

Identifikace jednotlivých druhů Václavek ze vzorku půdy

TEORETICKÝ ÚVOD

V současné době je na světě rozlišováno přes 40 druhů václavek (rod *Armillaria*), které se vyskytují na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Poprvé byl rod václavka identifikován v 18. století, ale až v roce 1973 objevení bifaktoriálního sexuálního inkompatibilního systému umožnilo spolehlivě identifikovat jednotlivé druhy václavek. V Evropě bylo do současnosti identifikováno sedm druhů václavek, *Armillaria borealis*, *cepistipes*, *ectypa*, *gallica*, *mellea*, *ostoyae* a *tabescens* [2]. Václavky se vyskytují téměř na všech druzích porostů, mezi něž patří především listnaté a jehličnaté lesy, ovocné sady a parky. Výskyt jednotlivých druhů je omezen jednak klimatickými a geografickými podmínkami a na druhé straně výskytem vhodných hostitelů [2]. Václavky se v lese podílejí na rozkladu odumřelé dřevní hmoty, čímž v mnohém připomínají chování mykorhizních hub. V mnoha případech však přechází k nekrotrofnímu parazitizmu, resp. saproparazitizmu, na celé škále dřevin, především pak na smrku, borovici a dubu. Byly však pozorovány i na nahosemenných a krytosemenných rostlinách, na celé řadě bylin, na obilninách nebo na okrasných rostlinách. Každoročně pak způsobují obrovské škody na lesních porostech [1,2].

Některé druhy mohou být obligátními saprotrofy, avšak všechny druhy jsou schopné napadat stresem oslabené hostitele. Některé druhy dále produkují antibiotické látky, které jim pomáhají udržet kontrolu nad infikovaným hostitelem [2]. Jednotlivé druhy václavek se liší jednak svou patogenitou a také spektrem napadaných hostitelů. Proto je z hlediska lesního hospodářství velmi důležité odlišovat od sebe jednotlivé druhy.

V současné době jsou k identifikaci jednotlivých druhů václavek nejvíce používané párové testy objevené Hinkitou v roce 1973, avšak v poslední době se k identifikaci začínají používat molekulárně–biologické metody, mezi něž především analýza restričních fragmentů ribozomální DNA.

Restriční analýza

Restriční endonukleasy jsou enzymy, které rozpoznávají ve dvoušroubovicové DNA specifickou sekvenci složenou obvykle ze 4 až 6 párů bazí a v tomto místě DNA specificky štěpí. Většina rozpoznávaných sekvencí restričními enzymy má dokonalou dvojčetnou rotační symetrii. Tyto sekvence jsou známy jako tzv. palindromy. Celá řada restričních enzymů (např. *HinfI*, *MboI*) katalyzuje štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence. Vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. U

některých restrikčních enzymů (Alu I) naopak místo štěpení prochází přímo dvojčtetnou osou palindromu. Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci [18].

Polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP) poté poskytuje cenné informace o rozdílech mezi sekvencemi u jednotlivých druhů organismů a je v současné době jednou z nejpoužívanějších metod v taxonomii a fylogenezi.

Identifikace na základě ribozomální RNA

Geny kódující ribozomální RNA jsou z hlediska taxonomického a fylogenetického velmi často používané. ITS oblast rDNA je velmi polymorfní, čímž se stává pro taxonomické a fylogenetické studie velmi výhodnou. Tato oblast leží mezi malou jadernou rDNA a velkou jadernou rDNA a je 5.8S rDNA rozdělena na oblasti ITS 1 a ITS 2 [3]. Pro amplifikaci této oblasti u hub byly navrženy primery ITS 1 a ITS 4 (obrázek 1).



Obrázek 1: Umístění ITS oblasti a primerů ITS1, ITS4, AR1 a AR2 na rDNA [3,4]

Detekce václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti

Pro specifickou detekci václavek poté byly navrženy primery AR1 a AR2 ležící na okrajích oblastí ITS1 a ITS2 (obrázek 1). Tyto primery se používají pro specifickou amplifikaci všech sedmi evropských druhů václavek. Pro dosažení velmi vysoké citlivosti metody pro identifikaci václavek se vzorků půdy se využívá tzv. nested PCR, při které dochází k amplifikaci požadované oblasti pomocí dvou párů primerů. První pár, tzv. externí, se většinou vyznačuje nižší specificitou a slouží k před-množení požadované oblasti. Druhý pár, tzv. interní, je poté vysoce specifický a používá se k namnožení požadované oblasti z již před-množeného vzorku. Při identifikaci václavek ze vzorků půdy lze využít jako externí pár primerů primery ITS1 a ITS4 a jako interní pár primery AR1 a AR2 [4].

Pro určení konkrétního druhu václavky se poté využívá RFLP analýza oblasti namnožené pomocí primerů AR1 a AR2 využívající restrikční endonukleázy *HinfI* a *AluI* [4]. Délky restrikčních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 1: Délky amplikonů a restričních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek

Izolát	Délka amplikonu (bp) ITS/AR	Restriční fragmenty <i>Hinf</i> I (bp)	Restriční fragmenty <i>Alu</i> I (bp)
<i>A. borealis</i> A1 ^a	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. cepistipes</i> 204 ^b	868/711	293, 227, 43, 132	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. gallica</i> 147 ^b	868/711	294, 227, 43, 63, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. mellea</i> 184 ^b	882/724	148, 159, 401	40, 47, 97, 149, 214, 325
<i>A. ostoyae</i> C2 ^a	870/713	294, 228, 31, 75, 69	41, 97, 180, 222, 323
<i>A. tabescens</i> T3 ^a	847/690	295, 125, 93, 32, 129	35, 70, 96, 138, 181, 327

Literatura

1. Jankovský L. 1997. Biologie Václavek, Dizertační práce MZLU, Brno.
2. Shaw C.G., Kile, G.A. 1991. ARillaria Root Disease, Agriculture Handbook 691, Department of Agriculture. Washington D.C., United States
3. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications: 315-322, Academic Press, Inc.
4. Lochman J, Sery O, Mikes V. 2004. The rapid identification of European Armillaria species from soil samples by nested PCR. FEMS Microbiol Lett. 1;237(1):105-10.

POSTUP PRÁCE

Izolace DNA z půdy pomocí izolačního kitu DNeasy® PowerSoil DNA

1. Do PowerBead zkumavky navažte přibližně 250 mg vzorku půdy a vortexujte.
2. Přidejte 60 µl roztoku C1 a několikrát promíchejte obrácením zkumavky nebo vortexujte.
3. Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně a vortexujte maximální rychlostí 10 minut.
4. Centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g.
5. Přeneste supernatant do čisté 2 ml mikrozkuavky.
Poznámka: Očekávejte 400 až 500 µl směsi. Směs může stále obsahovat určité množství půdních částic.
6. Přidejte 250 µl roztoku C2 a vortexujte 5 sekund. Inkubujte 5 minut na ledu.
7. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě a při 10 000 x g.
8. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkuavky (přiložena) maximálně 600 µl supernatantu.
9. Přidejte 200µl roztoku C3 a krátce vortexujte. Inkubujte 5 minut na ledu.
10. Centrifugujte 1 minutu při pokojové teplotě při 10 000 x g.
11. Přeneste do čisté 2 ml mikrozkuavky (přiložena) maximálně 750 µl supernatantu.
12. Přidejte 1200 µl roztoku C4 a vortexujte 5 sekund.

13. Přeneste přibližně 675 μl na MB spin kolonku a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a přidejte dalších 675 μl směsi do kolonky a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě. Přidejte do kolonky zbytek směsi a centrifugujte 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.

Poznámka: Každý vzorek je nutné rozdělit na tři dávky.

14. Přidejte 500 μl roztoku C5 a centrifugujte 30 sekund při 10 000 x g při pokojové teplotě.

15. Vylijte proteklou kapalinu.

16. Centrifugujte znovu 1 minutu při 10 000 x g při pokojové teplotě.

17. Opatrně přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozkušavky (přiložena). Zabraňte potřísnění kolonky roztokem C5.

18. Přidejte 100 μl roztoku C6 doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky a centrifugujte 30 sekund při pokojové teplotě při 10 000 x g .

19. Vyjměte kolonku. DNA ve zkumavce je nyní připravena pro další použití.

*Měření čistoty izolované DNA pomocí přístroje **Nano-fotometr***

1. Na fotometru nastavte měření koncentrace dsDNA.
2. Na čočku měřicí kyvety nepipetujte 2.5 μl PCR vody a zakryjte vrškem s faktorem 10
3. Zmáčkněte tlačítko pro měření Blanku (BLANK).
4. Čočku a vršek otřete tampónem a poté na čočku napipetujte 2.5 μl vzorku DNA.
5. Zakryjte čočku vrškem s faktorem 10 a zmáčkněte tlačítko pro měření vzorku (SAMPLE)
6. Vytisknete hodnoty čistoty $A_{260/280}$, $A_{230/260}$ a naměřené spektrum.

*Měření koncentrace izolované DNA pomocí přístroje **Qubit***

1. Smíchejte v 0.5 ml zkumavce 195 μl 1X dsDNA HS Working Solution roztoku s 5 μl izolované DNA a změřte na přístroji Qubit 4.0 koncentraci DNA.

Příprava 1. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primery ITS1+ITS4 (1 μM)	1.5 μl
RedTaq Mix 2x konc	15 μl
<u>PCR voda</u>	<u>11.5 μl</u>
DNA	2 μl

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2.5min	
95°C	30s	
55°C	30s	35x
72°C	20s	

Příprava 2. Reakční směsi nested-PCR

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer AR1+AR2 (5 uM)	4.0 ul
RedTaq Mix 2x konc	25 ul
PCR voda	16.0 ul
1 PCR reakce	5.0 ul

Reakční směs jemně promíchejte a krátce stočte a vložte do cycleru. Na cycleru nastavte následující program:

95°C	2.5min	
95°C	30s	
60°C	30s	45x
72°C	20s	

Restrikční analýza PCR produktu

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

PCR reakční směs	20.5 ul
10 x Green Reakční pufr	2.5 ul
Enzym <i>Hin</i> I	2.0 ul

Reakční směs jemně promíchejte, krátce stočte a inkubujte 1h při 37°C.

Analýza Restrikčních fragmentů pomocí agarózové elektroforézy

Připravte 2% agarózový gel – navažte 1,6 g agarózy, přidejte 80 ml 1x TAE pufru a agarózu důkladně rozvařte v mikrovlné troubě. Poté zchlaďte agarózu na cca. 70°C, přidejte 5 ul GelRed, promíchejte a nalijte do připravené vaničky s hřebínkem. Nechte asi 15 minut tuhnout.

Poté vložte nalitý gel do elektroforetické vaničky s cca. 200 ml 1x TAE pufru a vyndejte hřebínek. K restrikčním směsím a ke zbytku PCR reakce přidejte 2 ul Nanášecího pufru. Naneste vzorky na gel v následujícím pořadí: **Délkový marker – PCR produkt - RA *Hinf*I**

Analýza Restrikčních fragmentů pomocí HPLC

Do insertu napipetujte 10 ul směsi po restrikční analýze a 10 ul PCR vody. Insert vložte do HPLC přístroje HP 1100 Series, na kolonu nastříkněte 15 μ l vzorku a spusťte následující metodu, ve které je použita TSK-gel DEAE NPR kolona a průtok činí 1 ml/min:

Roztok A		Roztok B
10 mM Tris-HCl (pH = 9.0); 0.8 M NaCl		10 mM Tris-HCl (pH = 9.0)
Gradient		
T (min)		% B
0		62.5
0.1		50
0.11		50
3		35
10		25
10.5		0
11.5		0
11.51		0
11.70		62.5
14.50		62.5

VYHODNOCENÍ

- Uveďte koncentraci a na základě naměřených dat zhodnoťte čistotu izolované DNA.
- Na základě délky amplifikátu a výsledku restrikční analýzy určete, jaký druh václavky obsahoval váš vzorek půdy, a výsledek zdůvodněte.
- Porovnejte separaci DNA fragmentů pomocí agarozové elektroforózy a HPLC.
- Na základě sekvencí jednotlivých druhů václavek z NCBI databáze zkuste navrhnout dvojice specifických primerů a TaqMan sondu pro detekci Vámi identifikovaného druhu václavky.