

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Ivana Míková

Ověření druhových hranic mezi klinicky významnými geofilními druhy *Arthroderma*

Verification of species boundaries in clinically relevant *Arthroderma* species

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Vít Hubka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Adéla Čmoková

Praha 2018

Prohlášení

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

V Praze dne 13. 8. 2018

.....

Ivana Míková

Poděkování

Můj velký dík patří především mému školiteli Vítkovi Hubkovi za jeho čas a energii, které věnoval vední mé práce, konzultacím a kontrole textu této práce. Děkuji mu také za vstřícnost, laskavost, cenné rady a připomínky a ochotu vždy s čímkoli pomoci. Jsem velmi vděčná za to, že jsem měla možnost pracovat na tak zajímavém tématu pod jeho vedením.

Velice děkuji také Mgr. Adéle Čmokové za předání cenných rad, zkušeností a znalostí týkajících se molekulárních metod a práce s dermatofyty.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Lence Flaškové za praktické rady a pomoc při práci v DNA laboratoři katedry botaniky PřF UK, RNDr. Miladě Chudíčkové z Laboratoře genetiky a metabolismu hub v MBÚ AV ČR za izolaci velkého množství DNA, dále RNDr. Janu Svobodovi ze Střediska cytometrie a mikroskopie v MBÚ AV ČR za možnost využití průtokového cytometru a cell sorteru a RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za předání zkušeností se skenovací elektronovou mikroskopií.

Děkuji také doc. Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. za jeho trpělivost a pomoc jak se studijními, tak s organizačními záležitostmi, Karlu Prášilovi, prom. biol., CSc. za všestrannou podporu, Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. za jeho ochotu vždy pomoci a poradit a všem dalším kolegům a pedagogům z kryptogamologického oddělení katedry botaniky PřF UK za přátelskou atmosféru.

Dovolím si zde také poděkovat mému příteli a rodině, bez jejichž velké podpory a pomoci by dokončení této práce bylo o mnoho složitější.

Grantové agentuře Univerzity Karlovy děkuji za udělení grantu GAUK 80515 a tím i za možnost prezentovat výsledky své práce na mezinárodním kongresu ISHAM 2018 v Amsterdamu.

Abstrakt

Rod *Arthroderma* zahrnuje převážně geofilní druhy dermatofytů (přirozeně se vyskytující v půdě). Některé druhy, zejména zástupci někdejšího *Trichophyton terrestre* komplexu, příležitostně způsobují dermatomykózy u lidí a zvířat. Mezidruhové hranice v tomto komplexu byly v minulosti určovány převážně na základě biologického konceptu druhu, tedy za pomoci *in vitro* křížících experimentů. Platnost těchto téměř 70 let starých závěrů ale dosud nebyla testována za pomoci moderních taxonomických metod.

V této práci bylo zahrnuto celkem 194 izolátů rodu *Arthroderma* (včetně všech dostupných ex-typových kmenů) pocházejících převážně z USA, Kanady a Evropy, které byly izolovány nejčastěji z půdy (n = 77), zvířat (n = 50), lidského klinického materiálu (n = 41) a jeskynního sedimentu (n = 9). Primárním cílem této práce bylo objasnění hranic mezi druhy *A. insingulare*, *A. lenticulare* a *A. quadrifidum*, které se řadily do *T. terrestre* komplexu kvůli zdánlivě identickému nepohlavnímu stádiu. Dále měla práce ozřejmit vzájemné vztahy mezi druhy *Arthroderma* pomocí vícegenové fylogeneze a zjistit, které druhy jsou medicínsky významné.

Vícegenová fylogeneze rodu *Arthroderma* byla založená na sekvencích oblasti ITS rDNA a genech pro β -tubulin (*TUB2*) a translační elongační faktor 1 α (*TEF1 α*). Rod *Arthroderma* byl dle fylogeneze rozdělen na 8 dobře statisticky podpořených kladů zahrnujících 24 známých druhů a 15 linií, které pravděpodobně reprezentují nepopsané druhy. Fylogeneze jasně podpořila druhy *A. insingulare*, *A. lenticulare* a *A. quadrifidum*, které však netvořily monofyletický druhový komplex. *Trichophyton terrestre* je samostatným druhem, který není fylogeneticky příbuzný s žádným ze tří jmenovaných druhů. Tento druh bude v budoucnu třeba typifikovat a převést ho do rodu *Arthroderma* společně s druhy *Chrysosporium magnasporum* a *Ch. oceanitesii*, které fylogeneticky také náleží do rodu *Arthroderma*.

U druhů z *T. terrestre* komplexu byly dále využity křížící experimenty na 4 médiích a při 3 kultivačních teplotách pro indukci pohlavního stádia a zkoumány byly morfologické znaky jak na pohlavním, tak na nepohlavním stádiu. Křížící experimenty ukázaly, že požadavky jednotlivých druhů pro pohlavní proces jsou odlišné. Bylo zjištěno, že pohlavní i nepohlavní stádium nese znaky, které jsou použitelné pro rozlišení druhů *T. terrestre* komplexu. Kontroverzní je taxonomická pozice druhu *A. redellii* (patogen netopýrů), který se sice fylogeneticky nacházel uvnitř linie *A. quadrifidum* a byl schopen křížení s kmenem UAMH 2941 druhu *A. quadrifidum*, ale klíčivost askospor „hybridního“ potomstva byla velmi nízká v porovnání s jinými kříženci v rámci *A. quadrifidum*. Navíc *A. redellii* vykazoval řadu morfologických a fyziologických odlišností od *A. quadrifidum*, proto bude vzájemný vztah těchto dvou druhů předmětem dalšího zkoumání. Revize 41 kmenů z lidského klinického materiálu ukázala, že druhy *A. quadrifidum*, *A. onychocola*, *A. insingulare*, *A. crocatum*, *A. eboreum* a *T. terrestre* jsou potenciálními patogeny člověka. Podobně bylo identifikováno 12 známých a 9 nepopsaných potenciálně patogenních druhů pro zvířata, a to převážně pro netopýry (*A. redellii*,

A. insingulare, *A. quadrifidum* *A. vespertili* a nepopsané druhy označené *Arthroderma* sp. 8, 11, 12, 14, 15) a hady (*A. quarifidum*, *A. insingulare*, *A. curreyi*, *A. onychocola* a nepopsané druhy *Arthroderma* sp. 2, 3, 6, 8, 10).

Klíčová slova: *Arthroderma*, dermatofytóza, geofilní dermatofyty, hybridizace, fylogenetická analýza, křížící experimenty, mating type geny, polyfázická taxonomie, *Trichophyton terrestre* komplex, skenovací elektronová mikroskopie, viabilita askospor

Abstract

The genus *Arthroderma* contains predominantly geophilic dermatophytes (naturally occurring in soil). Some species, especially those from *Trichophyton terrestre* complex, cause human and animal dermatomycosis. In the past, the species boundaries were determined mainly on the basis of biological species concept using *in vitro* mating experiments. But these nearly 70-years-old findings have not been tested by means of modern taxonomic methods.

In total 194 species of the genus *Arthroderma* (including all available ex-type strains) originating predominantly in USA, Canada and Europe were studied in this thesis. They were mostly isolated from soil (n = 77), animals (n = 50), human clinical material (n = 41) and cave sediment (n = 9). The main goal of the thesis was to elucidate the species boundaries between species *A. insingulare*, *A. lenticulare* and *A. quadrifidum*, that were classified into the *T. terrestre* complex because of their seemingly identical asexual stage. Further, this work aimed to resolve the relationship between *Arthroderma* species using the multigene phylogeny and clarify which species are clinically relevant.

A multigene phylogeny of the genus *Arthroderma* was based on the sequences of the ITS rDNA region, β -tubulin (*TUB2*) and translation elongation factor 1 α (*TEF1 α*) genes. The genus *Arthroderma* was divided into 8 statistically well-supported clades encompassing 24 known species and 15 lineages probably representing undescribed species. Phylogenetic analysis clearly supported the recognition of species *A. insingulare*, *A. lenticulare* and *A. quadrifidum*, which however did not form a monophyletic species complex. *Trichophyton terrestre* is a separate species phylogenetically distantly related to the three above mentioned species. The typification of this species is required along with its transfer to the genus *Arthroderma*, similarly to *Chrysosporium magnasporum* and *Ch. oceanitesii*, that also belong to the genus *Arthroderma* based on the phylogeny.

The mating experiments on 4 media and at 3 cultivation temperatures were conducted to induce the sexual stage in *T. terrestre* complex species and the characters on both sexual and asexual stages were studied. The mating experiments revealed different requirements of particular species for the sexual reproduction *in vitro*. It was found that the both asexual and sexual stages show characters usable for species discrimination in *T. terrestre* complex species. The taxonomic position of *A. redellii* (bat pathogen) is controversial. This species was phylogenetically located in the lineage of *A. quadrifidum* and was able to mate with the *A. quadrifidum* strain UAMH 2941, but the „hybrid“ progeny showed very low level of germination compared to crosses between *A. quadrifidum* isolates. Additionally, *A. redellii* differed from *A. quadrifidum* in many morphological and physiological characters; the reason why mutual taxonomic position of these two species will be subjected to further analyses. A taxonomic revision of 41 strains from human clinical material showed that *A. quadrifidum*, *A. onychocola*, *A. insingulare*, *A. crocatum*, *A. eboreum* a *T. terrestre* are potential human pathogens. Similarly, 12 known and 9 undescribed species were identified as potentially pathogenic for animals,

especially for bats (*A. redellii*, *A. insingulare*, *A. quadrifidum*, *A. vespertili* and undescribed species *Arthroderma* sp. 8, 11, 12, 14, 15) and snakes (*A. quarifidum*, *A. insingulare*, *A. curreyi*, *A. onychocola* and undescribed species *Arthroderma* sp. 2, 3, 6, 8, 10).

Key words: *Arthroderma*, dermatophytosis, geophilic dermatophytes, hybridization, phylogenetic analysis, mating experiments, mating type genes, polyphasic taxonomy, *Trichophyton terrestre* complex, scanning electron microscopy, viability of ascospores

Obsah

1	ÚVOD	10
1.1	Výskyt a význam geofilních dermatofytů	10
1.2	Taxonomie rodu <i>Arthroderma</i> a <i>Trichophyton terrestre</i> komplexu.....	11
1.3	Pohlavní systém dermatofytů	14
1.4	Metody používané k určování geofilních dermatofytů.....	15
1.5	Patogenita geofilních dermatofytů	18
2	METODIKA.....	19
2.1	Studované kmeny	19
2.2	Kultivace a uchovávání kultur.....	20
2.3	Křížící pokusy – indukce tvorby pohlavního stádia	20
2.4	Molekulární metody a fylogenetická analýza.....	21
2.4.1	Izolace DNA.....	21
2.4.2	PCR amplifikace.....	21
2.4.3	Purifikace PCR produktů.....	23
2.4.4	Sekvenace DNA a úprava sekvencí.....	24
2.4.5	Konstrukce fylogenetického stromu.....	24
2.5	Morfologická analýza – studium fenotypu.....	24
2.5.1	Makromorfologie.....	24
2.5.2	Mikromorfologie	24
2.6	Statistické zpracování dat.....	25
2.7	Stanovení životaschopnosti (viability) a klíčivosti askospor	25
3	VÝSLEDKY	26
3.1	Molekulární metody a fylogenetická analýza.....	26
3.1.1	Sekvenace a tvorba alignmentu	26
3.1.2	Konstrukce fylogenetických stromů.....	37
3.1.3	Amplifikace MAT genů	48
3.2	Identifikace klinicky významných druhů <i>Arthroderma</i>	49
3.3	Křížící pokusy	54
3.4	Morfologie.....	57
3.5	Viabilita a klíčivost askospor	71
4	DISKUZE	73
4.1	Fylogeneze a taxonomie rodu <i>Arthroderma</i>	73
4.2	Postavení <i>Trichophyton terrestre</i> v rodě <i>Arthroderma</i>	74
4.3	Klinicky významné druhy	74
4.4	Morfologie.....	75

4.5	Biologický koncept druhu a křížící experimenty	76
4.6	Fitness pohlavně vzniklého potomstva a mezidruhových hybridů.....	77
5	ZÁVĚR.....	80
6	LITERATURA.....	82

Předmluva

Předkladaná práce se soustředí na revizi taxonomie a druhového konceptu rodu *Arthroderma*, který zahrnuje převážně geofilní dermatofyty. Přestože tento rod obsahuje druhy běžně nacházené v přírodě i klinickém materiálu, nebyla mu ze strany taxonomie věnována v posledních několika desetiletích zasloužená pozornost. Patogenní druhy *Arthroderma* jsou soustředěny především v tzv. *Trichophyton terrestre* komplexu, kam byly dříve řazeny nejméně tři druhy. Druhový koncept byl u této skupiny v minulosti založen převážně na morfologii, která je poměrně jednoduchá a neposkytuje dostatek taxonomicky informativních znaků, a dále na křížících experimentech *in vitro*. Zejména zcela chybí revize druhových hranic pomocí mnohagenové fylogeneze, které se v posledních dvou desetiletích dočkala většina skupin obsahujících klinicky a ekonomicky významné houby. Multidisciplinární přístup odhalení mezidruhových hranic zahrnuje i křížící experimenty *in vitro*, které odhalí biologický koncept druhu.

Cíle této práce jsou následující:

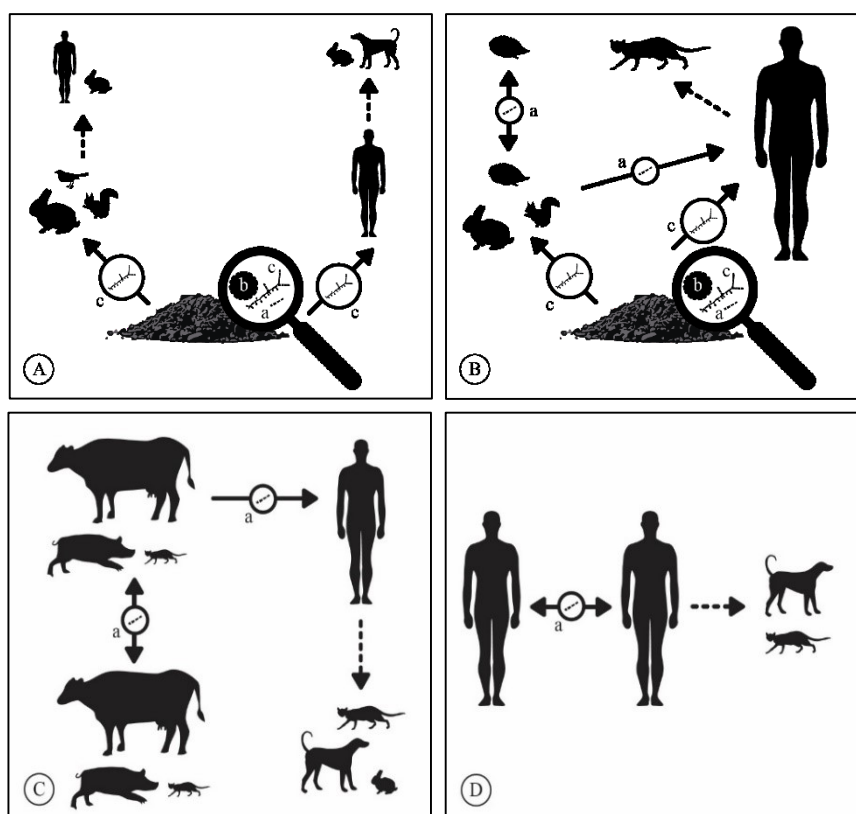
1. Provést taxonomickou revizi klinicky významných geofilních dermatofytů rodu *Arthroderma* na základě vícegenové fylogeneze podpořené analýzou morfologie a fyziologie a *in vitro* křížícími experimenty.
2. Zjistit, které druhy rodu *Arthroderma* jsou klinicky relevantní pro člověka a obratlovce.

1 ÚVOD

1.1 Výskyt a význam geofilních dermatofytů

Dermatofyty jsou skupina mikroskopických keratinofilních hub (*Arthrodermataceae*, Onygenales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota), které jsou významné svou schopností rozkládat materiál s obsahem keratinu. Mnohé druhy způsobují povrchové mykózy známé jako dermatofytózy (synonymum tinea) na kůži a jejích derivátech u člověka a zvířat. Dermatofytózami celosvětově trpí mezi 20–25 % lidské populace, což je řadí mezi nejběžnější infekce vůbec (Havlickova *et al.* 2008). Prevalence dermatofytóz je závislá na několika faktorech, jakými jsou např. klima v dané oblasti, socioekonomické podmínky, hygienické standardy apod. Obecně se dermatofyty vyskytují více v zemích s horkým a vlhkým klimatem (Sharma & Sharma 2011).

Mezi dermatofyty je v současnosti řazeno 9 rodů (*Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Paraphyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Arthroderma*, *Ctenomyces* a *Guarromyces*) a 57 druhů (de Hoog *et al.* 2017), které lze rozdělit do tří ekologických skupin – antropofilní, zoofilní a geofilní (Georg 1960) (Obrázek 1). Antropofilní dermatofyty nalezneme v rodech *Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*. Tyto druhy působí pouze onemocnění člověka a jen vzácně může být infekce přenesena i na jiné hostitele (Elewski & Hazen 1989). Nejčastějším původcem lidských dermatomykóz ve vyspělých zemích je *T. rubrum* (Seebacher *et al.* 2008). Naproti tomu zoofilní dermatofyty (rody *Lophophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*) způsobují onemocnění u zvířat, kde je šance přenosu na člověka z hospodářských nebo domácích zvířat poměrně vysoká. Geofilní dermatofyty jsou evolučně nejstarší skupinou dermatofytů (Summerbell 2002), ze které se vyvinuly zoofilní a antropofilní dermatofyty. Geofilní druhy se přirozeně vyskytují v půdě (Ajello & Cheng 1967, Böhme 1967) na materiálu s obsahem keratinu, např. v blízkosti zvířecích nor a pastvin (Dawson 1963, Weitzman & Summerbell 1995), na peří v ptačích hnízdech (Otčenášek *et al.* 1967), sovích vývrzcích a výkalech masožravců obecně (Kuehn 1960, Currah *et al.* 1996), dále na ptačím a netopýřím trusu (tzv. guano) v jeskyních a důlních sedimentech (Kajihiro 1965, Evolceanu & Alteras 1967, Hubalek 1970, Zeller 1970, Lorch *et al.* 2013) a některé druhy mohou být patogenní (Demange *et al.* 1992, Muller *et al.* 2011, Hubka *et al.* 2015, Lorch *et al.* 2015). Z půdy lze keratinofilní houby izolovat pomocí tzv. „hair-bait“ techniky (Vanbreuseghem 1952) položením zklávaných vlasů, koňských žíní, peří či jiného materiálu s obsahem keratinu na Petriho misku se vzorkem nejlépe zvlhčené půdy s přísadkou cyclohexamidu. Geofilní dermatofyty nalezneme zejména v rodech *Arthroderma*, *Nannizzia* a *Paraphyton*. Geofilní dermatofyty jsou ze všech tří skupin druhově nejbohatší, ale poměrně málo prozkoumané, a přesné hranice mezi druhy nejsou často zcela objasněné.



Obrázek 1. Schéma znázorňující životní cykly dermatofytů. A. Geofilní dermatofyty. B. Zoofilní dermatofyty způsobující běžně onemocnění člověka. C. Zoofilní dermatofyty způsobující zřídka onemocnění člověka. D. Antropofilní dermatofyty. a = arthrokonidie, b = plodnice (gymnothecium), c = mikro-/makrokonidie. Plně šipky značí častý a přerušované méně častý přenos onemocnění.

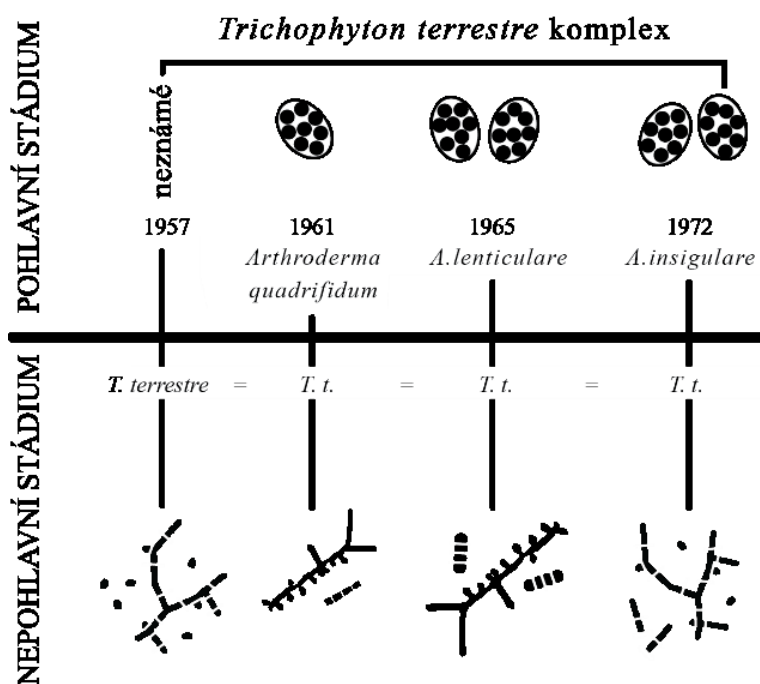
Upraveno podle Dvořák & Otčenášek (1969).

1.2 Taxonomie rodu *Arthroderma* a *Trichophyton terrestre* komplexu

Studium taxonomie dermatofytů sahá do první poloviny 19. stol. (Gruby 1841). V té době byly nové druhy dermatofytů definovány především na základě klinického obrazu a morfologických charakteristik pomocí přímé mikroskopie. Od toho okamžiku došlo díky rozvoji kultivačních a taxonomických metod k výraznému nárůstu nových druhů a k přejmenování celé řady dříve popsáných druhů. Obtížná identifikace druhů na základě fenotypu a často chybějící herbářový či obrazový materiál vedly k navržení velkého počtu nadbytečných jmen. Množství jmen spojených s dermatofyty bylo dáno také duální nomenklaturou, kdy byla odděleně pojmenovaná nepohlavní (anamorfa) a pohlavní část životního cyklu houby (teleomorfa). V roce 2012 bylo upuštěno od používání duální nomenklatury (McNeill *et al.* 2012) a zavedeno do praxe pravidlo „One fungus, one name“ (jedno jméno pro jednu houbu) (Taylor 2011). Výrazný dopad měly tyto změny na geofilní dermatofyty, kde došlo k nárůstu počtu uznávaných rodů a řadě přesunů druhů mezi nimi (de Hoog *et al.* 2017). Tyto změny se také výrazně dotkly druhů z *Trichophyton terrestre* komplexu (Durie & Frey 1957), který je z velké části předmětem této práce. *Trichophyton terrestre* je anamorfoou hned tří biologických druhů

– *A. quadrifidum* (Dawson & Gentles 1961), *A. lenticulare* (Pore *et al.* 1965) a *A. insingulare* (Carmichael & Padhye 1972) (Obrázek 2). Morfologie *T. terrestre* se vyznačuje vatovitými až práškovitými, bílými až světle žlutými koloniemi se žlutohnědým nebo červeným reverzem (Marples 1961, English 1964, Otčenášek *et al.* 1967), hruškovitými přisedlými mikrokonidiiemi a protáhle vejčitými nebo kyjovitými, 2 až 6-buněčnými makrokonidiiemi (Durie & Frey 1957). Typická je i produkce spirálních hyf a nodulárních útvarů podobných plodnicím.

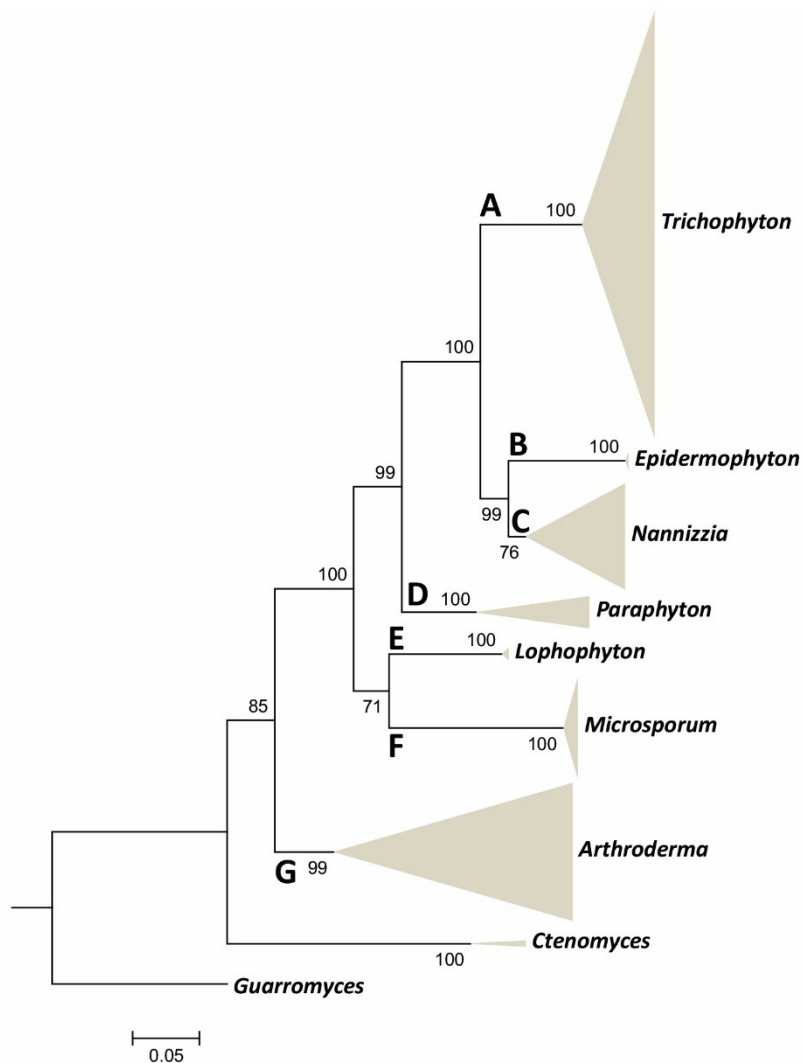
Druhy *Arthroderma quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare* byly definovány převážně na základě biologického konceptu druhu pomocí *in vitro* křížících pokusů. Podstatou biologického konceptu druhu je reprodukční izolace jedinců jednoho druhu od jedinců dalších druhů (Mayr 1942, Dobzhansky 1951). V případě, že dojde k vytvoření mezidruhových hybridů, mívají tyto většinou snížené fitness (u hub se může projevit jako snížená životaschopnost jedinců F1 generace nebo sterilita jedinců F1 nebo F2 generace, mikromorfologie F1 generace může být odlišná od rodičovské, apod.)(Dettman *et al.* 2003, Olarte *et al.* 2015, Hubka *et al.* 2018).



Obrázek 2. Časová osa s popisy druhů náležejících do *Trichophyton terrestre* komplexu.

V současnosti má rod *Arthroderma* 22 druhů a mezi nejnověji popsané patří *A. onychocola* (Hubka *et al.* 2014b, Hubka *et al.* 2015), druh popsaný z lidských nehtů, a druh *A. redellii* (Lorch *et al.* 2015) působící kožní onemocnění hibernujících netopýrů připomínající tzv. white nose syndrome (WNS). Sekvence ITS rDNA tohoto druhu vykazovaly 98 % podobnost se sekvencemi *A. quadrifidum*, ale na rozdíl od *A. quadrifidum* neroste *A. redellii* při 25 °C.

Geofilní dermatofyty z rodu *Arthroderma* tvoří vzhledem k antropofilním a zoofilním druhům bazální skupinu (Gräser *et al.* 2000a) (Obrázek 3). Druhy skupiny G na Obrázku 3 nesly ještě donedávna rodové jméno *Trichophyton* pro nepohlavní a *Arthroderma* pro pohlavní stádium (pokud bylo známé). Dnes je pro všechny tyto geofilní druhy *Trichophyton* používáno rodové jméno *Arthroderma* (de Hoog *et al.* 2017). Důvodem přejmenování byla polyfilie rodu *Trichophyton*, kdy antropofilní a zoofilní druhy tvořily zcela oddělenou fylogenetickou skupinu od geofilních druhů (Gräser *et al.* 2008). Typovým druhem rodu *Arthroderma* je *A. curreyi* (Padhye & Carmichael 1971), druh poprvé izolovaný v roce 1854 z mrtvých listů a větviček (Currey 1854). Platně ho popsal Berkeley v roce 1860.



Obrázek 3. Fylogenetický strom čeledi *Arthrodermataceae* založený na sekvencích ITS rDNA (= internal transcribed spacer), LSU rDNA (large subunit), *TUB2* (β -tubulin) a 60S L10 (ribosomální protein L10 podjednotky 60S). Skupina G zahrnuje druhy *Arthroderma*, které jsou studovány v této diplomové práci. Převzato z de Hoog *et al.* (2017).

1.3 Pohlavní systém dermatofytů

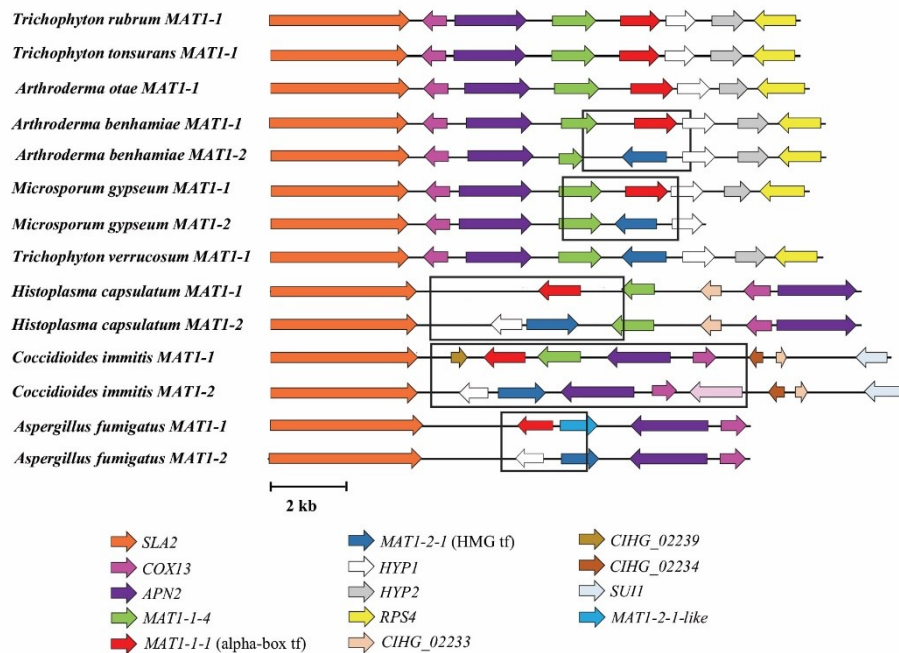
Pohlavního rozmnožování spojeného s tvorbou pohlavních struktur (plodnice, vřečka, askospory) jsou schopny různé druhy napříč dermatofyty. Pohlavní stádium je známé pro většinu geofilních a některé zoofilní dermatofyty. Naproti tomu drtivá většina antropofilních druhů a některé zoofilní dermatofyty ztratily schopnost tvorby pohlavního stádia, které je především vázané na půdní prostředí (Gräser *et al.* 2000a, Summerbell 2000, Gräser *et al.* 2006, White *et al.* 2008). Protože jsou antropofilní a zoofilní druhy úzce vázané na hostitele, šíří se převážně klonálně (nepohlavními arthrosporami v kožních šupinách) a řada druhů má ve svých populacích pouze jedince jednoho pohlavního ladění (*MATI-1-1* nebo *MATI-2-1*) (Gräser *et al.* 2008). Nicméně i u druhů hub nepohlavně se rozmnožujících byly zaznamenány známky sexuálních či parasexuálních procesů, které vnáší genetickou variabilitu do jinak téměř klonálních populací těchto druhů (Hull *et al.* 2000, O’Gorman *et al.* 2009). Geofilní dermatofyty z rodu *Arthroderma* jsou schopny jak pohlavního, tak nepohlavního rozmnožování. Vytvářejí kulovité plodnice (gymnothecia, dříve pojmenovávány kleistothecia) s činkovitými peridiálními a spirálními hyfami na povrchu a obsahují kulovitá nebo hruškovitá prototunikátní vřečka s 8 askosporami. Často (i v této práci) byly pozorovány nodulární útvary morfologicky podobné plodnicím („pseudokleistothecia“), které jsou však sterilní nebo obsahují konidie místo askospor (Durie & Frey 1957, Otčenášek *et al.* 1967, Brasch & Gräser 2005, Hubka *et al.* 2015, Uhrlaß *et al.* 2018).

Proces pohlavního rozmnožování probíhá pod kontrolou genů tzv. MAT lokusu (mating type locus). Zastoupení některých genů v tomto lokusu je určující pro pohlavní strategii druhu nebo pohlavní ladění (*MATI-1-1/MATI-2-1*) konkrétního jedince. U heterotalických druhů je v MAT lokusu přítomen buď *MATI-1-1* nebo *MATI-2-1* gen, u homotalických druhů se v MAT lokusu nachází oba geny. U hub jsou tyto geny zpravidla označovány jako idiomorfy kvůli své vzájemné sekvenční i funkční odlišnosti. U askomycetů kóduje gen *MATI-1-1* tzv. alfa doménu (alfa box domain) s funkcí aktivátoru transkripce a gen *MATI-2-1* kóduje HMG doménu (high mobility group box domain) s funkcí regulátoru transkripce (Kronstad & Staben 1997). Délka a struktura MAT lokusu je specifická pro každý druh houby. U dermatofytů se délka MAT lokusu pohybuje kolem 3000 bází (3 kbp), zatímco u druhů *Coccidioides* a *Paracoccidioides* dosahuje MAT lokus délky větší než 9 kbp (Li *et al.* 2010). Přilehlé geny MAT lokusů jsou *SLA2* (gen kódující protein tvořící cytoskelet), *COX13* (gen kódující cytochrom c oxidázu) a *APN2* (gen pro DNA lyázu). Zatímco u dermatofytů tyto geny navazují na 5’konec MAT lokusu, u ostatních hub z oddělení *Ascomycota* obvykle obklopují tyto geny MAT lokus z obou stran (Li *et al.* 2010) (Obrázek 4). Známé sekvence sousedících genů lze využít pro navrhování nových primerů pro amplifikaci MAT idiomorf. Správné určení pohlavního ladění je stěžejní pro křížící experimenty a identifikaci hranic biologických druhů.

Většina pohlavně se rozmnožujících druhů rodu *Arthroderma* je heterotalických a pro vytvoření pohlavního stádia je tedy nutné setkání jedinců s opačným pohlavním laděním.

Zkřížením jedince s *MAT1-1-1* idiomorfou a jedince s *MAT1-2-1* idiomorfou dojde za specifických podmínek k vytvoření pohlavního stádia.

Mezi geofilními dermatofyty najdeme i druhy homothalické (*A. ciferrii*, *A. crocatum*, *A. curreyi*), které mají v MAT lokusu jak *MAT1-1-1*, tak *MAT1-2-1* idiomorfu, a tudíž nepotřebují pro vznik pohlavního stádia jedince opačného pohlavního ladění.

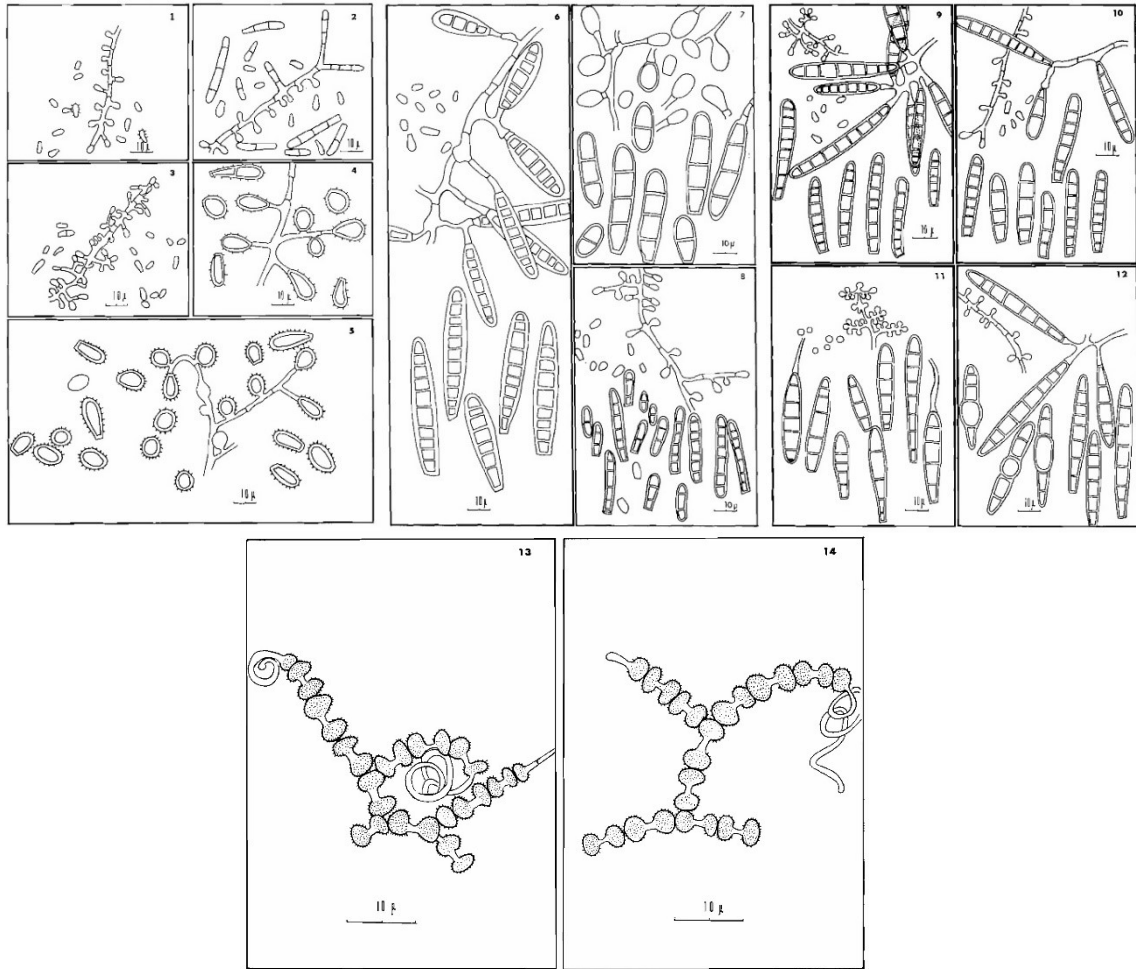


Obrázek 4. Struktura MAT lokusu (vymezený černým rámečkem) u dermatofytů a blíže příbuzných patogenních hub. Pro druhy *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *Microsporium canis* (*Arthroderma otae*) a *T. verrucosum* hranice MAT lokusu nejsou známy.

Převzato z Metin & Heitman (2016).

1.4 Metody používané k určování geofilních dermatofytů

Identifikace dermatofytů obecně je na základě mikro- a makromorfologických znaků nesnadná a často chybná (Kuehn 1958, Gräser *et al.* 2008), a to obzvláště u málo sporulujících druhů. Druhy geofilních dermatofytů byly v minulosti odlišovány na základě barvy kolonií a tvaru a velikosti mikro- a makrokonidií (Durie & Frey 1957, Marples 1961, Dawson 1963, Marples & Smith 1963, Varsavsky & Ajello 1964), tvorby jiných typů spor (Kuehn 1960) a na základě buněk peridiálních hyf na gymnotheciích (Pore *et al.* 1965, Böhme 1967) (Obrázek 5). Významným prostředkem pro určování těchto druhů byly křížící experimenty, které se hojně používaly od 60. let minulého století, tedy ještě před nástupem používání molekulárních metod (Dawson & Gentles 1961, Ajello & Cheng 1967). Byl to jediný možný způsob, jak od sebe druhy některých velmi podobných geofilních dermatofytů rozeznat.



Obrázek 5. Morfologická variabilita konidií, konidioforů (1-12) a buněk peridiálních hyf (13, 14) rodu *Arthroderma*. 1. *A. curreyi*. 2. *A. ciferrii*. 3. *A. cuniculi*. 4. *A. multifidum*. 5. *A. tuberculatum*. 6. *A. uncinatum*. 7. *A. flavescens*. 8. *A. quadrifidum*. 9. *A. gloriae*. 10. *A. gertleri*. 11. *A. benhamiae*. 12. *A. simii*. 13. Asymetrické peridiální buňky *A. benhamiae*. 14. Symetrické peridiální buňky *A. lenticulare*. Převzato z Padhye & Carmichael (1971).

Samotné *in vitro* křížící experimenty byly prováděny na půdě (sterilizované i nesterilizované) s přidavkem materiálu obsahujícího keratin. Dawson a Gentles (1961) navrhovali použití nesterilní půdy, kde podmínky více připomínají přirozené prostředí geofilních dermatofytů (např. půdní organizmy mohou stimulovat pohlavní rozmnožování hub). U nesterilní půdy však může dojít k přerůstání dermatofytů jinou houbou a tudíž ke zničení křížícího pokusu.

Pro navození pohlavního stádia je stěžejní najít vhodné podmínky (teplotu, médium, materiál s obsahem keratinu, pH, světlo). Teploty, při nichž v minulosti došlo k navození pohlavního stádia u geofilních druhů rodu *Arthroderma* se pohybují v rozmezí 17–28 °C (Hubka *et al.* 2015, Dawson & Gentles 1961). Alternativním substrátem k půdě jsou agarová média, která se později osvědčila jako vhodná pro křížení dermatofytů: Czapkův agar (Dawson & Gentles 1961), rýžový agar s vlasy (Böhme 1967), ovesný agar (OA), kukuřičný agar s kvasničným extraktem (Weitzman *et al.* 1967, Currah *et al.* 1996, Li *et al.* 2010), nebo tzv. „alphacel medium“

(Sloan *et al.* 1960). Dalšími médii, na kterých docházelo ke křížení opačně pohlavně laděných kmenů, byly vodní agar, agar s malt extraktem (MEA), bramborovomrkvový agar (PCA) a tzv. Takashio medium (Currah *et al.*, 1996, Hubka *et al.* 2015). Indukci plodnic může příznivě ovlivnit například přítomnost solí v médiu (Takashio 1972) či přírodní materiál v podobě semen (např. *Guizotia abyssinica*) (de Vroey 1964, Demange *et al.* 1992) a především materiál s obsahem keratinu. Jako nejvhodnější se osvědčily dětské vlasy (Pore *et al.* 1965, Otčenášek *et al.* 1967), koňské žíně (de Vroey 1964, Ajello & Cheng 1967), srst morčat, kousky kravích rohů a perí. Naopak vlasy dospělých a králíčí chlupy se příliš neosvědčily (Dawson & Gentles 1961). Na králíčích chlupcích naopak tvořily ve velké míře plodnice druhy *A. cuniculi* a *A. multifidum* (Dawson 1963). Podmínky pro křížení se tedy mezi geofilními druhy rodu *Arthroderma* významně liší.

Vedle výše zmiňovaného biologického konceptu zajištěného křížícími pokusy mají pro determinaci druhů zásadní přínos morfologie (makro- a mikromorfologie) podpořená fyziologickými testy (Ajello & Georg 1957, Georg & Camp 1957, Weitzman *et al.* 1983) a dále ekologická a fylogenetická data. Hrubá ekologická data často odpovídají datům fylogenetickým (geofilní druhy si jsou navzájem příbuzné, podobně i primárně patogenní druhy zoofilních a antropofilních dermatofytů se ve fylogenetických analýzách shlukují). Fylogenetický koncept předpokládá monofyletičnost druhu, který v tom případě zahrnuje všechny potomky společného předka. Druhy jsou vymezovány na podkladě molekulárně genetických dat získaných molekulárními metodami založenými na PCR (DNA sekvenace, fingerprintové analýzy, apod.). Vedle PCR metod je obzvlášť v klinické praxi široce rozšířená determinace pomocí metody MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization - time-of-flight) (Nenoff *et al.* 2013, L'Ollivier *et al.* 2013).

Pro druhovou determinaci a popis nových druhů je nejvhodnější použít tzv. polyfázický přístup, a to kombinaci výsledků získaných z fylogenetické analýzy, ekologie, morfologie i křížících pokusů, které jsou považovány za vhodný nástroj pro určení druhových hranic především u geofilních dermatofytů na rozdíl od primárně patogenních druhů. Nicméně křížící pokusy byly prováděny i u vybraných antropofilních a zoofilních druhů a není bez zajímavosti, že odhalily schopnost některých dvojic druhů tvořit mezidruhové hybridy *in vitro* (Kawasaki *et al.* 2009, Anzawa *et al.* 2010, Kawasaki *et al.* 2010). Tyto výsledky lze vysvětlit přítomností neúplných prezygotických reprodukčních bariér u těchto fylogeneticky mladých druhů. Díky odlišným ekologickým prostředím, ve kterých se tyto druhy vyskytují (odlišní hostitelé), je křížení a vznik mezidruhových hybridů v přírodě nepravděpodobné a lze ho dosáhnout jen v laboratorních podmínkách. Výsledky křížení *in vitro* u primárně patogenních druhů se tedy jen obtížně dají interpretovat bez znalosti mnohagenové fylogeneze a ekologie. Jednoduché metody odlišení těchto hybridů od pravých biologických druhů přitom u hub nebyly vyvinuty.

1.5 Patogenita geofilních dermatofytů

Geofilní dermatofyty jsou v porovnání s antropofilními či zoofilními druhy málo běžnými původci dermatomykóz. Pro svůj přirozený výskyt v půdě jsou považovány spíše za nepatogenní (Gräser *et al.* 2008), existují však dokumentované případy dermatomykóz u zvířat a člověka způsobené touto skupinou mikroskopických hub (Brasch & Gräser 2005, Nenoff *et al.* 2014, Hubka *et al.* 2014b, Lorch *et al.* 2015). Na srsti savců či peří ptáků se však mohou tyto druhy vyskytovat i bez známek infekce (Marples 1967, Otčenášek *et al.* 1967). Celosvětově působí geofilní dermatofyty z rodů *Arthroderma*, *Nannizzia* a *Paraphyton* jen asi 1–5 % všech dermatofytóz v závislosti na geografické oblasti (Hubka *et al.* 2014c, Segal & Frenkel 2015, Faure-Cognet *et al.* 2016). Vzhledem k vysoké prevalenci dermatofytóz v populaci představuje ale i toto nízké procento nezanedbatelný počet. Nejvíce postiženým místem bývá kůže končetin a nehty, které jsou nejčastěji v kontaktu s půdou obsahující spory dermatofytů (Brasch & Gräser 2005, Hubka *et al.* 2014a, Hubka *et al.* 2014c). Lidské dermatomykózy způsobené geofilními a zoofilními dermatofyty jsou akutní, vysoce zánětlivé, ale poměrně snadno léčitelné. Naproti tomu antropofilní dermatofyty působí mírné, nezápětivé, ale zato chronické mykózy (Metin *et al.* 2015).

U geofilních dermatofytů rodu *Arthroderma* byla také zkoumána patogenita na modelových organizmech. U *T. terrestre* bylo modelovým organizmem morče (Durie & Frey 1957, English 1964, Otčenášek *et al.* 1967), myš (Marples 1961), králík a ježek (English 1964). U *A. flavescens* bylo modelovým organizmem morče a kuře (Rees 1967), u *A. glorieae* morče (Ajello & Cheng 1967). Pouze Otčenášek *et al.* (1967) zjistil, že ve 2 případech z 9 byl *T. terrestre* pro morče patogenní, a English (1964) pozoroval klinickou reakci na bodlinách ježka s inokulovaným druhem *T. terrestre*.

2 METODIKA

2.1 Studované kmeny

Celkem bylo analyzováno 194 izolátů rodu *Arthroderma*, z nichž 95 izolátů bylo původně řazeno do *T. terrestre* komplexu podle morfologických metod. Izoláty byly získány z nebo uloženy do následujících sbírek:

UAMH (Centre for Global Microfungal Biodiversity, University of Toronto, Canada; Connie F. C. Gibas, Lynne Sigler), CBS-KNAW (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherland), CFMR (Center for Forest Mycology Research, Madison, Wisconsin, USA), CCF (Sbírka kultur hub katedry botaniky, PřF UK, Praha, Česká Republika).

Část izolátů byla získána z klinických pracovišť v České Republice zabývajících se diagnostikou dermatofytóz:

- 1) Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, ČR: Mgr. Radim Dobiáš, RNDr. Stanislava Dobiášová
- 2) Centrální laboratoře Nemocnice České Budějovice, a.s., ČR: MUDr. Nad'a Mallátová
- 3) Dermatovenerologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, ČR: doc. MUDr. Magdaléna Skořepová, CSc., doc. MUDr. Ivana Kuklová, CSc., Jiřina Stará
- 4) Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, Česká Republika: RNDr. Pavlína Lysková
- 5) Ústav mikrobiologie, LF Univerzity Palackého v Olomouci, ČR: doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D, MDDr. Lucie Svobodová
- 6) Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie, Krajská nemocnice Liberec, a.s., ČR: MUDr. Jana Doležalová
- 7) Ústav mikrobiologie, Fakultní nemocnice Plzeň-Lochotín, ČR: MUDr. Helena Janouškovcová, RNDr. Jana Hanzlíčková.

Anamnestické údaje pacientů s dermatofytózami byly získány z anonymní databáze <http://www.biomed.cas.cz/mbu/lbwr/dermatofyta>.

Zbývající izoláty byly získány od zahraničních spolupracujících pracovišť:

- 1) National Wildlife Health Center, US Geological Survey, Madison, Wisconsin, USA: Dr. Jeffrey M. Lorch
- 2) National Center for Microbial Resource, National Center for Cell Science, Pashan, Pune, Maharashtra, India: Dr. Rahul Sharma
- 3) Laboratory for Medical Microbiology, Mölbis, Deutschland: Dr. Silke Uhrlaß, Prof. Pietro Nenoff.

2.2 Kultivace a uchovávání kultur

Složení a výrobce médií použitých pro kultivaci, křížící pokusy a morfologickou analýzu jsou uvedeny v Tabulce 1. Dlouhodobě byly kmeny uchovávány ve tmě v lednici při 4 °C na šikmých půdách (sladinový agar SL 2° nebo agar s maltózovým extraktem MEA).

Tabulka 1. Média použitá pro kultivaci, křížící pokusy a morfologickou analýzu.

Médium	Zkratka	Složení na 1000 ml destilované vody
Agar s maltózovým extraktem	MEA (malt extract agar)	20 g malt extraktu (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom), 20g glukózy, 1g peptonu (Himedia, Mumbai, India), 15 g agaru, pH 5,4
2° sladinový agar	SL 2°	2° malt extrakt, 20 g agaru, pH 5
Bramborovodextrózový agar	PDA (potatoe dextrose agar)	39 g bramborovodextrózového agaru (Himedia, Mumbai, India), pH 5,6
Sabouraudův dextrózový agar	SAB (Sabouraud dextrose agar)	40 g glukózy, 10g peptonu, 20 g agaru, pH 5,6
Ovesný agar	OA (oatmeal agar)	72,5 g ovesného agaru (Difco, Le Pont de Claix, Francie), pH 6
Agar s přidavkem semen <i>Guizotia abyssinica</i> (mastiňák habešský)*	GAA (<i>G. abyssinica</i> agar)	30g semen <i>G. abyssinica</i> , 20 g agaru
vodní agar	A 2%	20 g agaru, pH 6,3
Bramborovomrkvový agar	PCA (potatoe carrot agar)	24 g bramborovomrkvového agaru (Himedia, Mumbai, India), pH 6,5

*převzato z de Vroey (1964)

S kulturami jsem pracovala podle pravidel pro práci s organismy skupiny BSL-2 (http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/bmb15_sect_iv.pdf).

2.3 Křížící pokusy – indukce tvorby pohlavního stádia

Křížení jsem prováděla u druhů náležejících do *T. terrestris* komplexu s determinovanými idiomorfami MAT genů, tedy u izolátů *A. insingulare*, *A. lenticulare* a *A. quadrifidum* reprezentujícími různé větve ve fylogenetické analýze (viz níže). Vybrané kmeny *A. quadrifidum* byly kříženy i s ex-typovým izolátem druhu *A. redellii*. Křížící experimenty byly prováděny na sterilní půdě (2× klávané) s přidavkem sterilních koňských žíní a dětských blondřatých vlasů (1× klávaných). Dále pak i na agarových médiích, a to na GAA, A 2% s přidavkem sterilních blondřatých dětských vlasů a PCA s dětskými blondřatými vlasy. Na jednu polovinu misky byl naočkován kmen s párovacím typem *MATI-1-1*, na druhou polovinu *MATI-2-1* kmen ve vzdálenosti přibližně 10 mm od sebe navzájem. Misky byly inkubovány při 12, 17 a 25 °C ve tmě; v případě půdy s vlasy a koňskými žíněmi při pokojové teplotě na světle. Pokusy byly kontrolovány od 3. týdne inkubace v týdenních intervalech (plodnice jsou viditelné pouhým okem, kontrola tedy probíhala aspekci bez použití optiky, případně

s použitím binolupy Leica EZ4). Přítomnost věreck a askospor byla kontrolována pod světelným mikroskopem Leica ICC50 W a vzniklé plodnice byly dokumentovány pod binokulární lupou Olympus SZ61 vybavenou fotodokumentačním systémem Olympus Camedia C-5050. Misky se založenými křížícími pokusy byly sledovány po dobu 6 měsíců a poté zničeny autoklávováním.

2.4 Molekulární metody a fylogenetická analýza

2.4.1 Izolace DNA

DNA byla izolována ze 7 dní starých kultur rostoucích na MEA za použití komerčního kitu ZYMO RESEARCH *Quick-DNA*[™] Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Irvine, USA). Izolace probíhala dle pokynů výrobce. Kvalita DNA byla kontrolována na 0,8 % agarosovém gelu s TAE pufrém (Tris-Acetate-EDTA pufr) a na spektrofotometru Nanodrop ND-1000. Extrahovaná DNA byla použita k amplifikaci DNA sekvencí pomocí PCR (z anglického „polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce).

2.4.2 PCR amplifikace

Pro účely následné fylogenetické analýzy byla pomocí PCR amplifikována oblast ITS rDNA (z anglického „internal transcribed spacer“, vnitřní přepisovaný mezerník ribozomální DNA) zahrnující podoblasti ITS1, 5.8S a ITS2. Dále byly amplifikovány geny kódující proteiny - β -tubulin (*TUB2*), translační elongační faktor (*TEF1 α*) a idiomorfy MAT lokusů. Primery použité pro amplifikaci výše jmenovaných genů jsou uvedeny v Tabulce 2. Kvůli neuspokojivým výsledkům při amplifikaci cílových genů u některých druhů byla řada primerů navržena *de novo* dle dostupných sekvencí. Primery DERM-TEF-REV1 ač DERM-TEF-REV4 byly použity pouze pro sekvenaci a ne pro vlastní amplifikaci.

Tabulka 2. Primery použité k amplifikaci a sekvenaci fragmentů studovaných genů.

Označení genu	Forward primer (sekvence 5'–3')	Reverse primer (sekvence 5'–3')	Zdroj
ITS	ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA)	ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)	(Gardes & Bruns 1993, White <i>et al.</i> 1990)
TUB2	Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)	Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)	(Glass & Donaldson 1995)
	T10 (ACGATAGGTTACCTCCAGAC)		(O'Donnell & Cigelnik 1997)
TEF1a	EFdermF (CACATTAACCTGGTCGTTATCG)	EFdermR (CATCCTTGGAGATACCAGC)	(Mirhendi <i>et al.</i> 2015)
		DERM-TEF-REV1 (TTGCCCAACTCTTCRGCTTCC)	(tato práce)
		DERM-TEF-REV2 (GGACTTCTTGCCCAACTCTTC)	(tato práce)
		DERM-TEF-REV3 (ATGGTGATACCACGCTCACGC)	(tato práce)
		DERM-TEF-REV4 (GAACTCCAGAGGGCGATATC)	(tato práce)
MAT1-1-1	TR MAT1 F1 (GAAYRCSAAAYTRAGRCC)	TR MAT1 R1 (TGAGSGARAAITGCTTG)	(tato práce)
	TR MAT1 F2 (TGAACCTCITYATTGCTTYCGA)	TR MAT1 R2 (GCTTGTCTCWTGTCGARAC)	(tato práce)
	TR MAT1 F3 (TCYCARAAAGTCAAGTCTG)	TR MAT1 R2N (TGCTTGTCTCTGTGAAAC)	(tato práce)
	TR MAT1 F3N (TCCAGAAAAGTCAAGTCTG)	TR MAT1 R3 (GYAAACCCATGGYAT)	(tato práce)
	TR MAT1 F4 (TCTGATCCYTTCAAAGCRAAATG)	TR MAT1 R3N (TGCAAACCCATGGCAT)	(tato práce)
		TR MAT1 R4 (CAGANACAATTCCAATGA)	(tato práce)
MAT1-2-1	TR MAT2 F1 (TCTGGRACCATGYCGATRCCAGC)	TR MAT2 R1 (GGAGTYGGCATGATKCGATAGACT)	(tato práce)
	TR MAT2 F1N (TCTGGGACCATGTCGATGCCAGC)	TR MAT2 R2 (ACGCTRTCCTCRAAYGC)	(tato práce)
	TR MAT2 F2 (CAGCITCWGGRTCGGTWGAG)	TR MAT2 R3 (TTMAGTAAYTTYCTGTC)	(tato práce)
	TR MAT2 F2N (CAGCTCAGGATCAGTAGAA)	TR MAT1 R3N (TTCAGTAACTTCCTGTC)	(tato práce)
	TR MAT2 F3 (GCAGAAGACNAACAAYGAGAT)	TR MAT2 R4 (TCTGATGACTTCGATGCT)	(tato práce)
	TR MAT2 F3N (GCAGAAGACGAACAAYGAGAT)		(tato práce)
	TR MAT2 F4 (TGATATTCGCTCTATTGTCGGAGGA)		(tato práce)
	TR MAT2 F5 (AGCATCGAAGTCATCAAGA)		(tato práce)

PCR reakční směs byla připravena v objemu 20 μ l o následujícím složení:

deionizovaná H ₂ O	14,2 μ l
pufř (MyTaq Bioline 5 \times obsahující nukleotidy a MgCl ₂)	4 μ l
primery (25 pmol/ μ l)	forward i reverse 0,3 μ l
MyTaq HS Red DNA polymeráza (Bioline, London, UK)	0,2 μ l
genomická DNA	1 μ l

Pro všechny PCR reakce byl použit následující amplifikační cyklus:

95 °C/60 s; 95 °C/20 s, 55–60 °C/30 s, 72 °C/60 s (40 \times); 72 °C/10 min

Vyšší teplota annealingu (58–60 °C) byla použita převážně pro amplifikaci MAT idiomorf. Amplifikace probíhala v cycleru Mastercycler Eppendorf pro v DNA laboratoři katedry botaniky PřF UK.

PCR produkty byly zobrazeny na gelové elektroforéze (1% agarózový gel) s elektroforetickým pufřem TAE a přidávkem 0,5 μ g ethidium bromidu (Top Bio s.r.o., Vestec, ČR) za pomoci transiluminátoru Herolab UVT – 28M a programu Kodak 1D 3.6.

2.4.3 Purifikace PCR produktů

PCR produkty byly purifikovány srážením v acetátu sodném (NaOAc) a ethanolu (EtOH) podle následujícího postupu:

1. K PCR produktu (16–20 μ l) ve stripech/destičce byly přidány 2 μ l 3M NaOAc a 50 μ l 96% EtOH.
2. Směs byla promíchána (Vortex) 1 min při 490 rpm a inkubována 10–15 min při laboratorní teplotě.
3. Směs byla centrifugována (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) 30 min při 3700 rpm a teplotě 21 °C.
4. Supernatant byl slit a otočené stripy/destičky stočeny v centrifuze po dobu 1 min při 490 rpm.
5. K precipitátu bylo přidáno 250 μ l 70% EtOH a směs byla dále centrifugována na 10 min při 3700 rpm.
6. Supernatant byl opatrně slit a otočené stripy/destičky byly centrifugovány po dobu 1 min při 490 rpm.
7. Precipitát byl sušen 5 minut při 65°C v termobloku (Thermomixer, Eppendorf).
8. Vzniklá peleta byla rozpuštěna ve 20 μ l deionizované vody.

2.4.4 Sekvence DNA a úprava sekvencí

K sekvenaci PCR fragmentů byly použity oba koncové primery (Tabulka 2) použité pro amplifikaci. Sekvenční analýza byla provedena v centru BIOCEV na kapilárním sekvenátoru MiSeq Illumina. Sekvence byly upravovány v programu BioEdit v7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) (Hall 2005).

2.4.5 Konstrukce fylogenetického stromu

Ze získaných sekvencí byly vytvořeny tři jednogenové stromy a jeden kombinovaný strom sestrojený ze tří jednogenových alignmentů (ITS, *TEF1a*, *TUB2*). Alignmenty sekvencí byly vytvořeny v programu MAFFT v7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato & Standley 2013). Stromy vypočítané z Maximum likelihood analýzy (ML) byly konstruovány v programu IQ-TREE v1.4.0 (Nguyen *et al.* 2015). Optimální rozdělení jednotlivých alignmentů na segmenty a dále nejlepší substituční modely byly zvoleny programem PartitonFinder v1.1.0 (Lanfear *et al.* 2012). Pro každý alignment byl vybrán podle bayesovského informačního kritéria (BIC) vhodný model evoluce. Hodnoty podpor u jednotlivých větví byly získány z 1000 bootstrapových výběrů. Pro výpočet bayesovské posteriorní pravděpodobnosti (pp) byl použit program MrBayes v3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) a optimální rozdělení alignmentů na segmenty a nejlepší substituční modely byly opět zvoleny programem PartitonFinder v1.1.0. Délka řetězce byla 5 000 000 generací, burn-in 25 %.

2.5 Morfologická analýza – studium fenotypu

2.5.1 Makromorfologie

Pro srovnání makromorfologických znaků a rychlostí růstu geofilních druhů *Arthroderma* byla použita média MEA, PDA, OA a SAB. Vybrané kmeny od každého druhu byly naočkovány na Petriho misky (průměr 90 mm) a kultivovány po dobu tří týdnů ve tmě při teplotě 25 °C. Po 7, 14 a 21 dnech byly měřeny rozměry kolonií, po 14 dnech byly misky dokumentovány fotoaparátem Canon EOS 500D a byla stanovena barva kolonií včetně reverzu (Kornerup & Wanscher 1978) a také textura kolonií (Otčenášek & Dvořák 1973).

2.5.2 Mikromorfologie

Mikromorfologická analýza probíhala za použití světelného mikroskopu Olympus BX-51 s digitální kamerou Olympus DP 72. Pro jednotlivé znaky bylo u každého kmenu provedeno nejméně 35 měření. U nepohlavního stádia byly měřeny a sledovány následující struktury: tvar, ornamentace a rozměry mikro- a makrokonidií, větvení konidioforu; u pohlavního stádia: průměr plodnice, rozměry vršek,

askospor, nejširší a nejužší místo buňky peridiální hyfy a její tvar a ornamentace. Pro měření struktur jsem používala program QuickPHOTO MICRO 3.0 (PROMICRA, s.r.o., Praha, ČR). Struktury na nepohlavním stádiu byly měřeny po 14 dnech kultivace při 25 °C na MEA a struktury na pohlavním stádiu u 5–17 týdnů starých kultur s plodnicemi. Preparáty pro focení byly připravovány v kyselině mléčné s přídavkem bavlníkové modři. U každého znaku byla zjišťována minimální a maximální hodnota, průměr a směrodatná odchylka.

Mikrostruktury byly dále pozorovány prostřednictvím skenovací elektronové mikroskopie (SEM) za použití mikroskopu JEOL 6380 LV. Fixaci vzorků pro SEM prováděla RNDr. Alena Kubátová podle následujícího postupu: plodnice s askosporami byly fixovány parami oxidu osmičelého po dobu 7 dnů v 5–10 °C. Dále byly preparáty pozlaceny pomocí přístroje Bal-Tec SCD 050 a tím připraveny k pozorování a fotografování, které jsem prováděla samostatně.

2.6 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl použit program R Studio (Gandrud 2015).

2.7 Stanovení životaschopnosti (viability) a klíčivosti askospor

U askospor byla stanovována jejich životaschopnost (viabilita) a klíčivost. Gymnothecia (20–30 kusů, 5–17 týdnů staré kultury) byla odebírána sterilní jehlou z média na misce a přenesena do zkumavky o objemu 1,5 ml s 0,5 ml pufru Tris-MgCl₂ [200 mM Tris, 4 mM MgCl₂·6H₂O, 0,5 % (v/v) Triton X-100 (pH 7,5)] (Pfosser *et al.* 1995). Pro uvolnění askospor z plodnic byla gymnothecia v pufru rozetřena skleněnou tyčinkou. Směs byla promíchána na vortexu a přefiltrována přes filtr Cell Trics 30 µm (Sysmex Partec GmbH) do nové 1,5 ml zkumavky eppendorf (odstranění větších částic, např. stěn plodnic, filtrací přes filtr s póry 30 µm).

Procento viabilních askospor bylo měřeno na cytometru BD LSR II ve Středisku Cytometrie a Mikroskopie v MBÚ AV ČR za použití softwaru FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, San Jose, CA). Ke každému vzorku byl přidán propidium jodid (2 µg/ml) a poté byly vzorky inkubovány 5 min při pokojové teplotě (Pozn.: Propidium jodid pronikne do mrtvých askospor, díky čemuž lze odlišit neživotaschopné askospory od životaschopných.). Data byla analyzována v programu FlowJo v9.9.4 (Tree Star, Inc., USA).

Askospory byly odděleny od konidií na sorteru Bio Rad S3 Cell Sorter (Pozn.: Askospory vykazují na rozdíl od konidií vyšší míru autofluorescence, čímž lze od sebe tyto dva typy spor odlišit.). Sto askospor bylo sortováno do 1,5 ml zkumavek s 0,2 ml pufru Tris-MgCl₂. Suspenze byla pipetou přenesena na Petriho misku s médiem MEA a rozetřena skleněnou „hokejkou“. Misky byly inkubovány na světle při pokojové teplotě a počet klíčících kolonií pro stanovení procentuální klíčivosti byl zjišťován po 5–7 dnech. Postup byl čtyřikrát opakován pro každý zkoumaný vzorek.

3 VÝSLEDKY

3.1 Molekulární metody a fylogenetická analýza

3.1.1 Sekvence a tvorba alignmentu

Pro fylogenetickou analýzu bylo k dispozici celkem 197 izolátů (Tabulka 3 – viz následující strana). Sekvence ITS se podařilo získat od všech 197 izolátů, sekvence *TEF1 α* byly získány od 189 izolátů a sekvence *TUB2* od 150 izolátů. Z těchto sekvencí byly vytvořeny alignmenty, jejichž délky a počty variabilních pozic jsou uvedeny v Tabulce 4. Podle údajů z Tabulky 4 je zřejmé, že nejvyšší procento variabilních pozic bylo přítomno v genu pro *TUB2* a nejvíce konzervativním lokusem v tomto ohledu je ITS oblast rDNA.

Tabulka 4. Délka alignmentu a počet variabilních a parsimonně informativních pozic u zkoumaných lokusů.

lokus	délka (počet bází)	variabilní pozice	parsimonně informativní pozice
ITS	766	389 (50,8 %)	309 (40,3 %)
<i>TEF1α</i>	762	435 (57,1 %)	322 (42,3 %)
<i>TUB2</i>	503	295 (58,7 %)	256 (51 %)
kombinovaný dataset ITS + <i>TEF1α</i> + <i>TUB2</i>	2031	1119 (55,1 %)	887 (43,7 %)

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 ⁴
<i>Arthroderma amazonicum</i>						
CBS 221.75 = ATCC 28356 = CDC Y-81 = IHEM 3454 = RV 34870	neznámá lokalita, chlupy z hlodavce („spiny rat“) (<i>Echimyidae</i>)	sb. a izol. A. A. Padhye	neidentif. (MT+)	*	*	*
CBS 967.68 = ATCC 18393 ^T	Brazílie, Manaus, chlupy z hlodavce (<i>Oryzomys</i>)	izol. D. Borelli	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma ciferrii</i>						
CBS 272.66 = UAMH 2534 ^T	USA, Arkansas, půda	sb. a izol. L. Ajello	homothalický	AJ877217	HF937403	*
<i>Arthroderma crocatum</i>						
CBS 130.70	Nizozemsko, Oosteljk Flevoland, půda	izol. J. H. van Emden 1969	neidentif.	*	*	*
CCF 5300 = ATCC 66309 = IHEM 5251 = NHL 2986 = UAMH 6331 ^T	Japonsko, Hokkaido, Nakagawa-cho, Nakagawa-gun, půda	izol. H. Kubo 1986	homothalický	*	*	*
CCF 5206 = KVK 101_15	ČR, Brno, muž 37 let, nehty na ruce	sb. a izol. R. Dobiáš 2015	neidentif.	*	*	*
CCF 5207 = KVK 173_15	ČR, Brno, žena 33 let, nehty na nohou	sb. a izol. R. Dobiáš 2015	neidentif.	*	*	*
CLIS 5170_16	ČR, Praha, kožní šupiny a srst kočky	sb. a izol. R. Dobiáš 2016	homothalický	*	*	*
<i>Arthroderma cuniculi</i>						
CBS 492.71 = ATCC 28442 = IHEM 4437 = IMI 096244 ^{MT}	UK, Skotsko, půda a králičí chlupy	sb. a izol. C. O. Dawson	neidentif. (MT-)	*	*	*
CBS 495.71 = ATCC 18444 = IMI 096245 ^{MT}	UK, Skotsko, půda a králičí chlupy	sb. a izol. C. O. Dawson	neidentif. (MT+)	*	*	*
<i>Arthroderma curreyi</i>						
CCF 5965 = CFMR 44736-30-110-I5	USA, Wisconsin, Green County, kůže korálovky sedlaté (<i>Lampropeltis triangulum</i>)	sb. a izol. J. M. Lorch. 2013	neidentif.	*	*	*
CBS 353.66 ^T	UK, půda	izol. A. E. Apinis 1966	homothalický	*	*	*
UAMH 2208	Nový Zéland, půda	neznámé	homothalický	*	*	*
<i>Arthroderma eboreum</i>						
CBS 117155 = DSM 16978 ^T	Německo, kůže člověka	sb. 2004	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma flavescens</i>						
CBS 473.78 = IMI 117341 ^T	Austrálie, Queensland, peří ledňáčka posvátného (<i>Halcyon sancta</i>)	sb. a izol. R. G. Rees 1965	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma gertleri</i>						
UAMH 2620 ^T	Německo, půda	izol. Böhme	neidentif.	*	*	*
UAMH 2818 = CDC X-847	neznámé	izol. Ajello	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 2819 = CBS 665.77 = CDC X-848	neznámé	izol. Ajello	neidentif.	*	*	*
UAMH 2998	Kanada, Alberta, Edmonton, Alberta Game Farm, půda	izol. A. Padhye 1968	neidentif.	*	*	*
UAMH 3424	USA, Kalifornie, Needles, půda	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
<i>Arthroderma glorioae</i>						
CBS 228.79 = UAMH 658 = ATCC 16655	USA, Nové Mexiko, půda	neznámé	neidentif.	*	*	*
CBS 663.77 = ATCC 16658 = UAMH 2821 ^{MT}	USA, Arizona, půda	izol. Ajello	neidentif.	*	*	*
CBS 664.77 = = ATCC 16657 = UAMH 2820 ^{MT}	neznámá lokalita, půda	izol. Ajello	neidentif.	*	*	*
UAMH 3417	USA, Kalifornie, San Diego County, půda	neznámé	neidentif.	*	*	*
UAMH 3418	USA, Kalifornie, San Diego County, půda	neznámé	neidentif.	*	*	*
UAMH 3421	USA, Kalifornie, San Diego County, půda	neznámé	neidentif.	*	—	*
<i>Arthroderma insingulare</i>						
BY 3809	USA, koberec v ložnici	izol. Z. Jurjević 2016	neidentif.	*	*	—
CBS 521.71 = UAMH 3441 = ATCC 22519	Kanada, Alberta, Edmonton, půda	izol. A. Padhye 1971	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CBS 522.71 = UAMH 3442 = ATCC 22520	Kanada, Alberta, Edmonton, půda	izol. A. Padhye 1971	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5417 = D 331_15	ČR, České Budějovice, žena 65 let, nehty na pravé noze	sb. a izol. N. Mallátová 2015	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CCF 5938 = 24230-02 dorsal skin #1 I2	USA, Vermont, Rutland County, kůže chřestýše lesního (<i>Crotalus horridus</i>)	sb. D. Blodgett 2009, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5939 = CFMR 24411-01 skin I2	USA, Massachusetts, Middlesex County, kůže korálovky sedlaté (<i>Lampropeltis triangulum</i>)	sb. J. Marzolf 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5940 = CFMR 24411-01 skin I3	USA, Massachusetts, Middlesex County, kůže korálovky sedlaté (<i>Lampropeltis triangulum</i>)	sb. J. Marzolf 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5941 = CFMR 24825-01 skin I2-DTM	USA, Massachusetts, Norfolk County, kůže chřestýše lesního (<i>Crotalus horridus</i>)	sb. A. Stengle 2014, izol. J. M. Lorch 2014	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CCF 5942 = CFMR 44736-22-snout-I1	USA, New Jersey, Morris County, kůže štíhlovky americké (<i>Coluber constrictor</i>)	sb. K. Michell 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5943 = CFMR 44797-157-I1-DTM	USA, Alabama, Conecuh County, kůže na křídlech hibernujícího netopýra (<i>Myotis austroriparius</i>)	sb. N. Sharp 2015, izol. J. M. Lorch 2015	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CCF 5944 = CFMR 45692-17-shed-I1-DTM	UK, Essex, Epping Forest, kůže užovky obojkové (<i>Natrix natrix</i>)	sb. L. Franklinoš 2014, izol. J. M. Lorch 2016	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
SK 1555_16	ČR, Praha, žena 53 let, nehty na noze	sb. a izol. M. Skořepová 2016	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 754	Kanada, Alberta, Edmonton, koňská pastvina	izol. J. W. Carmichael 1959	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 2922	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1962	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	—
UAMH 2923	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1962	neidentif.	*	—	*
UAMH 2925	USA, Kalifornie, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 3438 ^{MT}	Kanada, Alberta, Edmonton, Alberta Game Farm, půda	izol. A. Padhye 1968	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	—
UAMH 3439	Kanada, Alberta, Edmonton, Alberta Game Farm, půda	izol. A. Padhye 1968	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
UAMH 3440 ^{MT}	Kanada, Alberta, Fort Macleod, slepičí peří	izol. A. Padhye 1969	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma lenticulare</i>						
CBS 307.65 = ATCC 18445 = IHEM 3717 ^{MT}	USA, Kalifornie, Los Angeles County, půda z nory hlodavců	sb. a izol. R. S. Pore	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CBS 308.65 = ATCC 18446 = IHEM 3703 ^{MT}	USA, Kalifornie, Los Angeles County, půda z nory hlodavců	sb. a izol. R. S. Pore	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 2900 = CDC X-756	neznámé	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 2931 = IMI 113772 ^{MT}	neznámé	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 2932 = ATCC 18445 = IHEM 3717 = IMI 113773 ^{MT}	neznámé	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma melis</i>						
CBS 669.80 = CCM F-514 ^T	ČR, Morava, nora jezevce (<i>Meles meles</i>)	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	HF937404	*
<i>Arthroderma multifidum</i>						
CBS 419.71 = ATCC 18440 = IHEM 4432 = IMI 094205 = RV 20033 ^{MT}	UK, půda a chlupy z králičí nory	izol. C. O. Dawson	neidentif. (MT+)	*	KT155559.1	*
CBS 420.71 = ATCC 18441 = IMI 094206 ^{MT}	Velká Británie, půda a chlupy z králičí nory	izol. C. O. Dawson	neidentif. (MT-)	*	*	*
AK 108_14	ČR, Český Kras, podzemní chodba u Velké Ameriky, jeskynní sediment	sb. a izol. A. Kubátová 2014	neidentif.	*	*	—
<i>Arthroderma onychocola</i>						
CBS 132920 = CCF 4259 = SK 3941_11 ^T	ČR, Jičín, muž 33 let, nehty na nohou	M. Skořepová 2011	<i>MAT1-1-1</i>	HF937405	HF937401	*
CCF 4802	Dánsko, Kodaň, muž 56 let, nehet na levém palci u nohy	sb. a izol. 2013	<i>MAT1-2-1</i> LN624597, LN713932	*	LN589971	*
CCF 5208 = D 412_15	ČR, České Budějovice, žena 70 let, kůže na bérce pravé nohy	sb. a izol. N. Mallátová 2015	neidentif.	*	—	*
CCF 5927 = MYK-I9_1 = PL 9_17	ČR, Havířov, žena 52 let (onkologická pacientka), nehet na prostředníčku pravé ruky	sb. a izol. P. Lysková 2017	neidentif.	*	*	*
CCF 5945 = CFMR 24230-03 snout I2	USA, Vermont, Rutland County, kůže hada (<i>Pantherophis alleghaniensis</i>)	sb. D. Blodgett 2011, izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
D 233_16	ČR, České Budějovice, žena 71 let, kůže na obou bérkách	sb. a izol. N. Mallátová 2016	neidentif.	*	*	*
D 578_15	ČR, Tábor, žena 29 let, nehty na noze	sb. a izol. N. Mallátová 2015	neidentif.	*	*	*
UAMH 824	Nový Zéland, chlupy z ježka (<i>Erinacues</i> sp.)	izol. M. J. Marples 1960	neidentif.	*	—	*
<i>Arthroderma phaseoliforme</i>						
CBS 364.66 ^T	Venezuela, kožešina z hlodavce (<i>Proechimys guyanensis</i>)	sb. a izol. D. Borelli	neidentif.	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
<i>Arthroderma quadrifidum</i>						
CCF = 5198 = AN-TRICH 5198	Španělsko, Castanar de Ibor Cave, jeskynní sediment	sb. a izol. 2009	MAT1-2-1	*	*	*
CBS 117.61	neznámé	sb. a izol. 1961	MAT1-2-1	*	*	*
CBS 118.61	neznámé	sb. a izol. 1961	MAT1-1-1	*	*	*
CBS 138.26 = ATCC 13550 = IFO 31699	Švýcarsko, neznámý substrát	neznámé	MAT1-1-1	*	*	*
CBS 613.74 = UAMH 11336	Kanada, New Brunswick, Underground Lake Cave, kůže netopýra (<i>Myotis septentrionalis</i>)	izol. K. J. Vanderwolf 2010	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 4743 = KVK 2023_11	ČR, Frýdek-Místek, muž 76 let, nehty na ruce	sb. a izol. S. Dobiášová 2011	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 4826 = DMF 3040_13	ČR, Ostrava, žena 44 let, nehty obou nohou	sb. a izol. S. Dobiášová 2013	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5079 = KVK 3575_11	ČR, Frýdek-Místek, muž 51 let, kůže na dlani, Dobiášová	sb. a izol. S. Dobiášová 2011	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 5080 = DMF 1472_13	ČR, Karviná, žena 71 let, nehty na noze	sb. a izol. S. Dobiášová 2013	neidentif.	*	*	*
CCF 5431 = D 342_13	ČR, Prachatice, žena 62 let, nehty na noze	sb. a izol. N. Mallátová 2013	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 5776 = D 51_16	ČR, České Budějovice, žena 40 let, nehty na ruce	sb. a izol. N. Mallátová 2016	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5777 = D 294_14	ČR, České Budějovice, žena 70 let, nehet na malíčku na ruce	sb. a izol. N. Mallátová 2014	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5792 = D 326_16	ČR, Tábor, žena 56 let, kůže na plosce nohy	N. Mallátová 2016	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 5932 = CLIS 5933_16	ČR, Orlová, žena 63 let, palec na levé noze	sb. a izol. R. Dobiáš 2016	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 5946 = CFMR 46654-01 19VA06	USA, Virginie, Bath County, jeskynní sediment	sb. W. Orndorff 2009, izol. J. M. Lorch	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5947 = CFMR 46654-01 19VA09	USA, Virginie, Bath County, jeskynní sediment	sb. W. Orndorff 2009, izol. J. M. Lorch	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5948 = CFMR 46655-01 20KY07	USA, Kentucky, Wayne County, jeskynní sediment	sb. 2009, izol. J. M. Lorch	MAT1-2-1	*	*	*
CCF 5949 = CFMR 24834-02 skin II-DTM	USA, Minnesota, Fillmore County, kůže plaza (<i>Crotalus horridus</i>)	sb. J. Edwards 2014, izol. J. M. Lorch 2014	MAT1-1-1	*	*	*
CCF 5950 = CFMR 44797-062-II-LNA	USA, Missouri, Shannon County, kůže na křídle hibernujícího netopýra (<i>Myotis sodalis</i>)	sb. J. Colatskie 2015, izol. J. M. Lorch 2015	MAT1-1-1	*	*	*
CLIS 2233_15	ČR, Partutovice, žena 35 let, kůže na předloktí	sb. a izol. S. Dobiášová 2013	MAT1-2-1	*	*	*
D 345_14	ČR, České Budějovice, dívka 6 let, kůže na obličejí a krku	sb. a izol. N. Mallátová 2014	MAT1-1-1	*	*	*
D 388_11	ČR, České Budějovice, žena 67 let, nehet na palci poraněný při práci na zahradě	sb. a izol. N. Mallátová 2011	MAT1-1-1	*	*	*
IDE 13_1531 = DERM 10	ČR, Krnov, žena 57 let (revmatická artritida), kůže na bérce	sb. a izol. P. Hamal 2013	MAT1-2-1	*	*	*
KVK 2380_11	ČR, Frýdek-Místek, žena 19 let, kůže v levé podpažní jamce	sb. a izol. S. Dobiášová 2011	MAT1-2-1	*	*	*
SK 646_14	ČR, Jinončany, žena 48 let, kůže na plosce nohy	sb. a izol. M. Skořepová 2014	MAT1-1-1	*	*	*
SK 1539_15	ČR, Zdíby, žena 60 let, kůže v tříslech	sb. a izol. M. Skořepová 2015	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 458	Kanada, Alberta, Edmonton, kůže na pravé ruce	izol. J. W. Carmichael 1956	MAT1-1-1	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
UAMH 544	Kanada, Alberta, Edmonton, půda ve výběhu pro ovce	izol. J. W. Carmichael 1956	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 546	Kanada, Alberta, Edmonton, půda ve výběhu pro prasata (<i>Sus scrofa domestica</i>)	izol. J. W. Carmichael 1956	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 755	Kanada, Alberta, Edmonton, půda ve výběhu pro prasata (<i>Sus scrofa domestica</i>)	izol. J. W. Carmichael 1959	MAT1-2-1	*	*	*
UAMH 763	Kanada, Alberta, Edmonton, půda poblíž kurníku	izol. J. W. Carmichael 1959	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 790	Kanada, Alberta, Edmonton, kůže na noze	izol. J. W. Carmichael 1960	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 794	Kanada, Alberta, Edmonton, seškraby z nehtů na noze	izol. A. Padhye 1960	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 864	Maďarsko, půda	neznámé	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 1049	USA, Kalifornie, Riverside County, zásaditá půda	izol. Orr	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 1328	Kanada, Alberta, Edmonton, Alberta Game Farm, písčité půda ve výběhu pro koně	izol. J. W. Carmichael 1962	MAT1-1-1	*	*	*
UAMH 1491	Kanada, Alberta, Edmonton, půda pod hnízdem vrabce polního (<i>Passer montanus</i>)	izol. J. W. Carmichael 1962	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 1687	Kanada, Alberta, Edmonton, půda v květinovém záhonu	izol. J. W. Carmichael 1963	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 1688	Kanada, Alberta, Edmonton, půda v květinovém záhonu	izol. J. W. Carmichael 1963	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 1848	Maďarsko, půda	neznámé	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 1863	USA, Utah, Tooele County, Dugway, půda	neznámé	MAT1-2-1	*	*	*
UAMH 1914	neznámá lokalita, sputum člověka	neznámé	MAT1-1-1	*	*	*
UAMH 1915	Kanada, Alberta, Edmonton, kůže na ruce	izol. J. W. Carmichael 1964	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 2125	Kanada, Alberta, Edmonton, žena 16 let, kůže na noze	izol. J. W. Carmichael 1964	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 2496	Kanada, Alberta, Edmonton, kožní šupiny z ramenou	izol. J. W. Carmichael 1965	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 2514	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1964	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 2517	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1964	MAT1-1-1	*	*	*
UAMH 2527	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1964	MAT1-1-1	*	*	*
UAMH 2562	Austrálie, Queensland, <i>Rattus assimilis</i>	1964	MAT1-2-1	*	—	*
UAMH 2703	Kanada, Alberta, Edmonton, chlupy a kožní šupiny kočky (<i>Felis silvestris f. catus</i>)	izol. J. W. Carmichael	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 2843	Kanada, Alberta, Edmonton, chlupy na přední tlapce kočky (<i>Felis silvestris f. catus</i>)	izol. J. W. Carmichael 1967	MAT1-1-1	*	—	*
UAMH 2858	Maďarsko, půda	izol. Szathmary 1967	MAT1-1-1	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
UAMH 2920	USA, Kalifornie, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 2941 = ATCC 22954 = IMI 84307 = UAMH 3183 ^{MT}	neznámé (monosporický izolát)	izol. Dawson & Gentles 1961	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 2942 = ATCC 22955 = IMI 84308 = UAMH 3184 = UAMH 3187 ^{MT}	neznámé (monosporický izolát)	izol. Dawson & Gentles 1961	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 3065 = ATCC 26339	USA, Illinois, Farina, slepičí peří (<i>Gallus gallus f. domestica</i>)	izol. R. K. Benjamin 1950	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 3449	Nizozemsko, Flevoland, půda z polderu (vodní nádrž)	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 3455	Guatemala, lidské vlasy	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 3456	neznámá lokalita, lidské vlasy (bez známek onemocnění)	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 3458	neznámá lokalita, lidské vlasy (bez známek onemocnění)	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 3459	USA, Kalifornie, sputum člověka	neznámé	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 3564	Súdán, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 6435	Kanada, Alberta, kůže krávy (<i>Bos taurus</i>)	izol. K. Manninen 1989	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma redellii</i>						
CBS 134550 = CCF 5974 = CFMR 44738-01 = 44738-01-I1-SD	USA, Wisconsin, Grant County, kůže na křídle hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. M. L. Verant 2012, izol. J. M. Lorch 2012	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CBS 134551 ^T	USA, Wisconsin, Grant Co., Atkinson Mine, křídla hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. M. L. Verant 2012, izol. J. M. Lorch	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CBS 134554 = CCF 5975 = CFMR 44738-08 = 44738-08-I1-SD	USA, Wisconsin, Pierce County, kůže na křídle hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. M. L. Verant 2012, izol. J. M. Lorch 2012	neidentif.	*	*	—
CCF 5976 = CFMR 24245-01-I1-SD	USA, Wisconsin, Lafayette County, kůže na křídlech hibernujícího netopýra (<i>Perimyotis subflavus</i>)	sb. J. P. White 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5977 = CFMR 24300-01-I1-SD	USA, Wisconsin, Richland County, kůže na křídle hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. J. P. White 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CCF 5978 = CFMR 44738-13-I1-SD	USA, Wisconsin, Iowa County, kůže na křídle hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. J. P. White 2013, izol. J. M. Lorch 2013	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma silverae</i>						
CBS 141576 = UAMH 6517 ^T	Norsko - Špicberky, ostrov Svalbard, oblast Glundnest, Ny-Ålesund, trus polární lišky (<i>Alopex lagopus</i>)	izol. R. Currah 1988	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma thuringiense</i>						
CBS 417.71 = ATCC 22648 = IMI 134993 = NCPF 492A = UAMH 3431 ^T	bývalé Československo, chlupy z hlodavce	izol. Otčenášek 1967	<i>MAT1-2-1</i> LN624596, LN713931	*	HF937402	—

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
<i>Arthroderma tuberculatum</i>						
CBS 473.77 = ATCC 26700 = UAMH 873 ^T	USA, Illinois, Urbana, peří drozda (<i>Turdus americanis</i>)	izol. H. H. Kühn 1954	neidentif. (MT+)	*	*	*
UAMH 2831	Indie, Puné, půda	izol. A. Padhye 1967	neidentif.	*	—	*
<i>Arthroderma uncinatum</i>						
CBS 128.75 = ATCC 28687 = IMI 156619 = NCPF 472 = UAMH 3955	Polsko, Štětín, půda na dvorku s prasaty (<i>Sus scrofa domestica</i>)	izol. 1973	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
CBS 180.64 = UAMH 3389	bývalé Československo, půda	izol. M. Hejtmánek 1964	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
CBS 315.65 ^{MT}	USA, Kalifornie, Kern Country, půda	sb. a izol. O. A. Plunkett 1962	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
CBS 316.65 ^{MT}	USA, Kalifornie, Kern Country, půda	sb. a izol. O. A. Plunkett 1962	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
CBS 101515 = NCPF 216	Belgie, neznámý substrát	izol. R. Vanbreuseghem	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 519	Kanada, Alberta, Edmonton, půda ve výběhu s prasaty (<i>Sus scrofa domestica</i>)	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 520	Kanada, Alberta, Edmonton, půda na pastvině ovcí (<i>Ovis</i> sp.)	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 536	Kanada, Alberta, Edmonton, půda na dvorku s drůbeží	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 547	Kanada, Alberta, Edmonton, půda u prasečího chlívků	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 556	Kanada, Alberta, Edmonton, půda na poli	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 557	Kanada, Alberta, Edmonton, půda	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 735	Kanada, Alberta, Edmonton, zahradní půda	izol. J. W. Carmichael 1959	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 736	Kanada, Alberta, Edmonton, zahradní půda	izol. J. W. Carmichael 1959	<i>MAT1-1-1</i>	*	—	*
UAMH 745	Kanada, Alberta, Edmonton, ovčí vlna	izol. J. W. Carmichael 1959	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 1315	Kanada, Alberta, Edmonton, Alberta Game Farm, písčité půdy v ohradě pro koně	izol. J. W. Carmichael 1962	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UMAH 2711	Kanada, Alberta, Edmonton, půda pod smrkem (<i>Picea</i> sp.)	izol. J. W. Carmichael 1967	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 2759	Kanada, Alberta, Edmonton, zahradní půda	izol. J. W. Carmichael 1967	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 3271 = UAMH 2929 = UAMH 3185 = UKNCC 71194 = IMI 084305	UK, půda (monoaskosporický izolát)	izol. Dawson & Gentles 1961	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 3272 = UAMH 2930 = UAMH 3186 = IMI 84306	UK, půda (monoaskosporický izolát)	izol. Dawson & Gentles 1961	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 3394	neznámé	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 5157	USA, Michigan (monaskosporický izolát), neznámý substrát	izol. C. D. Jeffries 1985	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
UAMH 5161	USA, Michigan (monaskosporický izolát), neznámý substrát	izol. C. D. Jeffries 1985	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 6480 = ATCC 58594	neznámé	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 9278	Kanada, Alberta, Edmonton, žena 60 let, nehty na nohou	izol. C. Sand 1998	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma vespertilii</i>						
CBS 355.93 = FMR 3752 = IMI 357403 = RV 27093 ^T	Belgie, Louvain, zaživací trakt netopýra (<i>Microchiroptera</i>)	sb. C. de Vroey 1971	neidentif.	AJ007846	*	*
<i>Chrysosporium magnasporum</i>						
CBS 132551 = FMR 11770 ^T	Antarktida, Ostrov krále Jiřího; Potterova zátoka, Jubánská argentinská vědecká stanice, pelety chalupy velké (<i>Catharacta skua</i>)	sb. W. P. Mac Cormack 1996, izol. A. M. Stchigel	neidentif.	*	*	*
<i>Chrysosporium oceanitesii</i>						
CBS 132552 = FMR 11771 ^T	Antarktida, Ostrov krále Jiřího, Three Brothers Hill, mrtvé mládě buňňáčka Wilsonova (<i>Oceanites oceanicus</i>)	sb. A. Archuvi 2011, izol. A. M. Stchigel	neidentif.	*	*	*
<i>Trichophyton terrestre</i>						
CBS 132929 = CBS 124118 = DSM 25999 = GE 204847_07	Německo, muž 58 let, nehet na palci pravé nohy	sb. a izol. Nenoff 2014	neidentif.	*	*	*
UAMH 657	Austrálie, New South Wales, půda	izol. Durie 1959	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
UAMH 662	Austrálie, New South Wales, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
<i>Arthroderma</i> sp. 1						
UAMH 565	Kanada, Alberta, Edmonton, zorané pole	izol. J. W. Carmichael 1956	<i>MAT1-1-1</i>	*	*	*
UAMH 566	Kanada, Alberta, Edmonton, zorané pole	izol. J. W. Carmichael 1956	neidentif.	*	*	*
UAMH 567	Kanada, Alberta, Edmonton, půda ve výběhu pro drůbež	izol. J. W. Carmichael 1956	neidentif.	*	*	*
UAMH 629	Kanada, Alberta, Edmonton, půda na zahradě	izol. J. W. Carmichael 1959	neidentif.	*	*	*
UAMH 734	Kanada, Alberta, Edmonton, půda na zahradě	izol. J. W. Carmichael 1959	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma</i> sp. 2						
CCF 5955 = CFMR 26379-01-skin3-II-DTM	USA, New Hampshire, Hillsborough County, kůže štíhlovky americké (<i>Coluber constrictor</i>)	sb. B. Clifford 2015, izol. J. M. Lorch 2015	neidentif.	*	*	*
CCF 5956 = CFMR 26379-01-skin3-II-SD	USA, New Hampshire, Hillsborough County, kůže štíhlovky americké (<i>Coluber constrictor</i>)	sb. B. Clifford 2015, izol. J. M. Lorch 2015	neidentif.	*	*	*
CCF 5957 = CFMR 26417-01-biop-II-DTM	USA, Wisconsin, Sauk County, kůže chřestýše lesního (<i>Crotalus horridus</i>)	sb. J. Kapfer 2015, izol. J. M. Lorch 2015	neidentif.	*	*	*
CCF 5958 = CFMR 44736-44 scale II	USA, Minnesota, Sherburne County, kůže heterodona nosatého (<i>Heterodon nasicus</i>)	izol. C. Smith 2013, izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma</i> sp. 3						
CCF 5953 = CFMR 44736-26-102-II	USA, Wisconsin, Green County, kůže hada (<i>Thamnophis radix</i>)	sb. a izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 α ⁴
CCF 5954 = CFMR 44736-26-103-I3	USA, Wisconsin, Green County, kůže hada (<i>Thamnophis radix</i>)	sb. a izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 4						
07MA15	USA, Massachusetts, jeskynní sediment	neznámé	neidentif.	*	—	—
Arthroderma sp. 5						
CCF 5888 = CBS 143633 = MS246-T	Indie, Maharashtra, Ratnagiri, Chiplun, půda blízko holičství	sb. R. Sharma 2015, izol. 2016	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 6						
CCF 5987 = CFMR 45707-81-shed1-I1-DTM	ČR, jižní Morava, kůže užovky podplamaté (<i>Natrix tessellata</i>)	sb. V. Balaz 2016, izol. J. M. Lorch 2016	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 7						
SILKE5 = CCF 5865	Německo, Herxheim, muž 80 let, kožní šupiny z levé nohy (tinea cruris)	sb. a izol. T. Stern 2016	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 8						
CCF 5998 = CFMR 46373-1380-C2-DPYA	USA, Arkansas, Newton County, kůže na křídlech netopýra (<i>Myotis leibii</i>)	sb. B. Sasse 2017, izol. K. J. Vanderwolf 2017	neidentif.	*	*	*
CCF 5966 = CFMR 44736-43 chin I1-DTM	USA, Minnesota, Sherburne County, kůže užovky (<i>Pituophis catenifer</i>)	sb. C. Smith 2012, izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
UAMH 663	půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
Arthroderma sp. 9						
UAMH 851	USA, Kalifornie, San Joaquin Valley, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	—	*
UAMH 852	USA, Kalifornie, San Joaquin Valley, půda	neznámé	<i>MAT1-2-1</i>	*	*	*
Arthroderma sp. 10						
CCF 5959 = CFMR 44736-13-C4-I1	USA, Massachusetts, kůže chřestýše lesního (<i>Crotalus horridus</i>)	sb. J. Condon, izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 11						
CCF 5952 = CFMR 44797-079-I1-DTM	USA, Wisconsin, Iowa County, kůže na křídlech hibernujícího netopýra hnědého (<i>Eptesicus fuscus</i>)	sb. J. P. White 2015, izol. J. M. Lorch 2015	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 12						
CCF 5961 = CFMR 24729-17-I2-DTM	USA, Západní Virginie, Pendleton County, kůže hibernujícího netopýra hnědého (<i>Eptesicus fuscus</i>)	sb. C. Stihler 2014, izol. J. M. Lorch 2014	neidentif.	*	*	*
Arthroderma sp. 13						
AK 267_13	ČR, západní Čechy, Výškovice, jeskynní sediment	sb. a izol. A. Kubátová 2013	neidentif.	*	*	*
CCF 5960 = CFMR 44738-22-I2-SD	USA, Wisconsin, Grant County, kůže na křídlech hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. J. P. White 2013, izol. J. M. Lorch 2014	neidentif.	*	*	—

Tabulka 3. Seznam kmenů zahrnutých ve fylogenetické analýze a data o jejich původu.

Druh / sbírkový kód izolátu ^{1,2}	Lokalita, substrát	Sběr / izolace	MAT lokus ³	ITS ⁴	TUB2 ⁴	TEF1 ⁴
<i>Arthroderma</i> sp. 14						
AK 111_14	ČR, Český Kras, podzemní chodba u Velké Ameriky, jeskynní sediment	sb. a izol. A. Kubátová 2014	neidentif.	*	*	*
CCF 5951 = CFMR 44738-22-II/13-SD	USA, Wisconsin, kůže na křídlech hibernujícího netopýra (<i>Myotis lucifugus</i>)	sb. J. P. White 2013, izol. J. M. Lorch 2013	neidentif.	*	*	*
<i>Arthroderma</i> sp. 15						
CCF 5996 = CFMR 46372-1303-C1-SD	USA, Oklahoma, kůže na křídlech netopýra (<i>Perimyotis subflavus</i>)	sb. C. Hoose 2017, izol. K. J. Vanderwolf 2017	neidentif.	*	—	*
<i>Ctenomyces serratus</i> (outgroup)						
CBS 187.61 = ATCC 15504 = IMI 086199 = NRRL A-11176 ^T	Austrálie, půda	neznámé	neidentif.	*	*	*
<i>Onygenales</i> sp. (outgroup)						
CCF 5750 = L 1447_16	ČR, Liberec, žena 68 let, nehet palce pravé nohy	sb. a izol. J. Doležalová 2016	neidentif.	*	*	*
<i>Pectinotrichum llanense</i> (outgroup)						
CBS 882.71 = ATCC 18921 = IHEM 4440 = IMI 155643 = RV 22834 ^T	Venezuela, půda	sb. a izol. G. F. Orr	neidentif.	*	*	*

¹ Sbírkové kódy: ATCC = American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA; CBS = CBS-KNAW, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherland; CCF = Sběrka kultur hub katedry botaniky, PřF UK, Praha, ČR; CCM = Česká sbírka mikroorganismů, Masarykova Univerzita, Brno, ČR; CDC = Centers for Disease Control and Prevention, Georgia, USA; CFMR = Center for Forest Mycology Research, Medison, Wisconsin, USA; DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; FMR = Faculty of Medicine, University Rovira i Virgili, Reus, Spain; IFO = Institute for Fermentation Culture Collection, Osaka, Japan; IHEM = Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/IHEM), Brussels, Belgium; IMI = Culture Collection of CABI Europe-UK, Egham, UK; NCPF = National Collection of Pathogenic Fungi, Salisbury, UK; NHL = National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan; NRRL = Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, Illinois, USA; UAMH = Centre for Global Microfungal Biodiversity, University of Toronto, Canada; UKNCC = United Kingdom National Culture Collection. Ostatní kódy (07MA15, AK, AN, CLIS, D, DMF, DERM, GE, IDE, KVK, L, MYK, PL, RV, SILKE) jsou unikátními kódy izolátora a označují originální čísla izolátů, pod kterými nejsou izoláty uloženy v žádné veřejné sbírce.

² Písmeno T v hodním indexu u izolátů značí ex-typový izolát a písmena MT v horním indexu tzv. „mating-type“ izoláty, tedy opačně pohlavně laděné izoláty, které jsou oba obsaženy v holotypu (jejich křížení dalo vzniknout pohlavnímu stádiu, položka byla autorem usušena a uložena do herbáře; pro daný druh tedy existují hned dva kmeny, které se dají označit jako ex-typové).

³ Párovací typy (MT- a MT+) pro *A. amazonicum* uvádějí Moraes *et al.* (1975), pro *A. cuniculi* a *A. multifidum* Dawson (1963) a *A. tuberculatum* Sekhon *et al.* (1973)

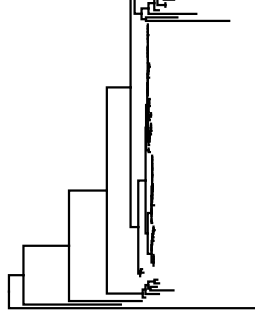
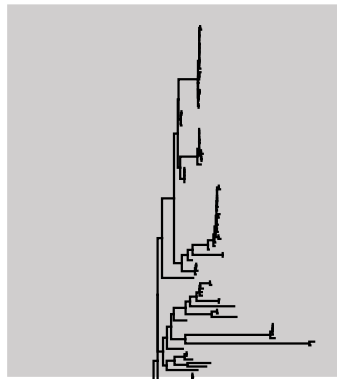
⁴ Sekvence získané v této práci jsou označeny hvězdičkou * a sekvence, které se nepodařilo amplifikovat, značí dlouhá pomlčka —. Sekvence získané z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) jsou označeny příslušným přístupovým číslem.

3.1.2 Konstrukce fylogenetických stromů

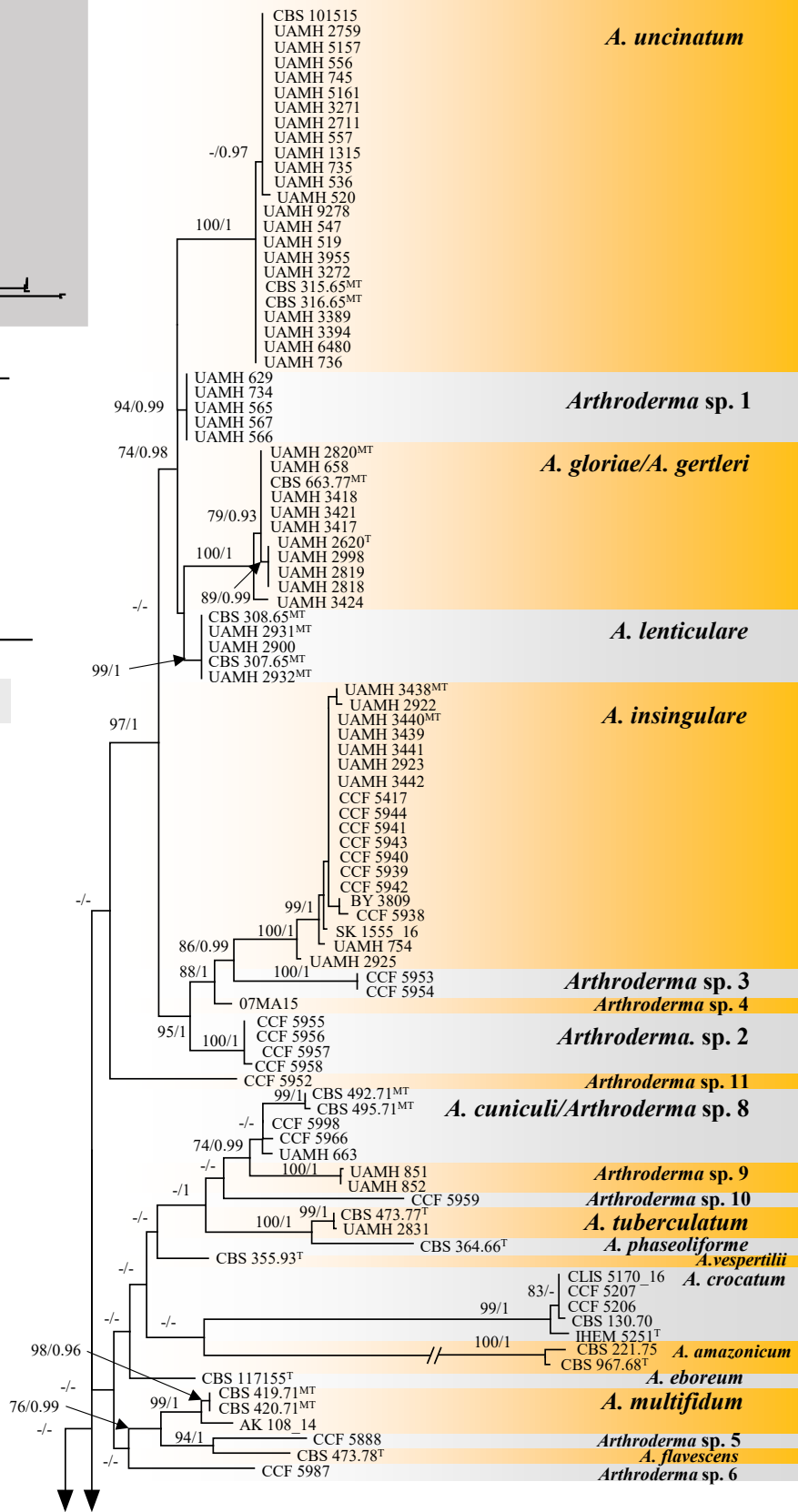
Kromě nově získaných kmenů byly do fylogenetické analýzy zahrnuty všechny ex-typové kmeny dosud známých druhů *Arthroderma*. Pomocí metody ML a Bayesovské analýzy byly vytvořeny tři jednolokusové a jeden kombinovaný fylogenetický strom (Obrázky 6–9). V Tabulce 5 jsou uvedena rozdělení jednotlivých alignmentů na segmenty (partitions) a nejlepší substituční modely pro každý segment, jak byly navrženy programem PartitionFinder v1.1.0.

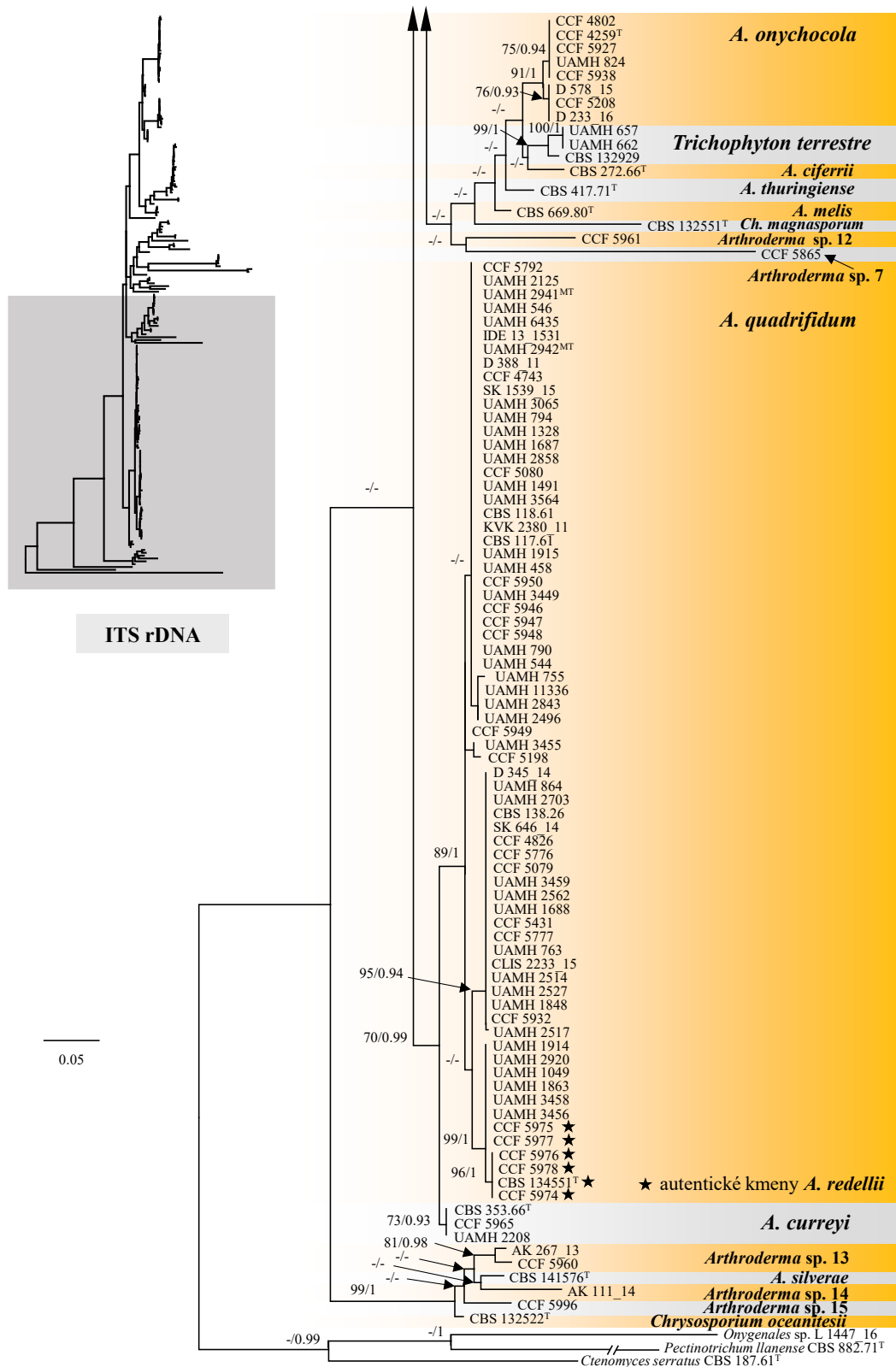
Tabulka 5. Rozdělení alignmentů na jednotlivé segmenty (partitions).

Lokus	Fylogenetická metoda	Segmenty (substituční model)
ITS	Maximum likelihood	ITS1 + ITS2 (GTR+G) 5.8S (K80+I+G)
	Bayesovská analýza	ITS1 + ITS2 (GTR+G) 5.8S (K80+I+G)
TEF1 α	Maximum likelihood	1. + 2. pozice kodonů <i>TEF</i> (SYM+I+G) 3. pozice kodonů <i>TEF</i> (SYM+G) <i>TEF</i> introny (GTR+G)
	Bayesovská analýza	1. + 2. pozice kodonů <i>TEF</i> (SYM+I+G) 3. pozice kodonů <i>TEF</i> (SYM+G) <i>TEF</i> introny (GTR+G)
TUB2	Maximum likelihood	<i>TUB2</i> introny (K80+I+G) 3. pozice kodonů <i>TUB2</i> (TVM+I+G) 1. + 2. pozice kodonů <i>TUB2</i> (JC+I)
	Bayesovská analýza	<i>TUB2</i> introny (K80+I+G) 3. pozice kodonů <i>TUB2</i> (HKY+I+G) 1. + 2. pozice kodonů <i>TUB2</i> (JC+I)
ITS + TUB2 + TEF1 α	Maximum likelihood	<i>TEF</i> + <i>TUB2</i> introny (HKY+I+G) 3. pozice kodonů <i>TUB2</i> (HKY+I+G) 1. + 2. pozice kodonů <i>TUB2</i> (JC+I) 1. + 2. pozice kodonů <i>TEF</i> (TrNef+I) 3. pozice kodonů <i>TEF</i> (HKY+G) ITS1 + ITS2 (GTR+G) 5.8S (K80+I+G)
	Bayesovská analýza	<i>TEF</i> + <i>TUB2</i> introny (HKY+I+G) 3. pozice kodonů <i>TUB2</i> (HKY+I+G) 1. + 2. pozice kodonů <i>TUB2</i> (JC+I) 1. + 2. pozice kodonů <i>TEF</i> (SYM+I) 3. pozice kodonů <i>TEF</i> (HKY+G) ITS1 + ITS2 (GTR+G)

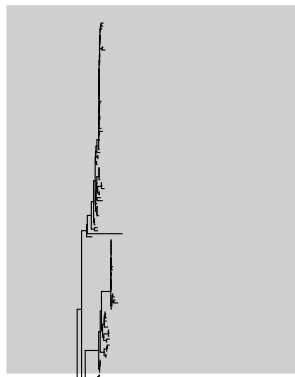


ITS rDNA

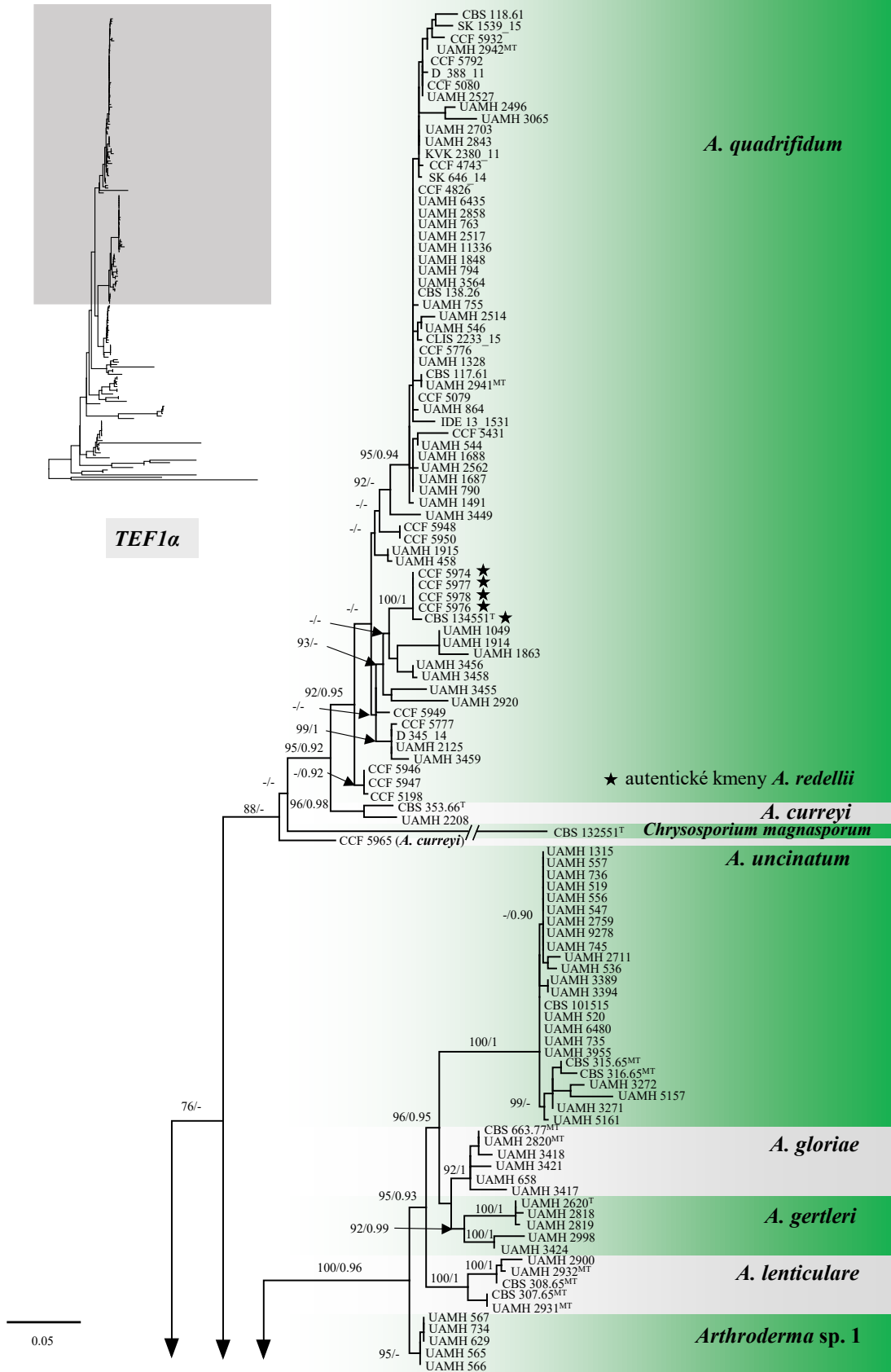


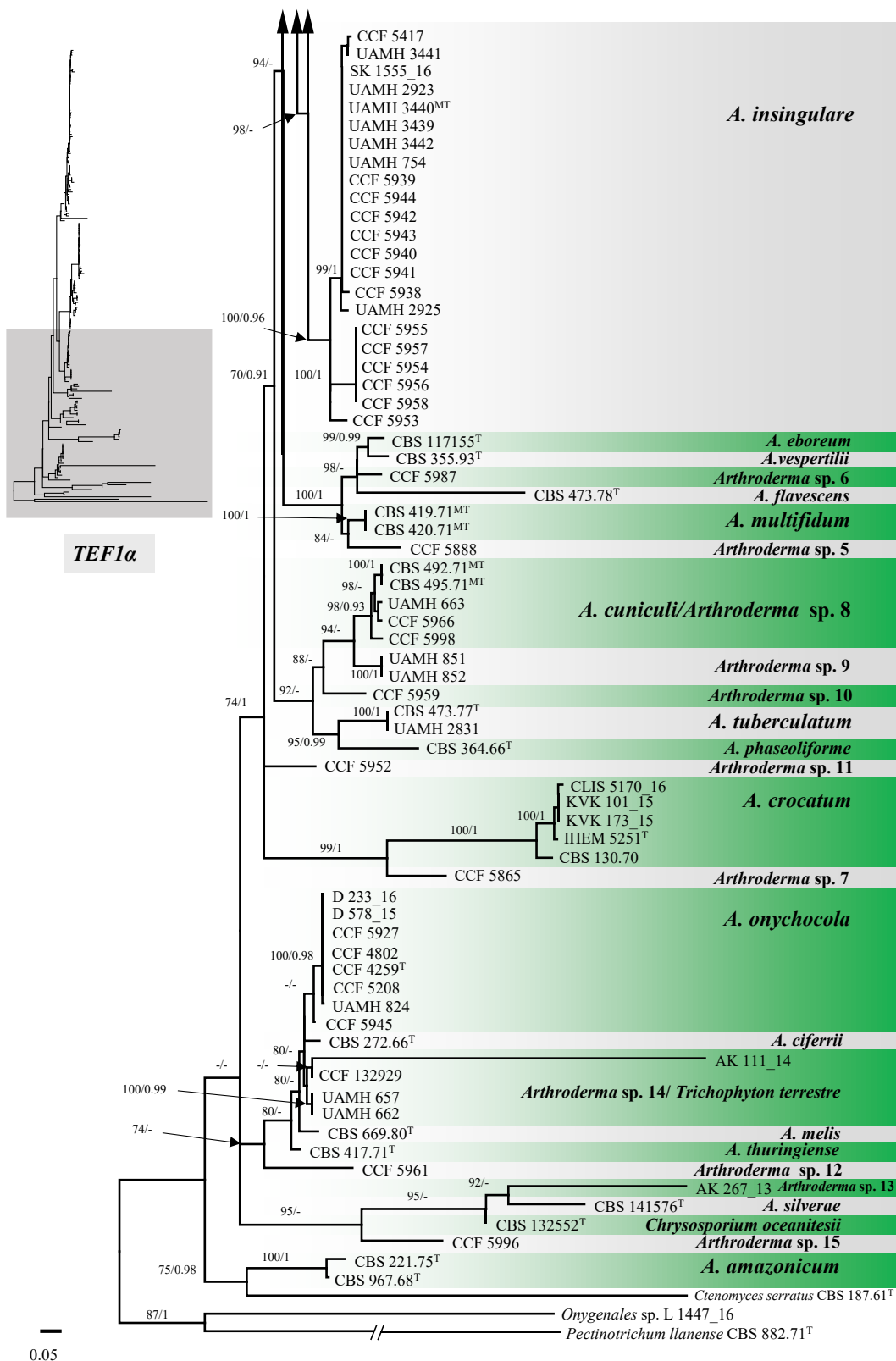


Obrázek 7. Fylogenetický strom rodu *Arthroderma* vytvořený na základě sekvencí ITS metodou Maximum likelihood (strom s nejvyšším log-likelihood skóre). Ve stromě jsou uvedeny bootstrapové podpory z ML analýzy přesahující 70 % a posteriorní pravděpodobnosti z Bayesovské analýzy přesahující 0.90 pp; nižší podpory jsou vyjádřeny pomlčkou. Ex-typové izoláty jsou označeny písmenem T a „mating-type“ izoláty písmenem MT v horním indexu. Strom byl zakořeněn kladem zahrnujícím kmeny L 1447_16, CBS 882.71 a CBS 187.61 (outgroup). Měřítka znázorňuje počet substitucí na jednu pozici v alignmentu (substitutions per site).

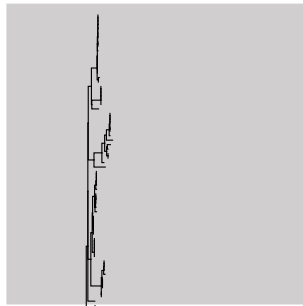


TEF1α

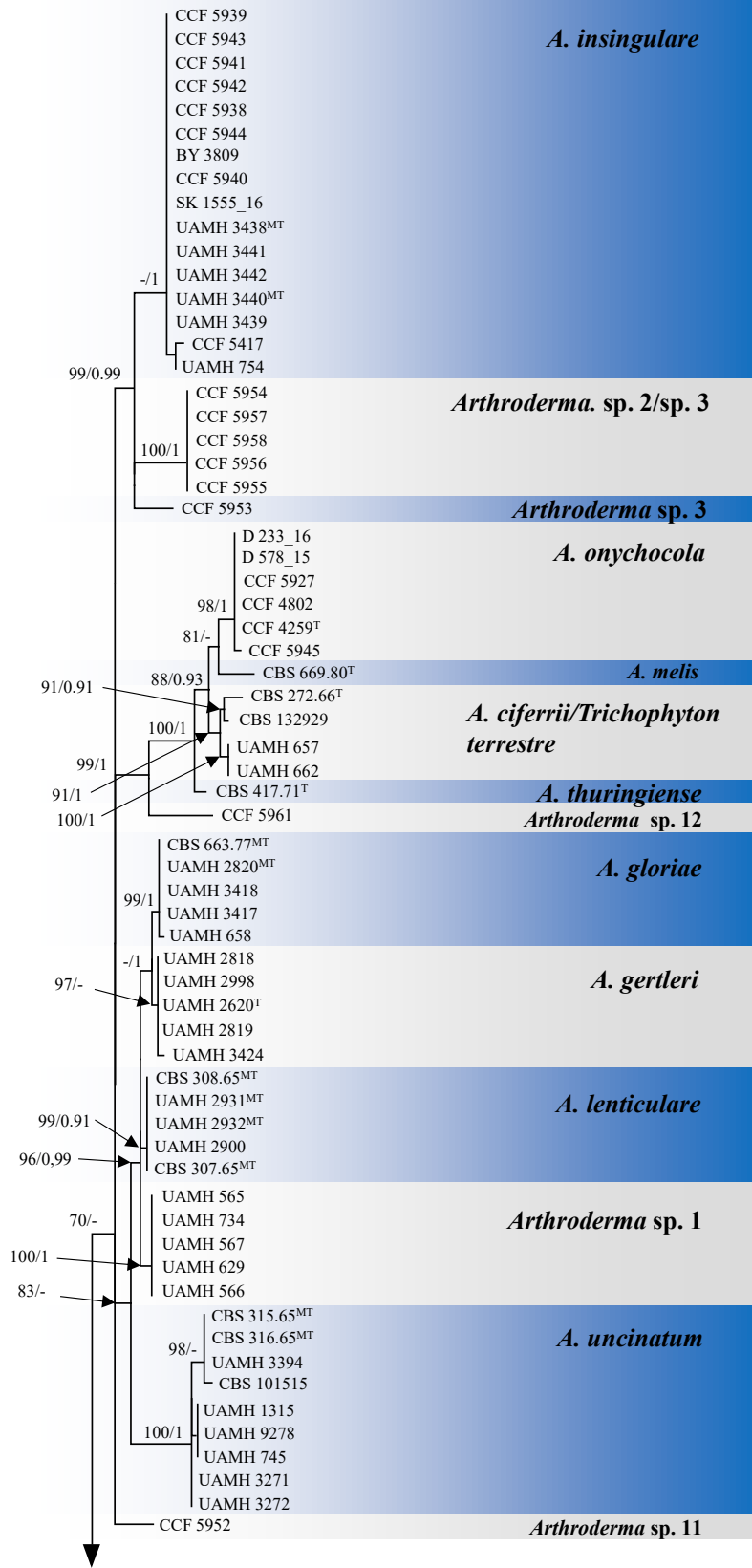




Obrázek 8. Fylogenetický strom rodu *Arthroderma* vytvořený na základě sekvencí *TEF1 α* metodou Maximum likelihood (strom s nejvyšším log-likelihood skóre). Ve stromě jsou uvedeny bootstrapové podpory z ML analýzy přesahující 70 % a posteriorní pravděpodobnosti z Bayesovské analýzy přesahující 0.90 pp; nižší podpory jsou vyjádřeny pomlčkou. Ex-typové izoláty jsou označeny písmenem T a „mating-type“ izoláty písmeny MT v horním indexu. Strom byl zakořeněn kladem zahrnujícím kmeny L 1447_16 a CBS 882.71 (outgroup). Měřítka znázorňuje počet substitucí na jednu pozici v alignmentu (substitutions per site).



TUB2



0.05

Výsledný kombinovaný strom ukazuje (Obrázek 6), že druhy *A. insingulare*, *A. lenticulare* a *A. quadrifidum*, se kterými bylo spojováno stejné nepohlavní stádium, tj. *T. terrestre*, jsou fylogeneticky dobře podpořené a vzájemně oddělené dalšími druhy. Tyto druhy tedy netvoří komplex z fylogenetického pohledu. Druh *T. terrestre*, reprezentovaný autentickými kmeny UAMH 657 a UAMH 662 se přitom nenachází v žádné fylogenetické linii jmenovaných druhů, ale je samostatným druhem.

Druh *A. quadrifidum* byl nejhojněji zastoupen mezi druhy zkoumanými v této práci a zahrnoval několik méně či více dobře statisticky podpořených linií. Příslušnost těchto linií ke stejnému druhu byla dále ověřována křížícími experimenty a analýzou morfologie (viz dále). Jednu z těchto linií tvořily i kmeny *A. redellii*, které nebyly fylogeneticky jasně odděleny od druhu *A. quadrifidum*, a proto jim byla věnována zvláštní pozornost při dalších analýzách (viz níže).

Druhy *Arthroderma* ve fylogenetickém stromě (Obrázek 6) vytvořily 8 statisticky dobře podpořených kladů (angl. clades), které zde byly vždy arbitrárně pojmenovány podle nejstaršího popsaného druhu *Arthroderma* v daném kladu. Druhy *Chrysosporium magnasporum*, *A. amazonicum* a izolát CCF 5952 (*Arthroderma* sp. 11) nebylo možné kvůli nízkým statistickým podporám jejich větví do žádného kladu zařadit. Níže je charakterizována ekologie a druhové zastoupení v rámci jednotlivých kladů:

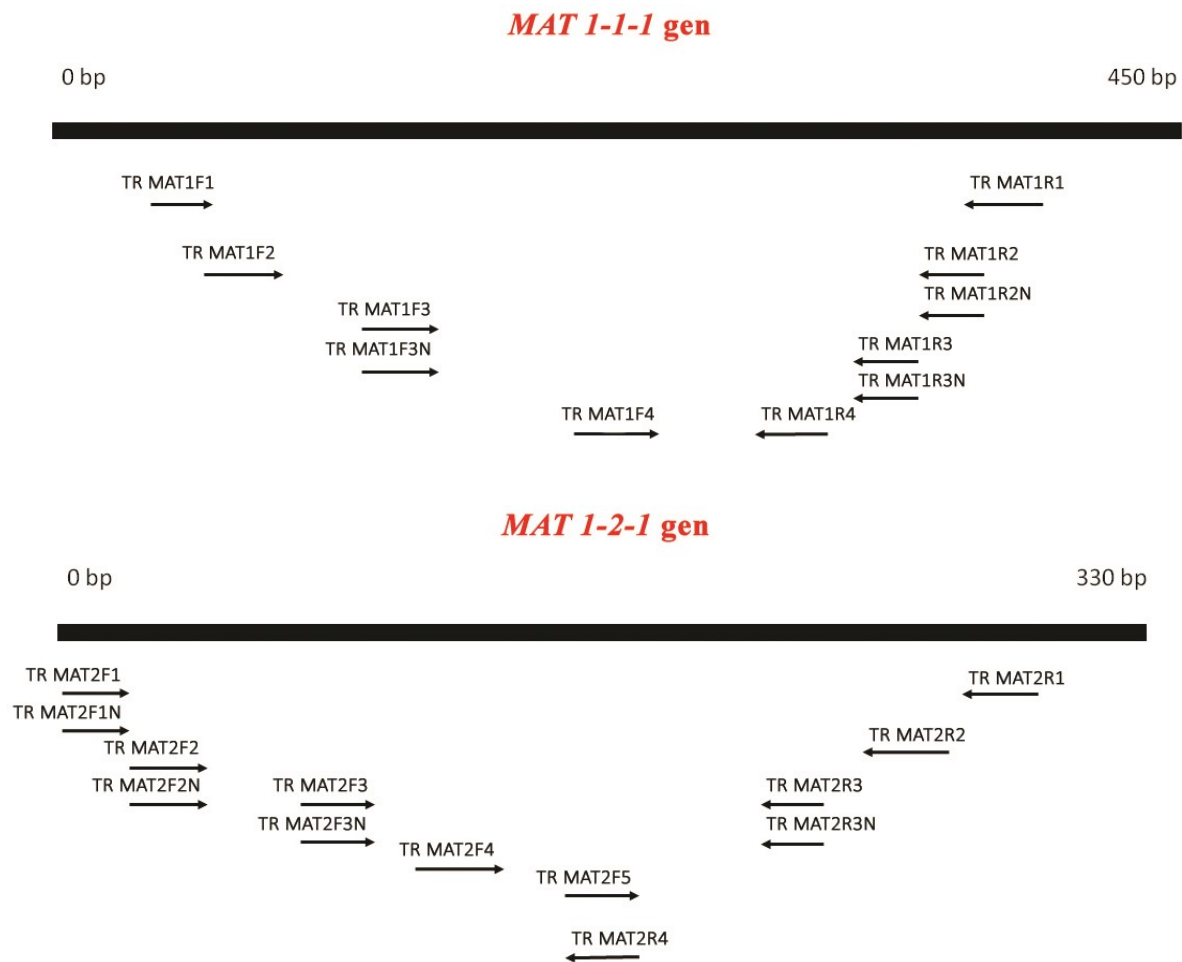
- 1) ***Arthroderma curreyi* klad** (2 druhy: *A. quadrifidum* + *A. redellii*, *A. curreyi*; 72 izolátů)
Tento klad byl zastoupen největším počtem izolátů, z nichž nejvíce pocházelo ze Severní Ameriky (18 kmenů z Kanady a 16 z USA). Na druhém místě byla Evropa (n = 26). Celkově nejčastějším substrátem byl lidský klinický materiál (*A. quadrifidum*; n = 26); tyto kmeny pocházely ve 14 případech z České Republiky. Kromě lidského klinického materiálu byly kmeny dále izolovány z půdy (n = 21) a zvířat (n = 15). Všechny autentické kmeny *A. redellii* (n = 6) pocházely z Wisconsinu v USA z kůže hibernujících netopýřů.
- 2) ***Arthroderma uncinatum* klad** (5 druhů: *A. uncinatum*, *A. gloriae*, *A. gertleri*, *A. lenticulare* a nepopsaný druh *Arthroderma* sp. 1; 45 izolátů)
Většina kmenů tohoto kladu byla izolována v Severní Americe (18 v Kanadě a 13 v USA). Kmeny všech druhů v tomto kladu pocházely výhradně z půdy (n = 33); ekologie ostatních kmenů byla neznámá, nebo kmeny pocházely z klinického materiálu (*A. uncinatum*; n = 2).
- 3) ***Arthroderma insingulare* klad** (4 druhy: *A. insingulare* a nepopsané druhy *Arthroderma* sp. 2, 3 a 4; 26 izolátů)
Největší část kmenů byla izolována v USA (n = 15). Ze zvířat, a to převážně z hadů, pocházelo největší množství izolátů (všechny kmeny druhů *Arthroderma* sp. 2 a 3 a značná část kmenů *A. insingulare*; n = 14), z půdy pocházelo 8 izolátů. Druh *Arthroderma* sp. 4 byl reprezentován jediným izolátem z jeskynního sedimentu.

- 4) ***Arthroderma multifidum* klad** (6 druhů: *A. multifidum*, *A. flavescens*, *A. eboreum*, *A. vespertilii* a nepopsané druhy *Arthroderma* sp. 5 a 6; 8 izolátů)
Izoláty v tomto kladu pocházely především z Evropy (n = 6), dále zde byl jeden zástupce z Asie (*Arthroderma* sp. 5) a Austrálie (jeden kmen *A. tuberculatum*). Izolovány byly z půdy (dva izoláty druhu *A. multifidum* a druh *Arthroderma* sp. 5 zastoupený jen jedním izolátem; n = 3), zvířat (druhy *A. flavescens*, *A. vespertilii* a *Arthroderma* sp. 6 zastoupené jediným izolátem; n = 3), lidského klin. materiálu (druh *A. eboreum*; n = 1) a jeskynního sedimentu (*A. multifidum*; n = 1).
- 5) ***Arthroderma crocatum* klad** (2 druhy: *A. crocatum* a nepopsaný druh *Arthroderma* sp. 7; 6 izolátů)
Tento klad zahrnoval nejmenší počet druhů a izolátů. Pocházely především z Evropy (n = 5) a lidského klin. materiálu (dva kmeny *A. crocatum* a jediný kmen druhu *Arthroderma* sp. 7; n = 3).
- 6) ***Arthroderma tuberculatum* klad** (6 druhů: *A. cuniculi*, *A. tuberculatum*, *A. phaseoliforme* a nepopsané druhy *Arthroderma* 8, 9, 10; 11 izolátů)
Kmeny z druhů tohoto kladu pocházely především z USA (n = 6) a byly izolovány z půdy (*A. cuniculi*, *Arthroderma* sp. 10, po jednom kmenu *Arthroderma* sp. 8 a *A. tuberculatum*; n = 6) a zvířat (dva kmeny *Arthroderma* sp. 8, jediný kmen druhu *A. phaseoliforme* a po jednom kmenu *A. tuberculatum* a *Arthroderma* sp. 11; n = 5).
- 7) ***Arthroderma ciferrii* klad** (6 druhů: *A. onychocola*, *T. terrestre*, *A. ciferrii*, *A. melis*, *A. thuringiense* a nepopsaný druh *Arthroderma* sp. 12; 15 izolátů)
Největší část izolátů tohoto kladu pocházela z Evropy (n = 9), autentické kmeny *T. terrestre* UAMH 657 a UAMH 662 byly izolovány z půdy v Austrálii. Klad zahrnuje i kmeny izolované z klin. materiálu (7 z lidí a 4 ze zvířat). Šest kmenů z lidí (Evropa) a také izolát z ježka (Nový Zéland) a hada (USA) patřily do druhu *A. onychocola*; jeden kmen z lidského pacienta patřil do druhu *T. terrestre* a 2 kmeny ze zvířat (hlodavec a netopýr) patřily do druhů *A. thuringiense* a *Arthroderma* sp. 12. Menší část tvořily kmeny z půdy (dva kmeny *T. terrestre* a také *A. melis* a *A. ciferrii* zastoupené jen jedním kmenem; n = 4).
- 8) ***Arthroderma silverae* klad** (5 druhů: *A. silverae*, *Chrysosporium oceanitesii* a nepopsané druhy *Arthroderma* sp. 13, 14 a 15; 7 izolátů)
Tento klad je reprezentován poměrně malým počtem izolátů, které pocházely převážně z USA (n = 3) a Evropy (n = 3) a s výjimkou jediného kmenu byly asociovány s jeskynním prostředím. Kmeny byly izolovány z netopýrů (jeden izolát *Arthroderma* sp. 14 a jediný kmen druhu *Arthroderma* sp. 15; n = 2) a jeskynního sedimentu (*Arthroderma* sp. 13 a jeden kmen *Arthroderma* sp. 14; n = 3). Jediný zástupce druhu *Ch. oceanitesii* pocházel z Antarktidy z mrtvého mláděte buňňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*).

Ve fylogenezi jednotlivých lokusů také došlo k několika rozporům s kombinovanou fylogenezí. ITS rDNA nedokázala jasně oddělit druhy *A. gertleri* a *A. gloriae*, *TEF1a* oddělila izolát CCF 5965 od *A. curreyi* a nerozlišila druhy *Arthroderma* sp. 14 od *T. terrestre* a fylogeneze založená na *TUB2* nerozlišila druhy *A. ciferrii* a *T. terrestre*. Tyto nesrovnalosti mohou být v některých případech dány kratšími amplikony získanými pro některé jednotlivé izoláty. Většinou se ale jedná o jev, který je běžný napříč skupinami hub, tj. některé lokusy nedovedou rozlišit všechny zkoumané druhy. Tento nedostatek překonává použití mnohagenové fylogeneze.

Fylogenetická analýza mimo jiné také ukázala na přítomnost až 15 dosud nepopsaných linií v rodu *Arthroderma*. Skutečnost, že se ve všech případech jedná o nové druhy, bude ale muset být ověřena dalšími analýzami, zejména analýzou morfologie, fyziologie a testy biologické kompatibility.

3.1.3 Amplifikace MAT genů



Obrázek 10. Mapa nově navržených primerů pro amplifikace genů *MAT1-1-1*- a *MAT1-2-1* určujících pohlavní ladění.

U většiny kmenů z druhů někdejšího *T. terrestre* komplexu (*A. insingulare*, *A. lenticulare*, *A. quadrifidum* + *A. redellii*) a druhu *A. uncinatum* byly určeny *MAT1-1-1* nebo *MAT1-2-1* idiomorfy (Tabulka 4). K amplifikaci MAT genů byly použity primery nově navržené v této práci (Obrázek 10) a u vybraných izolátů byla ověřena správnost amplifikace cílových genů sekvenováním. U ostatních kmenů byla MAT idiomorfa určena pomocí specifických délek PCR produktů na elektroforetogramu. U každého kmenu byla rovněž ověřována absence genu opačného párovacího typu.

Pro amplifikaci MAT lokusů u jednotlivých druhů se osvědčily kombinace primerů uvedené v Tabulce 6. Poměr MAT genů (*MAT1-1-1* : *MAT1-2-1*) u zkoumaných druhů se blížil 1:1 s výjimkou *A. redellii*, kde všechny zkoumané izoláty (n = 5) obsahovaly pouze *MAT1-1-1* gen.

Tabulka 6. Vhodné kombinace primerů použité pro amplifikaci MAT idiomorf a poměr MAT idiomorf uvnitř zkoumaných druhů.

Zkoumaný druh	Počet zkoumaných kmenů	Počet kmenů s determinovanou MAT idiomorfou	Vhodné kombinace <i>MAT1-1-1</i> primerů	Vhodné kombinace <i>MAT1-2-1</i> primerů	Poměr <i>MAT1-1-1</i> : <i>MAT1-2-1</i>
<i>A. insingulare</i>	19	17	TR MAT1R2 – TR MAT1F3	TR MAT2R1 – TR MAT1F2 TR MAT2R1 – TR MAT2F4	9:8
<i>A. lenticulare</i>	5	5	TR MAT1R2 – TR MAT1F3	TR MAT2R2 – TR MAT2F1	2:3
<i>A. quadrifidum</i>	63	62	TR MAT1R3 – TR MAT1F3	TR MAT2R2 – TR MAT2F1 TRMAT2R1 – TRMAT2F1N	34:28
<i>A. redellii</i>	5	5	viz <i>A. quadrifidum</i>	viz <i>A. quadrifidum</i>	5:0
<i>A. uncinatum</i>	24	24	TR MAT1R2 – TR MAT1F3	TR MAT2R2 – TR MAT2F1 TR MAT2R1 – TR MAT2F1N	11:13

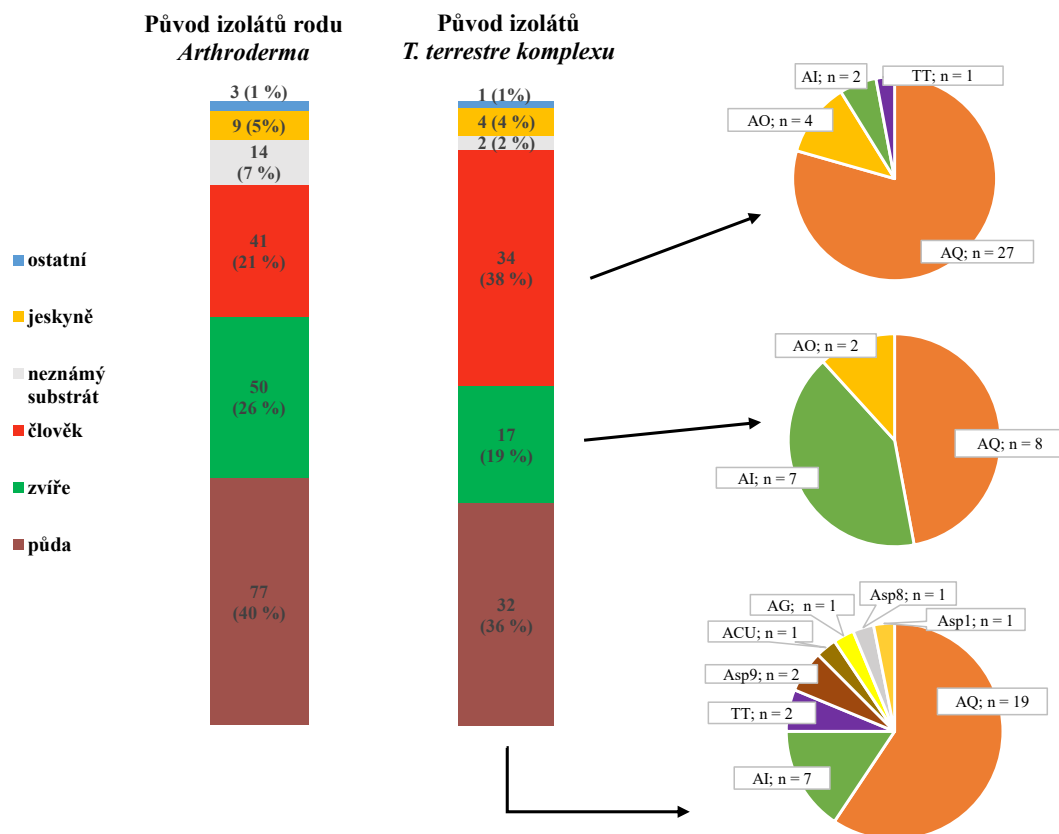
3.2 Identifikace klinicky významných druhů *Arthroderma*

Ze 194 kmenů rodu *Arthroderma* zahrnutých v této práci bylo 50 izolováno ze zvířat a 41 z lidského klinického materiálu (Obrázek 11). Z 50 kmenů izolovaných ze zvířat bylo 17 dříve morfologicky určeno jako *T. terrestre* a podle fylogenetické analýzy nyní zařazeny do druhů *A. quadrifidum* (n = 8), *A. insingulare* (n = 7) a *A. onychocola* (n = 2). Zbýlých 33 izolátů patří převážně do zatím nepopsaných druhů (*Arthroderma* sp. 2, 3, 6, 8, 10, 11, 12, 14 a 15; n = 14), druhů *A. curreyi* (n = 1), *A. uncinatum* (n = 1), *A. flavescens* (n = 1), *A. vespertilii* (n = 1), *A. crocatum* (n = 1), *A. tuberculatum* (n = 1), *A. phaseoliphorme* (n = 1), *A. thuringiense* (n = 1), *Ch. oceanitesii* (n = 1), *A. amazonicum* (n = 2) a druhu *A. redellii* (n = 5), který je ale potenciálním synonymem *A. quadrifidum*

(Obrázek 6). Nejvíce izolátů pocházelo z plazů (n = 18), netopýrů (n = 15), ptáků (n = 5) a hlodavců (n = 5).

Ze 41 kmenů izolovaných z lidí bylo 34 řazeno dle morfologie do *T. terrestre* komplexu a na základě molekulárních dat byly určeny jako *A. quadrifidum* (n = 27), *A. onychocola* (n = 4), *A. insingulare* (n = 2) a *T. terrestre* (n = 1). Další druhy *Arthroderma*, které se vyskytovaly v lidském klinickém materiálu, jsou *A. crocatum* (n = 2), *A. eboreum* (n = 1), *A. uncinatum* (n = 1) a *Arthroderma* sp. 7 (n = 1). Nejčastějším postiženým místem na těle člověka byly nehty na prstech u nohou (n = 11) a rukou (n = 7) a kůže na nohou (n = 7) a rukou (n = 8). Druhy z někdejšího *T. terrestre* komplexu můžeme tedy považovat za původce jak lidských, tak zvířecích dermatomykóz.

Bohaté zastoupení měly izoláty z půdy (n = 77; 18 druhů), z nichž bylo 32 původně morfologicky identifikováno do *T. terrestre* komplexu a fylogeneticky byly zařazeny do 8 druhů (Obrázek 11). Velmi malá část izolátů pocházela z jeskynního sedimentu (celkem: n = 9, *T. terrestre* komplex: n = 4), původ některých sbírkových izolátů byl neznámý (celkem: n = 14, *T. terrestre* komplex: n = 2).



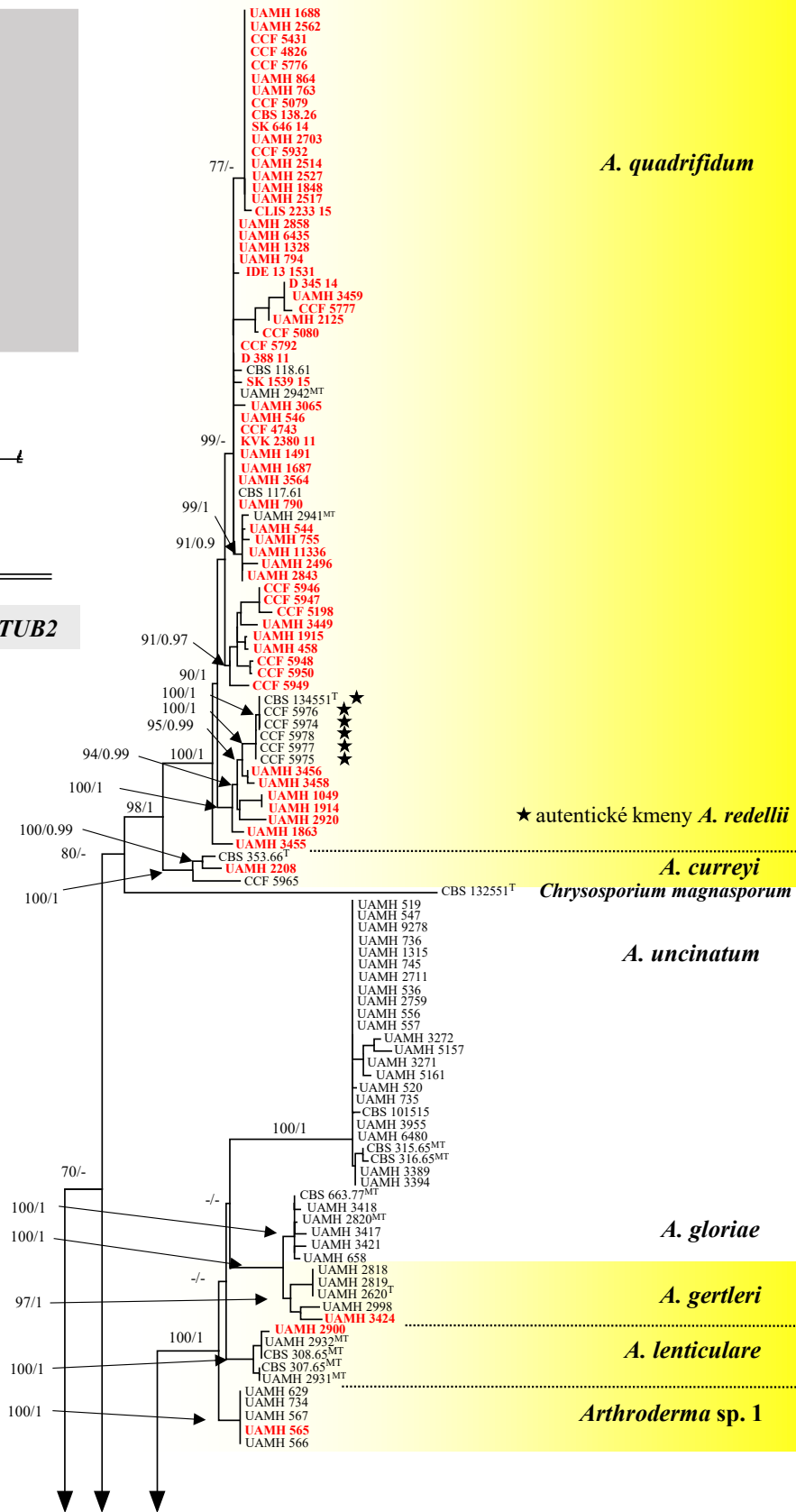
Obrázek 11. Původ izolátů rodu *Arthroderma* použitých v diplomové práci (n = 194) porovnávaný s původem izolátů dříve řazených do *Trichophyton terrestre* komplexu (n = 95). Kruhové výšeče zobrazují zastoupení druhů *T. terrestre* komplexu v rámci jednotlivých substrátů (zespodu půda, zvířata, lidský klinický materiál). ACU = *A. curreyi*, AG = *A. gertleri*, AI = *A. insingulare*, AL = *A. lenticulare*, AO = *A. onychocola*, Asp1 = *Arthroderma* sp. 1, Asp8 = *Arthroderma* sp. 8, Asp9 = *Arthroderma* sp. 9, TT = *T. terrestre*.

Z výsledků fylogenetické analýzy je patrné, že další původně *T. terrestre* kmeny byly zařazeny do druhů *A. curreyi* (UAMH 2208), *A. gertleri* (UAMH 3424), *Arthroderma* sp. 1 (UAMH 565), *Arthroderma* sp. 8 (UAMH 663) a *Arthroderma* sp. 9 (UAMH 851, UAMH 852). Druh *Trichophyton terrestre* (autentické kmeny), který byl označován za nepohlavní stádium druhů *T. terrestre* komplexu není překvapivě těmto druhům fylogeneticky příbuzný. Všechny jmenované kmeny byly izolovány z půdy.

Pro větší přehlednost je fylogenetická příslušnost kmenů morfologicky dříve určených jako *T. terrestre* vyznačena na Obrázku 12. Z fylogenetické analýzy lze odvodit, že morfologie charakterizující druh *T. terrestre* se vyvinula několikrát nezávisle na sobě.



ITS + *TEF1α* + *TUB2*



3.3 Křížící pokusy

Křížící pokusy byly prováděny u druhů z někdejšího *T. terrestre* komplexu, který byl hlavním objektem zájmu této práce z hlediska klinického významu jeho zástupců. Cílem bylo potvrdit kompatibilitu opačně pohlavně laděných jedinců v rámci *a priori* fylogeneticky definovaných druhových hranic (viz kapitola 3.1.2). Do experimentů byl zařazen i ex-typový kmen druhu *A. redellii*, který se fylogeneticky nacházel uvnitř linie *A. quadrifidum*, a jehož biologická kompatibilita s tímto druhem by mohla dále potvrdit jeho nadbytečnost. Dále bylo cílem zjistit vhodné podmínky pro indukci pohlavního stádia *in vitro* u jednotlivých druhů a ověřit, zda pohlavní stádium nese taxonomicky významné znaky, které by mohly být přínosné pro determinaci druhů. Vzhledem k tomu, že druhy *A. quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare* se ukázaly být fylogeneticky vzdálené, byly tyto experimenty prováděny jen uvnitř jednotlivých druhů a nebyla testována nekompatibilita mezi druhy. Její testování by dávalo smysl jen v případě velmi blízké fylogenetické příbuznosti těchto druhů, nebo za předpokladu, že bychom fylogenezi neměli k dispozici, jak tomu bylo v minulosti, kdy křížící experimenty hrály velmi významnou roli v definici druhových hranic.

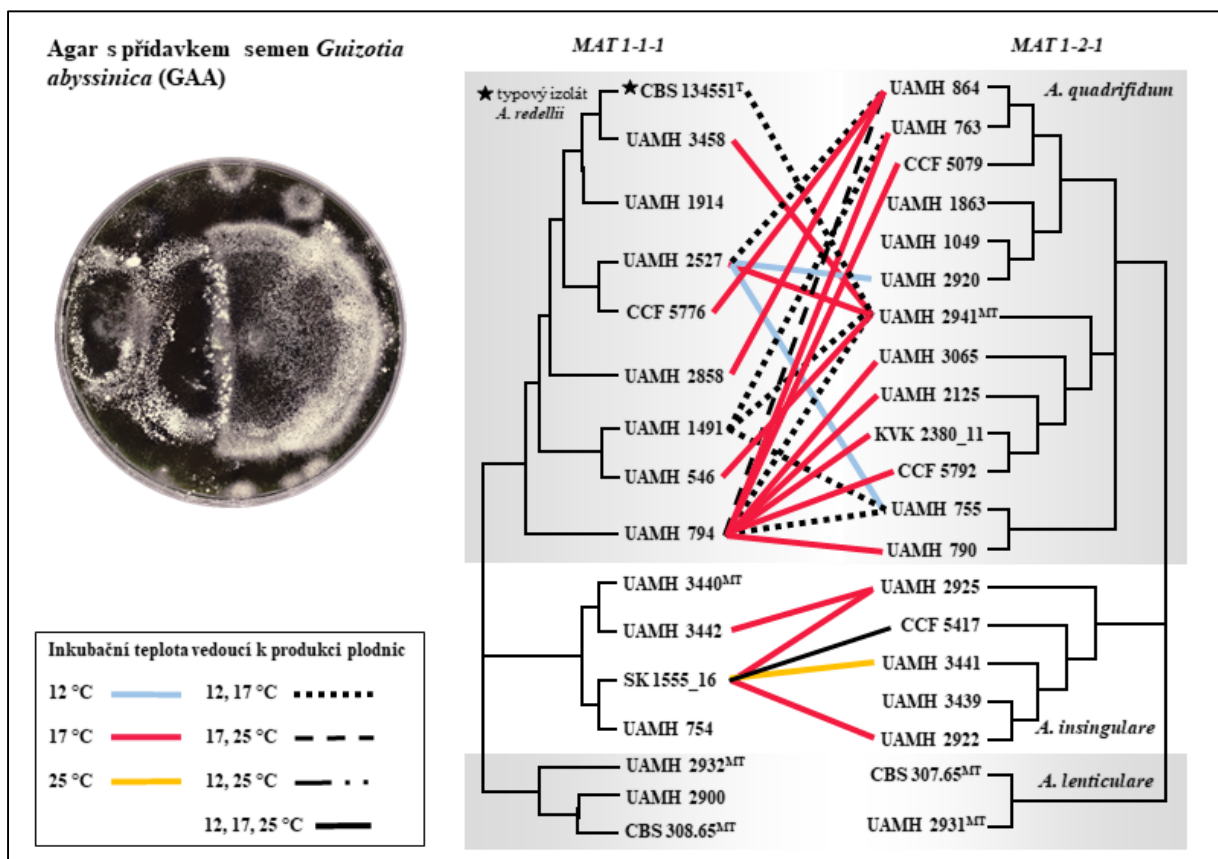
Křížení byla prováděna u všech dostupných kmenů *A. lenticulare* a u většiny dostupných kmenů *A. insingulare*. Vzhledem k velkému počtu zahrnutých kmenů *A. quadrifidum* byly experimenty u tohoto druhu omezeny na vzorek kmenů vybraných tak, aby reprezentoval fylogenetickou a ekologickou variabilitu druhu (různé genotypy, substráty a lokality). Pro experimenty byla použita 4 média (GAA, A 2%, PCA, půda) a 3 kultivační teploty (12, 17, 25 °C); pro půdu byl navíc zahrnut samostatný režim, a to pokojová teplota se střídáním světla a tmy. Všechna úspěšná křížení na jednotlivých médiích jsou vyznačena na Obrázcích 13–16.

Pohlavní stádium bylo úspěšně indukováno u všech tří druhů dříve řazených do *T. terrestre* komplexu (*A. quadrifidum*, *A. insingulare* a *A. lenticulare*) a dále mezi kmeny *A. quadrifidum* a *A. redellii*. Plodnice vznikaly v rozmezí 5–17 týdnů. Tvorba plodnic se uskutečňovala na GAA v místě styku dvou kmenů opačného párovacího typu („junction zone“) a v případě A 2%, PCA a půdy s vlasý a žíněmi se plodnice tvořily právě v blízkosti vlasů a žíní. Podmínky pro vznik pohlavního stádia se lišily u jednotlivých druhů, ale i mezi páry kmenů v rámci jednoho druhu. Nejvhodnějším médiem co do počtu úspěšných křížení se ukázalo být GAA (Obrázek 13), kde ale nedošlo ke vzniku pohlavního stádia mezi žádnými izoláty *A. lenticulare*. Obecně nejvhodnější teplota pro křížení byla 17 °C.

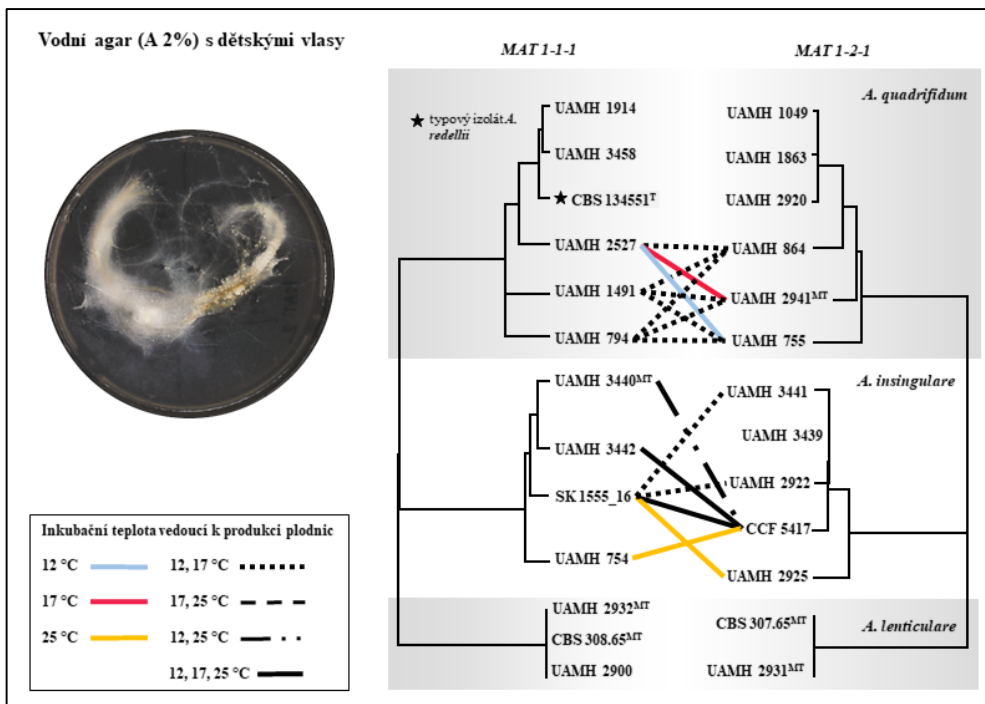
Plodnice u druhu *A. quadrifidum* vznikly alespoň u některých kombinací kmenů na všech použitých médiích. Pro *A. insingulare* se ukázalo být nejvhodnější médium A 2% (Obrázek 14). Ke křížení kmenů *A. lenticulare* došlo pouze v jediném případě, a to na půdě při pokojové teplotě za střídání světla a tmy. Plodnice vzniklé křížením *A. quadrifidum* a *A. redellii* se tvořily pouze na GAA při teplotě 12 a 17°C. Autentické kmeny *A. redellii* nebylo možné vnitrodruhově křížit, jelikož byly k dispozici kmeny pouze jednoho párovacího typu (*MAT 1-1-1*). Pohlavní stádium druhu *T. terrestre*

neomohlo být také navozeno, jelikož oba kmeny UAMH 657, UAMH 662 měly pohlavní ladění *MAT1-2-1*. Tyto kmeny se nekřížily ani s vybranými kmeny ostatních druhů *T. terrestre* komplexu. Mimo *T. terrestre* komplex byly neúspěšně kříženy opačně pohlavně laděné izoláty druhu *A. uncinatum* (*MAT1-1-1*: CBS 316.65, UAMH 736, UAMH 3272 × *MAT1-2-1*: UAMH 3271, UAMH 3389, UAMH 6480).

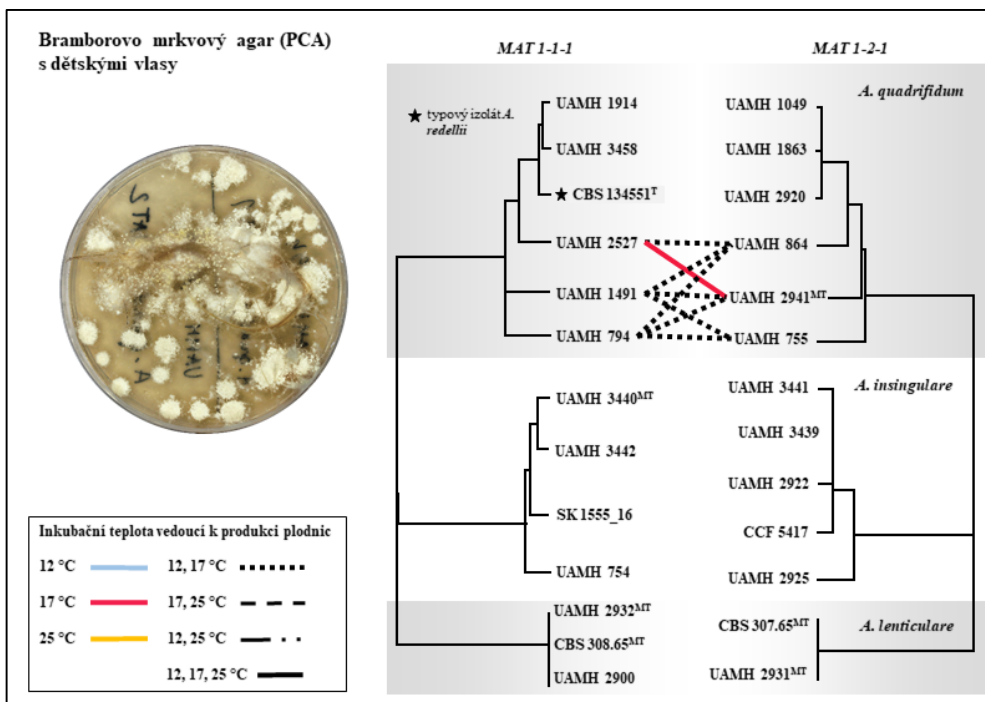
Vznikající gymnothecia byla zprvu bílá a kulovitá, ve zralosti světle žlutá až okrová s povrchem výrazně ornamentovaným spirálně stočenými peridiálními hyfami složenými z činkovitých ostnitých buněk. Plodnice obsahovaly prototunikátní vřevka s 8 hladkostěnnými čočkovitými askosporami se středovou prohlubní. Některé kmeny tvořily při křížení i samostatně v kultuře sterilní nodulární útvary podobné gymnotheciím s mikroskopicky pozorovanými peridiálními hyfami. Tyto struktury neobsahovaly askospory, ale pouze asexuální konidie.



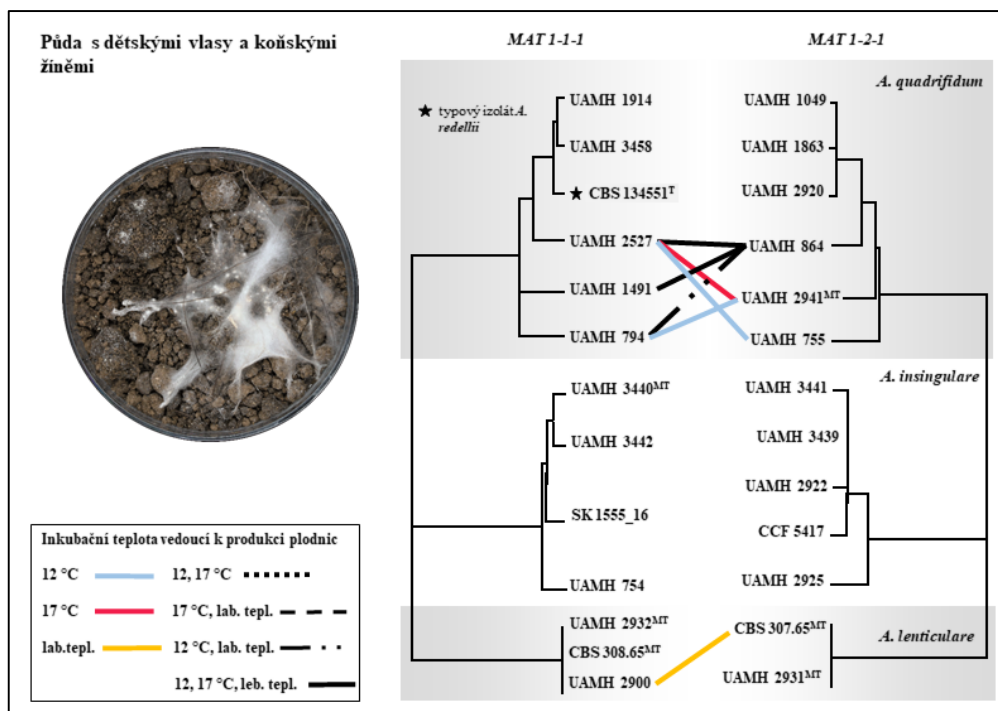
Obrázek 13. Schematické znázornění výsledků křížících experimentů u druhů dřívějšího *Trichophyton terrestre* komplexu na GAA médiu. Barevné spojnice mezi izoláty *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* párovacích typů značí úspěšná křížení při různých teplotách (viz legenda). Opačně laděné kmeny v rámci kladů (šedé nebo bílé podbarvení) byly kříženy ve všech možných kombinacích. Fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě sekvencí ITS rDNA a slouží pouze jako schéma pro přehledné vyjádření výsledků.



Obrázek 14. Schematické znázornění výsledků křížících experimentů u druhů dřívějšího *Trichophyton terrestre* komplexu na 2% vodním agaru s dětskými vlasy. Barevné spojnice mezi izoláty *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* párovacích typů značí úspěšná křížení při různých teplotách (viz legenda). Opačně laděné kmeny v rámci kladů (šedé nebo bílé podbarvení) byly kříženy ve všech možných kombinacích. Fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě sekvencí ITS rDNA a slouží pouze jako schéma pro přehledné vyjádření výsledků.



Obrázek 15. Schematické znázornění výsledků křížících experimentů u druhů dřívějšího *Trichophyton terrestre* komplexu na bramborovomrkvovém agaru s dětskými vlasy. Barevné spojnice mezi izoláty *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* párovacích typů značí úspěšná křížení při různých teplotách (viz legenda). Opačně laděné kmeny v rámci kladů (šedé nebo bílé podbarvení) byly kříženy ve všech možných kombinacích. Fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě sekvencí ITS rDNA a slouží pouze jako schéma pro přehledné vyjádření výsledků.



Obrázek 16. Schematické znázornění výsledků křížících experimentů u druhů dřívějšího *Trichophyton terrestre* komplexu na půdě s dětskými vlasy a koňskými žíněmi. Barevné spojnice mezi izoláty *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* párovacích typů značí úspěšná křížení při různých teplotách (viz legenda). Opačně laděné kmeny v rámci kladů (šedé nebo bílé podbarvení) byly kříženy ve všech možných kombinacích. Fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě sekvencí ITS rDNA a slouží pouze jako schéma pro přehledné vyjádření výsledků. Lab. tepl. = laboratorní (pokojová) teplota (20–25 °C), střídání světla a tmy.

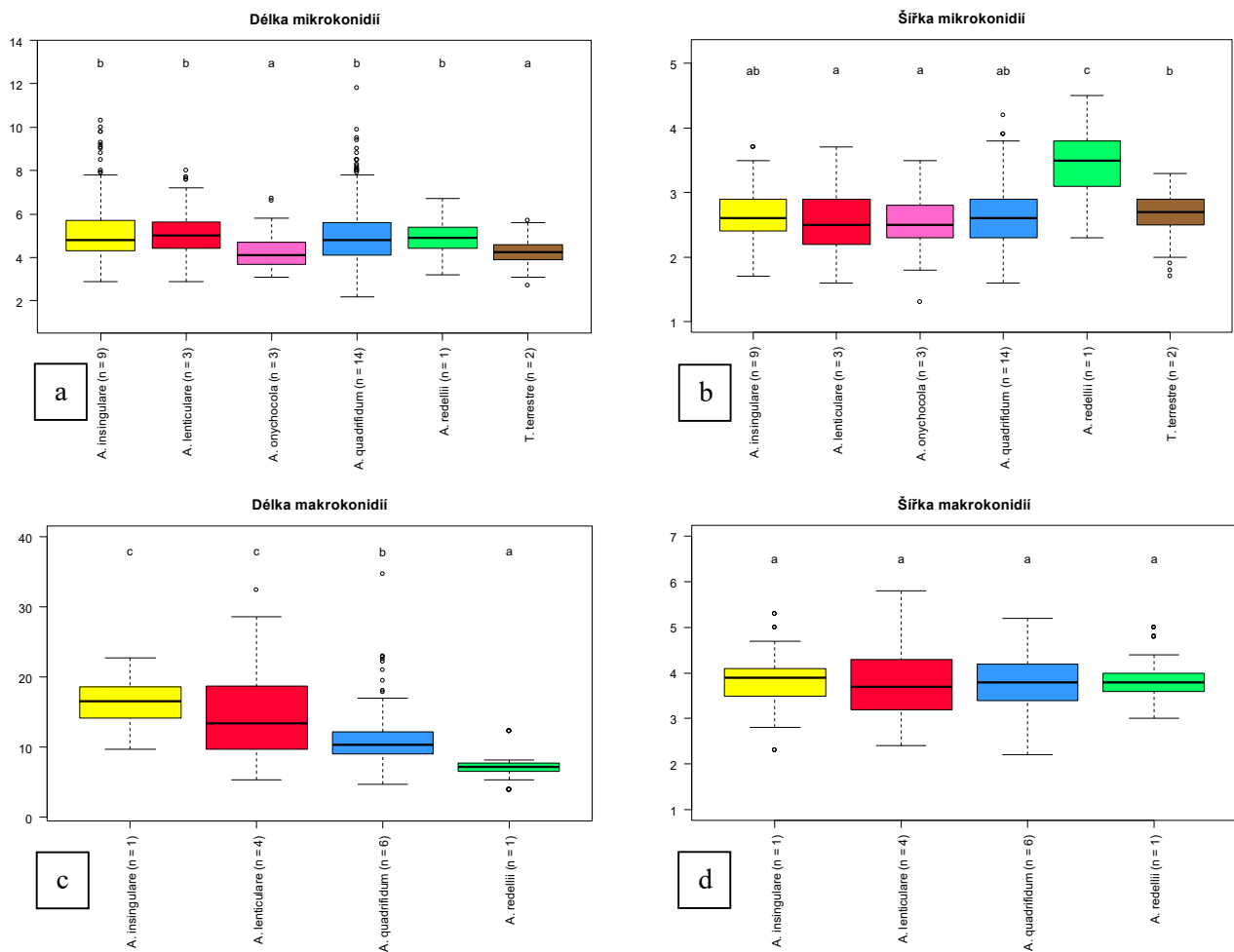
3.4 Morfologie

Do morfologické analýzy byly zahrnuty znaky na nepohlavním i pohlavním stádiu druhů z *T. terrestre* komplexu; pro srovnání byl v některých grafech zahrnut i druh *A. onychocola*, do kterého bylo zařazeno velké množství kmenů původně morfologicky identifikovaných jako *T. terrestre*. Pro zjištění statisticky významných rozdílů v mikromorfologických znacích mezi druhy byla použita analýza ANOVA a na ni navazující Tukey HSD test.

Všechny zkoumané druhy produkovaly velké množství hladkých, 1-bunčných, převážně hruškovitých až kyjovitých mikrokonidií; většina druhů produkovala i hladké, vícebunčné, kyjovité makrokonidie. Statistická analýza identifikovala dvě skupiny druhů se statisticky významně odlišnou délkou mikrokonidií ($p < 0,05$). Do první skupiny patřily druhy *A. onychocola* a *T. terrestre*, které měly signifikantně kratší mikrokonidie než zbývající druhy (Obrázek 17a). V šířce mikrokonidií se vymykal zejména druh *A. redellii* (Obrázek 17b). Ze zkoumaných druhů netvořil makrokonidie druh *A. onychocola*, u *T. terrestre* nebyly v kultuře makrokonidie nalezeny, přestože je autoři zmiňují v originálním popisu.

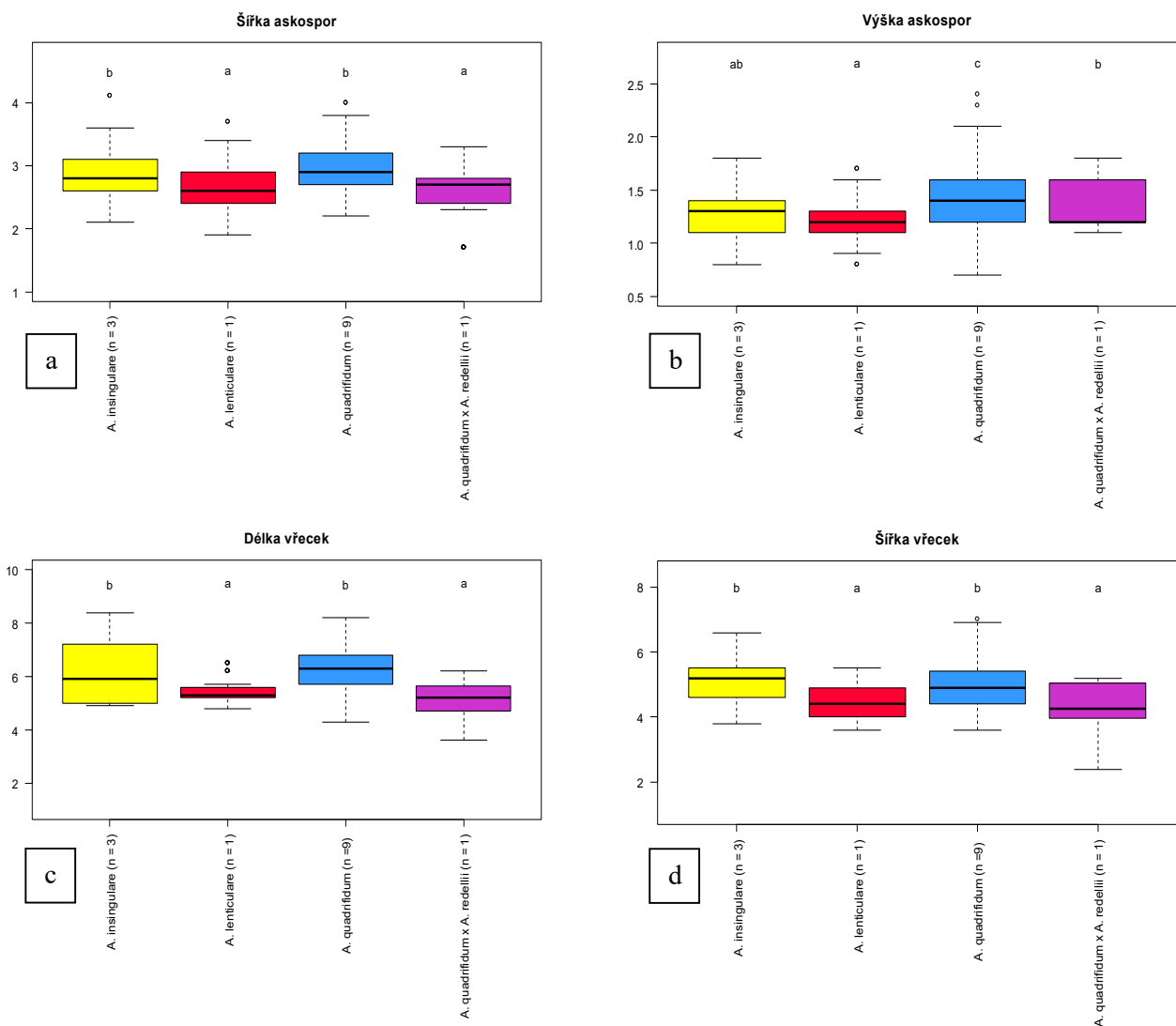
Délkou makrokonidií se signifikantně lišila dvojice *A. insingulare* a *A. lenticulare* od druhů *A. quadrifidum* a *A. redellii*, zatímco v šířce makrokonidií se zkoumané druhy statisticky nelišily

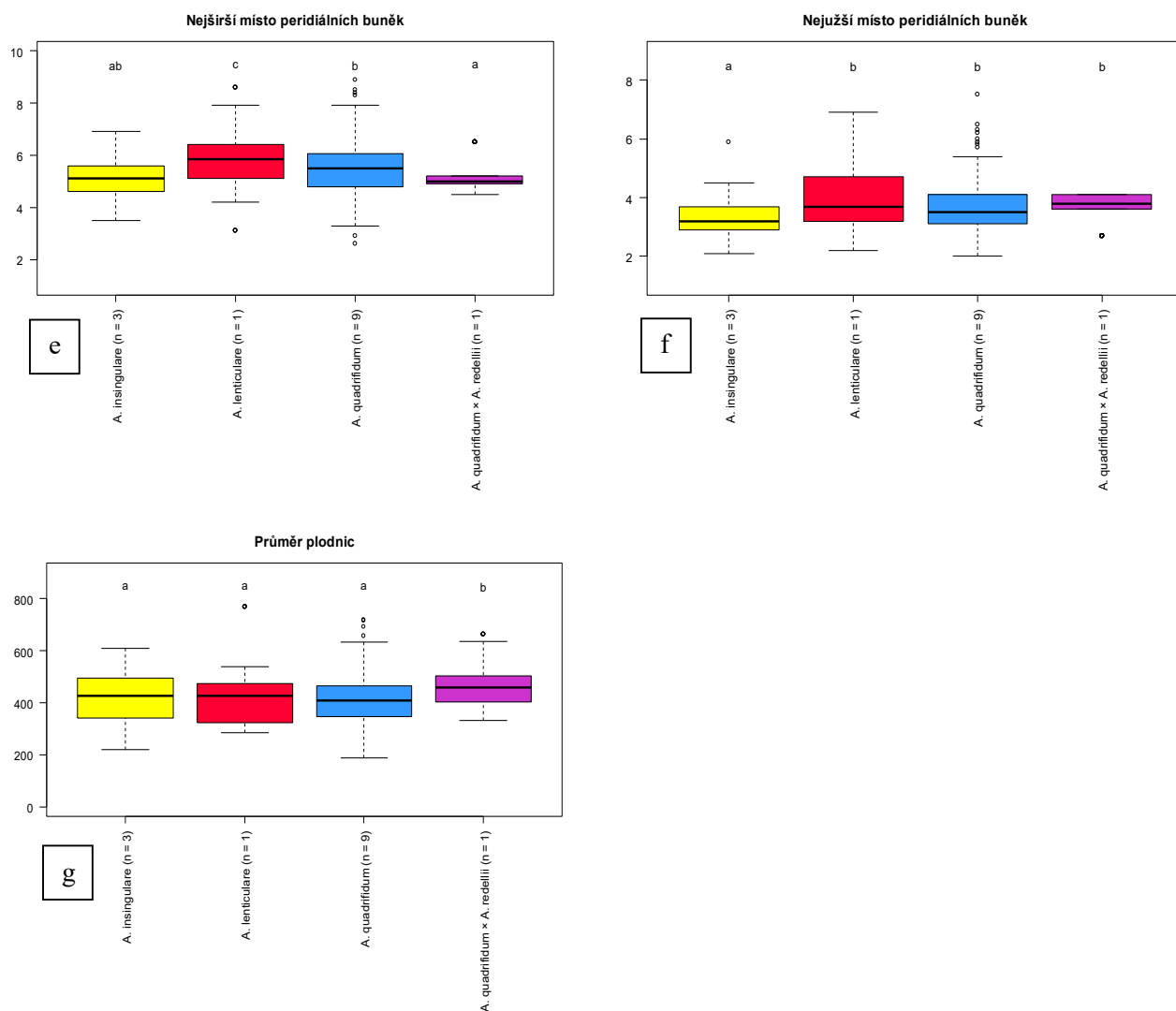
(Obrázky 17c, d). Ačkoliv nebyly druhy *A. insingulare* a *A. lenticulare* od sebe na základě délky makrokonidií statisticky významně odlišeny, makrokonidie *A. lenticulare* se výrazně lišily tvarem a počtem buněk (protáhle vejčitý tvar, 2–6-buněčné makrokonidie u *A. lenticulare* oproti kyjovitému tvaru 2–3-buněčných makrokonidií u *A. insingulare*). Délka a tvar makrokonidií by se tedy dal u těchto druhů považovat za dobrý determinační znak. Druh *A. redellii* se od kmenů *A. quadrifidum* odlišoval v šířce mikrokonidií, délce makrokonidií a septaci makrokonidií (pozorovány pouze 2-buněčné makrokonidie). Je ale nutné brát v potaz, že rozměry konidií pro *A. redellii* musely být získány z kultur inkubovaných na MEA při 17 °C (druh neroste při 25 °C), kdežto rozměry všech ostatních druhů byly odečítány na MEA při 25 °C. Rozměrové odlišnosti tedy nutně nemusejí být odrazem rozdílů mezi druhy, ale mohou být způsobeny odlišnými kultivačními podmínkami.



Obrázek 17 (a-d). Porovnání délky a šířky mikro- a makrokonidií u druhů z *T. terrestris* komplexu kultivovaných 14 dní na MEA při 25 °C. U druhu *A. redellii* byla měření získána pouze pro izolát CCF 5974 rostoucí při 17 °C. Rozdílná písmena nad jednotlivými boxploty znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) ve velikostech konidií mezi druhy zjištěnými Tukeyho HSD testem. Boxploty znázorňují medián, interkvartilové rozpětí, horní/dolní kvartil + 1,5 násobek interkvartilového rozpětí (vousy) a odlehle hodnoty (kolečka).

Znaky na pohlavním stádiu jsou považované za důležité determinační znaky u řady skupin vřeckovýtrusných hub. Šířka askospor spolu s délkou a šířkou vřecek oddělily dvě skupiny druhů se statisticky významně odlišnými rozměry, tj. *A. insingulare* s *A. quadrifidum* a *A. lenticulare* s křížencem *A. quadrifidum* × *A. redellii* (Obrázky 18a, c, d). Výška askospor odlišila druh *A. quadrifidum* od zbylých dvou druhů a křížence *A. quadrifidum* × *A. redellii* (Obrázek 18b). Rozměr nejširšího místa buněk peridiálních hyf signifikantně odlišil druh *A. lenticulare* od ostatních druhů (Obrázek 18e), kdežto v rozměru nejužšího místa buněk peridiálních hyf se lišil *A. insingulare* od zbývajících druhů (Obrázek 18f). Spolu s tvarovou odlišností (*A. lenticulare* symetrické = činkovité se spojujícím můstkem ve středu buněk versus *A. insingulare* a *A. quadrifidum* asymetrické = činkovité se spojnicí mimo střed koncových částí buňky) lze tedy rozměry peridiálních buněk považovat za vhodný determinační znak u druhů *T. terrestre* komplexu. Plodnice křížence *A. quadrifidum* × *A. redellii* se velikostí lišily od zbylých tří druhů (Obrázek 18g). Druh *A. lenticulare* se významně lišil ve většině rozměrů od dvojice druhů *A. insingulare* a *A. quadrifidum*. Až na rozměr nejužšího místa buňky peridiální hyfy se druh *A. quadrifidum* neshodoval s křížencem *A. quadrifidum* × *A. redellii* v žádném rozměru (Obrázky 18).





Obrázek 18 (a-g). Porovnání rozměrů na pohlavním stádiu (askospory, vřečka, peridiální hyfy, plodnice) u druhů z *T. terrestre* komplexu. Měření probíhala u zralých plodnic vytvořených po 5–17 týdnech při těchto podmínkách: *A. quadrifidum* a *A. q. × A. redellii* – GAA 17 °C, *A. insingulare* – A 2% 17 °C, *A. lenticulare* – půda, pokojová teplota. Rozdílná písmena nad jednotlivými boxploty znázorňují statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) ve velikostech konidií mezi druhy zjištěnými Tukeyho HSD testem. Boxploty znázorňují medián, interkvartilové rozpětí, horní/dolní kvartil + 1,5 násobek interkvartilového rozpětí (vousy) a odlehle hodnoty (kolečka).

Kolonie tvořily všechny druhy převážně vatovité a vločkovité (Tabulka 7). Druh *A. onychocola* tvořil granulární a vločkovité kolonie, druh *A. redellii* tvořil převážně submerzní (= zapuštěné do média) a vatovité kolonie. Rychlost růstu na jednotlivých médiích se mezi druhy výrazně nelišila, s výjimkou druhu *A. redellii*, který jako jediný nebyl schopen růst při 25 °C; rostl ale při 12 a 17 °C. Barva kolonií (obverz) byla většinou bílá až žlutobílá, reverz byl u druhů *A. lenticulare* žlutý až oranžový, u *A. insingulare*, *A. quadrifidum* a *A. redellii* žlutý a u *A. onychocola* a *T. terrestre* červený až tmavě hnědý.

Naměřená data jsou sumarizována v Tabulkách 7 a 8. Makro- a mikromorfologické charakteristiky jednotlivých druhů jsou vyobrazeny na fotografických tabulkách (Obrázky 19–26).

Tabulka 7. Rychlost růstu a makromorfologické charakteristiky kolonií u druhů *Trichophyton terrestre* komplexu.

Znak ¹	<i>A. insingulare</i>	<i>A. lenticulare</i>	<i>A. onychocola</i> ²	<i>A. quadrifidum</i>	<i>A. redellii</i> ³	<i>T. terrestre</i>
MEA (25°C, 14 d, mm)	31–40	25–45	23	27–40	0; 12–14 (17°C)	37–45
OA (25°C, 14 d, mm)	28–37	26–34	23	30–38	0; 9 (17°C)	33–39
PDA (25°C, 14 d, mm)	29–36	29–45	25–27	25–41	0; 12 (17°C)	31–39
SAB (25°C, 14 d, mm)	32–40	32–42	24–26	35–43	0; 12 (17°C)	38–46
MEA (textura)	vatovitá až vločkovitá (= floccose)	vločkovitá	granulární	vločkovitá až granulární	vatovitá	vatovitá
OA (textura)	vatovitá	vatovitá až vločkovitá	granulární	vatovitá až granulární	submerzní	vatovitá
PDA (textura)	vatovitá	vatovitá	granulární	vatovitá až granulární	submerzní	vatovitá
SAB (textura)	vatovitá	vatovitá až vločkovitá	vločkovitá	vatovitá	submerzní	vločkovitá
MEA (barva)						
obverz	bílá (1A1)	bílá (1A1)	nažloutle bílá (2A2)	bílá (1A1)	bílá (1A1), okraje nažloutle bílé (4A2)	1A1 (bílá)
reverz	světle žlutá (4A3–5)	nažloutle bílá (3A2, 4A2), okraje tmavě žluté až oranžové (4A8, 5A8)	světle hnědá (5D8), okraje světle žluté (4A3)	světle žlutá (4A3, 4A4)	pastelově žlutá (3A4), okraje světle žluté (3A2)	hnědooranžová (5C4) až světle hnědá (6D6), okraje světle žluté (3A3)
OA (barva)						
obverz	bílá (1A1) až nažloutle bílá (3A2)	bílá (1A1)	nažloutle bílá (3A2)	bílá (1A1)	bílá (1A1)	bílá (1A1) až světle žlutá (3A3)
reverz	nažloutle bílá (3A2)	nažloutle bílá (3A2, 4A2)	nažloutle bílá (3A2)	nažloutle bílá (3A2) až světle žlutá (4A3)	nažloutle bílá (4A2)	matně žlutá (3B3) až hnědooranžová (7C2)
PDA (barva)						
obverz	bílá (1A1) až nažloutle bílá (3A2)	bílá (1A1) až světle žlutá (2A2, 4A2)	nažloutle bílá (2A2)	bílá (1A1) až nažloutle bílá (1A2)	bílá (1A1)	bílá (1A1), okraje světle žluté (3A3)
reverz	světle žlutá (3A3, 4A4)	světle žlutá (3A5) až žlutooranžová (4A7)	šedooranžová (5B5), okraje světle žluté (4A3)	světle žlutá (3A3, 4A4) až světle oranžová (5A4)	světle žlutá (4A4)	světle hnědá (6D6), okraje pastelově žluté (3A4)
SAB (barva)						
obverz	bílá (1A1)	bílá (1A1) až světle žlutá (2A3)	nažloutle bílá (2A2)	bílá (1A1) až nažloutle bílá (1A2)	bílá (1A1) až nažloutle bílá (2A2)	bílá (1A1) až nažloutle bílá (1A2)
reverz	světle žlutá (3A3, 4A4)	žlutá (3A6) až žlutooranžová (4A7)	pastelově žlutá (3A4), okraje světle hnědé (7D5)	máslově žlutá (4A5), okraje světle žluté (3A3)	světle žlutá (4A5)	tmavě hnědá (8F7), okraje světle žluté (2A3)

¹ Kódy v závorkách u barev kolonií odpovídají barvám uvedeným v Kornerup & Wanscher (1978). Textura kolonií byla charakterizována podle Otčenáška a Dvořáka (1973).

² Rychlost růstu kolonií druhu *A. onychocola* byla měřena pouze u izolátu CCF 5927.

³ Rychlost růstu kolonií druhu *A. redellii* byla měřena pouze u izolátu CBS 134551 při 17°C.

Tabulka 8. Mikromorfologické charakteristiky nepohlavního a pohlavního stádia u druhů *Trichophyton terrestre* komplexu.

Znak ^{1,2,3}	<i>A. insingulare</i>	<i>A. lenticulare</i>	<i>A. onychocola</i> ⁴	<i>A. quadrifidum</i>	<i>A. redellii</i> ⁵	<i>T. terrestre</i> ⁶
Mikrokonidie (tvar, délka × šířka, μm)	hruškovité, kyjovité (3–) 4–6 (–11) × (1,5–) 2,5–3	kyjovité (3–) 4–6 (8) × (1,5) 2–3	kyjovité 3,5–5 (–6,5) × 2–3	hruškovité, kyjovité (2–) 3,5–6 (–12) × 2–3 (–4)	vejčité, kyjovité (3–) 4–5,5 (–6,5) × 3–4	hruškovité, kyjovité (2,5–) 3,5–5 × 2,5–3
Makrokonidie (počet buněk; délka × šířka, μm)	2–3-buněčné kyjovité (4,5–) 5,5–10 (–12) × 2,5–3	2–6-buněčné protáhle vejčité, kyjovité (5,5–) 9–20 (–33) × 3–4,5 (–6)	netvoří se	2–4-buněčné protáhle vejčité, kyjovité (4,5–) 7,5–15 (–35) × (2–) 3,5–4,5	2-buněčné kyjovité (4–) 5,5–8,5 (–12,5) × 3,5–4,5	— —
Arthrokonidie (délka × šířka, μm)	(4–) 5–8,5 (–11) × 2–3,5	(4–) 5–12 (–19) × 1,5–2,5	—	7–10 × 2–2,5	—	4,5–10,5 (–12,5) × 2–2,5
Větvení konidioforu	jednoduchý konidiofor (přisedlé konidie), větvení 1. stupně (mikrokonidie jednotlivě na krátkých postranních větvích) a 2. stupně (postranní větve se dále větví)	větvení 1. stupně, jednoduchý konidiofor	jednoduchý konidiofor, větvení 1. a 2. stupně	jednoduchý konidiofor, větvení 1. a 2. stupně	jednoduchý konidiofor, větvení 1. a 2. stupně	větvení 1. stupně, jednoduchý konidiofor
Pohlavní systém	heterothalický	heterothalický	heterothalický	heterothalický	heterothalický (?) ⁷	heterothalický (?) ⁸
Plodnice (průměr, μm)	(200–) 300–500 (–600)	300–550 (–750)	400–600 (–750)	(150–) 300–500 (–700)	400–550 (–650)	
Peridiální buňky (úzké; široké místo, μm)	asym. i symetrické, 2,5–4 (–6); (3,5–) 4,56 (–7)	symetrické, (2–) 3–5 (–7); (3–) 5–7 (–8,5)	symetrické, 2,5–5; 1,5–3	asymetrické (2–) 3–4,5 (–7,5); (2,5–) 4,5–6,5 (–8,5)	asymetrické, 3–4; 4,5–6	
Vřečka (délka × šířka, μm)	5–7 (–8,5) × 4,5–6	5–6 × 4–5	5–6 (průměr)	(4,5–) 5,5–7 (–8) × (3,5–) 4,5–5,5 (–7)	(3,5–) 4,5–6 × (2,5–) 3,5–5	pohl. stádium neznámé
Askospory (šířka × výška, μm)	2,5–4 × 1–2	2–3 × 1–1,5	2–3 × 1,5–2	2,5–3,5 × 1–2	2–3 × 1–2	

¹ Měření na pohlavním stádiu probíhala u zralých plodnic vytvořených po 5–17 týdnech při těchto podmínkách: *A. quadrifidum* a *A. q.* × *A. redellii* – GAA 17 °C, *A. insingulare* – A 2% 17 °C, *A. lenticulare* – půda, pokojová teplota (jen křížení UAMH 2900 × CBS 307.65).

² Dlouhá pomlčka — vyjadřuje nezměřený údaj.

³ Tvary konidií byly charakterizovány podle popisů v knize Otčenáška a Dvořáka (1973).

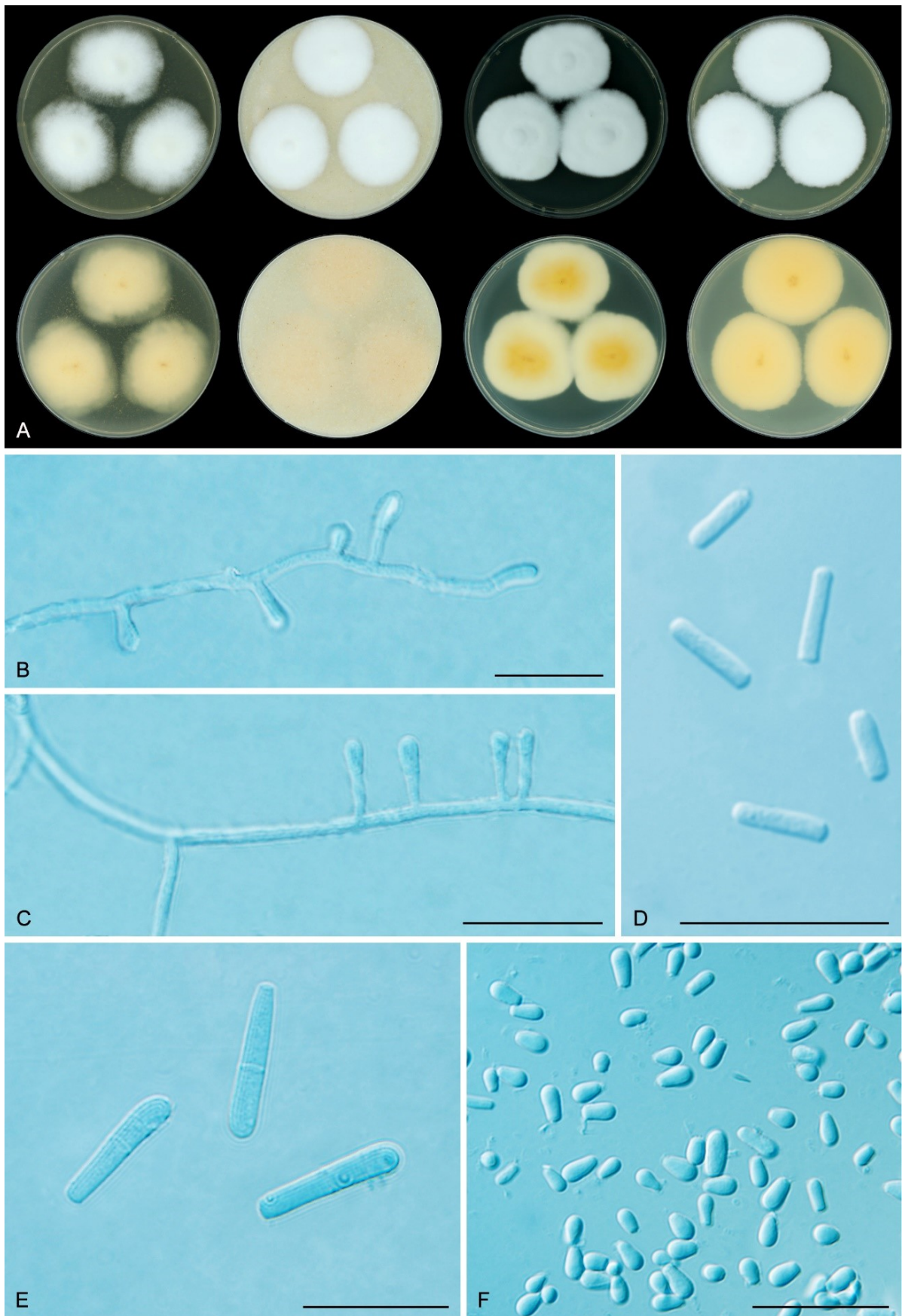
⁴ Údaje o pohlavním stádiu byly převzaty z Hubka *et al.* (2015).

⁵ Mikromorfologické znaky nepohlavního stádia *A. redellii* byly měřeny u izolátu CCF 5974 tvořícího pouze 2-buněčné makrokonidie. Znaky na nepohlavním stádiu byly měřeny u kříženců *A. quadrifidum* × *A. redellii*.

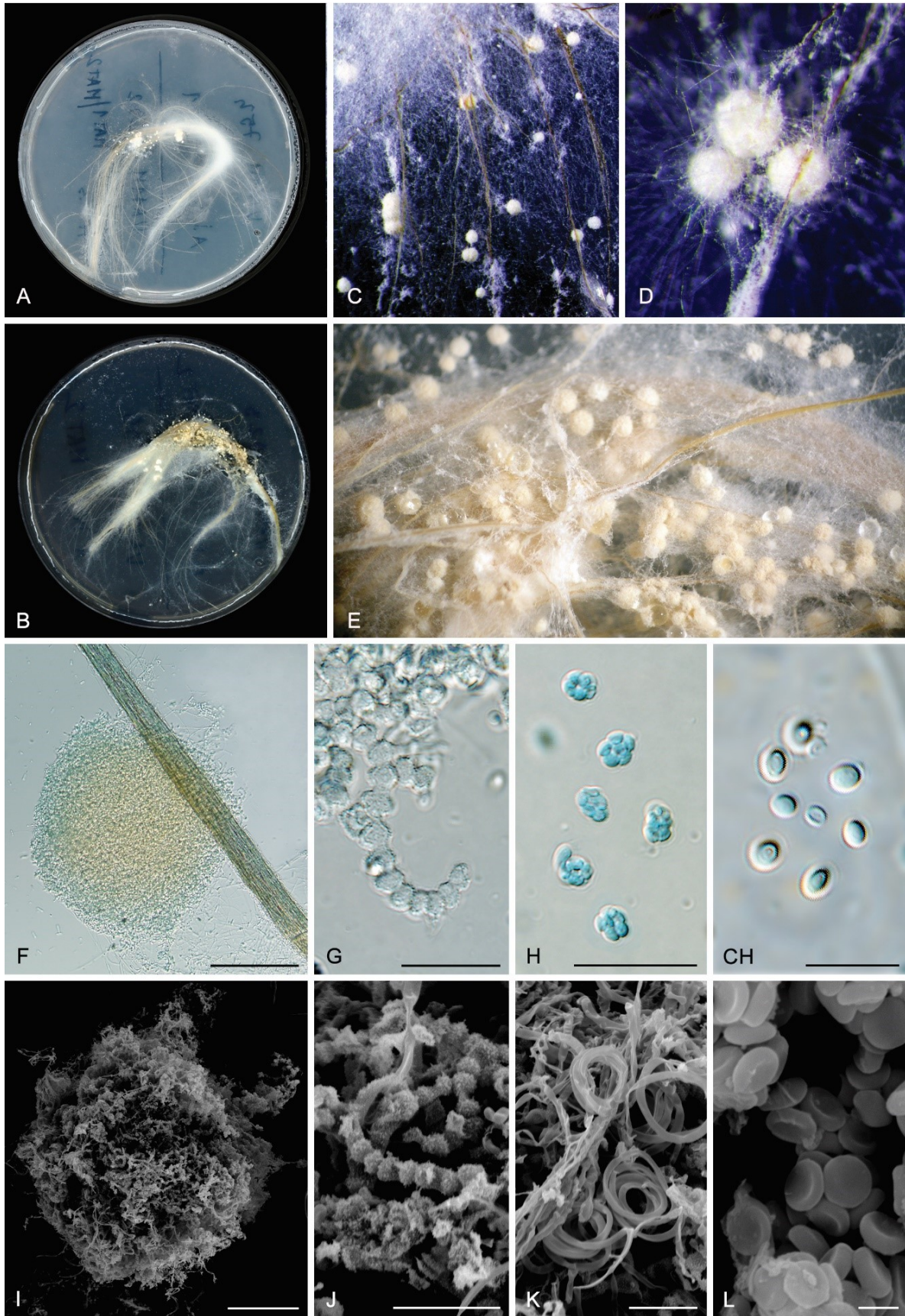
⁶ U *T. terrestre* nebyly změřeny makrokonidie, jelikož nebyly ve 14 dní staré kultuře kultivované ve tmě na MEA při 25 °C nalezeny.

⁷ U *A. redellii* byly dostupné pouze kmeny s *MAT1-1-1* idiomorfou.

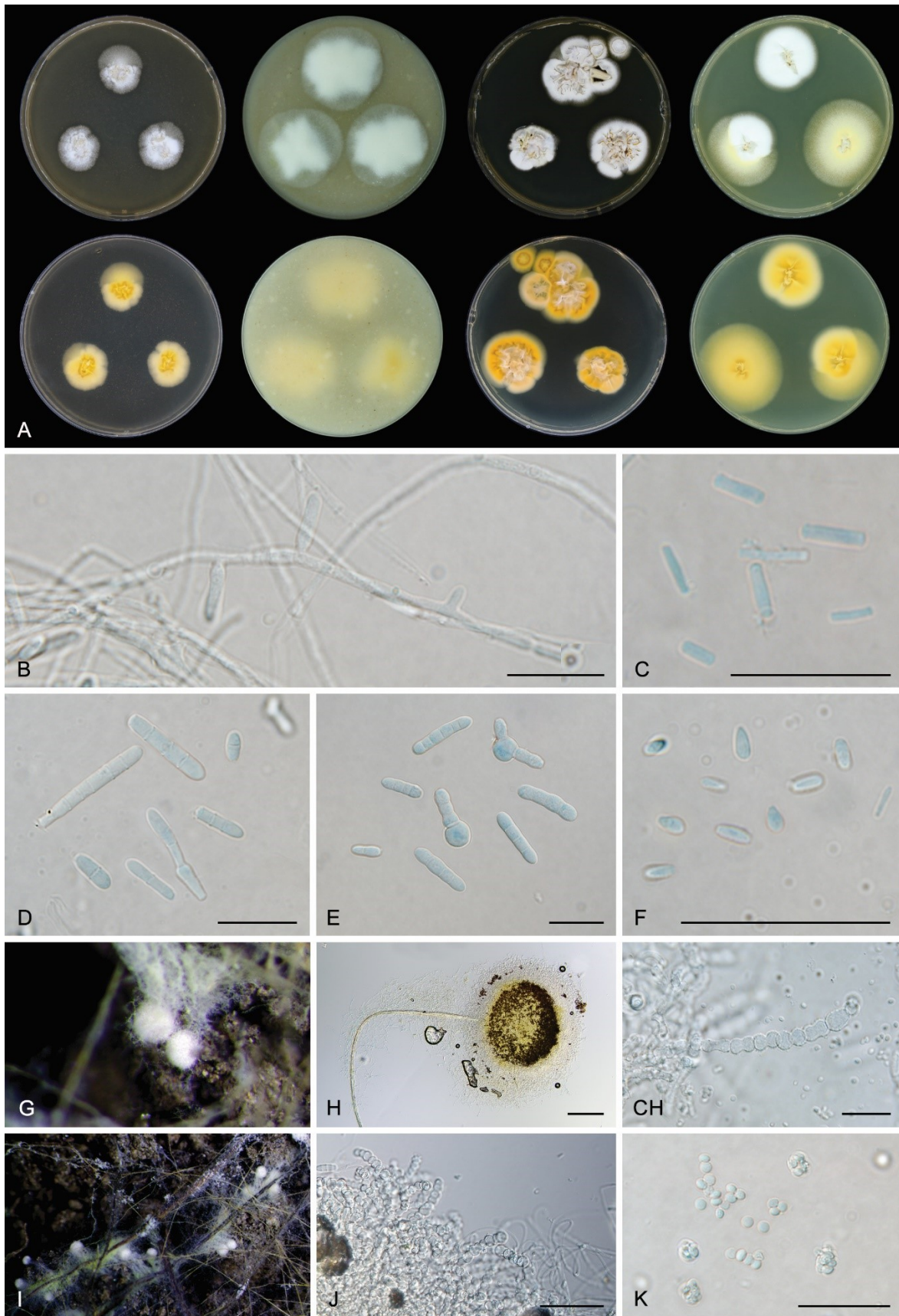
⁸ U *T. terrestre* byly dostupné pouze kmeny s *MAT1-2-1* idiomorfou.



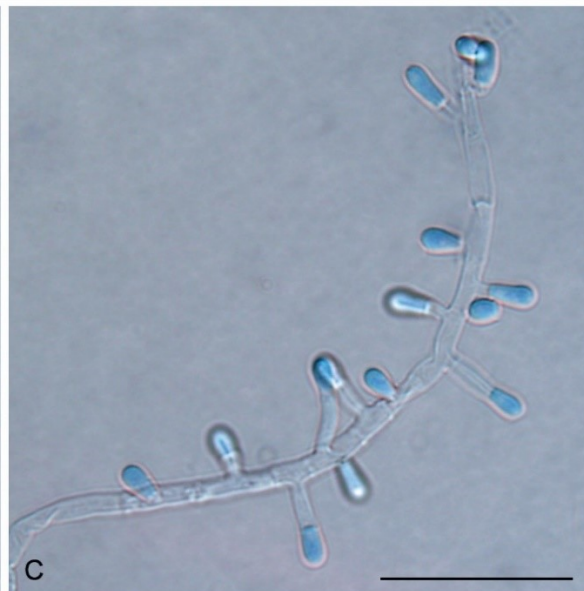
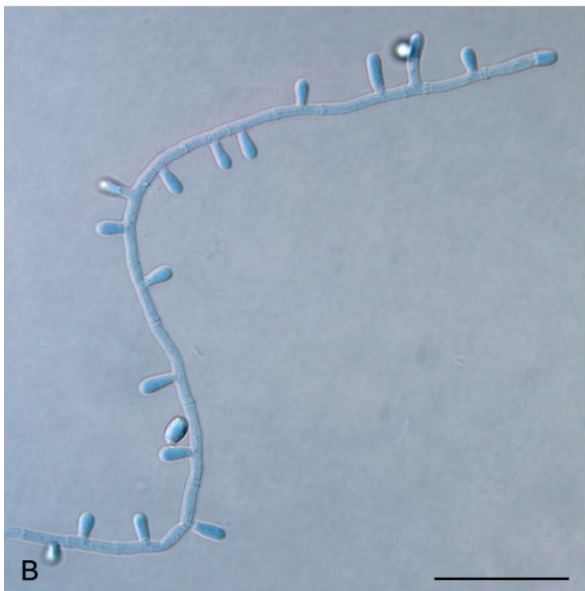
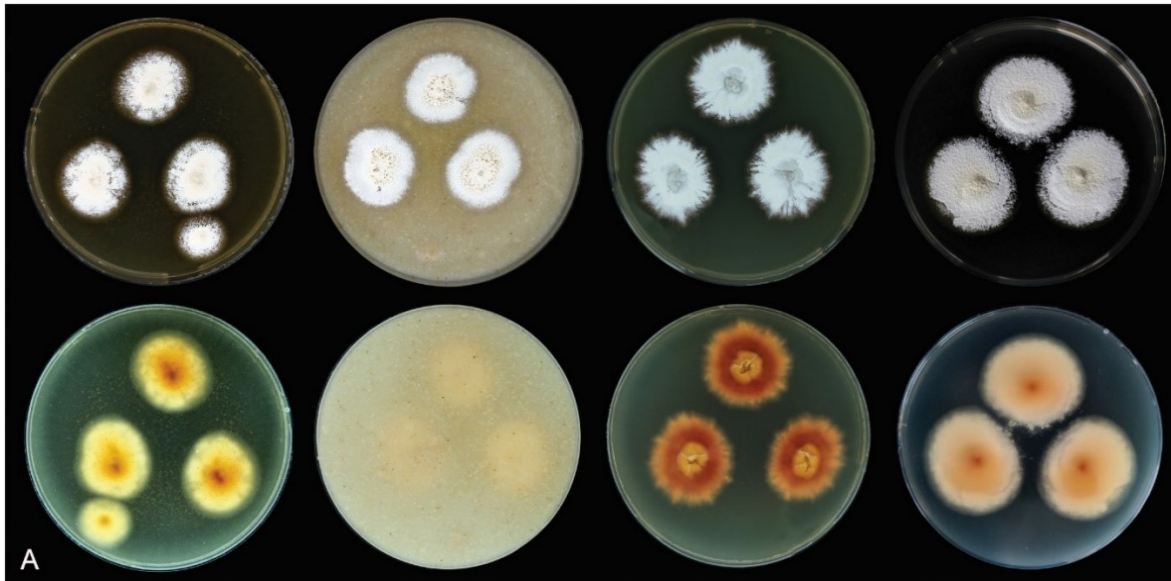
Obrázek 19. Nepohlavní stádium *Arthroderma insingulare*. A. Kolonie na médiích (zleva) MEA, OA, PDA a SAB; horní řada obverz, spodní reverz; kultivace 14 dní při 25 °C. B, C. Konidiofory. D. Arthrokonidie. E. Makrokonidie. F. Mikrokonidie. Měřítka 20μm.



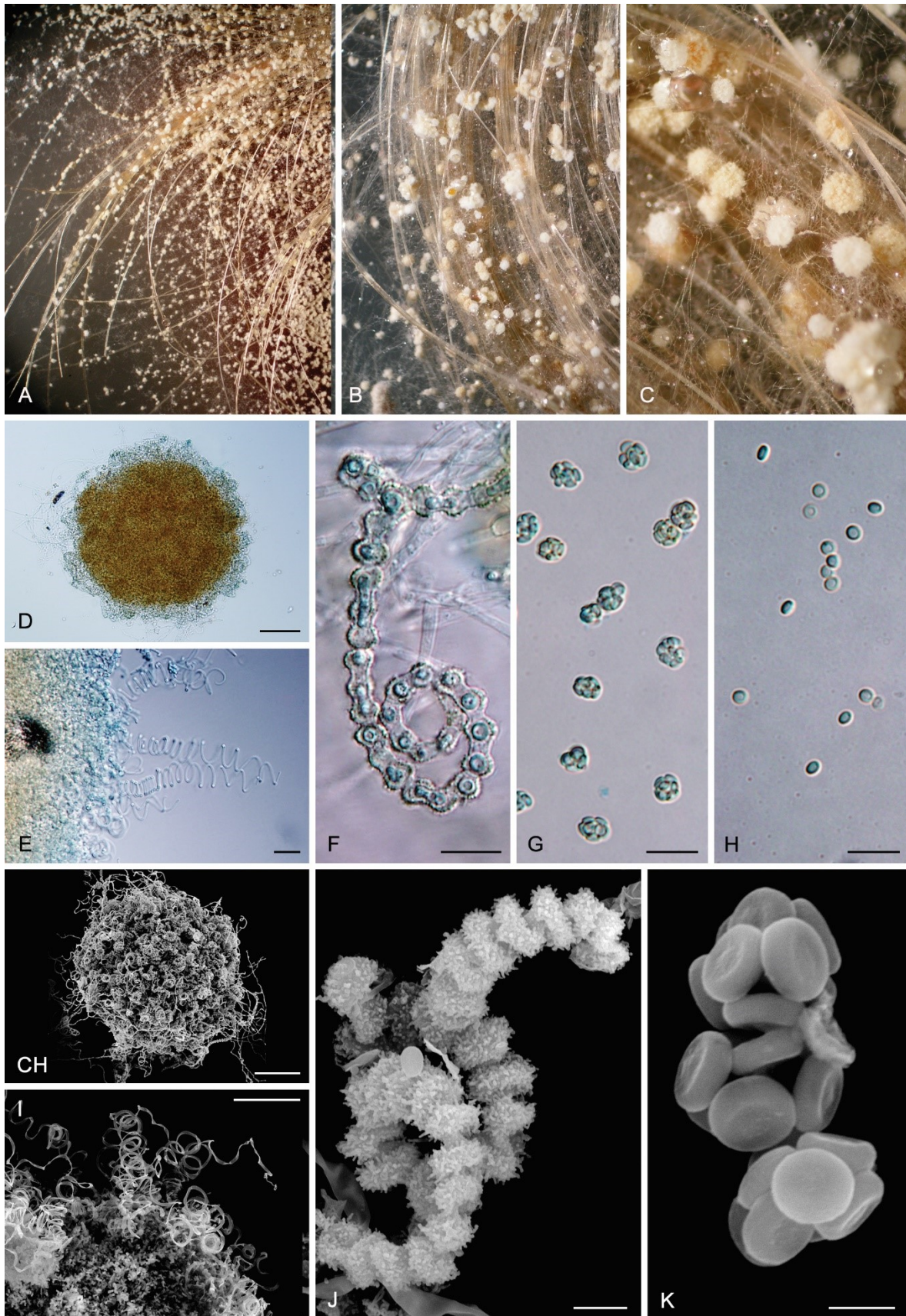
Obrázek 20. Pohlavní stádium *Arthroderma insingulare*. A-B. Křížení *in vitro*. C-D. Plodnice. F. Plodnice vyrůstající na dětském vlasu. G. Asymetrická peridiální hyfa. H. Vřečka. CH. Askospory. I. SEM - plodnice. J. SEM - peridiální hyfy. K. SEM - spirální hyfy. L. SEM - vřečka a askospory. Měřítka: F = 200 μm ; G, H, J, K = 20 μm ; CH = 10 μm ; I = 100 μm ; L = 2 μm .



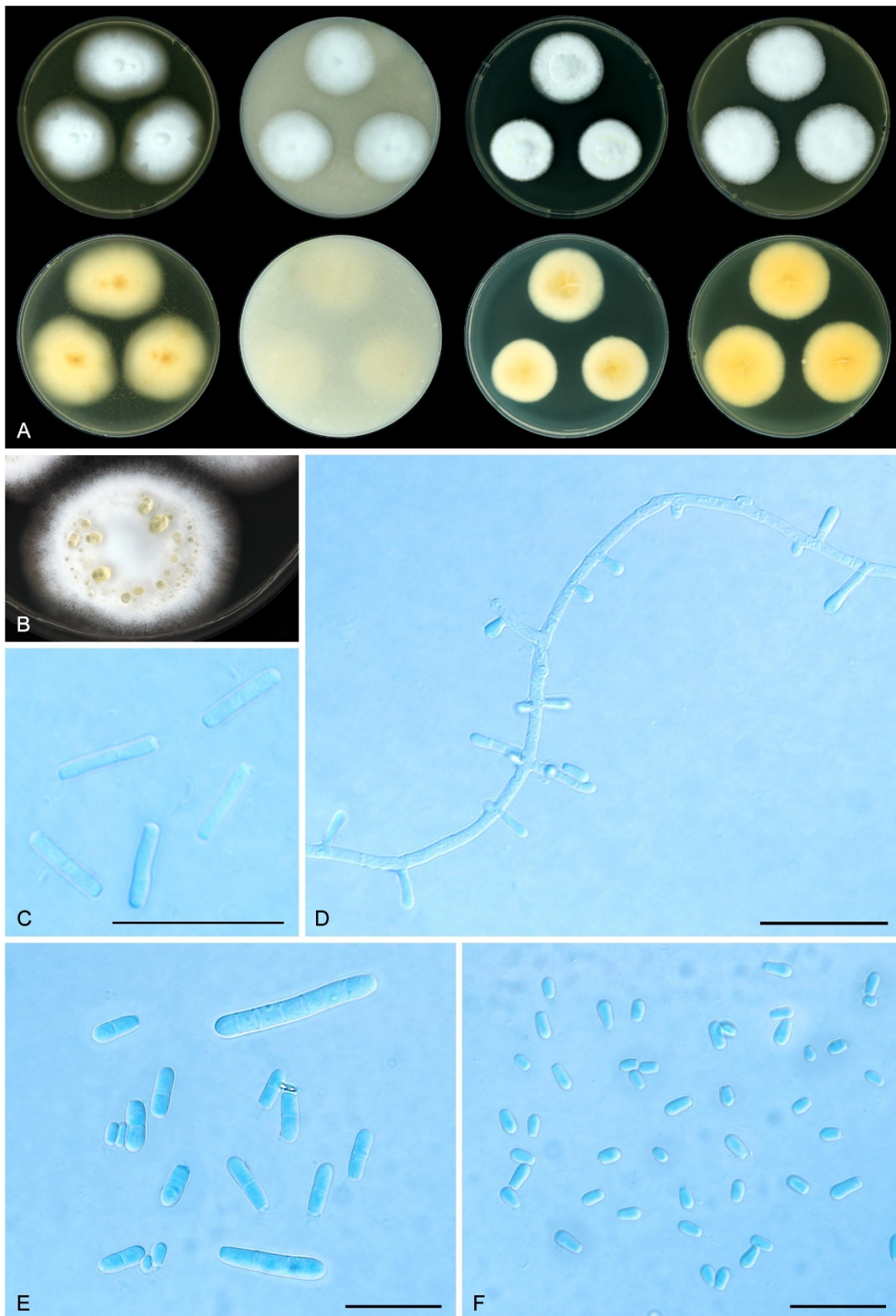
Obrázek 21. Pohlavní i nepohlavní stádium *Arthroderma lenticulare*. A. Kolonie na médiích (zleva) MEA, OA, PDA a SAB; horní řada obverz, spodní reverz; kultivace 14 dní při 25 °C. B. Konidiofor. C. Arthrokonidie. D, E. Makrokonidie. F. Mikrokonidie. G, H, I. Plodnice. CH. Symetrické peridiální hyfy. J. Peridiální a spirální hyfy. K. Vřetka s askosporami. Měřítka: B-F, CH, K = 20 µm; H = 200 µm; J = 50 µm.



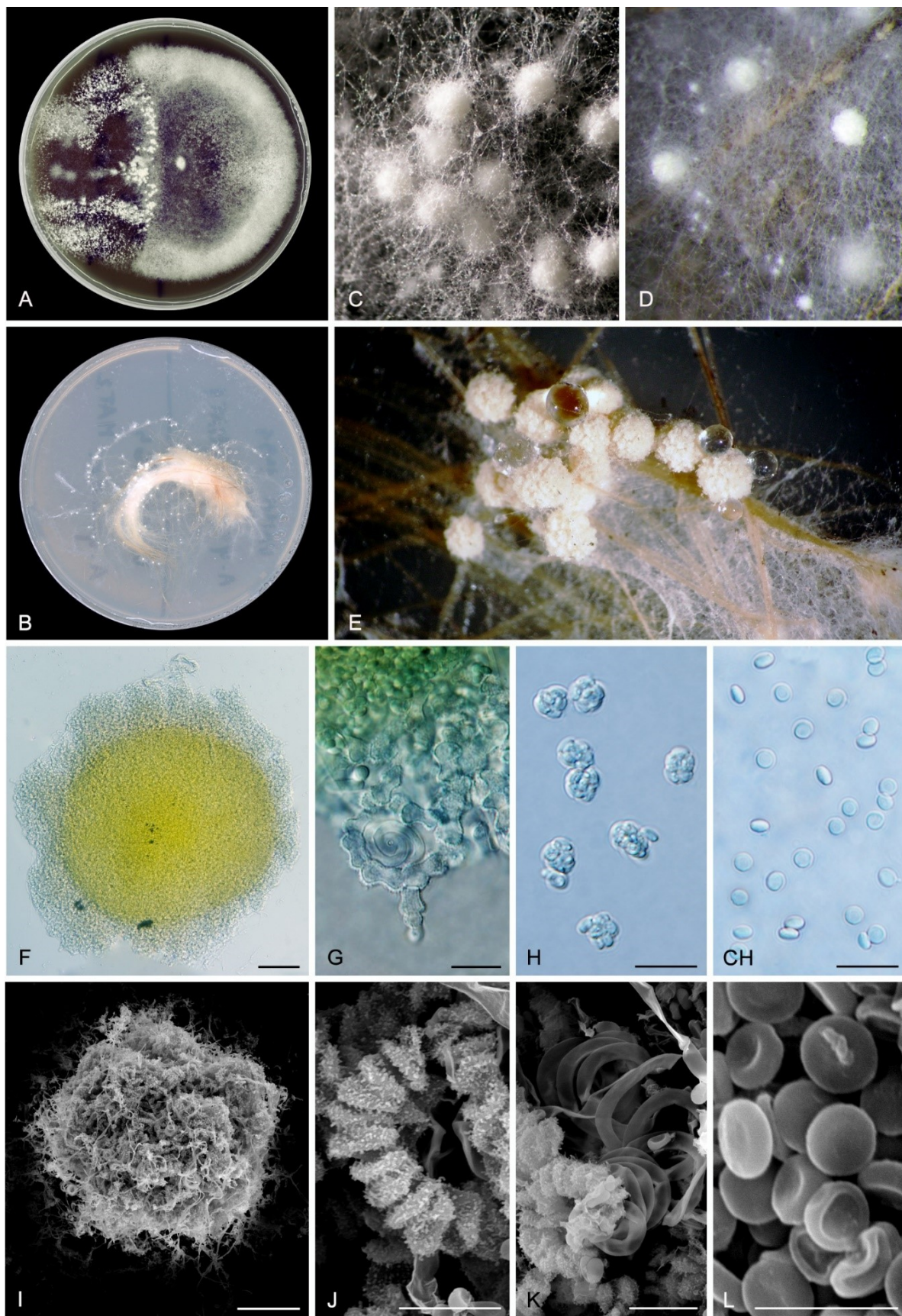
Obrázek 22. Nepohlavní stádium *Arthroderma onychocola*. A. Kolonie na médiích (zleva) MEA, OA, PDA a SAB; horní řada obverz, spodní reverz; kultivace 14 dní při 25 °C; foto kolonie na PDA Vít Hubka. B-D. Konidiofor. E. Mikrokonidie. Měřítka 20 μm.



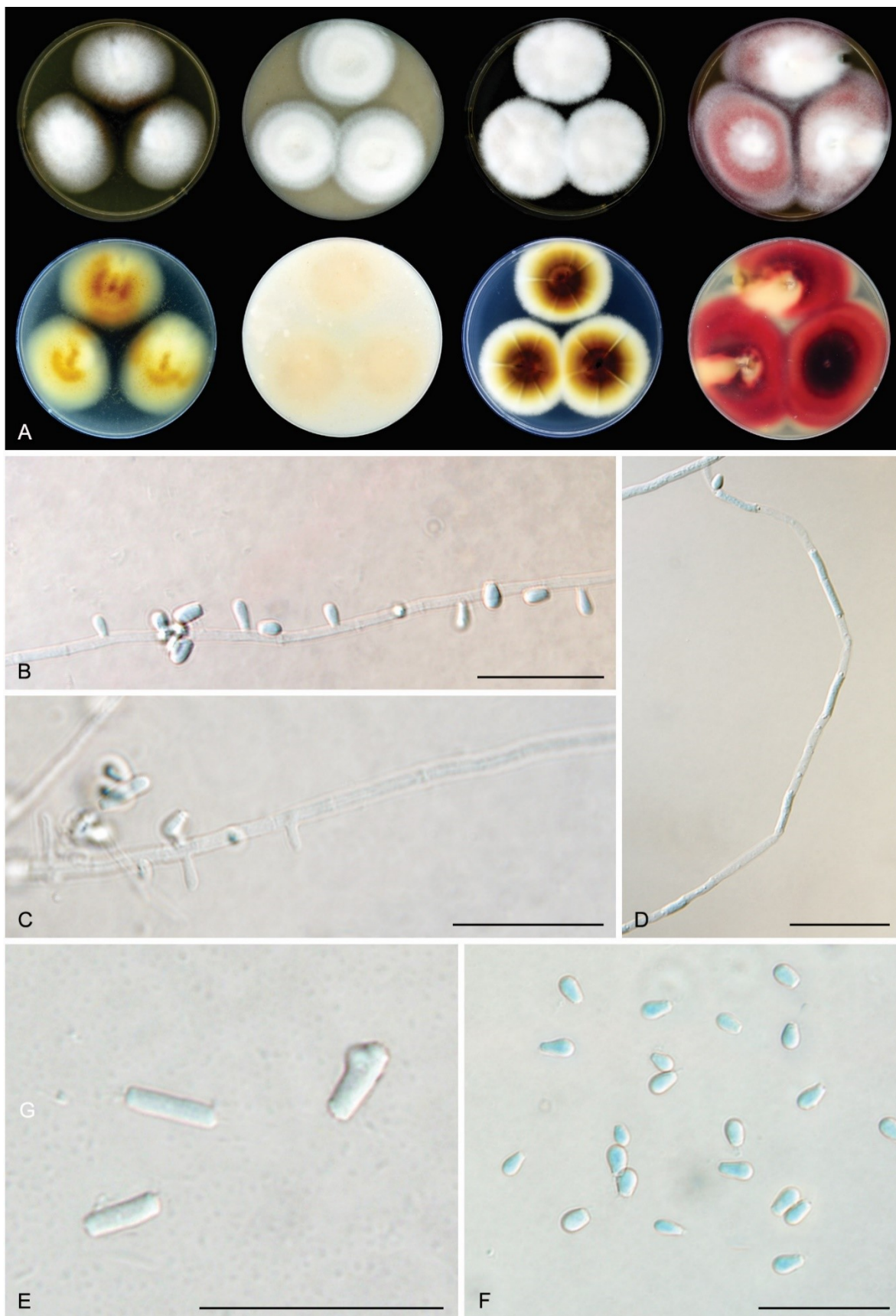
Obrázek 23. Pohlavní stádium *Arthroderma onychocola*. A-D Plodnice. E. Spirální hyfy. F. Peridiální hyfy. G. Vřeka. H. Askospory. CH. SEM – plodnice. I. SEM – spirální hyfy. J. SEM - peridiální hyfy. K. SEM - askospory v rozpadajících se vřecích. Měřítka: D, CH = 100 μm ; E = 20 μm ; F-H = 10 μm ; I = 50 μm ; J = 5 μm ; K = 2 μm . foto Vít Hubka



Obrázek 24. Nepohlavní stádium *Arthroderma quadrifidum*. A. Kolonie na médiích (zleva) MEA, OA, PDA a SAB; horní řada obverz, spodní reverz; kultivace 14 dní při 25 °C. B. Detail kolonie na PDA vylučující roztok sekundárních metabolitů (exudát). C. Arthrokonidie. D. Konidiofor. E. Makrokonidie. F. Mikrokonidie . Měřítka 20 µm.



Obrázek 25. Pohlavní stádium *Arthroderma quadrifidum*. A, B. Křížení *in vitro*. C-F. Plodnice. G. Asymetrické peridiální hyfy. H. Vřecka. CH. Askospory. I. SEM – plodnice. J. SEM – peridiální hyfa. K. SEM – spirální hyfa. L. SEM – askospory. Měřítko: F, I = 100 μm ; G-CH, J, K = 10 μm ; L = 5 μm .



Obrázek 26. Nepohlavní stádium *Trichophyton terrestre sensu stricto*. A. Kolonie na médiích (zleva) MEA, OA, PDA a SAB; horní řada obverz, spodní reverz; kultivace 14 dní (PDA 21 dní) při 25 °C. B, C. Konidiofy. D, E. Arthrokonidie. F. Mikrokonidie. Měřítka 20 µm.

3.5 Viabilita a klíčivost askospor

Pro stanovení viability a klíčivosti askospor byl použit průtokový cytometr (Obrázek 27) a cell sorter. Dostatečné množství materiálu pro stanovení viability a klíčivosti askospor se podařilo získat jen u některých křížení u druhů *A. insingulare*, *A. quadrifidum* a *A. quadrifidum* × *A. redellii* (Tabulka 9). Pro zjištění těchto hodnot u *A. lenticulare* nebyl získán dostatečný počet plodnic (byly spotřebovány pro měření mikromorfologie). Kvůli časové náročnosti indukce pohlavního stádia u tohoto druhu nebylo možné tento údaj doplnit před termínem odevzdání diplomové práce.

Tabulka 9. Životaschopnost (viabilita) a klíčivost askospor u křížení druhů *T. terrestre* komplexu.

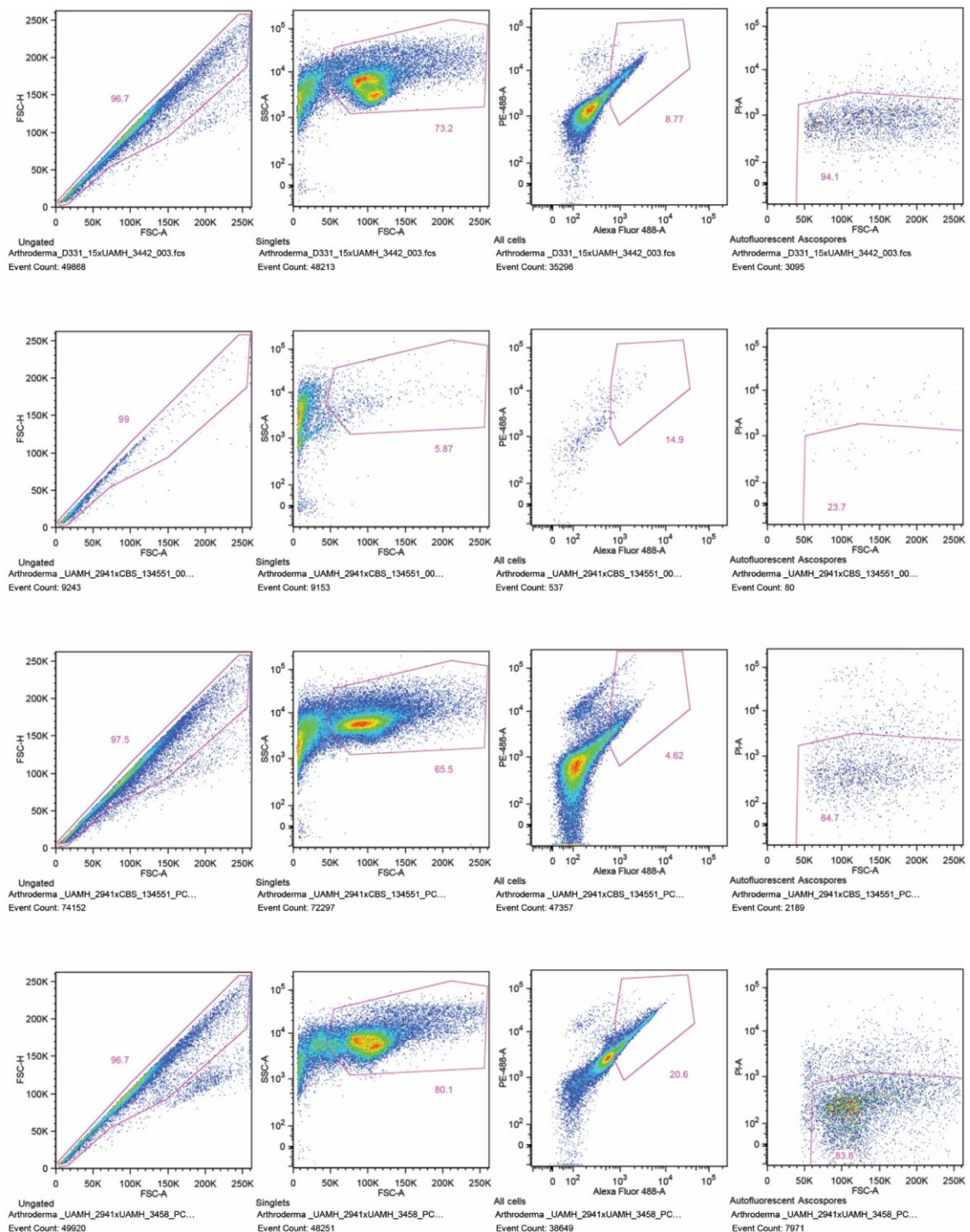
Druh	Křížení, médium, teplota	Viabilita	Klíčivost
<i>A. insingulare</i>	D 331_15 × SK 1555_16 A 17°C	92 %	8 %
	D 331_15 × UAMH 3442 A 17°C	95 %	14 %
<i>A. quadrifidum</i>	UAMH 794 × UAMH 864 GAA 17°C	99 %	66 %
	UAMH 2527 × UAMH 864 GAA 12°C	98 %	38,5 %
	UAMH 794 × UAMH 763 GAA 17°C	—	53 %
	UAMH 1491 × UAMH 755 GAA 17°C	—	37 %
	UAMH 1491 × UAMH 864 PCA 17°C	—	53 %
	UAMH 1491 × UAMH 2941 PCA 17°C	—	36,5 %
	UAMH 794 × KVK 2380_11 GAA 17°C	—	43 %
	UAMH 864 × D 51_16 GAA 17°C	—	63 %
	UAMH 2941 × UAMH 3458 GAA 17°C	91 %	30 %
	UAMH 2941 × UAMH 3458 PCA 17°C	95 %	70 %
<i>A. quadrifidum</i> × <i>A. redellii</i>	UAMH 2941 × CBS 134.551 PCA 17°C	86 %	14 %

Pozn.: Dlouhá pomlčka — značí nezměřené hodnoty. Hodnota klíčivosti značí průměr ze 4 provedených měření u jednoho vzorku.

Vzhledem k malému počtu získaných měření z nich nelze vyvozovat zásadní závěry. Obecně se předpokládá zejména velký význam klíčivosti askospor při odhalování mezidruhových hybridů u hub. Ta by měla být nízká u hybridů v porovnání s vlastními biologickými druhy, jak ukázaly např. experimenty u rodů *Neurospora* (Dettman *et al.* 2003) a *Aspergillus* (Sugui *et al.* 2014). Význam viability askospor není známý, ale cílem zde bylo zjistit, jestli její hodnoty koreluje s klíčivostí.

I přes malý počet získaných měření lze pozorovat u kříženců druhů *A. insingulare* a *A. quadrifidum* vysokou míru viability (přes 90 %). U křížence mezi *A. quadrifidum* a *A. redellii* je viabilita nižší než 90 %. V porovnání s viabilitou byla míra klíčivosti ve všech případech výrazně nižší. U *A. quadrifidum* byla průměrná klíčivost 49 %, u *A. insingulare* 11 % a u křížence *A. quadrifidum* × *A. redellii* 14 %. Nízká míra klíčivosti by mohla vypovídat o přítomnosti mezidruhových hybridů a tedy i kryptické speciace v rámci fylogenetických druhů. To je ale u *A. insingulare* vzhledem k výsledkům fylogeneze a morfologické analýzy velmi nepravděpodobné. U křížence mezi *A. quadrifidum* a *A. redellii* je snižena jak viabilita, tak klíčivost. Tento výsledek by tedy mohl ukazovat na rozvoj postzygotických reprodukčních bariér (sterilita, nižší fitness). Výsledky morfologické analýzy spolu s faktem, že *A. redellii* neroste při 25 °C oproti *A. quadrifidum*, také

podporují možnost, že by *A. redellii* mohl být samostatný druh. Fylogenetická analýza je s tímto závěrem ale v rozporu.



Obrázek 27. Data z průtokové cytometrie analyzovaná v programu FlowJo 7.6.1. Grafy v posledním sloupci zobrazují živé autofluorescentní askospory u měřených vzorků (označeno fialovým rámováním). 1. řádek. D 331_15 × UAMH 3442. 2. řádek. UAMH 2941 × CBS 134551_GAA. 3. řádek. UAMH 2941 × CBS 134551_PCA. 4. řádek. UAMH 2941 × UAMH 3458. Z grafu v posledním sloupci druhého řádku je patrné, že vzorek obsahoval velmi málo živých askospor.

4 DISKUZE

4.1 Fylogeneze a taxonomie rodu *Arthroderma*

Fylogenetických studií zabývajících se rodem *Arthroderma* je velmi málo. Ve většině případů se nejedná o studie, které by zahrnovaly větší množství izolátů v rámci druhů, ale jde spíše o studie popisující jednotlivé nové druhy. Tyto studie jsou v podstatě bez výjimky založeny na sekvencích ITS oblasti rDNA. Mezi nové druhy popsáné v éře molekulárních dat patří *Arthroderma olidum* s nepohlavním stádiem *Trichophyton eboreum* (dnes *A. eboreum*) (Brasch & Gräser 2005, Campbell *et al.* 2006), *T. redellii* (dnes *A. redellii*) (Lorch *et al.* 2015) a *T. onychocola* (dnes *A. onychocola*) (Hubka *et al.* 2014b). Zbylé druhy byly většinou popsány před nástupem molekulárních metod na základě morfologie a biologického konceptu.

V rámci dermatofytů byl rod *Arthroderma* pomocí molekulárních dat vymezen ve studiích Gräser *et al.* (2008) a de Hoog *et al.* (2017). De Hoog *et al.* (2017) převedli geofilní druhy *Trichophyton*, některé druhy *Microsporium* a *Chrysosporium* vyskytující se v kladu *Arthroderma* do tohoto rodu a zvolili pro ně jediné platné jméno *Arthroderma* podle principu „One fungus, one name“. K tomu bylo zapotřebí zavést nové kombinace pro následující druhy: *A. amazonicum* (dříve *Microsporium amazonicum*), *A. eboreum* (dříve *Trichophyton eboreum*), *A. onychocola* (dříve *T. onychocola*), *A. redellii* (dříve *T. redellii*), *A. thuringiense* (dříve *T. thuringiense*) a *A. vespertilii* (dříve *Chrysosporium vespertilii*).

Povinnost určení typové položky při popisu nových druhů byla zavedena od r. 1958 (Turland *et al.* 2018), proto u dříve popsáných druhů typus i ex-typový kmen často chybí (většina klinicky významných dermatofytů i některé geofilní druhy). Tyto problémy jsou v současnosti řešeny označením lekto-, neo- nebo epitypu pro tyto taxony. Takto byl nový typ označen u řady dermatofytů v recentních studiích (Gräser *et al.* 1999, Gräser *et al.* 2000b, de Hoog *et al.* 2017). V poslední jmenované studii byl také stanoven typus pro druh *A. curreyi* (zároveň i typový druh rodu *Arthroderma*); jako epityp byl zvolen kmen CBS 353.66. V předchozích studiích byl za referenční kmen *A. curreyi* většinou považován kmen CBS 130.70, který je však podle výsledků této práce sekvenčně vzdálený od druhu *A. curreyi* a spadá nyní do homothalického druhu *A. crocatum*. Přesto jsou sekvence tohoto kmenu v databázi GenBank uváděny stále pod jménem *A. curreyi*.

V této práci byla provedena fylogenetická analýza napříč druhy rodu *Arthroderma*, ve které byly zahrnuty všechny ex-typové izoláty dosud známých druhů. Přínosem této analýzy bylo zejména přidání dvou fylogenetických markerů (*TUB2* a *TEF1α*), které dosud nebyly pro druhy *Arthroderma* dostupné. Spolu s ITS rDNA mají oba nově amplifikované geny velmi dobrou rozlišovací schopnost a budou dobře použitelné nejen pro fylogenezi, ale také pro identifikaci druhů. Počet druhů *Arthroderma* bez pochyby v budoucnu stoupne, jelikož v této práci bylo objeveno 15 linií reprezentujících potenciálně nové druhy, což ale musí potvrdit další morfologické a fyziologické analýzy spolu s analýzou biologických

kompatibilit. Dále je zřejmé, že pro druhy *Chrysosporium magnasporum* a *Ch. oceanitesii*, které fylogeneticky patří do rodu *Arthroderma*, bude nutné zavést nové kombinace jmen.

4.2 Postavení *Trichophyton terrestre* v rodě *Arthroderma*

Druh *T. terrestre* byl na základě morfologických znaků popsán v roce 1957, tedy před povinností určit typovou položku pro platný popis druhu. Autentické kmeny, se kterými původní autoři (Durie & Frey 1957) pracovali, jsou ale k dispozici (UAMH 657 a UAMH 662). Pro jasné ukotvení jména v taxonomickém systému tedy bude nutné vybrat nový typ z dostupného původního materiálu. Tento druh považovaný za nepohlavní stádium druhů *A. quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare* není podle fylogenetické analýzy příbuzný ani jednomu ze tří jmenovaných druhů. Pohlavní stádium *T. terrestre* se v minulosti křížením jeho autentických kmenů nepodařilo navodit, a to pravděpodobně z důvodu stejného párovacího typu obou kmenů (*MAT1-2-1*), jak bylo zjištěno v této práci. V této práci nebyla úspěšná ani křížení mezi *T. terrestre* a dalšími druhy z *T. terrestre* komplexu, což je ve shodě s výraznými fylogenetickými vzdálenostmi od těchto druhů (Obrázky 6 a 12). Druh *T. terrestre* je tedy podle fylogenetického a biologického druhového konceptu samostatným druhem, pro který je nutné vytvořit novou kombinaci jména v rodě *Arthroderma*, podobně jako pro *Ch. magnasporum* a *Ch. oceanitesii* (viz výše).

Od druhů *A. quadrifidum*, *A. insingulare*, *A. lenticulare* se statisticky významně lišil v délce mikrokonidií. Makrokonidie nebyly v této práci u *T. terrestre* pozorovány, přestože původní publikace uvádí jejich přítomnost u tohoto druhu (Durie & Frey 1957). Příčinou může být použití odlišných kultivačních médií. V této práci bylo médium MEA použito jako základní médium pro sledování mikromorfologie napříč druhy. Durie a Frey (1957) pozorovali nejvíce makrokonidií u kultury na půdě s vlasy a méně na SAB s cyklohexamidem. Tomu však odporuje tvrzení Sharma & Sharma (2009), kteří uvádí, že nízká vlhkost média nepřispívá ke sporulaci, přičemž půda je prokazatelně sušším substrátem než uměle připravovaná média.

4.3 Klinicky významné druhy

Rezervoár geofilních dermatofytů je v půdě, odkud také bylo získáno 40 % izolátů pro tuto práci. Více než polovina však byla izolována ze zvířat a lidského klinického materiálu. Fylogenetická analýza rozdělila druhy *Arthroderma* do 8 statisticky dobře podpořených kladů, z nichž 4 (*A. curreyi*, *A. insingulare*, *A. crocatum* a *A. ciferrii* klad) zahrnovaly nejvíce kmenů izolovaných z lidí a zvířat. Klad *A. multifidum* a *A. tuberculatum* tvořily vždy z poloviny izoláty ze zvířat a lidí a z poloviny izoláty z půdy. U kladu *A. silverae* pocházely kmeny napůl ze zvířat (ve dvou případech z hibernujících netopýrů, v jednom případě z mrtvého ptačího mláděte) a napůl z jeskynního sedimentu. Klad *A. uncinatum* obsahoval výhradně kmeny z půdy.

Na zvířecí srsti, peří i na lidské kůži a nehtech se mohou geofilní dermatofyty vyskytovat pouze jako kontaminanty. Pro zjištění, zda se jedná o skutečné původce onemocnění, by měla být provedena přímá mikroskopie (s pozitivním výsledkem) a opakovaná izolace původce bez izolace jiných primárně patogenních dermatofytů (Weitzman & Summerbell 1995). K přesnému druhovému určení patogena z rodu *Arthroderma* se v klinických laboratořích často nepřístupuje a pro klinickou praxi bývá dostačující rodová identifikace nebo identifikace do druhového komplexu. Pokud se k přesné identifikaci přistupuje, je pak většinou zapotřebí použití PCR metod (nejčastěji se využívá sekvenace oblasti ITS rDNA, která je dostupná napříč druhy dermatofytů) nebo metoda MALDI-TOF, pro kterou je však nutné mít v databázi zahrnutý i referenční spektra netradičních druhů, jakými geofilní dermatofyty nepochybně jsou (Nenoff *et al.* 2014). U lidí působí geofilní druhy *Arthroderma* převážně onemocnění tinea corporis a onychomykózu. Léčba probíhá jako ve většině případů dermatomykóz lokálně antimykotiky (Hubka *et al.* 2014b) a při nedostatečném účinku systémově (především u imunodeficientních pacientů) (Brasch & Gräser 2005).

Správná definice druhových hranic je důležitá nejen z taxonomického a epidemiologického hlediska, ale kvůli klinickému významu těchto hub může mít i praktické důsledky. Různé druhy hub, běžně i velmi blízce příbuzné „kryptické“ druhy, mívají odlišné citlivosti k širokospektrálním antimykotikům, a proto má jejich správná identifikace význam pro adekvátní léčbu infekcí (Lackner *et al.* 2012, Pfaller *et al.* 2015, Silva *et al.* 2017, Lyskova *et al.* 2018). U druhů *Arthroderma* není ale jasné, zda správná druhová identifikace může ovlivnit volbu léčby, protože data o antifungálních citlivostech nejsou pro jednotlivé druhy dostupná. V této studii se přitom podařilo zjistit, že minimálně 6 druhů (a 1 nepopsaný) může mít význam pro humánní a 12 druhů (a 9 nepopsaných) pro veterinární medicínu.

4.4 Morfologie

U druhů *T. terrestre* komplexu byly v této práci porovnávány makro- i mikromorfologické znaky. Mnohé studie uvádí produkci červeného až vínového pigmentu do média u druhů tohoto komplexu (Durie & Frey 1957, Dawson & Gentles 1961, Marples & Smith 1962, English 1964, Carmichael & Padhye 1972, Hubka *et al.* 2014b). V této práci se produkce pigmentu nejvíce projevovala na médiích SAB a PDA, kde byl červeně zbarvený reverz pozorován u druhů *A. onychocola* a *T. terrestre* a u kmenu UAMH 2208 (morfologicky určený jako *T. terrestre*; fylogeneticky spadá do druhu *A. curreyi*), a to ve větší míře u starších kultur (3 a více týdnů). Ovesný agar se pro sledování makromorfologických charakteristik ukázal jako nejméně vhodný kvůli jeho nedostatečné průsvitnosti pro stanovení barvy reverzu.

Na základě výsledků statistické analýzy (Tukey HSD test) bylo zjištěno, že vhodnými determinaçními morfologickými znaky u druhů někdejšího *T. terrestre* komplexu, jsou tvar, septace

a délka makrokonidií a dále rozměr nejšířšího místa buněk peridiálních hyf. Tvarem buněk peridiálních hyf lze také rozlišit některé druhy *Arthroderma*. Tyto buňky se dají rozdělit na symetrické, např. u *A. uncinatum* (Dawson & Gentles 1961), *A. gloriae* (Ajello & Cheng 1967), *A. eboreum* (Campbell *et al.* 2006), *A. onychocola* (Hubka *et al.* 2015) a *A. lenticulare* (Pore *et al.* 1965) a asymetrické u *A. quadrifidum* (Dawson & Gentles 1961), *A. gertleri* (Böhme 1967) a *A. insingulare* (Carmichael & Padhye 1972).

Druhy *A. insingulare* a *A. quadrifidum* byly nerozlišitelné ve všech znacích kromě délky makrokonidií, výšky askospor a rozměrů peridiálních hyf. Textura kolonií a barva obverzu a reverzu byla u těchto dvou druhů identická. Ani v případě SEM nebyly u těchto dvou druhů zjištěny žádné výrazné rozdíly ve tvaru či ornamentaci askospor. Pohlavní stádium *A. lenticulare* nebylo v SEM pozorováno kvůli nedostatku dostupného materiálu a jeho úspěšné indukci nedlouho před odevzdáním práce.

Pore a Plunkett (1965) uvedli, že znaky na pohlavním stádiu u rodu *Arthroderma* mají malou determinační hodnotu. Výsledky této práce u druhů *T. terrestre* komplexu přesto ukázaly signifikantní odlišnosti druhů v rozměrech pohlavních struktur. Identifikace druhů podle znaků na pohlavním stádiu je však dosti nepraktická, jelikož nalezení vhodných podmínek pro indukci pohlavního stádia a samotný vznik plodnic (několik týdnů až měsíců) je časově náročný proces. U těchto znaků navíc dochází k častému překryvu hodnot, přestože jsou signifikantně odlišné. V této práci byl také upřednostněn pro pojmenovávání plodnic termín gymnothecium před termínem kleistothecium (Padhye & Carmichael 1971), který je používán ve většině studií popisujících pohlavní stádium rodu *Arthroderma*. Termín gymnothecium (centrální masa věcek obklopená síťovitou strukturou ze spletených hyf, skrz kterou mohou zralé askospory průběžně unikat ven) lépe charakterizuje plodnice rodu *Arthroderma* než termín kleistothecium (uzavřený askokarp s kompaktní stěnou, která se rozpadá za účelem uvolnění askospor).

4.5 Biologický koncept druhu a křížící experimenty

Pro amplifikaci idiomorf MAT genu byly v této práci vyzkoušeny dříve navržené primery (Li *et al.* 2010, Kano *et al.* 2012, 2014, Hiruma *et al.* 2016). Z důvodu neuspokojivých výsledků byly navrženy pro druhy *Arthroderma* nové primery na základě několika sekvencí dostupných v databázi GenBank. Úspěšnost amplifikace MAT genů nebyla přesto vždy stoprocentní, zřejmě kvůli vysoké variabilitě těchto lokusů napříč druhy *Arthroderma*. Nově získané sekvence MAT idiomorf by proto v další práci měly posloužit pro navržení další generace primerů s ještě lepšími výsledky.

V této práci bylo úspěšně navozeno pohlavní stádium u všech tří biologických druhů někdejšího *T. terrestre* komplexu. Každý druh vyžadoval pro vznik pohlavního stádia jiné kultivační podmínky (viz kapitola 3.3). U druhu *A. lenticulare* nevyhovovaly křížení téměř žádné podmínky a pohlavní

stádium bylo indukováno jen v případě jednoho páru izolátů a pouze při kultivaci na půdě s vlasy a koňskými žíněmi při pokojové teplotě za střídání světla a tmy. Tyto rozdílné nároky druhů také limitovaly možnost porovnávat znaky na pohlavním stádiu při stejných podmínkách. V minulosti docházelo k úspěšnému navození pohlavního stádia u těchto druhů převážně na půdě s přidaným keratinizovaným materiálem. V této práci byla kromě agarových médií pro křížící pokusy půda také použita. Křížení na ní ale nebyla s výjimkou *A. lenticulare* tak úspěšná, jako na agarových médiích.

U druhů *A. insingulare* a *A. quadrifidum* docházelo k úspěšným křížením kmenů reprezentujících různé genotypy/klady, geografické oblasti a substráty. Pro druh *A. redellii* bylo k dispozici pouze 5 kmenů pocházejících ze stejné lokality s *MAT1-1-1* idiomorfou, proto nemohlo být navozeno pohlavní stádium v rámci těchto kmenů. Ztrátou jednoho párovacího typu a posunutím svého pohlavního ladění ve prospěch jednoho párovacího typu se často vyznačují primárně patogenní druhy rozmnožující se klonálně (Gräser 2006, Symoens *et al.* 2013). Tento druh byl sice izolován z netopyřů postižených dermatomykózou, nicméně kvůli malému počtu izolátů (navíc pocházejících ze stejné lokality) nelze s určitostí říct, že u tohoto druhu převládl pouze jeden párovací typ. Navíc byly tyto kmeny fylogeneticky lokalizované uvnitř druhu *A. quadrifidum* a ex-typový kmen *A. redellii* se křížil s kmenem UAMH 2941 druhu *A. quadrifidum*. Vzhledem k těmto faktům by za normálních okolností bylo velmi jednoduché *A. redellii* s *A. quadrifidum* synonymizovat. Unikátní morfologické a fyziologické charakteristiky kmenů *A. redellii* a také nízká klíčivost pohlavně vzniklého potomstva *A. redellii* × *A. quadrifidum* (viz kapitola 3.5) si žádá detailnější prozkoumání statutu tohoto druhu.

4.6 Fitness pohlavně vzniklého potomstva a mezidruhových hybridů

Hybridizace mezi různými druhy hub není tak dobře prozkoumaný fenomén jako je tomu např. u rostlin a zvířat. Existuje však několik studií, které identifikovaly mezidruhovou hybridizaci u hub ve volné přírodě, a to konkrétně u saprofytických kvasinek (Nakao *et al.* 2009, Louis *et al.* 2012), rostlinného endofyta *Epichloë* (Charlton *et al.* 2014), rostlinných patogenů z rodů *Botrytis* (Staats *et al.* 2005), *Fusarium* (Starkey *et al.* 2007), *Microbotryum* (Gladieux *et al.* 2011) nebo *Verticillium* (Depotter *et al.* 2017) a lidských a zvířecích patogenů z rodů *Candida* (Schröder *et al.* 2016), *Malassezia* (Wu *et al.* 2015), *Coccidioides* (Johnson *et al.* 2015) nebo *Cryptococcus* (Aminnejad *et al.* 2012). Fenomén mezidruhové hybridizace může dát vzniknout jedincům, kteří budou lépe adaptováni na hostitele (mohou vykazovat i vyšší virulenci), jak dokládají studie zabývající se rostlinnými patogeny (Brasier 2001, Brasier & Kirk 2010, Depotter *et al.* 2016). Úspěšné indukce tvorby mezidruhových hybridů *in vitro* bylo v minulosti dosaženo u zástupců rodu *Neurospora* (Dettman *et al.* 2003), *Candida* (Pujol *et al.* 2004), primárně patogenních druhů *Trichophyton* (Kawasaki *et al.* 2009, Anzawa *et al.* 2010, Kawasaki *et al.*, 2010, 2011) a u rodu *Aspergillus* (Sugui *et al.* 2014, Olarte *et al.*, 2015, Hubka *et al.* 2018), kde byly rozdíly mezi rodičovskou a hybridní F1 a případně i F2 generací posuzovány na molekulární úrovni a podle morfologických znaků. Mezidruhovému křížení

však mohou bránit tzv. prezygotické (vegetativní genová inkompatibilita) a postzygotické bariéry (sterilita, nižší fitness potomstva, aj.).

V této práci nebylo mezi dříve definovanými biologickými druhy *T. terrestre* komplexu křížení cíleně prováděno, jelikož již výsledky fylogenetické analýzy jasně ukázaly, že *A. quadrifidum*, *A. lenticulare* a *A. insingulare* jsou fylogeneticky poměrně vzdálené druhy. Křížení v rámci druhů mělo ale za účel potvrdit, že i izoláty různých genotypů (případně i kladů v rámci jednoho druhu – např. *A. quadrifidum*) se spolu kříží a tak potvrdit, že hranice druhů definované fylogeneticky a morfologicky souhlasí i s biologickým konceptem druhu. Dále bylo cílem zjistit, jaké podmínky jsou vhodné pro indukci pohlavního rozmnožování u druhů *Arthroderma* v laboratorních podmínkách.

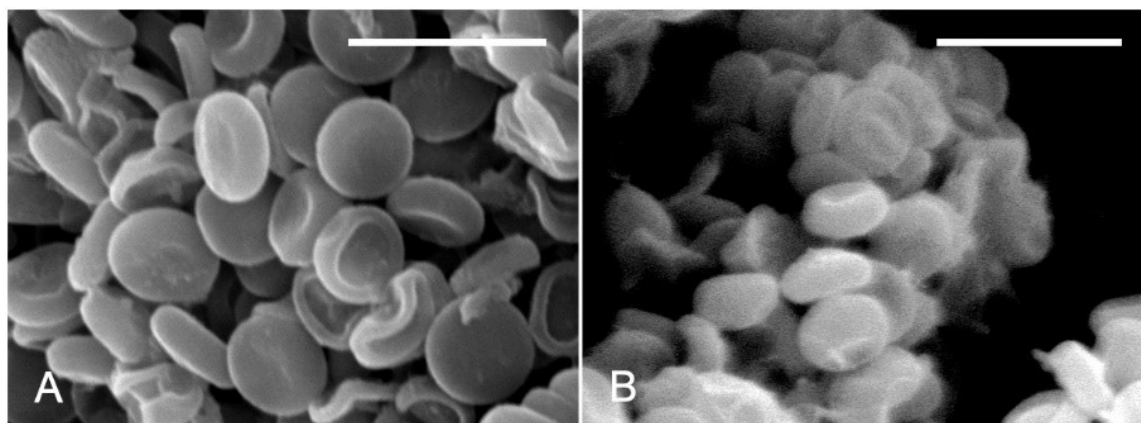
Indukce pohlavního stádia u všech druhů *T. terrestre* komplexu byla sice úspěšná, ale vyžadovala vyzkoušení řady kultivačních podmínek. Vhodné podmínky se přitom výrazně lišily mezi druhy a řada opačně pohlavně laděných kmenů stejných druhů se přesto nekřížila. Důvody tohoto jevu nejsou zcela jasné. Na vině mohou být prezygotické reprodukční bariéry, např. vegetativní genová inkompatibilita, regulátory vzniku plodnice či regulátory fúze hyf, které byly popsány např. u rodu *Aspergillus* (Szewczyk & Krappmann 2010, Olarte *et al.* 2015). Význam těchto genů u dermatofytů dosud nebyl zkoumán. V této práci se podařilo indukovat pohlavní reprodukci mezi izoláty *A. quadrifidum* a *A. redellii*. Otázkou je, zda se opravdu jedná o mezidruhovému křížení vzhledem k fylogenetické pozici *A. redellii*. Morfologické a fyziologické charakteristiky byly u obou druhů odlišné, fylogenetická analýza však zařadila tyto dva druhy do jedné statisticky dobře podpořené linie. Ačkoli je morfologická variabilita v rámci dermatofytů běžným jevem, fyziologické charakteristiky jako růstové optimum a maximum bývají relativně stabilní v rámci druhů. U kříženců *A. quadrifidum* a *A. redellii* byla porovnávána morfologie askospor pouze s askosporami vnitrodruhových kříženců *A. quadrifidum*. Rozměry byly signifikantně odlišné, tvar ani struktura se však neměnily.

Na křížící experimenty by mělo ideálně navazovat měření fitness vzniklého potomstva, tedy životaschopnosti a především klíčivosti askospor (Hubka *et al.* 2018). Fitness mezidruhových hybridů bývá zpravidla významně snížena již na úrovni F1 generace kříženců, na rozdíl od kříženců v rámci užších fylogenetických linií (vlastních biologických druhů) (Dettman *et al.* 2003). U některých druhů ale v rámci postzygotických reprodukčních bariér dochází ke snížení fitness hybridů až při následném křížení a tito kříženci nejsou schopni dávat vznik potomstvu další generace nebo jen v omezené míře. Postzygotické bariéry tedy hrají zásadní roli v udržování druhových hranic, a to obzvláště u evolučně mladých druhů (např. antropofilních a zoofilních dermatofytů), kde nemusí být ještě zcela vytvořeny prezygotické reprodukční bariéry. Výzkum v oblasti mezidruhovému hybridizace u hub poukázal na to, že vývoji reprodukční izolace často předchází fylogenetické rozlišení druhů (Dettman *et al.* 2003, Hubka *et al.* 2018). Mnohagenová fylogenetická analýza často lépe ukazuje tok genů a tím i lépe stanoví druhové hranice. Výsledky křížících pokusů je tedy často obtížné interpretovat bez znalosti výsledků fylogenetické analýzy.

Jak životaschopnost (86 %) tak klíčivost (14 %) byla u křížence *A. quadrifidum* a *A. redellii* v porovnání s askosporami *A. quadrifidum* (životaschopnost 96% a klíčivost 49%) snižena. V případě rodu *Aspergillus* (Sugui *et al.* 2014) byla u meziduhových hybridů hodnota klíčivosti <1 % a u vnitrodruhových kříženců *A. parafelis* 4 %, *A. lentulus* 8 % a *A. fumigatus* 40 %. U rodu *Neurospora* (Dettman *et al.* 2003) byla hodnota klíčivosti u vnitrodruhových kříženců 55,7 % a u mezidruhových hybridů 18,3 %. V případě *A. quadrifidum* × *A. redellii* byl však hodnocen jen jeden kříženec, který byl kultivován při pokojové teplotě (cca 20–25 °C). *Arthroderma redellii* neroste při teplotě vyšší než 17 °C, kříženci tedy mohli zdědit fyziologické vlastnosti po *A. redellii*. Výsledek je však kvůli tomuto faktu a kvůli malému počtu měření obtížně interpretovatelný a data o klíčivosti při nižší teplotě bude nutné doplnit.

U mezidruhových kříženců byly pozorovány i morfologické abnormality, a to např. rozdíly ve velikostech a ornamentaci askospor u rodu *Aspergillus* (Sugui *et al.* 2014, Hubka *et al.* 2018). Zde bohužel nemohly být tyto znaky u křížence *A. quadrifidum* × *A. redellii* srovnávány s oběma rodičovskými druhy. Askospory *A. quadrifidum* a křížence *A. quadrifidum* × *A. redellii* nevykazovaly žádné odlišnosti ve tvaru či ornamentaci (Obrázek 28). Rozměry znaků na pohlavním stádiu vyhodnotil Tukey HSD test za statisticky odlišné.

Jak ukázala tato práce, provedení i interpretace křížicích experimentů *in vitro* může být obtížné. Samotná úspěšná indukce pohlavního rozmnožování *in vitro* je komplexní a časově náročný proces. Bohužel zatím neznáme všechny mechanismy, které brání velké části opačně laděných izolátů v úspěšném křížení v laboratorních podmínkách. Interpretace životaschopnosti a klíčivosti askospor u dané skupiny hub vyžaduje shromáždit komplexní data uvnitř druhů i napříč druhy. V tomto ohledu jsou dílčí výsledky prezentované v této práci spíše výhledem do budoucna. Přesto výsledky křížicích experimentů přináší cenné poznatky využitelné pro definici druhových hranic nejen díky datům o (ne)kompatibilitě kmenů v rámci fylogenetických jednotek, ale také díky pozorování vlastního pohlavního stádia, které nese řadu taxonomicky informativních znaků.



Obrázek 28. Askospory vzniklé křížením kmenů *A. quadrifidum* UAMH 794 × UAMH 864 (A); askospory vzniklé křížením kmenů *A. quadrifidum* UAMH 2941 s ex-typovým kmenem *A. redellii* CBS 134551 (B). Měřítka 5µm.

5 ZÁVĚR

V diplomové práci byla provedena taxonomická revize rodu *Arthroderma* pomocí multidisciplinárního přístupu. Pozornost byla věnována především druhům z *Trichophyton terrestre* komplexu – *Arthroderma insingulare*, *A. lenticulare* a *A. quadrifidum*, jejichž nepohlavní stádium shodně neslo v době duální nomenklatury název *T. terrestre*. Kromě druhu *A. lenticulare* jsou všechny jmenované druhy spolu s morfologicky podobným *A. onychocola* původci dermatomykóz u lidí a obratlovců. Dermatomykózy u člověka a zvířat působí celá řada dalších druhů *Arthroderma* ($n = 22$), mezi nimiž je velká část dosud nepopsaná. Fylogenetická analýza druhů někdejšího *T. terrestre* komplexu dobře oddělila a *T. terrestre* podpořila jako samostatný druh. Úkolem do budoucna bude typifikace a také převedení *T. terrestre* do rodu *Arthroderma*. Stejně tomu bude i u druhů *Chrysosporium magnasporum* a *Ch. oceanitesii*, které fylogenetická analýza také zařadila do rodu *Arthroderma*. Na základě výsledků fylogenetické analýzy, založené na třech lokusech, byl rod *Arthroderma* rozdělen na 8 statisticky dobře podpořených kladů a zároveň bylo objeveno celkem 15 potenciálních nepopsaných druhů, kterým bude věnována pozornost v dalším studiu navazujícím na tuto práci. Práce tedy výrazně přispěla k poznání vzájemných fylogenetických vztahů mezi jednotlivými druhy, které dříve nebyly vyřešené fylogenezí založenou pouze na ITS rDNA. Revize identifikace 95 kmenů, původně morfologicky určených jako *T. terrestre*, ukázala, že tyto kmeny fylogeneticky spadají do 10 druhů. Je tedy zřejmé, že morfologie charakteristická pro *T. terrestre* se vyvinula několikrát nezávisle u řady druhů. Ze tří amplifikovaných genů zahrnutých do fylogenetické analýzy se ukázal být pro determinaci druhů nejvhodnější gen *TUB2*, který byl nejvariabilnější vzhledem ke své délce; nejméně variabilním lokusem byla oblast ITS rDNA. Dostupnost dvou nových markerů (*TUB2*, *TEF1 α*) pro všechny druhy *Arthroderma* bude zcela jistě významným přínosem pro budoucí taxonomii tohoto rodu a identifikaci jeho zástupců.

Ač jsou si druhy z *T. terrestre* komplexu morfologicky podobné, ukázalo se, že dobrým determinačním znakem jsou délka a septace makrokonidií a také znaky na buňkách peridiálních hyf. Pro pozorování znaků na pohlavním stádiu byly zařazeny i křížící experimenty, kterým předcházela determinace idiomorf MAT genů, kvůli jejichž amplifikaci byly navrženy nové primery. Nezanedbatelným přínosem práce bylo tedy i zjištění vhodných podmínek pro pohlavní rozmnožování těchto druhů *in vitro*. U použitých přístupů nastal rozpor v rozlišení druhů *A. quadrifidum* a *A. redellii*, kdy fylogeneze a biologický koncept druhu naznačily, že *A. redellii* je synonymum *A. quadrifidum*, kdežto výsledky morfologických (odlišná textura kolonií a rozměry konidií) a fyziologických studií (neschopnost *A. redellii* růst při 25°C) spíše kontraindikovaly sloučení těchto dvou druhů. K definitivnímu vyřešení taxonomie těchto druhů bude třeba provést další analýzy. U kříženců z F1 generace byla u druhů *T. terrestre* komplexu testována viabilita a klíčivost askospor. U všech byla procentuální klíčivost mnohem nižší než viabilita. Klíčivost askospor byla výrazně vyšší u *A. quadrifidum* (49 %) v porovnání s *A. insingulare* (11 %) a křížencem *A. quadrifidum* \times *A. redellii* (14 %). Pro vyslovení jasných závěrů bude však ještě nutné provést více měření. Budoucí práce bude

věnovaná studiu fitness vnitro- a mezidruhových kříženců v rodě *Arthroderma*. Tato studie bude usnadněna díky optimalizaci metodiky provedené zde. Jedná se zejména o optimalizaci oddělení askospor ze směsné suspenze s konidii (cell sorter) a měření viability askospor pomocí průtokové cytometrie.

6 LITERATURA

- Ajello L, Cheng SLY (1967). A new geophilic *Trichophyton*. *Mycologia*, 59, 255–263.
- Ajello L, Georg L (1957). *In vitro* hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 8, 3–17.
- Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazera M, Velegraki A et al. (2012). Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia*, 173, 337–346.
- Anzawa K, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H (2010). Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Medical Mycology*, 48, 629–634.
- Berkeley MJ (1860). *Outlines of British Fungology*. Lovell Reeve, London.
- Böhme H (1967). *Arthroderma gertleri* sp. nov., die perfekte form von *Trichophyton vanbreuseghemii* Rioux, Jarry et Juminer. *Mykosen*, 10, 247–252.
- Brasch J, Gräser Y (2005). *Trichophyton eboreum* sp. nov. isolated from human skin. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5230–5237.
- Brasier CM (2001). Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *BioScience*, 51, 123–133.
- Brasier CM, Kirk SA (2010). Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathology*, 59, 186–199.
- Campbell CK, Borman AM, Linton CJ, Bridge PD, Johnson EM (2006). *Arthroderma olidum* sp. nov. A new addition to the *Trichophyton terrestre* complex. *Medical Mycology*, 44, 451–459.
- Carmichael JW, Padhye AA (1972). *Arthroderma insingulare* sp. nov., another gymnoascaceous state of the *Trichophyton terrestre* complex. *Sabouraudia*, 10, 47–51.
- Charlton ND, Craven KD, Afkhami ME, Hall BA, Ghimire SR, Young CA (2014). Interspecific hybridization and bioactive alkaloid variation increases diversity in endophytic *Epichloë* species of *Bromus laevipes*. *FEMS Microbiology Ecology*, 90, 276–289.
- Currah RS, Abbott SP, Sigler L (1996). *Arthroderma silverae* sp. nov. and *Chrysosporium vallenarense*, keratinophilic fungi from arctic and montane habitats. *Mycological Research*, 100, 195–198.
- Currey F. (1854). On two new fungi. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 2, 240–242.
- Dawson CO (1963). Two new species of *Arthroderma* isolated from soil from rabbit burrows. *Sabouraudia*, 2, 185–191.
- Dawson CO, Gentles JC (1961). The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie & Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia*, 1, 49–57.
- de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M et al. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5–31.
- de Vroey C (1964). Formes sexuées des dermatophytes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 44, 831–840.
- Demange C, Contet-Audonnet N, Kombila M (1992). *Microsporum gypseum* complex in man and animals. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 30, 301–308.
- Depotter JRL, Seidl MF, Van Den Berg GCM, Thomma BPHJ, Wood TA (2017). A previously established divergent lineage of the hybrid fungal pathogen *Verticillium longisporum* emerges as stem striping pathogen in British oilseed rape. *BioRxiv*.
- Depotter JRL, Seidl MF, Wood TA, Thomma BPHJ (2016). Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 7–13.
- Dettman JR, Jacobson DJ, Turner E, Pringle A, John W (2003). Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora*: Comparing methods of species recognition in a model eukaryote. *Evolution*, 57, 2721–2741.

- Dobzhansky T (1951). *Genetics and the Origin of Species*. 3rd ed. revised. New York, USA: Columbia University Press.
- Durie EB, Frey D (1957). A new species of *Trichophyton* from New South Wales. *Mycologia*, 49, 401–411.
- Dvořák J, Otčenášek M (1969). *Mycological diagnosis of animal dermatophytoses*. Praha: Academia.
- Elewski BE, Hazen PG (1989). Continuing medical education. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 21, 655–673.
- English MP (1964). The ecology of some keratinophilic fungi associated with hedgehogs. *New Zealand Medical Journal*, 63, 586–591.
- Evolceanu R, Alteras I (1967). Eine keratinophyle *Chrysosporium*-Art mit ausgesprochen dermatophytischen, immunbiologischen Eigenschaften aus Guano von einer Grotte in Rumänien (unvollkommenes Stadium von *Arthroderma multifidum* - Dawson 1963?) (Erste Mitteilung). *Mykosen*, 10, 489–492.
- Faure-Cognet O, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H, Leccia MT (2016). Superficial fungal infections in a French teaching hospital in Grenoble area: Retrospective study on 5470 samples from 2001 to 2011. *Mycopathologia*, 181, 59–66.
- Gandrud C (2015). *Reproducible Research with R and R Studio* (2nd ed.). New York, USA.
- Gardes M, Bruns T (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118.
- Georg IK (1960). *Animal Ringworm in Public Health*.
- Georg LK, Camp LB (1957). Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. *Journal of Bacteriology*, 74, 113–121.
- Gladieux P, Vercken E, Fontaine MC, Hood ME, Jonot O, Couloux A, Giraud T (2011). Maintenance of fungal pathogen species that are specialized to different hosts: Allopatric divergence and introgression through secondary contact. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 459–471.
- Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1323–1330.
- Gräser Y, de Hoog GS, Kuijpers AFA (2000a). Recent advances in the molecular taxonomy of dermatophytes. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 17–21.
- Gräser Y, de Hoog GS, Summerbell RC (2006). Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Medical Mycology*, 44, 199–209.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W (2000b). Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3329–3336.
- Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, de Hoog GS (1999). Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Medical Mycology*, 37, 315–330.
- Gräser Y, Scott J, Summerbell R (2008). The new species concept in dermatophytes - A polyphasic approach. *Mycopathologia*, 166, 239–256.
- Gruby D (1841). Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 13, 72–75.
- Hall T (2005). *Bioedit v7.0.5*. Carlsbad.
- Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M (2008). Epidemiological trends in skin mycosis worldwide. *Mycosis*, 51, 2–15.
- Hiruma J, Okubo M, Kano R, Kumagawa M, Hiruma M, Hasegawa A et al. (2016). Mating type gene (MAT) and itraconazole susceptibility of *Trichophyton tonsurans* strains isolated in Japan. *Mycopathologia*, 181, 441–444.
- Hubalek Z (1970). *Trichophyton georgiae* Varsavsky et Ajello, from birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Sabouraudia*, 8, 1–3.

- Hubka V, Barrs V, Dudová Z, Sklenář F, Kubátová A, Matsuzawa T et al. (2018). Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41, 142–174.
- Hubka V, Čmoková A, Skořepová M, Mallátová N, Dobiášová S, Lysková P et al. (2014a). Současný vývoj v taxonomii dermatofytů a doporučení pro pojmenovávání klinicky významných druhů. *Československá Dermatologie*, 4, 151–165.
- Hubka V, Čmoková A., Skořepová, M., Mikula P, Kolařík M. (2014b). *Trichophyton onychocola* sp. nov. isolated from human nail. *Medical Mycology*, 52, 285–292.
- Hubka V, Nissen CV, Jensen RH, Arendrup MC, Čmoková A, Kubátová A et al. (2015). Discovery of a sexual stage in *Trichophyton onychocola*, a presumed geophilic dermatophyte isolated from toenails of patients with a history of *T. rubrum* onychomycosis. *Medical Mycology*, 53, 798–809.
- Hubka V, Větrovský T, Dobiášová S (2014c). Molekulární epidemiologie dermatofytóz v České republice – výsledky dvouleté studie. *Československá Dermatologie*, 4, 167–174.
- Hull CM, Raisner RM, Johnson AD (2000). Evidence for mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science (New York)*, 289, 307–10.
- Johnson SM, Carlson EL, Pappagianis D (2015). *Coccidioides* species setermination: Does sequence analysis agree with restriction fragment length polymorphism? *Mycopathologia*, 179, 373–379.
- Kajihiro ES (1965). Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. *American Society for Microbiology*, 13, 720–724.
- Kano R, Kawasaki M, Mochizuki T, Hiruma M, Hasegawa A (2012). Mating genes of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. *Mycopathologia*, 173, 103–112.
- Kano R, Yoshida E, Yaguchi T, Hubka V, Anzawa K, Mochizuki et al. (2014). Mating type gene (MAT1-2) of *Trichophyton verrucosum*. *Mycopathologia*, 177, 87–90.
- Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–780.
- Kawasaki M (2011). Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. *Medical Mycology*, 52, 291–295.
- Kawasaki M, Anzawa K, Mochizuki T, Ishizaki H, Hemashettar BM (2009). Successful mating of a human isolate of *Arthroderma simii* with a tester strain of *A. vanbreuseghemii*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 50, 15–18.
- Kawasaki M, Anzawa K, Wakasa A, Takeda K, Mochizuki T, Ishizaki H, Hemashettar B (2010). Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 51, 143–152.
- Kornerup A, Wanscher JH (1978). *Methuen handbook of colour* (third edit). London: Eyre Methuen.
- Kronstad JW, Staben C (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*, 31, 245–276.
- Kuehn HH (1958). A preliminary survey of the *Gymnoascaceae*. *Mycologia*, 50, 417–439.
- Kuehn HH (1960). Observations on *Gymnoascaceae*. VIII. A new species of *Arthroderma*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 13, 189–197.
- L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M et al. (2013). A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Medical Mycology*, 51, 713–720.
- Lackner M, de Hoog GS, Verweij E, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF (2012). Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2635–2642.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–1701.

- Li W, Metin B, White TC, Heitman J (2010). Organization and evolutionary trajectory of the mating type (MAT) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. *Eukaryotic Cell*, 9, 46–58.
- Lorch JM, Minnis AM, Meteyer CU, Redell JA, White JP, Kaarakka HM et al. (2015). The fungus *Trichophyton redellii* sp. nov. causes skin infections that resemble white-nose syndrome of hibernating bats. *Journal of Wildlife Diseases*, 51, 36–47.
- Louis VL, Despons L, Friedrich A, Martin T, Durrens P, Casarégola S et al. (2012). *Pichia sorbitophila*, an interspecies yeast hybrid, reveals early steps of genome resolution after polyploidization. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 2, 299–311.
- Lyskova P, Hubka V, Svobodova L, Barrs V, Dhand NK, Yaguchi T et al. (2018). Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: Comparison of two *in vitro* methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62.
- Marples MJ (1961). Some extra-human reservoirs of pathogenic fungi in New Zealand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 216–220.
- Marples MJ (1967). Non-domestic animals in New Zealand and in Rarotonga as a reservoir of the agents of ringworm. *New Zealand Medical Journal*, 66,(299–302).
- Marples MJ, Smith JMB (1962). *Trichophyton terrestre* as a resident in hedgehog skin. *Sabouraudia*, 2, 100–107.
- Mayr E (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of zoologist*. Nature. New York, USA: Columbia University Press.
- McNeill J, Barrie F, Buck W, Demoulin V, Greuter V (2012). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Regnum Vegetabile 154, Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Metin A, Dilek, N, Demirseven DD (2015). Fungal infections of the folds (intertriginous areas). *Clinics in Dermatology*, 33, 437–447.
- Metin B, Heitman J (2016). Sexual reproduction in dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 45–55.
- Mirhendi H, Makimur K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, Ahmadi B (2015). Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Medical Mycology*, 53, 215–224.
- Moraes M, Padhye AA, Ajello L (1975). The perfect state of *Microsporum amazonicum*. *Mycologia*, 67, 1109–1113.
- Muller A, Guaguère E, Degorce-Rubiales F, Bourdoiseau G (2011). Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor*: A retrospective study of 16 cases. *Canadian Veterinary Journal*, 52, 385–388.
- Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N et al. (2009). Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, 16, 115–129.
- Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Gräser Y (2013). MALDI-TOF mass spectrometry - A rapid method for the identification of dermatophyte species. *Medical Mycology*, 51, 17–24.
- Nenoff P, Winter I, Winter A, Krüger C, Herrmann J, Gräser Y et al. (2014). *Trichophyton thuringiense* H.A. Koch 1969. Ein seltener geophiler dermatophyt, erstmals vom menschen isoliert. *Hautarzt*, 65, 221–228.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 268–274.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 103–116.
- O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457, 471–474.

- Olarte RA, Worthington CJ, Horn BW, Moore GG, Singh R, Monacell JT et al. (2015). Enhanced diversity and aflatoxigenicity in interspecific hybrids of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Molecular Ecology*, 24, 1889–1909.
- Otčenášek M, Dvořák J (1973). *Pictorial Dictionary of Medical Mycology*. (M. Hejtmánek, Ed.). Praha: Academia.
- Otčenášek M, Dvořák J, Kunert J (1967). Ein Beitrag zur Kenntnis der sogenannten “roten Stamme” von *Trichophyton terrestre*. *Dermatologische Wochenschrift*, 153, 656–663.
- Padhye AA, Carmichael JW (1971). The genus *Arthroderma* Berkeley. *Canadian Journal of Botany*, 49, 1525–1540.
- Pfossler M, Heberle-Bors E, Amon A, Lelley T (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21, 387–393.
- Pore RS, Plunkett OA (1965). Biological species and variation in *Arthroderma*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 31, 225–241.
- Pore RS, Tsao GC, Plunkett OA (1965). A new species of *Arthroderma* established according to biological species concepts. *Mycologia*, 57, 969–973.
- Pujol C, Daniels KJ, Lockhart SR, Srikantha T, Radke JB, Geiger J, Soll DR (2004). The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate. *Eukaryotic Cell*, 3, 1015–1027.
- Rees RG (1967). *Arthroderma flavescens* sp. nov. *Sabouraudia*, 5, 206–208.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S et al. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.
- Schröder MS, Martínez de San Vicente K, Prandini THR, Hammel S, Higgins DG, Bagagli E et al. (2016). Multiple Origins of the Pathogenic Yeast *Candida orthopsilosis* by Separate Hybridizations between Two Parental Species. *PLoS Genetics*, 12, 1–26.
- Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. (2008). Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 166, 335–352.
- Segal E, Frenkel M (2015). Dermatophyte infections in environmental contexts. *Research in Microbiology*, 166, 564–569.
- Sekhona AS, Padhye AA, Carmichael JW (1973). Mating reactions in *Arthroderma tuberculatum*. *Mycopathologia*, 11, 283–286.
- Sharma M, Sharma M (2009). Influence of environmental factors on the growth and sporulation of geophilic keratinophiles from soil samples of public park. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 23, 307–312.
- Sharma M, Sharma M (2011). Influence of culture media on mycelial growth and sporulation of some soil dermatophytes compared to their clinical isolates. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 196–200.
- Silva WC, Gonçalves SS, Santos DWCL, Padovan ACB, Bizerra FC Melo ASA (2017). Species diversity, antifungal susceptibility and phenotypic and genotypic characterisation of *Exophiala* spp. infecting patients in different medical centres in Brazil. *Mycoses*, 60, 328–337.
- Sloan BJ, Routien JB, Miller VP (1960). Increased sporulation in fungi. *Mycologia*, 52, 47–63.
- Staats M, Van Baarlen P, Van Kan JAL (2005). Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 333–346.
- Starkey DE, Ward TJ, Aoki T, Gale LR, Kistler HC, Geiser DM et al. (2007). Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44, 1191–1204.
- Sugui JA, Peterson W, Figat A, Hansen B, Samson RA, Mellado E et al. (2014). Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 3707–3721.

- Summerbell RC (2002). What is the evolutionary and taxonomic status of asexual lineages in the dermatophytes? *Studies in Mycology*, 47, 97–101.
- Symoens F, Jousson O, Packeu A, Fratti , Staib P, Mignon B, et al. (2013). The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 377–385.
- Szewczyk E, Krappmann S (2010). Conserved regulators of mating are essential for *Aspergillus fumigatus* cleistothecium formation. *Eukaryotic Cell*, 9, 774–783.
- Takashio M. (1972). Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts. *Mykosen*, 15, 11–17.
- Taylor JW (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus*, 2, 113–120.
- Turland NJ, Wiersma JH, Barrie FR, Greuter , Hawksworth DL, Herendeen PS et al. (2018). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July 2017*. Regnum Vegetabile 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books.
- Uhrlaß S, Schroedl W, Mehlhorn C, Krüger C, Hubka V, Maier T et al. (2018). Molecular epidemiology of *Trichophyton quinckeanum* – a zoophilic dermatophyte on the rise. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 16, 21–32.
- Vanbreuseghem R (1952). Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 32, 173–178.
- Varsavsky E, Ajello L. (1964). The perfect and imperfect forms of a new keratinophilic fungus *Arthroderma ciferrii* sp. nov.: *Trichophyton georgii* sp. nov. *Rivista Di Patologia Vegetale*, 4, 351–364.
- Weitzman I, Salkin IF, Rosenthal SA (1983). Evaluation of trichophyton agars for identification of *Trichophyton soudanense*. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 203–205.
- Weitzman I, Silva-Hutner M (1967). Non-keratinous agar media as substrates for the ascigerous state in certain members of the *Gymnoascaceae* pathogenic for man and animals. *Sabouraudia*, 5, 335–340.
- Weitzman I, Summerbell RC (1995). The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 240–259.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315–312). New York, USA: Academic Press, Inc.
- White TC, Oliver B, Gräser Y, Henn MR (2008). Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryotic Cell*, 7, 1238–1245.
- Wu G, Zhao H, Li C, Rajapakse MP, Wong WC, Xu J et al. (2015). Genus-wide comparative genomics of *Malassezia delinea* delineates its phylogeny, physiology and niche adaptation on human skin. *PLoS Genetics*, 11, 1–27.
- Zeller L (1970). *Arthroderma* species from the „Baradla“ cave in Aggtelek. (Biospeleologica Hungarica, XXII.). In *Biology* (pp. 235–240).

