

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Zuzana Dudová

Pohlavní systém a druhový koncept u heterotalických druhů *Aspergillus* v sekci
Fumigati

Mating system and species concept in heterothallic species of *Aspergillus*
section *Fumigati*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Vít Hubka

Praha, 2014

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, 10.8.2014

Poděkování

Ráda bych vyjádřila veliký a upřímný dík svému školiteli Mgr. Vítkovi Hubkovi. Během mého tří roky trvajícího magisterského studia mi věnoval mnoho času a energie a byl mi ochoten s čímkoli pomoci a poradit. Je pro mě velkým vzorem a jsem vděčná, že jsem měla příležitost spolupracovat s člověkem jeho kvalit.

Velice děkuji Mgr. Miroslavovi Kolaříkovi, PhD. za umožnění práce v Laboratoři genetiky a metabolismu hub Mikrobiologického ústavu AV ČR, za jeho rady, připomínky, ochotu a všestrannou pomoc s mojí diplomovou prací.

Chtěla bych poděkovat také kolegům z Laboratoře genetiky a metabolismu hub, jmenovitě RNDr. Miladě Chudíčkové za pomoc s izolací DNA a tvorbou médií. Též děkuji všem pracovníkům Střediska sekvenování DNA Mikrobiologického ústavu AV ČR, především Dr. Jürgenovi Felsbergovi, CSc. za jejich ochotu, rady a pomoc.

Mé poděkování patří též RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za fotografie z elektronového mikroskopu a vstřícný přístup. Prom. biol. Karlovi Prášilovi děkuji za jeho připomínky, rady a všestrannou podporu, Mgr. Ondřejovi Koukolovi, PhD. děkuji za ochotu poradit a za pomoc s organizačními záležitostmi.

Děkuji za udělení grantu GAUK 1130214. Mé díky patří také Nadaci Nadání Marie, Josefa a Zdeňky Hlávkových za možnost prezentace výsledků na dvou zahraničních konferencích.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo objasnit mezidruhové hranice v druhovém komplexu *Aspergillus viridinutans*. Druhy patřící do tohoto komplexu jsou primárně půdní organismy, ale stále častěji jsou zaznamenávány jako oportunní patogeni zvířat i člověka. U celkem 98 izolátů z různých substrátů a zemí byly získány sekvence čtyř genů (kalmodulin, beta tubulin, aktin, velká podjednotka RNA polymerázy II) pro fylogenetickou analýzu, zjištěno pohlavní ladění a provedeny párovací pokusy na různých kultivačních médiích a při různých teplotách. Zkoumány byly též fyziologické a morfologické charakteristiky. Obdobný postup byl aplikován i u některých dalších heterothalických druhů v sekci *Fumigati*, u nichž zatím nebylo popsáno pohlavní stádium.

Klíčová slova: *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus turcosus*, fylogenetická analýza, MAT geny, anamorfa, teleomorfa, párovací pokusy, MAT1-1, MAT1-2

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the species boundaries within the *Aspergillus viridinutans* species complex. The species belonging to this complex are predominantly soil-inhabiting organisms that are increasingly reported as opportunistic human and animal pathogens. A total number of 98 isolates from various substrates and countries was subjected to morphological, physiological and molecular analysis (calmodulin, β -tubulin, actin and RNA polymerase II subunit 2 gene) and mating experiments were provided on different media and temperatures. Some other heterothallic species from section *Fumigati* with unknown sexual state were analysed using similar method as well.

Key words: *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus turcosus*, phylogenetic analysis, mating-type genes, anamorph, teleomorph, mating experiments, MAT1-1, MAT1-2

OBSAH

1. TEORETICKÝ ÚVOD	8
1.1 Sekce <i>Fumigati</i> - význam a druhový koncept	8
1.2 Komplex druhů <i>A. viridinutans</i>	9
1.3 Patogenita zástupců druhů z komplexu <i>A. viridinutans</i>	10
1.4 Pohlavní systém v sekci <i>Fumigati</i>	10
1.5 Další druhy s neznámou teleomorfoú v sekci <i>Fumigati</i>	11
1.6 Znaky a metody použitelné v delimitaci druhů v sekci <i>Fumigati</i> a komplexu <i>A. viridinutans</i> ..	12
2. METODIKA.....	13
2.1 Zdroje izolátů	13
2.2 Kultivace, uchovávání kultur a fotodokumentace	13
2.3 Křížící pokusy	14
2.4 Izolace DNA.....	14
2.5 PCR amplifikace a sekvenace	14
2.6 Úprava sekvencí	17
2.7 Konstrukce fylogenetického stromu.....	17
2.8 Monosporická izolace.....	17
2.9 Testování citlivostí k antimykotikům.....	18
2.10 Statistické zpracování dat	18
3. VÝSLEDKY	19
3.1 Molekulárně genetická část	19
3.1.1 DNA sekvenování, PCR.....	19
3.1.2 Fylogenetická analýza	27
3.2 Křížící experimenty	30
3.3 Morfologie.....	39
3.3.1 Morfologie komplexu <i>A. viridinutans</i>	39
3.3.2 Morfologie pohlavního stádia <i>Aspergillus turcosus</i>	46
3.4 Testování citlivosti na antimykotika	47

4. DISKUZE.....	52
4.1 Druhový komplex <i>A. viridinutans</i> , morfologické znaky	52
4.2 Rošíření a výskyt druhů komplexu <i>A. viridinutans</i>	52
4.3 Biologický koncept a párovací pokusy.....	53
4.4 Aplikace polyfázického přístupu na druhy <i>Aspergillus viridinutans</i> komplexu	54
4.5 Mezidruhové křížení.....	54
4.6 Citlivost k antimykotikům.....	55
5. ZÁVĚR.....	56
6. LITERATURA.....	57
PŘÍLOHY.....	61

PŘEDMLUVA

Tato práce studuje taxonomii druhového komplexu *Aspergillus viridinutans* ze sekce *Fumigati*. Bezprostředně navazuje na mojí bakalářskou práci, ve které jsem se zabývala sexuální reprodukcí u vřeckovýtrusých hub. Práce byla řešena na katedře botaniky PřF UK a v Laboratoři genetiky a metabolismu hub MBÚ AV ČR.

V rámci předkládané diplomové práce se rozvinula spolupráce s dalšími akademickými pracovišti v ČR jako je Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci (Doc. MUDr. Petr Hamal, PhD., MUDr. Lucie Svobodová - testování citlivostí k antimykotikům) a Ústavem půdní biologie AV ČR v Českých Budějovicích (RNDr. Alena Nováková, CSc.). Část metodiky se opírá o poznatky japonské výzkumné skupiny zabývající se taxonomií rodu *Aspergillus* (Prof. T. Yaguchi, PhD.; T. Matsuzawa, PhD.), která zároveň poskytla i značný počet izolátů. Primárně půdní druhy komplexu *A. viridinutans*, jehož mezidruhové hranice nebyly dosud jasně vymezeny, jsou stále častěji zaznamenávány jako oportunní patogeni zvířat i člověka. Význam objasnění hranic jednotlivých druhů komplexu je nejen taxonomický, ale i medicínský, jelikož citlivost k některým antimykotikům, používaných k léčbě oportunních infekcí, je druhově specifická.

Cíle práce:

- 1) Zjistit pohlavní systém a cílenými párovacími pokusy se pokusit navodit tvorbu teleomorfy u druhů v komplexu *A. viridinutans* a dalších druhů ze sekce *Fumigati* s neznámou teleomorfou
- 2) Objasnit mezidruhové vztahy v komplexu *A. viridinutans* přístupem zahrnujícím mnohagenovou fylogenezi, morfologii a sexuální kompatibilitu (biologický koncept druhu)

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Sekce *Fumigati* - význam a druhový koncept

Sekce *Fumigati* obsahuje asi 40 druhů, z nichž řada má slabou morfologickou podporu (velká fenoplastičita a překrývající se znaky). Proto byla velká část druhů popsána teprve s nástupem molekulárních metod (Balajee et al., 2005; Hong et al., 2005; Hong et al., 2008; Samson et al., 2007). Sekce je významná především z hlediska patogenity některých zástupců (Balajee et al., 2005; Barrs et al., 2013; Guarro et al., 2002; Padhye et al., 1994; Vinh et al., 2009a; Vinh et al., 2009b). Druhy *Neosartorya* (teleomorfa) znehodnocují pasterizované potraviny díky jejich termorezistenci (Samson, 1989). Některé druhy jsou též producenty významných mykotoxinů (Fujimoto et al., 1993; Samson et al., 2007) a nebo naopak látek, využívaných jako léčiva (Tomoda et al., 1994). K dispozici jsou genomické sekvence dvou druhů - *A. fumigatus* (Nierman et al., 2005; Wortman et al., 2006) a *N. fischeri* (Fedorova et al., 2008; Wortman et al., 2006).

Objektivně nejpoužívanějším přístupem v identifikaci a popisu nových druhů u rodu *Aspergillus* je kombinace morfologických dat podpořená sekvencemi z několika na sobě nezávislých lokusů. Naproti tomu fylogenetický druh odpovídá nejmenším monofyletickým shlukům jedinců (clusters), podpořených analýzou několika nezávislých DNA sekvencí (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition-GCPSR) (Dettman et al., 2006). Alternativně se pro popis druhů rodu *Aspergillus* využívá polyfázický přístup, který kromě sekvenačních dat z několika nezávislých lokusů a morfologie dále přidává charakterizaci základní fyziologie druhů a zohledňuje odlišnosti v produkovaných sekundárních metabolitech (Hong et al., 2008; Hubka et al., 2013b; Samson et al., 2007). Biologický koncept druhu byl využitelný jen u omezeného počtu heterothalických druhů (Horie et al., 1995; Kwon-Chung and Kim, 1974; Nováková et al., 2014; Takada et al., 2001; Takada and Udagawa, 1985).

Napříč rodem *Aspergillus* i sekcí *Fumigati* se vyskytují druhy homothalické (schopné rozmnožování bez opačně laděného partnera), heterothalické (k rozmnožování potřebují opačně laděného partnera) a druhy, u nichž není známo, zda definitivně ztratily schopnost pohlavní reprodukce, nebo mají pohlavní stadium, které se zatím nepodařilo pozorovat. Mezi přibližně 300 popsányými druhy *Aspergillus* je známá teleomorfa asi jen u čtvrtiny druhů, z toho jen necelé dvě desítky jsou heterothalické, z nichž je významná část právě v sekci *Fumigati*. Mezi tyto druhy patří i *A. fumigatus*, který byl dříve považován za ukázkový

příklad striktně asexuálního druhu vláknité houby, ale teleomorf se systematickým křížením izolátů podařilo indukovat (O’Gorman et al., 2008). Tvorba teleomorfy vyžaduje často velmi specifické kultivační podmínky a nalezení kompatibilních kmenů, ačkoliv ani to není zárukou úspěšnosti párovacích pokusů a ty často selhávají (Sugui et al., 2010). Dá se předpokládat, že řada druhů, dnes považovaných za asexuální, jsou ve skutečnosti druhy heterothalické s nepopsaným pohlavním stádiem.

Odhalení sexuální reprodukce umožňuje pochopit biologii a evoluci druhu, pomáhá vysvětlit přítomnost různých genotypů navzdory převažující nepohlavní reprodukci. Rekombinace v asexuálních populacích některých hub je často přičítána parasexuálním procesům, podle současných poznatků je ale zřejmé, že přinejmenším v některých případech bude primárním činitelem kryptický sexuální cyklus (Kück and Pöggeler, 2009; Paoletti et al., 2005; Taylor et al., 1999). Odhalení sexuálního procesu má také řadu medicínských důsledků. Pohlavní reprodukci může vznikat potomstvo s rostoucí virulencí a rezistencí k antimykotikům. Dále může pohlavní reprodukce zkreslovat výsledky řady diagnostických testů, které jsou založeny na předpokladech klonality.

1.2 Komplex druhů *A. viridinutans*

Primárně půdní druh, *A. viridinutans*, je oportunní patogen způsobující invazivní aspergilózu (IA), která se protrahovaným klinickým průběhem liší od běžnější formy IA působené *A. fumigatus* (Coelho et al., 2011; Vinh et al., 2009a). Na patogenezi onemocnění se pravděpodobně podílejí i produkované mykotoxiny, zejména viriditoxin, který vykazuje hemolytické, mytoxické a hepatotoxické účinky (Lillehoj and Milburn, 1973; Weisleder, 1971). Odlišení od *A. fumigatus* je důležité z hlediska rezistencí některých druhů komplexu *A. viridinutans* k běžně užívaným antimykotikům ze skupiny azolů a amfotericinu B (Van Der Linden et al., 2011). Přesto je *A. viridinutans* zřejmě v klinickém materiálu zaměňován za *A. fumigatus* (Balajee et al., 2006; Hong et al., 2010; Katz et al., 2005; Yaguchi et al., 2007), což může vést k neadekvátní léčbě.

Úloha druhů tohoto komplexu v půdní nice není zcela objasněna a záchyty *A. viridinutans* z půdy a jiných substrátů (mimo klinický materiál) byly vždy spíše sporadické. Jako poměrně bohatý zdroj izolátů se podařilo identifikovat výsypky a rekultivované plochy v USA a ČR (viz Tabulka 3.1) (Nováková et al., 2014), které pravděpodobně mohou představovat významný rezervoár nejen *A. viridinutans*, ale i dalších oportunně patogenních druhů ze sekce *Fumigati* jako např. *A. udagawae*, *A. lentulus* a *A. fumigatiaffinis*. *Aspergillus*

fumigatus, který v půdních vzorcích bývá dominantní (Hong et al., 2010) se v těchto společenstvech přitom vůbec nepovedlo zachytit, což naznačuje velmi specifickou úlohu non - *A. fumigatus* druhů v určitých stádiích sukcese na těchto stanovištích.

V této práci se podařilo shromáždit řadu nových kmenů, ale také autentických izolátů (dříve publikovaných), z různých lokalit po celém světě (Tab. 3.1). Většina těchto kmenů byla publikována pod druhovým názvem *A. viridinutans* nebo *N. udagawae*.

1.3 Patogenita zástupců druhů z komplexu *A. viridinutans*

Některé druhy z komplexu *A. viridinutans* byly zaznamenány jako oportunní patogeni zvířat i člověka. Mezi tyto druhy patří *A. felis*, *A. udagawae* a nejnověji také *A. wyomingensis*, který byl zachycen u kočky domácí (Barrs et al., 2014). Druhy *A. aureolus*, *A. viridinutans*, *A. arcoverdensis* a *A. siamensis* a „*A. acrensis*“ nebyly v klinickém materiálu zachyceny.

Aspergillus felis byl u člověka zachycen jako původce invazivní plicní aspergilózy (CCF 4557 - Portugalsko; NIHAV1 a NIHAV2-USA) (Coelho et al., 2011; Peláez et al., 2013; Vinh et al., 2009b) a osteomyelitidy (IFM 60053 - Japonsko). Další izoláty způsobily invazivní onemocnění plic a retrobulbární absces u kočky domácí (CBS 130245, FRR 5679 a FRR 5680 - Austrálie) (Barrs et al., 2012; Barrs et al., 2013; Katz et al., 2005).

Druh *A. udagawae* byl izolován jako původce keratitidy u člověka (IFM 59502 - Japonsko) (Shigeyasu et al., 2012), způsoboval invazivní aspergilózu (Balajee et al., 2007; Kano et al., 2013; Posteraro et al., 2011; Sugui et al., 2010); akutní respirační syndrom (ARDS) (Farrell et al., 2014) a oční infekci (Posteraro et al., 2011). V ČR byl tento druh zachycen jako pravděpodobný původce onychomykózy (CCF 4233, nehet na dolní končetině, žena, 53 let). Tento druh byl též zaznamenán u kočky domácí, u které způsobil oční aspergilózu (Kano et al., 2008; Kano et al., 2013; Katz et al., 2005).

1.4 Pohlavní systém v sekci *Fumigati*

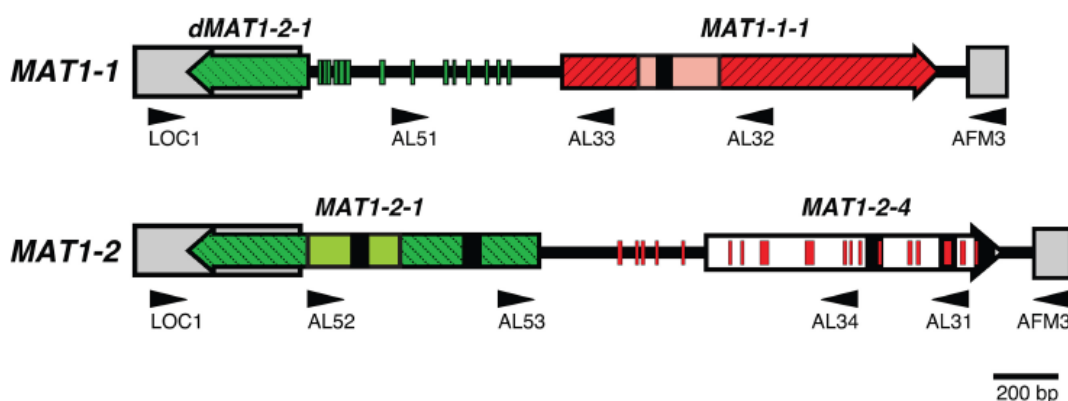
Molekulárně genetické pozadí pohlavního rozmnožování u rodu *Aspergillus* je velmi podrobně prozkoumané, jelikož byl tento rod používán jako modelový organismus pro studium této problematiky. Za esenciální v procesu indukce pohlavního cyklu a produkce pohlavních struktur se považují MAT geny (mating type genes) (Hiscock and Kües, 1999). Obsahují sekvence kódující DNA vazebné domény, které fungují jako transkripční faktory (Jacobsen et al., 2002). Jako transkripční aktivátor působí tzv. alfa doménu obsahující protein

kódovaný MAT1-1-1 genem. Ten kooperuje s dalšími proteiny specifickými pro sexuální rozmnožování (Coppin et al., 1997). Produktem MAT1-2-1 genu je tzv. HMG doména obsahující oblast bohatou na prolin, která je velmi podobná oblastem nalézaným u transkripčních aktivátorů (Coppin et al., 1997). In vitro bylo prokázáno, že samotná HMG doména je schopná vazby na DNA (Kronstad and Staben, 1997).

MAT geny jsou v genomu umístěny na tzv. MAT lokusu (mating type locus). U heterotalických druhů je v MAT lokusu přítomen jeden ze dvou MAT genů (MAT1-1 nebo MAT1-2). MAT geny jsou od sebe výrazně odlišné a jsou označovány jako idiomorfy (Metzenberg and Glass, 1990). U homotalických druhů jsou v MAT lokusu přítomny MAT1-1 i MAT1-2 geny.

V oblasti MAT1-1 a MAT1-2 lokusu mohou být v závislosti na konkrétním druhu přítomny různé MAT geny např. geny MAT1-1-1, MAT1-2-1, MAT1-2-4 atd. Druhově specifické jsou též geny, které k MAT idiomorfům přiléhají, pozice některých z nich jsou konzervativní a lze je využít pro navrhování primerů pro amplifikaci MAT genů.

Obr. 1.1 Znárodnění MAT1-1 a MAT1-2 lokusu u *A. lentulus* (Swilaiman et al., 2013)



Obrázek 1.1 ukazuje uspořádání genů v MAT1-1 a MAT1-2 lokusu, který má stejné uspořádání a strukturu jako bylo popsáno u *A. fumigatus* (Paoletti et al., 2005). Správná identifikace MAT genů je zásadní pro úspěšné párovací pokusy a následné nalezení pohlavního stádia (Swilaiman et al., 2013).

1.5 Další druhy s neznámou teleomorfou v sekci *Fumigati*

Sekce *Fumigati* obsahuje, kromě *A. viridinutans* řadu dalších popsaných druhů bez známé teleomorfy (*A. arcoverdensis*, *A. brevipes*, *A. brevistipitatus*, *A. conversis*, *A. duricaulis*, *A. fumigati*, *A. fumigati*affinis, *A. fumisynnematus*, *A. novofumigatus*, *A. unilateralis*,) (Hubka et al., 2013b;

Samson et al., 2007). V roce 2013, bylo popsáno pohlavní stádium *A. lentulus* (Swilaiman et al., 2013), který byl do té doby též považován za asexuální. V této práci se podařilo objevit pohlavní stádium druhu *A. turcosus* (nepublikovaná data).

1.6 Znaky a metody použitelné v deliminaci druhů v sekci *Fumigati* a komplexu *A. viridinutans*

Použití mikro- a makromorfologie k rozeznání druhů v sekci *Fumigati* je poměrně problematické napříč celou sekcí, včetně *A. viridinutans* a jeho nejpříbuznějších druhů. Podle provedených měření a pozorování se nedá makromorfologie, ani mikromorfologie anamorfního stádia aplikovat k rozeznání izolátů náležejících k již popsaným a hypotetickým nepopsaným druhům v komplexu *A. viridinutans* (Balajee et al., 2006; Nováková et al., 2014). Zahnutý měchýřek nesoucí fialidy (tzv. nodding head), který byl původně popsán jako znak typický pro *A. viridinutans* byl nalezen i u dalších příbuzných i fylogeneticky vzdálených druhů.

Jako potenciálně velmi použitelné se naopak zdají být znaky přítomné na pohlavním stádiu, zejména askosporách (velikost těla askospor, ekvatoriální hřebínky).

Při fyziologické charakterizaci druhů se u rodu *Aspergillus* využívá především maximální, případně i minimální růstová teplota (Balajee et al., 2007; Hubka et al., 2013a; Hubka et al., 2013b).

2. METODIKA

2.1 Zdroje izolátů

Celkem bylo v této práci použito 98 izolátů, jejichž původ (substráty, ze kterých byly získány, lokality, datum sběru) a přístupová čísla k sekvencím v databázi GenBank jsou uvedeny v Tabulce 3.1. Jednalo se především o druhy z komplexu *Aspergillus viridinutans* (*A. felis*, *A. arcoverdensis*, *A. viridinutans*, *A. udagawae*, *A. aureolus*, *A. wyomingensis*, *A. siamensis*), ale byly zde zařazeny také další heterothalické druhy sekce *Fumigati* (*A. nishimurae*, *A. marvanovae*, *A. turcosus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. novofumigatus* a další). Některé tyto druhy se známým pohlavní stádiem jsou heterothalické (*A. felis*, *A. udagawae*, *A. wyomingensis* sp. nov., *A. nishimurae*, *A. turcosus*-nepublikovaná data), některé homothalické (*A. aureolus*, *A. siamensis*). U části druhů nebylo zatím pohlavní stádium pozorováno a pravděpodobně se jedná o heterothalické druhy (*A. viridinutans*, *A. arcoverdensis*, *A. fumigatiaffinis*, *A. novofumigatus*, *A. marvanovae*). Kmeny byly izolovány v předchozích letech v ČR i zahraničí a získány jak z českých, tak zahraničních, veřejných či soukromých sbírek.

2.2 Kultivace, uchovávání kultur a fotodokumentace

Kultivace kmenů probíhala ve tmě při teplotě 25 °C, nejčastěji na agaru s maltózovým extraktem (MEA) či na sladínovém agaru (SL). Výrobci a složení médií je uvedeno v Tabulce 2.1. U některých izolátů byla testována schopnost růstu v rozmezí teplot 37 až 45 °C. Dlouhodobě byly kmeny uchovány v lednici (4 °C) na šikmých půdách (MEA, SL²). Většina izolátů byla uložena do Sbírký kultur hub (CCF - Culture Collection of Fungi) na katedře botaniky PřF UK v Praze, kde jsou uchovávány jako živé kultury, nebo jako lyofilizáty. S kulturami bylo zacházeno podle pravidel pro práci pro organismy skupiny BSL-2 (http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bmb15_sect_iv.pdf). Při práci byl používán flowbox, rouška a rukavice.

Fotodokumentace mikrostruktur byla provedena na mikroskopu Olympus BX-51 vybaveným digitálním fotoaparátem Olympus DP72. Petriho misky s koloniemi byly foceny fotoaparátem Cannon EOS 500D a plodnice binokulární lupou Olympus SZ61.

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) byla provedena Dr. Alenou Kubátovou, které byl dodán materiál pocházející z této práce. Konidiofory a plodnice s askosporami na MEA nebo OA byly fixovány parami tetraoxidu osmičelého po dobu 14 dnů v 5-10 °C.

Následně byly preparáty pozlacený pomocí přístroje Bal-Tec SCD 050. Vzoroký byly pozorovány elektronovým mikroskopem 6380 LV (JEOL).

Tab 2.1 Média použitá v této práci

Médium	Zkratka	Složení na 1000 ml destilované vody
agar s maltózovým extraktem	MEA(malt extract agar)	Malt extract 20 g (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie), glukóza 20 g (Lachner, Česká Republika), pepton 1 g, pH 5,6
ovesný agar	OA(oatmeal agar)	Difco (La Ponte de Claix, Francie), pH 6,0
bramborovo dextrózový agar	PDA(potato-dextrose agar)	Himedia (Mumbai, Indie), pH 5,6
sladinový agar	SL	2° Ballinga sladina 1000 ml, agar 20g (Dr. Kulich Pharma, Česká Republika), pH 5,2-5,5

2.3 Křížící pokusy

Pro křížící pokusy byla použita média MEA, OA a PDA a tři inkubační teploty - 25, 30 a 37 °C. Misky byly během prvních čtyř týdnů každý týden opětovně parafilmovány, aby se zabránilo vysychání. Inkubace probíhala ve tmě a trvala 6-12 (20) týdnů. Od třetího týdne byly misky každý týden kontrolovány s cílem zjištění zda jsou přítomné pohlavní struktury.

2.4 Izolace DNA

DNA byla izolována ze 4 dny starých monosporických kultur (metodika viz níže) komerční sadou ArchivePure DNA Yeast & Gram-+ Kit (5 PRIME) podle pokynů výrobce. Kvalita izolované DNA byla kontrolována na spektrofotometru Nanodrop ND-1000. Většinu DNA izolovala RNDr. Milada Chudičková.

2.5 PCR amplifikace a sekvenace

Pro amplifikaci, která byla prováděna v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf) byly nejčastěji používány následující programy:

Program č. 1: 94 °C/2 min (1×), 94°C/30 s, 55 °C/1 min, 72°C/1 min (35×), 72 °C/10 min (1×).

Program č. 2 (Touchdown): 94 °C/2min (1×), 94 °C/30s, 66 °C – 60 °C/45s, 72 °C/1min (5×), 94 °C/30s, 60 °C/45s, 72 °C/45s (30×), 72 °C/10 min (1×).

PCR reakční směsi byly připraveny v objemech 25 µl:

deionizovaná H₂O 15 µl

dNTP's (2 mM) 2,5 µl

PerfectTaq PCR pufr 10x (5 PRIME) 2,5 µl

primery (10 pM/µl), každý 2 µl

PerfectTaq polymeráza (5 PRIME) 0,2 µl

DNA 1 µl

K amplifikaci byla většinou použita PerfectTaq polymeráza (5 PRIME, Německo), nebo Maximo Taq DNA polymeráza (GeneOn, Německo), u obtížně amplifikovatelných vzorků Platinum® Taq DNA Polymeráza (Invitrogen, USA), všechny s příslušnými pufrý. Sekvence vzorků amplifikovaných polymerázou Platinum® Taq neměla až na výjimky dobré výsledky.

K amplifikaci fragmentů genů *benA*, *caM*, *act*, *RPB2*, *MAT1-1*, *MAT1-2* a ITS oblasti byly použity primery uvedené v Tabulce 2.2.

Pro amplifikaci genu *benA*, kódujícího β-tubulin, byly použity kombinace primerů T10 s Bt2b, Bt2a s Bt2b a Bt2a s T22 a výše popsany program č. 1.

Gen *caM*, který kóduje kalmodulin, byl amplifikován primery CF1M a CF4, nebo CF1L a CF4. U obtížně amplifikovatelných vzorků byly vyzkoušeny i kombinace primerů cmd5 s CF4, CF1L s cmd6 a CF1M s cmd6. Nejvhodnější byla kombinace CF4 s CF1M.

Pro gen *act*, kódující aktin, byly použity primery ACT-512F a ACT-783R a program č. 1, ve kterém byl annealing zvýšen na 60°C.

Gen *RPB2*, který kóduje velkou podjednotku RNA polymerázy II, byl amplifikován primery fRPB2-5F s fRPB2-7cR, standardně programem č.1 a při nedostatečné specificitě nasedání primerů (více produktů na gelu) programem Touchdown, ve kterém je během prvních pěti cyklů snižována teplota annealingu během každého cyklu o 1 °C. Z důvodu obtížné amplifikace některých vzorků byly na základě již dříve amplifikovaných sekvencí

navrženy nové primery, z nichž nejlépe fungovaly kombinace FumF1 s FumR2 a FumF2 s FumR1.

Amplifikace části *MAT1-1* genu, která kóduje alfa box doménu genu, byla provedena primery Alpha1 s Alpha2. K amplifikaci části *MAT1-2* genu, která kóduje HMG doménu (High Mobility Group box), byly použity primery HMG1 s HMG2. V obou případech byl používán program Touchdown.

Pro amplifikaci ITS rDNA byly použity primery ITS1F s NL4 nebo LR6 s NL4 a program č.1.

Purifikace PCR produktů a sekvenování byly řešeny servisně u společnosti Macrogen Europe (Holandsko), nebo v Středisku sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. Sekvence byla provedena oběma koncovými primery.

Tab. 2.2 Primery použité k amplifikaci fragmentů studovaných genů

Gen	Forward primer	Reverz primer
<i>benA</i>	T10 (ACGATAGGTTACCTCCAGAC)	Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)
	Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)	T22 (TCTGGATGTTGTTGGGAATCC)
<i>RPB2</i>	fRPB2-5F (GAYGAYMGWGATCAYTTYGG)	fRPB2-7cR (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT)
	FumF1 (GGCCAGTACCTTGACYGGAG)	FumR1 (TCIAGRTCCTTCIGGRGTCAT)
	FumF2 (CTCRCAGGTGYTGTCWCGTT)	FumR2 (GGCRTMGACATACTCGACAA)
	FumF3 (GTCACATCTTCGCCGTACCA)	FumR3 (GACCAAICCATCCCAICCGA)
		FumR4 (TTCCTCMGGRAGAGCGTAAC)
<i>act</i>	ACT-512F (ATGTGCAAGCCGTTTTTCGC)	ACT-783R (TACGAGTCCTCCTGGCCCCAT)
<i>caM</i>	CF1M (AGGCCGAYTCTYTGACYGA)	CF4 (TTYTGTCATCATRAGYTGGAC)
	CF1L (GCCGACTCTTTGACYGARGAR)	cmd6 (CCGATAGAGGTCATAACGTGG)
	cmd5 (CCGAGTACAAGGAGGCCTTC)	
<i>ITS</i>	ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA)	NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG)
	LR6 (CGCCAGTTCTGCTTACC)	
<i>MAT1-1</i>	Alpha1 (CTGGAGGAGCTTCTGCAGTAC)	Alpha2 (GGAGTACGCCTTCGCGAG)
<i>MAT1-2</i>	HMG1 (CTCTTGTGGCAGGATGCTCT)	HMG2 (TTGCTGGTAGAGGGCAGTCT)

2.6 Úprava sekvencí

Pro práci se sekvencemi byl použit program Bioedit v. 7.0.0 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

2.7 Konstrukce fylogenetického stromu

Pro sestavení fylogenetického stromu (kladogramu) byly sekvence alignovány za použití algoritmu ClustalW (Thompson et al., 1994). Kladogram byl vytvořen Bayesovskou analýzou v programu MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003) metodou Markov Chain Monte Carlo se dvěma paralelními běhy po čtyřech řetězcích a teplotě 1.0. Alignment byl rozdělen na 20 samostatných segmentů (*partitions*), které zahrnovaly jednotlivé exony a introny a v případě genu *RPB2*, obsahujícího pouze jeden přibližně 950 pozic dlouhý exon, i jednotlivé pozice v tripletu. Pro všechny *partitions* byl spočítán nejvhodnější substituční model v programu MEGA6 (Kumar et al., 2008). Model K2+G či K2+I byl vybrán jako první či druhý nejvhodnější pro všechny segmenty a proto byl první z nich použit ve všech případech. Analýzy jednotlivých genů běžely 100000 generací a "burning" (část řetězce, která se po analýze odstraňuje) byl stanoven pomocí programu Tracer v. 1.5 (Drummond and Rambaut, 2007) a následně byl vygenerován fylogenetický strom („50% majority rule consensus“). Maximum Likelihood analýza byla počítána v programu MEGA6 za použití modelu K2+G a 1000 bootstrapových výběrů. Podpory větví byly získány ze stromu s nejvyšším log likelihood skóre (-3986.0185).

2.8 Monosporická izolace

Monosporické izoláty, byly získány vyséváním suspenzí askospor kříženců na misky s agarovým médiem MEA pomocí ředící řady. Do zkumavek bylo vloženo několik plodnic, které byly následně rozdrceny pomocí skleněné trubičky nebo skleněných kuliček a následně vortexovány po dobu 1 min (1500 ot/min). Zkumavky byly po té inkubovány 30 minut při 70°C. Toto zahřátí zničí všechny tenkostěnné konidie (testováno u všech linií komplexu *A. viridinutans*) a zároveň aktivuje termorezistentní askospory u druhů sekce *Fumigati*, čehož bylo využíváno již v dřívějších studiích (Sugui et al., 2011). Následně byla v takto ošetřených vzorcích upravena koncentrace spor pomocí počítání v Bürkerově komůrce. Výsledné koncentrace (přibližně 100 spor v objemu 100 µl) byly vysévány na misky s agarovým

médiiem ve třech koncentracích (neředěné, ředěné 10× a 100×). Misky byly následující dny sledovány a po cca 24-48 hodinách byly patrné jednotlivé kolonie. Ty byly sledovány pod optickým mikroskopem přímo na Petriho misce a pokud bylo patrné, že kolonii dala vznik pouze jedna askospora, byla tato kolonie jehlou odebrána a inokulována na jinou Petriho misku s médiem MEA.

2.9 Testování citlivostí k antimykotikům

Testování provedla MUDr. Lucie Svobodová (Ústav Mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci) pomocí metody Sensititre YeastOne (Yeast-One s Anidulafunginem & Micafunginem, výrobce: TREK Diagnostic Systems LTD). Metoda je založená na principu mikrodilučního kolorimetrického testu. Test se skládá z mikrotitrační destičky s jamkami, ve kterých je naneseo vysušené antimykotikum v ředění odpovídajícím standardu CLSI. K rehydrataci antimykotik dochází přidáním 100 µl inokula o koncentraci $1,5 \times 10^3$ CFU/ml. Indikátorem v testu je Almar blue. Výsledkem testu je změna barvy z původní modré na růžovou, což značí růst houby a tedy její necitlivost k antimykotiku při dané koncentraci. Vyhodnocení probíhá spektrofotometriky. V našem případě byl test inkubován po dobu 48 hodin při teplotě 35 °C.

2.10 Statistické zpracování dat

Pro statistické analýzy byl použit volně přístupný program Past (Hammer et al., 2009).

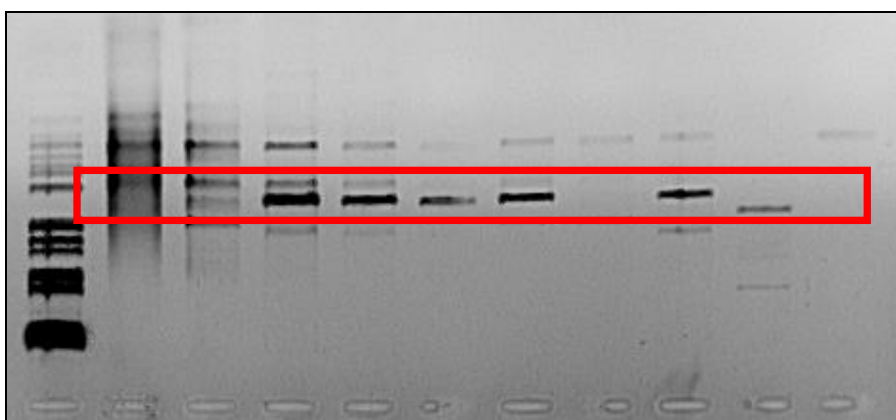
3. VÝSLEDKY

3.1 Molekulárně genetická část

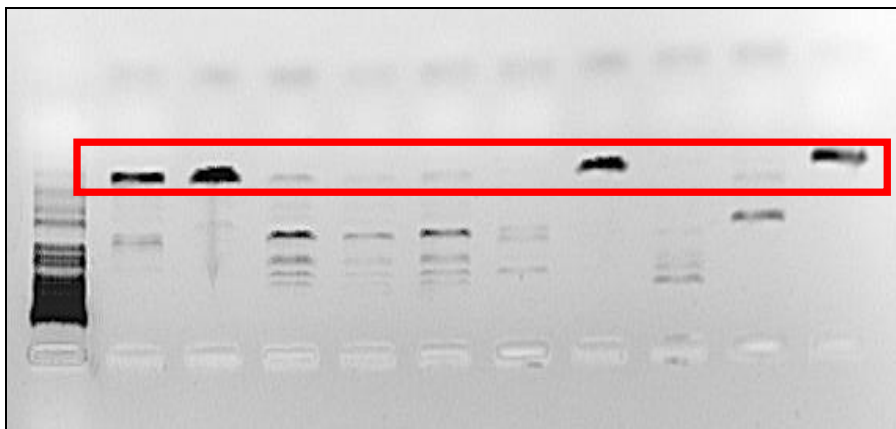
3.1.1 DNA sekvenování, PCR

V této práci bylo analyzováno celkem 98 izolátů z komplexu *A. viridinutans* a blízké příbuzných druhů ze sekce *Fumigati*. Substráty, ze kterých byly izoláty získány, lokality a přístupová čísla k sekvencím v databázi GenBank jsou uvedeny v Tabulce 3.1. Nejvíce kmenů bylo izolováno z půdy a z výsypek, dále pak z klinického materiálu (člověk, zvířata). Z jiných substrátů byly nálezy spíše sporadické.

U většiny izolátů byly pro fylogenetickou analýzu získány sekvence 4 genů (*BenA*, *caM*, *act*, *RPB2*). Do fylogenetické analýzy byly zahrnuty i další izoláty, jejichž sekvence byly získány z databáze GenBank (Tab. 3.2). Pomocí PCR bylo určeno pohlavní ladění izolátů (Tab. 3.1) na základě přítomnosti či absence fragmentů *MATI-1* (přibližně 1000 bp) a *MATI-2* (přibližně 500 bp) genů na elektroforetogramu (Obr. 3.1 a 3.2 - elektroforetogram před optimalizací PCR). PCR bylo dále optimalizováno a správnost produktů byla ověřena sekvenačně u vybraných izolátů.



Obr. 3.1
Elektroforetogram
s fragmenty *MATI-1*
genu



Obr. 3.2
Elektroforetogram
s fragmenty *MATI-2*
genu

Délky jednotlivých genů byly odlišné, stejně tak i počty intronů a exonů. Gen *RPB2* obsahoval pouze 1 exon a délka produktu i výsledného alignmentu (ClustalW, MEGA6) byla 973 bazí. Fragment genu pro aktin měl délku v rozmezí 319-331 bazí a obsahoval 2 introny a 2 exony, délka alignmentu byla 355 pozic. Fragment genu pro beta tubulin měl délku v rozmezí od 386 do 395 bazí, obsahoval 3 introny a 3 exony, alignment měl celkovou délku 404 pozic. Amplifikovaný úsek genu *caM* měl 676-689 bazí, obsahoval 3 introny a 4 exony a délka alignmentu byla 722 pozic.

Tabulka 3.3 udává počty unikátních haplotypů v komplexu *A. viridinutans* pro každý gen. Nejvyšší rozlišovací schopnost měl gen *caM*, který mezi 83 sekvencemi rozlišil 50 haplotypů. Druhou nejvyšší rozlišovací schopnost měl gen *RPB2*.

Tab. 3.3 Počty unikátních haplotypů pro každý lokus

Druh (počet izolátů)	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>RPB2</i>	<i>act</i>
<i>A. arcoverdensis</i> (13)	2	6	7	6
<i>A. aureolus</i> (6)	3	1	2	2
<i>A. felis</i> (22)	14	16	13	13
<i>A. siamensis</i> (2)	1	2	1*	1
<i>A. udagawae</i> (23)	10	16	17	7
<i>A. viridinutans</i> (1)	1	1	1	1
<i>A. wyomingensis</i> (14)	2	4	5	3
„ <i>A. acrensis</i> “ (2)	2	2	1*	1
Celkem (83)	34	50	47	24

*sekvence dostupná jen pro 1 izolát

Tab. 3.1 Seznam izolátů použitých v této práci s jejich původem a přístupovými čísly sekvencí v databázi GenBank

Druh / Číslo izolátu	Substrát	Lokalita	Rok izolace	MAT	ITS	BenA	act	caM	RPB2
<i>A. felis</i>									
CBS 130245 ^T	rohovka, kočka	Austrálie	<2013	MAT1-2	KF558318	JX021700	sekv.*	JX021715	KJ914735
CBS 458.75, KACC 41203	půda	Indie	<1971	MAT1-2		AY685178	DQ094853	HG426048	sekv.
CCF 2937	půdní vzorek z výsypky	Česká Republika, okolí Kladna, kamenouhelný důl Vítek	1993	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4002, AK196 07	substrát starého odvalu z dolu na stříbro	Česká Republika, Markovičky, okolí Kutné Hory	2007	MAT1-2	FR733865	FR775350	sekv.	sekv.	FR732055
CCF 4003, AK 27/07	povrchová půdní krusta bývalé sedimentační nádrže	Česká Republika, Chvaletice	2007	MAT1-2	FR733866	FR775349	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4171, F39, CMF ISB 2162, IFM 60852	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933350	sekv.	HF933402	sekv.
CCF 4148, F22, CMF ISB 1975, IFM 60868	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HE578084	sekv.	HF933404	sekv.
CCF 4376, AK 102/11	půdní vzorek z výsypky	Česká Republika, okolí Abertam, 2 km JV od Potůčků, Krušné hory	2011	MAT1-1		HF933380	sekv.	HF933422	sekv.
CCF 4497, F6, CMF ISB 1936	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933349	sekv.	HF933401	sekv.
CCF 4498, F49, IFM 60853	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933351	sekv.	HF933403	sekv.
CCF 4557, Viridi-Pinheiro	bronchoalveolární laváž, chronická invazivní aspergilóza, muž, 56 let	Španělsko	2007	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4559, IFM 60053	kostní dřev, absces v blízkosti stehenní kosti, osteomyelitis, muž, 40 let	Japonsko	2012	MAT1-1		HF933382	sekv.	HF933421	sekv.
CCF 4561, IFM 59502, I56	rohovka, keratomykóza, žena, 26 let	Japonsko	2011	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4562, IFM 59503, I57	rohovka, keratomykóza, žena, 26 let	Japonsko	2011	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4570, IFM 54303	potraviny	Japonsko	<2007	MAT1-1	AB250780	AB248299	sekv.	AB259973	sekv.
FRR 5679	hrudní absces, kočka	Austrálie	<2005	MAT1-2		AY590129	sekv.	sekv.	sekv.
FRR 5680	retrobulbární absces, kočka	Austrálie	<2005	MAT1-2		HF933381	sekv.	HF933420	sekv.
IFM 55266	pľíce	Japonsko	neznámý	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
IFM 59564	pacient	Japonsko	2011	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.

IMI 182127, KACC 41614	<i>Pinus caribea</i>	Srí Lanka	<1974	neidentif.		AF134777	DQ094850	DQ094888	sekv.
NIHAV1, viridi 1720	plicní tkáň, muž, 14 let	USA	2004	MAT1-1		GQ144441	sekv.	GQ144442	sekv.
NIHAV2, viridi 2594	plicní tkáň, muž, 8 let	USA	2004	MAT1-1		GQ144440	sekv.	GQ144443	sekv.
CCF 4665, IFM 57289	půda z pastviny	Brazílie, stát Pernambuco, Rio Fomosa	25. 10. 2001	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
<i>A. arcoverdensis</i>									
CCF 4560, IFM 59922	půda	Čína	2008	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4569, IFM 59923	půda	Čína	2008	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4574, CBS 121595, FRR 1266, DTO 19F2, SZMC 2091	písčítá půda	Austrálie, Warrumbungle National Park	1971	MAT1-1	JX021672	sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
IFM 61333, 10-2-3	půda	Brazílie	2011			sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
IFM 61334 ^T , 6-2-32	půda	Brazílie	2011	MAT1-1		AB818845	AB818867	AB818856	sekv.
IFM 61337, 1-1-34	půda	Brazílie	2011	MAT1-1		AB818846	AB818868	AB818857	sekv.
IFM 61338, 6-2-3	půda	Brazílie	2011	MAT1-2		AB818847	AB818869	AB818858	sekv.
IFM 61339, 2-1-11	půda	Brazílie	2011	MAT1-1		AB818848	AB818870	AB818859	sekv.
IFM 61340, 7-2-33	půda	Brazílie	2011	MAT1-1		AB818849	AB818871	AB818860	sekv.
IFM 61345, 3-2-2	půda	Brazílie	2011	MAT1-2		AB818850	AB818872	AB818861	sekv.
IFM 61346, 4-2-14	půda	Brazílie	2011	MAT1-2		AB818851	AB818873	AB818862	sekv.
IFM 61349, 4-2-9	půda	Brazílie	2011	MAT1-2		AB818852	AB818874	AB818863	sekv.
IFM 61362, 5-2-2	půda	Brazílie	2011	MAT1-2		AB818853	AB818875	AB818864	sekv.
<i>A. viridinutans</i>									
CCF 4382 ^T , IFM 47045 ^T , IMI 367415 ^T , NRRL4365 ^T , NRRL576 ^T , CBS 127.56 ^T	trus králíka	Austrálie	<1954	MAT1-1	EF669978	EF669834	sekv.	EF669904	EF661238
<i>A. udagawae</i>									
B3	půda, žízalí exkrementy	Česká Republika, Hostěradice	únor 2012			sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4660, IFM 55207	půda	neznámé		MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4661, IFM 54745	půda	Čína, Shaanxi		MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4663, IFM 54131	půda	Čína, Shaanxi		MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4475, F2	půda prerie	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933366	sekv.	HF933407	sekv.
CCF 4476, F32	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933371	sekv.	HF933412	sekv.

CCF 4478, F66, CMF ISB 2193	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Gillette	2011	MAT1-2		HF933376	sekv.	HF933416	sekv.
CCF 4479, F70, CMF ISB 2189	půdní vzorek z výsypky	USA, Illinois	2011	MAT1-2		HF933377	sekv.	HF933417	sekv.
CCF 4481, F83	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Gillette	2011	MAT1-2		HF933379	sekv.	HF933419	sekv.
CCF 4491, CMF ISB 1971, F3	půda prémie	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933370	sekv.	HF933411	sekv.
CCF 4492, F21	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933368	sekv.	HF933409	sekv.
CCF 4494, F44	půda prémie	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933374	sekv.	HF933413	sekv.
CCF 4502, F11, CMF ISB 1972	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2	HE578061	HE578075	sekv.	HF933405	sekv.
IFM 46973 ^T , CBS 114217 ^T , KACC 41155 ^T	půda plantáže	Brazílie, stát Sao Paulo	23.8.1993	MAT1-2	JN943591	AB248302	sekv.	AY689372	sekv.
CCF 4662, IFM 5058	člověk	neznámá		MAT1-1	AB250402	AB248292	sekv.	AB260927	sekv.
CCF 4664, IFM 54132	půda	Čína, Shaanxi		MAT1-2		AB201358	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4667, IFM 53868	člověk	neznámá		MAT1-2	AB250405	AB248295	sekv.	AB259971	sekv.
CCF 4668, IFM 62155	půda	neznámá		MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4671, IFM 51744	člověk	neznámá	2002	MAT1-1	AB250403	AB248293	sekv.	AB260928	sekv.
F20, CMF ISB 2509	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933367	sekv.	HF933408	sekv.
F37	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Gillette	2008	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
F76, CMF ISB 2190	půdní vzorek z výsypky	USA, Indiana	2011	MAT1-1		HG426055	sekv.	HG426049	sekv.
CCF 4558 ^T , IFM 46972 ^T , CSB 114218 ^T , CMB FA 0703 ^T , KACC 41156 ^T	půda z plantáže	Brazílie, stát Sao Paulo	1993	MAT1-1	AB185265	AB248303	sekv.	AY689373	sekv.
"A. acrensis" sp. nov.									
CCF 4666, IFM 57290	půda tropického deštného lesa	Brazílie, stát Amazonas, Manaus	11.11.2001	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4670, IFM 57291	půda z pastviny, dobytčí farma	Brazílie, stát Acre, Xapuri	6.11.2001	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	chybí
A. aureolus									
CCF 4571, IFM 53615	půda pastviny v tropickém deštném lese	Brazílie, stát Acre, Cruzeiro do Sul	2001	homothal.		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4644 ^T , IFM 47021 ^T , CBS 105.55 ^T , NRRL2244 ^T , IMI 06145 ^T , KACC 41095 ^T	půda	Ghana	1950	homothal.		AF057319	sekv.	AY689369	sekv.
CCF 4645, IFM 46584	půda	Brazílie, stát Sao Paulo	10.8.1993	homothal.		HG426057	sekv.	HG426050	sekv.
CCF 4646, IFM 46935	půda	neznámá	neznámý	homothal.		HG426058	sekv.	HG426051	sekv.

CCF 4647, IFM 46936	půda	Brazílie, stát Sao Paulo	10.8.1993	homothal.		HG426059	sekv.	HG426052	sekv.
CCF 4648, IFM 53589	půda	Brazílie		homothal.		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
A. wyomingensis sp. nov.									
CCF 4169, CMF ISB 2486, F24	půda	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933354	sekv.	HF933394	sekv.
CCF 4170, F12	půda	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933356	sekv.	HF933392	sekv.
CCF 4383, IMI 133982	půda	Rusko	<1968	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4411, CMF ISB 1977, IFM 60854, F5	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HE578077	sekv.	HF933389	sekv.
CCF 4412, F9	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933352	sekv.	HF933390	sekv.
CCF 4413, F10	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933360	sekv.	HF933391	sekv.
CCF 4414, CMF ISB 1974, IFM 60856, F13	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933353	sekv.	HF933393	sekv.
CCF 4415, CMF ISB 2487, F28	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933357	sekv.	HF933395	sekv.
CCF 4416 ^T , CMF ISB 1976 ^T , CBS 135455 ^T , F29 ^T	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933358	sekv.	HF933396	sekv.
CCF 4417 ^T , CMF ISB 2494 ^T , CBS 135456 ^T , F30 ^T	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933359	sekv.	HF933397	sekv.
CCF 4418, CMF ISB 2162, IFM 60855, F31	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933355	sekv.	HF933398	sekv.
CCF 4419, CMF ISB2495, F53	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-2		HF933361	sekv.	HF933399	sekv.
CCF 4420, CMF ISB 2491, F60	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Glenrock	2010	MAT1-1		HF933362	sekv.	HF933400	sekv.
CCF 4563, IFM 59681	půda	Čína	2008	MAT1-2		HG426056		HG426053	sekv.
A. siamensis									
IFM 59793 ^T	půda	Thajsko	2008	homothal.		AB646989	sekv.	AB776704	sekv.
CCF 4686, IFM 61157, KUFC 6397	půda, termítí chodbičky	Chiang Mai, Thailand	2009	homothal.		sekv.	sekv.	sekv.	chybí
A. marvanovae									
CCF 4037 ^T , NRRL 62486 ^T , IBT 31279 ^T , IFM 60873 ^T , CCM 8003 ^T	voda s vysokým obsahem kyseliny borité	Česká Republika, jaderná elektrárna Dukovany	1986	MAT1-1	HE974450	HE974387	HE974401	HE974389	HE974396
A. turcosus									
CCF 4693, KACC 42090, IBT 27920	klimatizace	Korea, Inchen	2005	MAT1-1	HF545009	DQ534142	DQ534178	DQ534147	sekv.
CCF 4694, KACC 41955, CBS 117265, IBT 3016	klimatizace v autě	Korea, Soul	2005	MAT1-1	HF545010	sekv.	DQ534180	sekv.	sekv.

NRRL 58107, ZJ 766	ovzduší v budově	USA, Missouri	2008	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
IBT 27921 ^T , KACC 42091 ^T	klimatizace	Korea, Soul		MAT1-1	HF545008	DQ534143	DQ534179	DQ534148	HF545310
<i>A. nishimurae</i>									
CBS 117265, IBT 3016				MAT1-2	HE974451	DQ534154	DQ534110	DQ534163	HE974395
IFM 54133, IBT 29024, CBM-FA-912	lesní půda	Keňa, Nairobi	15. 10. 1974	MAT1-1	HE974449	AB201360	HE974404	HE974392	HE974393
IFM 53610, CBM-FA-932	neznámý	neznámá	neznámý	MAT1-1	HE974448	AB201361	HE974403	HE971391	HE974394
<i>A. novofumigatus</i>									
CCF 4695 ^T , KACC 41934 ^T , CBS 117520 ^T , IBT 16806 ^T	půda	Equador	neznámý	MAT1-2		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4696, KACC 41937, CBS 117519, IBT 16755	půda	Equador	neznámý	MAT1-1		sekv.	sekv.	sekv.	sekv.
CCF 4078, CMF ISB 1811	půda	Španělsko	2009	MAT1-1	FR733874	FR775377	sekv.	FR839688	HE578105
<i>A. fumigatiaffinis</i>									
CCF 4482, CMF ISB 2158, F35	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Gilette	2008	MAT1-2		HE578083	sekv.	HF933384	sekv.
CCF 4499, CMF ISB 2188, F82	půdní vzorek z výsypky	USA, Wyoming, Gilette	2011	MAT1-2		HF933348	sekv.	HF933385	sekv.
CCF 4116, CMF ISB 1942, F1	půda	Španělsko, Málaga	2010	MAT1-1	HE578059	HE578074	sekv.	HE578096	HE578104

*sekvence získané v této práci, ale zatím neuložené v databázi GenBank

Tab. 3.2 Další izoláty, jejichž sekvence byly použité v této práci

Druh	Izolát	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>RPB2</i>	<i>act</i>
<i>A. duricaulis</i>	CBS 481.65; ATCC 16900; IMI 172282; JCM 01735; IBT 23177; NRRL 4021; VKM F-3572; WB 4021; KACC 41137	EF669827	EF669897	EF669758	DQ094854
<i>A. fumigatus</i>	IMI 016152; Thom 118; QM 1981; WB 163; CBS 133.61; NRRL 163; ATCC 1022; LSHB Ac71; NCTC 982; KACC 41143	EF669791	EF669860	EF669719	
<i>A. lentulus</i>	FH5; KACC 41940; NRRL 35552; IBT 27201	EF669825	EF669895	EF669756	DQ094873
<i>A. unilateralis</i>	CBS 126.56; ATCC 16902; IFO 8136; IMI 062876; NRRL 577; QM 8163; WB 4366; WB 4779; IBT 3210; KACC 41140	EF669852	EF669923	EF669784	DQ094847
<i>N. aurata</i>	CBS 466.65; ATCC 16894; IFO 8783; IMI 075886; NRRL 4378; QM 7860; WB 4378; IBT 3028	EF669835	EF669905	EF669766	DQ534112
<i>N. australensis</i>	CBS 112.55; IMI 061450; NRRL 2392; IBT 3021; WB 2392; Warcup SA14	EF669811	EF669880	EF669741	DQ534141
<i>A. fenneliae</i>	AF4, CBS 599.74, NRRL 5535, ATCC 24326, KACC 41150 (A); AF5, CBS 598.74, NRRL 5534, ATCC 24325, KACC 41125 (a)	EF669850 EU014108	EF669921 EF669920	EF669782 EF669781	DQ114128 DQ534121
<i>N. fischeri</i>	CBS 544.65; ATCC 1020; DSM 3700; IMI 211391; NRRL 181; QM 1983; Thom 4651.2; WB 181; IBT 3018; KACC 41182	EF669796	EF669865	EF669724	DQ094863
<i>N. glabra</i>	CBS 111.55; ATCC 16909; IFO 8789; IMI 061447; NRRL 2163; QM 1903; WB 2163; KACC 41617	EU014107	EU014120	EF669736	DQ534183
<i>N.pseudofischeri</i>	NRRL 20748; CBS 208.92	EF669805	EF669874	EF669734	DQ534187
<i>N. quaricineta</i>	CBS 135.52; ATCC 16897; IMI048583; NRRL 2154; QM 6874; WB2154	EF669806	EF669875	EF669735	DQ534132
<i>N. spathulata</i>	NHL 2948, CBS 408.89, IMI 308593, NRRL 20549, KACC 41174 (A); NHL 2949, CBS 409.89, IMI 308593, NRRL 20550, KACC 41131 (a)	EF669803 EF669804	EF669872 EF669873	EF669731 EF669732	DQ534138 DQ534139
<i>N. spinosa</i>	CBS 483.65; ATCC 16898; IFO 8782; IMI 211390; NRRL 5034; WB 5034; IBT 3022; KACC 41162	EF669844	EF669914	EF669775	DQ094869
<i>N. stramenia</i>	CBS 498.65; ATCC 16895; IFO 9611; IMI 172293; WB 4652; NRRL 4652	EF669840	EF669910	EF669771	DQ534188
<i>A. cervinus</i>	CBS 196.64	FJ491634	FJ491595	JN121452	

3.1.2 Fylogenetická analýza

Fylogenetický strom založený na sekvenačních datech ze 4 genů (*BenA*, *caM*, *act*, *RPB2*) obsahující 116 izolátů byl vytvořen Bayesovskou analýzou v programu MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Alingment měl celkovou délkou 2454 pozic, ze kterých bylo 941 variabilních. Pořadí genů v alingmentu a rozhraní intonů a exonů bylo následující:

act exon1 = 1-29
act intron1 = 30-263
act exon2 = 264-294
act intron2 = 295-355
benA intron1 = 356-389
benA exon1 = 390-431
benA intron2 = 432-527
benA exon2 = 528-582
benA intron3 = 583-652
benA exon3 = 653-759
caM exon1 = 760-791
caM intron1 = 792-881
caM exon2 = 882-897
caM intron2 = 898-1034
caM exon3 = 1035-1166
caM intron3 = 1167-1246
caM exon4 = 1247-1481
RPB2 exon1 = 1482-2454

Získaný fylogenetický strom ukazuje (Obr. 3.3), že komplex *Aspergillus viridinutans* obsahoval 8 dobře podpořených linií reprezentující 6 heterothalických druhů (*A. wyomingensis* sp. nov., „*A. acrensis*“, *A. udagawae*, *A. felis*, *A. viridinutans* a *A. arcoverdensis*) a 2 homothalické druhy (*A. siamensis* a *A. aureolus*).

Analýza konkordance podle GCPSR konceptu (shoda mezi stromy založenými na jednotlivých genech - data nezařazena do diplomové práce) (Dettman et al., 2006; Taylor et al., 2000) byly jako fylogenetické druhy podpořené 2 linie v rámci větve označené jako *A. felis* (Obr. 3.3). Tyto linie byly provizorně označeny jako „*felis 1*“ a „*felis 2*“ (Obr. 3.3). Větev „*felis 2*“ obsahovala izoláty IFM 55266, CBS 458.75, NIHAV1, NIHAV2, IFM 59502, IFM 59503, IMI 182127 a IFM 57289. Větev „*felis 1*“ obsahovala všechny zbývající izoláty *A. felis*. I další hlubší větve těchto dvou hlavních větví *A. felis* měly dobrou podporu, proto by s ohledem pouze na molekulární data mohly tyto linie reprezentovat několik druhů. Vzájemným úspěšným křížením izolátů z vzdálených větví, a testováním citlivostí k antimykotikům (dvě hlavní větve se v citlivosti k žádnému antimykotiku signifikantně

nelišily) se zdá být pravděpodobné, že se jedná pouze o jeden druh s velkou vnitrodruhovou variabilitou. Též morfologické znaky nebyly mezi jednotlivými větvemi odlišné.

Druh *A. udagawae* představoval jeden široký fylogenetický druh, s několika vnitřními větvemi. Jeho mezidruhové hranice byly též podpořeny křížícími experimenty (viz níže), na základě úspěšných křížení izolátů jednotlivých větví, stejně tak i morfologickou odlišností pohlavních struktur od ostatních druhů.

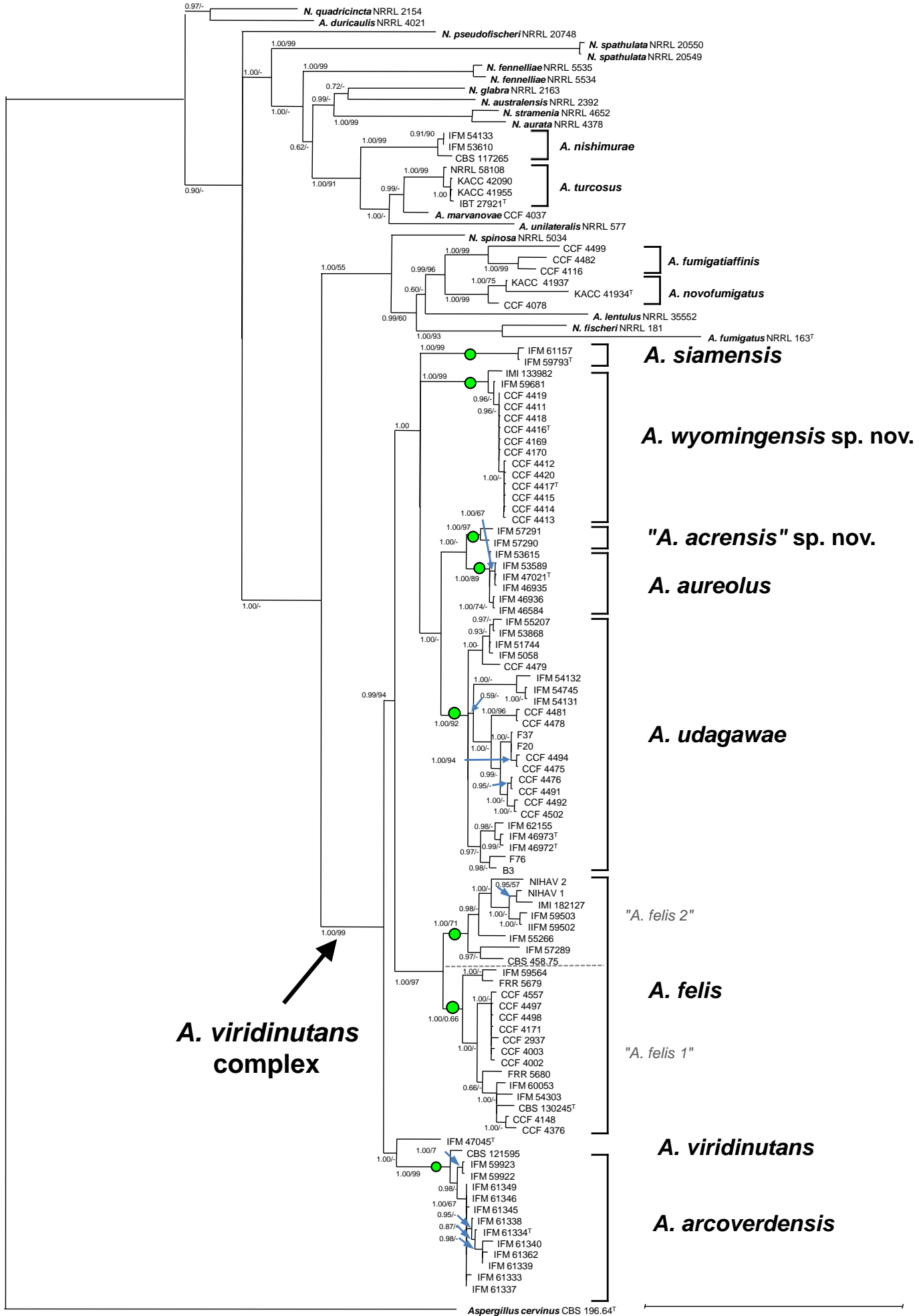
Dva z šesti heterothalických druhů představovaly nepopsané druhy. Jednalo se o druhy *A. wyomingensis* a „*A. acrensis*“. Druh *A. wyomingensis* byl popsán naší skupinou v roce 2013 (Nováková et al., 2014) na základě dat z této práce. Popsání druhu *A. wyomingensis* bylo podpořeno fylogenetickou analýzou a křížícími experimenty. Jednotlivé izoláty v rámci této větve se mezi sebou křížily a pohlavním procesem vzniklé askospory se významně lišily velikostí od askospor jiných druhů komplexu.

Nová fylogenetická linie, sesterská druhu *A. aureolus*, bude popsána později, a nese zatím provizorní pracovní jméno „*A. acrensis*“ podle lokality izolace. Na rozdíl od druhu *A. aureolus* je tento druh heterothalický a morfologicky podobný *A. udagawae*. Pohlavní stádium se indukovat nepodařilo.

Pohlavní stádium heterothalického druhu *A. arcoverdensis* se nepodařilo pozorovat. Jeho vymezení je však podle fylogenetického stromu poměrně zřetelné. *Aspergillus viridinitans* s. str. představuje sesterský druh *A. arcoverdensis* (Obr. 3.3).

Aspergillus siamensis a *A. aureolus* představovaly jedině dva homothalické druhy komplexu.

Obr. 3.3 Fylogenetický strom ukazující vzájemné vztahy druhů uvnitř komplexu *A. viridinitans* a pozici komplexu vzhledem k dalšími druhy ze sekce *Fumigati*. Statistické podpory jsou uvedeny posteriorní pravděpodobnosti (pp z bayesovské analýzy) a bootstrapové podpory (%) z Maximum likelihood analýzy. Uvedeny jsou jen podpory přesahující 0.50 pp a 50 %. *Aspergillus cervinus* CBS 196.64 byl zvolen jako outgroup. Fylogenetické druhy podle GCPSR konceptu jsou označeny zelenými kruhy.



3.2 Křížící experimenty

U většiny izolátů byla identifikována MAT1-1 nebo MAT1-2 idiomorfa. Kříženy byly opačně laděné izoláty v rámci hlavních větví i mezi vzdálenými větvemi fylogenetického stromu (Obr. 3.3). Podmínky vhodné pro tvorbu pohlavního stádia - plodnic (telomorfy) u jednotlivých druhů byly odlišné. Plodnice u *Aspergillus felis* byly přítomné ve všech testovaných teplotách (25, 30, 37 °C) i na všech médiích (MEA, OA, PDA). U *A. udagawae* a *A. wyomingensis* pouze na MEA a OA v 25, 30 a 37 °C. *Aspergillus wyomingensis* tvořil plodnice na OA ve větším počtu kombinací než na MEA. U *A. felis* bylo na OA přítomno větší množství plodnic než na MEA. Pro indukci teleomorfy bylo obecně nejméně vhodné médium PDA a nejvhodnější OA.

Tabulka 3.4 shrnuje všechna provedená křížení. V Tabulkách 3.5–3.7 jsou pro přehlednost uvedeny pouze úspěšné křížící experimenty a také podmínky při kterých vznikly plodnice, včetně jejich četnosti. Názorně jsou úspěšná křížení znázorněna na Obrázku 3.4.

U typového kmene *A. viridinutans* byla s použitím primerů Alpha1 a Alpha2 identifikována MAT1-1 idiomorfa, při použití primerů HMG1 a HMG2 nebyl pozorován na elektroforetogramu žádný produkt, což naznačuje, že se jedná o heterotalický druh. V současné době však není známý jiný opačně laděný izolát, se kterým by se typový kmen mohl křížit a mohlo by být indukováno pohlavní stádium.

U druhu *A. felis* bylo celkem identifikováno 10 izolátů s idiomorfou MAT1-1 a 12 s MAT1-2. U izolátu IMI 182127 se nepodařilo idiomorfu identifikovat. Žádné izoláty se nekřížily s typovými kmeny *A. viridinutans*. Izoláty se v rámci tohoto druhu úspěšně křížily.

Druh *A. wyomingensis* zahrnoval 8 izolátů MAT1-1 a 6 MAT1-2. Největší počet kleistothécií byl pozorován u kombinace CCF 4416 a CCF 4417 (sušená kultura byla uložena do herbáře mykologického oddělení v Národním muzeu v Praze pod číslem PRM 860737-8).

U *A. udagawae* byl poměr MAT1-1 ku MAT1-2 9:13. Velké množství kombinací dalo vznik pohlavnímu stádiu. Typový kmen IFM 46972 se křížil kromě izolátů *A. udagawae* i s dvěma izoláty *A. wyomingensis* (F5 a F29), jedním izolátem „*A. acrensis*“ (IFM 57290) a dvěma izoláty *A. felis* (CBS 458.75 a CCF 4171). Je zajímavé, že kmen CBS 458.75, který představoval jediný MAT1-2 izolát z větve „*A. felis* 2“, vytvořil plodnice s typovým kmenem *A. udagawae* ačkoli se nekřížil s jinými kmeny *A. felis*. Druhý kmen, který dal vznik pohlavnímu stádiu s izolátem z vzdálené větve byl F76 s IFM 57290 z druhu „*A. acrensis*“.

Morfologie askospor mezidruhových kříženců byla ve většině případů nejednotná, někdy ovšem měly askospory morfologii některého z mateřských druhů. Je ovšem pravděpodobné, že v přírodě se toto mezidruhové křížení nevyskytuje, nebo zcela minimálně. Také je pravděpodobné, že životaschopnost spor mezidruhových hybridů je snížena, což bude předmětem dalšího studia.

Tab. 3.4 Všechna provedená křížení*

Druh / Číslo izolátu	Tvorba plodnic	Křížení neproběhlo
<i>Aspergillus felis</i>		
CBS 130245 ^T		
	IFM 46972	CCF 4376, IFM 54303, IFM 60053, CCF 4148, CCF 4557, IFM 55266, IMI 182127, NIHAV1, NIHAV2, IFM 59502, IFM 59503
CBS 458.75, KACC 41203		
CCF 2937		
CCF 4002, AK196 07		
CCF 4003, AK 27/07		
CCF 4171, F39, CMF ISB 2162, IFM 60852	IFM 60053, IFM 59502, IFM 46972	
	CCF 4498	CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4148, F22, CMF ISB 1975, IFM 60868		
		CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4376, AK 102/11		
CCF 4497, F6, CMF ISB 1936	viridi 1720	
CCF 4498, F49, IFM 60853	CCF 4148, IFM 59502	
		CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4557, Viridi-Pinheiro		
	CCF 4171, FRR 5679	CBS 458.75, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4559, IFM 60053		
	CCF 4171, CCF 4498, FRR 5680, CCF 4497	CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, , CCF 4003
CCF 4561, IFM 59502, I56		
		CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4562, IFM 59503, I57		
		CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003
CCF 4570, IFM 54303		
	CCF 4148, IFM 60053	
FRR 5679		
FRR 5680	CCF 4148, IFM 60053, IFM 59502	
IFM 55266		CBS 458.75
IFM 59564		
IMI 182127, KACC 41614		CBS 458.75
	CCF 4497	CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF
NIHAV1, viridi 1720		

4003

NIHAV2, viridi 2594

CBS 458.75, FRR 5679, IFM 59564, FRR 5680, CCF 4171, CCF 4498, CCF 4497, CCF 4003

CCF 4665, IFM 57289

Aspergillus arcoverdensis

CCF 4560, IFM 59922

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

CCF 4569, IFM 59923

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

CCF 4574, CBS 121595, FRR 1266, DTO 19F2, SZMC 2091

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

IFM 61333, 10-2-3

IFM 61334^T, 6-2-32

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

IFM 61337, 1-1-34

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

IFM 61338, 6-2-3

IFM 59923, IFM 59922, CBS 121595, IFM 61337, IFM 61339, IFM 61334^T, IFM 61340, IFM 47045^T

IFM 61339, 2-1-11

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

IFM 61340, 7-2-33

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

IFM 61345, 3-2-2

IFM 59923, IFM 59922, CBS 121595, IFM 61337, IFM 61339, IFM 61334^T, IFM 61340, IFM 47045^T

IFM 61346, 4-2-14

IFM 59923, IFM 59922, CBS 121595, IFM 61337, IFM 61339, IFM 61334^T, IFM 61340, IFM 47045^T

IFM 61349, 4-2-9

IFM 59923, IFM 59922, CBS 121595, IFM 61337, IFM 61339, IFM 61334^T, IFM 61340, IFM 47045^T

IFM 61362, 5-2-2

IFM 59923, IFM 59922, CBS 121595, IFM 61337, IFM 61339, IFM 61334^T, IFM 61340, IFM 47045^T*Aspergillus viridinutans*

IFM 61362, IFM 61338, IFM 61346, IFM 61349, IFM 61345

CCF 4382^T, IFM 47045^T, IMI 367415^T, NRRL4365^T, NRRL576^T, CBS 127.56^T*Aspergillus udagawae*

B3

CCF 4660, IFM 55207

IFM 46972, F76, IFM 54131

IFM 62155, IFM 51744, IFM 57291

CCF 4661, IFM 54745

CCF 4663, IFM 54131

IFM 46972, F76, IFM 54131

F21, IFM 46973, IFM 57290

CCF 4475, F2

CCF 4476, F32

CCF 4478, F66, CMF ISB 2193

IFM 46972, F76, IFM 54131

IFM 62155, IFM 51744, IFM 57291

CCF 4479, F70, CMF ISB 2189

IFM 62155, IFM 51744, IFM 51791

CCF 4481, F83

CCF 4491, CMF ISB 1971, F3

CCF 4492, F21		IFM 62155, IFM 51744, IFM 51791, F76, IFM 54131
CCF 4494, F44		
CCF 4502, F11, CMF ISB 1972		
IFM 46973 ^T , CBS 114217 ^T , KACC 41155 ^T	IFM 46972	IFM 62155, IFM 51744, IFM 51791, F76, IFM 54131
CCF 4662, IFM 5058		
CCF 4664, IFM 54132		
CCF 4667, IFM 53868		
CCF 4668, IFM 62155		IFM 55207, F70, F21, F66, IFM 46973, IFM 57290
CCF 4671, IFM 51744		IFM 55207, F70, F21, F66, IFM 46973, IFM 57290
F20, CMF ISB 2509		
F37		
F76, CMF ISB 2190	IFM 55207, F70, F66, IFM 57290	IFM 46973, F21, IFM 57290
CCF 4558 ^T , IFM 46972 ^T , CSB 114218 ^T , CMB FA 0703 ^T , KACC 41156 ^T	IFM 55207, F70, F21, F66, IFM 46973, IFM 57290, CCF 4411, CCF 4171, CBS 458.75	
<i>"Aspergillus acrensis"</i> sp. nov.		
CCF 4666, IFM 57290	IFM 46972, CCF 4479	IFM 62155, IFM 51744, IFM 51791, F76, IFM 54131
CCF 4670, IFM 57291		IFM 55207, F70, F21, F66, IFM 46973, IFM 57290
<i>Aspergillus wyomingensis</i> sp. nov.		
CCF 4169, CMF ISB 2486, F24	CCF 4416 ^T , CCF 4419	CCF 4170, CCF 4411, CCF 4563,
CCF 4170, F12	CCF 4417 ^T	CCF 4414, CCF 4413, CCF 4169, IMI 133982, CCF 4417 ^T
CCF 4383, IMI 133982		CCF 4170, CCF 4419, CCF 4411, CCF 4563, CCF 4416 ^T
CCF 4411, CMF ISB 1977, IFM 60854, F5	IFM 46972	CCF 4414, CCF 4413, CCF 4169, IMI 133982, CCF 4417 ^T
CCF 4412, F9		
CCF 4413, F10		CCF 4170, CCF 4419, CCF 4411, CCF 4563, CCF 4416 ^T
CCF 4414, CMF ISB 1974, IFM 60856, F13		CCF 4170, CCF 4419, CCF 4411, CCF 4563, CCF 4416 ^T
CCF 4415, CMF ISB 2487, F28		
CCF 4416 ^T , CMF ISB 1976 ^T , CBS 135455 ^T , F29 ^T	CCF 4169, CCF 4417 ^T , IFM 46972	CCF 4414, CCF 4413, IMI 133982
CCF 4417 ^T , CMF ISB 2494 ^T , CBS 135456 ^T , F30 ^T	CCF 4416 ^T , CCF 4419, CCF 4170	CCF 4170, CCF 4411, CCF 4563
CCF 4418, CMF ISB 2162, IFM 60855, F31		
CCF 4419, CMF ISB2495, F53	CCF 4169, CCF 4417 ^T	CCF 4414, CCF 4413, IMI 133982
CCF 4420, CMF ISB 2491, F60		
CCF 4563, IFM 59681		CCF 4414, CCF 4413, CCF 4169, IMI 133982, CCF 4417 ^T
<i>Aspergillus marvanovae</i>		
CCF 4037 ^T , NRRL 62486 ^T , IBT 31279 ^T , IFM 60873 ^T , CCM 8003 ^T		NRRL 58107, CBS 117265
<i>A. turcosus</i>		
CCF 4693, KACC 42090, IBT 27920		NRRL 58107, CBS 117265
CCF 4694, KACC 41955, CBS 117265, IBT 3016	NRRL 58107	NRRL 58107, CBS 117265
NRRL 58107, ZJ 766		CCF 4037, CCF 4693, IBT 27921 ^T

IBT 27921^T, KACC 42091^T

NRRL 58107, CBS 117265

Aspergillus nishimurae

CBS 117265, IBT 3016

CCF 4037, CCF 4693, IBT
27921^T, IFM 54133, IFM 53610

IFM 54133, IBT 29024, CBM-FA-912

CBS 117265, NRRL 58107

IFM 53610, CBM-FA-932 (N58)

CBS 117265, NRRL 58107

Aspergillus novofumigatus

CCF 4695^T, KACC 41934^T, CBS 117520^T,
IBT 16806^T

CCF 4696, CCF 4078, CCF
4116

CCF 4696, KACC 41937, CBS 117519, IBT
16755

CCF 4695^T, CCF 4482, CCF
4499

CCF 4078, CMF ISB 1811

CCF 4695^T, CCF 4482, CCF
4499

Aspergillus fumigatiaffinis

CCF 4482, CMF ISB 2158, F35

CCF 4696, CCF 4078, CCF
4116

CCF 4499, CMF ISB 2188, F82

CCF 4696, CCF 4078, CCF
4116

CCF 4116, CMF ISB 1942, F1

CCF 4695^T, CCF 4482, CCF
4499

*Barvy rozlišují jednotlivé druhy komplexu *A. viridinutans* podobně jako v Obr. 3.4

Tab 3.5 Úspěšné křížící experimenty na médiu MEA *

<i>A. felis</i>						<i>A. wyom.</i>	<i>A. udagawae</i>					„ <i>A. acrensis</i> “	
<i>A. felis</i>		FRR5679	F39	FRR5680	F49	CBS 458.75	F29	IFM 46973	IFM 55207	F70	F21	F66	IFM 57290
	F22	6 (37°C)			6 (37°C)								
	IFM60053	6 (37°C)	5 (25,30,37°C)	5 (25,30,37°C)									
<i>A. wyom.</i>	F24						5 (25°C)						
	F30						5,4,4 (25,30,37°C)						
<i>A. udg</i>	IFM 46972		5 (25°C)			5 (25°C)	5(30°C)	5(25°C)	5 (30°C)	5 (30°C)	5(30°C)	5(30°C)	5(30°C)
	F76								5(30°C)	5(30°C)		5(30°C)	
	IFM 54131								5(30°C)	5(30°C)		5(30°C)	

*číslo udává počet plodnic, v závorce je uvedena teplota, ve které byla teleomorfa indukována, zelená barva značí vnitrodruhové křížení, červená mezidruhové

1: 1-10 plodnic

2: 20-50 plodnic

3: 50-200 plodnic

4: 200-víc plodnic

5: plodnice, počet nebyl zjištěn

6: plodnice bez askospor

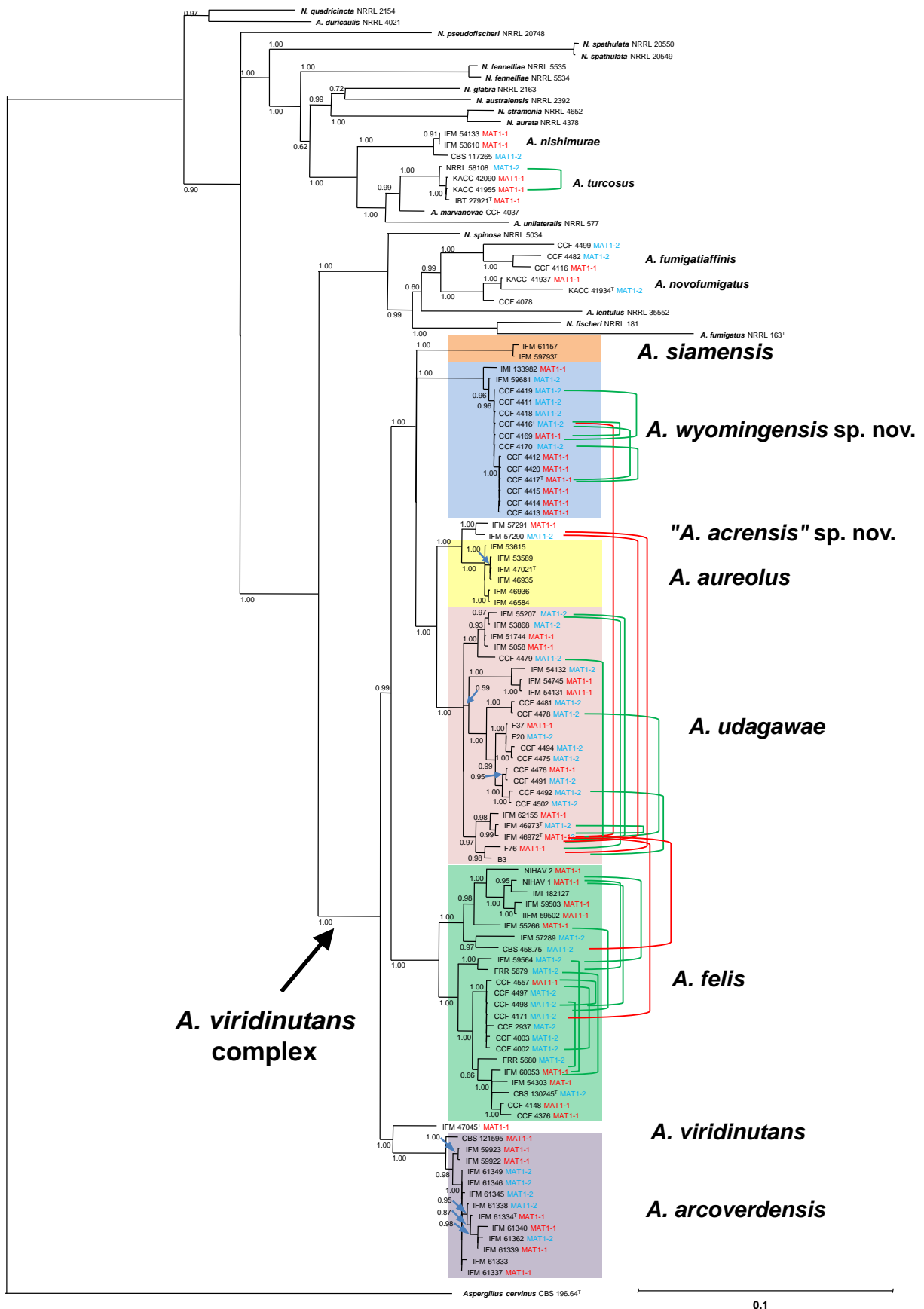
Tab 3.6 Úspěšné křížící experimenty na médiu OA (vysvětlivky viz Tab. 3.5)

<i>A. felis</i>							<i>A. wyom.</i>					<i>A. udagawae</i>					<i>„A. acr.“</i>	
		FRR567 9	F39	FRR568 0	F49	CBS458 .75	F6	F29	F53	F12	F5	IFM469 73	IFM552 07	F70	F21	F66	IFM5729 0	
<i>A. felis</i>	F22	6 (30, 37°C)		6 (37°C)	3 (37°C)													
	IFM600 53	6 (30, 37°C)	5, 5, 1 (25,30,37°C)	2 (25,30,37°C)														
	IFM 59502		2(30°C)	2(25, 30°C)	5 (30°C)	1 (25°)	2 (30°C)											
	VIRIDI 1720						2 (30°C)											
<i>A. wyom.</i>	F24							1,1,5(25,30,37°C)	5 (30°C)									
	F30							5(25,30, 37°C)	2 (30°C)	5 (30°C)								
<i>A. udg.</i>	IFM469 72										5 (25°C)	1 (30°C)	2 (30, 37°C)	4 (30, 37°C)	4(30,37°C)	1 (37°C)	3 (30°C)	
	F76											4 (30°C)		1(30°C)	4(30°C)	1 (30°C)		

Tab 3.7 Úspěšné křížící experimenty na médiu PDA (vysvětlivky viz Tab. 3.5)

<i>A. felis</i>				
<i>A. felis</i>		FRR5679	F39	FRR5680
	F22	6 (30, 37°C)		
	IFM60053	6 (30, 37°C)	2 (25°C)	5, 6 (25, 37°C)

Obr. 3. 4 Křížení druhů komplexu *A. viridinutans* (zeleně vnitroduhové, červeně mezidruhové)



3.3 Morfologie

3.3.1 Morfologie komplexu *A. viridinutans*

Na Obrázku 3.5 jsou znázorněna pohlavní stádia tří heterothalických druhů z komplexu *A. viridinutans*, která se podařilo indukovat v této práci. Nejdůležitější z hlediska rozlišení druhů byla velikost těla askospor a šířka ekvatoriálních hřebínků. Odlišnosti ve velikosti askospor mezi jednotlivými druhy byly statisticky testovány. Ornamenentace a struktura povrchu askospor je patrná na fotografiích ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obr. 3.6), ale jako rozlišovací znak neměla velký význam.

Statistické rozdíly velikosti těla askospor mezi jednotlivými druhy byly porovnány s použitím testu ANOVA. Testovaná data měla normální rozdělení podle Shapiro-Wilkova testu normality (předpoklad testu). Analýza byla provedena pro dva rozměry askospor, tj. pro šířku (delší rozměr, ekvatoriální) a výšku (kratší rozměr).

Šířka askospor *A. udagawae* byla signifikantně větší než *A. felis*, *A. wyomingensis* a *A. siamensis*. Askospory *A. felis* byly signifikantně méně široké než *A. udagawae* a *A. aureolus*. Askospory *A. wyomingensis* a *A. siamensis* byly signifikantně méně široké než *A. udagawae* a *A. aureolus*. *A. aureolus* měl signifikantně širší askospory než *A. felis*, *A. wyomingensis* a *A. siamensis* (Obr. 3.7). Pro druhý testovaný rozměr - výšku byly signifikantní rozdíly stejné, jako pro šířku (Obr. 3.8).

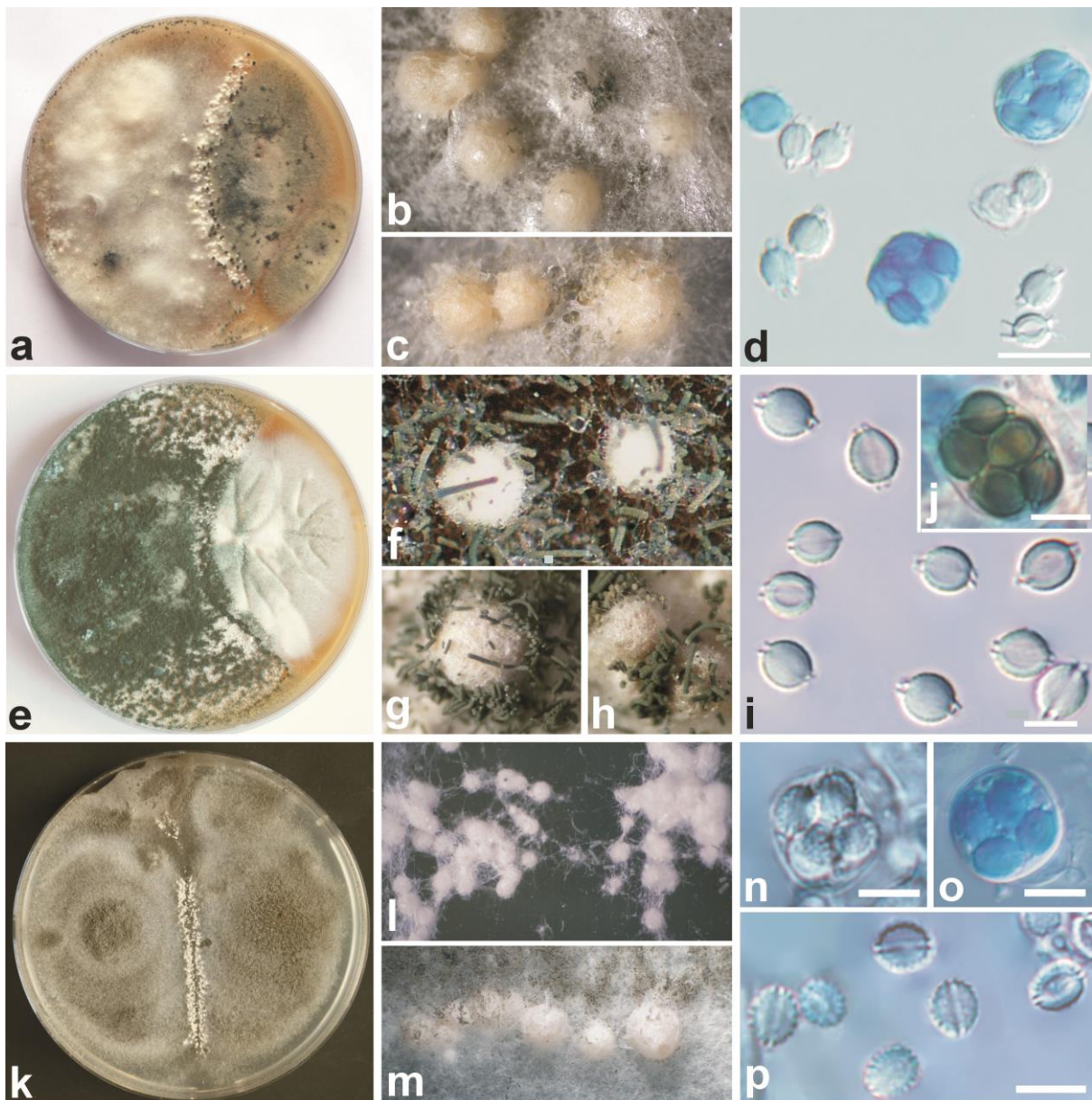
Šířka hřebínků se lišila významně mezi jednotlivými druhy a byla použitelná jako rozlišovací znak. U druhu *A. wyomingensis* byla šířka hřebínků nejmenší (menší než 0,2 μm) nebo nebyly hřebínky vůbec patrné. Druhy *Aspergillus udagawae* a *Aspergillus felis* měly dva zřetelné hřebínky širší než 0,5 μm , v případě *A. udagawae* byly užší než 1 μm , naproti tomu u *A. felis* byly širší než 1 μm . U homothalických druhů měly hřebínky šířku 0,5-1 μm u *A. aureolus* a u *A. siamensis* byly širší než 1 μm .

V Tabulce 3.8 jsou shrnuty morfologické znaky všech druhů komplexu *A. viridinutans*. Znaky přítomné na nepolavním stádiu (konidiofory, konide atd.) neměly v komplexu *A. viridinutans* velkou rozlišovací hodnotu a značně se překrývaly mezi druhy. I přesto však byly některé znaky odlišné u různých druhů. Druh *Aspergillus aureolus* tvořil žluté kolonie na všech médiích zatímco všechny ostatní druhy tvořily kolonie spíše zelené nebo bílé. Druh *Aspergillus viridinutans* měl ve srovnání s ostatními druhy komplexu výrazně pomalejší růst, na médiu CYA měl jako jediný z heterothalických druhů průměr kolonie po sedmi dnech menší než 40 mm a i na ostatních médiích byl jeho růst výrazně pomalejší. Též maximální délka konidioforů u *A. viridinutans* byla výrazně kratší než u ostatních druhů

s výjimkou *A. siamensis*, který měl konidiofory též kratší než ostatní druhy. Fyziologická odlišnost druhu *A. viridinutans* od ostatních druhů byla neschopnost růstu při teplotě nad 42°C.

Obr. 3.5 Morfologie pohlavních stádií druhů z komplexu *A. viridinutans*

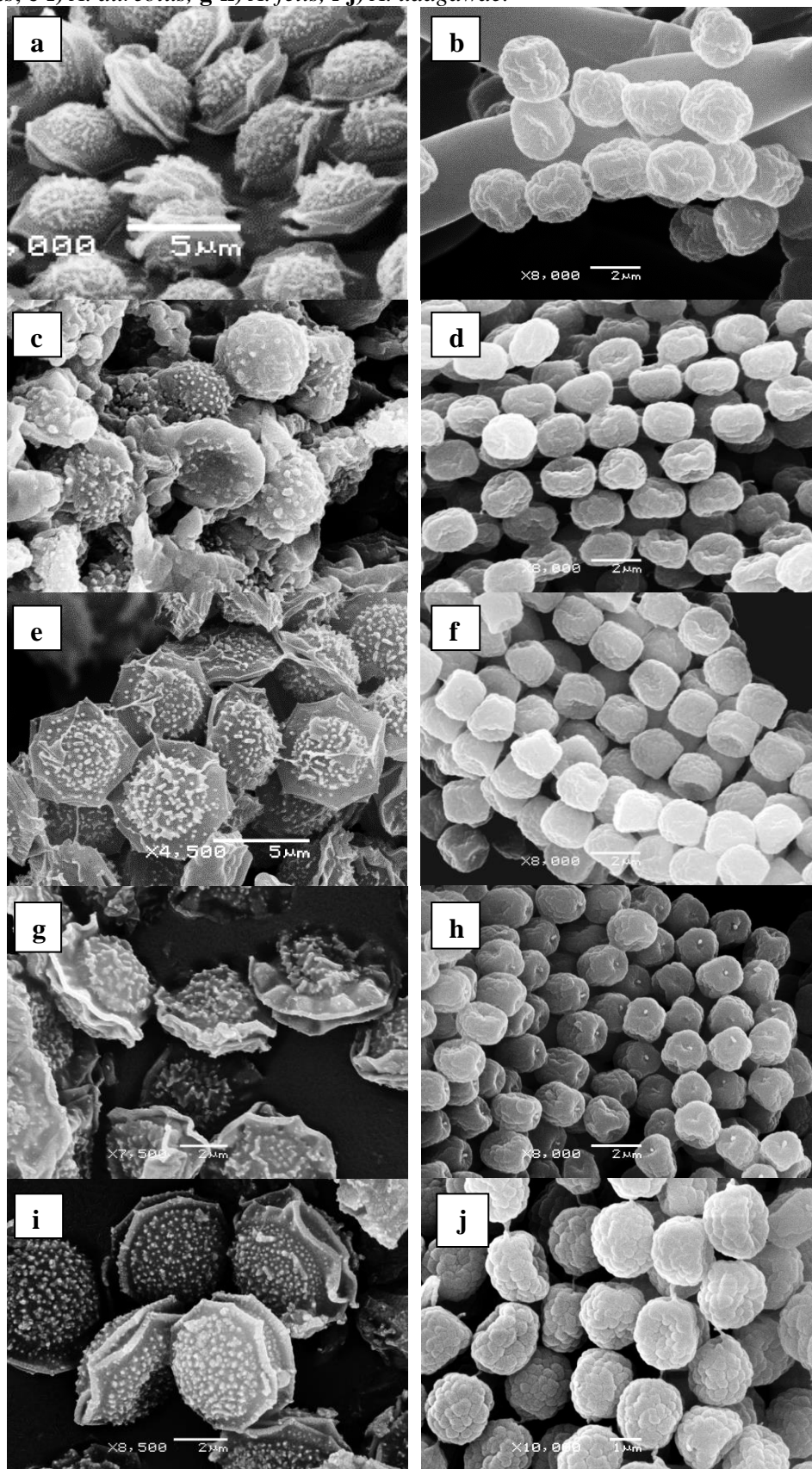
a-d) *Aspergillus felis*: **a)** plodnice vzniklé křížením izolátů IFM 60053 a FRR 5679 na MEA po šesti týdnech při 30° C, **b-c)** detail plodnic, **d)** askospory a vřečka, měřítko 10 µm;
e-j) *Aspergillus udagawae*: **a)** plodnice vzniklé křížením izolátů IFM 46972 s IFM 46973 na MEA po šesti týdnech při 30° C, **f-h)** detail plodnic, **i)** askospory, **j)** vřecko, měřítko 5 µm;
k-p) *Aspergillus wyomingensis*: **k)** plodnice vzniklé křížením izolátů CCF 4416 a CCF 4417 na OA po šesti týdnech při 37° C, **l-m)** detail plodnic, **n-o)** vřečka, **p)** askospory, měřítko 5 µm



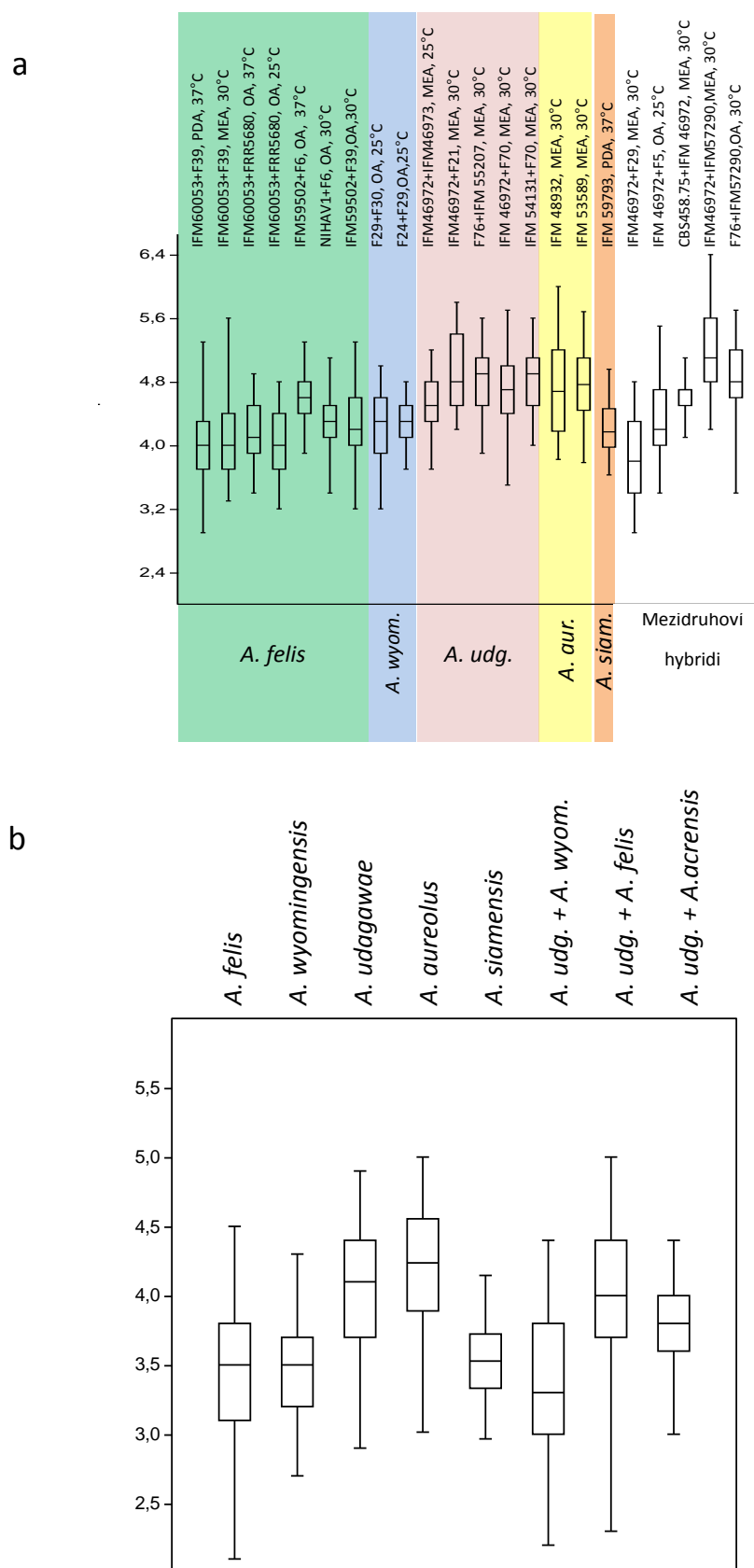
Tab. 3.8 Morfologické charakteristiky druhů komplexu *A. viridinutans*

Znak	<i>A. felis</i>	<i>A. arcoverdensis</i>	<i>A. udagawae</i>	<i>A. viridinutans</i>	<i>A. wyomingensis</i>	<i>A. aureolus</i>	<i>A. siamensis</i>
CZA (25°C, 7 d, mm)	45-48	52-62 (14 d)	37-47	19-25	38-42	48-53	35-55
MEA (25°C, 7 d, mm)	54-65	78-82 (14 d)	42-65	31-33	43-44	38-70	55 -61
CYA (25°C, 7 d, mm)	52-65	56-58	40-60	28-40	52-58	54-62	57-63
Délka konidioforu(μm)	až 250	80 – 150	až 252	20-70 (112)	až 275	až 450	75-110
Šířka stonku (μm)	3-5,5(-6,5)	4-5	3-5,5(-6,5)	3-4(-5)	(3-)4-6,5(-7)	2,5-3,5(-5)	3-4
Měchýřek (μm)	(7-)9-18(-20)	10-17	11-18(-19,5) μm	7,5-12(-14)	11-19(-24)	8-13,5	5,8-10
Konidie	subglobózní, lehce zdrsňelé, 2,3-2,8 μm	subglobózní až široce elipsoidní, 2-2,5 × 2-3 μm	2,4-3,2 μm	2-2,8 μm	1,7-2,8(-3,3)	subglobózní až lehce zakulacené, 2,1-2,8 μm	subglobózní až globózní, hladké, 2-2,5 μm
Pohlavní systém	heterothalický	heterothalický (?)	heterothalický	heterothalický (?)	heterothalický	homothalický	homothalický
Plodnice	kleistothécia žluto-bílá, 300-1000 (-1250) μm	pohl. stádium neznámé	kleistothécia žluto-bílá, 300-600 (-1000) μm	pohl. stádium neznámé	bílá kleistothécia 180-500(-600) μm	žlutá kleistothécia, 200-650 μm	světle žlutá kleistothécia, 250-320 μm
Vřecka	8-sporová, 10-12 × 9,5-11 μm	pohl. stádium neznámé	8-sporová, 9,5-11,5 × 9-11 μm	pohl. stádium neznámé	8-sporová, 10-12 x 10-11 μm	8-sporová, 10,5 - 13,5 × 10-12 μm	8-sporová 10-11 × 9-10
Askospory	čočkovité se dvěma výraznými ekvatoriálními hřebínky šířka 5.0-7.0 μm povrch s krátkými ostny	pohlavní stádium neznámé	čočkovité se dvěma výraznými ekvatoriálními hřebínky šířka 4,1-5,2 μm hrbolkatý povrch	pohlavní stádium neznámé	čočkovité, ekvatoriální hřebínky málo zřetelné šířka (3,2-)3,6-5 μm povrch ostnitý	čočkovité, 2 ekvatoriální hřebínky šířka (4-)4,5-5,5 μm	čočkovité šířka 5, 5-6 μm povrch ostnitý, vrásčitý
Maximální růstová teplota	některé izoláty 45° C, ostatní 42° C	neznámá	některé izoláty 45° C, ostatní 42° C	neschopnost růstu při 42° C	některé izoláty 45° C, ostatní 42° C	některé izoláty 45° C, ostatní 42° C	neznámá

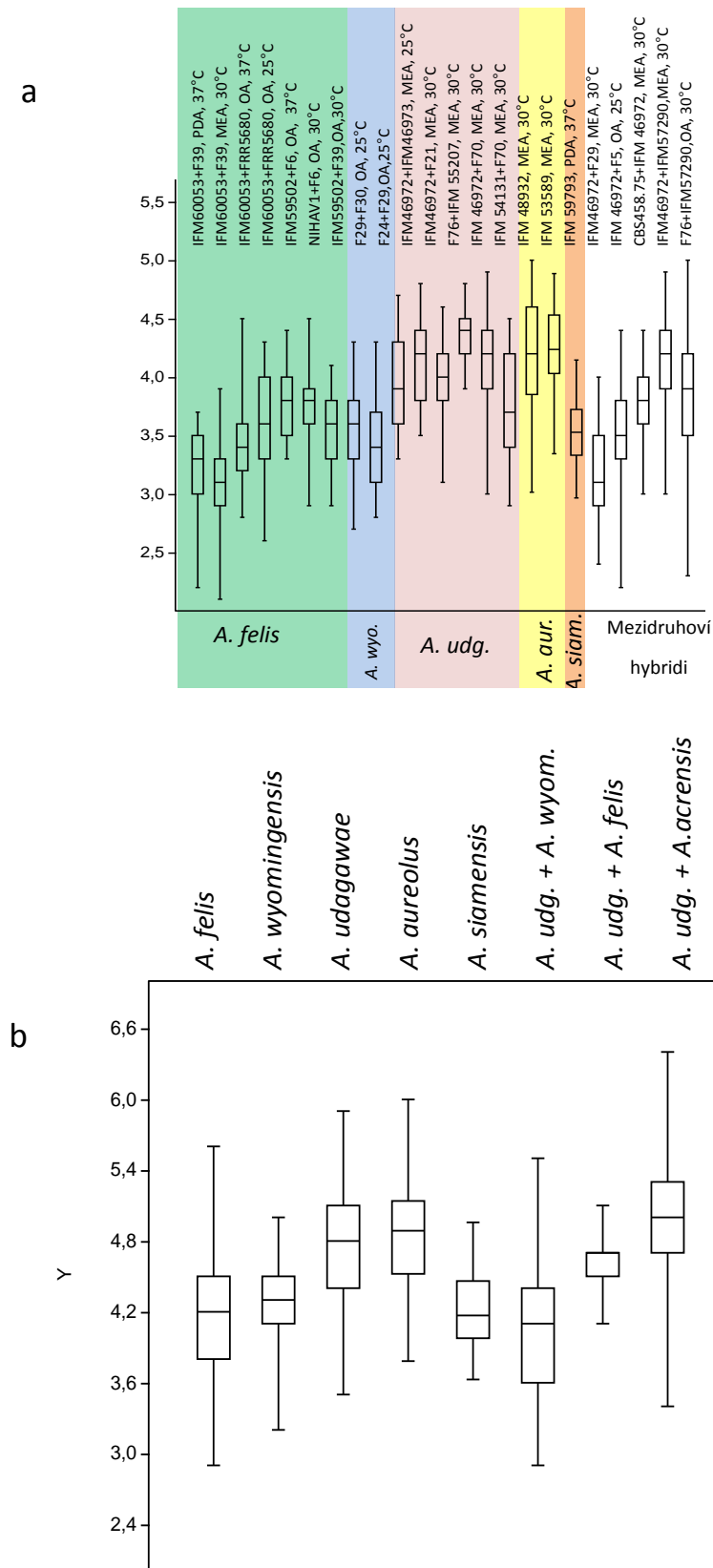
Obr. 3.6 Fotografie askospor a konidií druhů komplexu *Aspergillus viridinutans* získané skenovací elektronovou mikroskopií (na levé straně askospory, na pravé straně konidie); **a-b)** *A. siamensis*, **c-d)** *A. wyomingensis*, **e-f)** *A. aureolus*, **g-h)** *A. felis*, **i-j)** *A. udagawae*.



Obr. 3.7 Srovnání šířky askospor druhů komplexu *A. viridinutans*, na obrázku a) jednotlivé izoláty, na obrázku. b) všechny izoláty setjných druhů společně



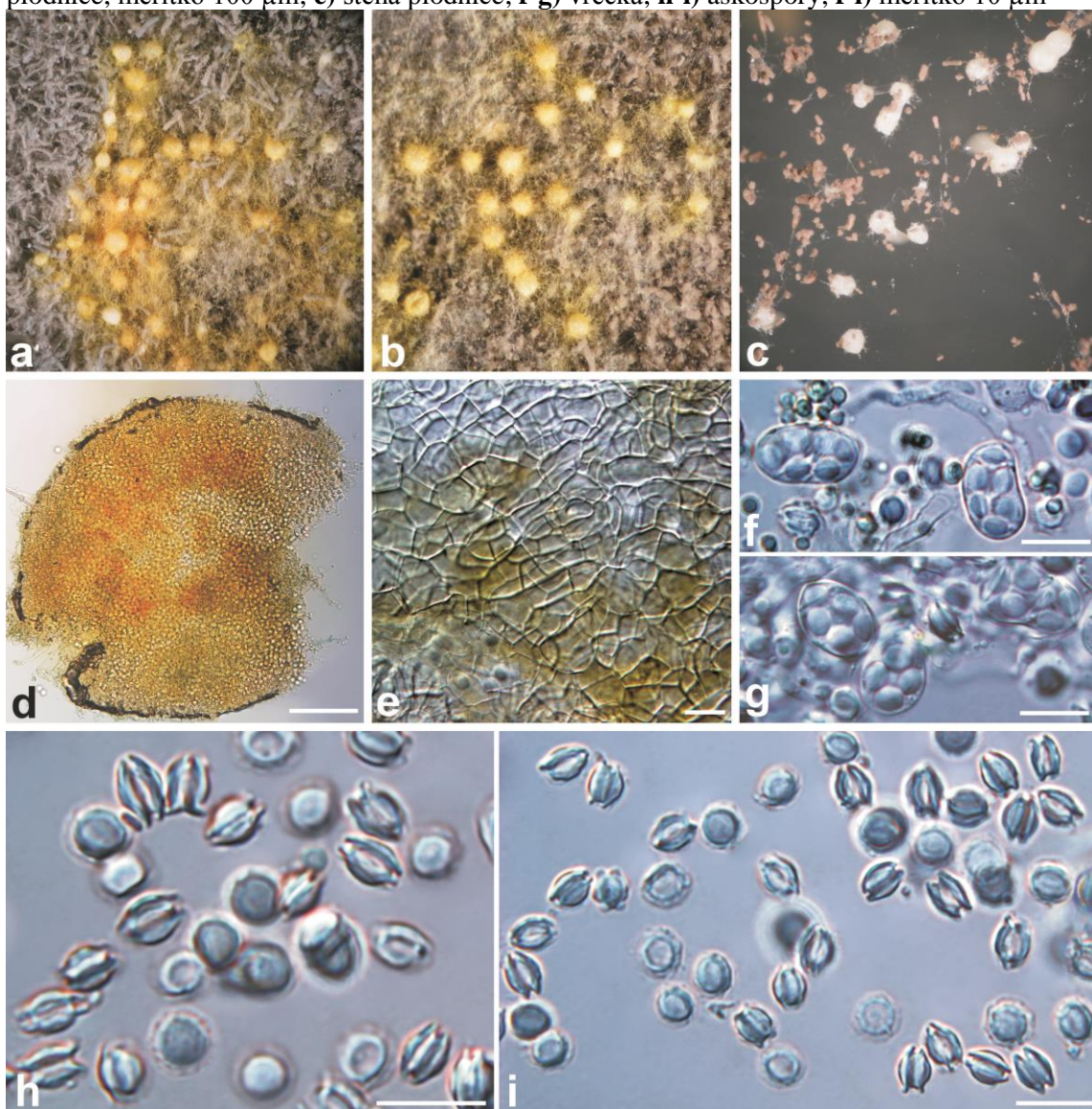
Obr. 3.8 Srovnání výšky askospor druhů komplexu *A. viridinutans*, na Obrázku a) jednotlivé izoláty, na obrázku. b) všechny izoláty setjných druhů společně



3.3.2 Morfologie pohlavního stádia *Aspergillus turcosus*

Křížením opačně laděných izolátů *A. turcosus* se podařilo indukovat tvorbu pohlavního stádia, které dosud nebylo pozorováno a je dokumentováno na Obrázku 3.9. Plodnice na médiu MEA byly žluté, na OA bílé a dosahovaly velikosti (122-)164-300 μm v průměru. Vřečka byla eliptická, osmisporová, s rozměry 12,5-17,7 \times 8,5-10,2 μm , askospory byly čočkovité s hladkým povrchem a dvěma hřebínky 0,6-1,4 μm širokými, tělo askospory mělo rozměry 4-5,2 \times 3,8-5 μm .

Obr. 3.9 Morfologie pohlavního stádia *Aspergillus turcosus* **a-b)** plodnice vzniklé křížením izolátů NRRL 58108 a KACC 42090 po šesti týdnech kultivace na MEA při 25 °C; **c)** plodnice na OA; **d)** plodnice, měřítko 100 μm ; **e)** stěna plodnice; **f-g)** vřečka; **h-i)** askospory; **f-i)** měřítko 10 μm



3.4 Testování citlivosti na antimykotika

V Tabulce 3.9 jsou uvedeny minimální inhibiční koncentrace (MICs) a minimální efektivní koncentrace (MECs) ($\mu\text{g/ml}$) druhů komplexu *A. viridinutans* k antimykotikům amfotericinu B (AMB), 5-fluorcytosinu (5-FC), posakonazolu (POS), vorikonazolu (VOR), itrakonazolu (ITR) a flukonazolu (FLU) měřené panelem YeastOne. Napříč všemi druhy v komplexu se jako nejvíce účinný ukázal být posakonazol. Všechny druhy byly rezistentní k 5-fluorcytosinu a flukonazolu. Citlivost k ostatním testovaným látkám byla druhově specifická.

Tab. 3.8 Citlivosti druhů komplexu *A. viridinutans* k antimykotikům testované metodou Sensititre YeastOne ($\mu\text{g/ml}$)

druh	kmen	AMB	5-FC	POS	VOR	ITR	FLU
<i>A. arcoverdensis</i>	CBS 121595	0,25	>64	0,25	2	>16	>256
	IFM 59922	0,5	>64	0,12	1	>16	>256
	IFM 59923	1	>64	0,12	2	>16	>256
	IFM 61362	2	64	0,06	1	>16	>256
	IFM 61338	1	>64	0,25	2	>16	>256
	IFM 61345	1	64	0,12	1	>16	>256
	IFM 61349	2	>64	0,06	1	>16	>256
	IFM 61340	1	>64	0,06	2	>16	>256
	IFM 61346	2	>64	0,06	1	>16	>256
	IFM 61334	2	>64	0,12	1	0,25	>256
	IFM 61333	1	>64	0,03	0,5	0,25	>256
	IFM 61337	1	16	0,008	0,25	<0,015	>256
	IFM 61339	1	2	0,015	0,25	<0,015	>256
	<i>A. aureolus</i>	IFM 46584	0,5	32	0,06	0,5	0,25
IFM 46935		1	32	0,03	0,25	0,06	256
IFM 46936		0,5	64	0,12	1	16	256
IFM 47021		1	64	0,12	1	0,25	256
IFM 53589		1	64	0,015	0,5	0,12	128
IFM 53615		0,25	32	0,06	0,25	0,12	256
<i>A. felis</i>	FRR 5679	2	>64	0,25	4	>16	>256
	CCF 4002	2	>64	0,12	2	>16	>256
	IFM 54303	0,5	64	0,25	4	>16	>256
	IFM 60053	1	>64	0,12	4	>16	>256
	CCF 4498	2	>64	0,12	2	>16	>256
	CCF 4497	2	>64	0,12	2	>16	>256
	CCF 4148	1	32	0,12	2	>16	>256
	CCF 4003	1	>64	0,12	2	>16	>256
	FRR 5680	1	64	0,12	2	>16	>256

	CCF 4376	1	>64	0,12	2	>16	>256
	CCF 4171	2	>64	0,12	4	>16	>256
	CCF 4557	2	>64	0,25	4	>16	>256
	IFM 59564	2	>64	0,12	4	>16	>256
	CCF 2937	2	>64	0,06	0,5	0,12	>256
	IFM 55266	2	>64	0,25	4	>16	>256
	CBS 458.75	2	>64	0,12	4	>16	>256
	NIHAV1	2	>64	0,25	4	>16	>256
	NIHAV2	2	>64	0,25	2	>16	>256
	IFM 59502	1	>64	0,12	4	>16	>256
	IFM 59503	2	>64	0,25	2	>16	>256
	IMI 182127	1	64	0,12	1	>16	>256
	CBS 130245	2	>64	0,12	4	>16	>256
<i>A. udagawae</i>	CCF 4479	2	>64	0,12	0,25	>16	>256
	F76	2	>64	0,06	1	>16	>256
	IFM46972	2	>64	0,12	0,25	>16	>256
	IFM 46973	0,5	64	0,25	2	>16	>256
	CCF 4478	2	>64	0,06	1	0,06	>256
	CCF 4481	0,5	64	0,06	0,5	0,03	>256
	CCF 4494	2	>64	0,12	2	>16	>256
	CCF 4475	1	4	0,12	1	0,12	>256
	CCF 4492	1	>64	0,015	0,12	0,03	256
	CCF 4502	2	>64	0,06	1	>16	>256
	CCF 4476	2	>64	0,06	1	0,06	>256
	CCF 4491	2	>64	0,12	1	>16	>256
	B3	2	>64	0,12	0,5	0,12	>256
<i>A. viridinutans</i>	IFM 47045	0,5	0,25	<0,008	0,25	<0,015	>256
<i>A. wyomingensis</i>	CCF 4170	0,12	64	0,015	0,5	0,06	>256
	CCF 4419	2	32	0,015	0,12	0,03	>256
	CCF 4169	1	32	0,03	2	0,03	>256
	CCF 4418	2	32	0,5	1	0,03	>256
	CCF 4416	2	64	0,03	0,5	0,06	>256
	CCF 4411	1	16	0,008	0,5	<0,015	>256
	CCF 4412	0,25	16	0,03	0,5	0,06	>256
	CCF 4414	1	32	0,03	1	0,03	>256
	CCF 4413	2	32	0,03	0,5	0,06	>256
	CCF 4415	2	32	0,03	0,5	0,03	>256
	CCF 4420	1	32	0,015	1	0,03	>256
	CCF 4417	4	32	0,03	0,5	0,03	>256
	IFM 59681	2	64	0,03	0,5	0,06	>256
	IMI 133982	2	64	0,015	0,5	0,03	>256

U druhů, u kterých byla citlivost k antimykotikům měřena u dostatečného počtu izolátů (alespoň 7 a více) bylo testováno, zda jsou tyto citlivosti k jednotlivým antimykotikům signifikantně odlišné od jiných druhů (*A. felis*, *A. arcoverdensis*, *A. udagawae*, *A. wyomingensis*). Pro vyhodnocení citlivostí k antimykotikům byl použit Mann-Whitneyův test, který lze použít pro nespojitá (ordinální) data. V Tabulkách 3.10 až 3.14 jsou uvedeny výsledné p-hodnoty párových srovnání, hladina významnosti testu byla zvolena jako 0,05 (signifikantní hodnoty $p < 0,05$ jsou v tabulkách označeny tučně). Druh *A. felis* byl testován celkově jako jeden druh, ale také rozdělený na dvě skupiny podle výsledků fylogenetické analýzy (mohou reprezentovat jiné druhy). Citlivosti k žádnému antimykotiku se mezi skupinami *A. felis 1* a *A. felis 2* nelišily, což kromě dalších dat (morfologie, křížící experimenty) podporuje názor, že se jedná o jediný druh.

Citlivost k flukonazolu byla u všech druhů téměř identická (větší než 128 $\mu\text{g/ml}$). Podobně citlivosti k amfotericinu B se mezi jednotlivými druhy signifikantně nelišily (Tab. 3.10). Senzitivita k vorikonazolu a posakonazolu byla signifikantně nejvyšší u *A. wyomingensis* a dále signifikantně klesala v pořadí *A. arcoverdensis*, *A. udagawae* a nejnižší byla u *A. felis* (Tab 3.11, 3.12). Citlivost *A. felis* k posakonazolu byla výrazně nižší než u ostatních druhů. Na itrakonazol byl signifikantně nejcitlivější *A. wyomingensis* a *A. udagawae*, signifikantně méně *A. arcoverdensis* a nejméně *A. felis* (Tab. 3. 13) Citlivost k 5-fluorocytosinu byla u *A. wyomingensis* signifikantně vyšší než u všech ostatních druhů (Tab. 3.14).

Tab. 3.10 Hodnoty srovnávající citlivosti druhů k amfotericinu B (statisticky signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

	<i>A. felis</i>	<i>A. felis 1</i>	<i>A. felis 2</i>	<i>A. arcov.</i>	<i>A. udag.</i>	<i>A. wyoming.</i>
<i>A. felis</i>		0,1301	0,119	0,05398	0,9512	0,7538
<i>A. felis 1</i>			0,7124	0,1301	0,8437	0,9328
<i>A. felis 2</i>				0,119	0,7934	0,9328
<i>A. arcoverdensis</i>					0,1265	0,2746
<i>A. udagawae</i>						0,7403
<i>A. wyomingensis</i>						

Tab. 3.11 Hodnoty srovnávající citlivosti druhů k vorikonazolu (statisticky signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

	<i>A.felis</i>	<i>A. felis 1</i>	<i>A. felis 2</i>	<i>A. arcov.</i>	<i>A. udag.</i>	<i>A. wyoming.</i>
<i>A.felis</i>		0,9176	0,8461	0,0001286	2,329×10⁻⁵	3,339×10⁻⁶
<i>A. felis 1</i>			0,791	0,0002333	1,132×10⁻⁵	3,713×10⁻⁶
<i>A. felis 2</i>				0,003109	0,00091159	0,0001118
<i>A. arcoverdensis</i>					0,3199	0,04295
<i>A. udagawae</i>						0,3543
<i>A. wyomingensis</i>						

Tab. 3.12 Hodnoty srovnávající citlivosti druhů k posakonazolu (statisticky signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

	<i>A.felis</i>	<i>A. felis 1</i>	<i>A. felis 2</i>	<i>A. arcov.</i>	<i>A. udag.</i>	<i>A. wyoming.</i>
<i>A.felis</i>		0,4392	0,3458	0,007909	0,004945	8,843×10⁻⁶
<i>A. felis 1</i>			0,126	0,03309	0,02021	2,243×10⁻⁶
<i>A. felis 2</i>				0,01673	0,00943	0,000516
<i>A. arcoverdensis</i>					0,7104	0,008994
<i>A. udagawae</i>						0,0003923
<i>A. wyomingensis</i>						

Tab. 3.13 Hodnoty srovnávající citlivosti druhů k itrakonazolu (statisticky signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

	<i>A.felis</i>	<i>A. felis 1</i>	<i>A. felis 2</i>	<i>A. arcov.</i>	<i>A. udag.</i>	<i>A. wyoming.</i>
<i>A.felis</i>		0,8128	1	0,03788	0,002855	2,026×10⁻⁶
<i>A. felis 1</i>			1	0,1091	0,0162	2,579×10⁻⁸
<i>A. felis 2</i>				0,1554	0,7973	8,6×10⁻⁶
<i>A. arcoverdensis</i>					0,4946	0,0006429
<i>A. udagawae</i>						0,000319
<i>A. wyomingensis</i>						

Tab. 3.14 Hodnoty srovnávající citlivosti k 5-fluorocytosinu (statisticky signifikantní p-hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

	<i>A. felis</i>	<i>A. felis 1</i>	<i>A. felis 2</i>	<i>A. arcov.</i>	<i>A. udag.</i>	<i>A. wyoming.</i>
<i>A. felis</i>		0,8128	1	0,2607	0,7026	3,094×10⁻⁵
<i>A. felis 1</i>			1	0,3452	0,7421	0,0004051
<i>A. felis 2</i>				0,5211	1	0,003801
<i>A. arcoverdensis</i>					0,74	0,02615
<i>A. udagawae</i>						0,00388
<i>A. wyomingensis</i>						

4. DISKUZE

4.1 Druhový komplex *A. viridinutans*, morfologické znaky

Dosavadní studie založené na molekulárních datech ukázaly, že *A. viridinutans* zahrnuje několik linií, jejichž druhové hranice nebyly zcela vymezeny a *A. viridinutans* byl dosud veden jako druhový komplex (Hong et al., 2010; Katz et al., 2005; Shigeyasu et al., 2012). Izoláty identifikované jako *A. viridinutans* vykazují značnou morfologickou variabilitu, ale většinou sdílí přítomnost tzv. „nodding heads“ v mikromorfologii (měchýřek zahnutý směrem ke stonku) a relativně málo sporulující kolonie s objemným vzdušným myceliem (ve srovnání s *Aspergillus fumigatus* s. str.). Jak ukázaly poslední fylogenetické studie, „nodding heads“ se nevyskytují výhradně v komplexu *A. viridinutans*, a není je tedy možné použít jako znak charakteristický pro *A. viridinutans* komplex. Nodding heads se totiž vyskytují i u druhů nepříbuzných *A. viridinutans*, např. u *A. brevipes* (Smith, 1952), *A. duricaulis* (Raper and Fennell, 1965), *A. marvanovae* (Hubka et al., 2013b), *N. pseudofischeri* (Paden, 1968) a u dvou nedávno popsanych druhů *A. brevistipitatus* a *A. conversis* (Nováková et al., 2014).

4.2 Rošíření a výskyt druhů komplexu *A. viridinutans*

Druhy ze sekce *Fumigati*, včetně *A. viridinutans* jsou primárně půdní, ale jsou také často izolovány z klinického materiálu. V této práci bylo zahrnuto velké množství izolátů z rekultivovaných půdních ploch z USA, které izolovala RNDr. Alena Nováková, CSc. Na základě sekvencí uložených v databázi GenBank se předpokládalo, že všechny klinicky významné případy lidských a zvířecích infekcí způsobené druhy komplexu *A. viridinutans* byly ve skutečnosti způsobené *A. felis* (Alcazar-Fuoli et al., 2008; Barrs et al., 2012; Barrs et al., 2013; Coelho et al., 2011; Kano et al., 2013; Katz et al., 2005; Peláez et al., 2013; Shigeyasu et al., 2012; Vinh et al., 2009a; Yaguchi et al., 2007) a *A. udagawae* (Balajee et al., 2009; Gyotoku et al., 2012; Kano et al., 2008; Kano et al., 2013; Katz et al., 2005; Posteraro et al., 2011; Vinh et al., 2009b; Yaguchi et al., 2007). Nové studie však zachytily jako patogena u kočky domácí i *A. wyomingensis* (Barrs et al., 2014). *Aspergillus viridinutans* s. str. doposud nebyl v klinickém materiálu zachycen, stejně tak ani *A. aureolus*, *A. siamensis*, *A. arcoverdensis* a „*A. acrensis*“. Většina druhů komplexu *A. viridinutans* se zdá být rozšířena v půdě po celém světě. *Aspergillus aureolus* se pravděpodobně vyskytuje pouze

v tropických oblastech (Nováková et al., 2014). Druh *A. viridinutans* byl izolován pouze z králičího trusu v Austrálii a podle druhového konceptu aplikovaného v této práci se jeví jako velmi vzácný druh.

4.3 Biologický koncept a párovací pokusy

Pomocí křížících pokusů byly v komplexu identifikovány pohlavní stádia u tří druhů, včetně dvou nepopsaných druhů. Jeden z nich byl v průběhu vypracovávání této práce popsán jako *A. felis* (Barrs et al., 2013), druhý druh byl popsán jako „*A. wyomingensis* Nováková, Dudová & Hubka“ v následujícím roce na základě dat z této práce (Nováková et al., 2014).

Pohlavní stádium všech těchto druhů bylo možné odlišit již v optické (rozměry těla askospor a délka hřebínků) - Obr. 3.5, ale přesvědčivě ve skenové elektronové mikroskopii (Obr. 3.6).

U heterothalických druhů *A. arcoverdensis* a „*A. acensis*“ se zatím nepodařilo indukovat tvorbu pohlavního stádia navzdory tomu, že ve studii byly izoláty MAT1-1 i MAT1-2. Indukce teleomorfy je dlouhodobý proces komplikovaný zejména rozdílnými nároky jednotlivých druhů na kultivační média, vhodné teploty a časové období nutné k jejímu vytvoření. Při větším množství izolátů tak závratně rychle roste počet nutných křížících experimentů, aby byla šance na pozorování teleomorfy dostatečně vysoká. V případě těchto druhů se zřejmě nepodařilo in vitro simulovat vhodné podmínky pro vytvoření plodnic.

Interpretace výsledků křížení *A. udagawae* byla obtížná. Askospory byly pozorovány jen u omezeného počtu kombinací, především s typovým kmenem IFM 46972. Následně byly provedeny další pokusy s větším počtem izolátů, jejichž výsledkem bylo více kombinací, které daly vznik pohlavnímu stádiu. Pozitivní výsledky křížení byly mezi všemi hlavními větvemi v linii označené jako *A. udagawae* (Obr. 3.3), což naznačuje, že *A. udagawae* je relativně široký druh. Strukturalizace *A. udagawae* na více oddělených linií byla již dříve popsána (Sugui et al., 2010; Yaguchi et al., 2007), ale dosud publikované párovací pokusy nebyly většinou úspěšné a nebo u velmi omezeného množství izolátů (Balajee et al., 2006; Sugui et al., 2010; Vinh et al., 2009b; Yaguchi et al., 2007). Data shromážděná v této práci naznačují, že *A. udagawae* představuje jeden geneticky široký druh, což podporuje i uniformita askospor mezi jednotlivými kříženci (Obr. 3.5, 3.6).

Jediný MAT-1 izolát je k dispozici druhů *A. viridinutans* s. str., který navzdory tomu, že dal jméno celému komplexu, je zřejmě velmi vzácný druh a nebyla u něj pozorována schopnost křížení s ostatními druhy komplexu.

4.4 Aplikace polyfázického přístupu na druhy *Aspergillus viridinutans* komplexu

V komplexu *A. viridinutans* bylo na základě molekulárních dat, fyziologických a morfologických charakteristik a křížících pokusů identifikováno osm druhů, mezi kterými byly i čtyři nepopsané druhy, z nichž 3 byly popsány v průběhu této práce: „*A. acrensis*“ (zatím nepopsán), *A. felis* (Barrs et al., 2013), *A. arcoverdensis* (Matsuzawa et al., 2014) a *A. wyomingensis* (Nováková et al., 2014). Pohlavní stádia tří heterothalických druhů z komplexu – *A. felis*, *A. udagawae* a *A. wyomingensis* vykazovaly odlišnou morfologii askospor, která je v této práci považována za nejdůležitější morfologický znak. Žádný z těchto druhů nevytvořil plodnice při křížení s typovým kmenem *A. viridinutans*.

Jedinečná byla vnitrodruhová genetická variabilita pozorovaná u druhu *A. felis*. V rámci kalmodulinového i beta-tubulinového genu zde byla nalezena variabilita dosahující 5 %, přitom vnitrodruhová variabilita bývá u rodu *Aspergillus* v těchto genech poměrně nízká (typicky kolem 1 %) i u heterothalických druhů. Dvou až pětiprocentní variabilita v tomto lokusu spíše odpovídá klasickým mezidruhovým vztahům (Hubka et al., 2013a; Hubka et al., 2013b). Vysvětlení pro tento fakt je buď velmi intenzivní vnitrodruhový sexuální proces (tomu by odpovídalo i zhruba stejné zastoupení MAT-1 a MAT-2 izolátů), nebo přítomnost několika kryptických druhů, které zatím nebyly odhaleny. Tomu ale odporují výsledky křížících experimentů, které úspěšně indukovaly pohlavní stádium při křížení izolátů ze všech hlavních větví. Navíc bylo v rámci tohoto druhu pozorováno i množství odlišných fingerprintových pattern za použití primerů M13-core a 834T (Nováková et al., 2014), které byly v minulosti použity u jiných druhů a sekcí *Aspergillus* a nejčastěji tato jednotlivá pattern odpovídala druhové úrovni (Hubka and Kolarik, 2012; Hubka et al., 2013a; Hubka et al., 2013b; Nováková et al., 2014; Nováková et al., 2012). Pro vyřešení taxonomie tohoto druhu bude zřejmě třeba detailně prozkoumat životaschopnost jednotlivých hybridů a jejich schopnost dát vzniku potomstvu dalších generací.

4.5 Mezidruhové křížení

Zajímavým jevem, dosud neznámým u rodu *Aspergillus* a pozorovaným opakovaně zatím u skupiny Bazidiomycetes, rodu *Neurospora* a pravých kvasinek (Giraud et al., 2008; Strandberg et al., 2010), byla tvorba plodnic při křížení opačně laděných izolátů vzdálených linií reprezentujících fylogenetické a dokonce i morfologicky podpořené druhy (dle askospor).

Mezidruhová kříženci se v této práci vyskytli v několika případech, jednalo se o dva izoláty *A. udagawae* (IFM 46927, F76), které byly schopné dát vznik mezidruhovým hybridům s druhy *A. felis*, *A. wyomingensis* a „*A. acrensis*“. Nicméně morfologie velkého procenta askospor uvolněných z plodnic těchto kříženců vykazovala vysokou nehomogenost ve velikosti i tvaru, který byl často kulovitý bez struktur jako ekvatoriální žlábk, nebo hřebínky. Část askospor si ale zachovávala morfologii původních druhů. Pozorování pohlavních útvarů (plodnice, vřečka a askospory) totiž pravděpodobně nemusí znamenat, že k toku genetické informace mezi těmito dobře definovanými liniemi (respektive druhy) přirozeně dochází. Kříženci mohou být neživotoschopnými (tzv. postzygotická bariéra) a nemusí dále přispívat ke genofondu daného druhu v dalších generacích. To by jasně demonstrovalo oprávněný status druhů pro fylogeneticky vymezené skupiny izolátů podle zásad fylogenetického konceptu (Dettman et al., 2006).

Vymezení hranic těchto mezidruhových hybridů vůči mateřským izolátům/druhům pomocí molekulárních metod (PCR-fingerprinting, sekvenování několika lokusů) a zkoumání jejich životaschopnosti v F1 a F2 generacích bude předmětem následujícího studia.

4.6 Citlivost k antimykotikům

Díky spolupráci s Lékařskou fakultou University Palackého v Olomouci se podařilo nalézt u některých linií odpovídajících novým druhům i specifická spektra citlivostí k antimykotikům. Tyto výsledky mohou mít význam i v klinické praxi vzhledem k tomu, že komplex zahrnuje původce infekcí člověka a zvířat (Dudová et al., 2013).

5. ZÁVĚR

Při vymezování hranic heterothalických druhů se podle poznatků shromážděných v této práci není možné opřít o druhový koncept založený pouze na molekulárních datech. Tento čistě fylogenetický přístup může vést k nadhodnocování počtu druhů. Důležité je zahrnutí dostatečného množství izolátů do fylogenetických analýz a propojení s biologickým konceptem druhu a morfologickými charakteristikami pohlavního stádia. Snahou této práce bylo podpořit fylogenetický koncept druhu párovacími experimenty, které měly ukázat existenci pohlavního procesu mezi izoláty daných linií reprezentující druhy. Dalším důležitým faktorem bylo zohlednění morfologie a fyziologických charakteristik. Zejména stabilita morfologie askospor uvnitř jednotlivých druhů se ukázala být důležitým znakem, narozdíl od mezidruhových hybridů, kteří vykazovali odlišnou morfologii.

V této práci se podařilo na základě fylogenetické analýzy a křížících experimentů vymezit mezidruhové hranice 8 druhů komplexu *Aspergillus viridinutans*, mezi kterými byly i nepopsané druhy. Párovacími pokusy se též podařilo indukovat tvorbu teleomorfy u druhu *Aspergillus turcosus*, která do té doby nebyla pozorována.

Pozornost by měla být dále věnována především zkoumání životaschopnosti vnitrodruhových kříženců a prokázání předpokládané snížené životaschopnosti mezidruhových hybridů. Zodpovězení této otázky bude předmětem studia méj dizertační práce a tyto výsledky by měly dále upřesnit druhový koncept u heterothalických druhů *Aspergillus*. Tyto výsledky by měly být aplikovatelné i na další skupiny hub.

6. LITERATURA

- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., 2008, *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 1244-1251.
- Balajee, S., Houbraken, J., Verweij, P., Hong, S., Yaguchi, T., Varga, J., Samson, R., 2007, *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology* 59, 39-46.
- Balajee, S.A., Gribskov, J.L., Hanley, E., Nickle, D., Marr, K.A., 2005, *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4, 625-632.
- Balajee, S.A., Kano, R., Baddley, J.W., Moser, S.A., Marr, K.A., Alexander, B.D., Andes, D., Kontoyiannis, D.P., Perrone, G., Peterson, S., 2009, Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3138-3141.
- Balajee, S.A., Nickle, D., Varga, J., Marr, K.A., 2006, Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell* 5, 1705-1712.
- Barrs, V., Beatty, J., Dhand, N., Talbot, J., Bell, E., Abraham, L., Chapman, P., Bennett, S., van Doorn, T., Makara, M., 2014, Computed tomographic features of feline sino-nasal and sino-orbital aspergillosis. *The Veterinary Journal*.
- Barrs, V., Halliday, C., Martin, P., Wilson, B., Krockenberger, M., Gunew, M., Bennett, S., Koehlmeyer, E., Thompson, A., Fliegner, R., 2012, Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. *The Veterinary Journal* 191, 58-64.
- Barrs, V.R., van Doorn, T.M., Houbraken, J., Kidd, S.E., Martin, P., Pinheiro, M.D., Richardson, M., Varga, J., Samson, R.A., 2013, *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *Plos One* 8, e64871.
- Coelho, D., Silva, S., Vale-Silva, L., Gomes, H., Pinto, E., Sarmiento, A., Pinheiro, M.D., 2011, *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis. *Medical Mycology* 49, 755-759.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnais, S., Picard, M., 1997, Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 411-428.
- Dettman, J.R., Jacobson, D.J., Taylor, J.W., 2006, Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* 98, 436-446.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007, BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7, 214.
- Dudová, Z., Hubka, V., Svobodová, L., Hamal, P., Nováková, A., Matsuzawa, T., Yaguchi, T., Kubatová, A., Kolařík, M., 2013, *Aspergillus viridinutans* complex: polyphasic taxonomy, mating behaviour and antifungal susceptibility testing. In: *Mycoses*, pp. 162-163.
- Farrell, J.J., Kasper, D.J., Taneja, D., Baman, S., O'Rourke, L.M., Lowery, K.S., Sampath, R., Bonomo, R.A., Peterson, S.W., 2014, Acute Respiratory Distress caused by *Neosartorya udagawae*. *Medical Mycology Case Reports*.
- Fedorova, N.D., Khaldi, N., Joardar, V.S., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M.J., Crabtree, J., Silva, J.C., Badger, J.H., Albarraq, A., 2008, Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS genetics* 4, e1000046.
- Fujimoto, H., Ikeda, M., Yamamoto, K., Yamazaki, M., 1993, Structure of fischerin, a new toxic metabolite from an ascomycete, *Neosartorya fischeri* var. *fischeri*. *Journal of natural products* 56, 1268-1275.
- Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D.M., Hood, M.E., 2008, Speciation in fungi. *Fungal genetics and biology* 45, 791-802.
- Guarro, J., Kallas, E.G., Godoy, P., Karenina, A., Gene, J., Stchigel, A., Colombo, A.L., 2002, Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerging infectious diseases* 8, 989-991.

- Gyotoku, H., Izumikawa, K., Ikeda, H., Takazono, T., Morinaga, Y., Nakamura, S., Imamura, Y., Nishino, T., Miyazaki, T., Kakeya, H., 2012, A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Medical Mycology* 50, 631-636.
- Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2009, PAST-PALaeontological STatistics, ver. 1.89. University of Oslo, Oslo.
- Hiscock, S.J., Kües, U., 1999, Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *International review of cytology* 193, 165-295.
- Hong, S.-B., Go, S.-J., Shin, H.-D., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2005, Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97, 1316-1329.
- Hong, S.-B., Kim, D.-H., Park, I.-C., Choi, Y.-J., Shin, H.-D., Samson, R., 2010, Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a new concept of species delimitation. *The Journal of Microbiology* 48, 607-615.
- Hong, S.-B., Shin, H.-D., Hong, J., Frisvad, J.C., Nielsen, P.V., Varga, J., Samson, R.A., 2008, New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 87-98.
- Horie, Y., Miyaji, M., Nishimura, K., Franco, M.F., Coelho, K.L.R., 1995, New and interesting species of *Neosartorya* from Brazilian soil. *Mycoscience* 36, 199-204.
- Hubka, V., Kolarik, M., 2012, β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 29, 1.
- Hubka, V., Kolarik, M., Kubátová, A., Peterson, S.W., 2013a, Taxonomic revision of the genus *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 12-151.
- Hubka, V., Peterson, S.W., Frisvad, J.C., Yaguchi, T., Kubátová, A., Kolařík, M., 2013b, *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section *Fumigati*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63, 783-789.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001, MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Jacobsen, S., Wittig, M., Pöggeler, S., 2002, Interaction between mating-type proteins from the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Current genetics* 41, 150-158.
- Kano, R., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H., Hasegawa, A., Balajee, S.A., 2008, Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. *Mycoses* 51, 360-361.
- Kano, R., Shibahashi, A., Fujino, Y., Sakai, H., Mori, T., Tsujimoto, H., Yanai, T., Hasegawa, A., 2013, Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science* 75, 7-10.
- Katz, M.E., Dougall, A.M., Weeks, K., Cheetham, B.F., 2005, Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 551-555.
- Kronstad, J., Staben, C., 1997, Mating type in filamentous fungi. *Annual review of genetics* 31, 245-276.
- Kück, U., Pöggeler, S., 2009, Cryptic sex in fungi. *Fungal Biology Reviews* 23, 86-90.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008, MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9, 299-306.
- Kwon-Chung, K., Kim, S.J., 1974, A second heterothallic *Aspergillus*. *Mycologia*, 628-638.
- Lillehoj, E., Milburn, M., 1973, Viriditoxin Production by *Aspergillus viridinutans* and Related Species. *Applied microbiology* 26, 202-205.
- Matsuzawa, T., Takaki, G.M.C., Yaguchi, T., Okada, K., Abliz, P., Gonoi, T., Horie, Y., 2014, *Aspergillus arcoverdensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. *Mycoscience*.
- Metzenberg, R.L., Glass, N.L., 1990, Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12, 53-59.
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., 2005, Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156.

- Nováková, A., Hubka, V., Dudová, Z., Matsuzawa, T., Kubátová, A., Yaguchi, T., Kolařík, M., 2014, New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Diversity* 64, 253-274.
- Nováková, A., Hubka, V., Saiz-Jimenez, C., Kolarik, M., 2012, *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov., two species in section *Usti* from Spanish caves. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62, 2778-2785.
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S., 2008, Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471-474.
- Paden, J., 1968, A new variety of *Aspergillus fischeri*. *Mycopathologia et mycologia applicata* 36, 161-164.
- Padhye, A.A., Godfrey, J.H., Chandler, F.W., Peterson, S.W., 1994, Osteomyelitis caused by *Neosartorya pseudofischeri*. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2832-2836.
- Paoletti, M., Rydholm, C., Schwier, E.U., Anderson, M.J., Szakacs, G., Lutzoni, F., Debeaupuis, J.-P., Latgé, J.-P., Denning, D.W., Dyer, P.S., 2005, Evidence for Sexuality in the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current Biology* 15, 1242-1248.
- Peláez, T., Álvarez-Pérez, S., Mellado, E., Serrano, D., Valerio, M., Blanco, J.L., Garcia, M.E., Muñoz, P., Cuenca-Estrella, M., Bouza, E., 2013, Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. *Journal of medical microbiology* 62, 474-478.
- Posteraro, B., Mattei, R., Trivella, F., Maffei, A., Torre, A., De Carolis, E., Posteraro, P., Fadda, G., Sanguinetti, M., 2011, Uncommon *Neosartorya udagawae* fungus as a causative agent of severe corneal infection. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 2357-2360.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965, The genus *Aspergillus*. The genus *Aspergillus*., pp. ix+686 pp.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003, MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Samson, R., 1989, Filamentous fungi in food and feed. *Journal of applied bacteriology* 67, 27s-35s.
- Samson, R.A., Hong, S., Peterson, S., Frisvad, J.C., Varga, J., 2007, Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59, 147-203.
- Shigeyasu, C., Yamada, M., Nakamura, N., Mizuno, Y., Sato, T., Yaguchi, T., 2012, Keratomycosis caused by *Aspergillus viridinutans*: an *Aspergillus fumigatus*-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns. *Medical Mycology* 50, 525-528.
- Smith, G., 1952, *Aspergillus brevipes* n. sp. *Transactions of the British Mycological Society* 35, 241-IN241.
- Strandberg, R., Nygren, K., Menkis, A., James, T.Y., Wik, L., Stajich, J.E., Johannesson, H., 2010, Conflict between reproductive gene trees and species phylogeny among heterothallic and pseudohomothallic members of the filamentous ascomycete genus *Neurospora*. *Fungal genetics and biology* 47, 869-878.
- Sugui, J., Vinh, D., Nardone, G., Shea, Y., Chang, Y., Zelazny, A., Marr, K., Holland, S., Kwon-Chung, K., 2010, *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *Journal of Clinical Microbiology* 48, 220-228.
- Sugui, J.A., Losada, L., Wang, W., Varga, J., Ngamskulrunroj, P., Abu-Asab, M., Chang, Y.C., O’Gorman, C.M., Wickes, B.L., Nierman, W.C., 2011, Identification and characterization of an *Aspergillus fumigatus* “supermater” pair. *American Society For Microbiology* 2, e00234-00211.
- Swilaiman, S.S., O’Gorman, C.M., Balajee, S.A., Dyer, P.S., 2013, Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 12, 962-969.
- Takada, M., Horie, Y., Abliz, P., 2001, Two new heterothallic *Neosartorya* from African soil. *Mycoscience* 42, 361-367.
- Takada, M., Udagawa, S., 1985, A new species of heterothallic *neosartorya*. *Mycotaxon*.
- Taylor, J., Jacobson, D., Fisher, M., 1999, The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual review of phytopathology* 37, 197-246.

- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000, Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology* 31, 21-32.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22, 4673-4680.
- Tomoda, H., Nishida, H., Kim, Y.K., Obata, R., Sunazuka, T., Omura, S., Bordner, J., Guadliana, M., Dormer, P.G., Smith III, A.B., 1994, Relative and absolute stereochemistry of pyripyropene A, a potent, bioavailable inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT). *Journal of the American Chemical Society* 116, 12097-12098.
- Van Der Linden, J.W., Warris, A., Verweij, P.E., 2011, *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Medical Mycology* 49, S82-S89.
- Vinh, D.C., Shea, Y.R., Jones, P.A., Freeman, A.F., Zelazny, A., Holland, S.M., 2009a, Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerging infectious diseases* 15, 1292.
- Vinh, D.C., Shea, Y.R., Sugui, J.A., Parrilla-Castellar, E.R., Freeman, A.F., Campbell, J.W., Pittaluga, S., Jones, P.A., Zelazny, A., Kleiner, D., 2009b, Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clinical infectious diseases* 49, 102-111.
- Weisleder, D., Lillehoj, E. B. , 1971, Structure of viriditoxin, a toxic metabolite of *Aspergillus viridinutans*. *Tetrahedron Letters* 12, 4705-4706.
- Wortman, J., Fedorova, N., Crabtree, J., Joardar, V., Maiti, R., Haas, B., Amedeo, P., Lee, E., Angiuoli, S., Jiang, B., 2006, Whole genome comparison of the *A. fumigatus* family. *Medical Mycology* 44, S3-S7.
- Yaguchi, T., Horie, Y., Tanaka, R., Matsuzawa, T., Ito, J., Nishimura, K., 2007, Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *The Japanese Society for Medical Mycology* 48, 37-46.

PŘÍLOHY

*New species in Aspergillus section Fumigati
from reclamation sites in Wyoming
(U.S.A.) and revision of A. viridinutans
complex*

**Alena Nováková, Vit Hubka, Zuzana
Dudová, Tetsuhiro Matsuzawa, Alena
Kubátová, Takashi Yaguchi & Miroslav
Kolařík**

Fungal Diversity
An International Journal of Mycology

ISSN 1560-2745

Fungal Diversity
DOI 10.1007/s13225-013-0262-5



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Mushroom Research Foundation. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (U.S.A.) and revision of *A. viridinutans* complex

Alena Nováková · Vit Hubka · Zuzana Dudová ·
Tetsuhiro Matsuzawa · Alena Kubátová ·
Takashi Yaguchi · Miroslav Kolařík

Received: 18 April 2013 / Accepted: 16 August 2013
© Mushroom Research Foundation 2013

Abstract The *Aspergillus viridinutans* complex includes morphologically similar, soil-inhabiting species. Although its species boundaries have not been fully defined, many isolates from the complex have been isolated as opportunistic human and animal pathogens. In the present study, these species were dominant in spoil sites subjected to various types of reclamation management after coal mining. These species were characterised using two different PCR-fingerprinting methods, sequence data from the β -tubulin (*benA*) and calmodulin (*caM*) genes, macro- and micro-morphology (optical and scanning electron microscopy), maximum growth temperatures and mating experiments. In addition, RNA polymerase II gene (*RPB2*), actin (*act1*) and ITS sequences were deposited for the ex-type isolates of newly described species. The mating experiment results, phylogenetic analyses and ascospore morphology suggested the presence of five species in the *A. viridinutans* complex. *Aspergillus aureolus* (syn. *Neosartorya aureola*) was the only homothallic species. Three species, *A. felis*, *A. udagawae* (syn. *N. udagawae*) and *A. wyomingensis* sp. nov., were heterothallic and their morphologically distinguishable teleomorph was induced by systematic mating experiments. *Aspergillus viridinutans* s. str. seems to be

a very rare species and was represented only by the ex-type isolate in which the MAT1-1 locus was amplified. *Aspergillus viridinutans* and *A. aureolus* were typified in accordance with the rules of the new botanical code. Other species outside the *A. viridinutans* complex isolated from the reclamation sites were *A. fumigati*affinis and *A. lentulus* as well as two new sister species, *A. brevistipitatus* sp. nov. and *A. conversis* sp. nov. which were closely related each to other and to *N. papuensis*. Both new species are phylogenetically distant from all anamorphic species and resemble *A. brevipes*, *A. duricaulis* and *A. unilateralis* in micromorphology and are distinguishable from each other by the slower growth of *A. conversis* on all tested media. Interestingly, no isolate from the reclamation sites represented *A. fumigatus* s. str. which is usually reported as the dominant species from the section *Fumigati* in soil.

Keywords *Aspergillus fumigatus* · Heterothallic species · MAT locus · *Neosartorya udagawae* · PCR fingerprinting · Soil fungi

Introduction

Aspergillus section *Fumigati* includes species that have an overall economic impact. Some of these species are causal agents of human and animal infections or important decomposers of organic matter in soil, and they are isolated as foodstuff contaminants (Samson 1989; Tourmas 1994; Balajee et al. 2005, 2009; Katz et al. 2005; Yaguchi et al. 2007, 2012; Hubka et al. 2012). Section *Fumigati* members produce many different compounds, including mycotoxins which are used or have potential to be used in pharmacology and biotechnology (Wong et al. 1993; Tomoda et al. 1994; Larsen et al. 2007; Samson et al. 2007a). Soil is the most important reservoir of section *Fumigati* members and *A. fumigatus* is usually reported as the most common species worldwide (Klich 2002; Domsch et al. 2007).

A. Nováková
Biology Centre AS CR, v.v.i., Institute of Soil Biology,
Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

V. Hubka · Z. Dudová · M. Kolařík
Laboratory of Physiology and Genetics of Fungi,
Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083,
142 20 Prague 4, Czech Republic

V. Hubka (✉) · Z. Dudová · A. Kubátová · M. Kolařík
Department of Botany, Faculty of Science, Charles University
in Prague, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic
e-mail: hubka@biomed.cas.cz

T. Matsuzawa · T. Yaguchi
Medical Mycology Research Center, Chiba University,
1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

Morphological differentiation of heterothallic and anamorphic species is limited because of their overlapping features on the anamorph, and molecular methods are routinely used to identify them. Four new anamorphic species were recently described based on molecular data from a group considered in the past to represent *A. fumigatus* (Balajee et al. 2005; Hong et al. 2005, 2008). In contrast to anamorph micromorphology, ascospore features belong to the most informative phenotypic characteristics in section *Fumigati* taxonomy. Using systematic crossing of opposite mating type isolates verified by molecular methods, the teleomorph was discovered in *A. fumigatus* (O’Gorman et al. 2009) which was previously treated as a strictly anamorphic species. This systematic approach replaced previous teleomorph discovery attempts based on randomly crossing phenotypically similar isolates which were successful in several heterothallic species (Kwon-Chung and Kim 1974; Takada and Udagawa 1985; Horie et al. 1995; Takada et al. 2001).

During the course of a survey of soil microorganisms in spoil sites subjected to various types of reclamation management after coal mining in Wyoming (U.S.A.), *Aspergillus* section *Fumigati* members were among the most frequently isolated organisms. These isolates were characterised using PCR-fingerprinting methods, sequence data, phenotypic analysis and mating experiments. This approach resulted in the discovery of three new species which are described in this study.

Material and methods

Description of studied sites and sampling and isolation methods

Soil samples were collected from two coal mine reclamation sites in the Powder River Basin, Converse County, Wyoming, U.S.A. One site was the Belle Ayr Mine, a functional coal mine located just south of Gillette. This site was dominated by cool season grass. The average annual precipitation in this area is 376 mm and the average air temperature is 6.7 °C (Wick et al. 2007). Samples were collected from this site in May 2008 and 2011. The other site was the Rolling Hills Wind Plant (formerly the Dave Johnson Coal Mine), located to the north of Glenrock. The mine was closed down in 2002 and the whole mine is currently being reclaimed. This research site was dominated by sagebrush grassland (Rana et al. 2007). The average annual precipitation in this area is 266 mm and the average air temperature is 7.4 °C (Ganjegunte et al. 2009). Samples were collected from this site in September 2010. All soil samples from both sites were collected from a depth of 0–5 cm by trowel and placed into sterile bags.

The soil dilution plate method and soil washing technique (Garrett 1981; Kreisel and Schauer 1987) and dichloran rose

bengal chloramphenicol agar (DRBC), Sabouraud glucose agar (SGA) and beer-wort agar (BWA) (Atlas 2010) were used to isolate microscopic fungi. The method of heating of soil samples at 75 °C for 30 min according to Samson et al. (1996) and Marvanová (1999) was used to isolate thermo-resistant microfungi. Keratin and cellulose bait techniques were also used for the isolation of soil microfungi in damp chambers in laboratory conditions. Pronghorn antelope and jackrabbit dungs collected at the studied sites were cultivated on filtrate paper or soil samples in damp chambers at room temperature to isolate coprophilic microfungi.

Phenotypic studies

The strains were grown on malt extract agar (MEA; malt extract–Fluka Chemie GmbH, Switzerland), Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA; yeast extract–Fluka Chemie GmbH, Switzerland), yeast extract sucrose agar (YES) and Czapek–Dox agar (CZA) plates at 25 °C. Agar media were formulated following the methods of Frisvad and Samson (2004) and Atlas (2010). Micromorphology was observed on MEA. Colour determination was performed according to the ISCC–NBS Centroid Colour Charts (Kelly 1964). Scanning electron microscopy (SEM) was performed using a JEOL JSM-6380 LV scanning electron microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan). Pieces of colonies growing on OA or MEA (5×5 mm) with ascomata were fixed and observed using the settings described in Hubka et al. (2013a).

Growth at 42, 45 and 47 °C was tested on MEA plates sealed with Parafilm. The production of cyclopiazonic acid or related alkaloids was tested using the Ehrlich test and the production of acid compounds in the agar medium was tested on creatine sucrose agar (CREA) following the methods of Samson et al. (2007b).

Molecular studies and phylogenetic analysis

DNA was extracted from seven-day-old colonies using the Microbial DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories). PCR fingerprinting, using the phage *M13-core* sequence as an oligonucleotide primer (5'-GAGGGTGGCGTTCT) and the primer *834t* [(AG)₈CG], was performed and evaluated as described previously (Hubka and Kolařík 2012; Nováková et al. 2012). Partial *benA* and *caM* sequences were amplified from at least one isolate with a unique combination of fingerprinting patterns. The PCR conditions for amplification of ITS, *benA* and *caM* loci were as described by Hubka et al. (2012). The annealing temperature for amplification of *act1* gene was 60 °C. The *RPB2* gene was amplified using Touchdown cycling conditions, as described by Hubka and Kolařík (2012). The partial *benA* gene (encoding β -tubulin) was amplified with primers *T10* (5'- ACGATAGGTTCCCTCCAGAC) or *Bt2a* (5'- GGTAACCAAATCGGTG

CTGCTTTC) and *Bt2b* (5'- ACCCTCAGTG TAGTGACC CTTGGC); the partial *cam* gene (encoding calmodulin), with *CF1M* (5'- AGGCCGAYTCTYTGACYGA) and *CF4* (5'- TTTYTGATCATRAGYTTGGAC); the partial *act1* gene (encoding actin), with *ACT-512 F* (5'-ATGTGCAAGGCCG GTTTCGC) and *ACT-783R* (5'-TACGAGTCCTTCTGG CCCAT); the partial *RPB2* gene (encoding RNA polymerase II), with *fRPB2-5F* (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG) and *fRPB2-7cR* (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT); and the ITS region with *ITS1F* (5'- CTTGGTCATTTAGAGG AAGTAA) and *NL4* (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG).

Sequences were inspected and assembled using Bioedit v. 7.0.0 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Alignments of the regions were performed using the FFT-NSi strategy, as implemented in MAFFT v. 6.861b (Katoh et al. 2005). The *benA* and *cam* loci were combined and Maximum likelihood (ML) analysis was performed using RAxML version 7.0.4 with bootstrapping (1,000 replicates) (Stamatakis et al. 2008) running on the CIPRES web portal (www.phylo.org). The analysis was performed with the model (GAMMA + P-I) and the α parameter was estimated using the same software. Bayesian Inference analysis (BI) was performed using MrBayes v3.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003), the substitution model K2 + G + I was determined as the most suitable using MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011) and metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo search algorithm was run with 5×10^6 generations. The burn-in and convergence of the chains were determined with TRACER v1.5 (available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>). Twenty-six data partitions were recognised in the RAxML and MrBayes analyses which include introns and exons and splitting of each codon position to a separate partition.

Mating experiments

The genotype of the *MAT* locus was determined using the primers described by Sugui et al. (2010). Opposite mating type strains were paired within and between major clades (Fig. 1) on MEA, PDA and OA plates and incubated at 25, 30 and 37 °C in the dark. The plates were sealed with Parafilm and examined periodically for 3 months under a stereomicroscope for the production of ascospores.

Results

Using the above-mentioned isolation techniques, many microscopic fungi were isolated from soil samples, including those that, according to their micromorphological characteristics, belonged to the *Aspergillus* section *Fumigati*. Long-term whitish cottony colonies with varying sporulation types and coloration that were dissimilar from *A. fumigatus* were

isolated and characterised using molecular methods, phenotypic methods and mating experiments.

Molecular studies

Eight unique fingerprinting pattern types (and five subtypes in pattern VIII) were observed among 73 isolates (Table 1) when using fingerprinting with *M13-core* primer. Similarly, eight pattern types (and four subtypes in pattern VIII) were observed when using fingerprinting with 834 t primer (Table 1). There were 19 unique combinations resulting from the two fingerprinting methods and for each combination the *benA* and *cam* genes were amplified for at least one isolate.

No major conflicts were observed between single locus trees (ML as well as BI) based on *benA* and *cam*, and the data were combined into one dataset. There were 104 sequences and 1,030 positions in the final dataset of which 520 were variable and 398 were parsimony informative. The single gene alignments were deposited in TreeBASE (submission ID 14615). A pseudogene with stop codons within coding regions which was derived from the calmodulin gene, was amplified for isolate CCF 4477 (see the long branch in Fig. 1). The insertions within exons were eliminated from the alignment. Based on the *benA* gene sequence, this isolate belongs to the *A. udagawae* clade. Two additional protein coding loci (*RPB2* and *act1*) were amplified for the ex-type isolates of the newly described species and were deposited under accession numbers HF937377–HF937384. Similarly, the sequence of ITS region was deposited for the ex-type isolates because of interest in barcoding fungi (HG324081, HF937385, HF937386). However, data for section *Fumigati* are incomplete, and these three loci were not used for the phylogenetic analysis. The sequences of all five loci were able to uniquely determine all species of *A. viridinutans* complex.

Among 73 isolates from the reclamation sites, 68 belonged to the *A. viridinutans* complex. *Aspergillus udagawae* ($n=52$) was the most frequently isolated species, followed by *A. wyomingensis* sp. nov. ($n=12$) and *A. felis* ($n=4$). Two isolates (CCF 4499 and CCF 4482) were conspecific with *A. fumigati*affinis and one isolate (CCF 4117) was conspecific with *A. lentulus*. Two isolates (CCF 4149 and CCF 4190) showed unique, fingerprinting patterns, ITS sequences and exhibited 2–3 % dissimilarity on protein coding loci (*benA*, *cam*, *act1* and *RPB2*) each to the other and to the most closely related *N. galapagensis*; these isolates are proposed as the new species *A. brevistipitatus* sp. nov. and *A. conversis* sp. nov.

Mating experiments

MAT1-1 and MAT1-2 idiomorphs were determined for almost all isolates (Tables 1 and 2) based on different lengths of gene products in the assay described by Sugui et al. (2010). The identity of products was verified by DNA sequencing in

several isolates (accession numbers HF937387–HF937392). Systematic mating experiments were performed within and between major clades. Suitable conditions for successful mating differed between species (for details, see [Taxonomy](#) section below).

The MAT1-2 gene was amplified in three of four *A. felis* isolates. Five additional isolates from different sources (Table 2) were included in the mating experiments (CCF 4376, IFM 54303 and IFM 60053 which had the MAT1-1 idiomorph, and CBS 135240^T and FRR 5680 which had MAT1-2). Fertile cleistothecia were present in almost all possible combinations, and the ascospore morphology was consistent between the crosses. The isolates did not mate with type isolates of *A. wyomingensis*, *N. udagawae* and *A. viridinutans*. The isolates CBS 458.75 (MAT1-1, the ex-type strain of *A. fumigatus* var. *sclerotiorum*; Rai et al. 1971) and IMI 182127 (MAT idiomorph was not identified) which are both closely related to *A. felis* clade, did not produce cleistothecia with any isolate of *A. felis* and as well as with other species. However, both these isolates were held for decades in culture collections, and it is possible that their ability to reproduce sexually was decreased by repeated passaging and degeneration. As no other morphological and physiological differences from *A. felis* were found, these isolates are considered here to represent *A. felis*. The examination of mating behaviour of genetically similar and fresh isolates would definitely confirm that both these strains represent either *A. felis* or separate species. The isolates IMI 280490 and NRRL 6106 previously examined by Varga et al. (2000) are no longer available but based on deposited sequence data also represent *A. felis*. Other two “atypical” isolates IMI 306135 and JV3 mentioned by Varga et al. (2000) are not included in *A. viridinutans* complex and are related to *A. lentulus* and *A. fumisynnematus*.

The ratio of MAT1-1 isolates to MAT1-2 isolates in *A. wyomingensis* ($n=14$) was 8:6. The isolates within the clade produced fertile cleistothecia and did not mate with other species from the *A. viridinutans* complex. The isolates CCF 4416 and CCF 4417^T produced particularly high numbers of cleistothecia, and dried cultures with cleistothecia were deposited into the herbarium of the Mycological Department, National Museum in Prague (PRM). *Aspergillus viridinutans* s. str., represented only by the ex-type isolate, had the MAT1-1 idiomorph and was used only to demonstrate cross-sterility with other species.

The isolates designated in this study as *A. udagawae* (Fig. 1) clustered into three subclades (clade 1: all isolates from Wyoming; clade 2: two mating ex-type isolates, IFM 46972^{MT} and IFM 46973^{MT}, from Brazilian soil; clade 3: additional isolates CCF 4479 and CMF ISB 2190 from Illinois and Indiana). The ratio of MAT1-1 isolates to MAT1-2 isolates was 13:42 ($n=55$; not determined in two isolated). Eight MAT1-1 isolates (IFM 46972^{MT}, CMF ISB 2190, CCF

Fig. 1 Phylogenetic tree showing relationships of isolates from reclamation sites in Wyoming to other species in section *Fumigati*. The strains isolated in Wyoming are in bold font (accession numbers are listed in Table 1 and 2; for other accession numbers see Hubka et al. (2013b)). Thick lines indicate branches that support Bayesian probabilities greater than 0.95 and a bootstrap value greater than 90 %. Only bootstrap values ≥ 50 % and Bayesian probabilities ≥ 0.50 are shown. The ex-type isolates are designated by a superscript T. *Dichotomomyces cejpii* NRRL 5183^T was used as outgroup

4476, CMF ISB 2687, CMF ISB 2688, CMF ISB 2689, CMF ISB 2690 and CMF ISB 2691) and eight MAT1-2 isolates (IFM 46973^{MT}, CCF 4475, CCF 4478, CCF 4479, CCF 4481, CCF 4491, CCF 4494 and CMF ISB 1972) were chosen for mating experiments in all possible combinations. In the mating assay, only the mating ex-type isolate IFM 46972^{MT} produced fertile cleistothecia with all MAT1-2 strains with exception of CCF 4481. Additional pair producing fertile cleistothecia was CCF 4479×CMF ISB 2689. Cleistothecia without ascospores were produced by pair CCF 4502×CMF ISB 2688. Other crosses did not produce cleistothecia.

Future studies are needed to confirm genetic recombination based molecular genetic methods in species from *A. viridinutans* complex, especially in species with high intra-species genetic diversity such as *A. udagawae* and *A. felis*. However, we believe that the species boundaries as determined here using mating experiment (cross-fertility and cross-sterility) and strongly supported by morphology of ascospore could represent the true species limits.

Phenotypic species differentiation

The *A. viridinutans* complex includes five species. *Aspergillus aureolus* (syn. *A. indohii*) is the only homothallic species within the complex, the remaining species are probably heterothallic, and the teleomorph form (neosartorya-morph) was observed in *A. udagawae*, *A. wyomingensis* and *A. felis* (Fig. 2).

Species differentiation based solely on anamorph phenotype and macromorphology is difficult. However, *A. viridinutans* s. str. could be distinguished from other species within the complex by its slower growth and shorter conidiophores (rarely exceeding 100 μm). Nodding heads occurred in all species within the *A. viridinutans* complex and in some non-related species from section *Fumigati* (see [Discussion](#)). In contrast, the morphology of ascospores alone clearly differentiates all heterothallic species within the *A. viridinutans* complex (see sections [Taxonomy](#) and [Dichotomous key to species from *Aspergillus viridinutans* complex](#)).

No acid production on CREA was observed in *A. felis* or in *A. viridinutans* s. str., *A. brevistipitatus*, or *A. conversis*. In contrast, isolates of *A. fumigati*affinis and *A. lentulus* showed strong acid production. Variation in acid production on CREA occurred in isolates of *A. udagawae* and *A. wyomingensis*. In

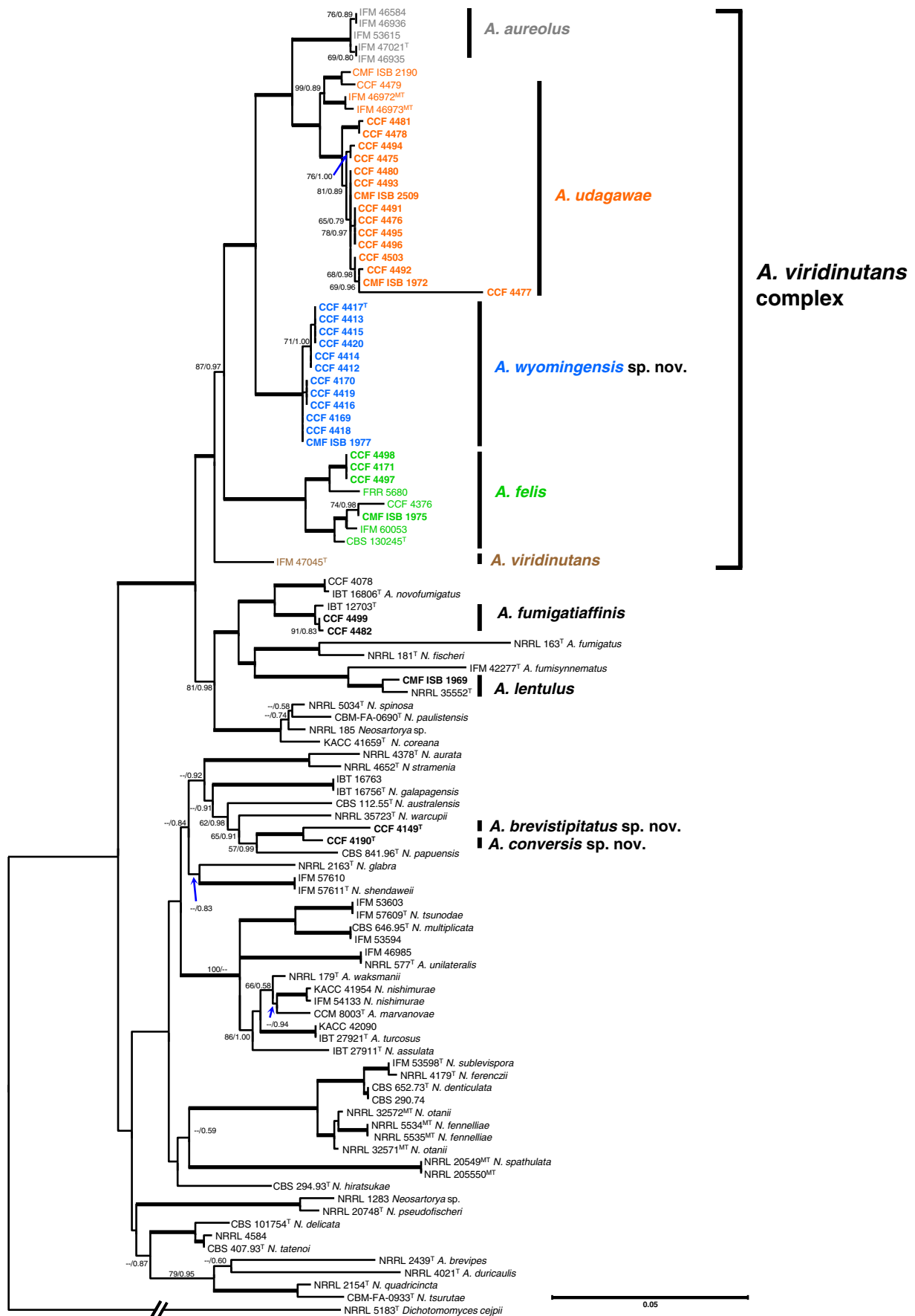


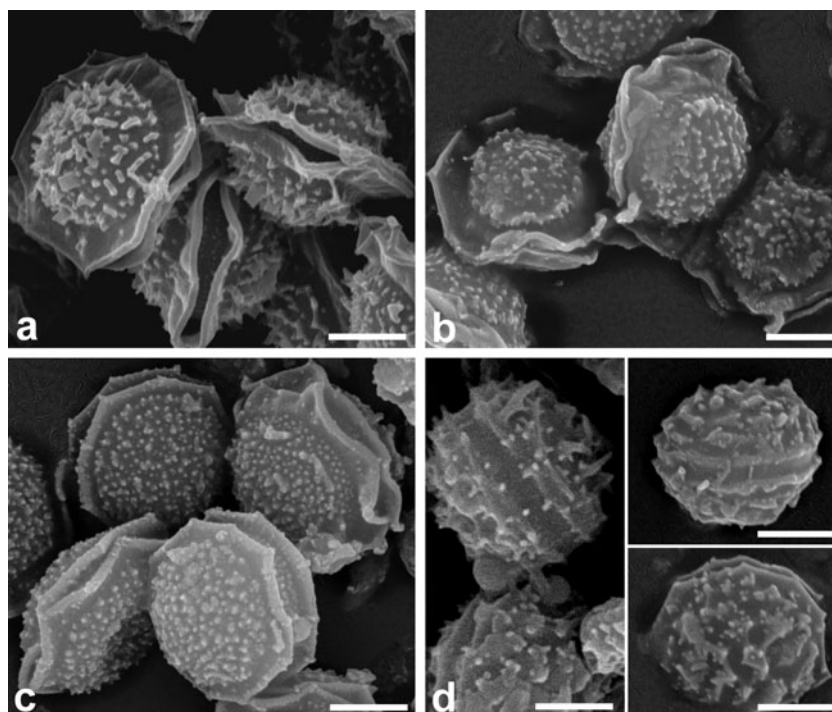
Table 2 Additional isolates examined in this study

Species identity	Culture collection nr. ^a	Locality	Year	MAT locus	EMBL and GenBank accession nrs.	
					<i>benA</i>	
					<i>caM</i>	
<i>A. aureolus</i>	IFM 47021 ^T =CBS 105.55 ^T =NRRL 2244 ^T =IMI 06145 ^T	Soil, Ghana	1950	ND ^b	AF057319	AY689369
	IFM 46584=CCF 4645	Soil, Brazil	1993	ND	HG426057	HG426050
	IFM 46935=CCF 4646	Soil, unknown	–	ND	HG426058	HG426051
	IFM 46936=CCF 4647	Soil, unknown	–	ND	HG426059	HG426052
	IFM 53615=CCF 4571 (ex-type of <i>A. indohii</i>)	Soil, Brazil	2001	ND	AB488757	AB488765
<i>A. felis</i>	CBS 130245 ^T	Retrolbar mass in cat, Australia	<2013	MAT1-2	JX021700	JX021715
	CBS 458.75 (ex-type of <i>A. fumigatus</i> var. <i>sclerotiorum</i>)	Soil, India	<1971	MAT1-2	AY685178	HG426048
	CCF 4376	Soil of reclamation site, Czech Rep.	2011	MAT1-1	HF933380	HF933422
	FRR 5680	Retrolbar abscess in cat, Australia	<2005	MAT1-2	HF933381	HF933420
	IFM 54303=CCF 4570	Food, Japan	<2007	MAT1-1	AB248299	AB259973
<i>A. udagawae</i>	IFM 60053=CCF 4559	Abscess near thigh bone (osteomyelitis in man), Japan	2012	MAT1-1	HF933382	HF933421
	IMI 182127	<i>Pinus caribea</i> , Sri Lanka	<1974	ND	AF134777	DQ094888
	IFM 46973 ^{MT} =CBS 114218 ^{MT} =CCF 4558 ^{MT}	Soil, Brazil	1993	MAT1-2	AB248303	AY689373
	IFM 46972 ^{MT} =CBS 114217 ^{MT}	Soil, Brazil	1993	MAT1-1	AB248302	AY689372
	CCF 4233	Human nail, Czech Rep.	2011	ND		HG426054
<i>A. viridinitans</i>	CCF 4479=CMF ISB 2189	Illinois, U.S.A.	2011	MAT1-2	HF933377	HF933417
	CMF ISB 2190	Indiana, U.S.A.	2011	MAT1-1	HG426055	HG426049
	IFM 47045 ^T =NRRL 4365 ^T =NRRL 576 ^T =CBS 127.56 ^T =IMI 367415 ^T =CCF 4382 ^T	Dung of rabbit, Australia	<1954	MAT1-1	EF669834	EF669904
	IFM 59681=CCF 4563	Soil, China	2008	MAT1-2	HG426056	HG426053
	IMI 133982=CCF 4383	Soil, Russia	<1968	MAT1-1	AF134775	DQ094889

^a Acronyms of culture collections: CMF ISB—Collection of Microscopic Fungi of the Institute of Soil Biology of the Academy of Sciences of the Czech Republic in České Budějovice, CCF—Culture Collection of Fungi in the Department of Botany of Charles University in Prague, IFM—Collection at the Medical Mycology Research Center, Chiba University, NRRL—Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, U.S.A.; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; FRR—Food Fungal Culture Collection, North Ride, Australia; IMI, CABI's collection of fungi and bacteria, Egham, UK

^b Not determined

Fig. 2 Comparison of ascospores morphology of homothallic *A. aureolus* and three heterothallic species in *A. viridinutans* complex as observed by SEM. **a** *A. aureolus*; **b** *A. felis*; **c** *A. udagawae*; **d** *A. wyomingensis*. — Scale bars 2 μm



visible sporulation, no acid production. Ehrlich test negative. Maximum growth temperature is 42 °C.

Conidial heads short columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, most commonly 34–144 \times 2.5–3.2 μm , septate, sometimes extremely short measuring only several μm , nodding heads common. Conidial heads uniseriate, vesicles subglobose to pyriform, 7–13 μm , phialides ampuliform, 3.5–4.5 μm , covering the upper half to two-third of vesicle. Conidia subglobose, rough, verrucose to spinose, 2–2.9 μm .

Diagnosis. The micromorphology is reminiscent of *A. brevipes*, *A. unilateralis* and *A. duricaulis* which also have echinulate conidia and short conidiophores with common nodding appearance. Colonies of *A. brevipes* are purple-red, and *A. unilateralis* has nearly black reverses on CZA. The growth of *A. conversis* and *A. duricaulis* on all media is slower in comparison with *A. brevistipitatus*.

Type. U.S.A., Wyoming, Converse County, Powder River Basin, Glenrock—Rolling Hills Wind Plant (former Dave Johnson Coal Mine), site recultivated by crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*), ex soil, 2010, *A. Nováková*, holotype PRM 860543, a dried culture, isotype PRM 860544, culture ex-holotype CCF 4149^T (= CMF ISB 2152^T=NRRL 62500^T=IFM 60858^T=CBS 135454^T).

Aspergillus conversis Hubka & A. Nováková, *sp. nov.* — MB803935; Fig. 4

Etymology. Relating to Converse County, Wyoming, U.S.A.

Description. Colonies on CYA 25–26 mm in diam at 25 °C in 7 days, velutinous, wrinkled, with white margin, light greenish grey (ISCC-NBS No. 154) to greyish yellow green

(No. 122), no exudate or soluble pigment production, reverse yellowish white (No. 92) to pale yellow (No. 89). Colonies at 37 °C 30–40 mm, velutinous, wrinkled, yellowish grey (No. 93), light greenish grey (154) in margin, reverse pale orange yellow (No. 73). Colonies on MEA 30–32 mm, velutinous with floccose centre, light greenish grey (No. 154) with pale green (No. 149) centre, no exudate or soluble pigment production, reverse brilliant yellow (No. 83) to brilliant orange yellow (No. 67). Colonies on YES 32–38 mm in diam, velutinous, wrinkled, light greenish grey (No. 154) to greenish grey (No. 155), exudate yellowish white (No. 92) to pale greenish yellow (No. 104), no soluble pigment, reverse strong yellow (No. 84). Colonies on CZA 28–30 mm in diam, no sporulation, no exudate or soluble pigment production. Colonies on CREA 15–20 mm in diam, no visible sporulation, no acid production, reverse colourless. Ehrlich test negative to very light yellow. Maximum growth temperature is 42 °C.

Conidial heads short columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, septate, most commonly 47–70(–90) \times 2.5–4 μm , sometimes extremely short measuring only several μm , nodding heads common. Conidial heads uniseriate, vesicles subglobose to subclavate, 6.5–9(–12) μm , phialides ampuliform, 3.5–5 μm , covering the upper half of vesicle. Conidia ellipsoidal to subglobose, delicately roughened, 2.0–2.8 μm .

Diagnosis. The species is most closely related and similar to *A. brevistipitatus* (see “Diagnosis” above) but the growth of *A. conversis* is slower on all media and at all temperatures. The colonies of *A. conversis* on CZA lack broad areas of submerged growth which are present in *A. duricaulis*.

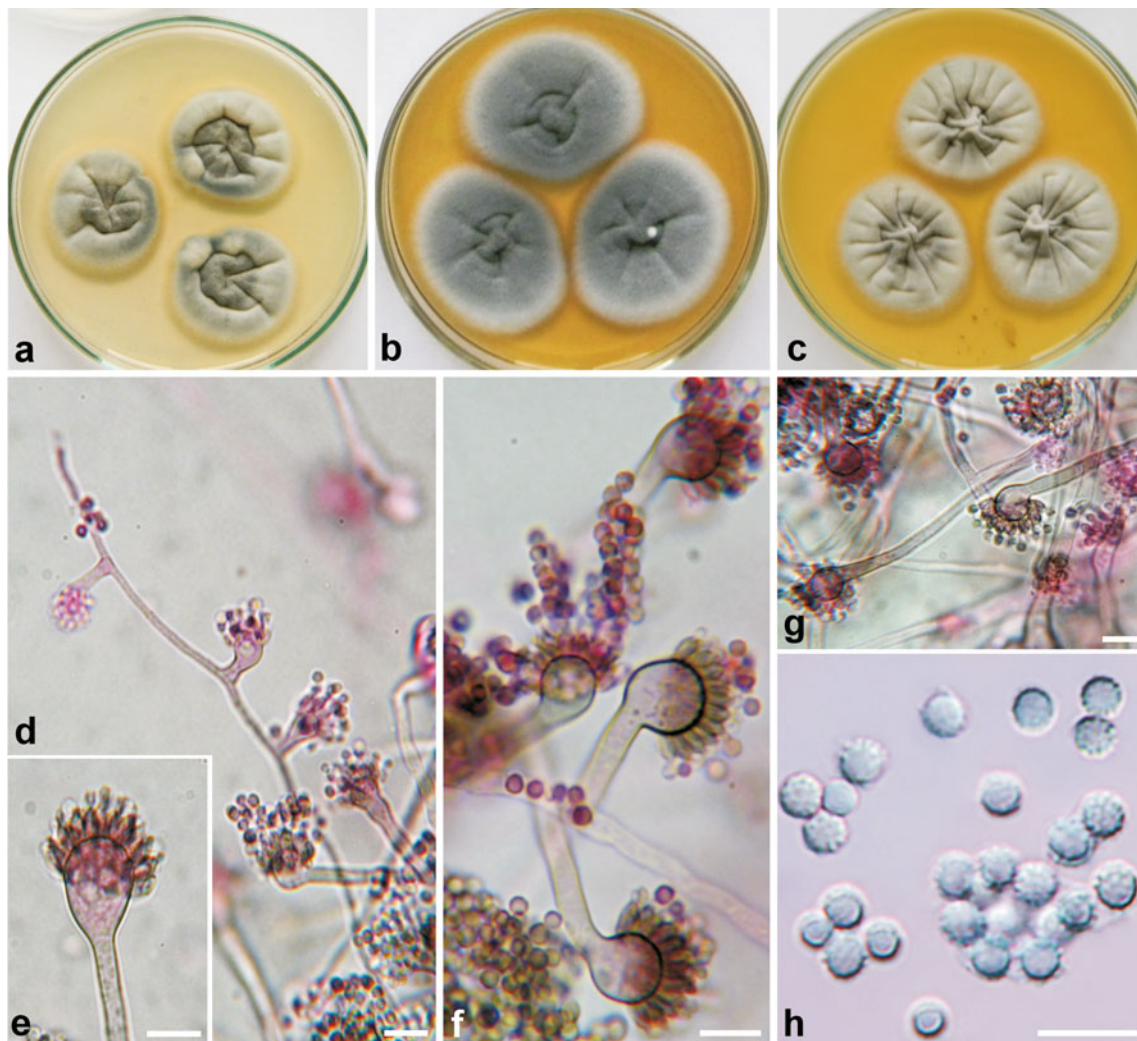


Fig. 3 *Aspergillus brevistipitatus* CCF 4149^T. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d–g** conidiophores; **h** conidia. — Scale bars 10 μm

Type. U.S.A., Wyoming, Converse County, Powder River Basin, Glenrock—Rolling Hills Wind Plant (former Dave Johnson Coal Mine), site recultivated by crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*), ex soil, 2010, *A. Nováková*, holotype PRM 860541, a dried culture, isotype PRM 860542, culture ex-holotype CCF 4190^T=CMF ISB 2151^T=NRRL 62496^T=IFM 60857^T=CBS 135457^T.

Aspergillus viridinutans complex

Aspergillus aureolus Fennell and Raper 1955, Mycologia 47: 71 — MB292836; Fig. 5

= *Sartorya aureola* (Fennell & Raper) Subram. 1972, Curr. Sci. 41: 760 — MB323108

= *Neosartorya aureola* (Fennell & Raper) Malloch & Cain 1973, Can. J. Bot. 50: 2620 — MB318627

= *Aspergillus aureoluteus* Samson & W. Gams 1985, in Samson & Pitt (eds), *Adv. Penicillium Aspergillus* Syst.: 34 — MB114698

= *Aspergillus indohii* Y. Horie 2003, Mycoscience 44: 398 — MB489533

= *Neosartorya indohii* Y. Horie 2003, Mycoscience 44: 398 — MB489536

Description. Colonies on CYA 54–62 mm in diam at 25 °C in 7 days, floccose, delicately furrowed to irregularly wrinkled, pale yellow (ISCC-NBS No. 89), light yellow (No. 86) to strong yellow (No. 84) with yellowish white margins, no exudate, no diffusible pigment, reverse deep yellowish brown (No. 75) to medium olive brown (No. 95) with 3–5 mm medium yellow (No. 87) margins. Colonies at 37 °C 65–70 mm in diam, plane to irregularly furrowed, floccose to lanose with umbonate centre, visible ascomata in some strains, yellowish white (No. 92) to pale yellow (No. 89), light olive grey (No. 112) sporulation in some strains, no exudate, no diffusible colour, reverse reverse yellowish white, pale orange yellow (No. 73) to strong yellow (No. 84). Colonies on MEA 38–70 mm in diam, velutinous to floccose with umbonate centre, delicately furrowed to irregularly wrinkled, yellowish

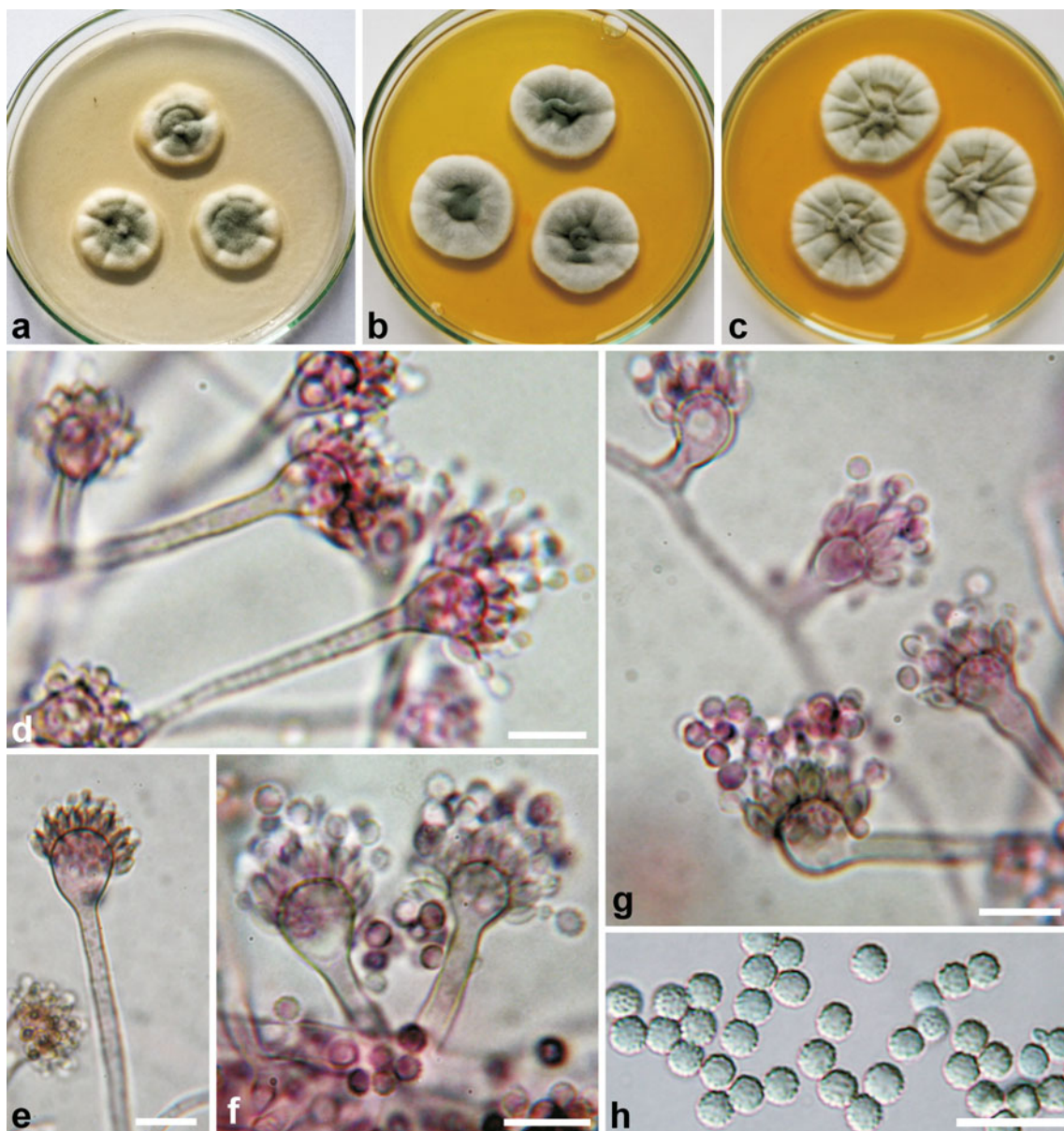


Fig. 4 *Aspergillus conversis* CCF 4190^T. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d–g** conidiophores; **h** conidia. — Scale bars 10 μm

white (No. 92), pale yellow (No. 89) to brilliant orange yellow (No. 67), no exudate, no diffusible colour, reverse strong yellow (No. 84), deep orange (No. 51) to strong brown (No. 55) with light yellow (No. 86) to strong yellow margins. Colonies on YES 43–58 mm in diam, floccose to lanose, plane, yellowish white (No. 92) with pale yellow tint in the colony centre, brilliant orange yellow (No. 67) to pale orange yellow with paler margins, no exudate, no diffusible colour, reverse brilliant yellow (No. 83) with vivid orange yellow or strong to vivid orange (No. 68 and 66) colonies centre or strong orange (No. 50) to vivid orange (No. 48). Colonies on CZA 48–53 mm in diam, floccose to lanose, plane, yellowish white (No. 92) to pale yellow (No. 89), colony centre

pale yellow (No. 98) to greyish yellow (No. 90) or with pale orange yellow (No. 73) coloured central parts, no exudate, no diffusible pigment, reverse yellowish white with strong yellow (No. 84) colony centre with several dark greyish yellow (No. 91), light olive brown (No. 94) or dark olive brown (No. 96) spots or yellowish white with pale yellow tint in colonies centre. Colonies on CREA 28–43 mm in diam, sparse colourless to yellow coloured mycelium with visible ascomata or dense mycelial ring in some strains, weak acid production under colonies. Ehrlich test negative.

Conidial heads columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, septate, up to $450.0 \times 2.5\text{--}3.5(-5)$ μm, nodding heads rarely present. Conidial heads uniseriate,

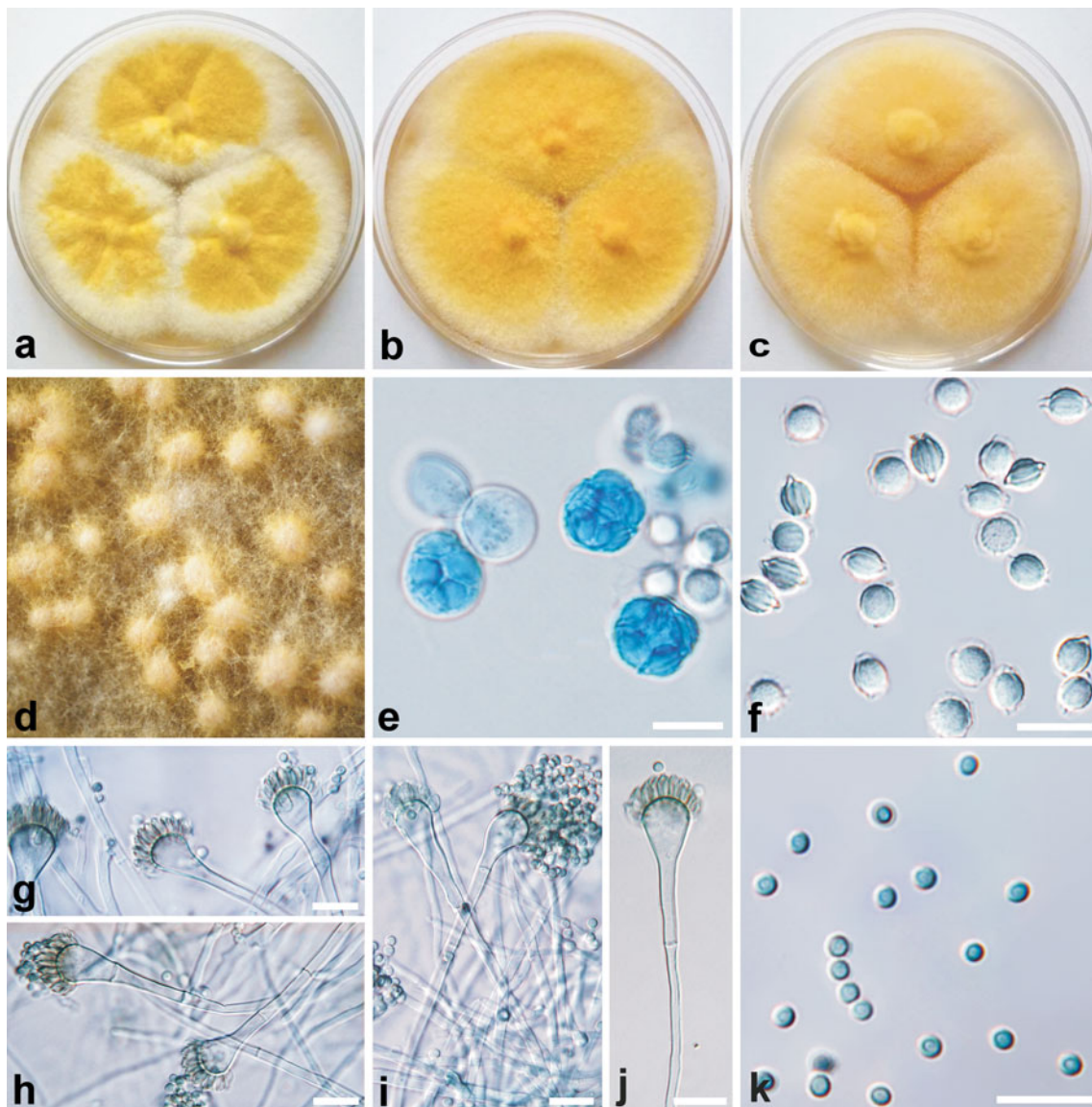


Fig. 5 *Aspergillus aureolus* IFM 46935. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d** cleistothecia; **e** asci; **f** ascospores; **g–j** conidiophores; **k** conidia. — Scale bars 10 μ m

vesicle clavate, 8–13.5 μ m, phialides ampuliform covering the upper half of vesicle. Conidia broadly subglobose, delicately roughened, 2.1–2.8 μ m.

Homothallic species; the ascomata visible after 1 week of incubation on CYA, CYA37, MEA, YES and CREA. Cleistothecia yellowish white to yellow, globose or subglobose, 200–650 μ m in diameter, covered by a felt of yellowish hyphae; asci eight-spored, globose to subglobose, 10.5–13.5 \times 10–12 μ m; ascospores lenticular, spore bodies (4–)4.5–5.5 μ m in longer axis, with two well-separated, 1–1.5 μ m wide, irregular equatorial crests, convex surface echinulate and tuberculate. The species is able to grow at 42 °C and does not grow at 45 °C.

Diagnosis. The species is homothallic in contrast to other members of *A. viridinitans* complex. The most of isolates

have typical yellow to golden yellow colonies, most conspicuous on MEA and CYA. The ascospores have echinulate and tuberculate convex surface, broad equatorial crests and are very similar to those of heterothallic *A. felis*. Colonies in shades of yellow and orange can be found in several other species (*A. auratus*, *A. lacinosus*, *A. multiplicatus* and *A. stramenius*) and all of them can be distinguished by different ascospores morphology and spectrum of produced secondary metabolites (Samson et al. 2007a). *Aspergillus lacinosus* and *A. auratus* have ascospores with convex surface smooth or slightly roughened by light microscopy, in addition *A. auratus* has slower growth parameters on all media and temperatures and has smaller cleistothecia. *Aspergillus lacinosus* is able to grow at 47 °C in contrast to *A. aureolus*. Ascospores of *A. multiplicatus* lack equatorial crests and have ribbed to

reticulate ornamentation. The cleistothecia of *A. stramenius* are smaller and its ascospores are less conspicuously roughened.

Ecology. Soil of tropical countries (Brazil, Ghana, Liberia, Suriname), passion-fruit juice (Fiji). References: Fennell and Raper (1955); Peterson (1992); Horie et al. (1995); Horie et al. (2003); Samson et al. (2007a).

Specimens examined. Five isolates, see Table 2.

Nomenclatural notes. The new botanical code (McNeill et al. 2012) enables the use of some well known holomorphic names that were treated as invalid in the dual nomenclature system and have priority over names proposed later separately for teleomorph and anamorph. This is true for *A. aureolus*. However, inappropriate type (living culture) was designated by the Fennell and Raper (1955), and the species is neotypified

here. Incorrect type designation before 1st January 1958 do not affect validity of published name [Art. 40.1; McNeill et al. 2012].

Type. Ghana, ex soil, 1950, *C. F. Charter*, a dried culture Herb. CBS 105.55 derived from the living culture CBS 105.55 is here designated as neotype. Ex-neotype culture CBS 105.55^T=NRRL 2244^T=IFM 47020^T=IMI 06145^T.

Aspergillus felis Barrs, van Doorn, Varga & Samson 2013, Plos One 8: e64871 — MB560382; Fig. 6

=? *Aspergillus fumigatus* var. *sclerotiorum* J.N. Rai, S.C. Agarwal & J.P. Tewari 1971, J. Ind. Bot. Soc. 50: 66 — MB347792

Description. Colonies on CYA 52–65 mm in diam at 25 °C in 7 days, floccose, plane to slightly wrinkled in central part of

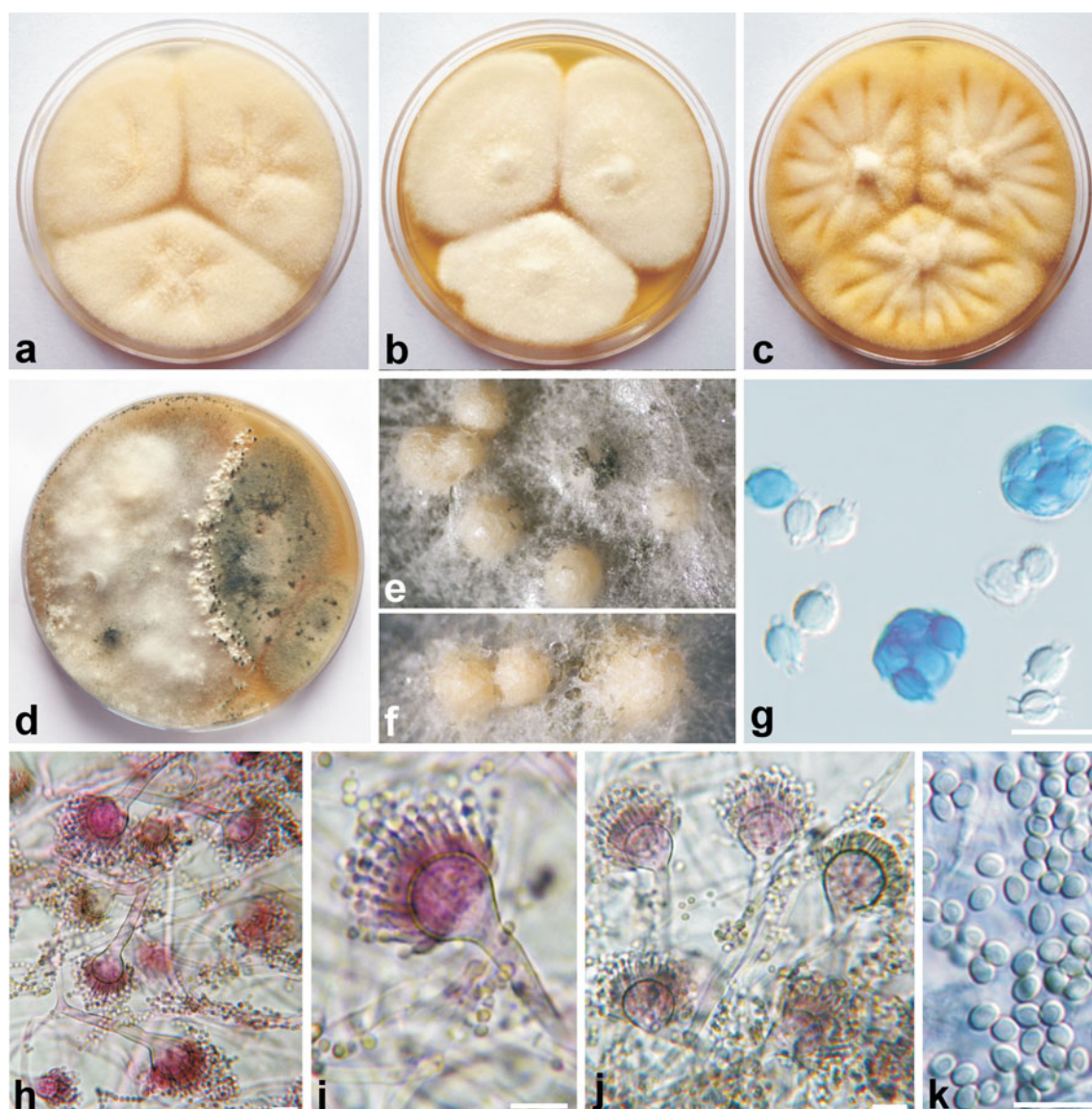


Fig. 6 *Aspergillus felis* CCF 4497. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d** fertile cleistothecia as a result of crossing of isolates IFM 60053 and FRR 5679 on MEA after

6 weeks. **e–f** cleistothecia. **g** asci and ascospores. **h–j** conidiophores; **k**. conidia. — Scale bars 10 µm

colonies, yellowish white (ISCC-NBS No. 92) to very pale green (No. 148), pale green (No. 149) in marginal parts, greyish yellow green sporulation (No. 122) after 14 days, no exudate or soluble pigment production, reverse yellowish white (No. 92) to pale yellow (No. 89). Colonies at 37 °C 65–70 mm, lanose, irregularly wrinkled, yellowish white (No. 92), reverse pale yellow (No. 89). Colonies on MEA 54–68 mm, floccose, white to yellowish white (No. 92) to very pale green (No. 148), after 14 days greenish grey (No. 155) to greyish green (No. 150) sporulation, no exudate or soluble pigment production, reverse brilliant yellow (No. 83) to strong yellow (No. 84). Colonies on YES 65–70 mm in diam, floccose, regularly wrinkled, white, light yellow (No. 89) to very pale green (No. 148), no exudate or soluble pigment production, reverse moderate yellow (No. 87). Colonies on CZA 45–48 mm in diam, plane, whitish yellow. Colonies on CREA 40–55 mm in diam, poor mycelial growth, no acid production, reverse colourless. Ehrlich test negative to very light violet. Only some isolates were able to grow restrictedly (up to 20 mm) at 45 °C.

Conidial heads short columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, up to $252 \times 3\text{--}5.5\text{--}6.5$ μm , nodding heads occasionally present. Conidial heads uniseriate, vesicles subglobose to subclavate, $(7\text{--})9\text{--}18\text{--}(20)$ μm , phialides ampuliform covering the upper half of vesicle. Conidia broadly subglobose, delicately roughened, $2.3\text{--}2.8$ μm .

Heterothallic species; the ascomata visible after 3 weeks of incubation on MEA, OA and PDA at 25, 30 and 37 °C, mature ascospores present after 4–6 weeks. Cleistothecia yellowish white, globose or subglobose $300\text{--}1,000\text{--}(1,250)$ μm in diameter, glabrous or covered by a loose felt of white hyphae; asci eight-spored, globose to subglobose $10\text{--}12 \times 9.5\text{--}11$ μm ; ascospores lenticular, spore bodies $3.2\text{--}5$ μm in longer axis, with two well-separated, $1\text{--}1.5\text{--}(2)$ μm wide, irregular equatorial crests, convex surface echinulate and tuberculate.

Diagnosis. The morphology of ascospores with markedly echinulate and tuberculate convex and broad equatorial crests (> 1 μm wide) differentiates *A. felis* from other heterothallic species in *A. viridinitans* complex. Some other heterothallic species have somewhat similar ascospores but all of them can be differentiated using morphology and physiology. The convex surface of ascospores of *A. spathulatus* is smooth, *A. nishimurae* has broadly ellipsoidal conidia and is able to grow at 47 °C in contrast to *A. felis*, the convex surface of ascospores of *A. fennelliae* and *A. otanii* is only delicately roughened, and their colonies on MEA have greyish colour.

Ecology. Soil (Czech Republic, India, U.S.A., Zambia), *Pinus caribea* (Sri Lanka), indoor air (Germany); human pathogen (or clinical material contaminant in some cases)—lungs, upper respiratory tract, thigh bone, cornea, nail (Japan, Portugal, Spain, U.S.A.), animal pathogen—thoracic mass and retrobulbar abscess in cats (Australia, Japan, UK), vitreous humor in dog (Australia). References: Rai et al. (1971); Varga et al. (2000); Katz et al. (2005); Yaguchi et al. (2007);

Alcazar-Fuoli et al. (2008); Vinh et al. (2009a); Coelho et al. (2011); Barrs et al. (2012); Shigeyasu et al. (2012); Barrs et al. (2013); Kano et al. (2013); Peláez et al. (2013)

Specimens examined. Eleven isolates, see Tables 1 and 2. A dried colony from a paired culture of isolates CCF 4171 = CMF ISB 2162 = IFM 60852 \times IFM 60053 was deposited as PRM 860735 and PRM 860736.

Type. Australia, retrobulbar mass in domestic short-haired cat, holotype CBS H-21125, culture ex-holotype CBS 130245^T.

Aspergillus udagawae Horie, Miyaji and Nishim. 1995, Mycoscience 36: 199 — MB412533; Fig. 7

= *Neosartorya udagawae* Y. Horie, Miyaji & Nishim. 1995, Mycoscience 36: 199 — MB413573

Description. Colonies on CYA 40–60 mm in diam at 25 °C in 7 days, velutinous to effuse, wrinkled, yellowish white (ISCC-NBS No. 92) to light greenish grey (No. 154) but strongly coloured in some strains with moderate greenish blue (No. 173), dark bluish green (No. 165) to dark greenish blue (No. 174) colour with sporulation in marginal area or on the whole colony surface, no exudate or soluble pigment production, reverse yellowish white (No. 92). Colonies on CYA at 37 °C 65–70 mm, lanose, yellowish white (No. 92) to greenish grey (No. 155) to dark greenish grey (No. 156) in parts with visible sporulation, reverse pale yellow (No. 89). Colonies on MEA 42–65 mm in diam, floccose, plane to very fine wrinkled, white to yellowish white (No. 92), in some strains with pale yellow in the centre, sporulation in very light bluish green (No. 162) to moderate bluish green (No. 164), no exudate, no diffusible pigment in some strains or yellow pigment in other ones, reverse yellowish white (No. 92) to vivid yellow (No. 82) in the case of diffusible pigment production. Colonies on YES 62–75 mm in diam, floccose, plane to wrinkled, yellowish white (No. 92) to light greenish grey (No. 154), no exudate or soluble pigment production, reverse yellowish white (No. 92). Colonies on CZA 37–47 mm in diam at 25 °C, velutinous, plane to sporadically wrinkled, with 0.3–0.5 mm submerge margins, yellowish white (No. 92), no exudate, no soluble pigment, reverse yellowish white. Colonies on CREA 46–50 mm in diam, floccose, pure sporulated, without acid production in some strains to slight or very strong acid production in other ones. Ehrlich test negative. Only some isolates were able to grow restrictedly (up to 7 mm) at 45 °C, all grew at 42 °C.

Conidial heads columnar. Conidiophores arising from the aerial hyphae up to $500 \times (2.5\text{--})3\text{--}6.5$ μm with stipes smooth, vesicles hemispherical to subglobose, $11\text{--}18\text{--}(19.5)$ μm , nodding heads occasionally present. Conidia globose, subglobose to ellipsoidal, smooth, $2.4\text{--}3.2$ μm .

Heterothallic species; the ascomata visible after 3 weeks of incubation on MEA at 25 °C, mature ascospores present after 5–6 weeks. Cleistothecia yellowish white, globose or subglobose $300\text{--}600\text{--}(1,000)$ μm in diameter, glabrous or

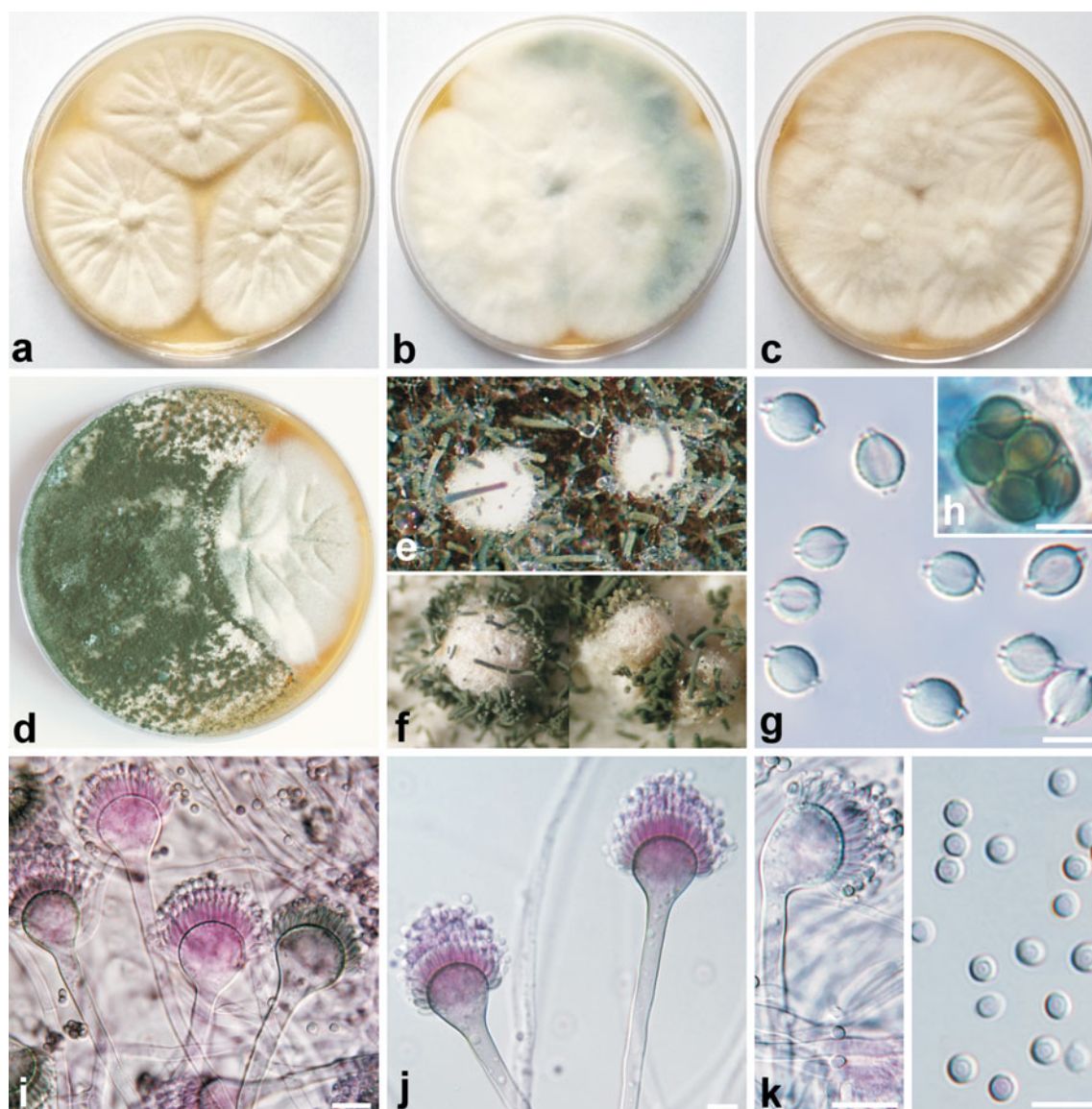


Fig. 7 *Aspergillus udagawae* CCF 4493. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d** fertile cleistothecia as a result of crossing of mating ex-type isolates IFM 46972^{MT} and IFM

46973^{MT} on MEA after 6 weeks. **e–f** cleistothecia. **g** ascospores. **h** ascus. **i–k** conidiophores; **l** conidia. — Scale bars: **g–h**=5 µm; **i–l**=10 µm

covered by a loose felt of white hyphae; asci eight-spored, globose to subglobose 9.5–11.5 × 9–11 µm; ascospores lenticular, spore bodies 4.1–5.2 µm in longer axis, with two well-separated, 0.5–0.8 µm wide equatorial crests, convex surface tuberculate.

Diagnosis. The species can be differentiated from other heterothallic species by the ascospores with tuberculate convex surface and two well visible equatorial crests that do not exceed 1 µm. The ascospores of recently described teleomorph stage of *A. lentulus* (Swilaiman et al. 2013) have similar morphology with tuberculate convex surface and equatorial crests <1 µm (Céline M. O’Gorman, personal communication). However, reticulate convex surface texture may be more pronounced in *A. lentulus* ascospores. The isolates of

A. lentulus always grow at 45 °C and produce different spectrum of secondary metabolites (Samson et al. 2007a).

Ecology. Soil (Brazil, Korea, U.S.A.), food (Japan), human pathogen (or clinical material contaminant in some cases)—lungs, upper respiratory tract, brain, cornea, nail (Czech Republic, Italy, Japan, U.S.A.), animal pathogen—respiratory tract and retrobulbar mass in cats (Australia, Japan). References: Horie et al. (1995); Katz et al. (2005); Balajee et al. (2006); Vinh et al. (2009b); Yaguchi et al. (2007); Kano et al. (2008); Balajee et al. (2009); Hong et al. (2010a, b); Posteraro et al. (2011); Gyotoku et al. (2012); Kano et al. (2013)

Specimens examined. Fifty-seven isolates, see Tables 1 and 2.

Type. Brazil, São Paulo, Botucatu, Lagoa Seka Avea, ex soil in plantation, 1993, Y. Horie, holotype CBM-FA-0711, a dried

colony from a paired culture of isolates MAT1-1 IFM 46972^{MT}=CBS 114218^{MT}×MAT1-2 IFM 46973^{MT}=CBS 114217^{MT}.

Aspergillus viridinutans Ducker and Thrower 1954, Aust. J. Bot. 2: 355 — MB292864; Fig. 8

Description. Colonies on CYA in 28–40 mm in diam at 25 °C in 7 days, velutinous to floccose, plane to slightly wrinkled and umbonate in central part of colonies, yellowish white (ISCC-NBS No. 92) to pale yellow (89), no exudate or soluble pigment production, reverse pale orange yellow (No. 73) to light orange yellow (No. 70). Colonies at 37 °C 40–50 mm, velutinous, irregularly wrinkled with umbonate central part, greyish white (No. 153) to light greenish grey (No. 154), reverse light orange yellow (No. 70) to pale orange yellow (No. 73) in marginal part of the colony or greyish

yellowish brown (No. 80) to moderate olive brown (No. 95) to greyish green (No. 150). Colonies on MEA 31–33 mm, velutinous to floccose, plane to lightly wrinkled, umbonate in the centre, white margin 1–3 mm, sporulation pale green (No. 149), greyish green (No. 150) to light greyish grey (No. 154) in the central umbonate part of colony, reverse light yellow brown (No. 76) with yellowish white margin or yellowish white to pale orange yellow (No. 73) to dark orange yellow (No. 72) in the centre. Colonies on YES 32–37 mm, floccose, irregularly lightly wrinkled, yellowish white, yellowish white to pale yellow (No. 89), pale orange yellow exudate, droplets to 1 mm, some of them to 2–3 mm in diam, reverse light yellow brown (No. 76) to moderate orange yellow (No. 71). Colonies on CZA 19–25 mm in diam at 25 °C, velutinous, plane with umbonate centre, yellowish white (No. 92) with

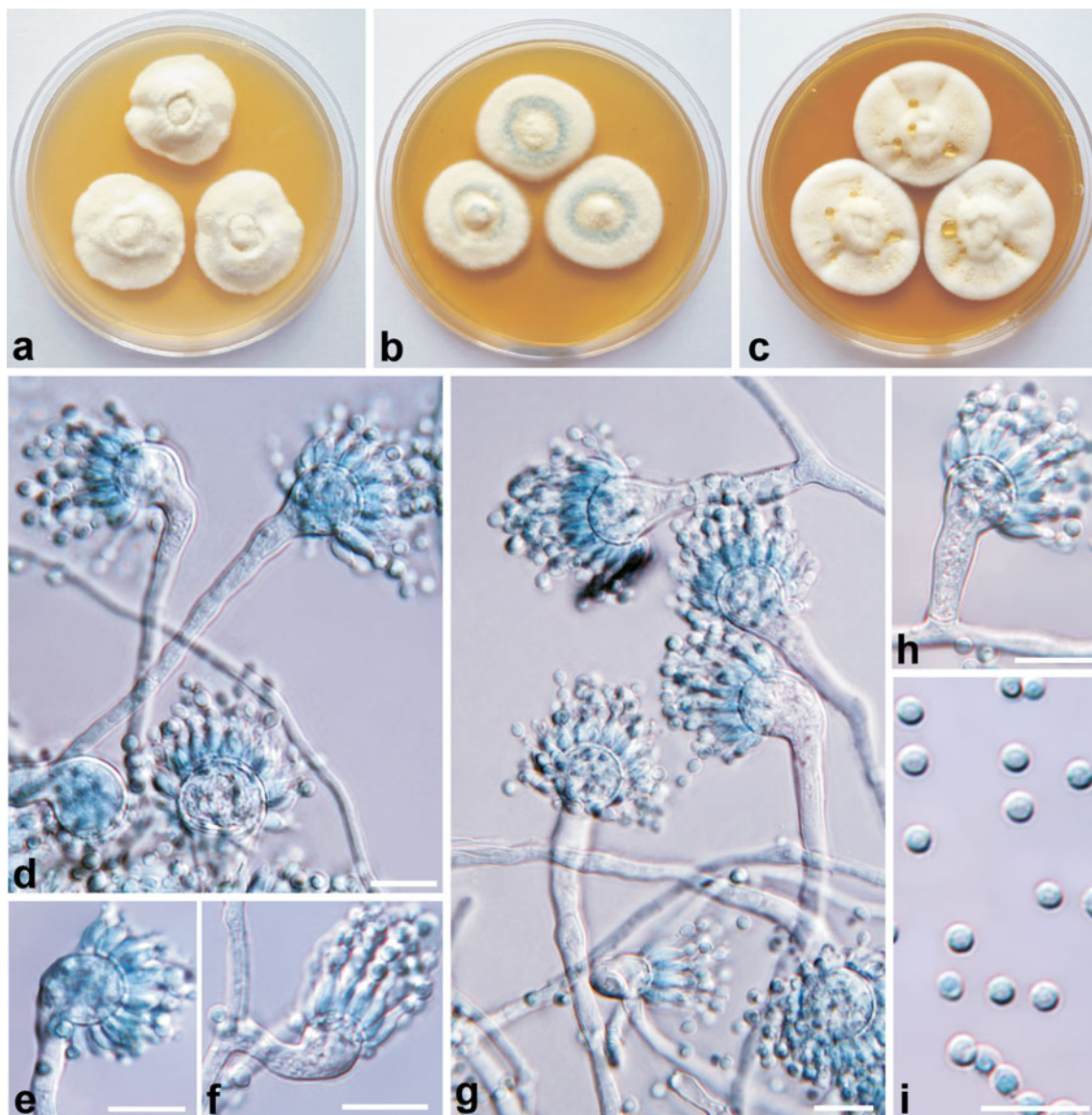


Fig. 8 *Aspergillus viridinutans* IFM 47045^T. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d–h** conidiophores; **i** conidia. — Scale bars 10 μm

light greenish grey (No. 154) to pale green (No. 149) sporulation, no soluble pigment, reverse yellowish white. Colonies on CREA 18–21 mm, effuse, yellowish white, no visible sporulation, no acid production. Ehrlich test negative.

Conidial heads columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, most commonly 20–70(–112)×3–4(–5) µm, sometimes extremely short measuring only several µm, nodding heads common. Conidial heads uniseriate, vesicles globose, 7.5–12(–14) µm, phialides ampuliform covering the upper half of vesicle. Conidia globose to subglobose, smooth to delicately roughened, 2–2.8 µm.

Diagnosis. The species can be differentiated from other anamorphic or heterothallic species by overall relatively slow growth parameters, inability to grow at 45 °C, colourless reverse on CZA, presence of nodding heads, short conidiophores, globose and almost smooth conidia.

Ecology. Dung of *Oryctolagus cuniculus* and soil (both at Frankston, Australia). References: McLennan et al. (1954).

Specimens examined. The species is only represented by the ex-type isolate.

Nomenclatural notes. Original material represented by illustration is extant for *A. viridinitans*, however the species was lecto- and later neotypified by a specimen dried from the original living culture (Samson and Gams 1985; Pitt and Samson 2000). In this study, we designated a lectotype (iconotype) to supersede neotype designated by Pitt and Samson (2000) and this “neotype” is here designated as epitype.

Type. Australia, Frankston, dung of *Oryctolagus cuniculus*, lectotype designated here—Fig. 2 in McLennan et al. 1954, Aust J Bot 2: 359; epitype designated here—Herb. IMI 62875, a dried culture, culture ex-epitype CBS 127.56^T=NRRL 4365^T=NRRL 576^T=IFM 47045^T=IMI 367415^T=CCF 4382^T.

Aspergillus wyomingensis A. Nováková, Dudová and Hubka, *sp. nov.* —MB803936; Fig. 9

Etymology. Named after the state of Wyoming (U.S.A.).

Description. Colonies on CYA in 52–58 mm in diam at 25 °C in 7 days, velutinous, wrinkled, yellowish white (ISCC-NBS No. 92) with poor sporulation on the colony margin (pale yellow green—No. 121) after 14 days, no exudate or soluble pigment production, reverse pale yellow (No. 89). Colonies at 37 °C 65–70 mm, floccose to lanose, wrinkled, yellowish white (No. 92), reverse pale yellow (No. 89). Colonies on MEA 43–44 mm, floccose, plane, yellowish white (No. 92), no exudate, soluble pigment present after 14 days—brilliant greenish yellow (No. 98) to vivid greenish yellow (No. 97), reverse light yellow (No. 86) with moderate yellow (No. 87) parts, brilliant greenish yellow (No. 98) to vivid greenish yellow (No. 97). Colonies on YES (60–)68–70 mm in diam, velutine to floccose, wrinkled, yellowish white (No. 92), no exudate, no soluble pigment, reverse strong yellow (No. 84) to deep yellow (No. 85). Colonies on CZA 38–42 mm in diam, plane, whitish yellow. Colonies on CREA 46–50 mm in diam, poor mycelial

growth, acid production strong or only under the colony. Ehrlich test negative. Only some isolates were able to grow restrictedly (up to 16 mm) at 45 °C, all grew at 42 °C.

Conidial heads columnar. Conidiophores arising from aerial hyphae, smooth, up to 275.0×(3–)4–6.5(–7) µm, nodding heads occasionally present. Conidial heads uniseriate, vesicles subglobose to globose, pigmented, 11–19(–24) µm, two-thirds covered by ampuliform phialides. Conidia subglobose, delicately rough, 1.7–2.8(–3.3) µm, light green in mass.

Heterothallic species; the ascospores visible after 3 weeks of incubation on OA at 25, 30 and less abundant at 37 °C, mature ascospores present after 4–5 weeks. Cleistothecia white, globose or subglobose 180–500(–600) µm in diameter, covered by a dense felt of white hyphae; asci eight-spored, globose to subglobose 10–12×10–11 µm; ascospores lenticular, spore bodies (3.2–)3.6–5 µm in longer axis, equatorial crests absent or are very low and difficultly distinguishable by light microscopy, shallow equatorial furrow is present, short ribs, rough tubercles and echines are present on the convex surface and clearly visible using light microscopy, a part of ascospores lack ornamentation as well as equatorial crests and furrow.

Diagnosis. The morphology of ascospores with convex surface covered by ribs and echines and very low to absent equatorial crests differentiating *A. wyomingensis* from all species in *A. viridinitans* complex as well as from all other heterothallic species in section *Fumigati*.

Ecology. Soil (USA, Russia, China). References: Varga et al. (2000).

Specimens examined. Fourteen isolates (see Tables 1 and 2). A paired culture of isolates CCF 4416 (= CMF ISB 1976 = CBS 135455)×CCF 4417^T (= CMF ISB 2494^T=CBS 135456^T) was deposited as PRM 860737–8.

Type. U.S.A., Wyoming, Converse Country, Powder River Basin, Glenrock—Rolling Hills Wind Plant (former Dave Johnson Coal Mine), site recultivated by crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*), ex soil, 2010, *A. Nováková*, holotype PRM 861504, a dried culture, isotype PRM 861505, culture ex-holotype CCF 4417^T=CMF ISB 2494^T.

Dichotomous key to species from *Aspergillus viridinitans* complex

- 1a) homothallic *A. aureolus*
- 1b) heterothallic or anamorphic 2
- 2a) colonies on MEA after 7 d at 25 °C < 35 mm; conidiophores on MEA < 120 µm *A. viridinitans*
- 2b) colonies on MEA after 7 d at 25 °C > 35 mm; at least some conidiophores on MEA > 120 µm 3
- 3a) ascospores without equatorial crests or with very low crests (< 0.2 µm) *A. wyomingensis*
- 3b) ascospores with two clearly distinguishable equatorial crests (> 0.5 µm wide) 4

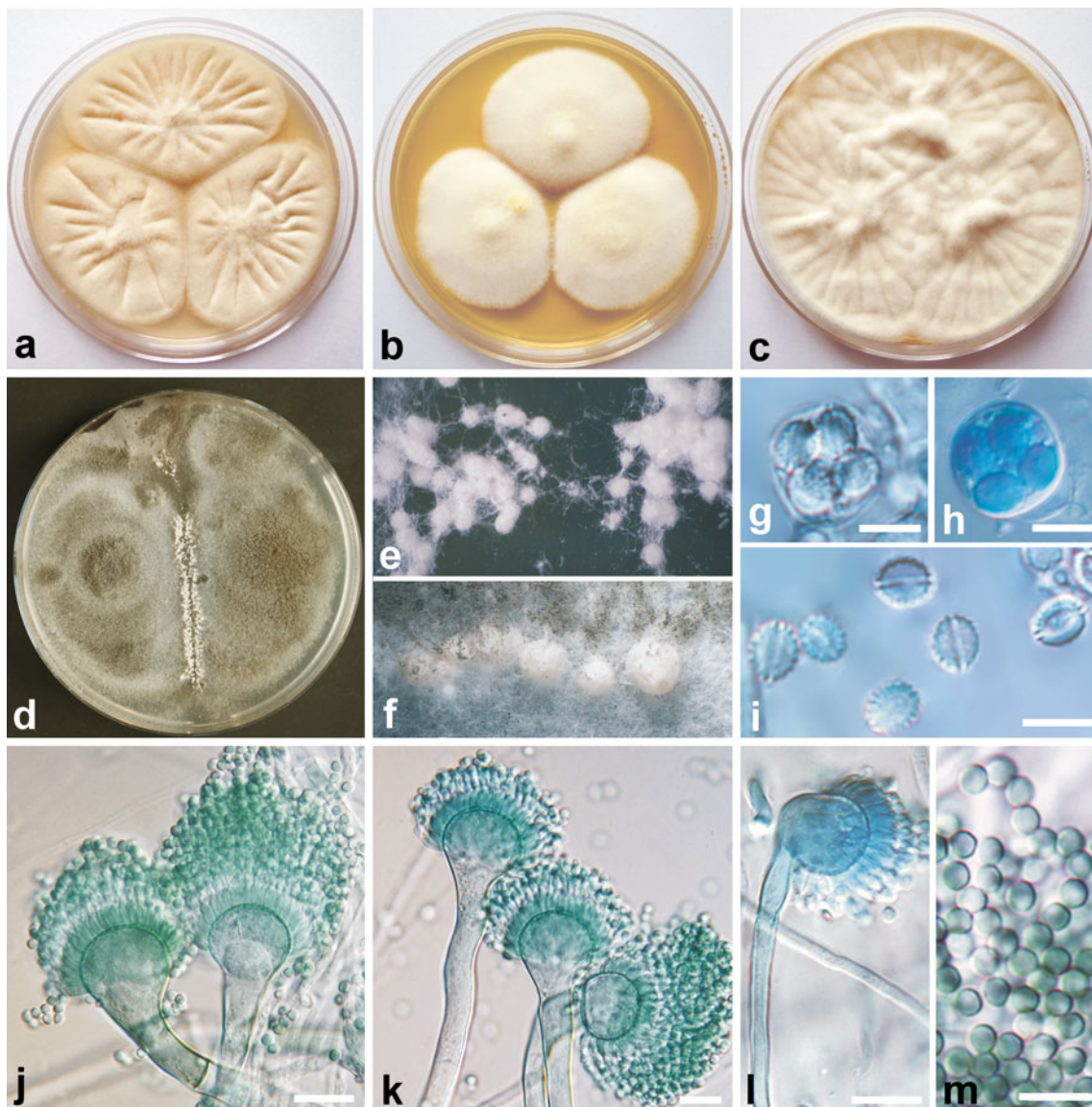


Fig. 9 *Aspergillus wyomingensis* CCF 4417^T. **a–c** Colonies incubated 7 days at 25 °C on CYA, MEA and YES, from left to right; **d** fertile cleistothecia as a result of crossing CCF 4416 and CCF 4417^T on OA

after 6 weeks. **e–f** cleistothecia. **g–h** asci. **i** ascospores. **j–l** conidiophores; **m** conidia. — Scale bars: **g–i**=5 μm; **j–m**=10 μm

- 4a) equatorial crests narrower than 1 μm*A. udagawae*
- 4b) equatorial crests wider than 1 μm*A. felis*

Discussion

The isolates traditionally named *A. viridinutans* show considerable phenotypic variability but typically share nodding heads (some vesicles borne at an angle to the stipe) and relatively poorly sporulating colonies with abundant aerial mycelium (in comparison with *A. fumigatus* s. str.) as important morphological characteristics. Previous studies based on molecular data confirmed that *A. viridinutans* includes several lineages but the species boundaries were not clearly

determined, and *A. viridinutans* was retained as a species complex (Varga et al. 2000; Katz et al. 2005; Hong et al. 2010b). *Aspergillus viridinutans* was originally described from rabbit dung (Australia) (McLennan et al. 1954) and seems to be very rare species according to the species concept presented here. As far we know, no other isolate identical to the ex-type strain based on molecular methods has been published. As discussed by Varga et al. (2000), the use of nodding heads as a morphological characteristic is misleading because it is present in not only the *A. viridinutans* complex but also many non-related species from the section *Fumigati*, including *A. brevipes* (Smith 1952), *A. duricaulis* (Raper and Fennell 1965), *A. marvanovae* (Hubka et al. 2013b), *A. unilateralis* (McLennan et al. 1954), *N. pseudofischeri* (Paden 1968;

Peterson 1992) and two newly described species, *A. brevistipitatus* and *A. conversis*.

Species of the section *Fumigati*, including those of the *A. viridinutans* complex, are most commonly isolated from soil and clinical material (Katz et al. 2005; Yaguchi et al. 2007; Hong et al. 2010a, b). In this study, we examined many isolates belonging to *A. viridinutans* complex which were dominant inhabitants of reclamation site soils. Seven species, including three undescribed species, were identified using an approach combining morphological, physiological, molecular and mating data. The boundaries between species from the *A. viridinutans* complex were established with an emphasis on our and previous mating experiment results. Three teleomorphs of heterothallic *A. felis*, *A. udagawae* and *A. wyomingensis* sp. nov. showed different ascospores morphology which is treated here as the most important phenotypic feature for these species (Fig. 2). None of these three species produced cleistothecia when paired with the ex-type isolate of *A. viridinutans*. The MAT1-1 idiomorph was partially characterised in the ex-type isolate of *A. viridinutans* IFM 47045^T using the primers *alpha1* and *alpha2* (Sugui et al. 2010). No product was observed on electrophoretograms when using the primers HMG1 and HMG2 designed for the MAT1-2 locus. These results suggest that *A. viridinutans* is also heterothallic, although no opposite mating type isolate is currently available for mating experiments.

Aspergillus felis and *A. udagawae* both include several strongly supported lineages which could be considered to represent separate species (Fig. 1) when only molecular data are taken into account. However, mating experiments clearly defined species boundaries in *A. felis*, as the opposite mating type isolates readily produced fertile cleistothecia and did not mate with species of the other clades. Similar results were obtained for *A. wyomingensis*. The interpretation of the mating experiment results for *A. udagawae* was problematic. The ascospores were observed in only limited number of crosses, most commonly with the mating ex-type isolate IFM 46972^{MT}. However, these crosses were distributed across all three major subclades (Fig. 1), supporting *A. udagawae* as relatively large species. Substructuring in *A. udagawae* isolates based on sequence data was also observed by Yaguchi et al. (2007) and Sugui et al. (2010). Previous mating experiments were either unsuccessful or successful in a very limited number of clinical isolates of *A. udagawae* (Balajee et al. 2006; Yaguchi et al. 2007; Vinh et al. 2009b; Sugui et al. 2010). Some isolates examined by Sugui et al. (2010) and Matsuzawa et al. (unpubl. data) were similar or identical based on sequence to a majority of *A. udagawae* isolates from Wyoming and were mated successfully with the ex-type strain. These data suggest that *A. udagawae* is one genetically diverse species with decreased ability to produce fertile ascomata rather than multiple cryptic species. A decline in the level of sexual reproduction was also reported for the human pathogen *A. fumigatus* (O’Gorman et al. 2009).

In contrast to Sugui et al. (2010) who observed a MA1-1:MAT1-2 ratio of 6:4 among clinical isolates of *A. udagawae*, we observed considerable bias toward MAT1-2 over MAT1-1 isolates (42:13). A comparable number of opposite mating type isolates were identified among *A. felis* (MAT1-1:MAT1-2, 4:6) and *A. wyomingensis* (8:6) isolates. Unequal ratios between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in *A. udagawae* populations could indicate decreased sexuality levels, as observed in some other genera (Brygoo et al. 1998; Yun et al. 2000). Further studies from geographically distant regions are needed to support our observation and to exclude the link between virulence and mating type idiomorph which was, for example, described in *Cryptococcus neoformans* (Nielsen et al. 2003).

Based on sequence data previously deposited in GenBank, all clinically important cases of human and animal infections due to species from the *A. viridinutans* complex belong to the *A. udagawae* (Katz et al. 2005; Balajee et al. 2006; Vinh et al. 2009b; Yaguchi et al. 2007; Kano et al. 2008; Balajee et al. 2009; Posteraro et al. 2011; Gyotoku et al. 2012; Kano et al. 2013) and *A. felis* clades (Katz et al. 2005; Yaguchi et al. 2007; Alcazar-Fuoli et al. 2008; Vinh et al. 2009a; Coelho et al. 2011; Barrs et al. 2012, 2013; Shigeyasu et al. 2012; Kano et al. 2013; Peláez et al. 2013). No clinically relevant cases have been reported for *A. viridinutans* s. str. or *A. wyomingensis* sp. nov. The majority of species in *A. viridinutans* complex (*A. felis*, *A. udagawae* and *A. wyomingensis*) seems to be worldwide distributed in soil, *A. aureolus* is probably restricted to soil of tropical countries (see “Ecology” in section **Taxonomy**).

An unexpected species spectrum, with the notable absence of *A. fumigatus*, was obtained using a combination of several isolation techniques from reclamation site soils. Our results and data previously published by Hong et al. (2010a) for arable soil indicate that the spectrum of species from the section *Fumigati* in soil is relatively wide and is not restricted to *A. fumigatus* which was usually referred to as predominant. On the other hand, reclamation sites and arable soil share unstable environmental conditions affected by human-mediated external interventions, and non-*fumigatus* species could play a specific role in these sites. Data on the occurrence of section *Fumigati* members in climax soils that have been verified by molecular methods are not currently available, and the species spectrum could be diametrically different. *Aspergillus udagawae*, an opportunistic human and animal pathogen with increasing incidence in the U.S.A. and worldwide, has never been reported as a dominant species in soil. Reclamation sites and dump soils could be an important source of this pathogen, together with other non-*fumigatus* opportunistic pathogens such as *A. felis* and *A. lentulus*.

Acknowledgments We thank Karel Tajovský, Václav Pižl and Jan Frouz (ISB BC AS CR, v.v.i.) for sampling in the Belle Ayr Mine research sites and Janos Varga for providing the ex-type isolate of *A. felis*. This study was supported by the project ME 08085 KONTAKT Soil organisms in spoils

after brown coal mining in the U.S.A. and Europe: a bioindication potential and a role in pedogenesis. This research was also partially supported by the Ministry of Education, Youth and Sports (CZ.1.07/2.3.00/20.0055 and CZ.1.07/2.3.00/30.0003). Molecular genetics analyses were supported by the project GAUK 607812.

References

- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Aslastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2008) *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1244–1251
- Atlas RM (2010) Handbook of microbiological media, 4th edn. CRC Press, Washington
- Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA (2005) *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:625–632
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA (2006) Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705–1712
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T (2009) Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* 47:3138–3141
- Barrs VR, Halliday C, Martin P, Wilson B, Krockenberger M, Gunew M, Bennett S, Koehlmeier E, Thompson A, Fliegner R (2012) Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes. *Vet J* 191:58–64
- Barrs VR, van Doorn TM, Houbraken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA (2013) *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats and dogs. *PLoS One* 8:e64871
- Brygoo Y, Caffier V, Carlier J, Fabre JV, Fernandez D, Giraud T, Mourichon X, Neema C, Notteghem JL, Pope C (1998) Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson J (eds) Molecular variability of fungal pathogens. CAB International, Wallingford, pp 133–148
- Coelho D, Silva S, Vale-Silva L, Gomes H, Pinto E, Sarmiento A, Pinheiro MD (2011) *Aspergillus viridinutans*: an agent of adult chronic invasive aspergillosis. *Med Mycol* 49:755–759
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (2007) Compendium of soil fungi, 2nd edn. IHW-Verlag, Eching
- Fennell DI, Raper KB (1955) New species and varieties of *Aspergillus*. *Mycologia* 47:68–89
- Frisvad JC, Samson RA (2004) Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Mycol* 49:1–173
- Ganjegunte GK, Wick AF, Stahl PD, Vance GF (2009) Accumulation and composition of total organic carbon in reclaimed coal mine lands. *Land Degrad Develop* 20:156–175
- Garrett SD (1981) Soil fungi and soil fertility: an introduction to soil mycology, 2nd edn. Pergamon Press, Oxford
- Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S (2012) A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. *Med Mycol* 50:631–636
- Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97:1316–1329
- Hong SB, Shin HD, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, Samson RA (2008) New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Leeuwenhoek* 93:87–98
- Hong SB, Kim D-H, Park I-C, Samson RA, Shin HD (2010a) Isolation and identification of *Aspergillus* section *Fumigati* strains from arable soil in Korea. *Microbiology* 38:1–6
- Hong SB, Kim DH, Park IC, Choi YJ, Shin HD, Samson R (2010b) Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a new concept of species delimitation. *J Microbiol* 48:607–615
- Horie Y, Miyaji M, Nishimura K, Franco MF, Coelho KLR (1995) New and interesting species of *Neosartorya* from Brazilian soil. *Mycoscience* 36:199–204
- Horie Y, Abliz P, Fukushima K, Okada K, Takaki GMC (2003) Two new species of *Neosartorya* from Amazonian soil, Brazil. *Mycoscience* 44:397–402
- Hubka V, Kolařík M (2012) β -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia* 29:1–10
- Hubka V, Kubátová A, Mallatova N, Sedlacek P, Melichar J, Skorepova M, Mencl K, Lyskova P, Sramkova B, Chudickova M, Hamal P, Kolarik M (2012) Rare and new aetiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing. *Med Mycol* 50:601–610
- Hubka V, Kolařík M, Kubátová A, Peterson SW (2013a) Taxonomical revision of the genus *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia* 105:912–937
- Hubka V, Peterson SW, Frisvad JC, Yaguchi T, Kubátová A, Kolařík M (2013b) *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section *Fumigati*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:783–789
- Kano R, Itamoto K, Okuda M, Inokuma H, Hasegawa A, Balajee SA (2008) Isolation of *Aspergillus udagawae* from a fatal case of feline orbital aspergillosis. *Mycoses* 51:360–361
- Kano R, Shibahashi A, Fujino Y, Sakai H, Mori T, Tsujimoto H, Yanai T, Hasegawa A (2013) Two cases of feline orbital aspergillosis due to *Aspergillus udagawae* and *A. viridinutans*. *J Vet Med Sci* 75:7–10
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33:511–518
- Katz ME, Dougall AM, Weeks K, Cheetham BF (2005) Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 43:551–555
- Kelly KL (1964) Inter-society color council—National bureau of standards color name charts illustrated with centroid colors. US Government Printing Office, Washington
- Klich MA (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94:21–27
- Kreisel H, Schauer F (1987) Methoden des mykologischen Laboratoriums. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Kwon-Chung KJ, Kim SJ (1974) A second heterothallic *Aspergillus*. *Mycologia* 56:628–638
- Larsen TO, Smedsgaard J, Nielsen KF, Hansen MAE, Samson RA, Frisvad JC (2007) Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Med Mycol* 45:225–232
- Marvanová L (1999) Biodiversity of soil micromycetes of meadows in surroundings of localities Lanžhot-soutok and Lednice-Nejdek. In: Vizárová G (ed) Ďugová O. Proceedings from the workshop Life in Soil II, Bratislava, pp 102–104
- McLennan EI, Tucker SC, Thrower LB (1954) New soil fungi from Australian heathland: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spiegazzinia*. *Aust J Bot* 2:355–364
- McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, van Prud'homme Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ (2012) International

- code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code): adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- Nielsen K, Cox GM, Wang P, Toffaletti DL, Perfect JR, Heitman J (2003) Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congeneric α and α isolates. *Infect Immun* 71:4831–4841
- Nováková A, Hubka V, Saiz-Jimenez C, Kolarik M (2012) *Aspergillus baeticus* sp. nov. and *Aspergillus thesauricus* sp. nov.: two new species in section *Usti* originating from Spanish caves. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2778–2785
- O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471–474
- Paden JW (1968) A new variety of *Aspergillus fischeri*. *Mycopathol Mycol Appl* 36:161–164
- Peláez T, Álvarez-Pérez S, Mellado E, Serrano D, Valerio M, Blanco JL, García ME, Muñoz P, Cuenca-Estrella M, Bouza E (2013) Invasive aspergillosis caused by cryptic *Aspergillus* species: a report of two consecutive episodes in a patient with leukaemia. *J Med Microbiol* 62:474–478
- Peterson SW (1992) *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Mycol Res* 96: 547–554
- Pitt JI, Samson RA (2000) Types of *Aspergillus* and *Penicillium* and their teleomorphs in current use. In: Samson RA, Pitt JI (eds) *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp 51–72
- Posteraro B, Mattei R, Trivella F, Maffei A, Torre A, Carolis E, Posteraro P, Fadda G, Sanguinetti M (2011) Uncommon *Neosartorya udagawae* fungus as a causative agent of severe corneal infection. *J Clin Microbiol* 49:2357–2360
- Rai NJ, Agarwal SC, Tewari JP (1971) Fungal microflora of usar soils of India. *J Ind Bot Soc* 50:63–74
- Rana S, Stahl PD, Ingram LJ, Wick AF (2007) Soil microbial community composition in reclaimed soil under different vegetation in Wyoming minelands. *American Society of Mining and Reclamation Meeting*, Gillette
- Raper KB, Fennell DI (1965) *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co, U.S.A
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574
- Samson RA (1989) Filamentous fungi in food and feed. In: Moss MO, Jarvis B, Skinner FA (eds) *Society for applied bacteriology symposium series no. 18. Filamentous fungi in foods and feeds*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 27S–35S
- Samson RA, Gams W (1985) Typification of the species of *Aspergillus* and associated teleomorphs. In: Samson RA, Pitt JI (eds) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, New York, pp 31–54
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (1996) Introduction to foodborne fungi. *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht
- Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J (2007a) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol* 59:147–203
- Samson RA, Noonin P, Meijer M, Houbraeken J, Frisvad JC, Varga J (2007b) Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 59: 129–145
- Samson RA, Varga J, Meijer M, Frisvad JC (2011) New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *Stud Mycol* 69:81–97
- Shigeyasu C, Yamada M, Nakamura N, Mizuno Y, Sato T, Yaguchi T (2012) Keratomycosis caused by *Aspergillus viridinutans*: an *Aspergillus fumigatus*-resembling mold presenting distinct clinical and antifungal susceptibility patterns. *Med Mycol* 50:525–528
- Smith G (1952) *Aspergillus brevipes* n. sp. *Trans Brit Mycol Soc* 35:241–242
- Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A fast bootstrapping algorithm for the RAxML web-servers. *Syst Biol* 57:758–771
- Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, Shea YR, Chang YC, Zelazny AM, Marr KA, Holland SM, Kwon-Chung KJ (2010) *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: how different is it from *Aspergillus fumigatus*? *J Clin Microbiol* 48:220–228
- Swilaiman SS, O’Gorman CM, Balajee SA, Dyer PS (2013) Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 12:962–969
- Takada M, Udagawa SI (1985) A new species of heterothallic *Neosartorya*. *Mycotaxon* 24:395–402
- Takada M, Horie Y, Abliz P (2001) Two new heterothallic *Neosartorya* from African soil. *Mycoscience* 42:361–367
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739
- Tomoda H, Kim YK, Nishida H, Masuma R, Omura S (1994) Pyripropenes, novel inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Production, isolation, and biological properties. *J Antibiot* 47:148–153
- Tournas V (1994) Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit Rev Microbiol* 20:243–263
- Varga J, Tóth B, Rigó K, Debets F, Kozakiewicz Z (2000) Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. *Folia Microbiol* 45:423–428
- Vinh DC, Shea YR, Jones PA, Freeman AF, Zelazny A, Holland SM (2009a) Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerg Infect Dis* 15:1292–1294
- Vinh DC, Shea YR, Sugui JA, Parrilla-Castellar ER, Freeman AF, William Campbell J, Pittaluga S, Jones PA, Zelazny A, Kleiner D, Kwon-Chung KJ, Holland SM (2009b) Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin Infect Dis* 49:102–111
- Wick AF, Stahl PD, Rana S, Ingram LJ (2007) Recovery of reclaimed soil structure and function in relation to plant community composition. In: Barnhisel RO (ed) *2007 National Meeting of the American Society of Mining and Reclamation, Gillette, WY, 30 Years of SMCRA and Beyond June 2–7, 2007*, Lexington, pp 941–957
- Wong SM, Musza LL, Kydd GC, Kullnig R, Gillum AM, Cooper R (1993) Fiscalins: new substance P inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*. *Taxonomy, fermentation, structures, and biological properties*. *J Antibiot* 46:545–553
- Yaguchi T, Horie Y, Tanaka R, Matsuzawa T, Ito J, Nishimura K (2007) Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jap J Med Mycol* 48:37–46
- Yaguchi T, Imanishi Y, Matsuzawa T, Hosoya K, Hitomi J, Nakayama M (2012) Method for identifying heat-resistant fungi of the genus *Neosartorya*. *J Food Protect* 75:1806–1813
- Yun S-H, Arie T, Kaneko I, Yoder OC, Turgeon BG (2000) Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* 31:7–20