

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Zuzana Dudová**

Navození sporulace a tvorby pohlavního stádia u Ascomycota (Fungi)

Induction of sporulation and sexual state formation in Ascomycota (Fungi)

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2011

**Poděkování:**

Především bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D., který mi i přes své pracovní vytížení a pobyt v Africe posílal cenné rady a připomínky k mé práci. Též děkuji za jeho ochotu a trpělivost při opravě celého textu. Dále můj velký dík patří Bc. Vítkovi Hubkovi, který mi opakovaně kontroloval počáteční verze práce a konzultoval se mnou celý průběh psaní. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za psychickou podporu a porozumění.

**Prohlášení:**

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

V Praze, 9. 5. 2011

Podpis

## **Abstrakt**

V této práci jsem se zabývala faktory indukujícími sporulaci nepohlavního stádia a tvorbu pohlavního stádia u ascomycet, mezi které v závislosti na druhu patří světlo, dostupnost vody, vzduchu a esenciálních látek, přítomnost různých chemických látek a osmolarita. Některé druhy vyžadují pro sporulaci a tvorbu pohlavního stádia velmi specifické podmínky a stejně tak i složení médií, kterým je též věnována část mé práce. V kapitole o genetickém pozadí fruktifikace a sporulace jsem svoji pozornost zaměřila především na párovací (MAT) geny a geny hrající roli v procesu sporulace.

Klíčová slova: sporulace, tvorba pohlavního stádia, MAT geny, párovací faktory, anamofa, teleomorfa, Ascomycota, homothalismus, heterothalismus.

## **Abstract**

The aim of this study was to summarize factors that induce sporulation of anamorph and fruiting body formation in ascomycetous fungi. These factors are, depending on a species, light, water, air and nutrients availability, presence of various chemical compounds and osmolarity. Specific media and cultivation conditions used for sporulation induction are reviewed. I concentrated on mating type (MAT) genes and genes involved in the process of conidiation in the chapter about genetic background of fructification and sporulation.

Key words: sporulation, fruiting body formation, MAT genes, mating factors, anamorph, teleomorph, Ascomycota, homothallism, heterothallism.

## Obsah

<b>Úvod</b> .....	2
<b>Navození sporulace</b> .....	3
Faktory ovlivňující sporulaci.....	3
Kultivační média doporučená pro navození sporulace.....	9
Genetické pozadí sporulace .....	10
<b>Navození tvorby pohlavního stádia</b> .....	12
Životní cyklus askomycet .....	12
Stimulace tvorby teleomorfy .....	13
Postup při hledání teleomorfy .....	15
Genetické pozadí tvorby pohlavního stádia .....	17
<b>Závěr</b> .....	23
<b>Citace</b> .....	24

## Úvod

Ascomycota jsou velká a diverzifikovaná skupina hub. Většina zástupců má ve svém životním cyklu dvě stádia. Během nepohlavní části životního cyklu (anamorfní stádium) houba produkuje nepohlavní spory (konidie), během pohlavní části životního cyklu (teleomorfní stádium) produkuje pohlavní spory (askospory). Ty vznikají ve vřeckách (asci), která se nejčastěji vyvíjejí v plodnicích (askoma). Genetický podklad, kterým vřeckovýtrusé houby kontrolují tvorbu pohlavních a nepohlavních reprodukčních struktur, je poměrně detailně prostudován, nejlépe na modelových organismech *Aspergillus nidulans* a *Neurospora crassa*.

Navození tvorby spor u nepohlavního stádia (dále jako sporulace) a tvorby pohlavního stádia u ascomycet je velmi klíčové pro determinaci a studium taxonomie. Dobře sporulující kultura či přítomnost meiospor je metodickým předpokladem pro řadu genetických a fyziologických testů sloužících k poznání biologie dané houby. Snahou současné taxonomie je vytvořit systém založený na teleomorfních (pohlavních) stádiích životního cyklu hub, ke kterým jsou přiřazena příslušná anamorfní (nepohlavní) stádia. V případě anamorfních druhů umožní nalezení teleomorfní struktury použití správného jména, které se upřednostňuje před jménem anamorfy. Celá řada znaků přítomných na pohlavním stádiu v průběhu ontogeneze i po jejím dokončení má značný taxonomický význam. Mnoho druhů je dokonce prakticky nemožné určit pouze na podkladě nepohlavního stádia. Indukce sporulace je nezbytná u řady hub, které za běžných kultivačních podmínek tvoří pouze sterilní mycelium. Z důvodu využití spor jako inokula v potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, aj.) je velmi důležité zajistit optimální podmínky růstu a sporulace při velkoprodukcí. Spory některých druhů se též s úspěchem využívají jako náhrada chemických pesticidů pro ochranu zemědělských plodin (Wolken et al. 2003).

Obecně lze říci, že houby často sporulují či tvoří pohlavní stádium v nepříznivých podmínkách, například při nedostatku živin, nízkých teplotách, osmotickém šoku atp. (Roncal & Ugalde 2003). Pohlavní spory bývají odolnější proti nepříznivým vlivům než nepohlavní spory. Kromě toho pohlavním procesem vznikají jedinci s variabilní genetickou výbavou, a tedy i větší šancí být na nepříznivé podmínky lépe adaptováni. Cílem mé práce je podat stručný přehled faktorů ovlivňujících sporulaci a tvorbu pohlavního stádia. Práce by měla

také posloužit jako praktická příručka při práci se špatně sporulujícími kmeny a anamorfami, u kterých je snaha o nalezení teleomorfy.

## **Navození sporulace**

U různých hub je sporulace indukována odlišnými faktory v závislosti na konkrétních ekologických nárocích. Obecně lze ale říci, že je to stres (limitní faktory), který stimuluje sporulaci. V praxi je větší sporulace dosahováno použitím polopřirozených médií (např. rostlinný materiál, filtrační papír, atp.), regulací světelného a teplotního režimu v kultivačních termostatech a dlouhodobou kultivací. Vědecky jsou studovány faktory, jako je světlo, teplota, dostupnost vody, vystavení vzduchu a vysychání, dostupnost živin a esenciálních látek, osmolarita média a další faktory (Tabulka 2.). Patrně jediný souhrn těchto studií je v práci Cooke & Whipps (1993), ze které jsem vycházela v následujícím textu.

## **Faktory ovlivňující sporulaci**

### ***Světlo***

Význam, který má světlo v procesu indukce sporulace, se podstatně liší u různých druhů. Například druhy *Septoria viciae* a *Phoma pinodella* vyžadují světlo pro sporulaci, naproti tomu sporulace u *Ascochyta gossypii* a některých izolátů *Ascochyta pisi* není na světle závislá (Tan 1978). U druhu *Phoma caricae-papayae* byla nalezena vnitrodruhová variabilita reakce na světlo, kde některé kmeny na světle sporulují a jiné nikoliv (Honda 1983). Jako pozitivní stimulus působí světlo na sporulaci u druhů *Neurospora crassa* (Lauter et al. 1997), *Trichoderma viride* (Betina 1995) a *Aspergillus nidulans* (Mooney & Yager 1990) a u několika druhů rodu *Penicillium*, např. u *Penicillium cyclopium* (Pažout et al. 1982). Naopak většina druhů rodu *Penicillium* světlo pro sporulaci nevyžaduje. Jako negativní regulátor sporulace působí světlo u druhu *Exserohilum turcicum* (Flaherty & Dunkle 2005). Světlo tedy může působit jako aktivátor i jako inhibitor sporulace.

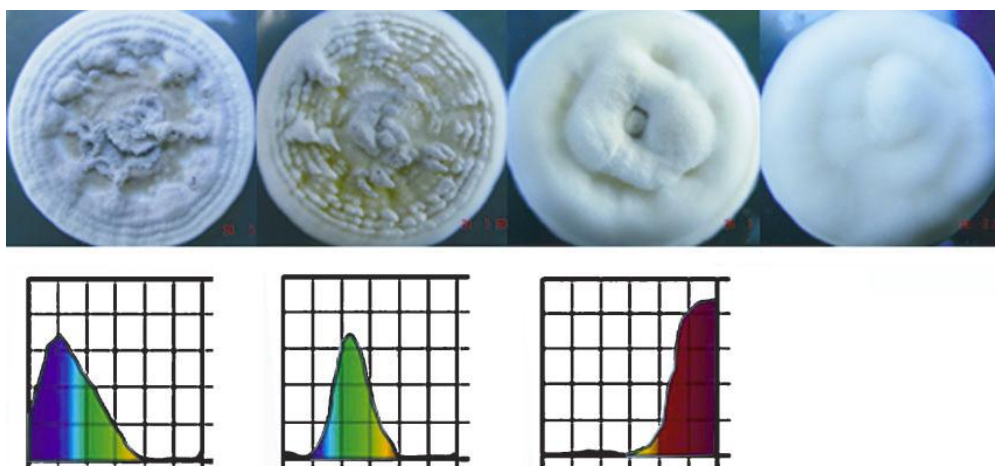
Také vlnová délka působícího záření hraje při stimulaci sporulace zásadní roli. Světlo o různých vlnových délkách může stimulovat obdobné procesy u různých skupin hub, naopak stejné vlnové délky mohou indukovat odlišné změny (Cooke & Whipps 1993). Vliv světla různých vlnových délek na stimulaci sporulace uvádí Tan (1978) (Tabulka 1.).

Vlnová délka světla	Indukce sporulace	Tvorba dalších nepohlavních struktur
200 - 320 nm (UV)	<i>Alternaria chrysanthemi</i> , <i>Helminthosporium oryzae</i> , <i>Stemphylium bothryosum</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Tvorba pyknid <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Septoria nodorum</i>
230 - 360 nm	<i>Phoma caricae-papaye</i> (Honda 1983)	
330 - 500 nm („near UV“ a modré)	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Penicillium</i> <i>isariiforme</i> , <i>Trichoderma viride</i> Tvorba konidií v cirkadiálních kruzích <i>Neurospora crassa</i>	Tvorba korémíí <i>Penicillium</i> <i>claviforme</i> Tvorba sklerocií <i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>

**Tabulka 1.** Vliv vlnové délky na tvorbu nepohlavních struktur. Údaje z Tan (1978), pokud neuvedeno jinak.

U druhu *Paecilomyces fumosoroseus* je ve tmě sporulace inhibována a po světelném pulzu dochází k její indukci. Kultury *P. fumosoroseus* byly exponovány různým vlnovým délkám světla (modrému, zelenému a červenému), kontrolní kultura byla ponechána v úplné tmě. Modré světlo se ukázalo nejefektivnější pro stimulaci sporulace (Obrázek 1.).

Modré ( $5,8 \times 10^9$  konidií) Zelené ( $6,3 \times 10^7$  kon.) Červené ( $3,4 \times 10^4$  kon.) Tma (0 kon.)



**Obrázek 1.** Morfologie kultur *Paecilomyces fumosoroseus* kultivovaných při různých vlnových délkách světla s počtem získaných konidií (Sánchez-Murillo et al. 2004).

U druhu *Botrytis cinerea* a některých druhů *Helminthosporium* může být sporulace reverzibilně navozena světlem o vlnových délkách 330-430 nm (tzv. near UV), ale inhibována světlem o vlnových délkách 430-500 nm (modrým). Stupeň sporulace závisí na relativních dávkách každé vlnové délky (Cooke & Whipps 1993).

Komerční produkce konidií druhu *Trichoderma* je maximalizována střídavým působením světla a tmy. Typický světelný režim střídání 12 hodin světla a 12 hodin tmy je založen na předpokladu odrážení podmínek v přirozeném prostředí (Betina & Zajacová 1978). Je zajímavé, že při střídání světla a tmy se tvoří konidie v koncentrických kruzích na kolonii, zatímco při kontinuálním působení světla jsou konidie kontinuálně po celé kultuře. Gutter (1957) navrhl teorii kompetence, která říká, že pouze buňky určitého stáří reagují na světelný podnět, a tím vysvětluje koncentrické kruhy na koloniích. Jako modelový organismus použil *Trichoderma viride* a demonstroval, že pro fotoindukci je nutné minimální stáří buněk přibližně 10 hodin a že mycelium kultivované ve tmě déle než 20 hodin už není na světlo receptivní. Při kontinuálním osvětlení projdou během vývoje všechny buňky určitou metabolickou fází a stanou se kompetitivními, což vysvětluje kontinuální rozmístění konidií po celé kultuře (Gutter 1957). Sporulace u druhu *Alternaria cichori* je inhibována světlem o vlnových délkách 330-500 nm (near UV) při 28°C, ale při 17 °C nemá světlo žádný efekt (Vakalounakis & Christias 1986).

Molekulární mechanismy, kterými je zprostředkována světlem-indukovaná sporulace, byly detailněji prozkoumány u některých modelových organismů, jako je *N. crassa* (He et al. 2002), a *A. nidulans* (Kim et al. 2002). U *N. crassa* dochází k aktivaci WC-1 transkripčního faktoru a u *A. nidulans* k inaktivaci represoru konidiace *VeA*.

### **Teplota**

Vliv teploty na sporulaci je velmi málo studován. Stres ve formě vysokých teplot (37 °C) a nízkých koncentrací kyslíku indukuje tvorbu chlamydospor u *Fusarium sulphureum* (Barran et al. 1977). U druhu *Ceratocystis fimbriata* a *Eurotium herbariorum* jsou konidie produkovány v nízkých teplotách a naopak tvorbu pohlavního stadia indukují teploty vysoké (Turian 1978).



### ***Dostupnost vody, vzduchu a vysychání***

Dostupnost vody představuje jeden z hlavních kontrolních faktorů reprodukce. Při postupujícím vysychání mohou být aktivovány metabolické dráhy nezbytné pro zahájení reprodukce dřívě, než vodní stres nevratně naruší buněčné procesy. Zároveň dlouhodobé zaplavení mycelia může být letální pro některé terestrické houby jako například *Sclerotium cepivorum*, ale je esenciální pro mnoho zoosporických hub (Leggett & Rahe 1985). Z toho plyne, že dostupnost vody vyžadovaná pro sporulaci je velmi variabilní a vázaná k habitatu a životní strategii konkrétní houby (Cooke & Whipps 1993).

Jako nejsilnější stimulus sporulace u rodu *Penicillium* bylo pozorováno vystavení původně suspenzní kultury v tekutém médiu vzduchu. Experimenty s *P. griseofulvum* a *P. chrysogenum* ukázaly, že vystavení mycelia vzduchu spouští prudké změny ve fyziologických procesech předtím, než jsou patrné morfogenetické změny. Stimulace atmosférickým vzduchem není spojována s přísunem O<sub>2</sub>, ani s koncentrací CO<sub>2</sub> ani se ztrátou vody z mycelia. Spíše se ukazuje, že hlavní roli hrají náhlé změny fyzikálních podmínek na buněčném povrchu při vystavení mycelia ze suspenzní kultury vzduchu. Sporulace může být zastavena znovuponořením kultury (Morton 1961). Modelový organismus *Aspergillus nidulans* též vyžaduje expozici vzduchu jako stimulus pro tvorbu jak pohlavního, tak nepohlavního stádia (Axelrod et al. 1973). Mechanismus, jakým působí vystavení vzduchu induktivní signál pro sporulaci, zatím není dostatečně objasněn.

Významným faktorem je i koncentrace kyslíku ve vzduchu, kterému jsou kultury vystaveny. U *Neurospora crassa* byl jako faktor spouštějící sporulaci popsán hyperoxidovaný stav buněk (Hansberg & Aguirre 1990). Naopak u několika druhů *Penicillium* bylo zjištěno, že sporulace normálně probíhá v prostředí na kyslík chudém a dokonce i v dusíkem obohacené atmosféře (Morton 1961).

### ***Dostupnost živin, esenciálních látek***

Sporulace může často probíhat pouze v přítomnosti určitých organických, nebo anorganických látek. Zároveň jsou některé živiny vyžadovány pouze ve specifických fázích ontogeneze, nebo při specifických podmínkách prostředí. Často má indukční vliv na sporulaci vyčerpání živin. Například u *Aspergillus nidulans* navozuje sporulaci vyčerpání dusíku nebo uhlíku (Skromne et al. 1995). U *Penicillium griseofulvum* spouští sporulaci vyčerpání dusíku

(Morton 1961). Naopak u *P. chrysogenum* (Righelato et al. 1968) a *Neurospora crassa* (Madi et al. 1997) vyčerpání uhlíku.

Obsah živin, hlavně poměr uhlíku a dusíku se mění přirozeně během rozkladných procesů, nebo při migraci do nového habitatu (Cooke & Whipps 1993). Efekt koncentrace uhlíku a poměr koncentrace uhlíku k dusíku (C:N) na sporulaci se liší u různých druhů. Obecně lze říci, že poměr C:N má na sporulaci větší vliv než jen samotná koncentrace uhlíku. Gao a kolektiv (2007) studoval tento vliv u šesti houbových kmenů a prokázali, že u všech kmenů, kromě dvou kmenů *Peecilomyces lilacinus*, byl poměr C:N s největším ziskem konidií 160:1. Koncentrace uhlíku optimální pro sporulaci byla odlišná u různých kmenů, ale byla vždy v rozsahu 6-12 g.l<sup>-1</sup>. Konkrétně 12 g.l<sup>-1</sup> u jednoho kmenu *Metarhizium anisopliae* a u jiného kmenu *M. anisopliae* 6 g.l<sup>-1</sup>. To ukazuje variabilitu v nárocích na i v rámci jednoho druhu. Pro *Trichoderma viride* byla optimální koncentrace uhlíku též 6 g.l<sup>-1</sup> a pro *Lecanicillium lecanii* 8 g.l<sup>-1</sup>. U *Peecilomyces lilacinus* byla optimální koncentrace uhlíku 8-12g.l<sup>-1</sup> a poměr C:N 10-20:1 (Gao et al. 2007).

Druh *Fusarium oxysporum* produkuje makrokonidie, mikrokonidie a chlamydospory odlišných proporcí na médiích s různým poměrem C:N (Oritsejafor 1986). Podobný pleomorfismus je typický pro celý rod *Fusarium*. Určování na základě morfologie je možné pouze při dodržení striktních podmínek – složení média, teplota inkubace, světelný režim apod. (Leslie & Summerell 2006).

Efektivní způsob navození sporulace u některých druhů *Penicillium* je přidání vápíkových iontů do média. To bylo pozorováno u druhů *P. notatum* (Foster et al. 1945), *P. cyclopium* (Ugalde & Pitt 1983), *P. griseofulvum* (Morton 1961), *P. paxilli* (Ibba et al. 1987), *P. bilaii* (Cunningham & Kuiack 1992) a *P. oxalicum* (Pascual et al. 1997).

Podobně i u *Trichoderma viride* extracelulární indukují vápíkové ionty sporulaci v suspenzních kulturách. Mechanismus jakým ionty Ca<sup>2+</sup> sporulaci navozují, však zůstává zatím neznámý, ačkoliv bylo zjištěno, že proces probíhá nezávisle na světelných a nutričních podmínkách, což naznačuje alternativní způsob tvorby konidií u *Trichoderma* (Simkovic et al. 2008).

Dostupnost dusíku a uhlíku, poměr C:N a pH média jsou hlavní faktory ovlivňující sporulaci u rodu *Trichoderma* (Bastos 2001). I přes velké množství studií zkoumajících tyto faktory však není možné stanovit žádné konkrétní optimální parametry pro tento rod jako celek. Mohou existovat parametry specifické ke konkrétním druhům, ale kvůli nedostatečné taxonomické identifikaci izolátů *Trichoderma* je obtížné aplikovat tyto výsledky v kontextu reálných druhů (Steyaert et al. 2010).

#### ***Osmolarita média, pH a další faktory***

Vysoká osmolarita byla poprvé popsána jako jeden ze stimulů sporulace u rodu *Penicillium*. Expozice vysokým koncentracím (10% w/v) glukózy, nemetabolizovatelným cukrům (sorbóza, D-arabinóza) a některým dalším polyalkoholům indukuje sporulaci v tekutých kulturách. Další zvýšení koncentrací sporulaci inhibuje. Indukci sporulace je též zabráněno určitými koncentracemi askorbátu,  $Hg^{2+}$ , cetyltrimethylammoniumbromidu (CTAB) a 3,4-dichlorphenylserinu, které ale zároveň neovlivňují vegetační růst (Morton 1961).

Zvýšená koncentrace solí zvyšuje intenzitu sporulace v kulturách a snižuje její defekty u mutantních kmenů *Aspergillus* (Lee & Adams 1995). *Aspergillus nidulans* začíná tvořit konidie v tekuté kultuře obsahující minimálně 0,8 M NaCl (Lee & Adams 1995). Podobně u *Aspergillus oryzae* podporuje sporulaci koncentrace KCl vyšší než 0,1 M (Song 2001). Mechanismus jakým tyto koncentrace sporulaci spouští je zatím neobjasněn, ale mohl by zahrnovat přítomnost dvoukomponentového systému osmosenzorů, podobných jako u *Saccharomyces cerevisiae* (Maeda et al. 1994). Takové systémy byly též nalezeny u *Aspergillus nidulans* (Appelyard et al. 2000) a *Neurospora crassa* (Alex et al. 1996).

<b>Faktor prostředí</b>	<b>Organismus</b>	<b>Mechanismus iniciace</b>
<b>Vysychání</b>	<i>Penicillium griseofulvum</i>	ztráta vody z mycelia
<b>Hyperoxie</b>	<i>Neurospora crassa</i>	hyperoxidovaný stav
<b>Světlo</b>	<i>Penicillium cyclopium</i>	Nedefinováno
	<i>Neurospora crassa</i>	aktivace WC-1 transkripčního faktoru
	<i>Trichoderma viride</i>	Nedefinováno
	<i>Aspergillus nidulans</i>	inaktivace represoru konidiace VeA
	<i>Septoria viciae</i>	nedefinováno (Tan 1978)
	<i>Phoma pinodella</i>	nedefinováno (Tan 1978)
<b>Osmotický stres (soli)</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Nedefinováno
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nedefinováno
	<i>Neurospora crassa</i>	nedefinováno (osmosenzor?)
<b>Nedostatek dusíku</b>	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Nedefinováno
<b>Nedostatek uhlíku</b>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Nedefinováno
	<i>Neurospora crassa</i>	glukózový senzor
<b>Nedostatek uhlíku a/nebo dusíku</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Nedefinováno
<b>Vápník</b>	<i>Penicillium spp.</i>	skrz konidiogenone
	<i>Trichoderma viride</i>	nedefinováno (Simkovic et al. 2008)
<b>Nízké teploty</b>	<i>Eurotium herbariorum</i>	Nedefinováno (Turian 1978)

**Tabulka 2.** Přehled faktorů stimulujících sporulaci u různých druhů askomycet. Převzato z Roncal & Ugalde (2003) a doplněno o aktuální údaje.

### **Kultivační média doporučená pro navození sporulace**

Pro častěji studované houby jsou doporučena média k navození sporulace. Tato média se liší podle studovaných druhů hub a jsou typická nízkým obsahem živin, vyšší osmolaritou či přítomností přirozených substrátů. Přehled používaných médií udává tabulka 3.

<b>Médium</b>	<b>Organismus</b>	<b>Citace</b>
<b>Základní slané médium (basal salts medium)</b>	<i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Lecanicillium lecani</i>	Gao et al. (2007)
<b>LHC agarové médium (lactose-casein hydrolysate agar medium)</b>	<i>Exserohilum tunicatum</i>	Flaherty & Dunkle (2005)
<b>Vogelovo minimální agarové médium (Vogel's minimal medium agar)</b>	<i>Neurospora crassa</i>	Lauter et al. (1997)
<b>PDYCA médium</b>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Sánchez-Murillo et al. (2004)
<b>Bramborovo dextrózový agar (PDA); CLA; rýžová sláma a větvičky moruše na vodním agaru; Mrkvový agar (Carrot agar); V-8 juice agar</b>	<i>Fusarium</i> spp.	Leslie & Summerell (2006)
<b>Potato Flakes Agar; Potato Dextrose Yeast Agar (PDY Agar); vodní agar</b>	Široké spektrum hub	Atlas (2010)

**Tabulka 3.** Přehled médií používaných pro stimulaci sporulace u různých druhů hub.

### Genetické pozadí sporulace

Sporulace je regulována specifickými geny kódujícími proteiny počínaje receptory, přes proteiny signalizačních kaskád, až po transkripční faktory (Tabulka 4.). Tyto kooperující proteiny zajišťují specifickou odpověď na vnější podněty ve smyslu indukce nebo represe sporulace. Neméně důležité jsou rozsáhlé nekódující regulační oblasti. Pro sporulaci jsou vyžadovány tzv. conidiation specific genes. Esenciální jsou nejen geny, které jsou exprimovány, ale i geny regulační a geny, jejichž proteinové produkty fungují jako transkripční faktory (Lauter et al. 1997).

*Neurospora crassa* produkuje konidie ve tmě i na světle. Ovšem geny specifické pro sporulaci (*con* a *eas*) byly pozorovány transkripčně aktivní po expozici mycelia světlu (Lauter et al. 1997). U druhu *N. crassa* je hlavní regulátor sporulace kódován *fluffy* genem, který je aktivován světlem. K aktivaci *fluffy* genu je vyžadován proteinový komplex WCC (white collar komplex). WCC komplex vzniká jako odpověď na modrou část světelného spektra a přímo reguluje transkripci *fluffy* genu vazbou na promotor. Transkripce *fluffy* genu je naopak inhibována ve tmě proteinem FLD. Tato inhibice se ztratí po expozici mycelia světlu a po aktivaci WCC komplexu. Zvyšující se množství mRNA ve vegetativním myceliu po expozici světlu a zvyšující se množství regulačního FL proteinu spouští kaskádu reakcí vedoucích ke konidiaci. Tato aktivace světlem ukazuje jednoduchý mechanismus aktivace konidiace modrým světlem, který je pravděpodobně obdobný i u jiných hub (Olmedo et al. 2010).

Zapojené geny	Organismus	Citace
<b>rasA, rasB</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fortwendel et al. (2004)
<b>cag8</b>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Fang et al. (2007)
<b>con-10, con-13, fluffy</b>	<i>Neurospora crassa</i>	Roberts et al. (1988), Bailey-Shrode & Ebbole (2004)
<b>briA, abaA, wetA</b>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Adams et al. (1988), Sewall et al. (1990), Marshall & Timberlake (1991)
<b>blr-1, blr-2</b>	<i>Trichoderma atroviride</i>	Casas-Flores et al. (2004), Castellanos et al. (2010)

**Tabulka 4.** Geny hrající roli v procesu konidiace.

## Navození tvorby pohlavního stádia

### Životní cyklus askomycet

Během vegetačního růstu vláknité vřeckovýtrusé houby tvoří síť většinou přehrádkovaných hyf obsahujících haploidní jádro. Sexuální cyklus začíná tvorbou samičí reprodukční struktury, ascogonia, ve vhodných environmentálních podmínkách (světlo, vyčerpání určitých živin atp.). U mnoha druhů nese ascogonium apikální receptivní část, trichogyn. Askogonia mohou být nahá, nebo obklopená okolními hyfami formující protoperithecium. U heterothalických hub fúzuje trichogyn se samčím elementem opačného párovacího typu. Donorová samčí buňka může být mikrokonidie, makrokonidie nebo pouze hyfa. Při fertilizaci se do primárního askogonia dostává samčí jádro. Tato událost iniciuje tvorbu plodnice, ve které nakonec dojde k tvorbě askospor ve vřecku. Po fertilizaci ihned nedochází ke karyogamii, ale jádra se nadále dělí a rostou ve formě askogenních hyf. Po určité době jádra fúzují a vytvoří mladé vřecko, které je jedinou diploidní buňkou v celém životním cyklu. Vřecko se ihned meioticky dělí na čtyři haploidní askospory, které se většinou následně znovu mitoticky rozdělí a výsledkem je osm askospor (Coppin et al. 1997).

Pohlavní rozmnožování má ve srovnání s nepohlavním mnoho výhod. Ukazuje se, že pohlavním procesem vzniklé askospory jsou více rezistentní teplotním extrémům než nepohlavní spory (Baggerman & Samson 1988) a mohou mít delší životnost než asexuální spory (Anderson & Kohn 1998). Další výhodou spočívá v možnosti vzniku výhodných mutací prostřednictvím rekombinace, naopak při vzniku nevýhodných mutací má sexuálně se množící populace šanci eliminovat tuto mutaci opět díky rekombinaci (Barton & Charlesworth 1998).

Většina hub je schopna rozmnožování pomocí nepohlavních a pohlavních spor. Nicméně v současné době se odhaduje, že jedna pětina všech hub se rozmnožuje pouze asexuálně a tyto druhy jsou tradičně zařazovány do skupiny Deuteromycota (Hawksworth et al. 1995). Počet striktně asexuálních druhů klesá díky vzrůstajícímu počtu objevů sexuálních cyklů, nebo díky jejich navození u druhů, u kterých byly nalezeny párovací (MAT) geny (Horn et al. 2009).

## Stimulace tvorby teleomorfy

Proces tvorby teleomorfy mohou stimulovat podobné faktory, jako proces sporulace. Různé faktory působí odlišně na různé druhy. Na rozdíl od stimulace sporulace je však stimulace tvorby teleomorfy studována na zcela odlišné úrovni. Nacházíme minimum prací, které by popisovaly faktory, jež tvorbu teleomorfy stimulují, naopak se v mnohem větší míře zabývají procesem párování, MAT geny, homothalismem a heterothalismem. Právě z tohoto důvodu je následující část o faktorech stimulujících tvorbu pohlavního stádia mnohem stručnější než část o faktorech stimulujících sporulaci.

### *Světlo*

Pro tvorbu pohlavního stádia většina druhů světlo nevyžaduje. U druhů *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus alliaceus*, které tvoří pohlavní stádium ve tmě, má též podporující vliv omezená ventilace vzduchu, což by mohlo představovat vhodný reprodukční model pro půdní organismy. Naopak pro tvorbu nepohlavního stádia vyžaduje *A. nidulans* světlo (Paoletti et al. 2007). Efekt světla na reprodukci se může také měnit v různých podmínkách prostředí, například při různých koncentracích živin. U druhu *Pyronema domesticum* se tvoří sclerotia i apothecia na chudých syntetických médiích exponovaných slabému světlu, ale při intenzivním osvětlení se tvoří jenom apothecia. Na médiu bohatém na živiny se tvoří sklerotia ve tmě, ale apothecia se nevytvoří ani při expozici světlu o vhodných vlnových délkách (Moore-Landecker 1987). Existují ale i druhy, u kterých světlo tvorbu pohlavního stádia stimuluje. U druhů *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae* navozuje tvorbu askospor modré světlo o vlnových délkách 330-500 nm. Podobně u druhů *Sclerotinia sclerotiorum* a *Sclerotium rolfsii* stimuluje modré světlo tvorbu sklerocií. Světlo ultrafialové o vlnových délkách 200-320 nm stimuluje tvorbu askospor u *Leptosphaerulina* spp. a tvorbu perithecií u *Pleospora herbatum*, *Leptosphaerulina trifolii* (Tan 1978). *Gelasinospora reticulospora* preferuje pro tvorbu plodnic střídání světla a tmy před kontinuálním světlem nebo tmou (Tan 1978).

### *Teplota*

U druhu *Eurotium herbariorum* indukují tvorbu pohlavního stádia vysoké teploty a naopak konidie jsou produkovány v nízkých teplotách. Naproti tomu druh *N. crassa* tvoří plodnice



jen v nízkých teplotách (Turian 1978). Druh *Phaeoacremonium aleophilum* tvoří teleomorfu při 35° C (Rooney-Latham et al. 2005).

#### **Dostupnost živin a dalších látek**

Druh *Sordaria macrospora* nedokáže přejít z fáze protoperithecia do fáze pravého ascogonia v absenci biotinu (Hock et al. 1978). U *Cordyceps takaomontana* byla tvorba peritecia indukována enzymy degradujícími buněčnou stěnu a PEG 4000 (Yokoyama et al. 2005).

#### **Speciální média**

Podobně jako pro navození sporulace se i pro navození tvorby pohlavního stádia používají speciální média. McAlpin (2005) provedl výzkum sexuálně se množícího druhu *Petromyces alliaceus* s cílem nalezení medií a zdrojů dusíku, které nejlépe podporují tvorbu stromat s askokarpy. Tři kmeny *P.alliaceus* byly kultivovány na vybraných agarových médiích po dobu 7 měsíců při 30°C ve tmě. Největší množství stromat vyrostlo na Czapek's agaru (CZA) a na MCA médiu (mixed cereal agar). Pokud byl *P. alliaceus* kultivován na standardním CZA médiu obsahujícím pouze 0,3% NaNO<sub>3</sub>, pouze 5% stromat obsahovalo askokarpy. Mnohem větší procento stromat obsahovalo askokarpy, pokud byl NaNO<sub>3</sub> v CZA mediu nahrazen odpovídajícím množstvím NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, kyselinou glutamovou nebo serinem, představujícím zdroj dusíku (McAlpin & Wicklow 2005).

Podobně bylo nalezeno nejvhodnější médium pro tvorbu plodnic u *Arthroderma vanbreuseghemii*. Jako základní médium bylo použito Eaglovo základní médium, 0,44 g tohoto minimálního média, které obsahuje aminokyseliny a vitamíny, bylo smícháno s 3,8 g minerálů ze speciální EARLE směsi, 1 g glukózy a 15 g purifikovaného agaru (Takashio's diluted Sabouraud dextrose agar with salt) v 1000 ml vody. Takto připravené médium se ukázalo nejvhodnější pro tvorbu perithecií (Honma & Nishimoto 1989).

Specifické médium je zapotřebí k navození tvorby pohlavního stádia u *Pestalotiopsis microspora*. Tento endofyt známý z himálajského tisu (*Taxus wallichiana*) je producentem taxolu, látky která se s úspěchem využívá k léčbě rakoviny plic a vaječnicků. Kvůli studiu dědičnosti genů souvisejících s biosyntézou taxolu byla snaha o navození pohlavního stádia. Do média chudého na živiny byly přidány sušené jehlice tisu a kultura byla inkubována při teplotě 16-20 °C a při dvanácti hodinách světla denně. Bylo zjištěno, že jehlice tisu obsahují

speciální látky (methylen chlorid), které podporují tvorbu perithecií. Tyto hydrofobní rostlinné sloučeniny byly nazvány „perithecial-stimulating factor (PFS)“ (Anneke et al. 2000).

Tvorba pohlavního stádia u *Aspergillus fumigatus*, který byl dlouho považován za modelový příklad striktně asexuálního druhu, byla navozena ponecháním kultur ve tmě za spolupůsobení dalších faktorů s použitím Czapek-dox agaru (CDA), ovesného agaru (Oatmeal agar) a kompletního média pro *Aspergillus* (*Aspergillus* complete medium). Tyto podmínky napodobují přirozené prostředí tohoto druhu. Pohlavní stádium bylo přiřazeno k rodu *Neosartorya* a pojmenováno *N. fumigata* (O' Gorman et al. 2009).

### **Postup při hledání teleomorfy**

V případě homotalických druhů lze stimulovat tvorbu plodniček použitím speciálních podmínek kultivace (viz. kapitola Stimulace tvorby teleomorfy). U heterotalických druhů je nejefektivnější postup popsán v práci O'Gorman et al. (2009). Pomocí PCR fingerprintingu byla nejdříve zjištěna příbuznost jednotlivých izolátů *Aspergillus fumigatus* a jejich pohlavní ladění pomocí PCR primerů pro MAT faktory. Následně byli kříženi jen kompatibilní jedinci, kteří jsou navíc geneticky příbuzní. Rozložení MAT faktorů v populaci není vždy rovnoměrné a vzácnost jednoho z nich může být klíčovým problémem při hledání kompatibilních jedinců (Tabulka 5.). Přehled používaných primerů k amplifikaci MAT idiomofr uvádí (Tabulka 6).

<b>Organismus</b>	<b>Procentuální zastoupení MAT1 : MAT2</b>	<b>Počet hodnocených izolátů</b>	<b>Reference</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	49,4 : 50,6	91	O’Gorman et al. (2009)
<i>Aspergillus terreus</i>	60 : 40	25	Eagle (2009)
<i>Neosartorya udagawae</i>	41,6 : 58,3	12	Sugui et al. (2010)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (druhový komplex)	86 : 13,24	68	Symoyens et al. (2011)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	97 : 1	539	

**Tabulka 5.** Procentuální zastoupení MAT1 a MAT2 v populaci různých druhů

<b>Organismus</b>	<b>Citace</b>
<i>Ascochyta rabiei</i>	Bennett et al. (2003)
<i>Ceratocystis</i> spp.	Witthuhn et al. (2000)
<i>Cochliobolus sativus</i>	Zhong & Steffenson (2001)
<i>Cordyceps takaomontana</i>	Yokoyama et al. (2005)
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Montenegro et al. (2008)
<i>Diaporthe</i> spp.	Santos et al. (2010)
<i>Fusarium</i> spp.	Karényi et al. (2004)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Bubnick & Smulian (2007)
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	Barve et al. (2003)
<i>Phaeosphaeria avenaria, P. arenaria</i>	Ueng et al. (2003)
<i>Tuber melanosporum</i>	Rubini et al. (2010)

**Tabulka 6.** Přehled primerů používaných u různých druhů k amplifikaci MAT idiomorf.

### **Genetické pozadí tvorby pohlavního stádia**

V roce 1904 demonstroval Blakeslee, že u některých zástupců Mucorinae (Zygomycetes) bylo možné párování pouze mezi dvěma opačnými monosporickými kmeny. Kultury mohly být rozděleny do dvou sexuálně kompatibilních skupin, nerozlišitelných morfologicky, které byly označeny + a – (Blakeslee 1904). V návaznosti na toto pozorování byl objeven heretothallismus i u ostatních hub, hlavně u vláknitých ascomycet (Edgerton 1914). Poprvé byl popsán u *Ascobolus magnificus* a *Ascobolus carbonarius* (Dodge 1920) a u několika druhů *Neurospora* (Shear & Dodge 1927) a bylo ukázáno, že párovací typ odpovídá dvěma alelickým formám jednoho lokusu, tedy že se jedná o heterothalismus bipolární (Whitehouse 1949). Bylo zjištěno, že heterothalismus je nezávislý na sexuální diferenciaci, kmeny o opačných párovacích typech produkují receptorové a donorové elementy, v podstatě samčí a samičí pohlavní orgány, ale dva kmeny, které představují kompatibilní pár orgánů, jsou vždy opačného párovacího typu. Kompatibilní interakce iniciuje vývoj plodnice, která produkuje askospory (Gwynne-Vaughan & Williamson 1932). Studie s *Bombardia lunata* ukázala, že donorové buňky produkují substanci, která je schopná specificky přitahovat receptorové buňky opačného párovacího typu. Toto pozorování se stalo prvním nepřímým důkazem, že párovací typy kontrolují hormonální mechanismus fúze sexuálně kompatibilních buněk. Experimenty s *Ascobolus stercorarius* však ukázaly, že párovací faktory mají další funkci v procesu následujícím po sexuálním rozpoznání, a to v tvorbě a vývoji plodnice (Bistis & Raper 1963). Tato duální role párovacích faktorů byla potvrzena molekulárními studiemi, které začaly v roce 1988 klonováním *A* a *a* párovacích typů *Neurospora crassa* a kompletním sekvenováním DNA *a* a *alfa* párovacích typů *Saccharomyces cervisie*. Další vývoj poznání párovacího procesu ascomycet je podán v souhrnných pracích Coppin et al. (1997), Eagle (2009), ze kterých jsem také čerpala v této bakalářské práci.

### ***Heterothalismus a homothalismus***

Podle definice jsou heterothalické ty druhy, které nejsou schopny pohlavního rozmnožování pomocí samooplození (tzv. self-fertile), ale musí se zkřížit s partnerem opačného párovacího typu. Homothalické druhy jsou schopny samo-oplození bez nutnosti křížení s partnerem.

Homothalické druhy jsou zároveň schopné tvorby askospor s kompatibilním partnerem při vhodných podmínkách prostředí, což znamená, že mohou profitovat z výhod rekombinace. Homothalická sexuální reprodukce samooplozením nezahrnuje rekombinaci a z genetického hlediska je tedy tato reprodukce v podstatě klonální a stejná, jako asexuální reprodukce (Nauta & Hoekstra 1992).

*Aspergillus nidulans* je homothalický ascomycet se strukturou populací téměř klonální, což naznačuje, že je preferována reprodukce asexuálními konidii a samooplozením vzniklými askosporami (Pontecorvo 1953). Ukazuje se však, že křížení se zde též vyskytuje, pravděpodobně právě z důvodu zvýšení genetické variability druhu (Croft & Jinks 1977). Podobně se rozmnožuje i rostlinný patogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Anderson & Kohn 1998). Určité výhody heterothalismu se tedy uplatňují i u homothalických druhů, pokud dochází k rekombinaci.

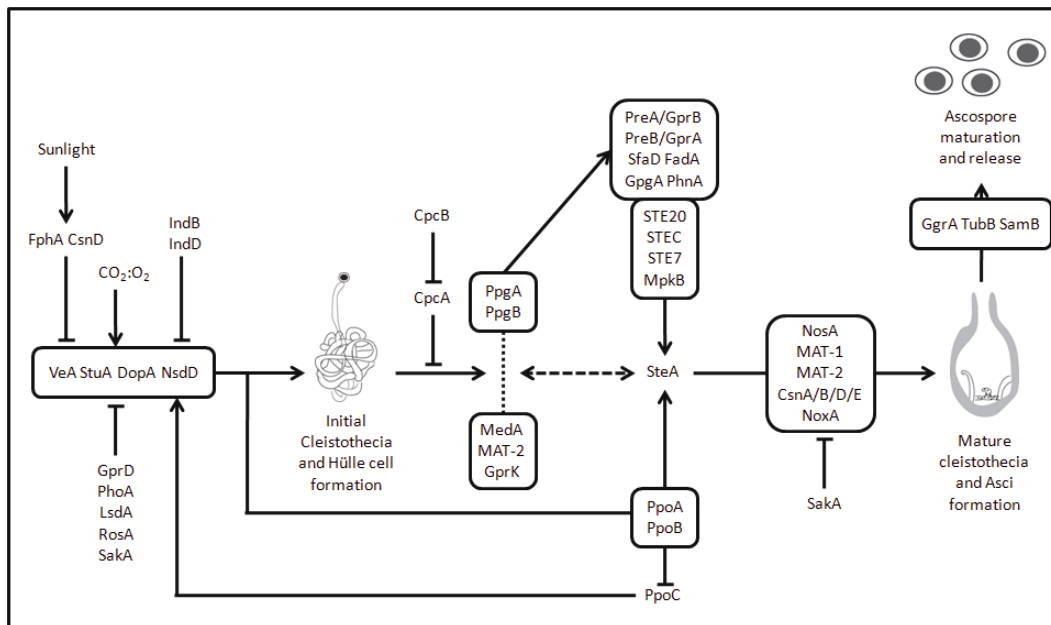
#### ***Pseudohomothalismus (sekundární homothalismus)***

Pseudohomothalické druhy se podobají homothalickým v produkci potomstva, které se chová převážně jako by bylo homothalické. Odchylkami v průběhu druhého meiotického dělení dochází k tvorbě heterokaryonu, který obsahuje geneticky odlišná jádra nesoucí opačné párovací faktory. Tyto druhy tvoří dva typy askospor. První, dvoujaderný typ askospor je častější a obsahuje dvě geneticky odlišná jádra, uzavřena v jediné pohlavně vzniklé askospoře. Askospory bývají ve čtyřsporých věccích a funkčně jsou homothalické (Choppin et al. 1997). Druhý typ askospor je menší a méně častý. Tento typ je haploidní, věcka obsahují osm pohlavně vzniklých askospor, potomstvo z nich vzniklé musí pro párování najít kompatibilního partnera a chová se jako heterothalické. Sekundární homothalismus by popsán u druhů *Podospora anserina*, *Neurospora tetrasperma* a *Gelasinospora tetrasperma* (Raju & Perkins 1994).

#### ***Molekulární genetika sexuální reprodukce u ascomycet***

Molekulárně genetické pozadí pohlavního rozmnožování u ascomycet je velmi podrobně prostudované a bylo již identifikováno mnoho genů zapojených v sexuálním procesu. Klíčové jsou párovací geny (mating-type genes, MAT). Mnoho dosavadních studií se zaměřovalo především na modelový rod *Aspergillus*.

Podle odhadů je v procesu sexuálního rozmnožování zahrnuto 200 až 400 genů (Dyer et al. 1992). Na obrázku 2 jsou geny zahrnuté v pohlavním cyklu *A. nidulans* (Dyer 2007).



Obrázek 2. Geny zahrnuté v pohlavním cyklu *A. nidulans* (Dyer 2007).

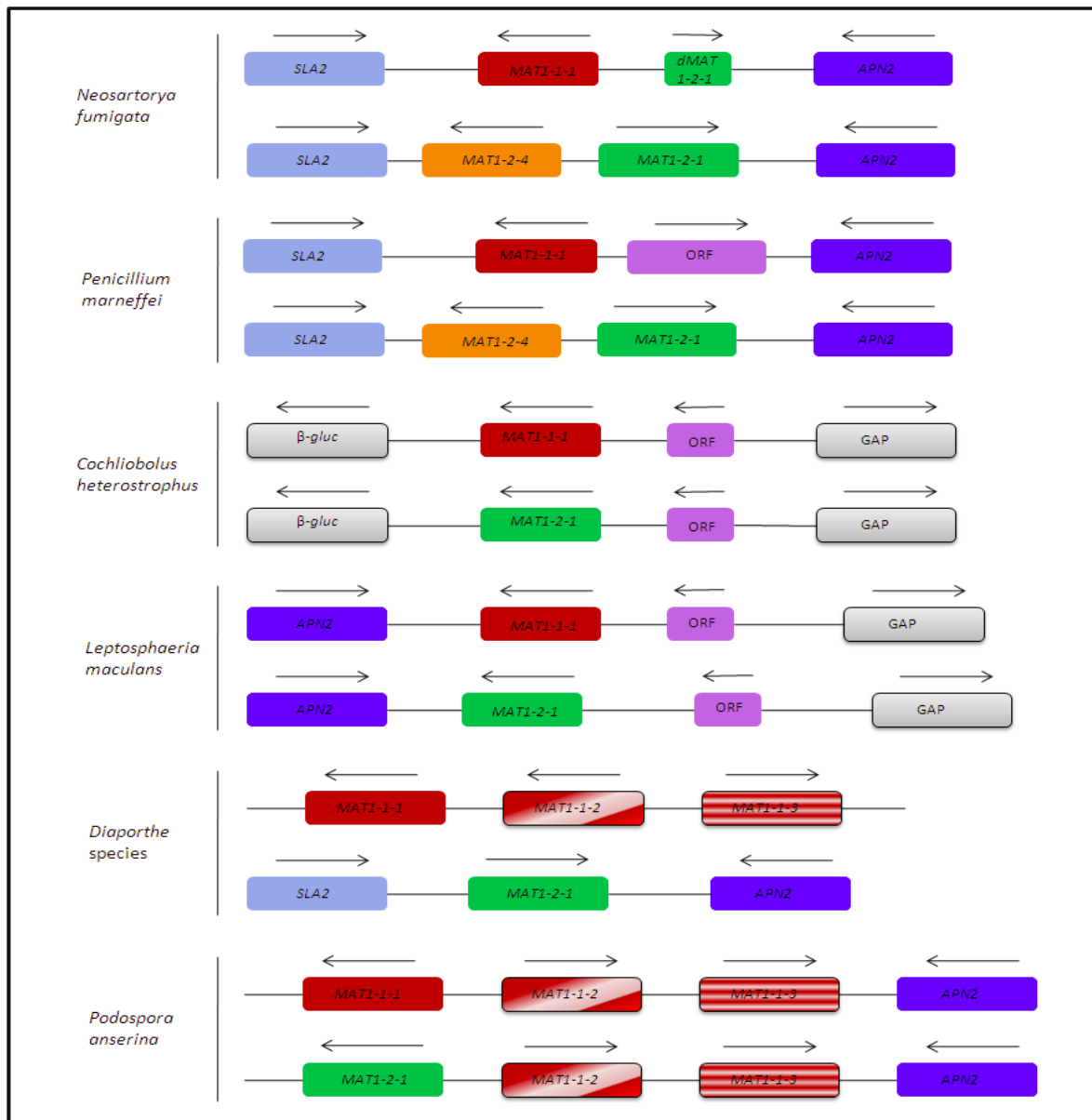
Sexuální reprodukce u heterotalických vláknitých ascomycet je zprostředkována geny přítomnými v „párovacím“ lokusu (mating-type lokus) (Turgeon 1998) a může nastat pouze tehdy, pokud jsou přítomny kompatibilní párovací typy (mating types) (Dyer et al. 1992). Párovací typ je určen přítomností nebo absencí MAT genů (Shiu & Glass 2000). Vláknité ascomycety mají jednolokusový, dvoualelový párovací systém (Kronstad & Staben 1997). Tento bialelický párovací systém byl též pozorován u kvasinek, např. u druhu *Saccharomyces cerevisiae* (Mayrhofer & Pöggler 2005). U basidiomycet je situace komplikovanější (James et al. 2006).

U vláknitých ascomycet (Pezizomycotina) jsou klíčové dva párovací (MAT) geny. MAT1-1 a MAT1-2 (Turgeon & Yoder 2000), ale často se můžeme setkat i se staršími označeními MATa a MATA (*Neurospora crassa*) a MAT+ a MAT- (*Podospora anserina*). První gen MAT1-1 (zkráceně MAT-1) je charakteristický sekvencí DNA, která kóduje protein s alfa doménou. Druhý gen MAT1-2 (zkráceně MAT-2) je charakteristický sekvencí kódující protein s HMG doménou (high mobility group) (Coppin et al. 1997). Tyto charakteristické MAT geny nevykazují strukturní podobnost, nicméně sdílejí určité sekvenční podobnosti, což vede ke

spekulaci, že by mohly mít společný evoluční původ (Debuchy & Turgeon 2006). To má za následek, že oblasti obsahující MAT geny jsou nazývány u heterothalických druhů idiomorfy, nikoliv alelami (Metzenberg & Glass 1990). U homothalických druhů jsou oblasti obsahující MAT geny nazývány pouze MAT lokusy, termín idiomorfa se zde neužívá. Termíny MAT idiomorfa a MAT lokus se velmi často používají jako synonyma. V názvosloví párovacích typů (jako je MAT1, MATa atd.) a celého názvu pro MAT oblast (lokus, idiomorfa) panuje nejednotnost.

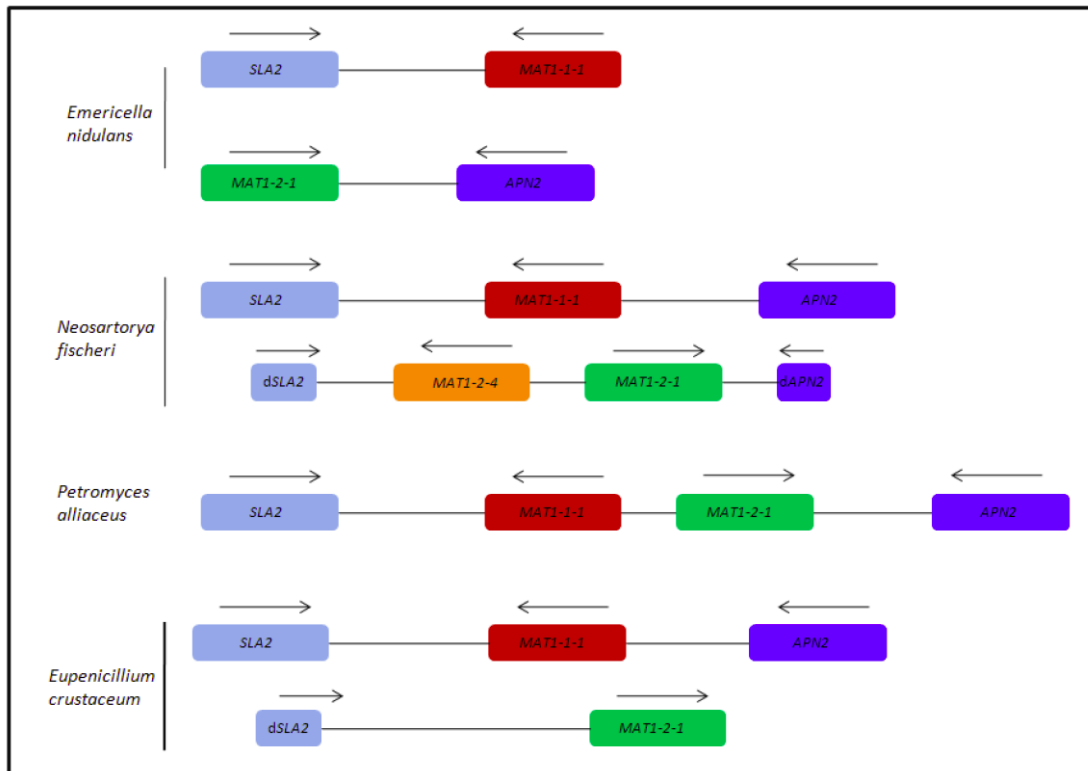
K MAT idiomorfám přiléhají geny kodující proteiny s GTPázovou aktivitou (Cozijnsen & Howlett 2003), geny pro  $\beta$ -glukosidázu (Yun et al. 1999), geny pro cytoskeletární proteiny, SLA2 gen (Melms et al. 1999), geny pro DNA lyázu, APN2 gen (Johnson et al. 1998). Pozice SLA2 a APN2 genů jsou u euscomycet většinou velmi konzervativní (Debuchy & Turgeon 2006, Mandel et al. 2007), což naznačuje možnost jejich společného předka (Reyholm et al. 2007). Tyto konzervativní oblasti lze využít při hledání PCR primerů pro MAT geny. V oblasti idiomorfy mohou být v závislosti na konkrétním druhu přítomny i jiné geny než MAT1 a MAT2. Stejně tak se mohou lišit i geny, které k idiomorfám přiléhají.

U skupiny Sordariomycetes mohou být v MAT-1 idiomorfě přítomny tři MAT geny (MAT1-1-1, MAT 1-1-2 a MAT1-1-3) ve srovnání s ostatními skupinami, např. s rodem *Cochliobolus*, u kterého je v MAT lokusu přítomen pouze jediný gen (Yun et al. 1999). U některých druhů ze skupiny Eutotiomyces byl nalezen MAT1-2-4 gen, nacházející se v MAT-2 lokusu (Bubnick & Smulian 2007). Uspořádání MAT genů v MAT idiomorfách u heterothalických druhů Pezizomycota ukazuje obrázek 3 a u homothalických obrázek 4 (Eagle 2009).



**Obrázek 3.** Uspořádání MAT genů v MAT idiomorfách u heterotalických druhů Pezizomycotina. Převzato z Eagle (2009).





**Obrázek 4.** Uspořádání MAT genů v MAT lokusech u homothalických druhů Pezizomycotina. Převzato z Eagle (2009).

MAT geny se považují za esenciální v procesu indukce pohlavního cyklu a produkce pohlavních struktur (Hiscock & Kúes 1999). Obsahují sekvence, kódující DNA vazebné domény, které fungují jako transkripční faktory (Jacobsen et al. 2002). Jako transkripční aktivátor působí alfa doména obsahující protein kódovaný MAT1-1-1 genem, který kooperuje s dalšími proteiny specifickými pro sexuální rozmnožování (Coppin et al. 1997). Produkt MAT1-2-1 genu s HMG doménou obsahuje na prolin bohatou C-koncovou oblast, která je velmi podobná oblastem nalezeným u transkripčních aktivátorů (Coppin et al. 1997). *In vitro* bylo prokázáno, že samotná HMG doména je schopná vazby na DNA (Kronstad & Staben 1997).

MAT geny jsou považovány za hlavní regulátory procesů zahrnutých v expersi feromonů a feromonových receptorů (Pöggeler 2002), podobně jako v post-fertilizačních procesech (Dyer 2007), jako je například kontrola a případná zástava buněčného cyklu (Banuett 1998). Proteinové produkty komplementárních MAT genů navzájem interagují, jak bylo prokázáno u druhu *Sordaria macrospora* (Jacobsen et al. 2002).

## **Závěr**

Cílem mé práce bylo podat přehled faktorů, které navozují sporulaci a tvorbu pohlavního stádia. Účinek těchto faktorů je odlišný u různých druhů, tím pádem nelze obecně říci, že by konkrétní faktor působil pouze jako aktivátor či inhibitor zmíněných procesů. Lze však konstatovat, že indukční pro sporulaci i tvorbu pohlavního stádia jsou faktory limitní, tedy stres. V těchto podmínkách houba začíná tvořit rozmnožovací struktury ve snaze zanechat co největší množství potomků, pokud jí samotné hrozí poškození či uhynutí. Mezi nejlépe prostudované faktory indukující sporulaci patří světlo a u některých druhů jsou známy i jeho optimální vlnové délky. Dalším důležitým faktorem je složení média, konkrétně obsah živin, hlavně uhlíku a dusíku. Pohlavní rozmnožování ascomycet je řízeno párovacími (MAT) geny. Při studiu tvorby teleomorfy hraje zásadní roli určení polarity kmenu a následné párování s možným využitím PCR primerů. V přírodě často nenacházíme teleomorfní stádia hub díky nerovnoměrnému rozdělení párovacích typů v populaci, či díky velmi specifickým podmínkám, které určité houby pro tvorbu pohlavního stádia vyžadují.

## Citace

ADAMS, T. H., WIESER, J. K., YU, J. H. (1998): Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 35-54.

ALEX, L. A., BORKOVICH, K. A., SIMON, M. I. (1996): Hyphal development in *Neurospora crassa*: Involvement of a two-component histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3416-3421.

ANDERSON, J., KOHN, L. (1998): Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *Tree* 13: 444-449.

ANNEKE, M. M., ASMAHAN, H., WORAPONG, J., LONG, D. M., E. J., HESS, W. M., STROBEL, G. A. (2000): Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. *Microbiology* 146: 2079-2089.

APPELYARD, M. V. C. L, McPHEAT, W. L., STARK, M. J. R (2000): A novel „two-component“ protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 37: 364-372.

ATLAS R. M. (2010) *Handbook of microbiological media*, 4th edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 2040.

AXELROD, D. E., GEALT, M., PASTUSHOK, M. (1973): Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology* 34: 9-15.

BAGGERMAN, W., SAMSON, R. (1988): Heat resistance of fungal spores, In: SAMSON R., REENEN-HOEKSTRA E. V. (eds.) *Introduction to food-borne fungi*, pp. 262-267, Centraalbureau voor Schimmelcultuur, Baarn.

BAILEY-SHRODE, L., EBBOLE, D.J. (2004): The fluffy gene of *Neurospora crassa* is necessary and sufficient to induce conidiophore development. *Genetics* 166: 1741-1749.

BANNUET, F. (1998): Signalling in the yeasts: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 249-274.

- BARRAN, L. R., SCHNEIDER, E. F., SEAMEN, W. L. (1977): Requirements for the rapid conversion of macroconidia of *Fusarium sulphureum* to chlamydospores. Canadian Journal of Microbiology 23: 148-151.
- BARTON, N., CHARLESWORTH, B. (1998): Why sex and recombination? Science 281: 1986-1990.
- BARVE, M. P., ARIE, T., SALIMATH, S. S., MUEHLBAUER, F. J., PEEVER, T. L. (2003): Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. Fungal Genetics and Biology 39: 151-167.
- BASTOS, C. N. (2001): Effect of temperature, pH and nutrition on growth and sporulation of *Trichoderma stromaticum* sp. nov., an antagonist of cocoa witches' broom pathogen. Summa Phytopathologica 27: 73-76.
- BENNETT, R. S., YUN, S. H., LEE, T. Y., TURGEON, B. G., ARSENIUK, E., CUNFER, B. M., BERSTROM, G. C. (2003): Identify and conservation of mating type genes in geographically diverse isolates of *Phaeosphaeria nodorum*. Fungal Genetics and Biology 40:25-37.
- BETINA, V. (1995): Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. Folia microbiologica 40: 219-224.
- BETINA, V., ZAJACOVÁ, J. (1978): Regulation of periodicity and intensity of photo-induced conidiation of *Trichoderma viride*. Folia Microbiologica 23: 453-459.
- BISTIS, G. N., RAPER, J. R. (1963): Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*, American Journal of Botany 50: 880-891.
- BLAKESLEE, A. (1904): Sexual reproduction in the *Mucorinae*. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 40: 205-319.
- BUBNICK, M., AND SMULIAN, A.G. (2007) The MAT1 locus of *Histoplasma capsulatum* is responsive in a mating type-specific manner. Eukaryotic Cell 6: 616-621.
- BUBNICK, M., SMULIAN, A. (2007): The MAT1 locus of *Histoplasma capsulatum* is responsive in mating type-specific manner. Eukaryotic Cell 6: 616-621.

CASAS-FLORES, S., RIOS-MOMBERG, M., BIBBINS, M., PONCE-NOYOLA, P., HERRERA-ESTRELLA, A. (2004): BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150: 3561-3569.

CASTELLANOS, F., SCHMOLL, M., MARTÍNEZ, P., TISCH, D., KUBICEK, C. P., HERRERA-ESTRELLA, A., ESQUIVEL-NARANJO, E. U. (2010): Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 468-476.

COOKE, R. C., WHIPPS, J. M. (1993): Induction and control of reproduction, In: *Ecophysiology of Fungi*, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, pp. 337.

COPPIN, E., DEBUCHY, R., ARNAISE, S., PICARD, M. (1997): Mating types and sexual development in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 411-428.

COZIJNSEN, A., HOWLETT, B. (2003): Characterization of the mating-type locus of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* 43: 351-357.

CROFT, J., JINKS, J. (1977): Aspects of the population genetics of *Aspergillus nidulans*, In: SMITH J., PATEMAN J. (eds.), *Genetics and physiology of Aspergillus*, pp. 339-360, Academic Press, London.

CUNNINGHAM, J. E., KUIACK, C. (1992): Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1451-1458.

DEBUCHY, R., TURGEON, B. (2006): Mating-type structure, evolution, and function in euascomycetes, In: KUES U., FISCHER R. (eds.), *The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality*, pp. 293-323, Springer-Verlag, Berlin.

DODGE, B. O. (1920): The life history of *Ascobolus magnificus*. *Mycologia* 12: 115-134.

DYER, P. (2007): Sexual reproduction and significance of MAT in the *Aspergilli*, In: HARTMAN, J., KRONSTAD, J., TYLOR, J., CASSELTON, L. (eds.), *Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications*, pp. 123-142, ASM Press, Washington DC.

- DYER, P., INGRAM, D., JOHNSTONE, K. (1992): The control of sexual morphogenesis in the ascomycotina. *Biology reviews* 67: 421-458.
- EAGLE, C. E. (2009): Mating-type genes and sexual potential in the Ascomycete genera *Aspergillus* and *Penicillium*, University of Nottingham, Ph.D. thesis, pp. 383.
- EDGERTON, C. W. (1914): Plus and minus strain in ascomycetes. *Science* 35: 151.
- FANG, W., PEI, Y., BIDOCHKA, M. J. (2007): A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag 8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizum anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology* 153: 1017-1025.
- FLAHERTY, J. E., DUNKLE, L. D. (2005): Identification and expression analysis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 471-381.
- FORTWENDEL, J. R., PANEPINTO, J. C., SEITZ, J. C., ASKEW, D. S., RHODES, J. C. (2004): *Aspergillus fumigatus* *rasA* and *rasB* regulate timing and morphology of asexual development. *Fungal Genetics and Biology* 41: 129-139.
- FOSTER, J. W., McDANIEL, L. E., WOODRUFF, H. B., STOKES, J. L. (1945): Microbiological aspects of penicillin. V. Conidiospore formation in submerged cultures of *Penicillium notatum*. *Journal of Bacteriology* 50: 355-368.
- GAO, L., SUN, M. H., LIU, X. Z., CHE, Y. S. (2007): Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111: 87-92.
- GUTTER, Y. (1957): Effects of light on sporulation of *Trichoderma viride*. *Bulletin of the Research Council of Israel Section D: Botany* 5: 273-286.
- GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I., WILLIAMSON, H. S. (1932): The cytology and development of *Ascobolus magnificus*. *Annals of Botany* 46: 653-670.
- HANSBERG, W., AGUIRRE, J. (1990): Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology* 142: 201-221.

HAWKSWORTH, D., KIRK, P., SUTTON, B., PEGLER, D. (1995): Ainsworth and Bisby's Dictionary of fungi. CAB International, Oxon.

HE, Q., CHENG, P., YANG, Y., WANG, L., GARDNER, K. H., LIU, Y. (2002): White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297: 840-843.

HISCOCK, S., KÚES, U. (1999): Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *International Review of Cytology* 193: 165-295.

HOCK, B., BAHN, M., WALK, R. A., NITSCHKE, U. (1978): The control of fruiting body formation in the Ascomycete *Sordaria macrospora* Auersw. By regulation of hyphal development. *Planta* 141: 93-103.

HONDA, Y. (1983): Light-dependence for fruiting body formation and its inheritance in *Phoma caricae-papayae*. *Mycologia* 75: 22-29.

HONMA, K., NISHIMOTO, K. (1989): Attempt to make a suitable medium for induction of teleomorph of *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Japanese Journal of Medical Mycology* 30: 182-186.

HORN, B., MOORE, G., CARBONE, I. (2009): Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 101: 423-429.

IBBA, M., TAYLOR, S. J. C., WEEDON, C. M., MANTLE, P. G. (1987): Submerged fermentation of *Penicillium paxilli* biosynthesizing paxilline, a process inhibited by calcium-induced sporulation. *Journal of General Microbiology* 133: 3109-3119.

JACOBSEN, S., WITTIG, M., PÖGGLER, S (2002): Interaction between mating-type proteins from the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Current genetics* 41: 150-158.

JAMES, T., SRIVILAI, P., KÚES, U., VILGALYS, R. (2006): Evolution of the bipolar mating system of the mushroom *Coprinellus disseminatus* from its tetrapolar ancestors involves loss of mating-type-specific pheromone receptor function. *Genetics* 172: 1877-1891.

JOHNSON, R., TORRES-RAMOS, C., IZUMI, T., MITRA, S., PRAKASH, S., PRAKASH, L. (1998): Identification of APN 2, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP

endonuclease HAP1, and its role in the repair of abasis sites. *Genes and Development* 12: 3137-3143.

KARÉNYI, Z., MORETTI, A., WAALWIJK, C., OLÁH, B., HORNOK, L. (2004): Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and environmental Microbiology* 70: 4419-4423.

KIM, H. S., HAN, K. Y., KIM, K. J., HAN, D. M., JAHNG, K. Y., CHAE, K. S. (2002): The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 37: 72-80.

KRONSTAD, J., STABEN, C. (1997): Mating type in filamentous fungi. *Annual review in Genetics* 31: 245-267.

LAUTER, F. R., YAMASHIRO, C. T., YANOFSKY, C. H. (1997): Light stimulation of conidiation in *Neurospora crassa*: studies with the wild-type strain and *wc-1*, *wc-2* and *acon-2*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 37: 203-211.

LEE, B. N., ADAMS, T. H. (1995): *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA $\beta$*  activation. *EMBO Journal* 15: 299-309.

LEGGETT, M. E., RAHE, J. E. (1985): Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. *Annals of Applied Biology* 106:255-263.

LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. (2006): Media - recipes and preparation. In: LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A. (eds.), *The Fusarium laboratory manual*, pp. 2-13, Iowa State University Press.

MADI, L., McBRIDE, S. A., BAILEY, L. A., EBBOLE, D. J. (1997): *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 146: 499-508.

MAEDA, T., WURGLER-MURPHY, S. M., SAITO, H. (1994): A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeasts. *Nature* 369: 242-245.



- MANDEL, M., BARKER, B., KROKEN, S., ROUNSLEY, S., ORBACH, M. (2007): Genomic and population analyses of the mating type loci in *Coccidioides* species reveal evidence for sexual reproduction and gene acquisition. *Eukaryotic Cell* 6: 1189-1199.
- MARSHALL, M. A., TIMBERLAKE, W. E. (1991): *Aspergillus nidulans* *WetA* activates spore-specific gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 11: 55-62.
- MAYRHOFER, S., PÖGGLER, S. (2005): Functional characterization of an  $\alpha$ -factor-like *Sordaria macrospora* peptide pheromone and analysis of its interaction with its cognate receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 4: 661-672.
- McALPIN, C. E., WICKLOW, D. T. (2005): Culture media and sources of nitrogen promoting the formation of stromata and ascocarps in *Pertomyces alliaceus* (*Aspergillus* section *Flavi*). *Canadian Journal of Microbiology* 51: 765-771.
- MELMS, A., GAUSMAN, U., SWOBODA, R., DOMNIGUEZ, A., KURISCHKO, C. (1999): Sequence analysis of SLA2 of the dimorphic yeasts *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica*. *Yeasts* 15: 1519-1528.
- METZENBERG, R., GLASS N. (1990): Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12: 53-59.
- MONTENEGRO, D., AGUÍN, O., SAINZ, M.J., HERMIDA, M., AND MANSILLA, J.P. (2008): Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW Spain. *Forest Ecology and Management* 256: 973-980.
- MOONEY, J. L., YAGER, L. N. (1990): Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development* 4:1473-1482.
- MOORE-LANDECKER, E. (1987): Effects of medium composition and light on formation of apotecia and sclerotia by *Pyronema domesticum*. *Canadian Journal of Botany* 65: 2276-2279.
- MORTON, A. G. (1961): The induction of sporulation in mould fungi. *Proceedings Royal Microscopical Society B* 153: 548-569.

- NAUTA, M., HOEKSTRA, R. (1992): Evolution of reproductive systems in filamentous ascomycetes.1. Evolution of mating types, *Heredity* 68: 405-410.
- O'GORMAN, C. M., FULLER, H. T., DYER, P. S. (2009): Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457: 471-475.
- OLMEDO, M., RUGER-HERROS, C. L. M. (2010): Regulation by blue light of the *fluffy* gene encoding a major regulator of conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 184: 651-658.
- ORITSEJAFOR, J. J. (1986): Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Elaeidis*. *Transactions of the British Mycological Society* 87, 225-231.
- PAOLETTI, M., SEYMOUR, F. A., ALCOCER, M. J., KAUR, N., CALVO, A. M., ARCHER, D. B., DYER, P. S. (2007): Mating type and the genetic basis of self-fertility in model fungus *Aspergillus nidulans*. *Current Biology* 17: 1384-1389.
- PASCUAL, S., MELGAREJO, P., MAGAN, N. (1997): Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 389-392.
- PAŽOUT, J., PAŽOUTOVA, S., VANČURA, V. (1982): Effects of light, phosphate and oxygen on ethylene formation and conidiation in surface cultures of *Penicillium cyclopium*. *Westling, Current Microbiology* 7: 133-136.
- PONTECORVO, G. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5: 141-238.
- PÖGGLER, S. (2002): Genomic evidence for mating abilities in the asexual pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Current genetics* 42: 153-160.
- RAJU, N. B., PERKINS, D. D. (1994): Diverse programs of ascus development in pseudomomothallic species *Neurospora*, *Gelasinospora* and *Podospora*. *Developmental Genetics* 15: 104-118.

REYHOLM, C., DYER, P., LUTZONI, F. (2007) DNA sequence characterization and molecular evolution of MAT1 and MAT2 mating-type loci of the self-compatible ascomycete *Neosartorya fischeri*. *Eucaryotic Cell* 6: 868-874.

RIGHELATO, R. C., TRINCI, A. P. J., PIRT, S. J., PEAT, A. (1968): The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology* 50: 399-412.

ROBERTS, A. N., BERLIN, V., HAGER, K. M., YANOFSKY, C. (1988): Molecular analysis of a *Neurospora crassa* gene expressed during conidiation. *Molecular and Cellular Biology* 8: 2411-2418.

RONCAL, T., UGALDE, U. (2003): Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology* 154: 539-546.

ROONEY-LATHAM, S., ESKALEN, A., GUBLER, W. D. (2005): Teleomorph formation of *Phaeoacremonium aleophilum*, cause of esca and grapevine decline in California. *Plant Disease* 89: 177-184.

RUBINI, A., BELFIORI, B., RICCIONI, C., TISSERANT, E., ARCIONI, S., MARTIN, F., AND PAOLOCCI, F. (2011): Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 189: 710-722.

SÁNCHEZ-MURILLO, R. I., TORRE-MARTÍNEZ, M., AGUIRRE-LINARES, J., HERRERA-ESTRELLA, A. (2004): Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology* 150 : 311- 319.

SANTOS, J. M., CORREIA, V. G., PHILLIPS A. J. L. (2010): Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology* 114: 255-270.

SEWALL, T. C., MIMS, C. W., TIMBERLAKE W. E. (1990) *AbaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2: 731-739.

SHEAR, C. L., DODGE, B. O. (1927): Life histories and heterothallism of the red bread mould fungi of the *Monilia sitipholia* group. *Journal of Agriculture Research* 34:1019-1042.

- SHIU, P., GLASS, N. (2000): Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 3: 183-188.
- SIMKOVIC, M., DITTE, P., KURUCOVA, A., LAKATOS, B., VARECKA, L. (2008): Ca<sup>2+</sup> -dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology* 138: 291-298.
- SKROMNE, I., SANCHEZ, O., AUGUIRRE, J. (1995): Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141: 21-28.
- SONG, M. H., NAH, J. Y., HAN, Y. S., HAN, D. M., CHAE, K. S. (2001): Promotion of conidial head formation in *Aspergillus oryzae* by a salt. *Biotechnology Letters* 23: 689-691.
- STEYAERT, J. M., WELD, R. J., MENDOZA-MENDOZA, A., STEWART, A. (2010): Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology* 156: 2887-2900.
- SUGUI, J. A., VINH, D. C., NARDONE, G., SHEA, Y. R., CHANG, Y. C., ZELAZNY, A. M. et al (2010): *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an Emerging Agent of Aspergillosis: How Different Is It from *Aspergillus fumigatus*? *Journal of Clinical Microbiology* 48: 220-228.
- SYMOENS, F., JOUSSON, O., PLANARD, C. H., FRATTI, M., STAIB, P., MIGNON, B., MONOD, M. (2011): Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *International Journal of Medical Microbiology* 301: 260-266.
- TAN, K. K. (1978): Light-induced fungal development, In: SMITH J. E., BERRY D. R. (eds.), *The filamentous fungi Vol III. Developmental mycology*, pp. 334-357, Edward Arnold, London.
- TURGEON, B. (1998): Application of mating-type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology* 36: 115-137.
- TURGEON, B., YODER, O. (2000): Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 31: 1-5.

TURIAN, G. (1978): Sexual morphogenesis in the ascomycetes, In: SMITH J. E., BERRY D. R. (eds.) *The filamentous fungi Vol. III. Developmental mycology*, pp: 315-333, Edward Arnold, London.

UENG, P. P., DAI, Q., CUI, K., CZEMBOR, P. C., CUNFER, B. M., TSANG, H., ARSENIUK, E., BERGSTROM, G. C. (2003): Sequence diversity of mating-type genes in *Phaeosphaeria averina*. *Current Genetics* 43:121-130

UGALDE, U., PITT, D. (1983): Morphology and calcium-induced conidiation of *Penicillium cyclopium* in submerged cultures. *Transactions of the British Mycological Society* 87: 199-203.

VAKALOUNAKIS, D. J., CHRISTIAS, C. (1986): Light quality, temperature and sporogenesis in *Alternaria cichori*. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 247-254.

WHITEHOUSE, H. (1949): Heterothallism and sex in the fungi. *Biological Reviews* 24: 411-447.

WITTHUHN, R. C., HARRINGTON, T. C., WINGFIELD, B. D., STEIMEL, J. P., WINGFIELD, M. J. (2000): Deletion of the *MAT-2* mating-type gene during uni-directional mating-type switching in *Ceratocystis*. *Current Genetics* 38: 48-52.

WOLKEN, W. A. M., TRAMPER, J., WERF, M. J. (2003): What can spores do for us? *Trends in Biotechnology* 21: 338-345.

YOKOYAMA, E., YAMAGISHI, K., HARA, A. (2005): Heterothallism in *Cordyceps takaomontana*. *FEMS Microbiology Letters* 250: 145-150.

YUN, S., BERBEE, M., YODER, O., TURGEON, B. (1999): Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self.fertile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5592-5597.

ZHONG, S., STEFFENSONA, B. J. (2001): Genetic and molecular characterization of mating type genes in *Cochliobolus sativus*. *Mycologia* 93(5): 852-863.