

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika

Studijní specializace: Mykologie



Bc. Tereza Ježková

Sekundární metabolity a antimikrobiální účinky neotropických zástupců rodu

Hermatomyces

Secondary metabolites and antimicrobial effects of neotropical members
of the genus *Hermatomyces*

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 22. 4. 2022

.....
Tereza Ježková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. Ondřeji Koukolovi Ph.D. za cenné připomínky, trpělivost a čas, který mi věnoval. Můj velký dík patří též Mgr. Adéle Čmokové za její vedení v laboratoři, její vstřícný přístup a cenné rady. Děkuji také RNDr. Zdeňkovi Janovskému, Ph.D., Mgr. Lukáši Janošíkovi a Mgr. Aničce Růžičkové za veškeré rady s prací v programu R a se statistikou. RNDr. Evě Stodůlkové děkuji za pomoc při purifikaci sekundárních metabolitů. Také děkuji Jakubu Zápalovi a RNDr. Ivaně Císařové, CSc. za určení struktury látek. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jaroslavu Semerádovi za jeho čas a četné konzultace ohledně hmotnostní spektrometrie. Chtěla bych poděkovat rovněž laborantkám Bc. Adéle Kovaříčkové, Bc. Petře Seifertové a Ing. Soně Kajzrové za jejich ochotu, když jsem něco potřebovala. Mé poděkování patří také Mgr. Lence Machové, Mgr. Štěpánce Žárové, Bc. Kateřině Glässnerové, Bc. Kristýně Holíkové, Ing. Andreji Jašicovi a všem z mykologické pracovní skupiny katedry botaniky PřF UK a Laboratoře genetiky a metabolismu hub Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR za jejich pomoc a všechny jejich rady. V neposlední řadě patří veliký dík mé rodině a přátelům za jejich podporu.

Abstrakt

Druhy rodu *Hermatomyces* (Pleosporales) se vyskytují jako saprotrofové na dřevě a v opadu v tropických oblastech. Jelikož sekundární metabolity tohoto rodu nebyly doposud zkoumány, zaměřuje se tato práce na jejich výzkum. V této diplomové práci byly ověřeny antifungální vlastnosti rodu *Hermatomyces*, a to pomocí párovacích pokusů na agarových plotnách a testováním minimálních inhibičních koncentrací extraktů získaných z houbové biomasy. Extrakt jednoho vybraného kmene *H. reticulatus* CCF 5893 byl separován preparativní metodou HPLC. Vybrané biologicky aktivní frakce byly purifikovány a analýzou nukleární magnetické rezonance a rentgenovou krystalografií byla stanovena chemická struktura separovaných látek. U tohoto druhu byly objeveny dvě sloučeniny: palmarumyciny C2 a C12, které mají antifungální vlastnosti. Dále bylo porovnáno celkem 25 kmenů *Hermatomyces* na základě produkce sekundárních metabolitů (testováním jejich minimálních inhibičních koncentrací a porovnáním HRMS dat). Unikátní látky produkoval *H. megasporus*, který také vykazoval nejvyšší antimikrobiální aktivitu ze všech druhů, a je tedy nejvhodnějším druhem pro další studium antimikrobiálních sloučenin tohoto rodu.

Klíčová slova: *Hermatomyces*, sekundární metabolity, palmarumyciny, antimikrobiální aktivita, hmotnostní spektrometrie

Abstract

Species of the genus *Hermatomyces* (Pleosporales) saprotrophs on wood and litter in the tropics. Since the secondary metabolites of this genus have not been investigated so far, this thesis focuses on them. In this thesis, the antifungal properties of the genus *Hermatomyces* were verified by pairing experiments on agar plates and by testing the minimum inhibitory concentrations of extracts obtained from fungal biomass. The extract of one selected strain, *H. reticulatus* CCF 5893, was separated by preparative HPLC. The selected biologically active fractions were purified and the chemical structure of the separated compounds was determined by nuclear magnetic resonance analysis and X-ray crystallography. Two compounds were found in this species: palmarumycins C2 and C12, which have antifungal properties. Furthermore, a total of 25 *Hermatomyces* strains were compared in terms of secondary metabolite production (by testing their minimum inhibitory concentrations and comparing HRMS data). Unique compounds were produced by *H. megasporus*, which also showed the highest antimicrobial activity of all species and is therefore the most suitable species for further study of antimicrobial compounds of this genus.

Key words: *Hermatomyces*, secondary metabolites, palmarumycins, antimicrobial activity, mass spectroscopy

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Sekundární metabolity	1
1.2. Význam studia sekundárních metabolitů	1
1.3. Rod <i>Hermatomyces</i>	2
1.4. Sekundární metabolity příbuzných rodů <i>Hermatomyces</i>	4
1.4.1. Palmarumyciny	5
1.4.1.1. Charakteristika palmarumycinů	5
1.4.1.2. Biologická aktivita palmarumycinů	5
2. Cíle	7
3. Metodika	8
3.1. Použité kmeny rodu <i>Hermatomyces</i>	8
3.2. Interakce druhů na agarových plotnách	9
3.2.1. Interakce druhů rodu <i>Hermatomyces</i> s druhy rodu <i>Trichoderma</i>	9
3.2.1.1. Statistické zpracování	10
3.2.2. Zjištění přítomnosti antimikrobiálních těkavých látek	11
3.3. Analýza sekundárních metabolitů	12
3.3.1. Extrakce sekundárních metabolitů	12
3.3.2. Určení struktury sekundárních metabolitů u <i>H. reticulatus</i> CCF 5893	12
3.3.2.1. Separace hrubého extraktu pomocí chromatografie	12
3.3.2.2. Purifikace sekundárních metabolitů	13
3.3.2.3. Určení struktury vybraných látek	13
3.3.3 Analýza extraktů	13
3.3. Biologická aktivita	14
3.3.1. Screening antimikrobiální aktivity třech druhů rodu <i>Hermatomyces</i> proti vybraným houbám	15
3.3.2. Antimikrobiální aktivita extraktů druhů rodu <i>Hermatomyces</i>	16
3.3.3. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných z druhu <i>H. reticulatus</i> CCF 5893	17
4. Výsledky	18

4.1. Interakce druhů na agarových plotnách	18
4.1.1. Interakce druhů rodu <i>Hermatomyces</i> s druhy rodu <i>Trichoderma</i>	18
4.1.2. Zjištění přítomnosti antimikrobiálních těkavých látek.....	19
4.2. Analýza sekundárních metabolitů.....	20
4.2.1. Určení struktury sekundárních metabolitů u <i>H. reticulatus</i> CCF 5893	20
4.2.1.1. Separace hrubého extraktu pomocí chromatografie	20
4.2.1.2. Nalezené sekundární metabolity.....	20
4.2.4. Diverzita produkovaných metabolitů	21
4.3. Biologická aktivita.....	24
4.3.1. Screening antimikrobiální aktivity třech druhů rodu <i>Hermatomyces</i> proti vybraným houbám.....	24
4.3.2. Antimikrobiální aktivita extraktů druhů rodu <i>Hermatomyces</i>	26
4.3.3. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných z druhu <i>H. reticulatus</i> CCF 5893	27
4.4. Tvorba knihovny palmarumycinů.....	28
5. Diskuse	29
5.1. Párovací pokusy	29
5.2. Další látky, které by mohl rod <i>Hermatomyces</i> produkovat.....	29
5.3. Nově nalezené látky a jejich využití v chemotaxonomii.....	30
5.4. Diverzita produkovaných metabolitů	31
5.5. Biologická aktivita	32
5.6. Výhledy do budoucna.....	32
6. Závěr.....	34
7. Reference	35
8. Přílohy	43

Přehled zkratk

zkratka	anglický název	český název
ESI	electrospray ionization	elektrosprejová ionizace
EF1- α	elongation factor 1- α	elongační faktor 1- α
GLS	generalized least squares	(metoda) nejmenších čtverců
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	high-resolution mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ITS	internal transcribed spacer	vnitřní přepisovaný mezerník
LB	lysogeny broth	lysogenylový vývar
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LSU	large subunit (rDNA)	velká podjednotka (rDNA)
MEA	malt extract agar	agar se sladovým extraktem
MeOH	methanol	methanol
MIC	minimal inhibition concentration	minimální inhibiční koncentrace
MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
NMR	nuclear magnetic resonance	nukleární magnetická rezonance
PDA	potato dextrose agar	bramboro-dextrózový agar
rDNA	ribosomal DNA	ribozomální DNA
RPB2	RNA polymerase II subunit 2	druhá největší podjednotka RNA polymerázy II
SSU	small subunit (rDNA)	malá podjednotka (rDNA)
TEF1	translation-elongation factor 1- α	translační elongační faktor 1- α
YES	yeast extract supplemented	agar s kvasničným extraktem
YMG	yeast extract malt extract glucose	kvasničný a maltový extrakt s glukózou

1. Úvod

1.1. Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou látky, které organismy sice nutně nepotřebují pro svůj růst, ale přinášejí jim mnoho výhod (Macheleidt et al. 2016). Mohou sloužit např. k inhibici ostatních konkurenčních mikroorganismů (Demain 1999), k rozeznávání substrátu (Collemare et al. 2008), k ochraně před predací (Fox & Howlett 2008) či hrají roli ve virulenci patogenních zástupců a komunikaci v rámci jednoho druhu i mezi více druhy (Macheleidt et al. 2016).

1.2. Význam studia sekundárních metabolitů

Výzkum sekundárních metabolitů hub skýtá značný potenciál. V posledních letech narůstá rezistence hub jak vůči antimykotikům používaných v léčbě mykotických infekcí (von Lilienfeld-Toal et al. 2019), tak i vůči fungicidům v zemědělství používaným k ochraně pěstovaných plodin (Cook et al. 2021). V zemědělství stejně jako v medicíně se totiž používají azolové sloučeniny a jejich deriváty, což vede ke vzniku rezistentních kmenů hub na polích (Chen et al. 2020). Proto kromě vývoje nových antimykotik je také nutné stále hledat nové antifungální látky, jejichž použitím v zemědělství místo běžně používaných azolů by mohlo dojít ke snížení indukce rezistence půdních a fytopatogenních hub na polích, a tudíž i k poklesu rezistentních invazivních mykóz v nemocničním prostředí.

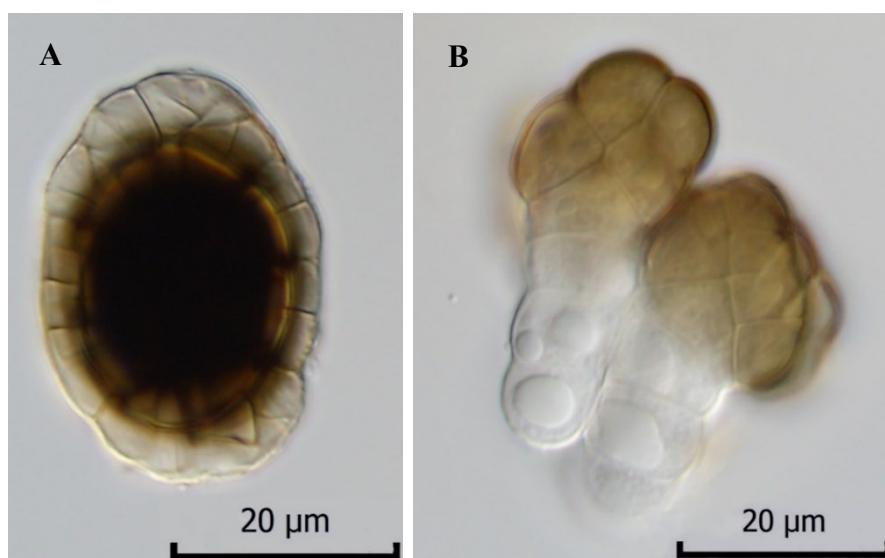
Konkrétní využití sekundárních metabolitů může být v boji proti zástupcům houby rodu *Trichoderma*, která způsobuje kontaminaci dalších hub (např. hlívy nebo žampionů) v jejich pěstírnách, jež je příčinou tzv. “green mold disease“ (Komon-Zelazowska et al. 2007; Samuels et al. 2017). Druhy rodu *Trichoderma* (*T. aggressivum*, *T. pleuroticola*, *T. pleurotum*, *T. harzianum*) rostou rychleji než pěstované houby, a proto nad nimi získávají výhodu v boji o živiny a místo. Navíc produkují sekundární metabolity a extracelulární enzymy, které znehodnocují substrát, na němž jsou houby pěstovány (Kredics et al. 2010). V současné době je k zabránění “green mold disease“ v Evropské unii povolen jediný chemický fungicid prochloraz (Potocnik et al. 2015). Ten je ale pravděpodobně efektivní jen v primárních fázích infekce sporymi zástupci rodu *Trichoderma*, nikoliv už ve fázi sekundární, kdy se koncentrace prochlorazu snižuje a fungicid přestává být efektivní (Innocenti et al. 2019). Antifungální sekundární metabolity by mohly tedy představovat alternativu k tomuto přípravku.

Sekundární metabolity mohou najít uplatnění také v chemotaxonomii. Spektrum sekundárních metabolitů je totiž často taxonově specifické (Frisvad et al. 2008) a může popisovat jinou evoluční trajektorii než další taxonomické markery. Produkce sekundárních metabolitů také často přímo vysvětluje ekologii a rozšíření druhu. Proto může být

chemotaxonomie vhodným doplňkem k běžně používaným taxonomickým přístupům. Praktické využití lze dokladovat např. u druhu *Stachybotrys chartarum* (Hypocreales), u kterého byla objevena přítomnost kryptických druhů lišících se právě rozdílnou produkcí sekundárních metabolitů. Tím se vysvětlila i rozdílná biologická aktivita obou kryptických taxonů (Andersen et al. 2017). Chemotaxonomie byla dále využita např. v řádu Xylariales nebo v rodech *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (Becker & Stadler 2021; Frisvad et al. 2008).

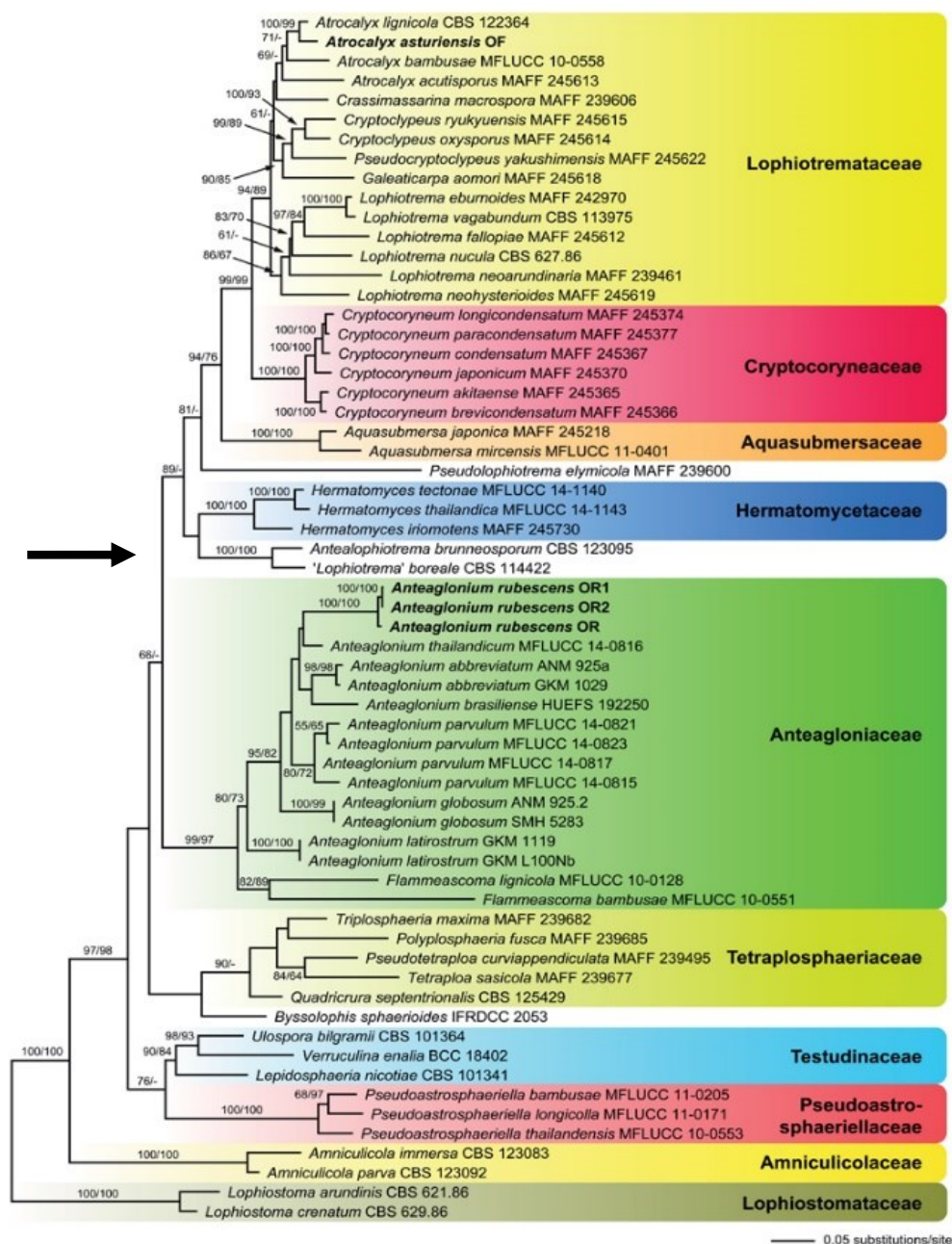
1.3. Rod *Hermatomyces*

Řád Pleosporales je jeden z nejdiverzifikovanějších řádů v rámci oddělení Ascomycota zahrnující převážně tropické druhy, které produkují široké spektrum sekundárních metabolitů (Cao et al. 2017; Isaka et al. 2014; Khiralla et al. 2016; Lai et al. 2020). Do tohoto řádu patří anamorfní rod *Hermatomyces* rozšířený v tropických oblastech celého světa (Koukol & Delgado 2019; Koukol et al. 2018; Tibpromma et al. 2016). Charakteristickým znakem tohoto rodu jsou sporodochiální konidiomata a dimorfní konidie (obr.1) (Hashimoto et al. 2017). Většina známých druhů se vyskytuje jako saprotrófové na suchém i vlhkém rostlinném materiálu (Doilom et al. 2017; Koukol et al. 2018), například v opadu (větvíček stromů a keřů), suchých palmových listech nebo na větvích a listech lián (Delgado 2013; Koukol et al. 2018; Prasher & Prasher 2014; Pratibha et al. 2012; Tibpromma et al. 2016). Zástupci rodu *Hermatomyces* se pravděpodobně budou vyskytovat rovněž jako endofyté, neboť sekvence neznámé endofytní houby izolované ze semen *Apeiba membranacea* (*Malvaceae*) spadala do příbuznosti *H. sphaericus* (Koukol et al. 2018).



Obr. 1: Konidie *Hermatomyces amphisporus* A. Čočkovitá konidie. B. Cylindrická konidie. Přípraveno z herbářové položky. Měřítko A, B = 20 µm. Fotografie: O. Koukol.

Počet známých druhů tohoto rodu je 24 (podle Indexu Fungorum je jich sice uváděno 31, nicméně mnohé z nich jsou vzájemnými synonymy nebo patří do jiného druhu (Koukol et al. 2018, Koukol & Delgado 2021, <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>, stav 13. 3. 2022). Na základě fylogenetické analýzy rDNA (SSU, ITS, LSU podjednotky), TEF1 a RPB2 genů a morfologického pozorování byla odlišena nová čeleď *Hermatomycetaceae* zahrnující samostatný rod *Hermatomyces* (Hashimoto et al. 2017). Fylogenetická příbuznost s ostatními čeleděmi je vidět na obr. 2.



Obr. 2: Fylogram vybraných druhů řádu Pleosporales ukazující příbuzné čeledi a druhy čeledi *Hermatomycetaceae*. Založený na fylogenetické analýze rDNA (SSU, ITS, LSU podjednotky), TEF1 a RPB2 genů. Převzato z: Jaklitsch et. al (2018).

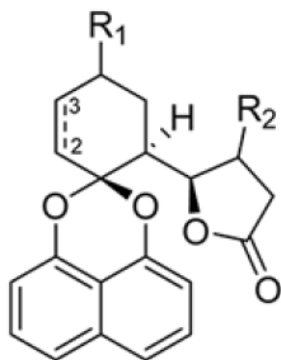
Fylogeneze tohoto rodu byla provedena na základě pozorování morfologie v kombinaci s analýzou molekulárních dat (úseky SSU, ITS, LSU, EF1- α , RPB2, β -TUB) (Delgado et al. 2020; Hashimoto et al. 2017; Koukol et al. 2018). Sekundární metabolity rodu *Hermatomyces* nebyly dosud zkoumány.

1.4. Sekundární metabolity příbuzných rodů *Hermatomyces*

Sekundární metabolity byly však studovány u třech zástupců fylogeneticky příbuzných druhů z čeledi *Testudinaceae* (*Verruculina enalia* a *Ulospora bilgramii*) (Zhang et al. 2009) a *Anteagloniaceae* (*Anteaglonium* sp.) (Mafezoli et al. 2018; Xu et al. 2015). *Verruculina enalia* se vyskytuje na dřevě v mangrovech (Alias & Jones 2000) a ve slaných jezerech (Lin et al. 2002). Extrakt získaný z tohoto druhu vykazoval antimikrobiální aktivitu, za kterou pravděpodobně stojí lipodepsipeptid verrucilin (Bunyapaiboonsri et al. 2020) či metabolit enalin A (Lin et al. 2002). Kromě antibakteriální aktivity byly u verruculinonu zjištěny také cytotoxické účinky na buněčné linie karcinomu prsu a plic (Bunyapaiboonsri et al. 2020).

Druhý jmenovaný druh *Ulospora bilgramii* se vyskytuje v lišejnících (jako tzv. „endolichenic fungus“) (Xie et al. 2020). Ze zástupců tohoto druhu bylo izolováno několik látek, z nichž pozornost si zasluhují heptaketidy – látky, u kterých byly zjištěny antifungální (Li et al. 2019), antibakteriální (Okeke et al. 2014), antivirové (He et al. 2012) a cytotoxické účinky (Li et al. 2019). Xie et al. (2020) zjistili, že heptaketid ulosporin G, produkovaný druhem *Ulospora bilgramii*, vykazoval značnou cytotoxickou aktivitu pro buněčné linie karcinomu prsu, plic a rakoviny děložního čípku.

Anteaglonium sp., jenž byl izolován ze stonku vranečku *Selaginella arenicola*, produkoval rovněž rozličné heptaketidy, jako např. herbarin, herbaridin A a B nebo scorpionon (Mafezoli et al. 2018; Xu et al. 2015). Podle tohoto rodu jsou pojmenovány nová skupina látek – tzv. anteaglonialidy, sloučeniny mající strukturu znázorněnou na obr. 3. Všechny tyto metabolity byly cytotoxické proti buněčnou linii Ewingova sarkomu (Xu et al. 2015).



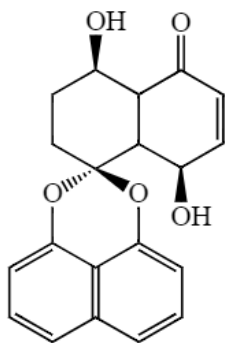
Obr. 3: Obecná struktura anteaglonialidu. Přezato z: Xu et al. (2015).

Další biologicky aktivní látky, které *Anteaglonium* sp. a též i *Ulospora bilgramii* produkovaly, jsou palmarumyciny, látky strukturně podobné anteaglonialidům (Xie et al. 2020; Xu et al. 2015).

1.4.1. Palmarumyciny

1.4.1.1. Charakteristika palmarumycinů

Své pojmenování dostaly palmarumyciny podle houby *Coniothyrium palmarum* (Pleosporales) (Krohn et al. 1994a), z níž bylo izolováno celkem šest těchto sloučenin (Krohn et al. 1994a, 1997) a dalších 16 palmarumycinů bylo získáno z blíže neurčeného druhu rodu *Coniothyrium* (Krohn et al. 1994b). První nález palmarumycinu byl ale pravděpodobně již v roce 1989 v Japonsku, kdy Ogishi et al. izolovali z houby *Teraploa aristata* (Pleosporales) a následně patentovali látku MK3018 (obr. 4), která vykazovala antibiotické účinky.



Obr. 4: Struktura prvního nalezeného palmarumycinu MK 3018.

Chemicky patří tyto látky mezi spirodioxynafthaleny, skládají se ze dvou naftalenových jednotek, které jsou navzájem propojené přes atomy kyslíku. Zatímco jedno naftalenové jádro zůstává nezměněno, druhé jádro je modifikováno, a to např. epoxidací, oxidací, redukcí nebo halogenací (Aslan 2009). Zmiňované látky zahrnují sloučeniny nazývané např. jako cladospirony (Bode et al. 2000), diepoxiny (Schlingmann et al. 1996), dekaspirony (Jiao et al. 2006), guignardiny (Ai et al. 2014), rhytidony (Siridechakorn et al. 2017) nebo rhytidenony (Pudhom & Teerawatananond 2014). Strukturně podobné palmarumycinům jsou preussomeriny a spiroxiny, které se od palmarumycinů liší způsobem navázání naftalenových jader na sebe (Aslan 2009).

1.4.1.2. Biologická aktivita palmarumycinů

Palmarumyciny vykazují antibakteriální (Ai et al. 2014; Kouam et al. 1993; Krohn et al. 1994b,a), antifungální (Krohn et al. 1994b,a), antiprotozoální (Martínez-Luis et al. 2008), algicidní (Bode et al. 2000) a herbicidní (Krohn et al. 1994b) účinky. Mnohé z nich jsou též cytotoxické vůči různým rakovinným buněčným liniím (Chu et al. 1994c,a,b, 1995; Siridechakorn et al. 2017). Mezi mechanismy účinků protirakovinné aktivity patří inhibice

farnesyl-protein transferasy (FPTasy) (Singh et al. 1994), DNA gyrasy (Sakemi et al. 1995), fosfolipasy D (Chu et al. 1994b, 1996) nebo thioredoxin reductasy (Powis et al. 2006; Wipf et al. 2001a, 2004). Jelikož jsou tyto látky někdy cytotoxické specificky na určitý typ nádoru (Wipf et al. 2001b), skýtají tyto sloučeniny perspektivu ve výzkumu léčby nádorových onemocnění.

Další možnou perspektivou těchto látek je jejich využití pro léčbu diabetes mellitus typu I a II. Metabolit guignardin C, patřící do skupiny palmarumycinů, významně inhiboval enzymy, které hrají klíčovou roli ve vzniku diabetu (Ai et al. 2014). Palmarumyciny rovněž inhibovaly enzym karbonanhydrasu katalyzující reverzibilní přeměnu oxidu uhličitého a vody na kyselinu uhličitou, která z velké části disociuje na bikarbonát a proton vodíku, což ovlivňuje pH v buňkách (Gocer et al. 2015). Palmarumyciny by tedy jako inhibitory karbonanhydrasy mohly být využity v léčbě glaukomu, epilepsie, nervových potíží nebo jako diuretika (Gocer et al. 2015).

2. Cíle

Jelikož druhy příbuzné zástupcům rodu *Hermatomyces* produkují perspektivní biologicky aktivní látky, chtěla bych v této práci zjistit, jaké sekundární metabolity vytváří rod *Hermatomyces* a jak tyto látky působí na další mikroorganismy. Předchozí pokusy ukázaly, že druhy rodu *Hermatomyces* inhibovaly růst zástupců rodu *Trichoderma* (O. Koukol, nepublikovaná data). Tento rod by tedy mohl produkovat sekundární metabolity s antifungálními účinky.

Cílem této práce je u zástupců rodu *Hermatomyces*:

1. ověřit inhibiční účinek vybraných druhů na zástupce rodu *Trichoderma*
2. identifikovat biologicky aktivní látky produkované rodem *Hermatomyces*
3. porovnat profily produkovanych sekundárních metabolitů napříč celým rodem
4. porovnat, do jaké míry metabolická příbuznost těchto druhů souhlasí s fylogenetickými daty

3. Metodika

3.1. Použité kmeny rodu *Hermatomyces*

Bylo použito celkem 25 kmenů rodu *Hermatomyces* v osmi druzích (tab. 1), izolovaných v letech 2016–2018 O. Koukolem v Panamě a Portoriku a G. Delgadem v Texasu. Tyto kmeny byly určeny na základě své morfologie a fylogenetické analýzy molekulárních dat – DNA regionů ITS, LSU, EF1- α , RPB2, β -TUB (Delgado et al. 2020; Koukol et al. 2018). Část izolátů byla uložena ve sbírce CCF (Sbírka kultur hub PřF UK). Kultury byly uchovávány při cca 5 °C.

Tab. 1: Kmeny rodu *Hermatomyces* použité v této diplomové práci.

kmen	substrát	oblast sběru
<i>H. amphispurus</i> CCF 6392	tlející list palmy <i>Sabal minor</i>	Texas, USA
<i>H. amphispurus</i> CCF 6394	tlející list palmy <i>Sabal minor</i>	Texas, USA
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5899	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5900	suchá ztrouchnivělá větev /kmen	Panama
<i>H. megasporus</i> CCF 5897	ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. megasporus</i> CCF 5898	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. reticulatus</i> CCF 5893	ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. reticulatus</i> CCF 5905	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5907	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5908	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5894	nahnílý list palmy z čeledi <i>Arecaceae</i>	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5902	suchá ztrouchnivělá liána	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5906	mokrý ztrouchnivělý liána	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5911	suchá ztrouchnivělá větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5914	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5916	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 5917	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> CCF 6178	suchá větev listnatého stromu	Portoriko, USA
<i>H. sphaericus</i> CCF 6179	suchá větev listnatého stromu	Portoriko, USA
<i>H. sphaericus</i> CCF 6180	suchá větev listnatého stromu	Portoriko, USA
<i>H. sphaericus</i> KZP 441	suchá ztrouchnivělá větev <i>Guazuma ulmifolia</i>	Panama
<i>H. sphaericus</i> KZP 445	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. sphaericus</i> KZP 469	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. tucumanensis</i> CCF 5915	suchá ztrouchnivělá visící větev	Panama
<i>H. verrucosus</i> CCF 5903	suchá ztrouchnivělá liána	Panama

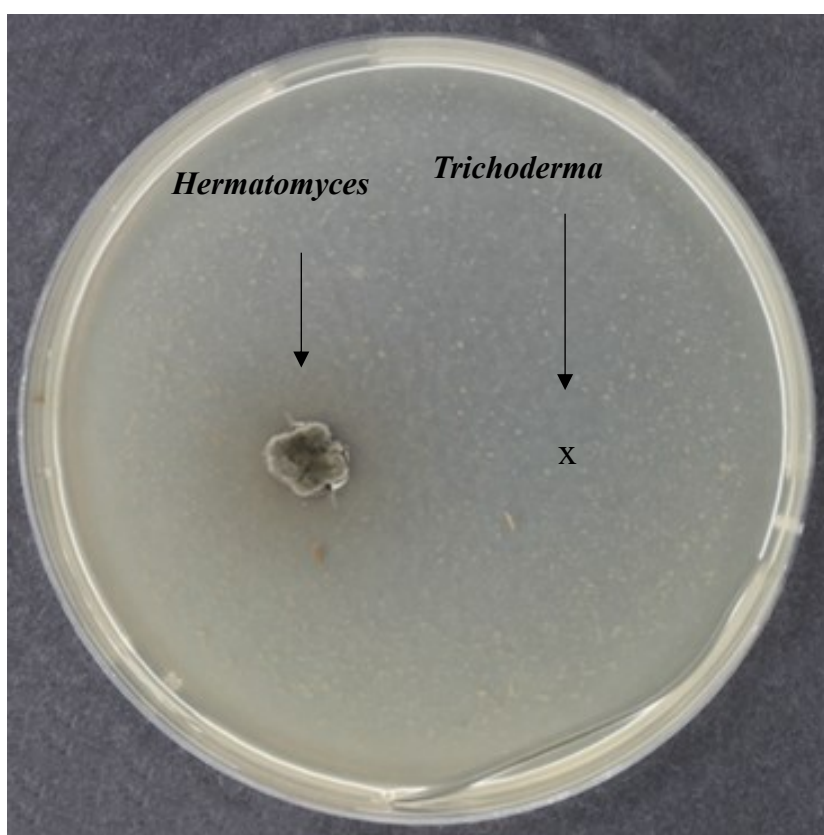
3.2. Interakce druhů na agarových plotnách

3.2.1. Interakce druhů rodu *Hermatomyces* s druhy rodu *Trichoderma*

Ke zjištění interakce mezi druhy rodu *Hermatomyces* s ostatními houbami byly využívány párovací pokusy, které umožňují v čase opakovaně pozorovat kompetici a vzájemnou interakci jednotlivých druhů. Na agarovou živnou půdu typu MEA (HIMEDIA, Bombaj, Indie, složení v tab. 2) byl na Petriho misce naočkován izolát rodu *Hermatomyces* a po předem zvolené době izolát další testované houby. Vybrané druhy rodu *Trichoderma* byly přidány po 14 dnech od naočkování jedním z druhů rodu *Hermatomyces*. V úvahu zde byla vzata rychlost růstu jednotlivých druhů hub. Vzdálenost zaočkování jednotlivých hub byla třetina průměru misky od okraje. To znamená, že houby měly mezi sebou rovněž jednu třetinu délky průměru misky (obr. 5). Ve všech pokusech byly agarové půdy kultivovány při pokojové teplotě a střídavém světelném režimu.

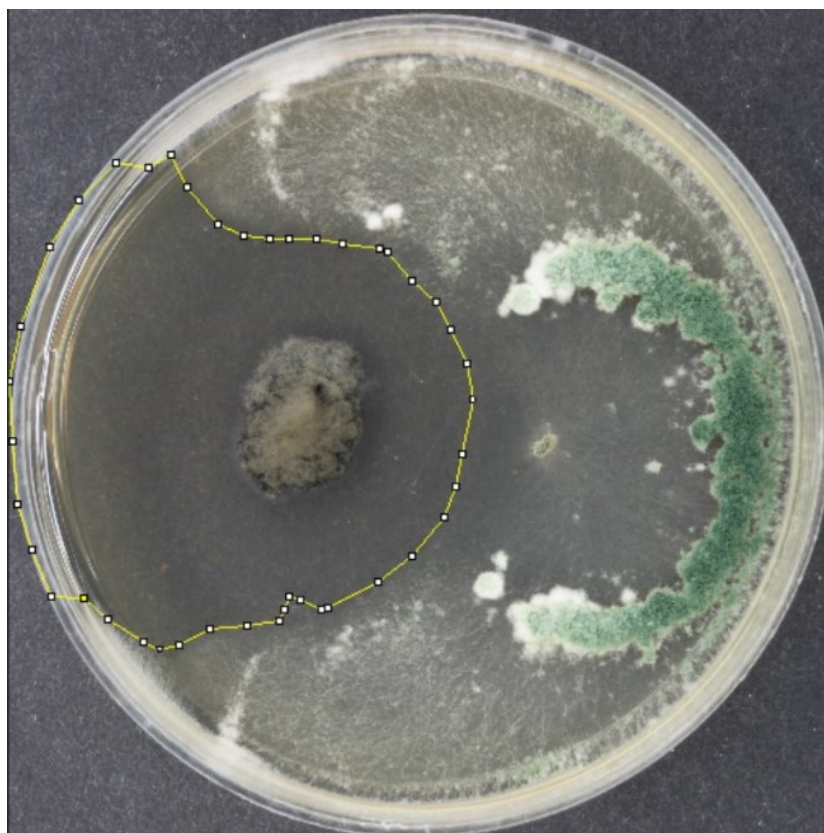
Tab. 2: Složení agarového média typu MEA, množství na 1 l destilované vody

maltózový extrakt	20 g
D-glukóza	20 g
pepton	1 g
agar	15 g



Obr. 5: Založení párovacích pokusů pro stanovení inhibiční aktivity. Ke kultuře izolátu rodu *Hermatomyces* (vlevo) byl zaočkován zástupce rodu *Trichoderma* (vpravo).

Misky byly nafoceny fotoaparátem Canon EOS 500D (objektiv EF-S 60 mm f/2,8 Makro USM). Poté byla v programu ImageJ (www.imagej.nih.gov) ručním ohraňčením změřena plocha, kterou nekolonizoval druh rodu *Trichoderma* (obr 6).



Obr. 6.: Stanovení velikosti plochy nekolonizované druhu rodu *Trichoderma* v programu ImageJ. *Hermatomyces reticulatus* x *T. aggressivum* po čtyřech dnech od přidání *T. aggressivum*.

Pro zjištění efektu rodu *Hermatomyces* na rod *Trichoderma* byly vybrány tři druhy, které kontaminují pěstírny hub – *T. aggressivum* CCF 3865, *T. harzianum* CCF 2713 a *T. pleuroticola* CCF 4514 uložené ve sbírce CCF. Tři vybrané druhy rodu *Hermatomyces*: *H. reticulatus* CCF 5893, *H. sphaericus* CCF 5911 a *H. bifurcatus* CCF 5899 byly testovány na agarovém médiu MEA proti třem výše zmíněným druhům rodu *Trichoderma*, každá varianta v osmi opakováních. Každý druh (rodů *Trichoderma* i *Hermatomyces*) byl rovněž za účelem kontroly kultivován samostatně, a to taktéž vždy v osmi opakováních. Vzájemná interakce všech kombinací uvedených hub byla pozorována po čtyřech a šesti dnech po zaočkování druhu rodu *Trichoderma*.

3.2.1.1. Statistické zpracování

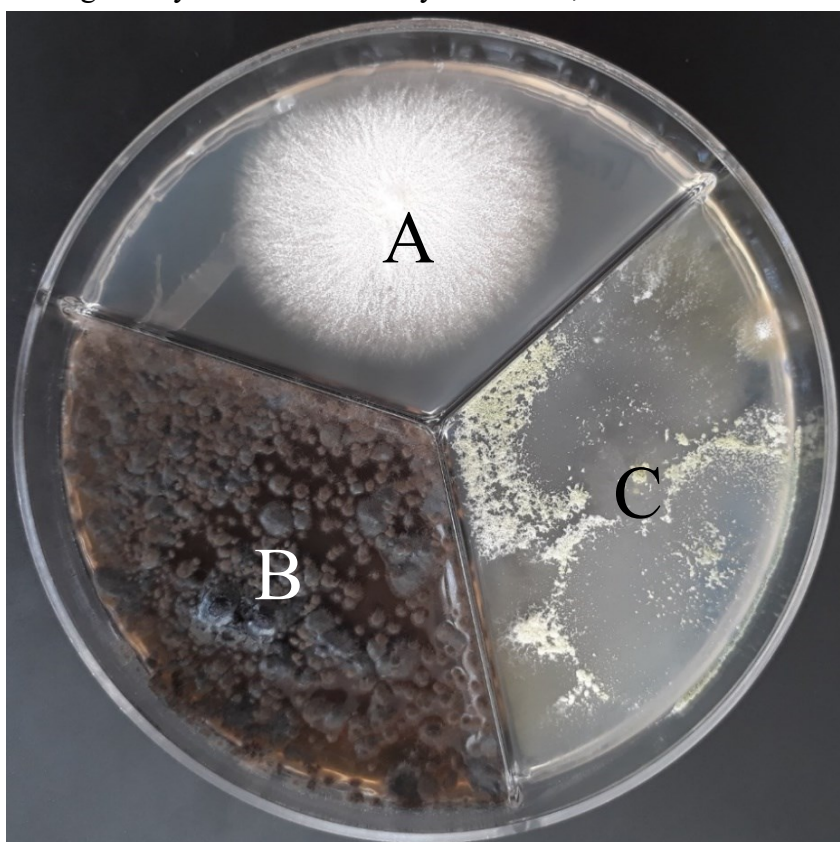
Do analýzy byly zahrnuty plochy misek, které nebyly kolonizované druhem *Trichoderma*. Nejprve byla provedena explorace dat, na základě které bylo vyhodnoceno rozložení dat a jejich rozptyl (viz kapitola 4.1.1.). Vhodný model byl vybrán na základě diagnostických grafů.

Analýza variance (ANOVA) nemohla být použita, protože se skupiny výrazně lišily ve svém rozptylu. Byla proto využita metoda GLS (Generalized least squares), u které se dají zohlednit rozdíly ve varianci jednotlivých skupin. U většiny pozorování byl u kontrolní skupiny (druh rodu *Trichoderma* kultivovaný samostatně) nulový rozptyl. Protože i u metody GLS platí, že nulový rozptyl kontrolní skupiny by výsledky ovlivnil tak, že by nemohly být správně interpretovány, nebyly kontroly do této analýzy zahrnuty. Poněvadž po šesti dnech od zaočkování druhů rodu *Trichoderma* došlo k přerůstání druhů rodu *Hermatomyces*, nebyla tato data staticky vyhodnocována.

Analýza GLS a grafické výstupy byly zpracovány pomocí programovacího jazyka R (R Core Team 2021) s využitím balíčků ggplot2 a nlme.

3.2.2. Zjištění přítomnosti antimikrobiálních těkavých látek

Pro zjištění, zda za inhibiční aktivitu nejsou zodpovědné těkavé látky, byly využity dělené Petriho misky s agarovým médiem. Misky byly rozdělené na tři části – do jedné byl naočkován *H. reticulatus* CCF 5893 a do zbývajících dvou organismy, které *H. reticulatus* ve sdíleném médiu inhiboval – *Trichoderma harzianum* a *Trichophyton spiraliiforme* CCF 6259 (obr. 7). Misky byly důkladně obaleny parafilmem, aby případné těkavé látky neunikaly ven. Organismy mezi sebou sdílely atmosféru, nikoli médium.



Obr. 7: Dělené misky pro zjištění, zda jsou za inhibiční aktivitu *Hermatomyces* zodpovědné těkavé látky. A: *Trichophyton spiraliiforme*, B: *H. reticulatus* CCF 5893 C: *Trichoderma harzianum*.

3.3. Analýza sekundárních metabolitů

3.3.1. Extrakce sekundárních metabolitů

Celkem 25 kmenů rodu *Hermatomyces* (tab. 1 viz výše) bylo kultivováno v třepaném mediu (180 rpm) s přidavkem kvasničného extraktu (složení v tab. 3) v 250 ml baňkách při teplotě 25 °C. Po zaznamenání viditelného růstu bylo médium kontrolováno každý den na přítomnost cukru. Po jeho utilizaci se totiž předpokládá začátek produkce většiny sekundárních metabolitů. Přítomnost cukru byla měřena pomocí proužků užívaných běžně pro měření glykosurie v moči diabetiků (DIAPHAN[®], Erba Lachema s.r.o.). U většiny kmenů byl cukr vyčerpán po cca 14 dnech.

Tab.3: Složení tekutého média s kvasničným extraktem na 1 l destilované vody.

malt extrakt (HIMEDIA, Bombaj, Indie)	10 g
bakteriologický pepton (HIMEDIA, Bombaj, Indie)	0,5 g

Po ukončení kultivace bylo mycelium odděleno filtrací pomocí filtračního papíru od supernatantu. V supernatantu bylo změřeno pH (v příloze P1). K supernatantu (30 ml) byl přidán ethylacetát (20 ml) a tato emulze byla sonikována po dobu 30 minut při teplotě 38 °C (v ultrazvukové čističce Sonorex Digital 10 P). K myceliu byl přidán aceton a celá směs byla rovněž sonikována po dobu 30 minut. Po sonikaci bylo mycelium přefiltrováno přes filtrační papír a aceton byl odpařen na vakuové rotační odparce (Hei-VAP Precision). Po odpaření acetonu byl k vodné fázi získané z mycelia přidán ethylacetát v poměru 1:1. Z připravených extraktů získaných jak ze supernatantu, tak z mycelia, byla pipetou oddělena organická a vodná fáze (která se již dále neanalyzovala). Extrakty byly následně odpařeny ve vakuovém koncentrátoru SpeedVac a poté resuspendovány v methanolu, znovu odpařeny a zváženy. Poté byly naředěny do koncentrace 4,5 mg/ml v methanolu, čímž byly připraveny pro další analýzu.

3.3.2. Určení struktury sekundárních metabolitů u *H. reticulatus* CCF 5893

3.3.2.1. Separace hrubého extraktu pomocí chromatografie

Jeden vybraný druh – *Hermatomyces reticulosus* CCF 5893 byl nakultivován v pěti litrech média. Získaný extrakt extrahovaný stejným způsobem, jako bylo uvedeno výše, byl rozdělen pomocí flash chromatografie Adélou Čmokovou v Helmholtově centru pro výzkum infekcí (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) v německém Braunschweigu. Separace probíhala na koloně Reveleris[®] Silica 24 g po dobu 38 min. Rychlost průtoku byla 32 ml/min. Jako mobilní fáze byl použit dichlormethan (A), dichlormethan:aceton 4:1 (B), dichlormethan:aceton:methanol (4:1):3 (C) a methanol (D). Extrakt supernatantu (1,5 g) byl eluován v gradientu, který zachycuje tab. 4.

Tab. 4: Program separace extraktu supernatantu *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893. A: dichlormethan, B: dichlormethan:aceton 8:2, C: dichlormethan:aceton:methanol (8:2):3, D: methanol.

	trvání programu (minuty)	rozpouštědlo	% druhého rozpouštědla
1	0	AB	0
2	5	AB	0
3	7	AB	20
4	0	BC	20
5	7	BC	60
6	7	BC	100
7	7	BC	100
8	5	CD	100

Použitím UV detekce 220, 254, 280 nm byly vybrány frakce, které měly píky s vysokými signály. Na základě UV signálu byly tyto frakce spojeny a následně otestovány na biologickou aktivitu (mikrodiluční metodou viz dále).

3.3.2.2. Purifikace sekundárních metabolitů

Získané frakce byly dále purifikovány na preparativním HPLC (Waters, Milford, MA, USA) (chromatogram v příloze P2). U ostatních frakcí nebylo možné jednoduše od sebe oddělit jednotlivé složky. Metoda pro purifikaci extraktu pomocí HPLC byla vyvinuta Evou Stodůlkovou (Laboratoř genetiky a metabolismu hub, MBÚ AV ČR). Použita k tomu byla kolona Kinetex 2,6 µm EVO C18 (LC Column 150 mm × 4,6 mm, Phenomenex). Metoda běžela isokraticky po dobu 27 min v 70% methanolu. Z této frakce byly získány dvě látky s retenčními časy 14 a 16.

3.3.2.3. Určení struktury vybraných látek

Pro určení struktury látek byla využita nukleární magnetická rezonance (NMR). NMR analýzu a interpretaci dat provedl Jakub Zápál (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, MBÚ AV ČR). U materiálu, z kterého se podařilo získat krystaly, byla použita ke zjištění struktury X-ray krystalografie (rentgenová krystalografie) Ivanou Císařovou (Centrum molekulových a krystalových struktur, katedra anorganické chemie, PřF UK).

3.3.3 Analýza extraktů

Extrakty získané ze supernatantu a mycelia různých kmenů rodu *Hermatomyces* (viz kap. 3.3.1.) byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie kombinované s hmotnostním spektrometrem LC-HRMS (1260 Infinity II LC system (Agilent, USA) spojený s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HRMS) (6546 LC/Q-TOF Agilent, USA) s využitím elektrosprejového iontového zdroje Agilent Jet Stream (Agilent Technologies, USA)). Tytéž vzorky byly změřeny také hmotnostním spektrometrem LC-MS

amaZon speedTM (Bruker Daltonik GmbH, Brémy, Německo), kde byla naměřena UV spektra, která mohou být využita při identifikaci látek. Vzorky byly ionizovány elektrosprejem (ESI) za vzniku kladně a záporně nabitých molekul. Kladně nabitě molekuly byly zaznamenány v pozitivním módu (ESI+), záporně nabitě pak v negativním módu (ESI-). Vizualizace chromatogramů (LC-MS data) byla provedena pomocí programu MassHunter Quantitative Analysis Software (verze 10.0, Agilent Technologies).

K statistické analýze s cílem porovnat jednotlivé kmeny mezi sebou byl využit program Mass Profiler Professional verze 15.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Analyzovány byly píky intenzity vyšší než 15 000 countů. Tím se odfiltrovaly látky, které byly produkovány v minoritním množství, a látky z reference, které byly ve všech vzorcích stejné. Byla využita funkce PARETO (jejíž škálovým parametrem je druhá odmocnina směrodatné odchylky (Xi et al. 2014)), která snižuje relativní důležitost sloučenin s vysokými píky. Tak se zabránilo případné chybě vzniklé odlišným nařazením vzorků. Aby data byla rovnoměrně rozdělena, byla logaritmicky transformována (log2). Následně byly dendrogramy hierarchické shlukové analýzy (HCA) založené na podobnosti sekundárních metabolitů porovnány s fylogramem sestaveným ze čtyř molekulárních markerů.

3.3. Biologická aktivita

Pro zjištění antifungální a antibakteriální aktivity extraktů z mycelia a ze supernatantu (viz kap. 3.3.1) byla využita mikrodiluční metoda. Do vaničky bylo dáno 25 ml tekutého média s kvasničným extraktem (viz tab.3, kap.3.3.1.) pro houby a pro bakterie bylo použito LB médium (LB Broth (Miller), Sigma-Aldrich, složení v tab. 5). Následně byl přidán organismus, u kterého se zjišťovala minimální inhibiční koncentrace. Bakterie (*E. coli*, *B. subtilis*) a kvasinky (*C. neoformans*, *C. tenuis*) byly spočítány v počítací komůrce a přidány v koncentraci $6,7 \times 10^5$ buněk/ml. U ostatních hub, jejichž buňky nebylo možné takto spočítat, byl přidán do vaničky 1 ml tekutého média s organismem.

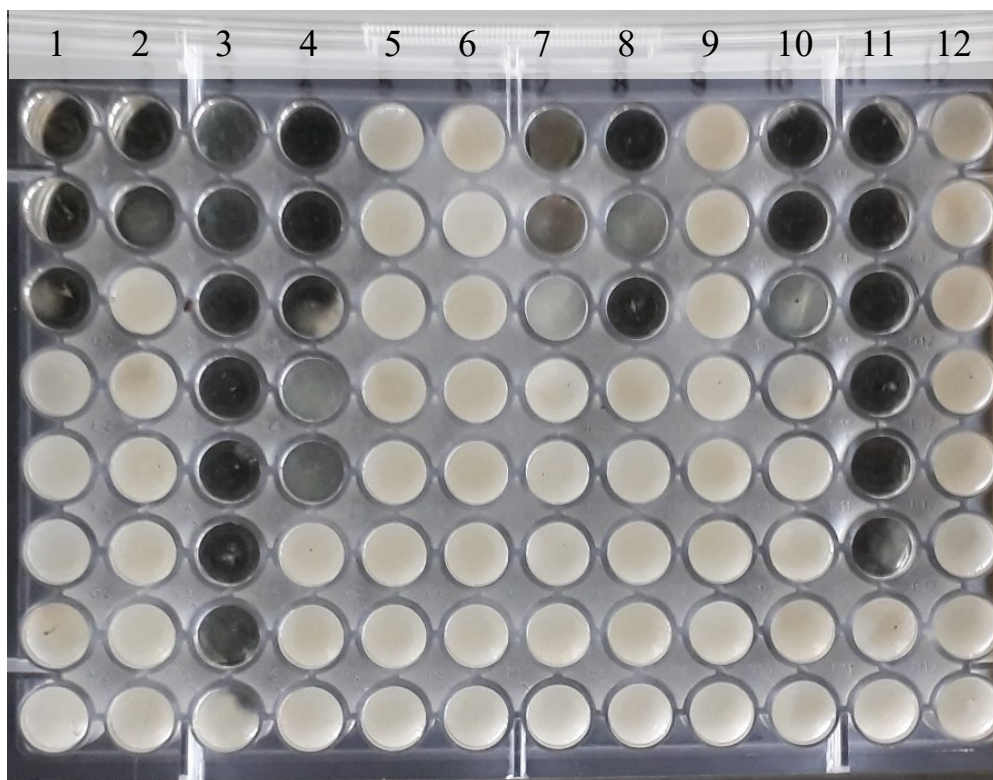
Tab. 5: Složení LB média, množství na 1 l destilované vody.

trypton	10 g
NaCl	10 g
kvasničný extrakt (HIMEDIA, Bombaj, Indie)	5 g

Byla použita mikrotitrační destička o 96 jamkách (obr. 8). Do každé jamky bylo napipetováno 150 μ l média, do 1. řady bylo navíc přidáno ještě 130 μ l téhož média. Do 1. řady bylo napipetováno 20 μ l extraktů druhů rodu *Heratomyces*– supernatantu a mycelia (4,5 mg/ml) nebo frakcí získaných kapalinovou chromatografií (2 mg/ml), v další jamce pro kontrolu byl methanol a v ostatních antimykotika pro houby a antibiotika pro bakterie. Konkrétně byla využita antimykotika cykloheximid (1,5 mg/ml v methanolu), griseofulvin (1,5 mg/ml v MeOH), amphotericin B (250 μ g/ml v MeOH) a nystatin (4,5 mg/ml v MeOH).

Pro bakterie byla jako kontrola použita antibiotika penicilin (1,5 mg/ml v MeOH) a v některých případech ciprofloxacin (1,5 mg/ml v MeOH).

Vzorky byly inkubovány v termostatu při teplotě 25 °C, třepání 120 rpm po dobu 3–7 dní (v závislosti na rychlosti růstu testované houby/bakterie). Poté byla pro jednotlivé extrakty stanovena hodnota MIC – minimální inhibiční koncentrace antimykotika, při které nebyl patrný nárůst organismu. Výsledky byly odečteny vizuálně a byla zaznamenána nejmenší koncentrace, při které nedocházelo k růstu testovaného organismu.



Obr. 8: Mikrodiluční metoda – 96-jamková destička s *Xylaria karyophthora* po 7 dnech od zaočkování houby. Testovány jednotlivé frakce získané preparací *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893 (2-10). (11) nystatin, (12) methanol pro kontrolu. Jednotlivé frakce přidány do první jamky v koncentraci 133,3 µg/ml, nystatin přidán v koncentraci 300 µg/ml. Shora dolů klesá koncentrace vždy o polovinu předchozí koncentrace. Foto: Adéla Čmoková.

3.3.1. Screening antimikrobiální aktivity třech druhů rodu *Hermatomyces* proti vybraným houbám

Testování biologické aktivity probíhalo ve třech fázích. V první fázi se testovaly tři vybrané kmeny (*H. bifurcatus* CCF 5899, *H. reticulatus* CCF 5893 a *H. sphaericus* CCF 5911) proti vybraným houbám a též proti grampozitivní (*Bacillus subtilis*) a gramnegativní bakterii (*Escherichia coli*) (tab. 6). Zpravidla se jednalo o oportunní patogeny člověka, které mohou způsobit závažné komplikace u lidí se sníženou imunitou, u HIV pozitivních nebo onkologicky nemocných pacientů. Dále byl u nich testován efekt na kontaminanty pěstíren hub (*Trichoderma aggressivum*, *T. pleuroticola*, *T. harzianum*) a v neposlední řadě na

pěstované houby samotné (*Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus*).

Tab. 6: Použité mikroorganismy k testování biologické aktivity tří druhů rodu *Hermatomyces*.

druh	taxonomické zařazení	význam
<i>Mortierella humilis</i> CCF 2688	Mortierellales, Mucoromycota	oportunní patogen člověka
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopus</i> CCF 1509	Mucorales, Mucoromycota	oportunní patogen člověka
<i>Rhizopus oryzae</i> CCF 4144	Mucorales, Mucoromycota	oportunní patogen člověka
<i>Rhizomucor pusillus</i> CCF 4094	Mucorales, Mucoromycota	oportunní patogen člověka
<i>Candida tenuis</i> MUCL 29892	Saccharomycetales, Ascomycota	oportunní patogen člověka
<i>Aspergillus felis</i> CCF 4559	Eurotiales, Ascomycota	oportunní patogen člověka
<i>Talaromyces marneffei</i> CCF 2348	Eurotiales, Ascomycota	oportunní patogen člověka
<i>Trichophyton interdigitale</i> CCF 4873	Onygenales, Ascomycota	oportunní patogen člověka
<i>Trichoderma aggressivum</i> CCF 3865	Hypocreales, Ascomycota	kontaminant pěstíren hub
<i>Trichoderma harzianum</i> CCF 2713	Hypocreales, Ascomycota	kontaminant pěstíren hub
<i>Trichoderma pleuroticola</i> CCF 4514	Hypocreales, Ascomycota	kontaminant pěstíren hub
<i>Cryptococcus neoformans</i> CCF 1081	Tremellales, Basidiomycota	oportunní patogen člověka
<i>Pleurotus ostreatus</i> (izolováno z hub koupených v supermarketu)	Agaricales, Basidiomycota	komerčně pěstovaná houba
<i>Agaricus bisporus</i> (izolováno z hub koupených v supermarketu)	Agaricales, Basidiomycota	komerčně pěstovaná houba
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	Bacteria	zástupce grampozitivní bakterie
<i>Escherichia coli</i> DSM498	Bacteria	zástupce gramnegativní bakterie

3.3.2. Antimikrobiální aktivita extraktů druhů rodu *Hermatomyces*

V druhé fázi se testovaly extrakty všech dostupných kmenů *Hermatomyces* (viz výše tab. 1) pro porovnání biologické aktivity jednotlivých kmenů mezi sebou. K tomu byly využity houby *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* a gramnegativní bakterie *Bacillus subtilis*. (Použity byly stejné kmeny jako v tab. 6).

3.3.3. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných z druhu *H. reticulatus* CCF 5893

V třetí fázi byla stanovena MIC pro jednotlivé frakce získané flash chromatografií druhu *H. reticulatus* CCF 5893, a to na *Xylaria karyophthora*, *Mucor plumbeus*, *Candida tenuis*, *Hypoxylon carneum* a *Bacillus subtilis* (tab. 7).

Tab. 7: Mikroorganismy použité k testování biologické aktivity frakcí získaných z *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893.

druh	taxonomické zařazení
<i>Candida tenuis</i> MUCL 29892	Saccharomycetales, Ascomycota
<i>Mucor plumbeus</i> MUCL 49355	Mucorales, Mucoromycota
<i>Xylaria karyophthora</i>	Hypocreales, Ascomycota
<i>Hypoxylon carneum</i> MUCL 54177	Hypocreales, Ascomycota
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	Bacteria

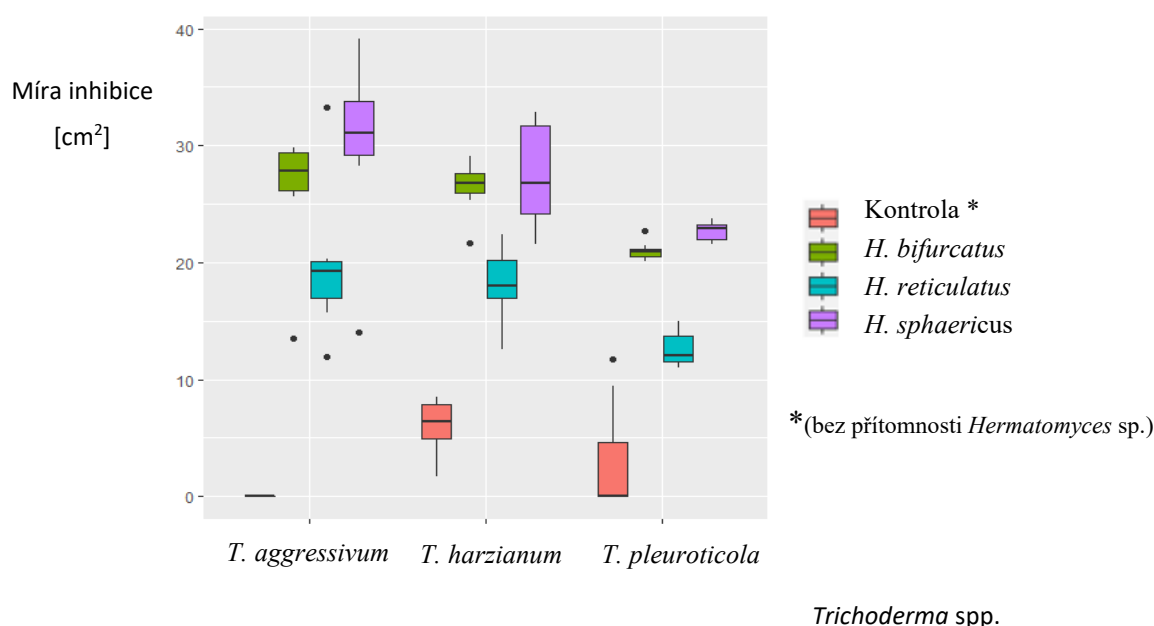
4. Výsledky

4.1. Interakce druhů na agarových plotnách

4.1.1. Interakce druhů rodu *Hermatomyces* s druhy rodu *Trichoderma*

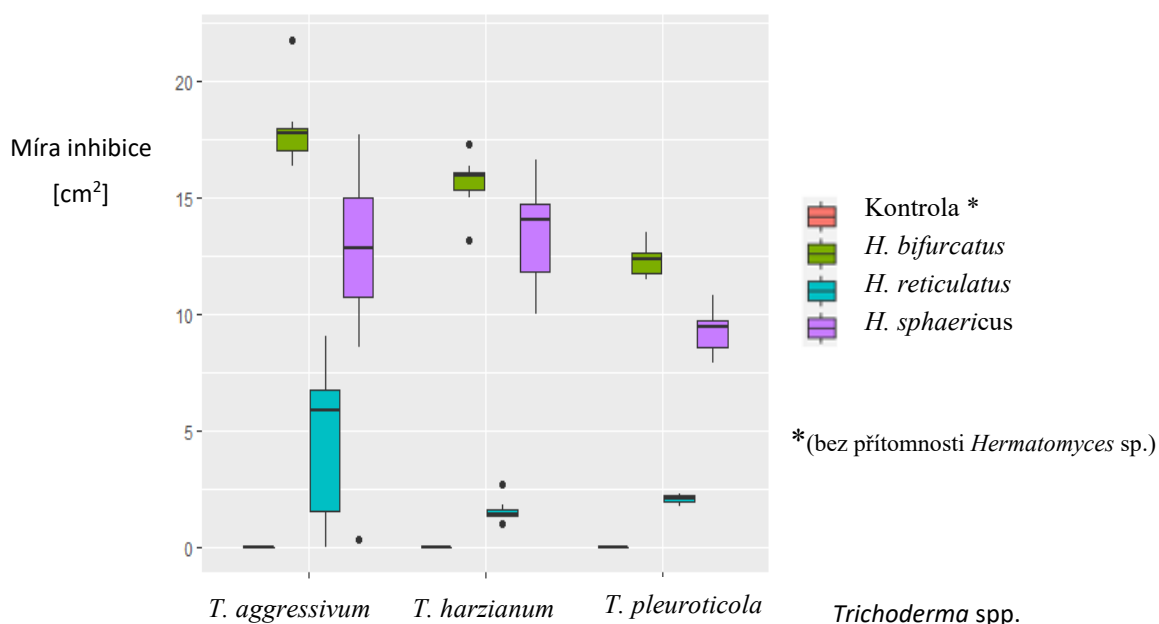
Všechny tři druhy rodu *Hermatomyces* signifikantně inhibovaly tři druhy rodu *Trichoderma* po čtyřech dnech od zaočkování druhů rodu *Trichoderma* (příloha P4). Jednotlivé druhy rodu *Hermatomyces* se v účinku od sebe navzájem významně lišily ($p = <0,0001$). Stejně tak se druhy rodu *Trichoderma* lišily v citlivosti na přítomnost rodu *Hermatomyces* ($p = <0,0001$).

Do jaké míry inhibovaly jednotlivé druhy *Hermatomyces* pozorované druhy rodu *Trichoderma* po čtyřech dnech od jejich zaočkování, je patrné z následujícího grafu (obr. 9). Nejvíce inhiboval růst druh *H. sphaericus*, zanedbatelně méně pak *H. bifurcatus* a nejméně *H. reticulatus*.



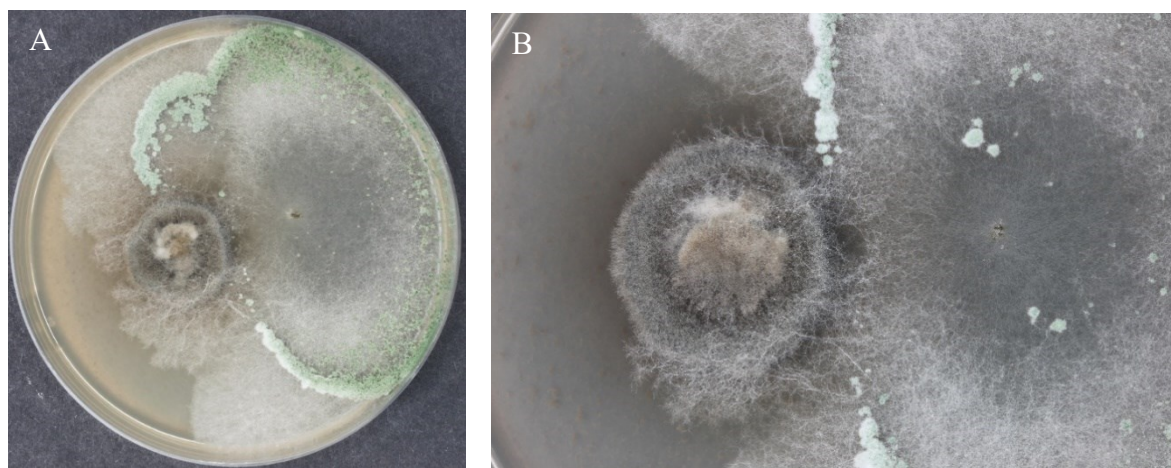
Obr. 9: Plocha misky, kterou nekolonizovaly druhy *Trichoderma aggressivum*, *T. harzianum* a *T. pleuroticola* (= míra inhibice) v přítomnosti druhů *Hermatomyces bifurcatus*, *H. reticulatus*, *H. sphaericus* a bez jejich přítomnosti (kontrola) po čtyřech dnech od zaočkování druhů rodu *Trichoderma*. 0 – zástupci rodu *Trichoderma* přerostly celou miskou.

Situaci po šesti dnech od zaočkování druhy *Trichoderma aggressivum*, *T. harzianum* a *T. pleuroticola* vykresluje graf na obr. 10 a ilustruje příloha P5. Všechny druhy rodu *Trichoderma* byly nejvíce inhibovány druhem *H. bifurcatus*, o něco slabší efekt měl *H. sphaericus*. Nejmenší inhibici pak vykazoval *H. reticulatus*, stejně jako po čtyřech dnech od zaočkování druhů rodu *Trichoderma* (viz výše).



Obr. 10: Plocha misky, kterou nekolonizovaly druhy *Trichoderma aggressivum*, *T. harzianum* a *T. pleuroticola* (= míra inhibice) v přítomnosti druhů *Hermatomyces bifurcatus*, *H. reticulatus*, *H. sphaericus* a bez jejich přítomnosti (kontrola) po šesti dnech od zaočkování druhů rodu *Trichoderma*. 0 – zástupci rodu *Trichoderma* přerostly celou misku.

Inhibice nebyla stabilní v čase. Po šesti dnech začala *T. aggressivum* přerůstat *H. sphaericus* a v některých případech i *H. reticulatus* (obr. 11).



Obr. 11: A: *Trichoderma aggressivum* (vpravo) přerůstá *Hermatomyces sphaericus* (vlevo) po šesti dnech od zaočkování *T. aggressivum*. B: Detail přerůstání

4.1.2. Zjištění přítomnosti antimikrobiálních těkavých látek

Kolonie *Trichophyton spiraliforme* a *Trichoderma harzianum* rostly na dělené misce rovnoměrně a nevykazovaly žádné ovlivnění kulturou druhu *H. reticulatus*. Velikost kolonií se shodovala s velikostí kolonií kontrol (*T. spiraliforme* a *T. harzianum* kultivované samostatně). Těkavé látky za antimikrobiální aktivitu tedy zodpovědné nejsou nebo jsou přítomny jen v minoritním množství a na inhibiční účinek mají hlavní vliv látky netěkavé.

4.2. Analýza sekundárních metabolitů

4.2.1. Určení struktury sekundárních metabolitů u *H. reticulatus* CCF 5893

4.2.1.1. Separace hrubého extraktu pomocí chromatografie

Na základě UV signálu bylo získáno celkem devět frakcí. Ty byly otestovány na biologickou aktivitu (viz kap. 4.3.3.). Z nich bylo vybráno celkem šest frakcí, u kterých byla zaznamenána inhibice mikroorganismů. Frakce č. 6 byla následně ještě rozdělena na dalších osm frakcí (A-H). Chromatogram extraktu *H. reticulatus* CCF 5893 rozděleného pomocí flash chromatografie je v příloze P6. Výtěžky a charakteristiku biologicky aktivních frakcí získaných rozdělením extraktu *H. reticulatus* CCF 5893 znázorňují tabulky 8 a 9. Jejich chromatogramy jsou v příloze P7 a P8.

Tab. 8: Vybrané biologicky aktivní frakce z *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893 získané flash chromatografií.

frakce	hmotnost (ekvivalent k % hrubého extraktu)	charakteristika
1	6,43 mg (0,43 %)	žlutá pevná látka, nerozpustná v MeOH, lehce krystalizuje v dichlormethanu
2	12,21 mg (0,81 %)	žlutooranžový olej
3	49,18 mg (3,28 %)	žlutooranžový olej
4	46,3 mg (3,09 %)	bílo-žlutooranžový prášek rozpustný v MeOH
5	61,7 mg (4,11 %)	žlutohnědý olej
6	193,53 mg (12,9 %)	tmavě hnědý olej

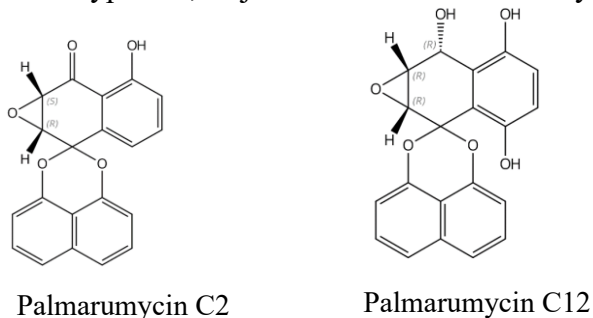
Tab. 9: Rozdělená frakce č. 6 na frakce A-H.

frakce č. 6	hmotnost (ekvivalent k % hrubého extraktu)	charakteristika
A	25,88 mg (1,72 %)	žluté čtverhranné krystalky
B	14,37 mg (0,96 %)	žluté čtverhranné krystalky
C	10,48 mg (0,70 %)	-
D	3,78 mg (0,25 %)	-
E	11,45 mg (0,76 %)	hnědočervené krystalky
F	23,18 mg (1,55 %)	hnědobílý prášek
G	11,76 mg (0,78 %)	černé krystalky
H	4,86 mg (0,32 %)	žlutý prášek

4.2.1.2. Nalezené sekundární metabolity

V druhu *H. reticulatus* CCF 5893 (ve frakcích č. 1 a č. 3) byly s využitím NMR a X-ray krystalografie nalezeny dva palmarumyciny – palmarumycin C2, známý též pod názvy deoxypreussomerin A nebo guignardin F – frakce 1, retenční čas 16 (Ai et al. 2014; Krohn et al. 1994b; Singh et al. 1994) a palmarumycin C12 – frakce 4 (obr. 12) (Krohn et al. 1994b). Sloučeninu z frakce 1 s retenčním časem 14 nebylo možné jednoznačně určit

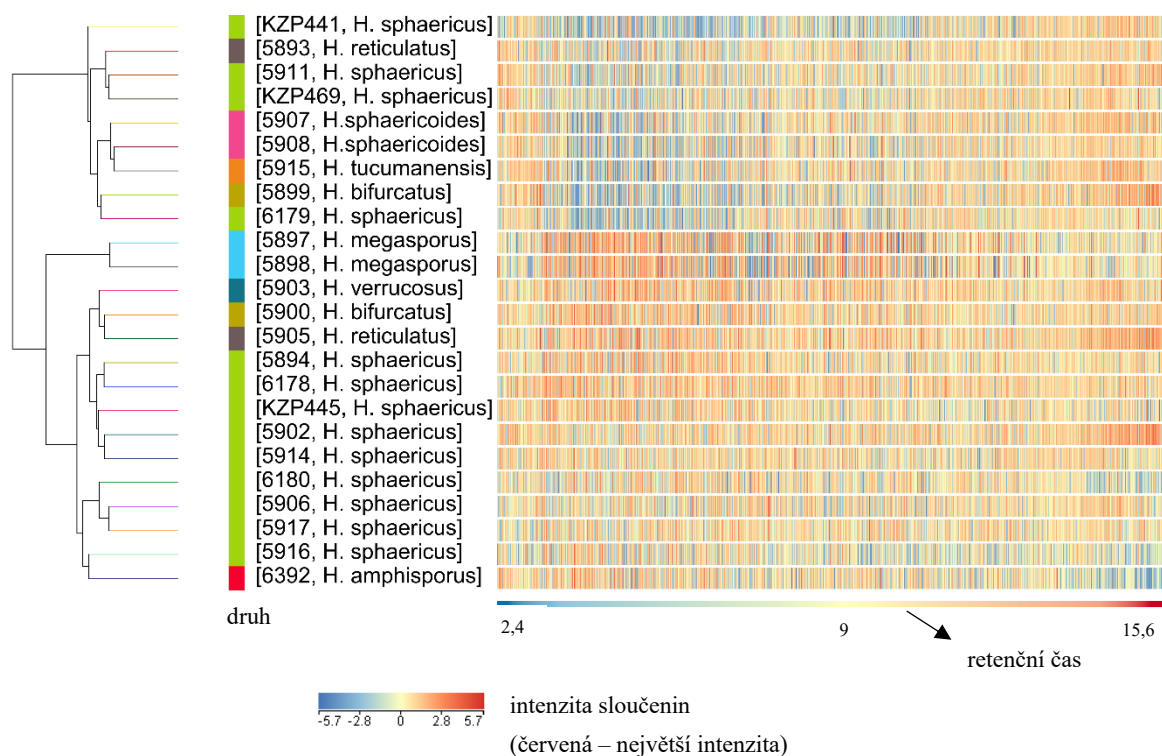
(pravděpodobně se jednalo o směs dvou sloučenin). Na základě HRMS dat byla ale vyslovena hypotéza, že jedna z těchto sloučenin by mohl být palmarumycin C3.



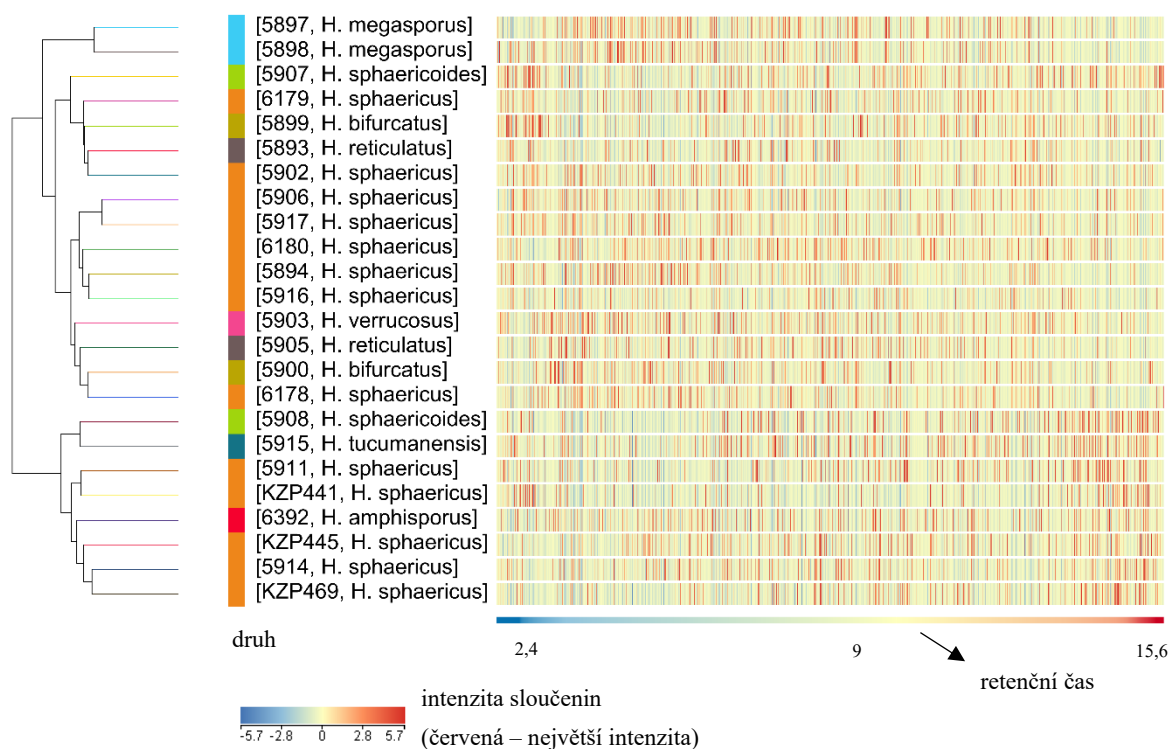
Obr. 12: Identifikované sloučeniny z *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893.

4.2.4. Diverzita produkovaných metabolitů

Porovnání jednotlivých kmenů na základě produkce sekundárních metabolitů znázorňují obr. 13 (v pozitivním módu) a 14 (v negativním módu). Zprůměrovány byly hodnoty mycelia a supernatantu. Některé látky jsou totiž produkovány jen v myceliu, jiné v supernatantu a mnoho z nich je společných. Zprůměrováním látek z mycelia a supernatantu vzniká ucelenější obraz sekundárních metabolitů daného kmene.

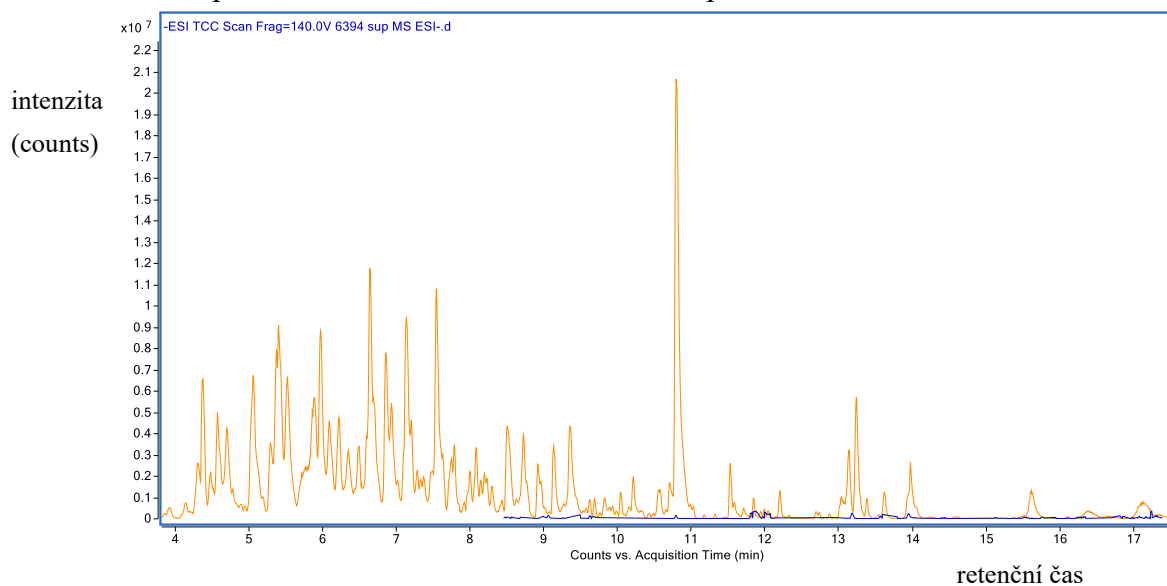


Obr. 13: Dendrogram hierarchické shlukové analýzy jednotlivých kmenů rodu *Hermatomyces* sestavený na základě podobnosti sekundárních metabolitů v pozitivním MS módu. Zprůměrovány mycelium a supernatant. Analyzovány píky intenzity větší než 15 000 countů. Snížená signifikantnost vysokých píků pomocí funkce PARETO. Jednotlivé metabolity seřazeny na základě retenčního času.



Obr. 14: Dendrogram hierarchické shlukové analýzy jednotlivých kmenů rodu *Hermatomyces* sestavený na základě podobnosti sekundárních metabolitů v negativním MS módu. Zprůměrované mycelium a supernatant. Analyzovány píky intenzity větší než 15 000 countů. Snížená signifikantnost vysokých píků pomocí funkce PARETO. Jednotlivé metabolity seřazeny na základě retenčního času.

Do analýzy nebyl zahrnut kmen *H. amphisorus* CCF 6394. Supernatant byl totiž velmi podobný blanku a neprodukoval téměř žádné sekundární metabolity ve srovnání se supernatantem *H. amphisorus* 6392 (obr. 15). Pravděpodobně byla provedena špatná extrakce nebo špatné nasátí vzorku do hmotnostního spektrometru.



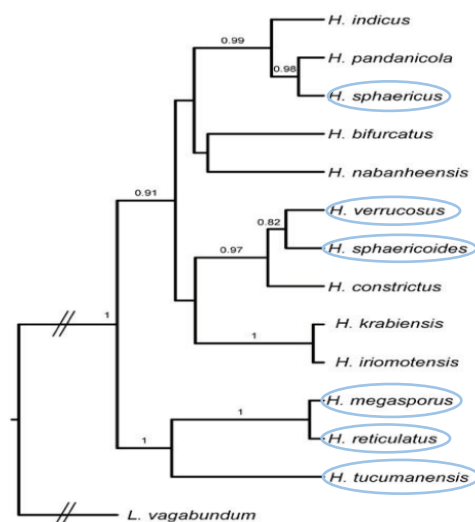
Obr. 15: Srovnání supernatantu *H. amphisorus* 6392 (žlutě) a *H. amphisorus* 6394 (modře).

Produkce sekundárních metabolitů se v rámci jednoho druhu lišila (především u *H. reticulatus*, *H. bifurcatus* a *H. sphaericus*). Při pozitivní i negativní ionizaci se spolu seskupoval *H. megasporus*. Tento druh produkoval unikátní látky, které jiné druhy neprodukovaly (v pozitivním módu bylo těchto látek 27, v negativním módu 358). Protože byly u tohoto druhu zkoumány dva kmeny, byly porovnány dvojice různých kmenů mezi sebou (tab. 10). Při porovnání jednotlivých druhů by totiž mohlo dojít k chybné interpretaci způsobené použitím odlišných počtů kmenů (je totiž pravděpodobnější, že spolu budou mít více společných látek dva kmeny než kmenů 13).

Tab. 10: Porovnání vybraných dvojic kmenů ukazující unikátní látky, které se vyskytují jen v daných kmenech. Porovnáváno celkem 23 kmenů. Do analýzy nebyl zahrnut *H. sphaericus* KZP 469 a *H. amphispurus* CCF 6394 z důvodu nemožnosti porovnávat v programu Mass Profiler Professional více než 23 kmenů. Jednotlivé druhy *H. sphaericus* měly 0 až 56 unikátních látek v pozitivním módu, v negativním módu bylo těchto látek pouze 0-2. V této tabulce jsou zobrazeny jen vybrané kombinace *H. sphaericus* s hraničními hodnotami.

	počet unikátních látek pro tuto kombinaci v negativním módu	počet unikátních látek pro tuto kombinaci v pozitivním módu
<i>H. megasporus</i> CCF 5897 x <i>H. megasporus</i> CCF 5898	358	27
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5907 x <i>H. sphaericoides</i> CCF 5908	14	0
<i>H. reticulatus</i> CCF 5893 x <i>H. reticulatus</i> CCF 5905	11	0
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5899 x <i>H. bifurcatus</i> CCF 5900	3	0
<i>H. sphaericus</i> CCF 5906 x <i>H. sphaericus</i> CCF 5907	56	0
<i>H. sphaericus</i> CCF 5917 x <i>H. sphaericus</i> CCF 6180	0	0

Seskupení kmenů na základě produkce sekundárních metabolitů nekoreluje s fylogramem sestaveným na základě čtyř molekulárních markerů na obr. 16. Nicméně pro zjištění vzájemné metabolické příbuznosti druhů by bylo potřeba využít více kmenů (od druhů *H. tucumanensis* a *H. verrucosus* a v této analýze i od *H. amphispurus* byl využit pouze jeden kmen).



Obr. 16: Příbuznost druhů rodu *Hermatomyces* na základě molekulárních dat (úseky SSU, ITS, LSU, EF1- α a β -TUB). Modře zakroužkované linie byly zkoumané v této diplomové práci. Převzato a upraveno z: Koukol et al. (2018).

4.3. Biologická aktivita

4.3.1. Screening antimikrobiální aktivity třech druhů rodu *Hermatomyces* proti vybraným houbám

Screening na různé patogeny člověka z říše hub ukázal, že některé druhy hub nebyly extrakty druhů rodu *Hermatomyces* inhibovány (*Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus oryzae*, *Agaricus bisporus*), jiné naopak vykazovaly lepší antifungální aktivitu než testovaná antimykotika (*Rhizomucor pusillus*, *Mortierella humilis*) (tab. 11). Ve většině případů nejvíce inhiboval extrakt z mycelia *H. sphaericus* CCF 5911.

Míra inhibice na druhy rodu *Trichoderma* se lišila v závislosti na druhu. Na růst druhu *T. aggressivum* antimykotika (griseofulvin, cykloheximid) neměla žádný vliv, a to ani při nejvyšší testované koncentraci. Extrakty zástupců rodu *Hermatomyces* růst *T. aggressivum* inhibovaly, ale jen opravdu minimálně (MIC <300 μ g/ml). *T. pleuroticola* byla inhibována zkoumanými extrakty více. Minimální inhibiční koncentrace mycelia *H. sphaericus* byla u *T. pleuroticola* 75 μ g/ml a druhou nejvyšší inhibici vykazovalo mycelium *H. bifurcatus*, které se k hodnotě MIC 75 μ g/ml blížilo. *T. harzianum* byla inhibována ze všech testovaných druhů rodu *Trichoderma* nejvíce. Hodnoty MIC se blížily až k 37,5 μ g/ml.

Žampion (*Agaricus bisporus*) nebyl extrakty druhů rodu *Hermatomyces* téměř vůbec ovlivněn, naopak u hlívy (*Pleurotus ostreatus*) byly extrakty účinné při koncentraci >6,25 μ g/ml. Extrakty druhů rodu *Hermatomyces* inhibovaly při koncentraci >2,34 μ g/ml grampozitivní bakterii *Bacillus subtilis*, nikoliv však gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, a to ani při nejvyšší testované koncentraci. Extrakty z mycelia vykazovaly obecně vyšší aktivitu než extrakt ze supernatantu.

Tab.11: Minimální inhibiční koncentrace (MIC) extraktů druhů rodu *Hermatomyces* proti vybraným mikroorganismům. V µg/ml. Extrakty přidávány v koncentraci 4,5 mg/ml. AF: *Aspergillus felis*, RO: *Rhizopus oryzae*, TI: *Trichophyton interdigitale*, RP: *Rhizomucor pusillus*, RM: *Rhizopus microsporus* var. *rhizopus*, TM: *Talaromyces marneffei*, CT: *Candida tenuis*, CN: *Cryptococcus neoformans*, MH: *Mortierella humilis*, TA: *Trichoderma aggressivum*, TH: *Trichoderma harzianum*, TP: *Trichoderma pleuroticola*, PO: *Pleurotus ostreatus*, AB: *Agaricus bisporus*, EC: *Escherichia coli*, BC: *Bacillus subtilis*, myc: mycelium, sup: supernatant.



nejnižší koncentrace

nejvyšší koncentrace

	AF	RO	TI	RP	RM	TM	CT	CN	MH	TA	TH	TP	PO	AB	EC	BS
<i>H. bifurcatus</i> myc	37,5	x	9,38	7,04	225	75	37,5	x	9,38	>300	75	112,5	56,25	x	x	9,38
<i>H. bifurcatus</i> sup	75	>300	37,5	14,06	225	75	75	x	9,38	300	75	150	37,5	x	x	2,34
<i>H. reticulatus</i> myc	300	x	150	56,25	>300	300	300	x	18,75	>300	75	150	6,25	>300	x	4,69
<i>H. reticulatus</i> sup	300	x	150	112,5	>300	300	300	x	37,5	>300	75	300	56,25	>300	x	9,38
<i>H. sphaericus</i> myc	37,5	x	9,38	3,51	225	37,5	18,75	x	2,34	>300	56,25	75	225	x	x	6,25
<i>H. sphaericus</i> sup	150	>300	37,5	14,06	225	150	75	x	9,38	>300	75	300	75	x	x	9,38
cykloheximid	x	25	x	9,38	>100	50	1,56	6,25	12,5	x	18,75	100	x	50	-	-
griseofulvin	x	x	6,25	100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	>300	-	-
amphotericin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	3,12	-	-
penicilin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	1,56
ciprofloxacin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,56	-
methanol (kontrola)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

4.3.2. Antimikrobiální aktivita extraktů druhů rodu *Hermatomyces*

Porovnání minimální inhibiční koncentrace jednotlivých kmenů rodu *Hermatomyces* ukazuje tab.12. I zde převládal trend, že extrakty z mycelia byly efektivnější než extrakty ze supernatantu. Nejlépe inhiboval *H. megasporus*, nejhůře pak *H. sphaericoides*. Jednotlivé kmeny *H. sphaericus* se mezi sebou v míře inhibice hodně lišily.

Tab. 12: Porovnání minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých kmenů rodu *Hermatomyces* na *Bacillus subtilis*, *Pleurotus ostreatus* a *Trichoderma harzianum*. V µg/ml. (-): nepozorováno.



nejnižší koncentrace

nejvyšší koncentrace

kmen	mycelium/ supernatant	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>H. amphisorus</i> CCF 6392	mycelium	9,38	150	37,5
<i>H. amphisorus</i> CCF 6392	supernatant	4,69	300	300
<i>H. amphisorus</i> CCF 6394	mycelium	7,03	9,38	18,75
<i>H. amphisorus</i> CCF 6394	supernatant	18,75	37,5	150
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5899	mycelium	37,5	>300	9,38
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5899	supernatant	x	>300	37,5
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5900	mycelium	37,5	300	4,69
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5900	supernatant	18,75	56,25	9,38
<i>H. megasporus</i> CCF 5897	mycelium	2,34	4,69	18,75
<i>H. megasporus</i> CCF 5897	supernatant	2,34	7,03	37,5
<i>H. megasporus</i> CCF 5898	mycelium	2,34	9,38	4,69
<i>H. megasporus</i> CCF 5898	supernatant	2,34	37,5	150
<i>H. reticulatus</i> CCF 5893	mycelium	37,5	300	9,38
<i>H. reticulatus</i> CCF 5893	supernatant	300	300	75
<i>H. reticulatus</i> CCF 5905	mycelium	9,38	4,69	18,75
<i>H. reticulatus</i> CCF 5905	supernatant	150	225	37,5
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5907	mycelium	x	>300	75
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5907	supernatant	x	>300	300
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5908	mycelium	300	>300	300
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5908	supernatant	x	>300	150
<i>H. sphaericus</i> CCF 5894	mycelium	2,34	75	4,69
<i>H. sphaericus</i> CCF 5894	supernatant	2,34	75	37,5
<i>H. sphaericus</i> CCF 5902	mycelium	37,5	300	4,69
<i>H. sphaericus</i> CCF 5902	supernatant	75	150	37,5
<i>H. sphaericus</i> CCF 5906	mycelium	4,69	>300	2,34
<i>H. sphaericus</i> CCF 5906	supernatant	300	>300	37,5
<i>H. sphaericus</i> CCF 5911	mycelium	300	>300	75

kmen	mycelium/ supernatant	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>H. sphaericus</i> CCF 5911	supernatant	225	>300	75
<i>H. sphaericus</i> CCF 5914	mycelium	14,06	300	4,69
<i>H. sphaericus</i> CCF 5914	supernatant	14,06	150	56,25
<i>H. sphaericus</i> CCF 5916	mycelium	7,03	150	4,69
<i>H. sphaericus</i> CCF 5916	supernatant	4,69	225	56,25
<i>H. sphaericus</i> CCF 5917	mycelium	56,25	>300	2,34
<i>H. sphaericus</i> CCF 5917	supernatant	56,25	300	14,06
<i>H. sphaericus</i> CCF 6178	mycelium	75	>300	18,75
<i>H. sphaericus</i> CCF 6178	supernatant	112,5	300	37,5
<i>H. sphaericus</i> CCF 6179	mycelium	x	>300	4,69
<i>H. sphaericus</i> CCF 6179	supernatant	x	>300	2,34
<i>H. sphaericus</i> CCF 6180	mycelium	18,75	18,75	14,06
<i>H. sphaericus</i> CCF 6180	supernatant	18,75	37,5	37,5
<i>H. sphaericus</i> KZP 441	mycelium	150	x	150
<i>H. sphaericus</i> KZP 441	supernatant	x	x	x
<i>H. sphaericus</i> KZP 445	mycelium	9,38	225	2,34
<i>H. sphaericus</i> KZP 445	supernatant	18,75	300	9,38
<i>H. sphaericus</i> KZP 469	mycelium	-	>300	37,5
<i>H. sphaericus</i> KZP 469	supernatant	-	>300	37,5
<i>H. tucumanensis</i> CCF 5915	mycelium	x	>300	37,5
<i>H. tucumanensis</i> CCF 5915	supernatant	300	>300	14,06
<i>H. verrucosus</i> CCF 5903	mycelium	18,75	56,25	18,75
<i>H. verrucosus</i> CCF 5903	supernatant	75	150	300
penicilin		x	-	-
amphotericin B		-	3,13	16,66
methanol		x	x	x

4.3.3. Antimikrobiální aktivita frakcí získaných z druhu *H. reticulatus* CCF 5893

Minimální inhibiční koncentrace jednotlivých frakcí získaných preparací extraktu z *H. reticulatus* CCF 5893 jsou zobrazeny v tab. 13. Frakce 1-6 vykazovaly antimikrobiální aktivitu. Zvláště pak frakce 1-3 vykazovaly vysoký inhibiční účinek na testované mikroorganismy. Frakce 7-9 naopak nebyly proti houbám a bakterií vůbec účinné, proto se s nimi dále nepracovalo. (Výtěžky a charakteristika vybraných biologicky aktivních frakcí jsou v kap. 4.2.1.1).

5. Diskuse

5.1. Párovací pokusy

Umělá média dávají jedinečnou možnost pozorovat mikroorganismy v přesně definovaných podmínkách (Crowther et al. 2018). Sice nejsou schopna zcela replikovat podmínky v přírodě (tam je vysoká heterogenita v přírodních zdrojích), ale mohou i přesto pomoci identifikovat důležité mechanismy v ekologii hub (Crowther et al. 2018). Cennou informací o tom, jak na sebe organismy působí, mohou podat párovací pokusy na miskách s agarovým médiem. Nicméně výsledky z nich nemusejí být vždy spolehlivé z následujících důvodů.

a) Po určité době všechny druhy rodu *Trichoderma* přerostly celou misku i samotné zástupce rodu *Hermatomyces*, a kdyby se výsledky odečítaly po delší době, mohlo by se zdát, že k žádné inhibici nedocházelo. Přitom ale testováním extraktů druhů rodu *Hermatomyces* bylo v této práci zjištěno, že rod *Hermatomyces* opravdu produkuje látky inhibující růst dalších mikroorganismů.

b) Zástupci rodu *Trichoderma* produkují také široké spektrum sekundárních metabolitů s antifungálními účinky (Zin & Badaluddin 2020), které mohou ovlivnit druhy rodu *Hermatomyces* tak, že potlačí jeho růst, a tedy nebude detekována produkce antimikrobiálních látek rodem *Hermatomyces*.

c) Na produkci sekundárních metabolitů, a tedy i na interakci mezi organismy, může mít vliv také typ použitého média (Pu et al. 2013). Např. produkce palmarumycinu C2, který byl v této studii objeven a vykazuje antifungální účinky, může být zvýšena přidáním 1-hexadecenu do média. Alkany a alkeny totiž mohou fungovat jako vektor kyslíku, a tak zvyšovat tvorbu těchto sloučenin (Mou 2015).

d) V tom, kdo vyhraje boj o místo na agarové plotně, budou hrát roli kromě sekundárních metabolitů i další faktory jako rychlost růstu organismu či míra schopnosti využívat živiny ze substrátu/média.

5.2. Další látky, které by mohl rod *Hermatomyces* produkovat

V této práci bylo zjištěno, že rod *Hermatomyces* produkuje palmarumyciny, konkrétně palmarumycin C2 a palmarumycin C12. Palmarumyciny vznikají polyketidovou (acetát-malonátovou) cestou a jejich biosyntéza je navzájem provázána (Bode & Zeeck 2000).

Je pravděpodobné, že rod *Hermatomyces* bude produkovat kromě nalezených látek i další sloučeniny z této skupiny (viz příloha P3). Palmarumycin C2 totiž může vznikat epoxidací palmarumycinu CP1. Oxidací palmarumycinu C2 vzniká palmarumycin C3. Redukcí palmarumycinu C3 se pak tvoří palmarumycin C12. Jeho epoxidace dává vznik palmarumycinu C13 (Bode & Zeeck 2000).

5.3. Nově nalezené látky a jejich využití v chemotaxonomii

Palmarumyciny byly nalezeny i u příbuzných rodů *Ulospora* a *Anteaglonium*. Je tedy možné, že produkce těchto metabolitů souvisí s fylogenezí – příbuzné druhy mohou mít podobný metabolismus. Nicméně palmarumyciny se vyskytují v různých skupinách hub. Kromě řádu Pleosporales (Kanehara et al. 2021; Martínez-Luis et al. 2008) jsou známy i z dalších řádů jako Botryosphaeriales (Ai et al. 2014; Chu et al. 1994c; Lü et al. 2014), Tubeufiales (Hu et al. 2006), Patellariales (Pudhom & Teerawatananon 2014), Sphaeropsidales (Bode et al. 2000), Hypocreales (Mou et al. 2013) nebo Helotiales (Song et al. 2022).

Palmarumyciny byly izolovány také z rostlin, a to z afzérie *Afzelia bipendensis* (*Caesalpiniaceae*) (Kouam et al. 1993), dávivce *Jatropha curcas* (*Euphorbiaceae*) (Ravindranath et al. 2004), tomele *Diospyros ehretioides* (*Ebenaceae*) (Prajoubklang et al. 2005) a ze semen kulčiby *Strychnos angustiflora* (*Loganiaceae*) (Jiang et al. 2016). Ravindranath et al. (2004) se kvůli vysokému obsahu palmarumycinů v rostlině, klonili k názoru, že se jedná o rostlinné metabolity, nicméně chemotaxonomie nasvědčuje tomu, že půjde pravděpodobně o látky produkované endofytními či epifytickými houbami, které kolonizují rostlinu (Zhou et al. 2010). Toto tvrzení podporuje i zjištění, že palmarumyciny izolované z ovoce tomele *D. ehretioides* se nenašly v čerstvém ovoci, nýbrž jen v ovoci sušeném, na kterém se mohou vyskytovat houby (Prajoubklang et al. 2005). I když není běžné nalézat stejné metabolity u hub a rostlin (Bills & Gloer 2017), zůstává stále otázkou, zda palmarumyciny indikují přítomnost hub nebo ne. Tato skupina pravděpodobně nebude moci být využita v chemotaxonomii k odlišení rodů nebo řádů, protože tyto metabolity se vyskytují napříč různými rody a řády (viz výše). Rovněž tyto sloučeniny nebudou s velkou pravděpodobností moci být využity k odlišení jednotlivých druhů, poněvadž jejich biosyntéza je provázaná (Bode & Zeeck 2000).

Nicméně je možné, že jejich produkce souvisí s ekologií druhu. Palmarumyciny se totiž vyskytují často u endofytních a saprotrofních hub. Např. palmarumycin C2, který byl v této práci identifikován, byl izolován z endofytů *Coniothyrium* sp. (Pleosporales) (Krohn et al. 1994b), *Guignardia* sp. (Botryosphaeriales) (Ai et al. 2014), *Berkleasium* sp. (Hypocreales) (Mou et al. 2013), z endofytní houby patřící do řádu *Sphaeropsidales* (Bode et al. 2000) a ze saprotrofní houby rozkládající prasečí trus (Singh et al. 1994). Endofytní houby kolonizují mezibuněčné prostory rostlinných pletiv a nezpůsobují symptomy napadení (Wani et al. 2015). S rostlinou žijí v mutualistickém vztahu – rostlina poskytuje houbě živiny a endofytní houba podporuje růst rostliny a chrání rostlinu před patogeny či herbivory, a to právě díky sekundárním metabolitům, které produkuje (Martinez-Klimova et

al. 2017). Navíc mohou být endofyty po odumření rostliny prvními kolonizátory substrátu, a tak získávat výhodu nad konkurenčními organismy (Cline et al. 2018).

Druhy rodu *Hermatomyces* byly izolovány z tlejícího rostlinného materiálu, který byl kolonizován dalšími mikroorganismy. Sekundární metabolity hrají u saprotrofů důležitou roli v boji proti konkurenčním mikroorganismům, které by chtěly stejnou perspektivní niku rovněž osídlit (Birkemoe et al. 2021).

5.4. Diverzita produkovaných metabolitů

V této práci bylo zjištěno, že se metabolity v rámci jednoho druhu liší. Příkladem může být *H. sphaericus*, u kterého se jednotlivé kmeny seskupovaly s různými dalšími druhy, a byly si tedy metabolicky blíže s jinými druhy než uvnitř druhu. Produkce sekundárních metabolitů závisí na mnoha faktorech (např. na teplotě, osvětlení, pH, médiu, přítomnosti kyslíku, tvorbě biofilmu, přítomnosti dalších organismů nebo na tom, zda byla kultura třepaná nebo ne (Bode et al. 2000; Brakhage 2012; Pu et al. 2013). Tyto výše zmíněné faktory pravděpodobně ale neměly na různost metabolitů v rámci jednoho druhu vliv nebo měly účinek jen minoritní. Kmeny totiž byly kultivovány ve stejném médiu, při stejném osvětlení, teplotě, třepání a měly stejný přístup kyslíku.

Čím je odlišnost produkce metabolitů v rámci druhu způsobená, není jasné. Stejně druhy budou mít pravděpodobně tutéž genetickou výbavu pro produkci sekundárních metabolitů, nicméně ne všechny geny musí být exprimovány. U hub existují klastry genů, které jsou často umlčené (tzv. silent genes) a nedávají vznik žádným látkám (Hertweck 2009). Mohou být aktivovány nějakým vnějším stimulem, např. živinami (Sarkar et al. 2012), signálními molekulami (Baral et al. 2018), enviromentálními podněty nebo mikrobiální interakcí (Brakhage & Schroeckh 2011).

Část variability sekundárních metabolitů by bylo možné vysvětlit odlišnostmi v pH. Hodnota pH totiž ovlivňuje, jaké metabolity houby produkují (Tudor et al. 2013). Na začátku kultivace mělo médium pro všechny zkoumané kmeny stejné pH. Zjištěné pH před extrakcí se ale velmi lišilo (příloha P1). Např. u *H. sphaericus* bylo pH v rozmezí od 4,28 do 7,80. Rozdílné pH bylo způsobeno odlišnou produkcí metabolitů a vzniklé pH mohlo ovlivnit produkci dalších látek.

Jednotlivé metabolity se navíc mohou přeměňovat na různé izoformy a rovněž se rozpadat na fragmenty. Hmotnostní spektrometr zaznamenával velice citlivě všechny tyto sloučeniny. Mnohé kmeny mohou mít v sobě také mykoviry, které mohou ovlivňovat produkci sekundárních metabolitů (Ninomiya et al. 2020). Nicméně všechna tyto výše zmíněná vysvětlení objasňují pravděpodobně jen určitou část variability, a tak čím jsou rozdíly v metabolismu způsobeny, zůstává otázkou.

5.5. Biologická aktivita

Testování minimálních inhibičních koncentrací proti různým mikroorganismům potvrdilo antifungální aktivitu zjištěnou párovacími pokusy. Výsledky párovacích pokusů korelují s analýzou MIC extraktů – *H. sphaericus* a *H. bifurcatus* působí větší inhibici než *H. reticulatus*.

Extrakty vybraných druhů rodu *Hermatomyces* inhibovaly jak druhy rodu *Trichoderma*, tak hlivu ústřičnou (*Pleurotus ostreatus*), proto s největší pravděpodobností druhy rodu *Hermatomyces* neprodukují selektivní látky, které by se daly využít v boji proti druhům rodu *Trichoderma* v pěstírnách hlivy. Zvláště efektivní byly tyto extrakty vůči některým zástupcům způsobující oportunní mukormykózy (*Rhizomucor pusillus*, *Mortierella humilis*), které jsou na mnohá antimykotika rezistentní (Peixoto et al. 2017) a které působí mimo jiné i komplikaci u COVID pozitivních pacientů (Banerjee et al. 2021). Produkované metabolity by tedy možná mohly být kandidáty na nová léčiva na tato onemocnění.

Obecně byly extrakty získané z mycelia efektivnější než sekundární metabolity extrahované do supernatantu. Zda má vyšší antimikrobiální aktivitu mycelium nebo supernatant, se liší druh od druhu. Např. extrakt ze supernatantu druhu *Trichoderma reesei* vykazoval vyšší účinek než extrakt z mycelia (Samirana et al. 2021). Naopak myceliální extrakty několika různých hub z oddělení Basidiomycota kultivovaných v YMG médiu (kvasničný a maltový extrakt s glukózou) byly proti *Bacillus subtilis* účinnější než ze supernatantu (Sum et al. 2019). Antimikrobiální látky mohou mít tedy různou povahu, ty, co jsou stabilní ve vodě, se koncentrují v supernatantu, naopak ty, co jsou nerozpustné ve vodě, jsou nacházeny více v myceliu. Za inhibiční účinek byly v párovacích pokusech zodpovědné metabolity vylučované do média a tedy ty, které byly pozorovány v supernatantu.

Kromě antimikrobiálních účinků bude mít rod *Hermatomyces* pravděpodobně rovněž účinky cytotoxické. V druhu *H. reticulatus* nově nalezený palmarumycin C2 inhiboval farnesyl-protein transferasu, enzym zodpovědný za farnesylyaci peptidu Ras (p21), která je jedním z klíčových procesů pro tvorbu nádoru (Singh et al. 1994).

5.6. Výhledy do budoucna

U sekundárních metabolitů rodu *Hermatomyces* je stále prostor pro další výzkum. Zjištěné hodnoty minimální inhibiční koncentrace by mohly být analyzovány spolu s daty z hmotnostního spektrometru a mohlo by se tak zjistit, které skupiny látek by mohly být zodpovědné za antimikrobiální aktivitu. Tyto látky by bylo pak možné identifikovat stejnými metodami, jimiž byla v této práci zjištěna přítomnost palmarumycinů C2 a C12. Další možností identifikace by bylo vytipované sloučeniny (viz výše) porovnat s vytvořenou

knihovnou palmarumycinů (příloha P3). Na základě hmoty a UV spekter zjištěné hmotnostním spektrometrem totiž lze nepřímo identifikovat sloučeniny (El-Elimat et al. 2013).

Z většiny biologicky aktivních frakcí získaných z *H. reticulatus* CCF 5893 nebylo možné získat čisté látky z důvodu přítomnosti mnoha dalších sloučenin, které zabraňovaly snadnému oddělení látek. Dalším směrem, kterým by se výzkum antimikrobiálních látek tohoto rodu mohl ubírat, by bylo nalézt metabolity z frakcí *H. reticulatus* CCF 5893, které vykazovaly antimikrobiální účinky, v dalších kmenech a ze všech zástupců vybrat ten, kde je možné tyto látky snáze oddělit. Tento kmen pak extrahovat, rozdělit pomocí HPLC, dané látky purifikovat a určit pomocí NMR (případně pak s využitím X-ray krystalografie a HRMS dat).

Nejefektivnějším inhibitorem (ve srovnání s dalšími druhy viz kap. 4.3.2.) byl druh *H. megasporus*. Ten zároveň produkoval unikátní látky, které jiné druhy neprodukovaly. Tento druh skýtá pro další výzkum největší potenciál pro objev nových antimikrobiálních látek. Zároveň by zjištění unikátních látek tohoto druhu mohlo být využito k chemotaxonomii.

6. Závěr

V této práci byly ověřeny antifungální vlastnosti celkem 25 kmenů rodu *Hermatomyces*. Párovací pokusy ukázaly inhibiční aktivitu vybraných druhů rodu *Hermatomyces* na druhy rodu *Trichoderma*. Tato inhibice byla potvrzena testováním minimálních inhibičních koncentrací extraktů z vybraných druhů rodu *Hermatomyces*. Extrakty získané z mycelia vykazovaly lepší antimikrobiální účinky než extrakty ze supernatantu.

Pomocí HPLC, NMR a X-ray krystalografie se podařilo u kmene *H. reticulatus* CCF 5893 identifikovat dvě sloučeniny – palmarumyciny C2 a C12, u nichž je známá antimikrobiální aktivita. HRMS data ukazují, že *H. reticulatus* by mohl produkovat také palmarumycin C3. Tím, že syntéza palmarumycinů je provázaná (Bode & Zeeck 2000), lze předpokládat, že by druhy tohoto rodu mohly produkovat další tyto sloučeniny. Z toho důvodu jsem vytvořila databázi palmarumycinů s jejich vypočítanou hmotou a UV spektry (příloha P3), která v budoucnu může sloužit k jejich identifikaci. Palmarumyciny by mohly být skupinou látek, která způsobuje inhibiční účinky pozorované v párovacích pokusech. Jaké další antimikrobiální látky druhy rodu *Hermatomyces* produkují, zůstává předmětem pro další výzkum.

Na základě produkce sekundárních metabolitů (HRMS dat) bylo porovnáno celkem 25 kmenů rodu *Hermatomyces*. Ze vzájemného porovnání jsem zjistila, že *H. megasporus* produkuje nejvíce unikátních látek pro svůj druh a zároveň testováním minimální inhibiční koncentrace na organismy rodů *Trichoderma*, *Pleurotus* a *Bacillus* jsem odhalila, že inhibuje nejefektivněji ze všech testovaných druhů rodu *Hermatomyces*. Druhy *H. sphaericus*, *H. bifurcatus* a *H. reticulatus* se na základě sekundárních metabolitů spolu neseskupovaly. Část variability sekundárních metabolitů může být vysvětlena přítomností mykovirů, rozpadem metabolitů na fragmenty, či odlišnostmi vniklými odlišným pH, nicméně stále není jasné, čím je tato různorodost metabolitů v rámci jednoho druhu způsobená. Seskupení kmenů na základě produkce sekundárních metabolitů nekorelovalo s fylogenetickými daty.

Extrakty vybraných druhů rodu *Hermatomyces* působily značně efektivně na některé druhy způsobující mukormykózy (*Rhizomucor pusillus*, *Mortierella humilis*), jež jsou v dnešní době kvůli časté rezistenci ke stávajícím antimykotikům velmi nebezpečné (Peixoto et al. 2014; Troiano & Nante 2022). Navíc palmarumyciny a jejich analogy jsou látkami skýtajícími potenciál pro léčbu nádorových onemocnění (Kornienko et al. 2015). Z výše zmíněných důvodů jsou sekundární metabolity tohoto rodu perspektivní pro další výzkum.

7. Reference

- Ai W, Wei X, Lin X, Sheng L, Wang Z, et al. 2014. Guignardins A-F, spirodioxynaphthalenes from the endophytic fungus *Guignardia* sp. KcF8 as a new class of PTP1B and SIRT1 inhibitors. *Tetrahedron*. 70(35):5806–14
- Alias SA, Jones EBG. 2000. Colonization of mangrove wood by marine fungi at Kuala Selangor mangrove stand, Malaysia. *Fungal Divers*. 5:9–21
- Andersen B, Nielsen KF, Jarvis BB, Andersen B, Nielsen KF, et al. 2017. Characterization of *Stachybotrys* from water- damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production morphology, growth, and metabolite production. *Mycologia*. 94(3):392–403
- Aslan A. 2009. *Untersuchungen zur biomimetischen synthese von palmarumycinen*. Doctoral dissertation, Universität Paderborn, Fakultät für Naturwissenschaften
- Banerjee I, Robinson J, Asim M, Sathian B, Banerjee I. 2021. Mucormycosis and COVID-19 an epidemic in a pandemic? *Nepal J. Epidemiol*. 11(2):1034–39
- Baral B, Akhgari A, Metsä-Ketelä M. 2018. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synth. Syst. Biotechnol*. 3(3):163–78
- Becker K, Stadler M. 2021. Recent progress in biodiversity research on the Xylariales and their secondary metabolism. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 74:1–23
- Bills GF, Gloer JB. 2017. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *The Fungal Kingdom*. 1087–1119
- Birkemoe T, Nybakken L, Andelic M, Tangnæs M, Sverdrup-thygeson A. 2021. Secondary metabolites and nutrients explain fungal community composition in aspen wood. *Fungal Ecology*. 101115
- Bode HB, Walker M, Zeeck A. 2000. Cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp. F-24'707 by variation of culture conditions. *European J. Org. Chem*. (18):3185–93
- Bode HB, Zeeck A. 2000. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes. *Phytochemistry*. 55:311–16
- Brakhage AA. 2012. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol*. 11(1):21–32
- Brakhage AA, Schroeckh V. 2011. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol*. 48(1):15–22
- Bunyapaiboonsri T, Yoiprommarat S, Suntivich R, Preedanon S, Komwijit S, et al. 2020. A cyclic lipodepsipeptide, a spirolactone, and a chromanone from the marine fungus *Verruculina enalia* BCC 22226. *Tetrahedron*. 76:5–11

- Cai YS, Kurtán T, Ze-Hong M, Mándi A, Komáromi I, et al. 2011. Palmarumycins BG1-BG7 and preussomerin BG1: establishment of their absolute configurations using theoretical calculations of electronic circular dichroism spectra. *J. Org. Chem.* 76(6):1821–30
- Cao F, Zhao D, Chen X, Liang X. 2017. Antifungal drimane sesquiterpenoids from a marine-derived Pleosporales sp. fungus. *Chem. Nat. Compd.* 53(6):1189–91
- Chen Y, Dong F, Zhao J, Fan H, Qin C, et al. 2020. High azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from strawberry fields, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 26(1):81–89
- Chu M, Patel MG, Pai J-K, Das PR, Puar MS. 1996. Sch 53823 and Sch 53825, novel fungal metabolites with phospholipase inhibitory activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 6(5):579–84
- Chu M, Truumees I, Patel M, Blood C, Das PR, Puar MS. 1995. Sch 50673 and Sch 50676, two novel antitumor fungal metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 48(4):329–31
- Chu M, Truumees I, Patel MG, Gullo VP, Blood C, et al. 1994a. A novel class of antitumor metabolites from the fungus *Nattractia mangiferae*. *Tetrahedron Lett.* 35(9):1343–46
- Chu M, Truumees I, Patel MG, Gullo VP, Pai J-K, et al. 1994b. Two new phospholipase D inhibitors, Sch 49211 and Sch 49212, produced by the fungus *Nattractia mangiferae*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 4(12):1539–42
- Chu M, Truumees I, Patel MG, Gullo VP, Puar MS, McPhail AT. 1994c. Structure of Sch 49209: a novel antitumor agent from the fungus *Nattractia mangiferae*. *J. Org. Chem.* 59(5):1222–23
- Cline LC, Schilling JS, Menke J, Groenhof E, Kennedy PG. 2018. Ecological and functional effects of fungal endophytes on wood decomposition. *Funct. Ecol.* 32(1):181–91
- Collemare J, Pianfetti M, Houille A, Morin D, Camborde L, et al. 2008. *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytol.* 179:196–208
- Cook NM, Chng S, Woodman TL, Warren R, Oliver RP, Go D. 2021. High frequency of fungicide resistance- associated mutations in the wheat yellow rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Pest Manag. Sci.* 77(7):3358–71
- Crowther TW, Boddy L, Maynard DS. 2018. The use of artificial media in fungal ecology. *Fungal Ecol.* 32:87–91
- Delgado G 2013. South Florida microfungi: a new species of *Ellisembia* (hyphomycetes) with new records from the U.S.A. *Mycotaxon.* 123:445–50
- Delgado G, Koukol O, Eredia G, Piepenbring M. 2020. Texas microfungi: *Hermatomyces amphisporus* (Pleosporales, Dothideomycetes) revisited. *Czech Mycol.* 72(1):95–107

- Demain AL. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:455–63
- Doilom M, Dissanayake AJ, Wanasinghe DN, Bahkali AH, McKenzie EHC, Hyde KD. 2017. Microfungi on *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Fungal Divers.* 82:107–82
- El-Elmat T, Figueroa M, Ehrmann BM, Cech NB, Pearce CJ, Oberlies NH. 2013. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J. Nat. Prod.* 76(9):1709–16
- Fox EM, Howlett BJ. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:481–87
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112:231–40
- Gocer H, Aslan A, Gülçin I, Supuran CT. 2015. Spirobisnaphthalenes effectively inhibit carbonic anhydrase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31(3):503–7
- Hashimoto A, Matsumura M, Hirayama K, Tanaka K. 2017. Revision of *Lophiotremataceae* (Pleosporales, Dothideomycetes): *Aquasubmersaceae*, *Cryptocoryneaceae*, and *Hermatomycetaceae* fam. nov. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi.* 39:51–73
- He J-W, Chen G-D, Gao H, Yang F, Li X-X, et al. 2012. Heptaketides with antiviral activity from three endolichenic fungal strains *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp. *Fitoterapia.* 83(6):1087–91
- Hertweck C. 2009. Hidden biosynthetic treasures brought to light. *Nat. Chem. Biol.* 5(7):450–52
- Hu H, Guo H, Li E, Liu X, Zhou Y, Che Y. 2006. Decaspirones F-I, bioactive secondary metabolites from the saprophytic fungus *Helicoma viridis*. *J. Nat. Prod.* 69(12):1672–75
- Innocenti G, Montanari M, Righini H, Roberti R. 2019. *Trichoderma* species associated with green mould disease of *Pleurotus ostreatus* and their sensitivity to prochloraz. *Plant Pathol.* 68(2):392–98
- Isaka M, Palasarn S, Komwijit S, Somrithipol S, Sommai S. 2014. Pleosporin A, an antimalarial cyclodepsipeptide from an elephant dung fungus (BCC 7069). *Tetrahedron Lett.* 55(2):469–71
- Jiang H, Ma SG, Li Y, Liu YB, Li L, et al. 2016. Spirobisnaphthalenes and lactones from the seeds of *Strychnos angustiflora* with potential anti-inflammatory activity. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26(19):4832–36
- Jiao P, Swenson DC, Gloer JB, Campbell J, Shearer CA. 2006. Decaspirones A-E, bioactive spirodioxynaphthalenes from the freshwater aquatic fungus *Decaisnella thyridioides*. *J. Nat. Prod.* 69(12):11–15

- Kaneda K, Yamauchi Y, Inagaki T, Sakami S, Kojima N. 1994. New spiro compound. *Japan, Patent No: 1994128250*
- Kanehara R, Hayasaka A, Inose K, Okamura T, Miura S, et al. 2021. Decaspirones and palmarumycins from *Phaeoseptum* sp. KT4106: Chirality reinvestigation of palmarumycins CP4a and CP5. *Tetrahedron*. 92:132251
- Khiralla A, Mohamed IE, Tzanova T, Slezack-deschaumes S, Hehn A, et al. 2016. Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential. *FEMS Microbiol. Lett.* 363(11):
- Komon-Zelazowska M, Bissett J, Zafari D, Hatvani L, Manczinger L, et al. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause green mold disease in oyster mushroom farms worldwide. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22):7415–26
- Kornienko A, Evidente A, Vurro M, Cimmino A, Evidente M, et al. 2015. Toward a cancer drug of fungal origin. *Med. Res. Rev.* 35(5):937–67
- Kouam, Mpondo TN, Lavaud C, Massiot G, Nuzillard J-M, et al. 1993. Bipendensin, an unusual phenolic acetal from *Afzelia bipendensis*. *Nat. Prod. Lett.* 3(4):299–303
- Koukol O, Delgado G. 2019. Do not forget Africa – revision of fungarium collections at Kew revealed a new species of *Hermatomyces* (*Hermatomycetaceae*, Pleosporales). *Nov. Hedwigia*. 109(3–4):413–23
- Koukol O, Delgado G. 2021. Why morphology matters: the negative consequences of hasty descriptions of putative novelties in asexual ascomycetes. *IMA Fungus*. 12:26
- Koukol O, Delgado G, Hofmann TA, Piepenbring M. 2018. Panama, a hot spot for *Hermatomyces* (*Hermatomycetaceae*, Pleosporales) with five new species, and a critical synopsis of the genus. *IMA Fungus*. 9(1):107–41
- Kredics L, Jimenez LG, Naeimi S, Czifra D, Urbán P, et al. 2010. A challenge to mushroom growers: the green mould disease of cultivated champignons. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, ed. A Méndez-Vilas, pp. 295–305. FORMATEX
- Krohn K, Beckmann K, Flörke U, Aust HJ, Draeger S, et al. 1997. New palmarumycins CP(4a) and CP5 from *Coniothyrium palmarum*: Structure elucidation, crystal structure analysis and determination of the absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron*. 53(9):3101–10
- Krohn K, Michel A, Florke U, Austb H, Draegerq S, Schulzb B. 1994a. Palmarumycins CP1 - CP4 from *Coniothyrium palmarum*: Isolation, structure elucidation, and biological activity. *Liebigs Ann. der Chemie*. 3(3):1093–97
- Krohn K, Michela A, Flörke U, Aust H-J, Draeger S, Schulz B. 1994b. Palmarumycins C1

- C16 from *Coniothyrium* sp.: Isolation, structure elucidation, and biological activity. *Liebigs Ann. der Chemie*. 29(2):1099–1108
- Lai D, Mao Z, Zhou Z, Zhao S, Xue M, et al. 2020. New chlamydosporol derivatives from the endophytic fungus Pleosporales sp. Sigrf05 and their cytotoxic and antimicrobial activities. *Sci. Rep.* 10(1):8193
- Li G, Xu K, Chen W-Q, Guo Z-H, Liu Y-T, et al. 2019. Heptaketides from the endophytic fungus Pleosporales sp. F 46 and their antifungal and cytotoxic activities. *R. Soc. Chem.* 9:12913–20
- Lin Y, Wu X, Deng Z, Wang J, Zhou S, et al. 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. *Phytochemistry*. 59(2606):469–71
- Lü X, Chen G, Li Z, Zhang Y, Wang Z, et al. 2014. Palmarumycins from the endophytic fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* XSZ-3. *Helv. Chim. Acta*. 97(9):1289–94
- Macheleidt J, Mattern DJ, Fischer J, Netzker T, Weber J, et al. 2016. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* 50:371–92
- Mafezoli J, Xu Y ming, Hilário F, Freidhof B, Espinosa-Artiles P, et al. 2018. Modulation of polyketide biosynthetic pathway of the endophytic fungus, *Anteaglonium* sp. FL0768, by copper (II) and anacardic acid. *Phytochem. Lett.* 28:157–63
- Martinez-Klimova E, Rodríguez-Peña K, Sánchez S. 2017. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 134:1–17
- Martínez-Luis S, Della-Togna G, Coley PD, Kursar TA, Gerwick WH, Cubilla-Rios L. 2008. Antileishmanial constituents of the panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* 71(12):2011–14
- Mou Y, Meng J, Fu X, Wang X, Tian J, et al. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities and effect of 1-hexadecene addition on palmarumycin C2 and C3 yields in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12. *Molecules*. 18(12):15587–99
- Ninomiya A, Urayama S, Suo R, Itoi S, Fuji S, et al. 2020. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Microbiol.* 11:1641
- Ogishi H, Chiba N, Mikawa T, Sasaki T, Miyaji S, Sezaki M. 1989. Novel antibiotic substance MK3018 and production thereof. *Japan, Patent No: H01294686A*
- Okeke B, Seigle-Murandi F, Steiman R. 2014. Biological activity of a heptaketide metabolite from *Pleiochaeta setosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59(2):173–75
- Pearce CJ, West R, Schlingmann G. 1993. Isolation, characterization and structures of new antibiotic components produced by fungal culture 07F275. *Patent No: 5789604*
- Peixoto D, Gagne LS, Hammond SP, Glimore ET, Joyce AC, et al. 2014. Isavuconazole

- treatment of a patient with disseminated mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* 52(3):1016–19
- Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, et al. 2017. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Arch. Oral Biol.* 73:179–85
- Potocnik I, Stepanovic M, Rekanovic E, Todorovic B, Milijasevic-Marcic S. 2015. Disease control by chemical and biological fungicides in cultivated mushrooms: button mushroom, oyster mushroom and shiitake. *Pestic. i fitomedicina.* 30(4):201–8
- Powis G, Wipf P, Lynch SM, Birmingham A, Kirkpatrick DL. 2006. Molecular pharmacology and antitumor activity of palmarumycin-based inhibitors of thioredoxin reductase. *Mol. Cancer Ther.* 5(3):630–36
- Prajoubklang A, Sirithunyalug B, Charoenchai P, Suvannakad R, Sriubolmas N, et al. 2005. Bioactive deoxypreussomerins and dimeric naphthoquinones from *Diospyros ehretioides* fruits: Deoxypreussomerins may not be plant metabolites but may be from fungal epiphytes or endophytes. *Chem. Biodivers.* 2(10):1358–67
- Prasher IB, Prasher S. 2014. *Hermatomyces indicus* sp. nov. (Hyphomycetes) from India. *Nov. Hedwigia.* 99(3–4):551–56
- Pratibha J, Raghukumar S, Bhat DJ. 2012. Diversity of litter degrading microfungi from the forests of Western Ghats, India. *Biodivers. Taxon.*, pp. 195–210
- Pu X, Qu X, Chen F, Bao J. 2013. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:9365–75
- Pudhom K, Teerawatananond T. 2014. Rhytidenones A-F, spirobisanaphthalenes from *Rhytidhysterion* sp. AS21B, an endophytic fungus. *J. Nat. Prod.* 77(8):1962–66
- Pudhom K, Teerawatananond T, Chookpaiboon S. 2014. Spirobisanaphthalenes from the mangrove-derived fungus *Rhytidhysterion* sp. AS21B. *Mar. Drugs.* 12(3):1271–80
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R version 4.0.4. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ravindranath N, Ravinder Reddy M, Mahender G, Ramu R, Ravi Kumar K, Das B. 2004. Deoxypreussomerins from *Jatropha curcas*: Are they also plant metabolites? *Phytochemistry.* 65(16):2387–90
- Sakemi S, Inagaki T, Kaneda K, Hirai H, Iwata E, et al. 1995. CJ-12,371 and CJ-12,372, two novel DNA gyrase inhibitors fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo).* 48(2):134–42
- Samirana PO, Murti YB, Jenie RI, Setyowati EP. 2021. Antibacterial and cytotoxic activities

- of supernatant and mycelium extracts from fermentation of fungal symbiont *Trichoderma reesei* TV221. *J. Appl. Pharm. Sci.* 11(12):90–99
- Samuels GJ, Dodd SL, Gams W, Castlebury LA, Dodd SL. 2017. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 94(1):146–70
- Sarkar A, Funk AN, Scherlach K, Horn F, Schroeckh V, et al. 2012. Differential expression of silent polyketide biosynthesis gene clusters in chemostat cultures of *Aspergillus nidulans*. *J. Biotechnol.* 160(1–2):64–71
- Schlingmann G, Matile S, Berova N, Nakanishi K, Carter GT. 1996. Absolute stereochemistry of the diepoxines. *Tetrahedron*. 52(1):435–46
- Schlingmann G, West RR, Milne L, Pearce CJ, Carter GT. 1993. Diepoxins, novel fungal metabolites with antibiotic activity. *Tetrahedron Lett.* 34(45):7225–28
- Singh SB, Zink DL, Liesch JM, Ball RG, Goetz MA, et al. 1994. Preussomerins and deoxypreussomerins: novel inhibitors of Ras farnesyl-protein transferase. *J. Org. Chem.* 59(21):6296–6302
- Siridechakorn I, Yue Z, Mittraphab Y, Lei X, Pudhom K. 2017. Identification of spirobisnaphthalene derivatives with anti-tumor activities from the endophytic fungus *Rhytidhysterium rufulum* AS21B. *Bioorganic Med. Chem.* 25(11):2878–82
- Song J, Xie F, Luan X, Xu K, Qian L, et al. 2022. Perylenequinone derivatives from the endolichenic fungus *Phialocephala fortinii*. *Nat. Prod. Res.*
- Sum WC, Indieka SA, Matasyoh JC. 2019. Antimicrobial activity of Basidiomycetes fungi isolated from a Kenyan tropical forest. *African J. Biotechnol.* 18(5):112–23
- Thiergardt R, Hug P, Rihs G, Peter HH. 1994. Cladospirone bisepoxide - a novel metabolite structure determination. *Tetrahedron Lett.* 35(7):1043–46
- Tibpromma S, Bhat JD, Doilom M, Lumyong S, Nontachaiyapoom S, et al. 2016. Three new *Hermatomyces* species (*Lophiotremataceae*) on *Pandanus odorifer* from Southern Thailand. *Phytotaxa*. 275(2):127–39
- Troiano G, Nante N. 2022. Mucormycosis – emerging fungal threats. *Encyclopedia*. 2:247–55
- Tudor D, Robinson SC, Cooper PA. 2013. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 80:22–28
- von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. 2019. Invasive fungal infection. *Dtsch. Arzteblatt Online*. 116(16):271–78
- Wani ZA, Ashraf N, Mohiuddin T, Riyaz-Ul-Hassan S. 2015. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(7):2955–65

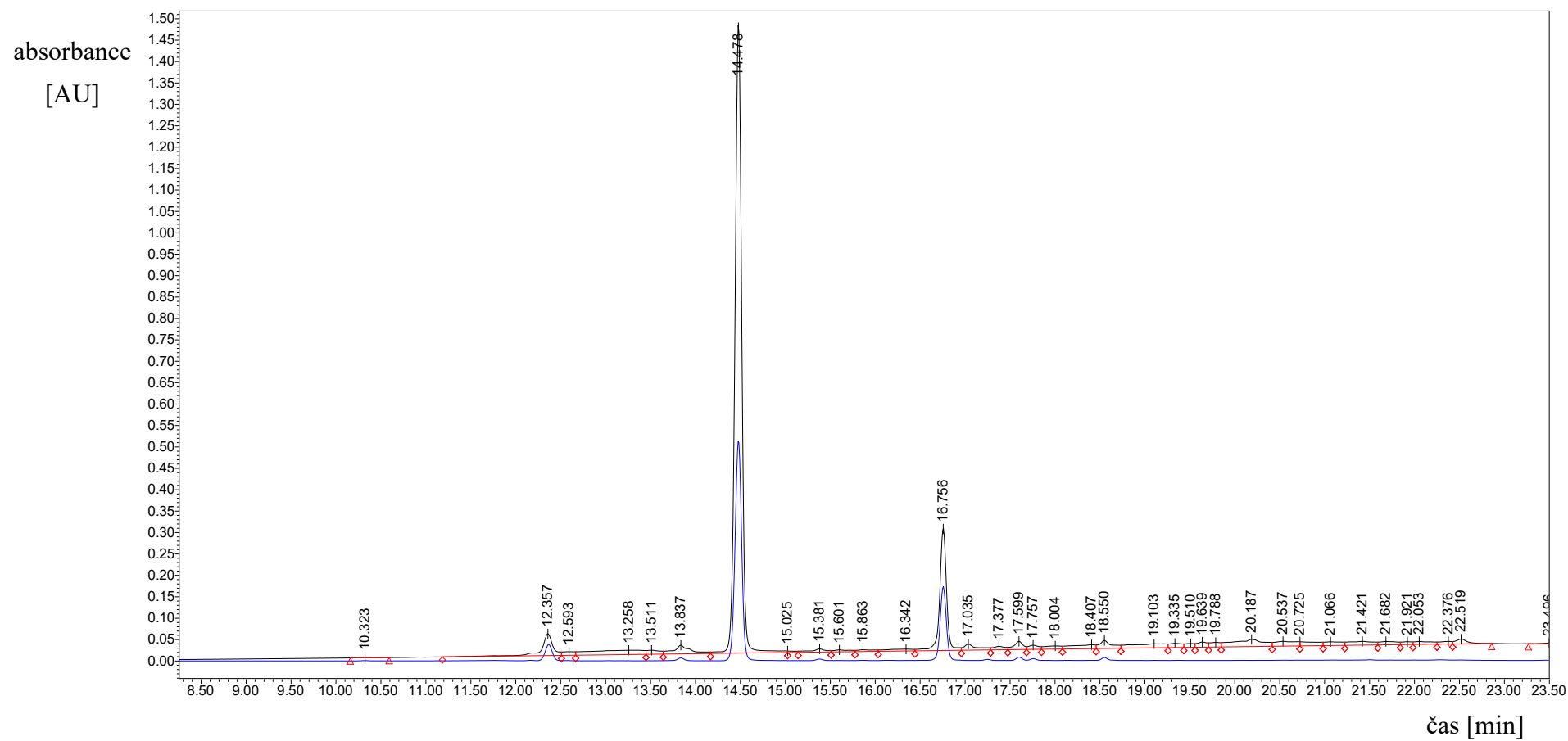
- Wipf P, Hopkins TD, Jung JK, Rodriguez S, Birmingham A, et al. 2001a. New inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system based on a naphthoquinone spiroketal natural product lead. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 11(19):2637–41
- Wipf P, Jung JK, Rodríguez S, Lazo JS. 2001b. Synthesis and biological evaluation of deoxypreussomerin A and palmarumycin CP1 and related naphthoquinone spiroketals. *Tetrahedron.* 57(2):283–96
- Wipf P, Lynch SM, Birmingham A, Tamayo G, Jiménez A, et al. 2004. Natural product based inhibitors of the thioredoxin-thioredoxin reductase system. *Org. Biomol. Chem.* 2(11):1651–58
- Xi B, Gu H, Baniasadi H, Raftery D. 2014. Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data. *Methods Mol. Biol.* 1998:333–53
- Xie F, Luan X, Gao Y, Xu K, Lou H. 2020. Cytotoxic heptaketides from the endolichenic fungus *Ulospora bilgramii*. *J. Nat. Prod.* 83(4):1623–33
- Xu YM, Mafezoli J, Oliveira MCF, U'Ren JM, Arnold AE, Gunatilaka AAL. 2015. Anteaglonialides A-F and palmarumycins CE1-CE3 from *Anteaglonium* sp. FL0768, a fungal endophyte of the spikemoss *Selaginella arenicola*. *J. Nat. Prod.* 78(11):2738–47
- Zhang Y, Schoch CL, Fournier J, Crous PW, Gruyter J De, et al. 2009. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Stud. Mycol.* 64:85–102
- Zhou L, Zhao J, Shan T, Cai X, Peng Y. 2010. Spirobisnaphthalenes from fungi and their biological activities. *Mini-Reviews Med. Chem.* 10(10):977–89

8. Přílohy

P1: pH supernatantu extraktů druhů rodu *Hermatomyces*.

Kmen	pH	Kmen	pH
<i>H. amphisporus</i> CCF 6392	6,91	<i>H. sphaericus</i> CCF 5906	4,38
<i>H. amphisporus</i> CCF 6394	7,82	<i>H. sphaericus</i> CCF 5911	7,53
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5899	5,74	<i>H. sphaericus</i> CCF 5914	4,45
<i>H. bifurcatus</i> CCF 5900	6,79	<i>H. sphaericus</i> CCF 5916	5,38
<i>H. megasporus</i> CCF 5897	5,95	<i>H. sphaericus</i> CCF 5917	4,28
<i>H. megasporus</i> CCF 5898	4,32	<i>H. sphaericus</i> CCF 6178	6,9
<i>H. reticulatus</i> CCF 5893	6,32	<i>H. sphaericus</i> CCF 6179	5,86
<i>H. reticulatus</i> CCF 5905	7,39	<i>H. sphaericus</i> CCF 6180	4,64
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5907	4,56	<i>H. sphaericus</i> KZP 441	5,05
<i>H. sphaericoides</i> CCF 5908	6,19	<i>H. sphaericus</i> KZP 445	5,74
<i>H. sphaericus</i> CCF 5894	4,7	<i>H. sphaericus</i> KZP 469	5,65
<i>H. sphaericus</i> CCF 5902	4,78	<i>H. tucumanensis</i> CCF 5915	4,58
<i>H. sphaericus</i> CCF 5906	4,3	<i>H. verrucosus</i> CCF 5903	6,62

P2: Chromatogram frakce č. 1, která byla následně purifikovaná a získány dvě látky (s retenčním časem 14,4 a 16,7). Černě UV 260 nm, modře UV 340 nm.



P3: Knihovna palmarumycinů – jejich vypočítaná hmota a UV spektra. Světle žlutě označeny palmarumyciny s. l. (druhé naftalenové jádro je modifikováno tak, že kostra neobsahuje dekalinovou jednotku, nýbrž o jeden uhlík méně).

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ_{max} [nm]	reference
MK 3018 (Palmarumycin CE1, 4a-epi-Decaspirone C)	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1191	(MeOH) 225, 286, 291, 313, 327	(Ogishi et al. 1989; Xu et al. 2015)
Bipendensin (Palmarumycin SA1)	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0845	(MeOH) 203, 226, 287	(Jiang et al. 2016; Kouam et al. 1993)
07F275 π	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	-	-	(Pearce et al. 1993)
07F275 β	C ₂₁ H ₁₄ O ₈	-	-	(Pearce et al. 1993)
Diepoxin α (07F275 α)	C ₂₀ H ₁₄ O ₇	366,0740	(MeOH) 225, 298, 313, 327	(Pearce et al. 1993; Schlingmann et al. 1993)
Diepoxin κ (07F275 κ)	C ₂₁ H ₁₈ O ₈	398,1002*	(MeOH) 226, 299, 313, 328	(Pearce et al. 1993)
Diepoxin δ (07F275 δ)	C ₂₀ H ₁₆ O ₈	384,0845*	(MeOH) 226, 299, 313, 328	(Schlingmann et al. 1996)
Diepoxin γ (07F275 γ)	C ₂₀ H ₁₆ O ₈	384,0845*	(MeOH) 226, 299, 313, 328	(Schlingmann et al. 1996)
Diepoxin ι (07F275 ι)	C ₂₁ H ₁₈ O ₈	-	(MeOH) 226, 299, 313, 328	(Schlingmann et al. 1996)
Diepoxin σ (Sch 49209, 07F275 σ)	C ₂₀ H ₁₂ O ₇	364,0578	(MeOH) 226, 299, 313, 328	(Chu et al. 1994a; Pearce et al. 1993)
Palmarumycin C1	C ₂₀ H ₁₁ ClO ₄	350,0346	(CH ₂ Cl ₂) 285, 296, 301, 314, 329, 371	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C2 (Deoxypreussomerin A, Guignardin F)	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	332,0685	(CHCl ₃) 295, 300, 314, 328	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C3	C ₂₀ H ₁₂ O ₆	348,0634*	(CHCl ₃) 296, 299, 312, 327, 380	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C4	C ₂₀ H ₉ ClO ₆	380,0088	(CHCl ₃) 282, 299, 307, 313, 328, 380	(Krohn et al. 1994b)

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ _{max} [nm]	reference
Palmarumycin C5	C ₂₁ H ₁₆ O ₅	348,0997	(CH ₂ Cl ₂) 286, 299, 313, 317, 329	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C6	C ₁₉ H ₁₂ O ₅	320,0685	(CH ₂ Cl ₂) 286, 296, 300, 314, 329, 346	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C7	C ₂₀ H ₁₁ ClO ₆	382,0244*	-	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C8	C ₂₀ H ₁₃ ClO ₆	384,0401*	-	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C9 (07F2750)	C ₂₀ H ₁₀ O ₇	362,0427*	-	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C10 (Diepoxin φ, 4-Oxocladospirone bisepoxide)	C ₂₀ H ₁₂ O ₇	364,0583	(CH ₂ Cl ₂) 293, 299, 307, 313, 327	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C11	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0841	(CH ₂ Cl ₂) 293, 296, 300, 314, 329	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C12	C ₂₀ H ₁₄ O ₆	350,0790	(CH ₂ Cl ₂ /10% MeOH) 288, 292, 299, 302, 313, 327	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C13 (Sch 53514, Diepoxin ζ, Cladospirone bisepoxide, 07F275ζ)	C ₂₀ H ₁₄ O ₇	366,0739	(MeOH) 226, 299, 313, 328 (Pearce et al. 1993) 313, 328 (Thiergardt et al. 1994)	(Pearce et al. 1993; Thiergardt et al. 1994)
Palmarumycin C14 (Sch 53516, Diepoxin η, 07F275η)	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	368,0896*	(MeOH) 225, 297, 305, 313, 320, 327	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C15	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	368,0896	(CH ₂ Cl ₂) 287, 297, 312, 327	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin C16 (07F275ε)	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	370,1053	(CH ₂ Cl ₂) 287, 298, 307, 313, 327	(Krohn et al. 1994b)
Palmarumycin CP1	C ₂₀ H ₁₂ O ₄	316,0736	(CH ₂ Cl ₂) 232, 288, 296, 330, 362	(Krohn et al. 1994a)

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ_{max} [nm]	reference
Palmarumycin CP2 (deoxypreussomerin B)	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318,0892	(CH ₂ Cl ₂) 285, 297, 300, 315, 329	(Krohn et al. 1994a)
Palmarumycin CP3	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0841*	(CHCl ₃) 290, 299, 307, 313, 327, 381	(Krohn et al. 1994a)
Palmarumycin CP4	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0998	(CHCl ₃) 283, 295, 301, 304, 314, 328	(Krohn et al. 1994a)
Palmarumycin CP4a	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1183	(CH ₂ Cl ₂) 333,6; 319,2; 305,4 (CH ₃ CN) 226, 300	(Kanehara et al. 2021; Krohn et al. 1997)
Palmarumycin CP5	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354,1103	(CHCl ₃) 297, 312, 326	(Krohn et al. 1997)
Palmarumycin CP17	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0839	228, 298, 365	(El-Elimat et al. 2013; Martínez-Luis et al. 2008)
Palmarumycin CP18	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0839	-	(Martínez-Luis et al. 2008)
Palmarumycin CP19 (4-O-Methyl CJ-12.371)	C ₂₁ H ₁₈ O ₄	334,1205	-	(Kaneda et al. 1994)
Sch 49210	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	368,0896	-	(Chu et al. 1994a)
Sch 49211	C ₂₀ H ₁₄ O ₇	366,0740	-	(Chu et al. 1994b)
Sch 49212	C ₂₀ H ₁₆ O ₇	368,0896	-	(Chu et al. 1994b)
Sch 50673	C ₂₁ H ₁₄ O ₈	394,0689	(MeOH) 225, 228, 313, 327	(Chu et al. 1995)
Sch 50676	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,2144	(MeOH) 227, 299, 313, 328	(Chu et al. 1995)
Sch 53823 (Palmarumycin JC1)	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0841	(MeOH) 224, 288, 300, 314, 328	(Chu et al. 1996)
Sch 53825	C ₂₀ H ₁₃ O ₅ Cl	368,0452	(MeOH) 225, 289, 300, 314, 328	(Chu et al. 1996)
CJ-12.371	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	320,1049	(MeOH) 227,2; 288,6; 301,0; 314,2; 328,4	(Sakemi et al. 1995)
CJ-12.372	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0998	(MeOH) 227,0; 288; 300,8; 312,6; 327,2	(Sakemi et al. 1995)

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ _{max} [nm]	reference
Cladospirone B	C ₂₀ H ₁₄ O ₆	350,0790	(MeOH) 226, 260, 297, 312, 326, 366	(Bode et al. 2000)
Cladospirone C	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	352,0946	(MeOH) 225, 297, 312, 327	(Bode et al. 2000)
Cladospirone D	C ₂₀ H ₁₄ O ₇	366,0739	(MeOH) 225, 298, 313, 327	(Bode et al. 2000)
Cladospirone E	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	352,0946	(MeOH) 225, 299, 313, 327	(Bode et al. 2000)
Cladospirone F	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	356,1259	(MeOH) 206, 226, 300	(Bode et al. 2000)
Cladospirone G	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	334,0841	(MeOH) 226, 299, 313, 327	(Bode et al. 2000)
Cladospirone H	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372,1209	(MeOH) 226, 299, 313, 327	(Bode et al. 2000)
Cladospirone I	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	370,1041	(MeOH) 226, 299, 313, 327	(Bode et al. 2000)
Palmarumycin CR1	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340,1311	-	(Wipf et al. 2004)
Palmarumycin JC2	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0841	-	(Ravindranath et al. 2004)
Decaspirone A	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0998	(MeOH) 222, 296	(Jiao et al. 2006)
Decaspirone B	C ₂₂ H ₂₀ O ₆	380,1260	(MeOH) 218, 300	(Jiao et al. 2006)
Decaspirone C	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1154	(MeOH) 225, 297	(Jiao et al. 2006)
Decaspirone D	C ₂₂ H ₁₈ O ₆	378,1103	(MeOH) 217, 276	(Jiao et al. 2006)
Decaspirone E	C ₂₂ H ₁₈ O ₆	378,1103	(MeOH) 221, 297	(Jiao et al. 2006)
Decaspirone F	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1148	(MeOH) 225, 300	(Hu et al. 2006)
Decaspirone G	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1148	(MeOH) 225, 300	(Hu et al. 2006)
Decaspirone H	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356,1254	(MeOH) 225, 300	(Hu et al. 2006)
Palmarumycin M1	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340,1303	(MeOH) 326, 313, 299, 288, 226	(Dai 2007)
Palmarumycin M2	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356,1260	-	(Dai 2007)
Palmarumycin BG1	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0841	(MeOH) 224, 256, 299, 313, 327	(Cai et al. 2011)
Palmarumycin BG2	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0997	-	(Cai et al. 2011)
Palmarumycin BG3	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,1017	-	(Cai et al. 2011))
Palmarumycin BG4	C ₂₀ H ₁₆ O ₈ S	416,0568	(MeOH) 226, 301, 314, 328	(Cai et al. 2011)

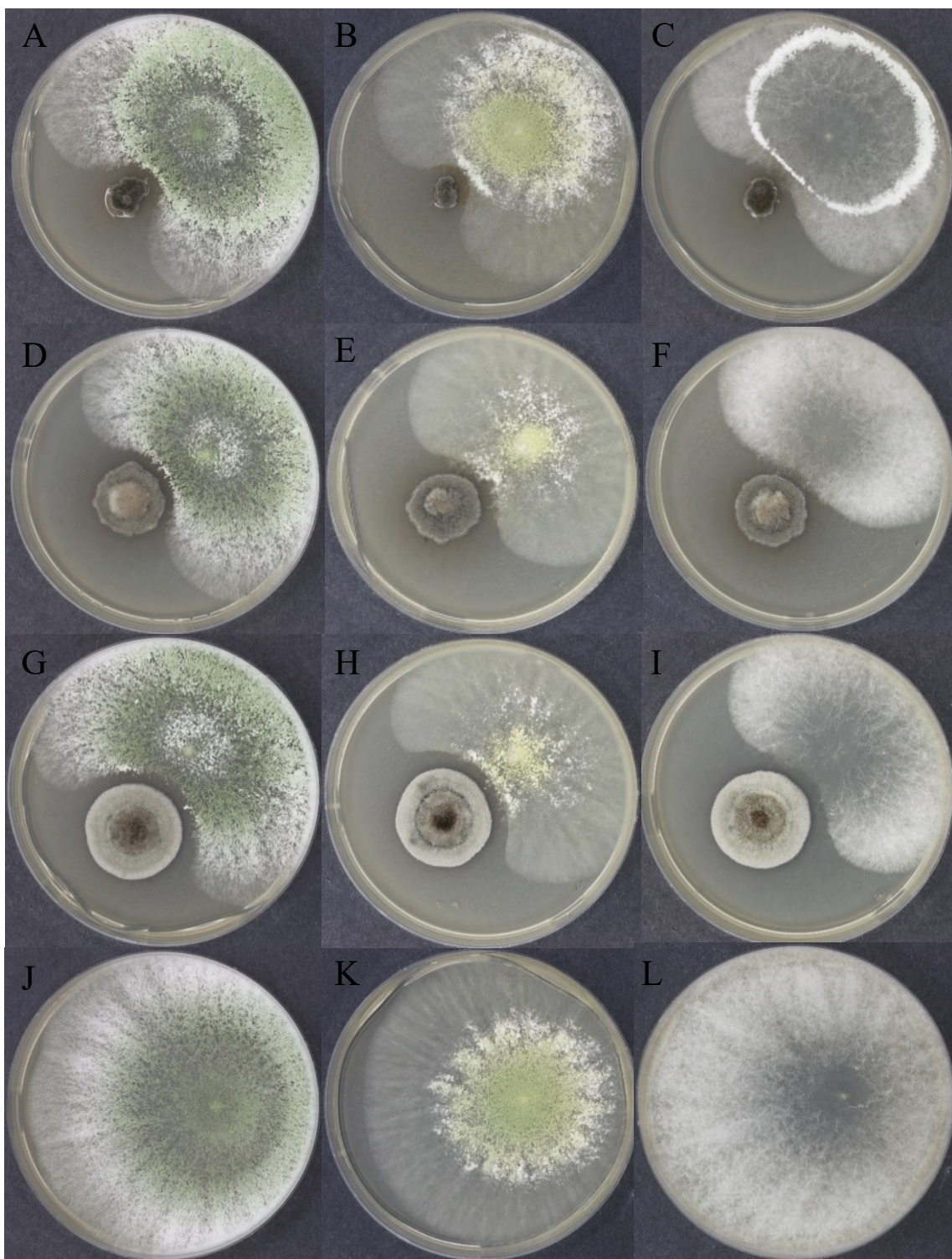
název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ _{max} [nm]	reference
Palmarumycin BG5	C ₂₀ H ₁₅ ClO ₅	370,0608	(MeOH) 226, 287, 299, 313, 327	(Cai et al. 2011)
Palmarumycin BG6	C ₂₀ H ₁₅ ClO ₅	370,0608	-	(Cai et al. 2011)
Palmarumycin BG7	C ₂₀ H ₁₅ ClO ₈ S	450,0178	-	(Cai et al. 2011)
Guignardin A	C ₂₃ H ₁₈ O ₆	390,1096	(MeOH) 226, 300, 328	(Ai et al. 2014)
Guignardin B	C ₂₀ H ₁₄ O ₅	334,0848	(MeOH) 226, 287, 296, 299, 310, 313, 327	(Ai et al. 2014)
Guignardin C	C ₂₀ H ₁₂ O ₅	332,0677	(MeOH) 224, 258, 299, 328	(Ai et al. 2014)
Guignardin D	C ₂₃ H ₁₄ O ₈	418,3101	(MeOH) 203, 214, 224, 265, 275	(Ai et al. 2014)
Guignardin E	C ₂₀ H ₁₃ ClO ₅	368,0426	(MeOH) 223, 257, 298, 327	(Ai et al. 2014)
Palmarumycine B1	C ₂₀ H ₁₆ O ₈	384,0838	(MeOH) 202,8; 220,8; 286,4	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B2	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	386,0996	(MeOH) 203,8; 223,6; 283,4	(Shan et al. 2014)
Palmarumycine B3	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	386,0954	(MeOH) 208,8; 224,2; 298,6	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B4	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388,1153	(MeOH) 224,8; 298,6	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B5	C ₂₀ H ₁₈ O ₈	386,0996	(MeOH) 209,4; 221,8; 299,6	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B6	C ₂₀ H ₁₃ ClO ₄	352,0509	(MeOH) 203,8; 239,6; 286,4	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B7	C ₂₁ H ₁₄ O ₈	394,0683	(MeOH) 203,6; 223,8; 285,8	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B8	C ₂₁ H ₁₄ O ₇	378,0734	(MeOH) 203,2; 221,6; 286,8	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin B9	C ₂₂ H ₁₆ O ₇	392,0891	(MeOH) 208,8; 224,4; 301,0	(Shan et al. 2014)
Palmarumycin EG1 (4-O-Methyl-CJ-12372)	C ₂₁ H ₁₈ O ₅	350,1154	(MeOH) 328,5; 325,5; 314,5; 310,6; 300,5; 296; 288; 255 226,5; 212,6	(Macías-Rubalcava et al. 2014)
Palmarumycin LP1	C ₂₀ H ₁₄ O ₇	366,0738	(MeOH) 219, 309, 325, 340	(Lü et al. 2014)
Rhytidone A	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358,1416	-	(Pudhom et al. 2014)
Rhytidone B	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356,1260	-	(Pudhom et al. 2014)
Rhytidone C	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	370,1416	-	(Pudhom et al. 2014)
Rhytidenone A	C ₂₆ H ₂₄ O ₇	448,1522	(MeOH) 226, 298	(Pudhom & Teerawatananond 2014)

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ_{max} [nm]	reference
Rhytidenone B	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	322,1198	(MeOH) 222, 297	(Pudhom & Teerawatananond 2014)
Rhytidenone C	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1152	(MeOH) 224, 297	(Pudhom & Teerawatananond 2014)
Rhytidenone D	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1152	(MeOH) 221, 296	(Pudhom & Teerawatananond 2014)
Rhytidenone E	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	352,1310	(MeOH) 222, 296	(Pudhom & Teerawatananond 2014)
Rhytidenone F	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	310,1047	(MeOH) 230, 303	(Pudhom & Teerawatananond 2014)
Rhytidenone G	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0997	(MeOH) 250, 260	(Siridechakorn et. al. 2017)
Rhytidenone H	C ₂₂ H ₁₈ O ₅	362,1254	(MeOH) 230, 250, 260	(Siridechakorn et. al. 2017)
Palmarumycin P1	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	366,1103	(MeOH) 200, 225, 271	(Bunyapaiboonsri et al. 2015)
Palmarumycin P2	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0997	(MeOH) 202, 226, 275, 327	(Bunyapaiboonsri et al. 2015)
Palmarumycin P3	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354,1103	(MeOH) 327	(Bunyapaiboonsri et al. 2015)
Palmarumycin P4	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0992	(MeOH) 225, 299, 327	(Bunyapaiboonsri et al. 2015)
Palmarumycin P5	C ₂₁ H ₁₆ O ₅	348,0992	(MeOH) 224, 256, 299, 327	(Bunyapaiboonsri et al. 2015)
Palmarumycin CE2	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340,1305	-	(Xu et al. 2015)
4(5a)-Anhydropalmarumycin CE2	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	322,1199	(MeOH) 267, 299, 313, 328	(Xu et al. 2015)
Palmarumycin CE3	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338,1148	(MeOH) 228, 299, 313, 328	(Xu et al. 2015)
Palmarumycin SA2	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	352,0941	(MeOH) 203, 226, 287	(Jiang et al. 2016)

název	sumární vzorec	vypočítaná hmota – z článků, popř. z databáze PubChem (*)	UV spektrum (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/CHCl ₃ /CH ₃ CN) maximální vlnové délky λ_{max} [nm]	reference
Palmarumycin SA3	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	366,1098	(MeOH) 203, 226, 289	(Jiang et al. 2016)
5-Dehydrodecaspirone F	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	336,0991	(CH ₃ CN) 226, 300	(Kanehara et al. 2021)
5-Dehydrodecaspirone H	C ₂₀ H ₁₀ O ₆	354,1096	(CH ₃ CN) 226, 300	(Kanehara et al. 2021)

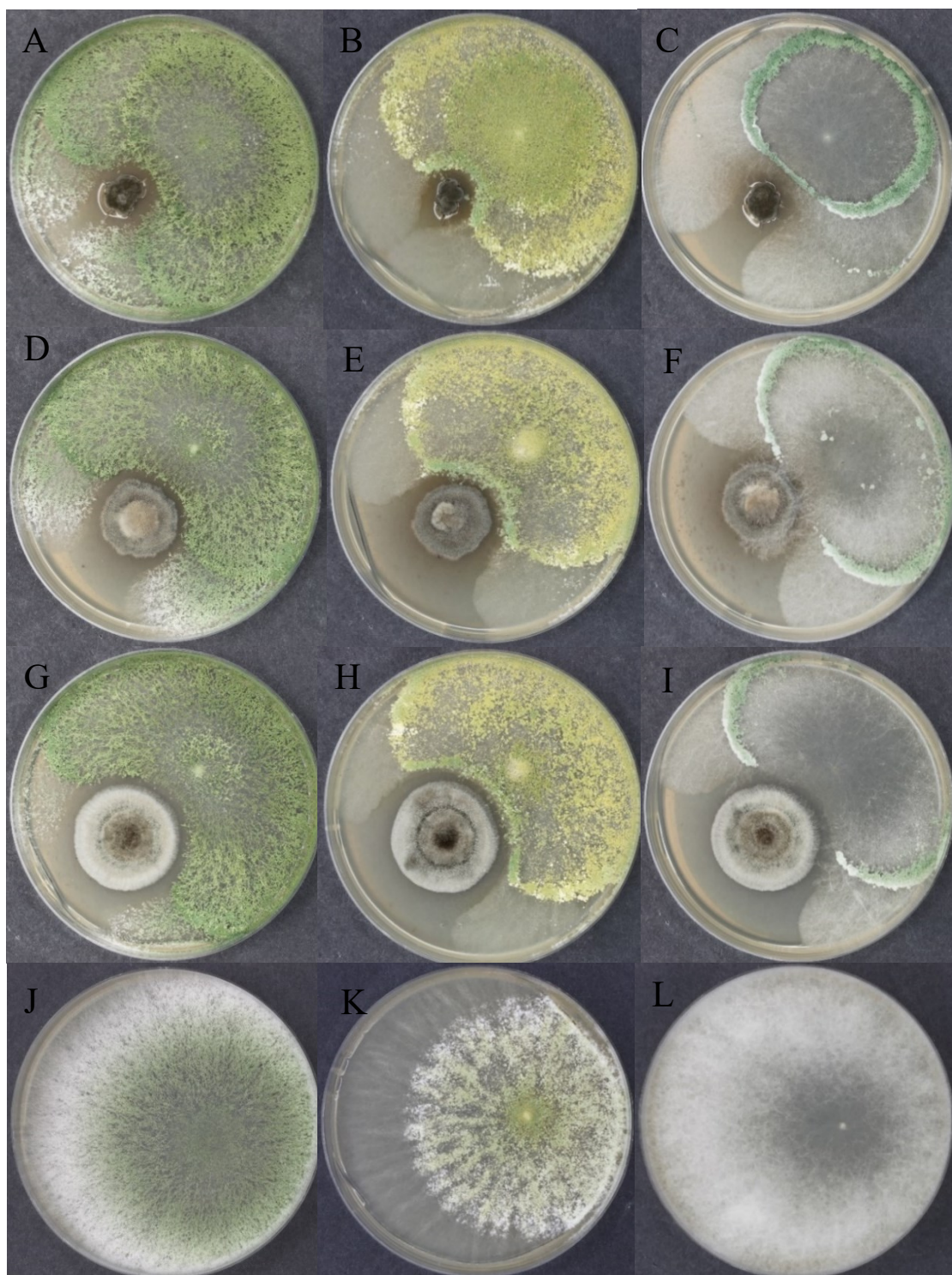
P4: Výsledek párovacích pokusů po čtyřech dnech po zaočkování druhů rodu *Trichoderma* (vpravo nahoře) ke kolonii druhů rodu *Hermatomyces* (vlevo dole).

A) *H. reticulatus* x *T. pleuroticola* B) *H. reticulatus* x *T. harzianum* C) *H. reticulatus* x *T. aggressivum* D) *H. sphaericus* x *T. pleuroticola* E) *H. sphaericus* x *T. harzianum* F) *H. sphaericus* x *T. aggressivum* G) *H. bifurcatus* x *T. pleuroticola* H) *H. bifurcatus* x *T. harzianum* I) *H. bifurcatus* x *T. aggressivum* J) kontrola – *T. pleuroticola* K) kontrola – *T. harzianum* L) kontrola – *T. aggressivum*.

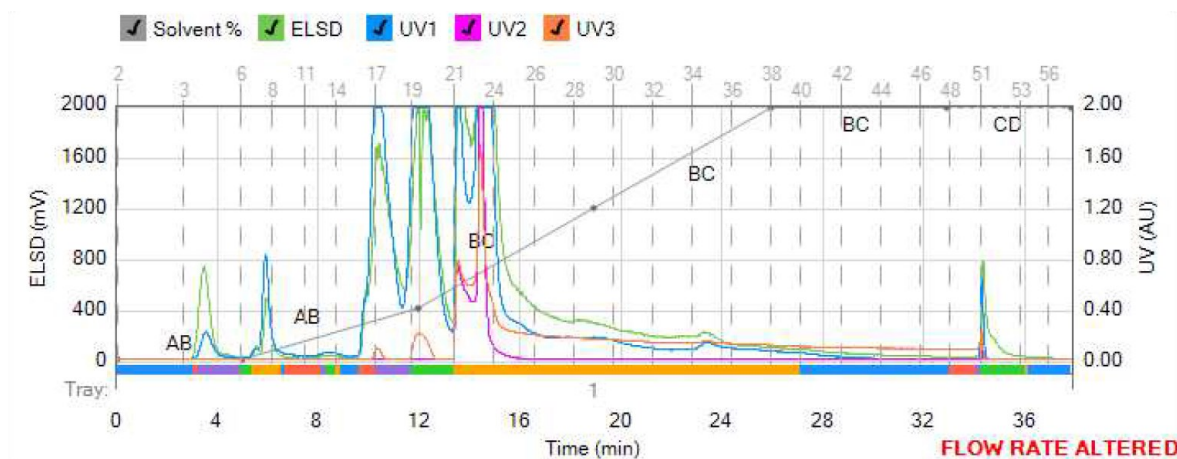


P5: Výsledek párovacích pokusů po šesti dnech po zaočkování druhů rodu *Trichoderma* (vpravo nahoře) ke kolonii druhů rodu *Hermatomyces* (vlevo dole).

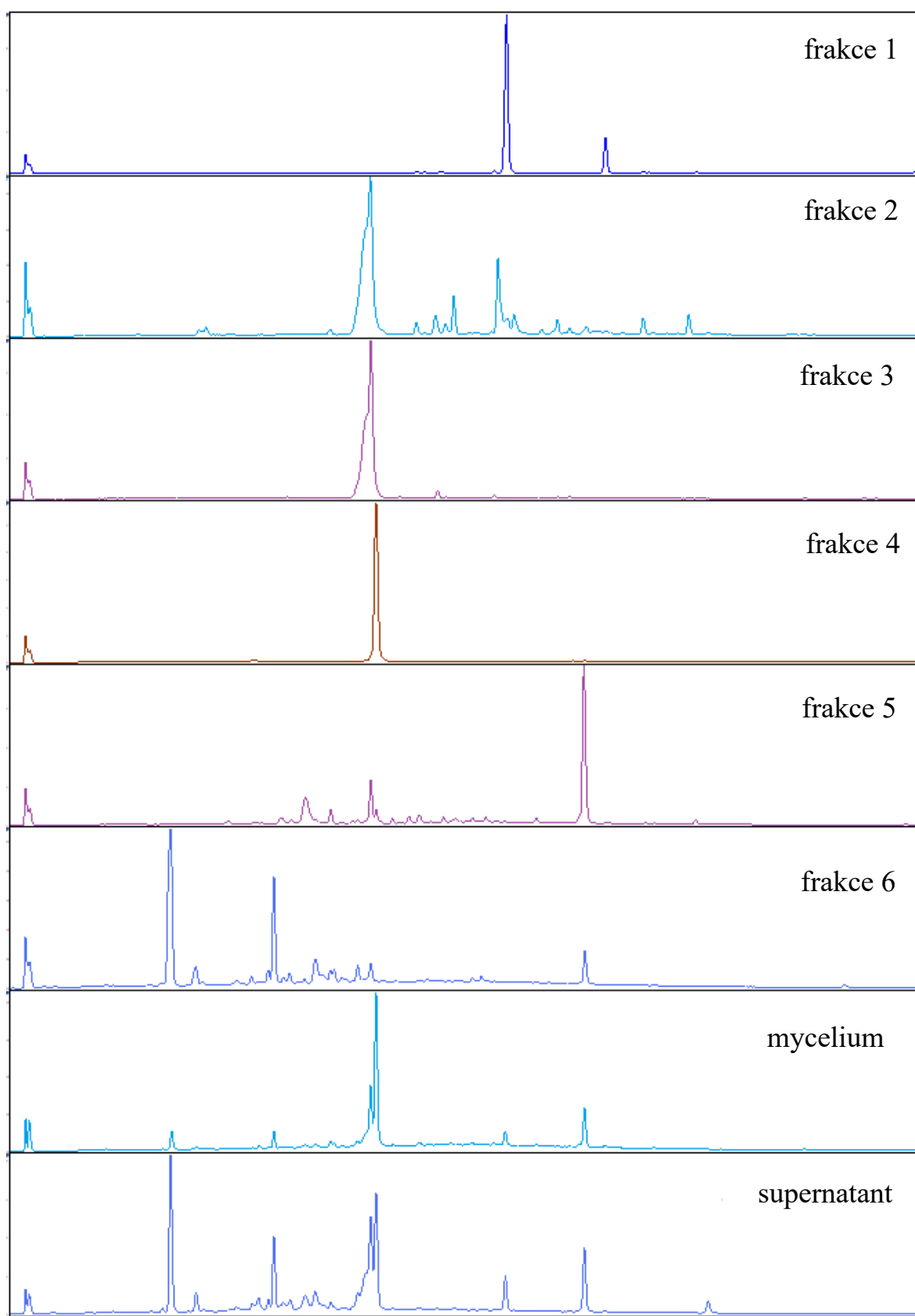
A) *H. reticulatus* x *T. pleuroticola* B) *H. reticulatus* x *T. harzianum* C) *H. reticulatus* x *T. aggressivum* D) *H. sphaericus* x *T. pleuroticola* E) *H. sphaericus* x *T. harzianum* F) *H. sphaericus* x *T. aggressivum* G) *H. bifurcatus* x *T. pleuroticola* H) *H. bifurcatus* x *T. harzianum* I) *H. bifurcatus* x *T. aggressivum* J) kontrola – *T. pleuroticola* K) kontrola – *T. harzianum* L) kontrola – *T. aggressivum*.



P6: Chromatogram extraktu *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893. UV1: 220 nm, UV2 254 nm, UV3 280 nm. Rozpouštědla: (A) dichlormethan, (B) dichlormethan:aceton 4:1, (C) dichlormethan:aceton:methanol (4:1):3, (D)methanol. Separace pomocí flash chromatografie na koloně Reveleris ®Silica 24 g po dobu 38 min.



P7: Chromatogramy biologicky aktivních frakcí *Hermatomyces reticulatus* CCF 5893.



P8: Chromatogramy frakce č. 6.

