktuře se ethidium bromid naváže dovnitř dvoušroubovice a po excitaci ultrafialovým světlem (UV) emituje viditelné záření (SAMBROOK et al., 1989).

Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul od několika set bp až po molekuly o velikosti 50kb, polyakrylamidové gely slouží k oddělení menších molekul o velikosti 10 – 1000bp (ROSYPAL a kol., 1997).

##### **3.5.1.1. Separace technologií LAB-ON-CHIP**

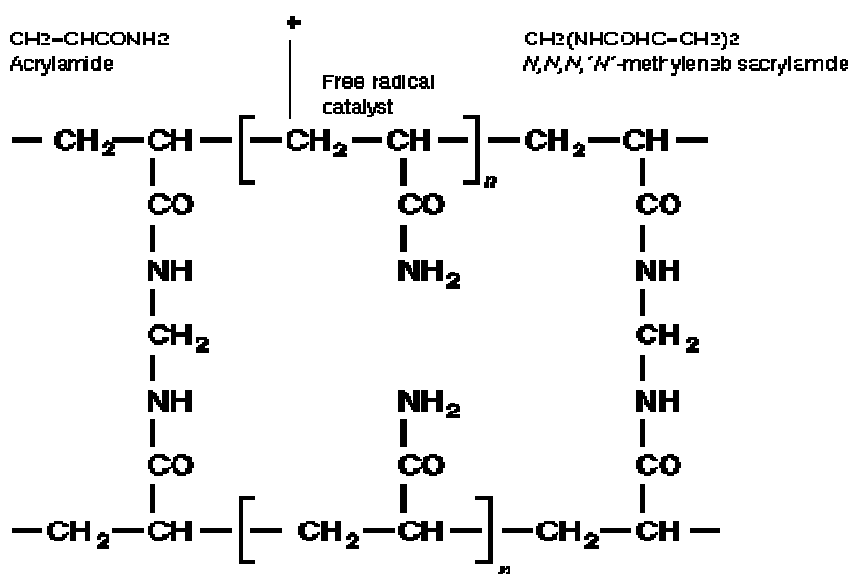
Technologie Lab-on-a chip prováděná na přístroji Bioanalyzer 2100 Agilent představuje mikrofluidní technologii pro analýzu DNA, RNA, proteinů a buněk. Nabízí alternativu k tradiční technice gelové elektroforézy, přináší rychlé, přesné a reprodukovatelné výsledky. Lab-on-a chip převádí laboratorní procesy na miniaturní čip, který je tvořen množstvím kanálů a zásobníků. Naplnění kanálů chipu gelovou matrix a zásobníků pufrem se vzorky, umožňuje provedení elektroforézy v miniaturním měřítku. Gelová matrix, obsahující fluorescenční barvičku, jež se váže

na molekulu DNA, je vtlačena pomocí „priming station“ do jednotlivých separačních kanálků chipu. Směs pufru se vzorkem je vedena elektrokinetickými silami do jednotlivých separačních kanálků, dle pořadí vzorků. Jednotlivé separované komponenty procházejí bodem, kde je detekováno množství fluorescence pomocí indukovaného laserového záření. Všechna data o hodnotách naměřené fluorescence jsou softwarově zpracovaná a převedená do zobrazovacích modulů buď jako „elektroforeogram“, nebo jako „běžný obrázek“ gelové elektroforézy (PANARO et al., 2000).

### 3.5.1.2. Separace v polyakrylamidovém gelu

Polyakrylamidový gel je hydrofilní polymer, jenž tvoří většinou lineární řetězce pospojované v určitých intervalech methylenovými můstky. Základní jednotkou polyakrylamidového gelu je monomer akrylamid, který polymeruje v přítomnosti volných radikálů, které poskytuje amonium persulfát (APS) za přítomnosti katalyzátoru TEMEDu (N,N,N,N'-tetrametylenetylen diamin). Vzniklé řetězce vytvářejí síť v přítomnosti N,N'-metylenbisakrylamidu a tak vznikne porózní gel. Hustota vytvořené sítě závisí na koncentraci N,N'-metylenbisakrylamidu v gelu - udává se v poměru k akrylamidu (akrylamid : N,N'-metylenbisakrylamidu = 29 : 1), (SAMBROOK et al., 1989).

Obr. 4 – schéma polyakrylamidového gelu (SAMBROOK et al., 1989)



### 3.5.1.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza, princip a použití

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je elektroforetická metoda určená k identifikaci bodových mutací ve fragmentu DNA. Je využívána tzv. teplota tání ( $T_m$ ), při které denaturuje dvouřetězcová DNA (dsDNA). Tato  $T_m$  je specifická pro určité sekvence.  $T_m$  mutovaného fragmentu DNA se liší od  $T_m$  nemutované DNA, a tím je odlišná i migrace fragmentů v akrylamidovém gelu. Přítomnost mutace v daném amplikonu způsobuje oddělování vláken dsDNA při nižší koncentraci denaturantu než v případě dsDNA bez mutací.

Pro každý zavedený systém PCR je nutné zjistit koncentraci denaturantu, při které bude nejlépe patrná odlišnost migrace mutovaných a nemutovaných fragmentů DNA. K tomu se využívá „perpendicular“ denaturační gradientový gel. Na jeho přípravu existuje speciální systém, který umožňuje připravit akrylamidový gel s horizontálně narůstající koncentrací denaturantu v rozmezí 0% - 100% resp. 20% - 70% (FISCHER et LERMAN., 1983).

Pro účinnější rozdělení fragmentů DNA se používá konstantní teplota elektroforetického pufru, a to v rozmezí 50 až 65°C.

Optimální výsledky jsou dosaženy na DGGE pokud je analyzovaný fragment DNA denaturován jen částečně. Této neúplné denaturace je dosaženo přidáním 30 – 40 bp GC bazí k jednomu z dvojice použitých primerů pro PCR. Tato GC svorka zajistí, že vyšetřovaný region bude mít nižší hodnotu  $T_m$  a vyšetřovaný úsek DNA zůstane částečně spojený do dsDNA (SMITH-SORENSEN et al., 1992).

Dle délky analyzovaného fragmentu se zvolí koncentrace polyakrylamidového gelu (tab. 3).

**Tab. 3 – Koncentrace polyakrylamidového gelu pro různé délky DNA fragmentů**

Koncentrace polyakrylamidového gelu	Délka fragmentu DNA
6%	300 – 1000 bp
8%	200 – 400 bp
10%	100 – 300 bp

V praxi se DGGE využívá v různých oborech a pro různé aplikace. V lékařské genetice byla například použita pro vyhledávání polymorfizmů v genu TP53 rakoviny plic, kde byla porovnávána úspěšnost vyhledávání mutací pomocí DGGE, SSCP a automatické kapilární elektroforézy (HOLMILA et HUSGAFVEL – PURSIANEN, 2006). V další práci byla DGGE použita jako referenční metoda k výsledkům denaturační vysokovýkoné kapalinové chromatografie (DHPLC) při vyhledávání mutací v TP53 u rakoviny jícnu a kardie (BRETON et al., 2003). V lékařské bakteriologii byla DGGE použita pro rozlišení druhů bakterií v domácnostech dětí – astmatiků, pocházejících z domácích zvířat či z provozu domácnosti (MAIER et al., 2010). Dále byla DGGE použita v molekulární ekologii pro rozlišení jednotlivých rodů z půdního společenství hlístic podle 18s rDNA (WAITE et al., 2003) či k odhalení genetické diverzity eukaryontních vodních mikroorganismů (HANNEN et al., 1998). U fytopatogenních hub byla metoda DGGE použita například k posouzení druhové diverzity rodu *Fusarium* u chřestu, kdy pomocí DGGE bylo rozlišeno více než 19 různých druhů mezi taxony rodu *Fusarium* (YERGEAU et al., 2005).

### **3.6. Přímé určení sekvence pomocí sekvenátoru ABI PRISM**

Vzhledem k tomu, že sekvenační proces klade velké nároky na čistotu sekvenovaného vzorku, je nutné provést před samotnou sekvenační reakcí purifikaci PCR produktů. Jednou z metod běžně používaných k purifikaci PCR produktů je purifikační kit MinElut (QIAGEN, USA). Tento kit využívá k čištění PCR produktů speciální kolony se silica membránami, které s minimálními ztrátami umí odstranit z PCR produktů zbytky primerů, nukleotidů, enzymů a dalších komponent, které jsou součástí PCR reakce. Pomocí vázacího pufru s vysokým obsahem solí a za optimálního pH (7,5) je PCR produkt navázán na silica membránu a čištěn purifikačním pufrům centrifugací. Po očištění je PCR produkt vymyt z membrány elučním pufrům s nízkým obsahem soli (VOGELSTEIN et GILLESPIE, 1979). Tímto kitem lze purifikovat produkty o délce 70bp – 4kb.

Sekvenování pomocí genetického analyzátoru ABI PRISM (Applied Biosystems), umožňuje provádět plně automatizovanou sekvenační a fragmentační



analýzu DNA. Analyzátor pracuje na principu elektroforetického dělení fragmentů ve velmi tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Pro každý vzorek je kapilára naplněna čerstvým polymerem, poté je automaticky nanesen přesný objem vzorku. Sekvenování probíhá podle Sangerovy metody. Analýza je založena na principu detekce vícebarevné fluorescence z inkorporovaných nukleotidů (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) po excitaci argonovým laserem (excitační spektrum 488 - 514 nm). Detekce emitovaného záření je prováděna pomocí citlivého CCD chipu s maximální citlivostí ve spektrálním pásmu 525 - 650 nm. Při jediném průchodu kapilárou je proto možné při sekvenování stanovit pořadí všech čtyř bazí. Řízení celého procesu i zpracování dat probíhá současně za použití PC a speciálního softwaru.

U PCR produktů je nutné před sekvenováním velmi pečlivě odstranit všechny zbytky primerů a dNTP, protože by se změnilo složení reakční směsi a značení nukleotidy by neproběhlo. Dalším důležitým faktorem je správné určení koncentrace DNA a délka PCR fragmentu. Doporučené koncentrace templátů PCR DNA je 10 - 30 ng.  $\mu\text{l}^{-1}$ , 60 - 180 ng na jednu sekvenační reakci.

Příprava značených fragmentů probíhá pomocí asymetrické PCR za použití značených nukleotidů, polymerázy, primerů a reakčního pufru (MCBRIDE et al., 1989). Vyjma primerů jsou tyto komponenty součástí firemního kitu dodávaného pro sekvenaci na přístroji ABI Prism. Po skončení asymetrické PCR je nutné vzniklé fragmenty přesrážet a odstranit všechny nezreagované složky kitu. Fragmenty DNA se pak rozpustí ve formamidu, který zajistí jejich denaturaci a vzorek je připraven pro sekvenční analýzu.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Biologický materiál

K analýzám bylo použito izolátů DNA z monosporických a směsných kultur *Venturia inaequalis*. Bylo získáno 38 vzorků DNA z 10 různých míst v České republice (tab. 4).

**Tab. 4 - Přehled vzorků použitých k analýzám**

Číslo	Označení vzorku	Původ	Typ izolátu
1	1	Veselý Žďár	směsný
2	2	Veselý Žďár	směsný
3	5	Veselý Žďár	směsný
4	7	Kladno - Sítná za jazykovkou	směsný
5	8	Kladno - Sítná u pekáren nahoře	směsný
6	9	Kladno - Štěpánská ulice za Labyrintem	směsný
7	10	Kladno - Štěpánská ulice za Labyrintem	směsný
8	12	Radňov R1	směsný
9	13	Radňov R2/2	směsný
10	14	Radňov R3/2	směsný
11	15	Radňov R3/2	směsný
12	16	Radňov	směsný
13	17	Radňov	směsný
14	19	Radňov	směsný
15	33	Žernov Topaz	směsný
16	36	Žernov Topaz MS 1	monosporický
17	38	Žernov Topaz MS 3	monosporický
18	39	Žernov Topaz MS 4	monosporický
19	40	Žernov Topaz MS 5	monosporický
20	41	Žernov Topaz MS 6	monosporický

Číslo	Označení vzorku	Původ	Typ izolátu
21	42	Žernov Topaz MS 2	monosporický
22	43	Brno – Golden Delicious	monosporický
23	44	Brťov – Jeneč - Goldstar	monosporický
24	45	Brťov – Jeneč - Rubinola	monosporický
25	46	Lysice - Jonagold	monosporický
26	47	Tuchoraz	monosporický
27	48	Velké Bílovice G. Del. 1	monosporický
28	49	Velké Bílovice G. Del. 2	monosporický
29	50	Velké Bílovice G. Del. 3	monosporický
30	51	Velké Bílovice G. Del. 4	monosporický
31	52	Velké Bílovice G. Del. 5	monosporický
32	53	Velké Bílovice G. Del. 6	monosporický
33	54	Velké Bílovice G. Del. 12	monosporický
34	55	Holovousy – Včelín 1	monosporický
35	56	Holovousy – Včelín 2	směsný
36	57	Holovousy – Včelín 3	směsný
37	58	Holovousy – Včelín 4	směsný
38	59	Holovousy – Včelín D1	směsný

#### 4.2. Primery a reakční podmínky polymerázové řetězové reakce (PCR)

Gen pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis* je složen ze sedmi exonů (kódující oblasti genu) a šesti intronů (nekódující oblasti genu). Dle sekvence tohoto genu uložené v databázi NCBI pod kódovým označením AF004559 (Zheng et Köller, 1997), bylo pro metodu PCR navrženo sedm sad primerů, které byly komplementární k přechodovým oblastem mezi jednotlivými introny a exony. Navržené primery byly o velikosti mezi 20 a 27 bazovými páry (bp). Pro zajištění optimálních výsledků v následné denaturační gradientové gelové elektroforéze byla k jednomu z dvojice primerů připojena na 5'konci GC svorka o délce 40 bp a sekvenci 5'cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gtc ccg ccg ccc ccg ccc g 3' (tab. 5).

**Tab. 5 – Primery použité pro amplifikaci jednotlivých exonů genu pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis***

Exon	Označení	Sekvence 5' - 3'	Délka primeru	Velikost produktu
1	<b>VICB1Fcl</b>	tctcactttttcaatttgatatgc	64	220
	VICB1R	ggtgttacttttagcaatgcacg	22	
2	VICB2F	ttcactacaatcctagtgctagaag	27	182
	<b>VICB2Rcl</b>	cgaaatatgctataaaacgactatgaa	67	
3	VICB3F	gggtagatttgctatttgcacat	22	250
	<b>VICB3Rcl</b>	ctacatcggcagggtcaaggt	60	
4	VICB4F	tgcaagataaaatctgagttgacg	23	198
	<b>VICB4Rcl</b>	tggtgttaggctcttcaatgaataat	66	
5	VICB5F	ttcagagaatggggttatcaaga	23	352
	<b>VICB5Rcl</b>	cccaagtataaccacgtaattttca	65	
6	<b>VICB6Fcl</b>	attacaaattcgtgtaatttacctttt	67	187
	VICB6R	agtgacatcttctgttctatcactcc	26	
7	<b>VICB7Fcl</b>	tccattttgggatcttcttcc	61	429
	VICB7R	tctgcccttttatccgacat	20	

Směs pro PCR byla připravena z následujících komponent: sterilní voda, 10xPCR pufr (Applied Biosystem, USA), 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystem, USA), hot start Gold Polymeráza 5U.μl<sup>-1</sup> (Applied Biosystem, USA), oligonukleotidy 10mM dNTP (Applied Biosystem, USA), dvojice primerů pro daný exon (každý 10 μM). Množství jednotlivých součástí PCR mixu jsou shrnuty v tabulce 6.

**Tab. 6 – Reagencie a jejich množství pro přípravu PCR mixu**

Reagencie	Na 1 PCR reakci
PCR Pufr	1x koncentrovaný
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTP	0,3 mM
Forward primer	0,28 μM
Reverse primer	0,28 μM
Hot Start Polymeráza	0,5 U
DNA	20 ng

Objem PCR reakce byl 25 mikrolitrů ( $\mu\text{l}$ ). Směs pro polymerázovou řetězovou reakci byl rozdělen do speciálních tenkostěnných 200  $\mu\text{l}$  zkumavek dle počtu vzorků a do každé zkumavky byl přidán jeden mikrolitr DNA o koncentraci  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Zkumavky byly pečlivě uzavřeny, aby nedocházelo k odpařování a vloženy do Termocykleru. Teplotní profil reakce je shrnut v tabulce 7.

**Tab. 7 - Teplotní profil PCR reakce**

Krok PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	95°C	10´	1
Denaturace	94°C	30´´	35
Annealing	60°C	30´´	
Extenze	72°C	60´´	
	72°C	6´	1
zchlazení	15°C	$\infty$	

#### 4.2.1. Ověření účinnosti amplifikace

Účinnost amplifikace byla ověřena na 1,5% agarózovém gelu. Bylo smícháno 5  $\mu\text{l}$  PCR produktu s 1  $\mu\text{l}$  6x Loading Dye. Tento mix byl opatrně napipetován do jamky v agarózovém gelu. Do poslední pozice na gelu bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  velikostního markeru Gene Ruler 100bp DNA (Fermentas). DNA putovala v agarózovém gelu 45 minut při 120 V, poté byl agarózový gel s nosičem vyjmut z elektroforetické vany, vložen na UV transiluminátor dokumentačního systému ChemiDoc (BioRad). Gel byl vyfocen a pořízená fotografie byla uložena ve formátu \*.jpg.

#### 4.3. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Pro denaturační gradientovou gelovou elektroforézu byl připraven 8% polyakrylamidový gel se dvěma koncentracemi denurantu a to 20% a 70%. Přesné množství jednotlivých reagentů je popsáno v tabulkách 8 a 9.

**Tab. 8 - 8% polyakrylamidový gel 20% denaturant**

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem</b>
40% Bis-Acrylamid (37,5:1)	20 ml
50xTAE	2 ml
Formamid	8 ml
Urea	8,4 g
Destilovaná voda	Doplnit do 100 ml

**Tab. 9 - 8% polyakrylamidový gel 70% denaturant**

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem</b>
40% Bis-Acrylamid (37,5:1)	20 ml
50xTAE	2 ml
Formamid	28 ml
Urea	29,4 g
Destilovaná voda	doplnit do 100 ml

Byl připraven systém pro nalití gelu. Systém se skládá ze dvou skel, z nichž jedno má výřez pro umístění plastových vsuvek, které po zatuhnutí gelu vytvoří jamku pro nanášení vzorků. Skla byla očištěna z vnitřních stran etanolem, aby bylo zajištěno rovnoměrné vzlínání nalévaného gelu. Na sklo bez výřezu byly umístěny po obou stranách a doprostřed „spacing“ s otvorem pro nalévání gelu. Bylo přiloženo druhé sklo s výřezem a takto spojená skla byla vložena do úchytného stojánku, který měl na svém dně pryž proti protékání gelu. Do horní části sestavených skel, byla vložena plastová vsuvka a skla byla upevněna do stojánku. Byl sestaven nalévací systém, který se skládá ze dvou stříkaček, plnicího zařízení, hadiček a kohoutů. Skla se stojanem byla nakloněna do šikmé polohy. Byly vytaženy kolíčky z odvzdušňovacích otvorů stojanu a připojeny přírodní hadičky do otvorů k tomu určených. Do připravených polyakrylamidových směsí o objemu 10 ml bylo přidáno 100 µl 10% roztoku amonium persulfátu a 10 µl TEMEDu. Směs byla natažena do stříkaček. Do jedné stříkačky 8% polyakrylamid se 70% denaturantem do druhé

stříkačky 8% polyakrylamid s 20% denaturantem. Stříkačky byly vloženy do plnicího zařízení a připojeny k hadičkám, které byly zasunuty do otvorů ve stojanu se skly. Pomalu bylo otáčeno kolečkem v plnicím zařízení, které umožnilo tlak na písty obou stříkaček tak, že gel ve stříkačkách byl vytlačován v určitém poměru do hadiček a následně mezi skla ve stojanu. Když hladina roztoku gelu mezi skly dosáhla pár milimetrů nad horní plastovou vsuvku, byl uzavřen přívod gelu příslušnými kohouty na přívodních hadičkách a odvzdušňovací otvory ve stojanu se skly byly uzavřeny kolíčky. Skla s roztokem gelu byla umístěna do horizontální polohy a nechala se 60 minut polymerizovat.

V průběhu polymerizace gelu byl připraven 0,5xTAE elektroforetický pufr, který byl nalit do elektroforetické vany a předeřhát na 56°C. Po zatuhnutí gelu byla skla vyňata z nalévacího systému, byly vytaženy plastové vsuvky a jamky na vzorky byly promyty destilovanou vodou. Skla s gelem byla upevněna do držáků pro elektroforézu a vložena do předeřhátého elektroforetického pufru. Pro každý vyšetřovaný exon bylo amplifikováno pět náhodně vybraných vzorků z vyšetřovaného souboru. PCR produkty těchto vzorků byly smíchány a byly nanесeny do jamek na polyakrylamidovém gelu. DNA fragmenty byly děleny pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy 3 hodiny při 200 voltech.

Po proběhnutí elektroforézy byl gel opatrně sňat ze skel a vložen na 5 minut do lázně TAE pufru, do které bylo přidáno 20  $\mu$ l ethidium bromidu pro obarvení fragmentů DNA. Poté byl gel položen na UV transiluminátor, kde byla pořízena obrazová dokumentace. Analýzou obrázku byla zjištěna optimální koncentrace denaturantu pro každý ze sedmi analyzovaných exonů.

#### **4.4. Konstantní denaturační gelová elektroforéza (CDGE)**

Konstantní denaturační gelová elektroforéza byla provedena pro každý amplifikovaný exon. Množství denaturantu použitého pro CDGE bylo zjištěno pro každý exon pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy v horizontálním gradientu denaturantu.

**Tab. 10 – Množství denurantů použitého pro CDGE**

Exon číslo	% denurantů v 8% akrylamidovém gelu
1	29,5
2	32,5
3	25
4	50
5	22,5
6	37,5
7	65

Byl sestaven nalévací systém pro konstantní denaturační gelovou elektroforézu. Skla pro CDGE byla očištěna etanolem a přiložena očištěnou stranou k sobě. Mezi skla byly vloženy plastové „spacery“, které zajistily mezeru mezi skly pro nalití akrylamidového gelu. Skla byla vložena do svorek a do horní části byla mezi skla vložena plastová vsuvka s 20 „zuby“, které zajistily mezery v gelu pro nanesení vzorků. Nalévací systém byl řádně utěsněn a byl připraven 8% akrylamidový gel s množstvím denurantů optimalizovaným dle DGGE (tab. 10). Před nalitím polyakrylamidového gelu bylo do 200 ml směsi přidáno 200  $\mu$ l 10% amonium persulfátu a 20  $\mu$ l TEMEDu. Pomocí stříkačky byl akrylamidový gel opatrně aplikován mezi připravená skla. Takto nalitý gel polymerizoval 1 hodinu. Byl připraven 0,5xTAE elektroforetický pufr, který byl nalit do elektroforetické vany a předeřát na 56°C.

Po zatuhnutí byla skla s gelem vyňata z nalévacího systému, byly vytaženy plastové vsuvky a jamky na vzorky byly promyty destilovanou vodou. Skla s gelem byla upevněna do držáků pro elektroforézu a vložena do předeřátého elektroforetického pufru. Do jednotlivých jamek v gelu bylo nanášeno 6  $\mu$ l PCR vzorku smíchaného s 6  $\mu$ l DGGE vzorkového pufru. Konstantní denaturační gelová elektroforéza probíhala 220 minut při 100 voltech. Po dokončení elektroforézy byl gel opatrně sňat ze skel a vložena na 5 minut do lázně TAE pufru, do kterého bylo přidáno 20  $\mu$ l ethidium bromidu pro obarvení fragmentů DNA. Poté byl gel položen na UV



transiluminátor dokumentačního systému (BioRad), kde byla pořízena obrazová dokumentace.

#### **4.5. Extrakce PCR produktů z akrylamidového gelu**

Po vizualizaci a zdokumentování polyakrylamidového gelu, byly vybrány dle rozdílu lokalizace zóny, které by mohly obsahovat mutace. Tyto zóny byly vyříznuty skalpelem z gelu a vloženy do 1,5 ml zkumavky. K vyříznutým částem gelu bylo přidáno 100  $\mu$ l sterilní vody, ve které byl gel vymyt.

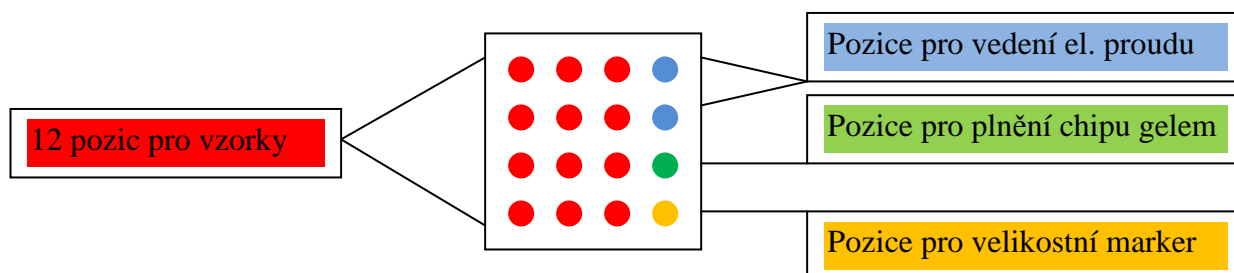
#### **4.6. Reamplifikace fragmentů DNA a ověření účinnosti reamplifikace**

Vyříznuté fragmenty DNA byly reamplifikovány pomocí PCR. Byl připraven PCR mix s primery dle exonu, z kterého byly vyříznuté proužky. PCR mix byl nadávkován do PCR zkumavek po 24  $\mu$ l a bylo přidáno 1  $\mu$ l PCR extraktu. PCR zkumavky byly vloženy do termocykleru, kde proběhla PCR. Teplotní profil byl použit stejný jako při první amplifikaci, dle amplifikovaného exonu.

Po dokončení PCR byla ověřena účinnost reamplifikace pomocí technologie LAB-ON-CHIP, na přístroji Bioanalyzer 2100 Agilent.

Reagencie pro analýzu byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Na chip (obr. 5) do pozice G bylo nanášeno pipetou 9  $\mu$ l gel-dye mixu. Chip byl vložen do priming station a gel v pozici G byl vtlačěn do chipu pomocí stříkačky připojené k „priming station“. Pipetou bylo nanášeno 9  $\mu$ l gel-dye mixu do dvou pozic pro vedení elektrického proudu. Do 12 pozic pro vzorky a jedné pozice pro velikostní marker bylo pipetou nanášeno 5  $\mu$ l Nano markeru (nosič pro vzorky). Do pozic pro vzorky byl pipetou nanášen 1  $\mu$ l PCR produktu, do poslední pozice byl nanášen 1  $\mu$ l velikostního markeru. Chip byl vložen do třepačky a byl míchán 1 minutu při 3000 rpm. Poté byl vložen do Bioanalyzer 2100 Agilentu, který byl před analýzou promyt destilovanou vodou. Byla provedena analýza.

**Obr. 5 – Schéma Lab-on-chipu**



#### **4.7. Purifikace PCR produktů**

Před přípravou sekvenační reakce byly PCR produkty purifikovány kitem MinElute (QIAGEN, USA). Jeden díl PCR produktu byl smíchán s 5 díly vázacího pufru PB. Směs byla pipetou přenesena na MinElute kolonu a centrifugována 1 minutu při 13000 rpm. Filtrát byl odstraněn a na kolonu, kde zůstaly zachyceny fragmenty DNA, bylo přidáno 750 ul purifikačního pufru PE. Kolona byla vložena do centrifugy, kde proběhla centrifugace 1 minutu při 13000 rpm. Filtrát byl odstraněn a kolona byla ještě jednou centrifugována 1 minutu při maximálních otáčkách, aby došlo k úplnému odstranění PE pufru. Po centrifugaci byla kolona vložena do čisté zkumavky a bylo pipetou naneseo 20 ul elučního pufru EB. Proběhla minutová inkubace při laboratorní teplotě a následná centrifugace kolony 1 minutu při 14000 rpm. Filtrát, který obsahoval purifikovaný fragment DNA, byl přenesen do čisté zkumavky.

#### **4.8. Sekvenační reakce**

Byla namíchána reakční směs pro sekvenační analýzu z každého vyřezaného a reamplifikovaného PCR produktu (tab. 11). Směs pro sekvenační reakci byla napipetována do tenkostěnných 200 µl PCR zkumavek, které byly vloženy do termocykléru, kde proběhla asymetrická PCR (tab. 12).

**Tab. 11 – Složení sekvenační směsi**

Reagencie	Množství na 1 reakci (μl)
Sterilní voda pro PCR	3
BDT 1.1	1,5
Primer 10 μM	1
PCR produkt	2
<b>celkový objem</b>	<b>7,5</b>

**Tab. 12 - Teplotní profil asymetrické PCR reakce**

Krok PCR	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	96°C	10''	30
Annealing	50°C	5''	
Extenze	60°C	4'	
Zchlazení	4°C	∞	

Produkty asymetrické PCR byly smíchány s 80 μl 75% isopropanolu a krátce promíchány na stolním vortexu. Směs byla inkubována 15 minut ve tmě při laboratorní teplotě a následně centrifugována 20 minut při 4°C a 14 000 rpm. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a do zkumavek bylo přidáno 250 μl 75% isopropanolu. Směs byla krátce promíchána na stolním vortexu a centrifugována 5 minut při 4°C a 14 000 rpm. Supernatant, oddělený centrifugací, byl pečlivě odstraněn a vzorek byl vysoušen ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 25 μl formamidu, promíchány a celý objem byl přenesen do sekvenační destičky. Po přenesení všech vzorků byla destička vložena do sekvenátoru ABI PRISM 7300, kde proběhla sekvenační reakce.

#### 4.9. Sekvenační analýza

Sekvenační analýza byla provedena pomocí programů Chromas Lite a Vector NT. Pomocí programu Chromas Lite byly sekvence hodnoceny z pohledu úspěšnosti sekvenační reakce a pořadí jednotlivých bazí. Pomocí programu Vector NT byla

provedena srovnávací analýza jednotlivých sekvencí vzorků se známou sekvencí daného exonu uložené v databázi NCBI pod kódovým označením AF004559.

## 5. Výsledky a diskuze

Na základě odborných publikací, které popisují mutace v mitochondriálním genu pro cytochrom *b* způsobující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům u různých hub a oomycet (STEINFELD et al., 2001; GISL et al., 2002; SIEROTZKI et al., 2007; ISHII et al., 2001; KIM et al., 2003; SIEROTZKI et al., 2000a; SIEROTZKI et al., 2000b), jsem se v rámci své diplomové práce snažila nalézt tyto mutace a případně další mutace v mitochondriálním genu pro cytochrom *b* *Venturia inaequalis*.

K vyhledávání polymorfizmů byla použita metoda denaturační gelové elektroforézy. Bylo analyzováno 38 vzorků z 10 různých lokalit České republiky, z nichž některé vykazovaly známky rezistence vůči strobilurinovým fungicidům (tab. 13). U části rezistentních vzorků byly prokázány mutace v exonu 4 genu pro CYTB metodou konformačního polymorfizmu jednořetězcové DNA (SSCP), (tab. 13), (obr. 6). Tato analýza byla provedena nezávisle na této práci.

Prvním krokem k přípravě denaturační gelové elektroforézy bylo namnožení sedmi exonů pomocí PCR. Účinnost PCR byla ověřena na agarózovém gelu (obr. 7). Pro každý amplifikovaný exon byla provedena denaturační gradientová gelová elektroforéza, aby byla zjištěna koncentrace denaturantu, při které je nejlépe patrná odlišnost v elektroforetické mobilitě potenciálně mutovaných vzorků a vzorků bez mutací (obr. 8 a 9). Hodnoty koncentrace denaturantu použité pro CDGE jsou shrnuty v tabulce 10. V případě exonů 1 – 6 bylo možné určit dle DGGE koncentraci denaturantu, jelikož rozdíl v elektroforetické mobilitě částečně denaturovaných DNA fragmentů s mutací a bez mutace se zdál být zřetelný. Přestože byl pro exon sedm použit 8 i 6% polyakrylamidový gel, nepodařilo se určit koncentraci denaturantu pro konstantní gelovou elektroforézu, jak je patrné na obrázku 9. Koncentrace pro CDGE byla odhadnuta (65%). Možným důvodem proč se DGGE exonu 7 nepodařilo provést, může být délka amplikonu. V případě exonu 7 se jedná o nejdelší analyzovaný amplikon (359 bp). Dalším možným důvodem by mohlo být zastoupení bází guaninu a cytosinu v exonu sedm pouze v 26%. Vazba mezi guaninem (G) a cytosinem (C) je stabilizována třemi vodíkovými můstky a zaniká obtížněji než vazba mezi adeninem (A) a thyminem (T), protože pár A-T je stabilizován pouze dvěma vodíkovými můstky (ALBERTS et al., 1998). Vysoké zastoupení bází A a T, by mohlo

znamenat rychlou denaturaci DNA fragmentu a tudíž nízkou elektroforetickou mobilitu.

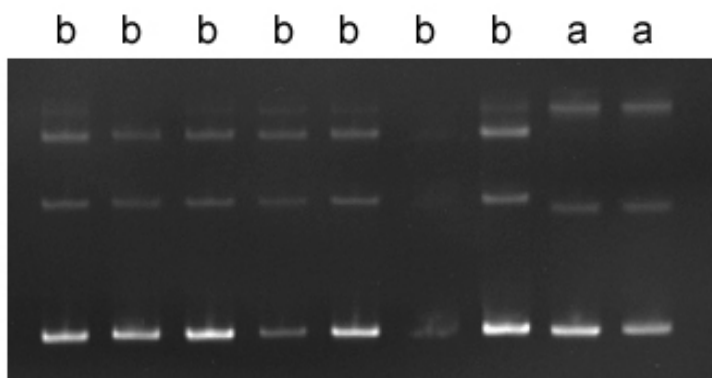
Na základě zjištěných koncentrací denaturantu byla provedena konstantní denaturační gelová elektroforéza pro každý exon u 38 vzorků. Dle rozdílů v elektroforetické mobilitě byly vybrány vzorky s potenciálními polymorfismy (obr. 10 – 16). Vybrané vzorky jsou shrnuty v tabulce 14. U těchto vzorků byla provedena sekvenační analýza, které předcházela reamplifikace DNA fragmentů (obr. 21) a purifikace reamplifikovaných vzorků. Dále byla provedena asymetrická PCR s následným přečištěním a na závěr samotné sekvenování. Získané sekvence byly analyzovány v programech Chromas Lite a Vector NTI. V programu Vector NTI bylo provedeno, pomocí funkce Alignment, porovnání sekvencí analyzovaných vzorků se známou sekvencí jednotlivých exonů mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis* získanou v knihovně NCBI pod kódovým označením AF004559 (obr. 21). Sekvence vzorků byly zkontrolovány v programu Chromas Lite, kde byla potvrzena záměna guaninu za cytosin v exonu 4 u vzorků 57 a 59 (obr. 18 – 19). Na obrázku 20 je sekvence vzorku 9, který nemá mutaci v exonu 4 mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis*. Sekvence vzorků s mutací byly transformovány pomocí programu Vector NTI do aminokyselinové sekvence (obr. 22). Záměna guaninu za cytosin má za následek změnu aminokyseliny glycinu na alanin na pozici 143 (G143A).

**Tab. 13 – Mutace v exonu 4 dle SSCP, dle DGGE a citlivost vůči strobilurinovým fungicidům u jednotlivých izolátů**

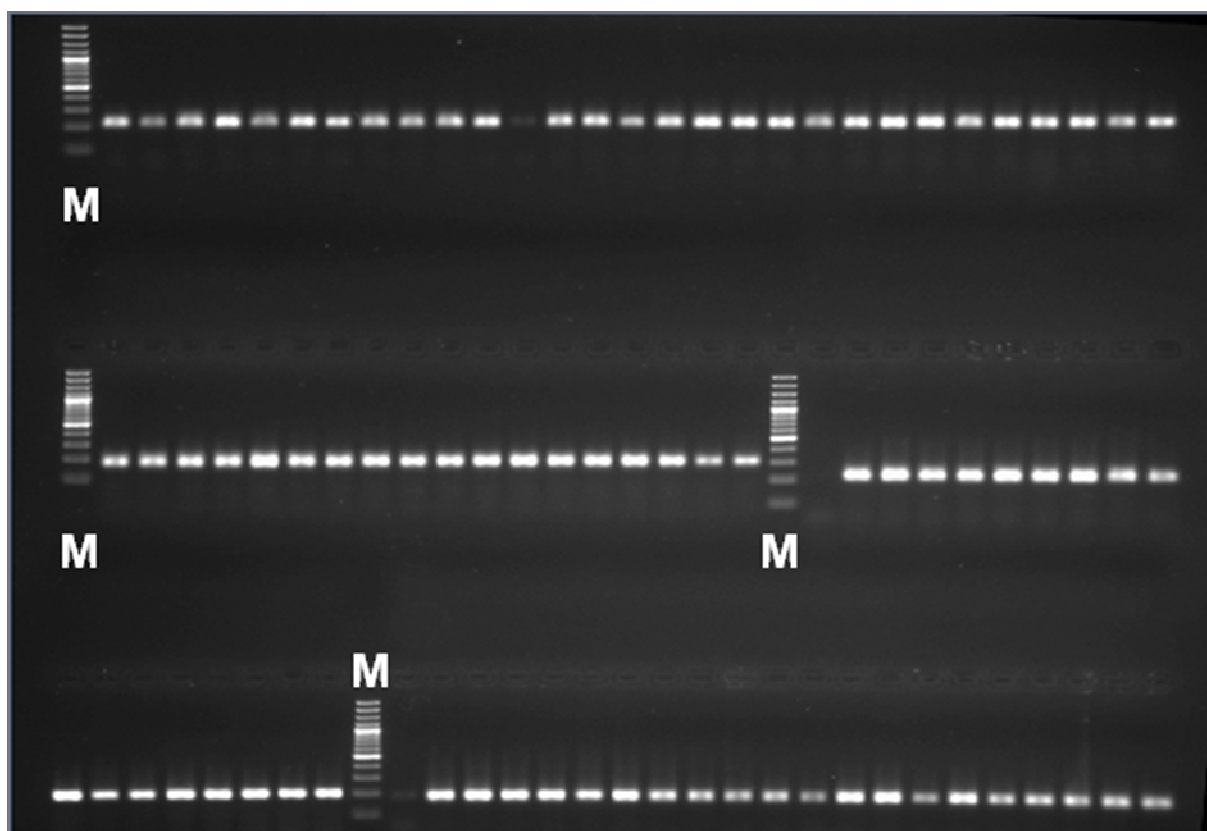
Číslo	Označení vzorku	Mutace v exonu 4 dle SSCP	Mutace v exonu 4 dle DGGE	Citlivost vůči fungicidům
1	1	bez mutace	bez mutace	citlivý
2	2	bez mutace	bez mutace	citlivý
3	5	bez mutace	bez mutace	citlivý
4	7	bez mutace	bez mutace	citlivý
5	8	bez mutace	bez mutace	citlivý
6	9	bez mutace	bez mutace	citlivý
7	10	bez mutace	bez mutace	citlivý

Číslo	Označení vzorku	Mutace v exonu 4 dle SSCP	Mutace v exonu 4 dle DGGE	Citlivost vůči fungicidům
8	12	bez mutace	bez mutace	citlivý
9	13	bez mutace	bez mutace	citlivý
10	14	bez mutace	bez mutace	citlivý
11	15	bez mutace	bez mutace	citlivý
12	16	bez mutace	bez mutace	citlivý
13	17	bez mutace	bez mutace	citlivý
14	19	bez mutace	bez mutace	citlivý
15	33	bez mutace	bez mutace	citlivý
16	36	bez mutace	bez mutace	citlivý
17	38	bez mutace	bez mutace	citlivý
18	39	bez mutace	bez mutace	citlivý
19	40	bez mutace	bez mutace	citlivý
20	41	bez mutace	bez mutace	citlivý
21	42	bez mutace	bez mutace	citlivý
22	43	bez mutace	bez mutace	citlivý
23	44	bez mutace	bez mutace	citlivý
24	45	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
25	46	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
26	47	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
27	48	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
28	49	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
29	50	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
30	51	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
31	52	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
32	53	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
33	54	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
34	55	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
35	56	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
36	57	<b>s mutací</b>	<b>s mutací</b>	<b>odolný</b>
37	58	<b>s mutací</b>	bez mutace	<b>odolný</b>
38	59	<b>s mutací</b>	<b>s mutací</b>	<b>odolný</b>

Obr. 6 – SSCP exonu 4 vybraných vzorků, dráhy označené a – vzorky bez mutace, dráhy označené b – vzorky s mutací G143A

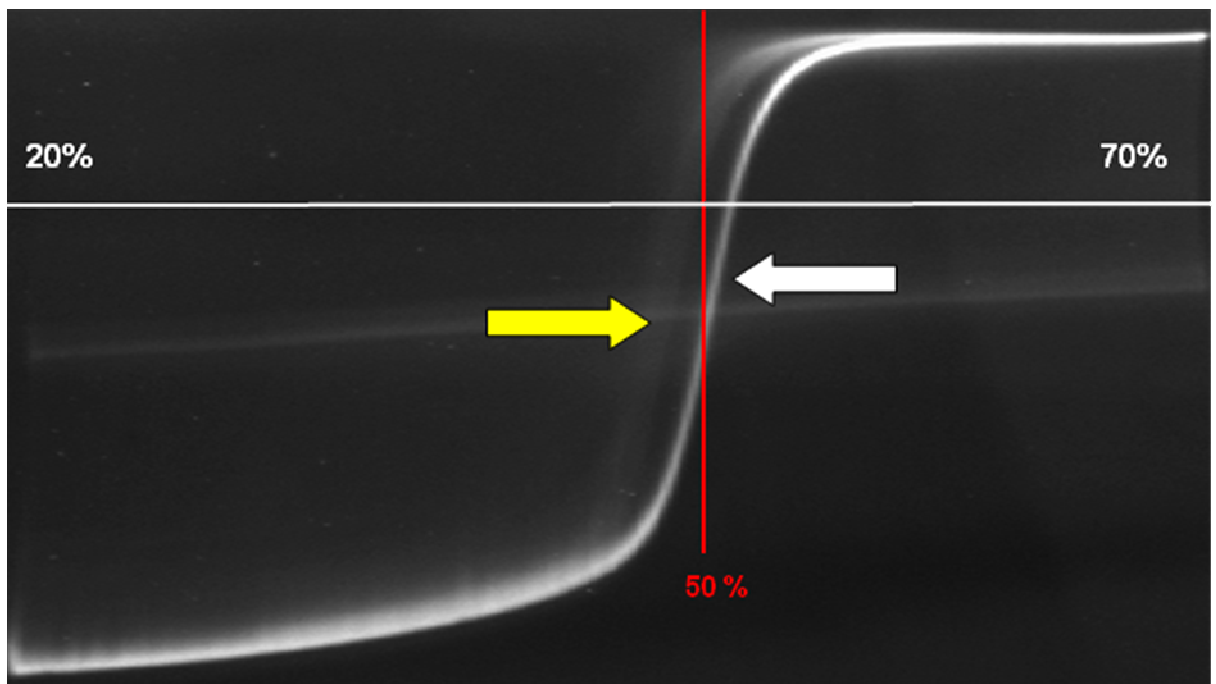


Obr. 7 – Agarózový gel pro ověření účinnosti amplifikace - vybrané vzorky, M – velikostní marker, ostatní dráhy – PCR produkty vzorků

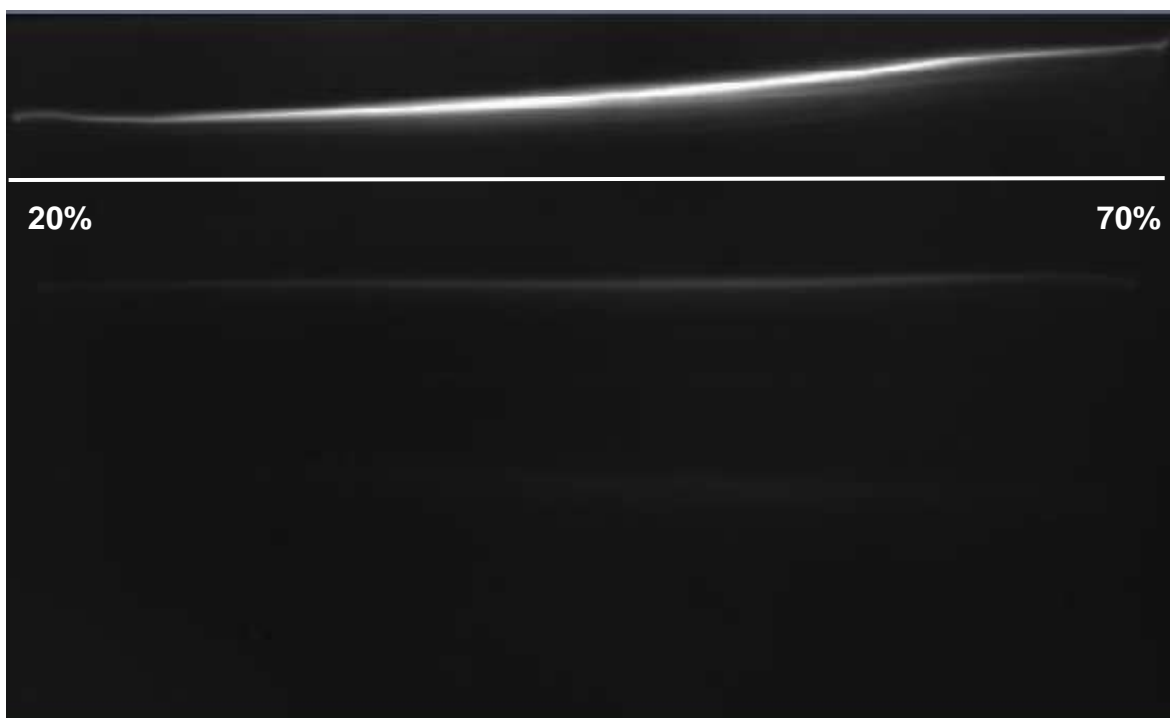




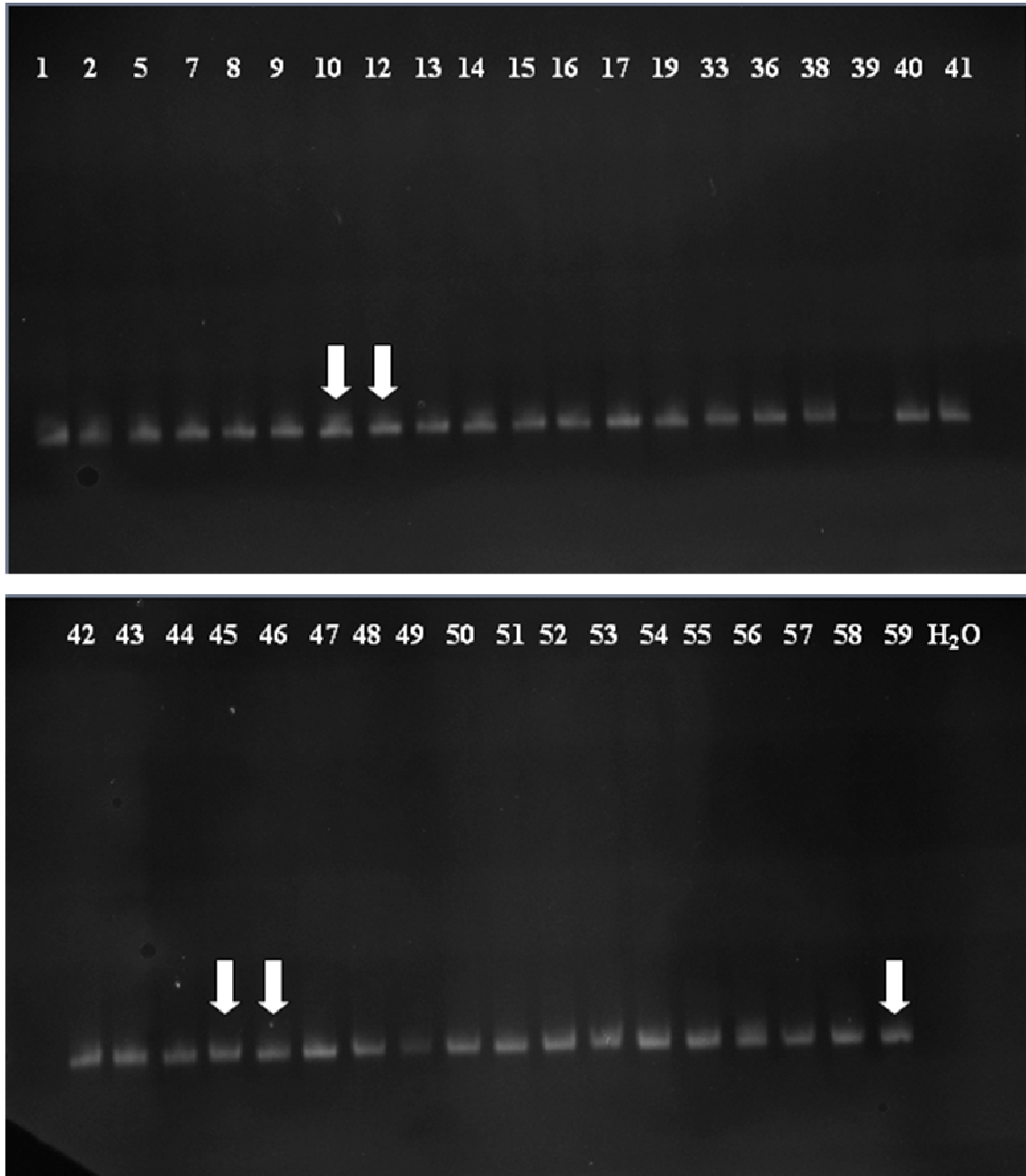
Obr. 8 - DGGE – PCR produkty exonu 4, žlutá šipka označuje potenciálně mutované fragmenty DNA, bílá šipka označuje fragmenty DNA bez mutací.



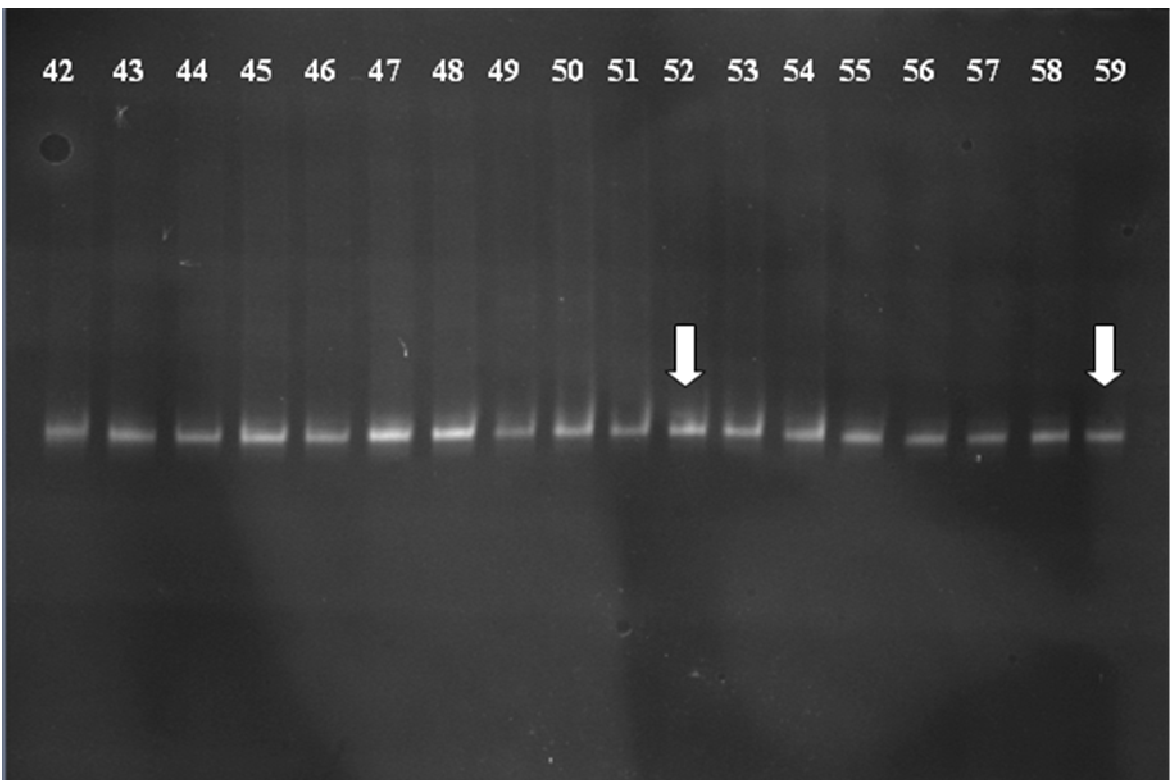
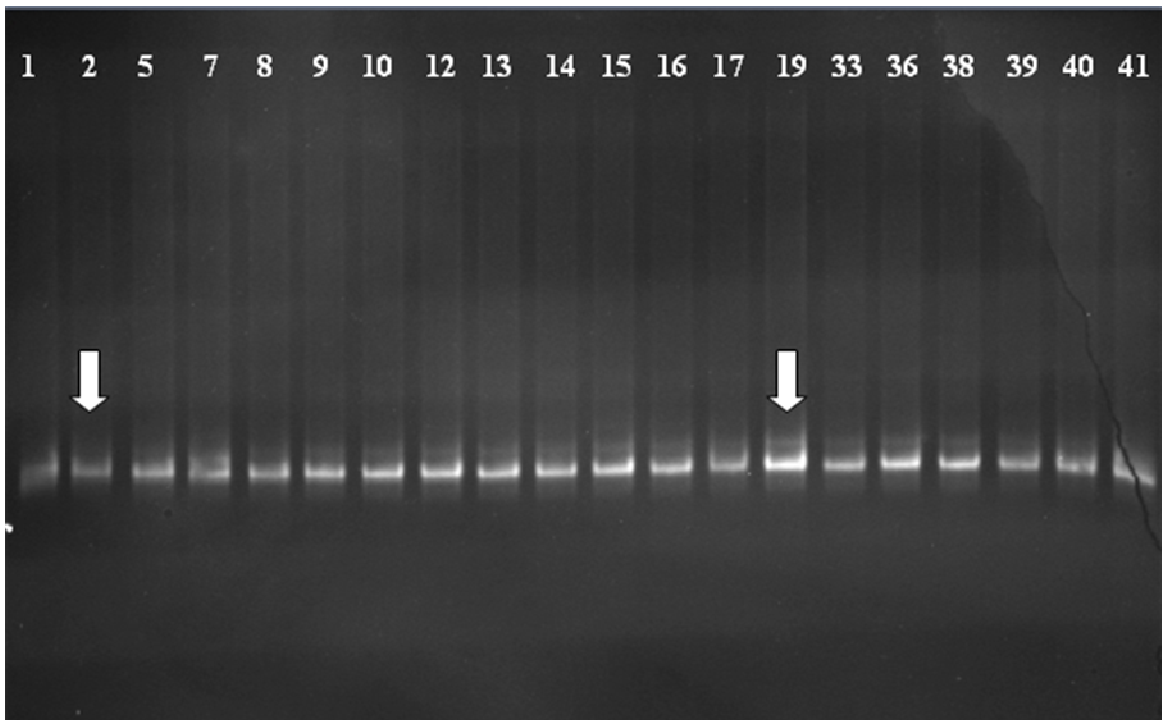
Obr. 9 - DGGE – PCR produkty exonu 7, nedokonalá migrace DNA fragmentů



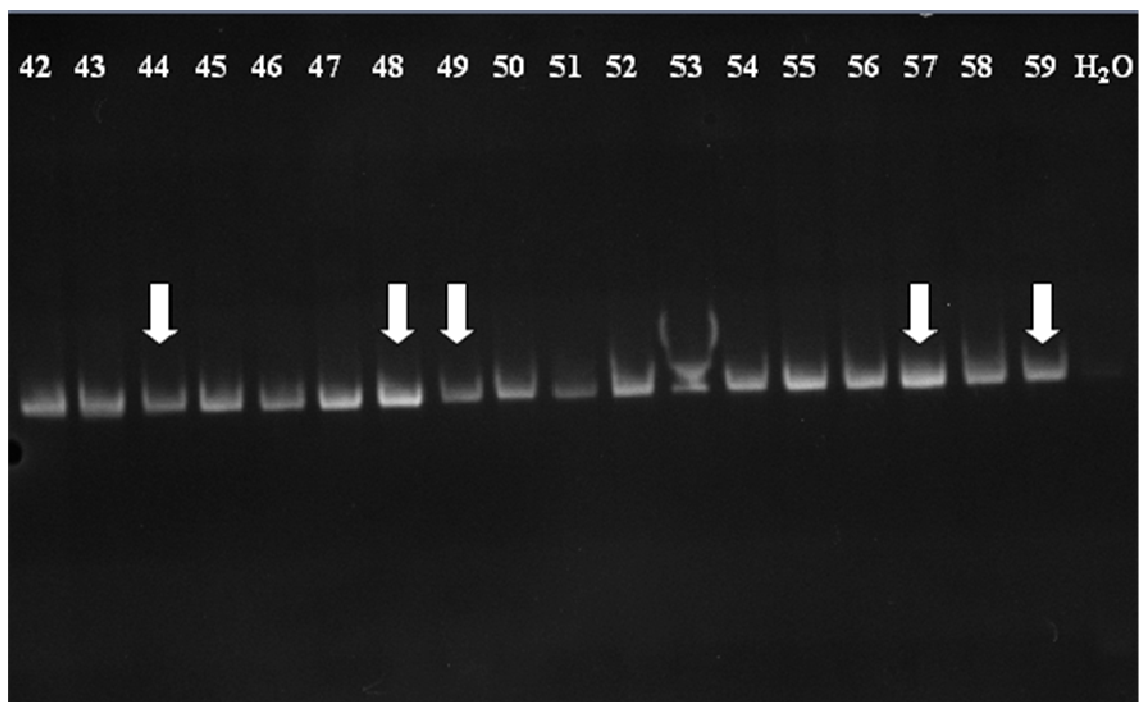
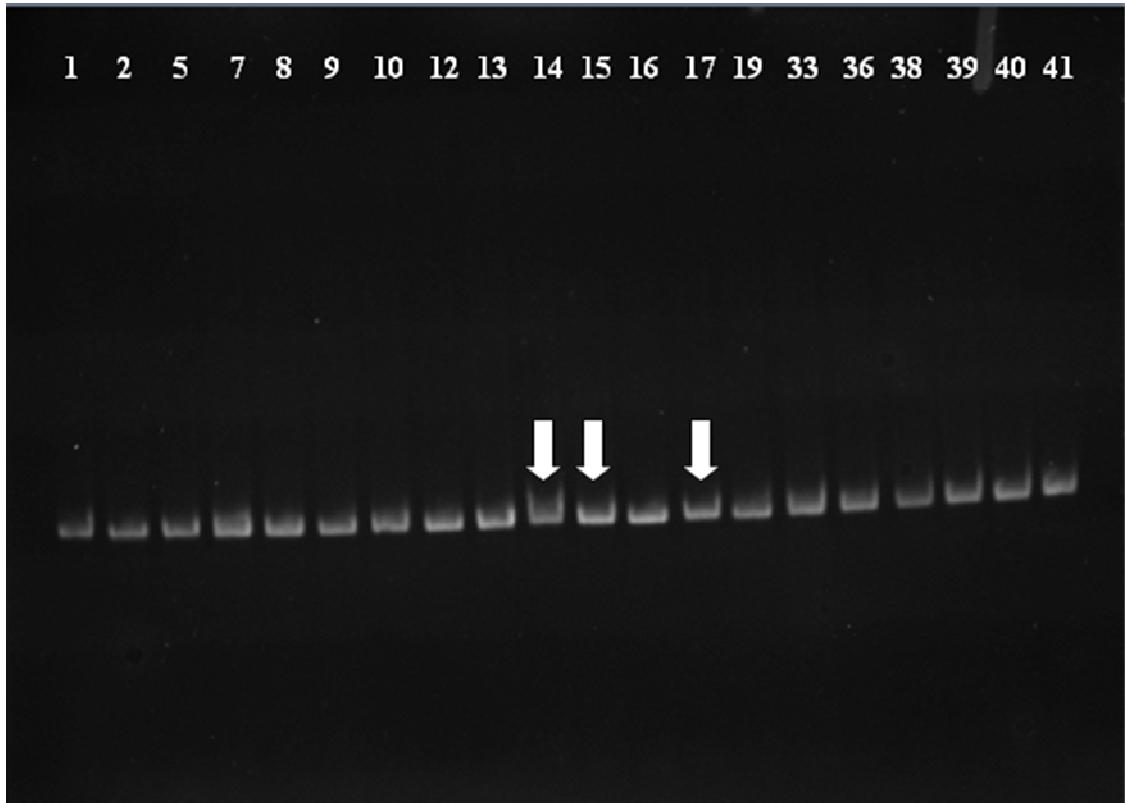
Obr. 10 - CDGE – PCR produkty exonu 1, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenační analýze, v poslední dráze je negativní kontrola – PCR amplifikována s H<sub>2</sub>O



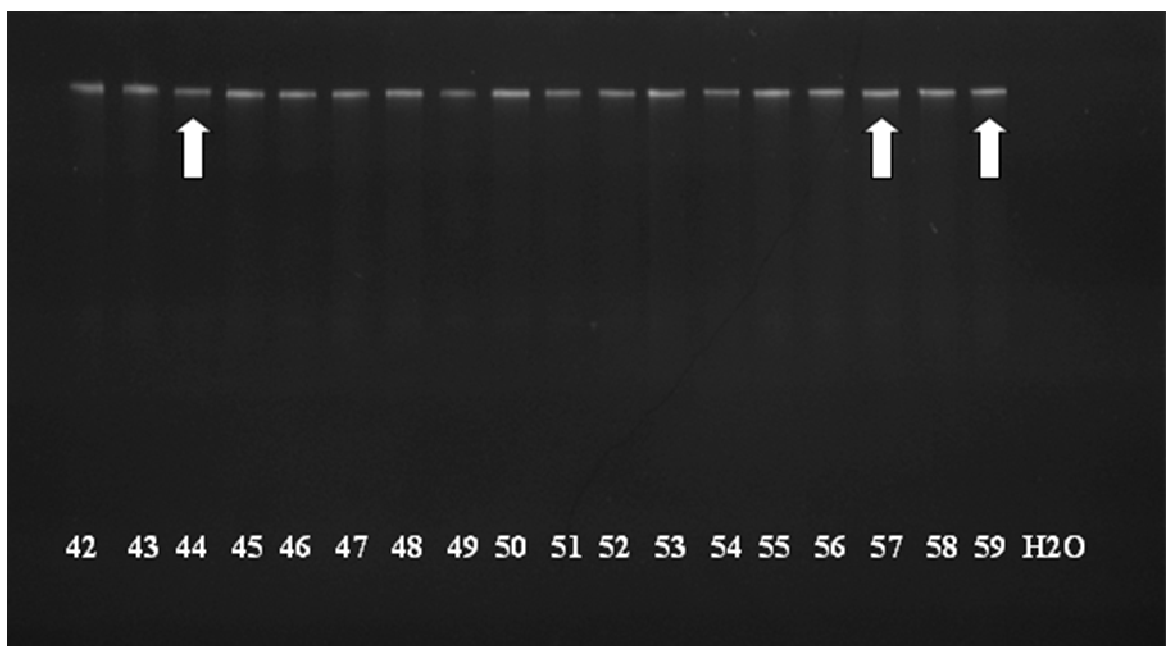
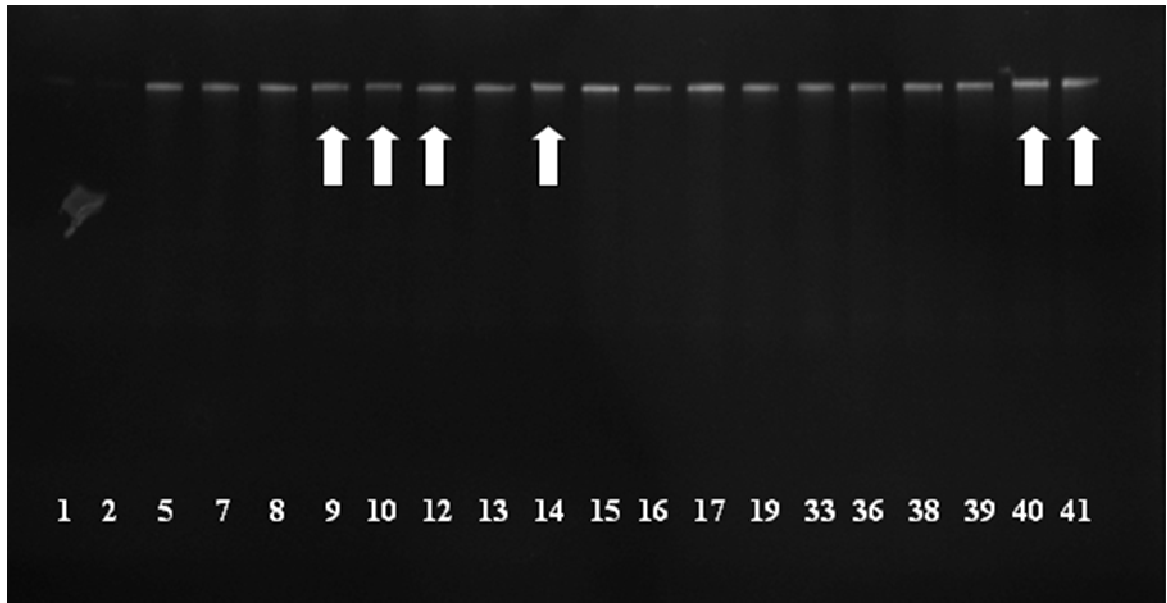
Obr. 11 - CDGE – PCR produkty exonu 2, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenční analýze



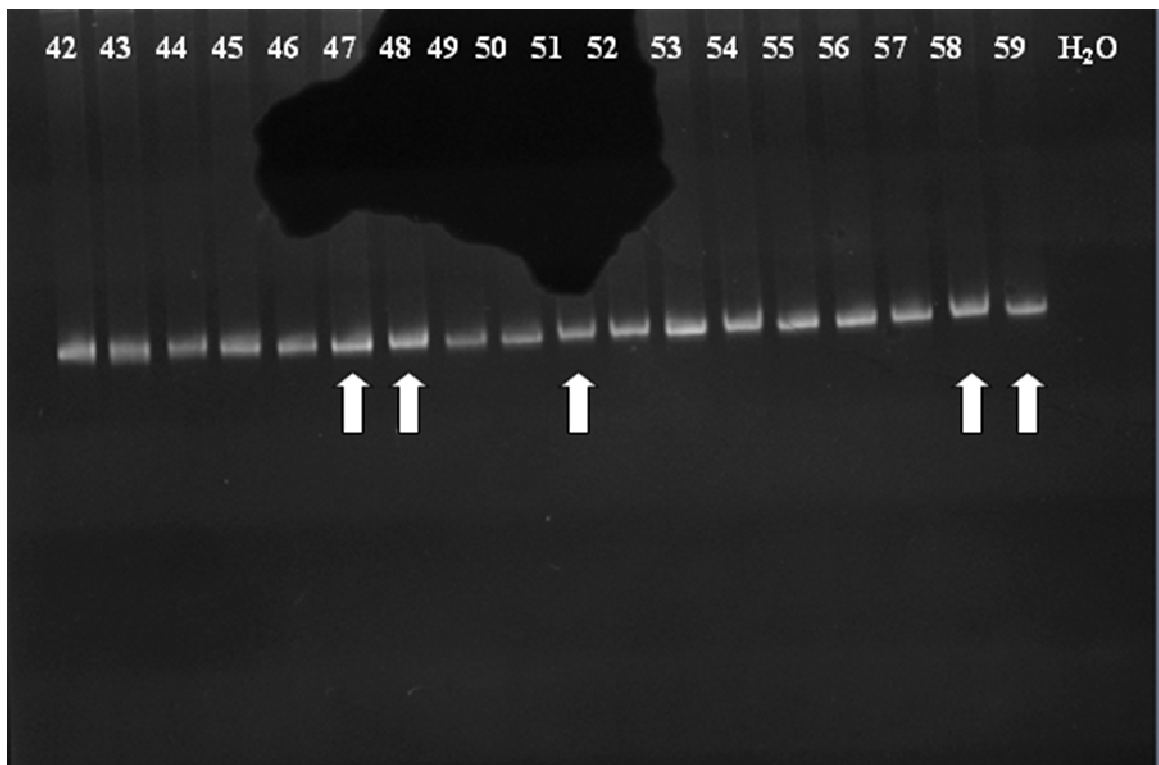
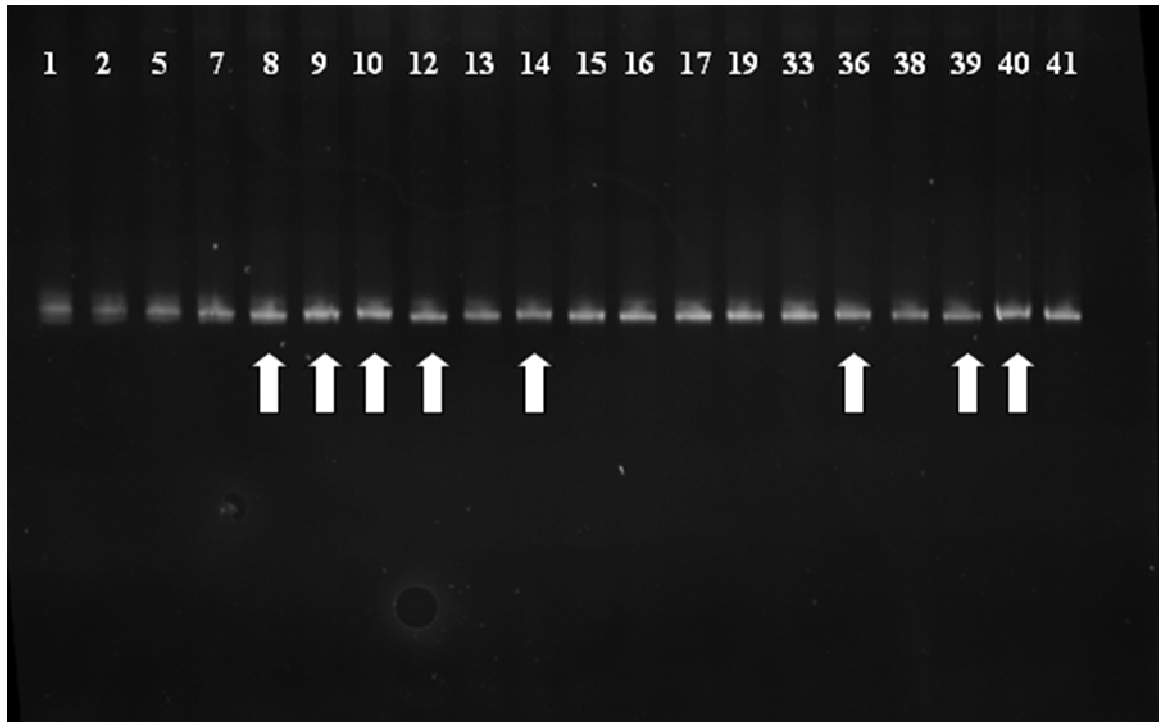
Obr. 12 - CDGE – PCR produkty exonu 3, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenační analýze, v poslední dráze je negativní kontrola – PCR amplifikována s H<sub>2</sub>O



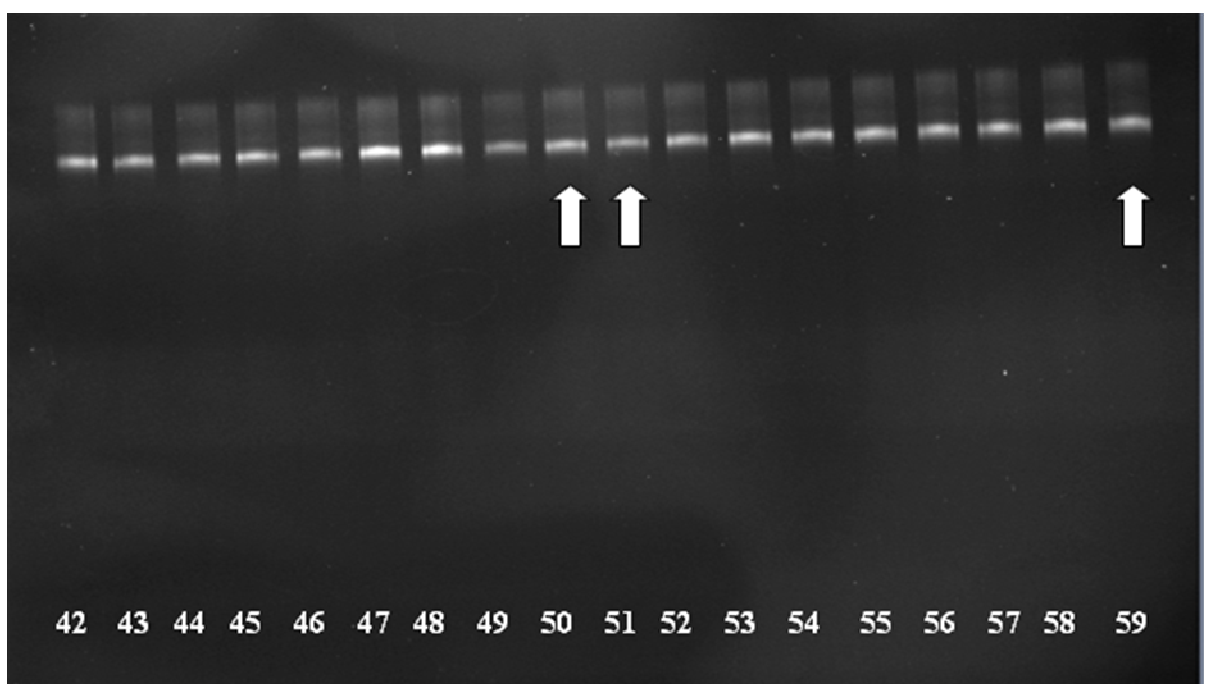
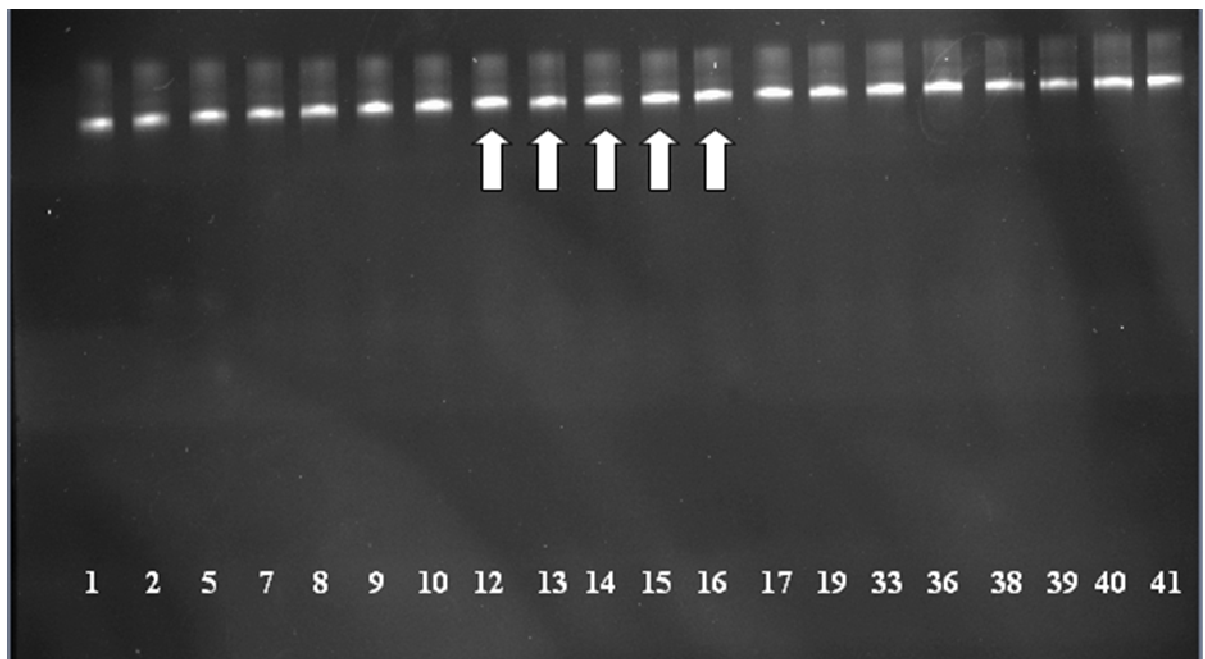
Obr. 13 – CDGE – PCR produkty exonu 4, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenační analýze, v poslední dráze je negativní kontrola – PCR amplifikována s H<sub>2</sub>O



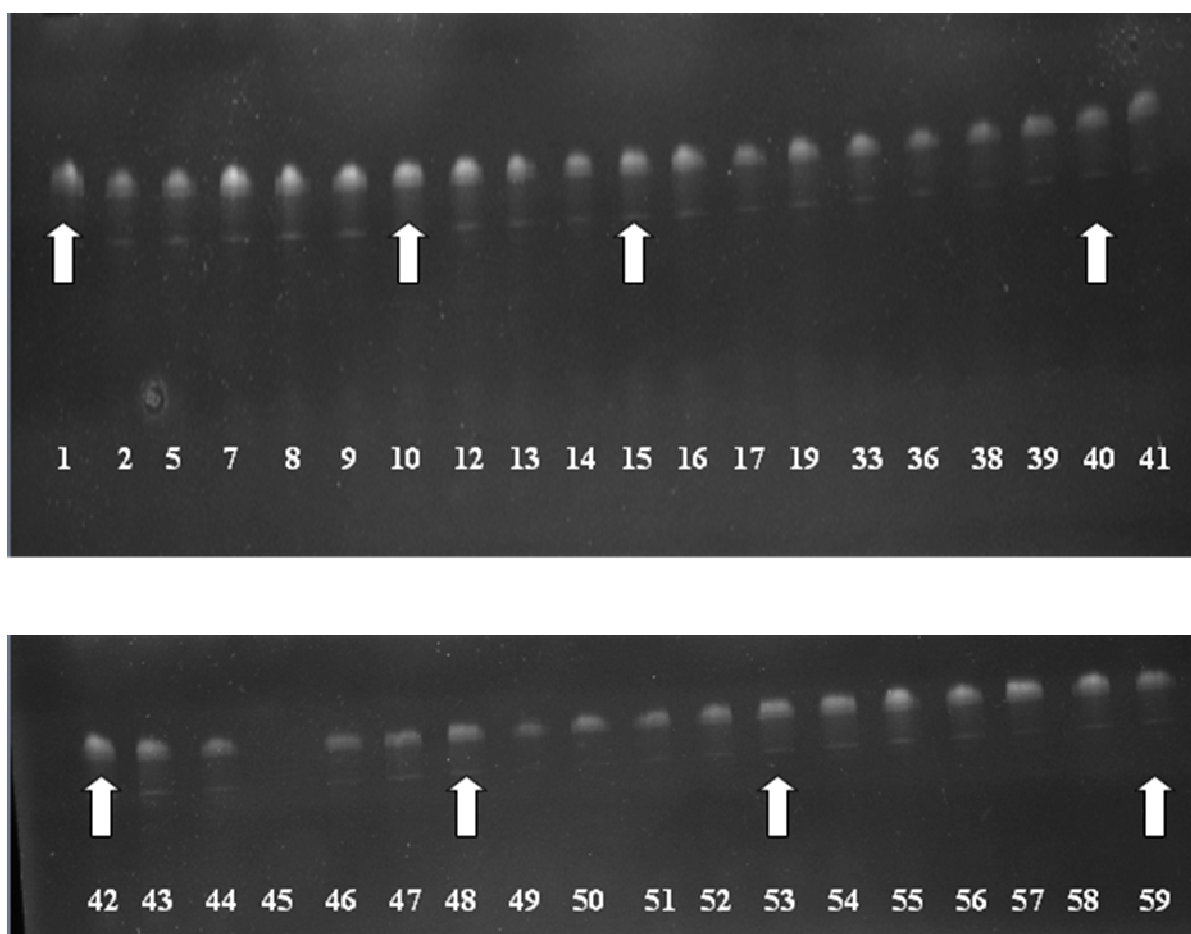
Obr. 14 - CDGE – PCR produkty exonu 5, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenační analýze, v poslední dráze je negativní kontrola – PCR amplifikována s H<sub>2</sub>O



Obr. 15 - CDGE – PCR produkty exonu 6, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenční analýze



Obr. 16 - CDGE – PCR produkty exonu 7, šipky označují DNA fragmenty vybrané k sekvenční analýze

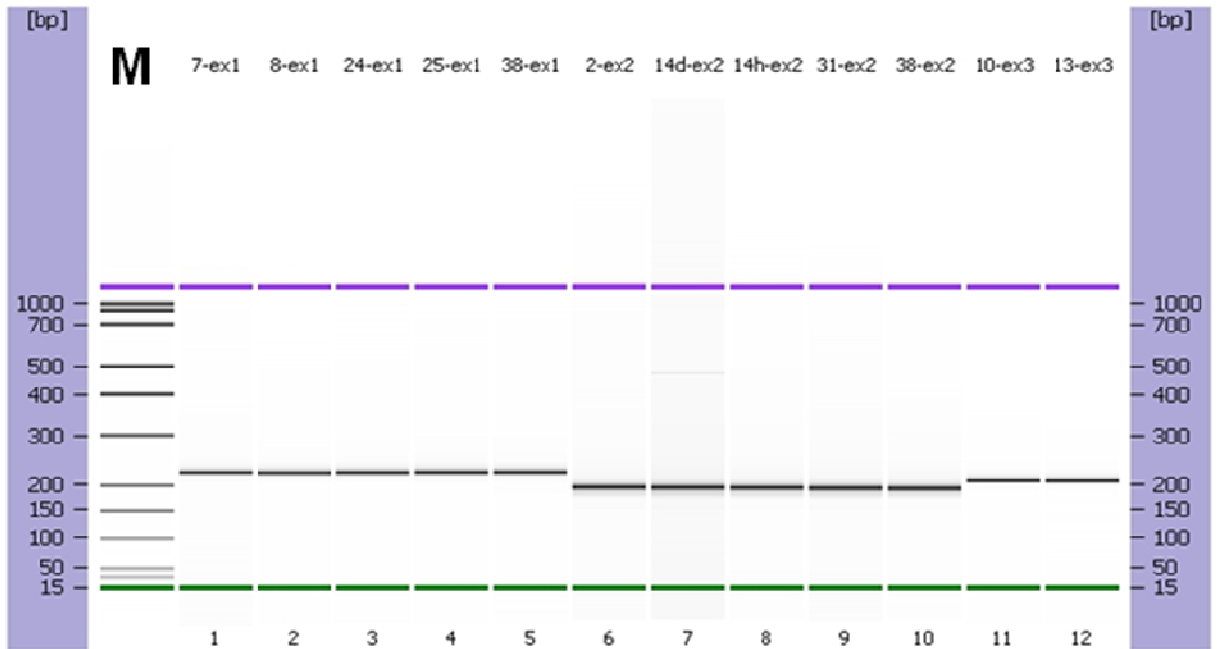


Tab. 14 - Přehled vzorků vybraných k sekvenaci dle CDGE

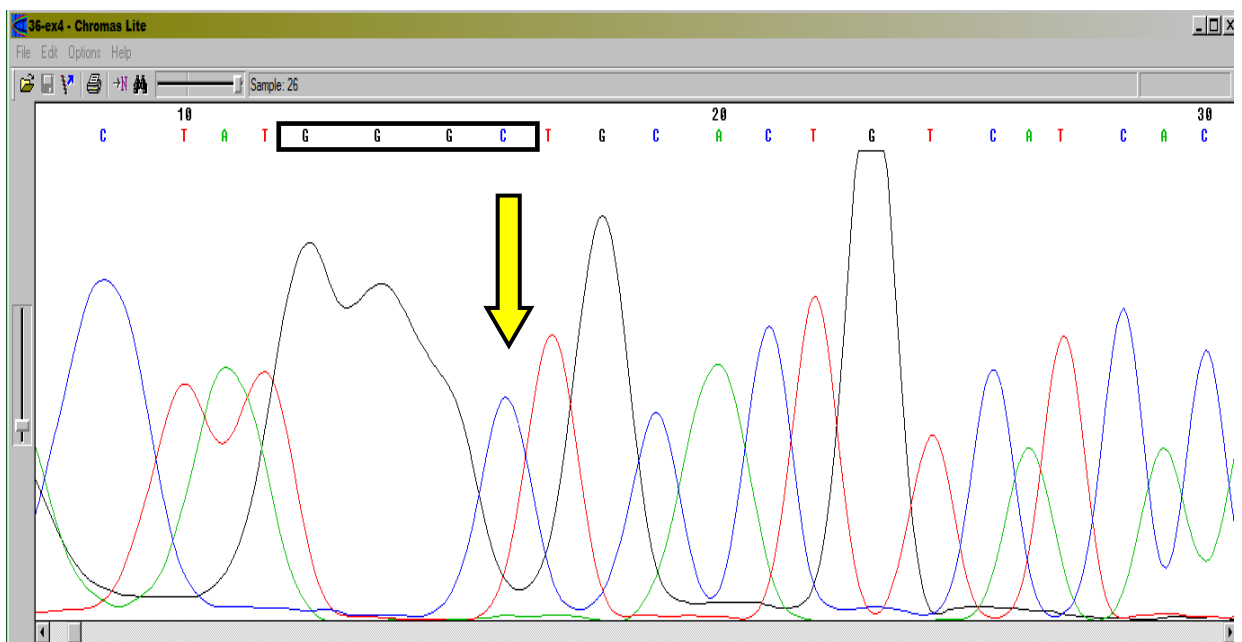
Exon číslo	Vzorky vybrané k sekvenaci
1	10,12,45,46,59
2	2,19,52,59
3	14,15,17,44,48,49,57,59
4	9,10,12,14,40,41,44,57,59
5	8,9,10,12,14,36,39,40,47,48,51,58,59
6	12,13,14,15,16,50,51,59
7	1,10,15,40,42,48,53,59



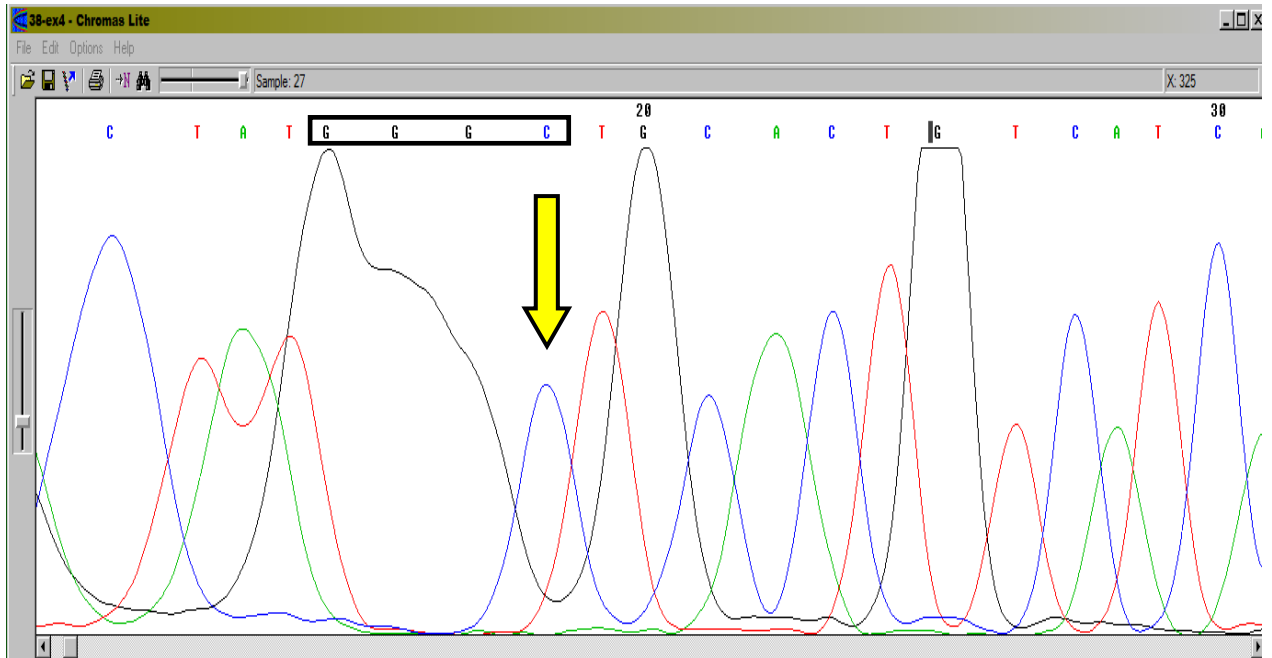
Obr. 17 - Kontrola reamplifikace na přístroji Bioanalyzer 2100 Agilent, M – velikostní marker, pozice 1 – 5 reamplifikované vzorky exonu 1, pozice 6 – 10 reamplifikované vzorky exonu 2, 11 a 12 reamplifikované vzorky exonu 3



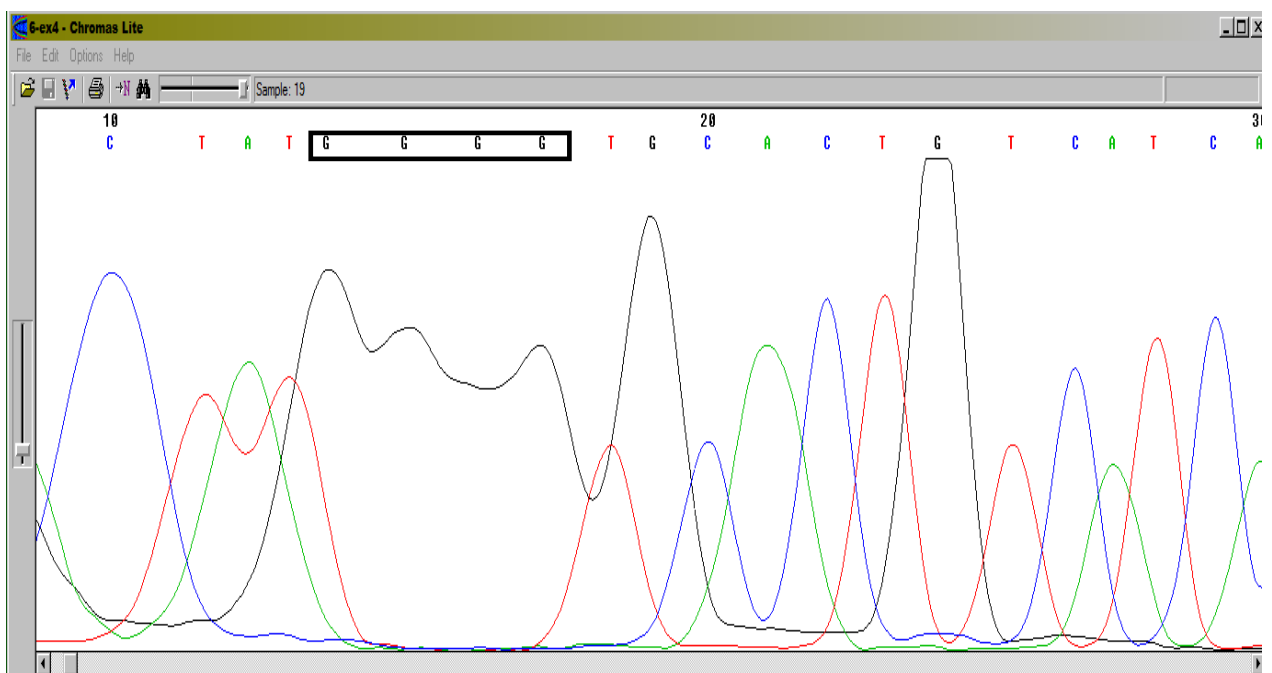
Obr. 18 - Sekvence vzorku 57 se záměnou bází G-C v exonu 4 mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis* (záměna označena šipkou), analyzováno programem Chromas Lite



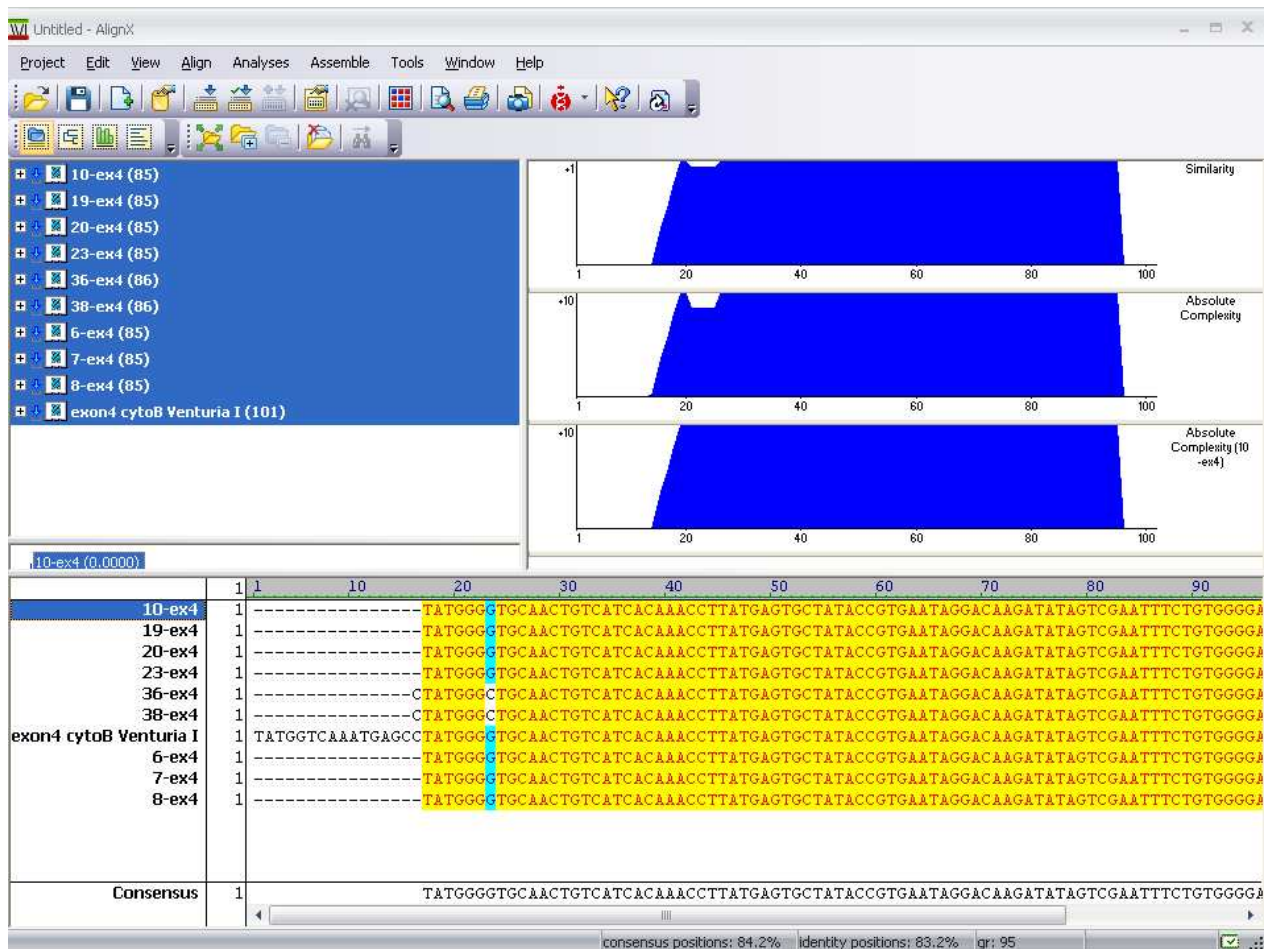
Obr. 19 - Sekvence vzorku 59 se záměnou bází G-C v exonu 4 mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis* (záměna označena šipkou), analyzováno programem Chromas Lite



Obr. 20 - Sekvence vzorku 9 bez mutace v exonu 4 mitochondriálního genu pro CYTB *Venturia inaequalis*, analyzováno programem Chromas Lite



Obr. 21 – Porovnání sekvence exonu 4 *Venturia inaequalis* se sekvencemi vybraných vzorků pomocí funkce Alignment programu Vector NTI, žlutá barva označuje identické sekvence mezi porovnávanými vzorky, bílá barva označuje odlišnost jedné báze dvou analyzovaných vzorkům, světle modrá barva označuje schodu báze s původní sekvencí



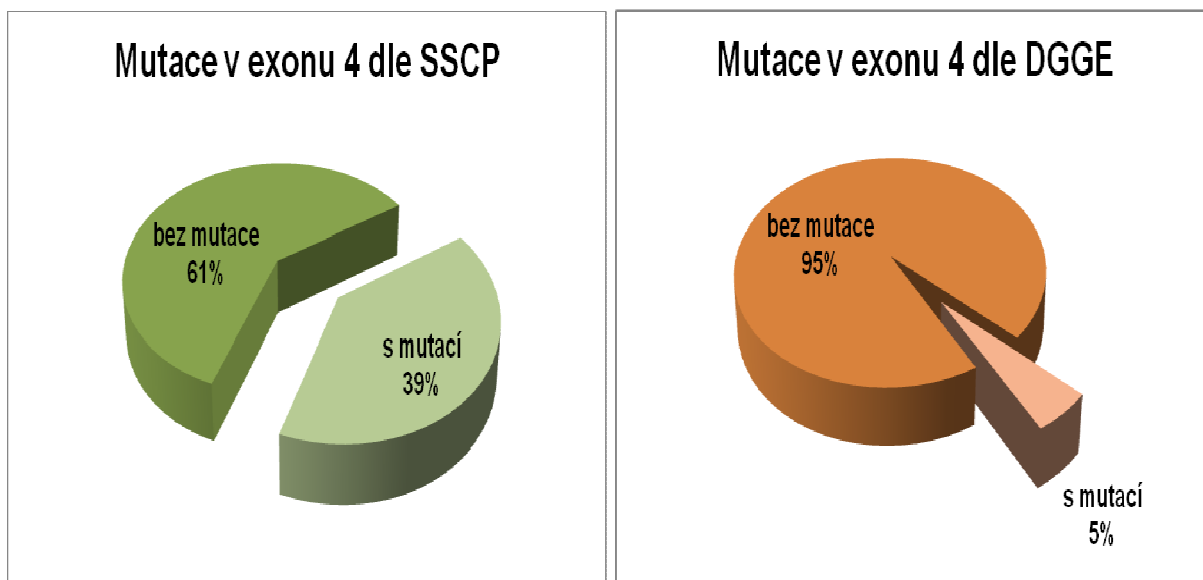
**Obr. 22 - Změna aminokyseliny na pozici 143 u vzorků 57 a 59, analyzováno v programu Vector NTI**

sekvence exonu 4 <i>Venturia inaequalis</i> dle NCBI																											
Leu	Trp	Gly	Ala	Thr	Val	Ile	Thr	Asn	Leu	Met	Ser	Ala	Ile	Pro	***	Ile	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Trp	Gly	Gly
CTATG	GGGTGC	AACT	GTCATC	CACAA	ACCTTATGAG	TGCTATACCG	TGAATAGGAC	ARGATATAGT	CGAATTTCTG	TGGGGAGGC																	
GATAC	OCCACG	TGTA	CAGTAG	TGTT	TGGAATACTC	ACGATATGGC	ACTTATCCTG	TTCTATATCA	GCTTAAAGAC	ACCCCTCCG																	
sekvence exonu 4 <i>Venturia inaequalis</i> vzorků 57 a 59																											
Leu	Trp	Ala	Ala	Thr	Val	Ile	Thr	Asn	Leu	Met	Ser	Ala	Ile	Pro	***	Ile	Gly	Gln	Asp	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Trp	Gly	Gly
CTATGGGCTG	CAACTG	TGCAT	CACAA	ACCTT	ATGAGT	GCCTA	TACCGT	GAAAT	AGGACA	RAGAT	ATAGT	CGAAT	TTCTGT	GGGG	AGGC												
GATACCCGAC	GTTGAC	AGTA	GTGTTT	TGGAA	TACTC	ACGAT	ATGGC	ACTTA	TCCTGT	TCTA	TATC	AGCTTA	AAGAC	CCCC	TCCC												

Na základě výsledků denaturační gelové elektroforézy bylo vybráno 55 potenciálně mutovaných vzorků (tab. 14). Polymorfismus se podařilo prokázat pouze u dvou vzorků z devíti vybraných pro exon 4. U ostatních 53 vzorků se žádnou mutaci nepodařilo prokázat. Je možné, že mutaci G137R se nepodařilo prokázat proto, že se nachází v sekvenačním stínu - leží na počátku sekvence exonu 4, kam byl navržen jeden z dvojice primerů. Pokud by byl tento primer navržen více do intronu ležícím mezi exony 3 a 4, byla by sekvence začátku exonu 4 lépe čitelná, a tudíž by mohla být bez pochyb prokazována potenciální mutace. Metoda SSCP, která byla prováděna nezávisle na DGGE, odhalila mutace v exonu čtyři u 15 vzorků. Výsledky SSCP korespondovaly s rezistencí jednotlivých izolátů vůči fungicidům (tab. 13, graf 1,2). Citlivost ke strobilurinovým fungicidům byla provedena na pracovišti Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy v rámci jiného projektu. Pomocí DGGE byl k sekvenační analýze vybrán jiný sortiment vzorků, vyjma vzorků 57 a 59, než metodou SSCP.

Je možné, že v tomto případě byla neprůkaznost metody DGGE způsobena tím, že se u mutace G143A jednalo o záměnu guaninu za cytosin, což jsou báze, které jsou donory tří vodíkových můstků ve struktuře DNA. Pokud by se jednalo o záměnu bází s odlišným počtem vodíkových můstků, je pravděpodobné, že by rozdíly byly lépe zřetelné.

**Graf 1 – grafické znázornění zastoupení mutace G143A ve vyšetřovaném souboru vzorků pomocí metod SSCP a DGGE**



**Graf 2 – grafické znázornění citlivosti vůči fungicidům vyšetřovaného souboru vzorků**



## 5.1. Ekonomické dopady zvýšeného výskytu *Venturia inaequalis* v ČR

V České republice byla v roce 2009 výměra produkčních jabloňových výsadeb 8 986 hektarů. Z této plochy zabíraly téměř polovinu výsadby s odrůdami náchylnými vůči strupovitosti (Golden Delicious - 2 031,4 ha; Gloster – 276,7 ha; Idared - 1 705,1 ha). Odhad produkce jablek v České republice pro rok 2009 činil 137 546 tun (odhad ÚKZÚZ k 1. 9. 2009). Nákupní ceny jablek bez DPH se v roce 2008 pohybovaly v rozmezí 5,7 – 11,9 Kč.kg<sup>-1</sup> pro jablka konzumní, 1,4 – 2,4 Kč.kg<sup>-1</sup> pro jablka průmyslová (MZE, 2009).

Plody náchylných odrůd, napadené *Venturia inaequalis*, bývají malé, deformované, nevhodné pro přímý konzum či skladování. Jejich upotřebení bývá pouze pro průmyslové zpracování, tudíž se jejich cena snižuje až čtyřnásobně. Vzhledem k faktu, že v ČR je většina pěstovaných odrůd náchylných ke strupovitosti, je nutné používat chemickou ochranu k zabránění ekonomických ztrát, které by mohl způsobit kalamitní výskyt *Venturia inaequalis*.

## 5.2. Opatření vhodná ke kontrole výskytu a rozšíření rezistentních populací *Venturia inaequalis*

Vznik mutace v mitochondriálním genu pro CYTB způsobující rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům je jev velmi závažný a pozorovaný nejen u strupovitosti jabloní. Mutace je popsána u mnoha dalších fytopatogenů. Časté používání fungicidů na bázi strobilurinů může vest k postupnému vyselektování rezistentní populace patogena. Pro zabránění vzniku rezistence je doporučováno ošetření strobiluriny v efektivních dávkách a v intervalech, které doporučuje výrobce. Omezení počtu aplikací strobilurinů aplikovaných jednotlivě nebo ve směsi s jinými látkami určenými k ochraně rostlin proti fytopatogenům, kombinování strobilurinů s kontaktními fungicidy (BRENT et HOLLOMONT, 2007).

Nejúčinnější ochranou proti *Venturia inaequalis* je výsadba odrůd, které jsou rezistentní vůči strupovitosti. Je samozřejmé, že tento proces je dlouhodobý

vzhledem k životnosti sadů, nicméně v rámci obnovy stárnoucích výsadeb, by mělo být pamatováno právě na rezistentní odrůdy.

Z důvodů závažnosti tématu rezistence fytopatogenů vůči fungicidům vznikla světová organizace „Fungicide Resistance Action Committee“ (FRAC). Hlavními cíly FRAC je shromažďování a předávání informací o výzkumu, distribuci, registraci a používání fungicidů. FRAC se snaží vytvářet pokyny a doporučení týkající se správného používání fungicidních přípravků a snaží se o zlepšování spolupráce mezi vysokými školami, vládními agenturami, poradci, distributory a zemědělci.

### **5.3. Nové metody v diagnostice rezistentních populací fytopatogenů**

Téma rezistence vůči fungicidům je velmi závažné a řeší se po celém světě. Infekce rostlin, které nelze zvládnout ani dostupnými chemickými látkami, znamenají velké ztráty na výnosech a jsou hrozbou do dalších pěstebních sezón. Aby bylo možné provádět rychlou diagnostiku již známých mutací, a tak podávat aktuální výsledky o výskytu rezistentních fytopatogenů, je nutné zavést jednoduchou a rychlou metodiku k potvrzení těchto mutací. Metoda DGGE se pro vyhledávání mutací v genu pro CYTB *Venturia inaequalis* neosvědčila a navíc je limitována počtem analyzovaných vzorků. Jako slibná metoda pro rychlou a spolehlivou detekci mutace G143A se jeví PCR v reálném čase. Tato metoda byla pro mutaci G143A popsána u *Mycosphaerella graminicola*. Jedná se o metodu modifikované PCR, kdy se do PCR směsi navíc přidává dvojice fluorescenčně značených sond. Sekvence jedné sondy je navržena tak, aby korespondovala s nemutovanou DNA, a je značená 6-carboxy-fluoresceinem (FAM), druhá sonda je značená barvičkou VIC a odpovídá sekvenci mutované DNA (FRAAIJE et al., 2005). PCR v reálném čase se provádí ve speciálních termocyklerech, které mají optickou hlavu pro odečítání hodnoty fluorescence, která se v případě amplifikace daného DNA fragmentu s každým cyklem zvyšuje. Pro PCR v reálném čase se používají standardy známé koncentrace, podle kterých se odečítají naměřené hodnoty u analyzovaných vzorků. Naměřené hodnoty se zpracovávají pomocí speciálního programu, který vyhodnotí naměřená data a z hodnot standardů vytvoří kalibrační křivku, ze které následně odečte naměřené hodnoty vzorků. V případě výše popsané metody umožňuje dvojice

různě značených sond odlišit množství mtDNA, která nese mutaci a DNA bez mutace. Každá sonda emituje záření jiné vlnové délky a tak je možné jasně rozlišit DNA s a bez mutace a v podstatě i množství kopií daného fragmentu DNA. Kapacita této metody je 96 analyzovaných vzorků s časovým limitem 2 hodiny. Tato metoda není vhodná pro vyhledávání nových mutací, ale pouze pro diagnostiku již známých mutací. Pro každou další nalezenou mutaci, by musel být navržen nový systém se sondami odpovídajícími sekvencím daného fragmentu DNA. Pro vyhledávání mutací se stále zdá být spolehlivější SSCP.



## 6. Závěr

V rámci diplomové práce bylo otestováno 7 exonů mitochondriálního genu pro cytochrom *b* u 38 různých vzorků pomocí denaturační gelové elektroforézy. Výsledky ukázaly že:

- očekávané rozdíly v elektroforetické mobilitě mutovaných a nemutovaných DNA fragmentů jednotlivých vzorků jsou pomocí této metody velmi málo patrné
- denaturační gelová elektroforéza nedokázala bezpečně odhalit možné mutace v genu pro cytochrom *b*

Pomocí sekvenační analýzy, která byla provedena u 55 vzorků vytipovaných dle denaturační gelové elektroforézy, bylo zjištěno že:

- izoláty 57 a 59 jsou charakteristické mutací v exonu 4 mitochondriálního genu pro cytochrom *b*
- nalezená mutace představuje substituci guaninu za cytosin
- touto záměnou dochází ke změně aminokyseliny glycinu za alanin na pozici 143 (G143A), a tím ke změně fyzikálních vlastností výsledného peptidu
- v exonech 1,2,3,5,6,7 u vybraných vzorků nebyla mutace nalezena

Na základě výše uvedených závěrů bych metodu denaturační gelové elektroforézy pro odhalování neznámých polymorfizmů nedoporučila, jelikož odchylky v elektroforetické mobilitě nebyly v případě mých pokusů natolik výrazné, aby spolehlivě odhalily vzorky nesoucí mutaci. Naproti tomu metodou SSCP byly vzorky s mutacemi identifikovány jednoznačně.

Podle mého názoru metodika, která nedává homogenní výsledky, není vhodná pro laboratorní použití ať už rutinního nebo výzkumného charakteru.

Fakt, že mutace G143A způsobuje úplnou rezistenci vůči strobilurinovým fungicidům by mohl mít za následek vyřazení fungicidů na bázi strobilurinů ze zemědělské praxe. Rozumné zacházení s těmito fungicidy a dodržování doporučení odborníků, by mohlo oddálit degradaci strobilurinů v zemědělství. Významným krokem v pěstování výsadeb jabloní, je používání odrůd rezistentních vůči *Venturia inaequalis*.

## 7. Seznam použité literatury

**ALBERTS B.**, Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. **Základy buněčné biologie.** Ústí nad Labem: Espero Publishing. 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4

**BARTLETT DW.**, Clough JM., Godwin JR., Hall AA., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. **The strobilurin fungicides.** Pest Manag Sci. 2002. 58:649-662

**BLAŽEK J.**, Beneš V., Dlouhá J., Janečková M., Kneifl V., Kosina J., Lánský M., Paprštejn F., Pražák M., Plíšek B., Svoboda A., Staněk J., Sus J., **Ovocnictví.** 2. Vyd. Praha: Květ. 1998. 383 s. ISBN 80-85362-43-0

**BRENT KJ.** et **HOLLOMON DW.**, **Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed?** 2007. (second, revised edition), dostupné z [http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC\\_Mono1\\_2007\\_100dpi.pdf](http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Mono1_2007_100dpi.pdf)

**BRETON J.**, Sichel F., Abbas A., Marnay J., Arsène D., Lechevrel M., **Simultaneous use of DGGE and DHPLC to screen TP53 mutations in cancers of the esophagus and cardia from a European high incidence area (Lower Normandy, France).** Mutagenesis. 2003 May;18(3):299-306.

**BURGER G.**, Gray MW., LANG BF., **Mitochondrial genomes: anything goes.** TRENDS in Genetics. 2003. 19(12):709-16

**FERNÁNDEZ-ORTUÑO D.**, Torés JA., de Vicente A., Pérez-García A., **Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi.** International microbiology. 2008. 11:1-9

**FISCHER SG.** et Lerman LS., **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory.** Proc. NatL Acad. Sci. USA 1983. Vol. 80, pp. 1579-1583

**FRAAIJE BA.**, Cools HJ., Fontaine J., Lovell DJ., Motteram J., West JS., Lucas JA., **Role of Ascospores in Further Spread of Qol-Resistant Cytochrome *b* Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*.** *Phytopathology*. 2005. 95:933-941

**GISI U.**, Sierotzki H., Cook A., McCaffery A., **Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qol inhibitor fungicides.** *Pest Management Science* 2002. 58: 859-867.

**HANNEN EJ.**, van Agterveld MP., Gons HJ., Laanbroek HJ., **Revealing genetic diversity of eukaryotic microorganisms in aquatic Environments by denaturing gradient gel electrophoresis.** *J. Phycol.* 1998. 34: 206–213

**HOLMILA R.** et Husgafvel-Pursiainen K., **Analysis of TP53 gene mutations in human lung cancer: Comparison of capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism assay with denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing.** *Cancer Detect Prev.* 2006;30(1):1-6.

**CHEN WJ.**, Delmotte F., Richard-Cervera S., Douence L., Greif CandCorio-Costet MF., **At least two origins of fungicide resistance in grapevinedowny mildew populations.** *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73:5162–5172

**ISHII H.**, Fraaije BA., Sugiyama T., Noguchi K., Nishimura K., Takeda T., Amano T., Hollomon DW., **Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew.** *Phytopathology*. 2001. 91: 1166-1171

**Kalina T.** a Váňa J., **Sinice, řasy, houby a mechorosty v systému šesti říší.** Praha. Karoílnum. 2005. 608 s. ISBN 80-246-1036-1

**KAZDA J.**, Jindra Z., Kabíček J., Prokinova E., Ryšánek P., Stejskal V. **Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny.** 3. vyd. Praha: 2003. 158 s. ISBN 80-86726-03-7

**KIM YS.**, Dixon EW., Vincelli P., Farman LM., **Field Resistance to Strobilurin (QoI) Fungicides in *Pyricularia grisea* Caused by Mutations in the Mitochondrial Cytochrome *b* Gene.** Phytopathology. 2003. 93: 891-900

**MAIER RM.**, Palmer MW., Andersen GL., Halonen MJ., Josephson KC., Maier RS., Martinez FD., Neilson JW., Stern DA., Vercelli D., Wright AL., **The Bacterial Community in Household Dust: Environmental Determinants and Impact on Childhood Asthma.** Appl. Environ. Microbiol. 2010. 76/8, 2663-2667

**MCBRIDE LJ.**, Koepf SM., Gibbs RA., Salser W., Mayrand PE., Hunkappiler MW., Kronick MN., **Automated DNA Sequencing Methods Involving Polymerase Chain Reaction.** Clinical Chemistry. 1989. 35/11, 2196 - 2201

**PANARO N. J.**, Yuen PK., Sakazume T., Fortina P., Kricka LJ., Wilding P., **Evolution of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer.** Clinical Chemistry, Technical Briefs. 2000. 46, No. 11: 1851-1853

**ROSYPAL S.**, **Úvod do molekulární biologie.** 2. vyd. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc. 1997. 556 s.

**SALAŠ P.**, **Modernizace výukového procesu u předmětů ovocné, okrasné školkařství a ovocnářství.** Sborník přednášek z odborného semináře. Lednice na Moravě. listopad 2003. s. 3 – 7, ISBN 80-7157-715-4

**SAMBROOK J.**, Fritsch EF., Maniatis T., **Molecular Cloning - A Laboratory manual.** 2. Vyd. USA. Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989. ISBN 0-87969-309-6

**SIEROTZKI H.**, Wullschleger J., Gisi U., **Point-mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis f. sp. Tritici* field isolates.** Pesticide Biochemistry and Physiology. 2000a. 68:107-112.

**SIEROTZKI H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S., Gisi U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*.** Pest Management Science. 2000b. 56: 833-841.

**SIEROTZKI H., Frey R., Wullschleger J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U., Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance.** Pest Manag Sci. 2007. 63(3):225-33.

**SMITH-SORENSEN B., Hovig E., Andersson B., Borresen AL. - Screening for mutations in human HPRT cDNA using the polymerase chain reaction (PCR) in combination with constant denaturant gel electrophoresis (CDGE).** Mutat Res. 1992. 269(1):41-53

**STEINFELD U., Sierotzki H., Parisi S., Poirey S., Gisi U. Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*.** Pest Management Science. 2001. 57: 787-796.

**VOGELSTEIN B. et Gillespie D., Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** Proc. NatL Acad. Sci. USA 1979. Vol. 76, No. 2, pp. 615 – 619

**WAITE IS., O'Donnell AG., Harrison A., Davies JT., Colvan SR., Ekschmitt K., Dogan H., Wolters V., Bongers T., Bongers M., Bakonyi G., Nagy P., Papatheodorou EM., Stamou GP., Boström S., Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of soil community DNA.** Soil Biology & Biochemistry. 2003. 35: 1165–1173

**YERGEAU E., Filion M., Vujanovica V., St-Arnaud M., A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess *Fusarium* diversity in asparagus.** Journal of Microbiological Methods. 2005. 60:143-154

**ZHENG D et Köller, W. Characterization of the mitochondrial cytochrome b gene from *Venturia inaequalis*. Curr. Genet. 1997. 32:361-366.**

**MZE, Situační a výhledová zpráva ovoce,** dostupné z [http://eagri.cz/public/eagri/file/2810/OVOCE\\_10\\_2009.pdf](http://eagri.cz/public/eagri/file/2810/OVOCE_10_2009.pdf)

## 8. Seznam použitých zkratek

**A** - Adenin

**APS** – amonium persulfát

**ATP** – adenosintrifosfát

**bp** – počet párů bází v molekule nukleové kyseliny

**BDT** – komerčně vyráběná reakční směs pro automatickou sekvenaci

**C** – Cytosin

**CDGE** – konstantní denaturační gelová elektroforéza

**CYTb** – cytochrom *b*

**DGGE** – Denaturační gradientová gelová elektroforéza

**DNA** - deoxyribonukleová kyselina

**ddATP** - dideoxyadenosintrifosfát

**ddCTP** - dideoxycytidintrifosfát

**ddGTP** - dideoxyguanosintrifosfát

**dNTP** – směs nukleotidů

**ddTTP** - dideoxythymidintrifosfát

**G** – Guanin

**mtDNA** – mitochondriální deoxyribonukleová kyselina

**PCR** – Polymerázová řetězová reakce

**RNA** - ribonukleová kyselina

**rRNA** – ribozomální ribonukleová kyselina

**SSCP** - metoda konformačního polymorfizmu jednořetězové DNA

**T** - Thymin

**TAE** – elektroforetický pufr obsahující Tris base, acetic acid a EDTA

**TBE** - Tris-borate elektroforetický pufr

**tRNA** - transferová ribonukleová kyselina

**UV** – ultrafialové světlo

## **Přílohy**

### **Příloha I.**

#### **Seznam použitých chemikálií**

50x TAE pufr

40%Acrylamide/BIS

Formamid (Sigma-Aldrich)

Urea

redestilovaná voda

1x TBE pufr

Agaróza (Sigma, 500g, kat.č. A-9539)

ethidium bromid

velikostní marker  $\lambda$  DNA, ECO 471, 0,5 mg DNA/ml (MBI Fermentas)

vzorkový pufr 6x loading dye solution (MBI Fermentas)

Gold Polymeráza (Applera)

10x Buffer Gold (Applera)

50mM MgCl<sub>2</sub> Gold (Applera)

dNTP (Aplera)

primery pro exony 1 – 7 mt DNA *Venturia inaequalis*

MinElute purifikační kit (QIAGEN)

Sekvenační kit (Applera)

Chemikálie pro Lab-on-a chip analýzu (Agilent)



## **Příloha II.**

### **Seznam použitých přístrojů**

digitální analytické váhy – AND HA-180M

automatické pipety s nastavitelným objemem (Eppendorf)

automatické pipety s nastavitelným objemem (Nichirio)

magnetická míchačka (IKA)

mikrovlnná trouba (Moulinex)

elektroforéza Sub Cell (Bio Rad)

zdroj elektrického proudu Power Pac 300 (Bio Rad)

Gelový dokumentační systém (BioRad)

Nalévací systém pro gradientovou elektroforézu (BioRad)

Elektroforetický systém pro gelovou elektroforézu (BioRad)

Agilent Bioanalyzátor 2100 (Agilent Technologies)

Centrifuga Minispin (Eppendorf)

Sekvenační analyzátor ABI Prism 7800

Thermocycler Perkin Elmer 2700

Vortex (IKA)

Manofuga

### **Příloha III.**

#### **Seznam použitých laboratorních pomůcek**

váženky

skleněná tyčinka

odměrné válce

kádinky

stříkačky

laboratorní lžička na navážení agarózy

nesmyvatelné popisovače na zkumavky

magnetické míchadlo

pipetovací špičky

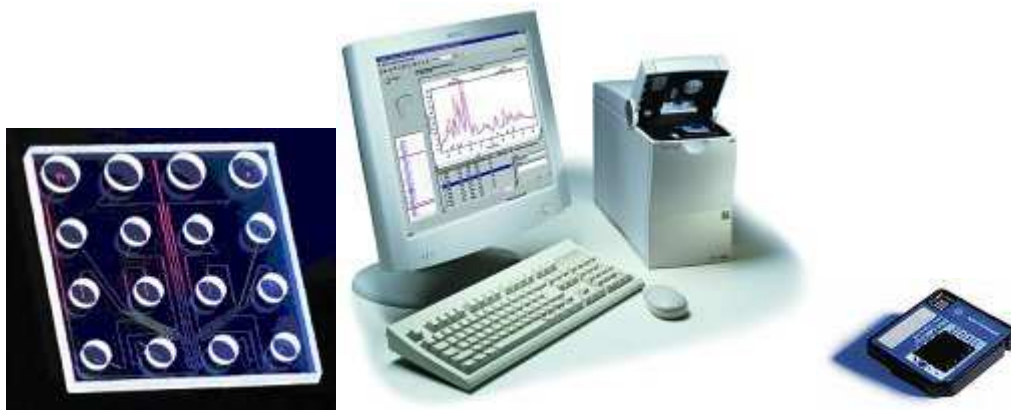
zkumavky na 2 ml

zkumavky na 0,5 ml

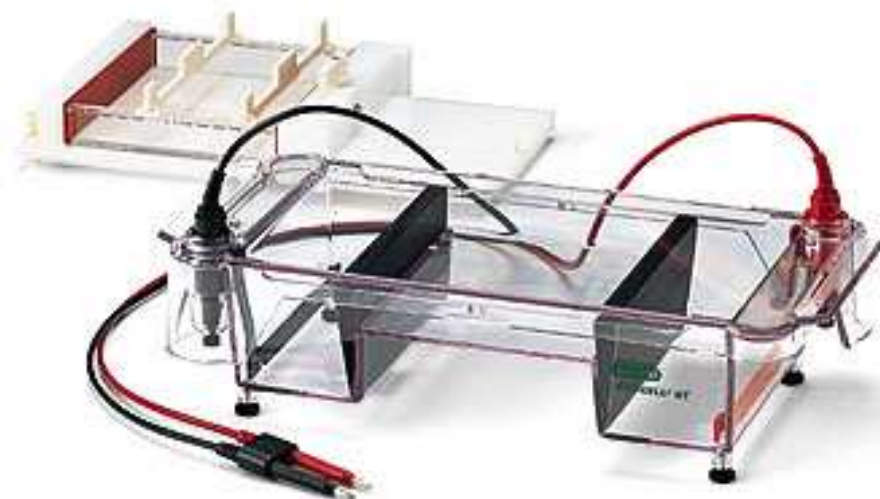
PCR zkumavky na 0,2 ml

## Příloha IV.

### Obrazová příloha



Agilent Bioanalyzer – Lab-on-chip (Agilent Technologies)



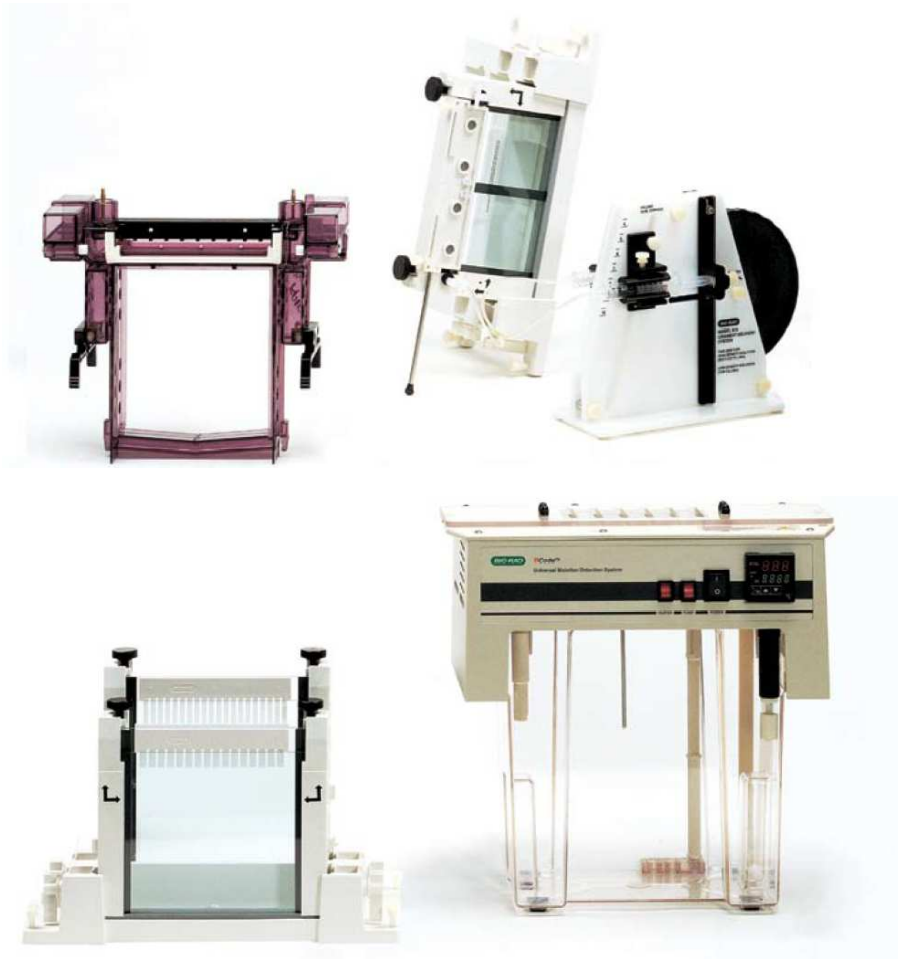
Elektroforetická vana se systémem pro přípravu agarózového gelu (Bio Rad)



Zdroj stejnosměrného elektrického proudu (Bio Rad)



Sekvenátor ABI (Applied Biosystems)



Souprava pro denaturační gradientovou a konstantní elektroforézu (Bio Rad)



Thermal Cycler pro Polymerázovou řetězovou reakci (Applied Biosystems)



Minicentrifuga (Eppendorf)



Vortex (IKA)