

Identifikaci jednotlivých druhů václavek

C7195 - Pokročilé praktikum z biochemie

Úvod

- v Evropě bylo popsáno sedm druhů václavek:
A. borealis, *A. cepistipes*, *A. ectypa*, *A. gallica*, *A. mellea*, *A. ostoyae* a *A. tabescens*
- hlavní ekologická funkce:
Dekompozice dřevní hmoty, ale velmi častý přechod k nekrotrofnímu parazitismu
- druhy hodnocené jako slabí parazité
A. borealis, *A. ectypa*, *A. gallica* and *A. tabescens*
- druhy hodnocené jako vážní parazité na stresovaných dřevinách
A. mellea, *A. ostoyae* and *A. cepistipes*

Identifikace jednotlivých druhů václavek

Párové testy

Založeny na kompatibilitě neznámého izolátu s testovacím druhem



Časově náročné, v případě diploidních vzorků jsou výsledky často špatně interpretovatelné

Metody založené na analýze sekvence DNA


- RAPDs (random amplified polymorphic DNAs)
- RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) - IGS a ITS oblasti
- Sekvence specifických oblastí



Nutnost čistého mycelia václavky nebo plodnic

Identifikace jednotlivých druhů václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti

Sekvenční homologie ITS1 oblasti

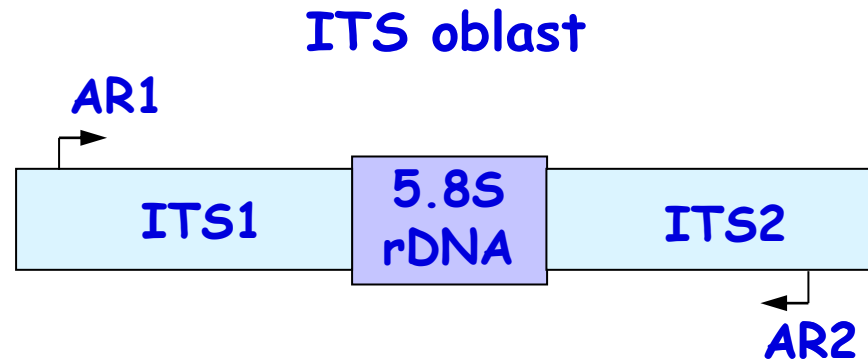
AR1 

```

A. borealis      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAACTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACCGTG
A. ostoyae      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAGCTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACCGTG
A. gallica      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAAATCGTAGCATCG-AGAACTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACCGTG
A. cepistipes   TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAACTTGAA-TCGTAGCATTG-AGAACTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCGACCGTG
A. tabescens    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCTGAAACTTGAA-TCGTAGCATGGCAGAACTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTTGAAGTG
A. mellea      TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGAAACTTGAATTTGTAGCATTG-AGAACTGTTCTGACCTGTTAAAGGGTATGTGCACGTTCAAAGTG
*****
A. borealis      TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC-----GAGCTC
A. ostoyae      TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC-----GAGCTC
A. gallica      TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCTCGAG--CGGTTAGAAGGGTTGCTTTC-----GAGCTC
A. cepistipes   TTGCG--TTCTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTTTTCGAG--CGGTTAGAAGGGCTGCTTTC-----GAGCTC
A. tabescens    TTGCG--TTTTATTC--ATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAACTTTCGCTCCAAGGGCTGGATTAGAAGGGTTGCTTTC-----GAGCTC
A. mellea      TTACGGGTTCTGTTCTAATCCACCTGTGCACCTTTGTAGACTTGATTAAGCTTCGCTTTTCGAG--CGGTTTGAAGGGTTGCTTTCTTTCGAGCTAAGCTC
** * * * * *
A. borealis      CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTC-TTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. ostoyae      CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTTTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. gallica      CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. cepistipes   CCTTTGTCT-ATCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAAATGTCTTGTTTATGGGACGCAAGTC-TTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. tabescens    CCTTTGTCTTACCAAGTCTATGTCTATATAATCTCTTGTATGTCTAGAAATGTCTTGTTTATAGGACGCAAGTCCTTTAAATCTTATACAACTTTCAACAA
A. mellea      CGTTTGTCTTACCGAGTCTATGTCTATATAAACTTTTGTATGTTTAGAAATGTCTTGTTTATAGGACGCAAGTC-TTTAAATGTTATACAACTTTCAACAA
*****

```

Identifikace jednotlivých druhů václavek na základě RFLP analýzy ITS oblasti



Primer	Sekvence (5' → 3')	Délka	Amplikon (bp)	T _m (C) ^b
AR1	CTGACCTGTTAAAGGGTATGTGC	23 b	690-724	59.94
AR2	AAGCTGAATCCTTCTACAAAGTCAA	25 b		59.85

^bT_m byla vypočtena programem Primer 3

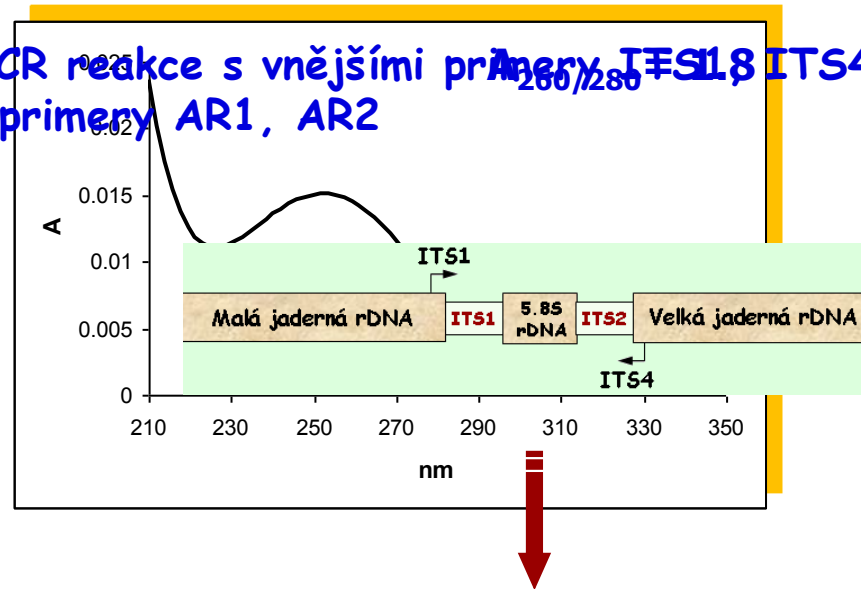
Lochman, J., Serý, O. and Mikes, V. (2004) The rapid identification of European Armillaria species from soil samples by nested PCR. FEMS Microbiology Letters 237, 105-110.

Identifikace václavek se vzorků půdy

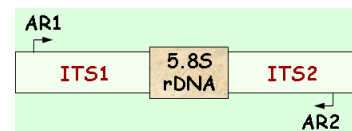
- Izolace DNA z 0.2g půdy pomocí kitu (Soil, Qiagen)

- Nested PCR reakce s vnějšími primery ITS1, ITS2, ITS4 a vnitřními primery AR1, AR2

1 krok



2 krok



Délky ampliconů a restričních fragmentů

Izolát	Délka ampliconu (bp) ITS/AR	Restriční fragment <i>Hinf</i> I (bp)
A. borealis A1 ^a	868/711	293, 172, 56, 31, 75, 68
A. cepistipes 204 ^b	868/711	293, 227, 43, 132
A. gallica 147 ^b	868/711	294, 227, 43, 63, 69
A. mellea 184 ^b	882/724	148, 159, 401
A. ostoyae C2 ^a	870/713	294, 228, 31, 75, 69
A. tabescens T3 ^a	847/690	295, 125, 93, 32, 129