

Jméno a UČO:

Datum:

## ÚLOHA E

### 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. *Hinf*I, *Mbo*I) katalyzuje štěpení dvou vláken DNA v polohách symetricky rozmístěných okolo středu palindromové sekvence. Vznikají tak fragmenty s kohezními či lepivými konci. U některých restričních enzymů (*Alu* I) naopak místo štěpení prochází přímo dvojčtetnou osou palindromu. Vznikají pak fragmenty se zarovnanými či tupými konci [18].

Polymorfie délky restričních 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 restriční endonukleázy *Hinf*I a *Alu*I [4]. Délky restričních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek jsou uvedeny v tabulce níže.

**Tabulka 1:** Délky ampliconů a restrikčních fragmentů pro jednotlivé druhy václavek

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

## Literatura

- Jankovský L. 1997. Biologie Václavek, Dizertační práce MZLU, Brno.
- Shaw C.G., Kile, G.A. 1991. ARillaria Root Disease, Agriculture Handbook 691, Department of Agriculture. Washington D.C., United States
- 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.
- 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 kitu **Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Microprep Kit**

- Do **ZR BashingBead™** zkumavky navažte přibližně 250 mg vzorku půdy.
- Přidejte 750 µl **BashingBead™** pufru a zkumavku dobře uzavřete.
- Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně a vortexujte maximální rychlostí 10 miut.
- Centrifugujte 1 minutu při 10 000 *g*.
- Přeneste až 400 µl supernatantu do **Zymo-Spin™ III-F kolonky** ve sběrné zkumavce.  
**Poznámka:** Směs může stále obsahovat určité množství půdních částic.
- Centrifugujte 1 minutu při 8 000 *g*.
- Ponechte si filtrát a zlikvidujte **Zymo-Spin™ III-F kolonku**.
- Přidejte 1 200 µl **Genomického lyzačního pufru** k filtrátu ve sběrné zkumavce z kroku 7. Dobře promíchejte.
- Přeneste 800 µl směsi z kroku 8 do **Zymo-Spin™ IC kolonky** ve sběrné zkumavce.
- Centrifugujte 1 minutu při 10 000 *g*.
- Ponechte si kolonku a zlikvidujte protečený filtrát.
- Opakujte kroky 9 a 10.
- Vložte **Zymo-Spin™ IC kolonku** do nové sběrné zkumavky.

14. Přidejte 200  $\mu\text{l}$  **DNA Pre-Wash pufru** na **Zymo-Spin™ IC kolonku**.
15. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 *g*.
16. Přidejte 500  $\mu\text{l}$  **g-DNA Wash pufru** na **Zymo-Spin™ IC kolonku**.
17. Centrifugujte 1 minutu při 10 000 *g*.
18. Přeneste **Zymo-Spin™ IC kolonku** do čisté 1,5ml mikrozkušavky a přidejte 20  $\mu\text{l}$  **DNA Elučního pufru** přímo do středu kolonky.
19. Centrifugujte 30 sekund při 10 000 *g*.
20. Umístěte **Zymo-Spin™ II- $\mu$ HRC kolonku** do čisté sběrné zkumavky a přidejte 600  $\mu\text{l}$  roztoku **Prep Solution**.
21. Centrifugujte 3 minuty při 8 000 *g*.
22. Přeneste **Zymo-Spin™ II- $\mu$ HRC kolonku** do čisté 1,5ml mikrozkušavky.
23. Přeneste eluovanou DNA z kroku 18 a 19 na připravenou **Zymo-Spin™ II- $\mu$ HRC kolonku** a centrifugujte 3 minuty při 16 000 *g*.
24. 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 květy nepipetujte 2,5  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  1 $\times$  dsDNA HS Working Solution roztoku s 5  $\mu\text{l}$  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 $\mu\text{M}$ )	1,5 $\mu\text{l}$
RedTaq Mix 2 $\times$ konc	15 $\mu\text{l}$
PCR voda	11,5 $\mu\text{l}$
DNA	2 $\mu\text{l}$

## Úloha E – Identifikace jednotlivých druhů Václavěk ze vzorku půdy

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

95 °C	2,5min	
95 °C	30 s	
55 °C	30 s	35×
72 °C	20 s	

### **Příprava 2. Reakční směsi nested-PCR**

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

Primer AR1+AR2 (5 uM)	4,0 µl
RedTaq Mix 2x konc	25 µl
<u>PCR voda</u>	<u>16,0 µl</u>
1 PCR reakce	5,0 µl

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	45×
72 °C	20s	

### **Restrikční analýza PCR produktu**

Připravte reakční směs dle uvedené tabulky do PCR zkumavky:

PCR reakční směs	20,5 µl
10× Green Reakční pufr	2,5 µl
Enzym <i>Hinf</i> I	2,0 µl

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 1× LAB pufru a agarózu důkladně rozvařte v mikrovlnné troubě. Poté zchladte agarózu na cca. 70 °C, přidejte 2 µl MidoriGreen, promíchejte a nalijte do připravené vaničky s hřebínkem. Nechte asi 15 minut tuhnout.

Poté vložte nalitý gel do elektroforetické vaničky s 1× LAB pufrem a vyndejte hřebínek. K restrikčním směsím a ke zbytku PCR reakce přidejte 2 µl Nanášecího pufu. Naneste vzorky na gel v následujícím pořadí: **Délkový marker – PCR produkt – RA *Hinfl***

### *Analýza restrikčních fragmentů pomocí **Fragment Analyzeru***

Do destičky připravte směs 22 µl **Diluent Markeru** a 2 µl vzorku. Do poslední jamky každého řádku připravte směs 22 µl **Diluent Markeru** a 2 µl žebříčku. Do jamek beze vzorku či žebříčku přidejte 24 µl roztoku **Blank Solution**.

### **VYHODNOCENÍ**

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