

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Vít Hubka

Geny β -tubulinových paralogů u rodu *Aspergillus*: taxonomický význam a markery použitelné
v jejich rozlišení

*β -tubulin paralogs in *Aspergillus*: taxonomical importance and molecular tools for
distinguishing*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Miroslav Kolařík, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 29.8.2011

Podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval především školiteli diplomové práce Mgr. Miroslavovi Kolaříkovi, PhD. za všestrannou podporu, výborné nápady a "akční" přístup v jejich realizaci. Zároveň si velmi vážím prostoru a volnosti, kterou jsem dostal v realizaci nápadů vlastních.

Dále bych rád poděkoval Mgr. Karlu Prášilovi, CSc., který dlouhou dobu vedl diplomovou i předcházející bakalářskou práci. Chtěl bych poděkovat i RNDr. S. Pažoutové, CSc., vedoucí Laboratoře genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub MBÚ AV ČR, ve které mi bylo umožněno vypracovat značnou část práce.

Za spolupráci děkuju RNDr. Aleně Kubátové, CSc., RNDr. Aleně Novákové, CSc., Mgr. Tomášovi Větrovskému, všem lékařům, zdravotnickým i nelékařským pracovištím (zmiňovány dále), které mi poskytly izoláty. Za pomoc s organizačními věcmi bych rád poděkoval Mgr. Ondřejovi Koukolovi, PhD.

Moc děkuju RNDr. Miladě Chudíčkové za izolaci většiny DNA a paní Dagmar Pokorné za lyofilizaci velkého množství kmenů.

Zvláštní dík patří mojí rodině, díky jejíž podpoře a zajištění jsem se mohl věnovat jen studiu a nemusel řešit existenciální otázky.

Poděkování za podporu a možnost prezentace výsledků na XIII. Mezinárodním mykologickém kongresu (IUMS 2011) v Sapporu patří nadaci Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových.

ABSTRAKT

Gen pro β -tubulin (*benA*) patří k nejvíce využívaným genům v taxonomii a identifikaci druhů u rodu *Aspergillus* i u ostatních hub. Napříč druhy rodu *Aspergillus* se v genomech gen pro β -tubulin vyskytuje buď v podobě jediného genu (*benA*), nebo může být přítomen ještě paralogní gen *tubC*. Jak bylo zjištěno, oba paralogy byly v taxonomii rodu *Aspergillus* opakovaně použity v kombinovaném datasetu společně. Tato práce charakterizuje oba geny u řady druhů *Aspergillus*, reviduje v současnosti používané primery pro β -tubulin a předkládá nové primery pro použití u rodu *Aspergillus*, které jsou více specifické pro gen *benA*. Navíc se snaží řešit nepřehlednou situaci kolem paralogů navržením řady markerů, které více či méně specificky odliší oba paralogy - parametry hodnotící "codon usage", složení bazí, délka intronů, sekvenční motivy. Součástí práce je i rozsáhlá studie molekulární diversity 349 izolátů *Aspergillus* (PCR-fingerprint, sekvenace - ITS, *benA*, *rpb2*, *caM*) pocházejících z českých sbírek a klinického materiálu mezi nimiž bylo nalezeno celkem 82 druhů. Na jejím základě bude navrženo devět nových taxonů, které byly odhaleny i v ekonomicky velmi významných sekcích jako jsou sekce *Nigri*, *Fumigati* nebo *Aspergillus* (*Eurotium* spp.). Pět druhů v sekci *Aspergillus* bude synonymizováno s již popsanými druhy. Studie molekulární diversity izolátů z klinického materiálu (n=200) je unikátní jednak geograficky (nejsou podobné práce z Evropy), ale také svým zaměřením nejen na invazivní aspergilózu.

ABSTRACT

A β -tubulin gene (*benA*) is widely used in taxonomy and identification of *Aspergillus* spp. and other Fungi. Across *Aspergillus* spp. there is either one (*benA*) or two β -tubulin paralogs (*benA* and *tubC*). The risk of contemporary use of sequences of paralogous genes with non-homologous function in the same phylogenetic analysis is well known. It is evident that it had happened repeatedly in *Aspergillus* section *Nigri*. It is alarming that conventional primers for amplification of partial *benA* sequence can specifically amplify *tubC* paralog in some species. In this work, both paralogs were characterised in a set of species. The β -tubulin primers in use were revised and new, more *benA* specific primers were designed. Applicability of some markers such as base composition, codon usage and length of introns for distinguishing β -tubulin paralogs *benA* and *tubC* is tested. A large study on molecular diversity of 349 isolates of *Aspergillus* (PCR-fingerprint, sequence data - ITS, *benA*, *rpb2*, *caM*) originating from Czech culture collections and from clinical material is also included. 82 species were identified, together with nine tentative new taxa belonging to sections with high economic impact - *Nigri*, *Fumigati* or *Aspergillus* (*Eurotium* spp.). Five species from Section *Aspergillus* could be synonymised with existing taxa. A study on molecular diversity of clinical isolates (n=200) is innovative in sense of the geographical origin, Central Europe, where is remarkable lack of similar reports. It also brings support for presence of several rare, little known or new species recognized as mycotic agents. This is the first comprehensive study providing reliable identification of such large set of aspergilli from both superficial and deep infections.

OBSAH

OBSAH	5
PŘEDMLUVA	6
1. TEORETICKÝ ÚVOD	8
1.1. Rod <i>Aspergillus</i> - význam, taxonomie a současný druhový koncept	8
1.1.1 Ekonomický význam	8
1.1.2 Vnitrodruhové členění	8
1.1.5. Medicínský význam rodu <i>Aspergillus</i> , diagnostická kritéria pro potvrzení infekce	10
1.2. Paralogní geny	12
1.2.1 Riziko paralogních genů pro taxonomii	12
1.2.2 Vznik paralogních genů procesem duplikace-subfunkcionalizace-komplementární degenerace	12
1.3. Tubulinová superrodina u eukaryotických organismů	14
1.3.1 Hlavní zástupci tubulinové superrodiny	14
1.3.2 Paralogní geny kódující β -tubulin u rodu <i>Aspergillus</i> a jejich nomenklatura	14
1.3.3 Funkce paralogů <i>benA</i> a <i>tubC</i> u rodu <i>Aspergillus</i>	15
1.3.4 β -tubulinové paralogy v říši Fungi	15
1.3.5 Specifita primerů užívaných k amplifikaci genu pro β -tubulin (<i>benA</i>)	15
1.4 Preference genů v používání kodonů: vztah ke genové expresi a možnosti hodnocení	17
1.4.1 "Codon usage" a genová exprese	17
1.4.2 Možnosti hodnocení "codon usage"	18
1.5. Význam intronů a architektiky genů v genomech eukaryot	21
1.5.1 Mají introny funkci?	21
1.5.2 Co ovlivňuje počet a délku intronů v genu?	22
1.5.3 Mechanismy získání a ztráty intronů	22
1.5.4 Specifika intronů hub	24
2. METODIKA	25
2.1 Zdroje materiálu	25
2.2 Kultivace, rozdělení do morfotypů a uchovávání kultur	25
2.3 Izolace DNA	25
2.4 PCR-fingerprintová metoda s primerem M13-core a typizace do druhu	26
2.5 PCR amplifikace a sekvenace	26
2.6 Navrhování primerů	27
2.7 Kontrukce fylogenetických stromu	27
2.8 Analýza codon usage	28
2.9 Statistické zpracování dat	28
3. VÝSLEDKY	29
3.1 Diverzitně-taxonomická část	29
3.1.1 Diversita izolátů uchovávaných v českých sbírkách mikroorganismů	29
3.1.2 Nepopsané taxony	43
3.1.3 Diversita klinických izolátů <i>Aspergillus</i> z českých pacientů	56
3.2 β -tubulinové paralogy u rodu <i>Aspergillus</i>	57
3.2.1 Nově navržené primery a jejich specifita k β -tubulinovým paralogům	57
3.2.2 Architektonika paralogů <i>benA</i> a <i>tubC</i>	60
3.2.3 Gen <i>tubC</i> není přítomen u všech druhů <i>Aspergillus</i>	60
3.2.4 Divergence paralogů se různí mezi druhy	60
3.2.5 V současnosti užívané primery jsou málo specifické	63
3.2.6 Paralog <i>tubC</i> je běžně zaměňován za gen <i>benA</i> v sekci <i>Nigri</i>	64
3.2.7 Nesprávnou specifitu primeru Bt2a v sekci <i>Nigri</i> řeší primer T10 a nově navržený T10n	67
3.2.8 Další markery použitelné k odlišení paralogů <i>benA</i> a <i>tubC</i>	68
4. DISKUZE	73
4.1 Výsada molekulárních metod u rodu <i>Aspergillus</i>	73
4.2 Je <i>benA</i> vhodný pro taxonomii?	73
4.3 Pozice intronů není nástroj k odlišení paralogů <i>benA</i> a <i>tubC</i>	74
4.4 Omyly v sekci <i>Nigri</i>	74
4.5 β -tubulinové paralogy: příčiny a možné následky rozdílné divergence	75
4.6 Vztah rozdílu v codon usage a délce intronů ke genové expresi a funkci proteinu	76
4.7 Kombinace molekulárních markerů při rozpoznávání β -tubulinových paralogů	76
5. ZÁVĚR	78
CITOVANÉ ZDROJE	79
PŘÍLOHY	88

PŘEDMLUVA

Na tomto místě bych chtěl přiblížit některé pohnutky, které vedly k vytvoření předkládané práce.

Během čtyřletého studia nedermatofytických vláknitých hub izolovaných získaných spoluprací s řadou lékařských pracovišť v ČR byl rod *Aspergillus* jedním z nejběžnějších původců onemocnění, se kterým jsem se setkával. Z hlediska morfologické identifikace do druhu patří tento rod k nejobtížnějším a často není definitivní identifikace možná, zvláště u klinických izolátů, které poměrně často vykazují různé morfologické odchylky. Možnost identifikovat druhy pomocí molekulárních metod v Laboratoři genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub MBÚ AV ČR proto byla vítanou možností. Bylo to nedlouho po tom, co byla osekvenována velká většina typových položek druhů *Aspergillus*, což značně usnadňovalo determinaci pomocí sekvenčních dat a popis případných nových druhů. Navíc rozsáhlejší molekulární studie na klinických izolátech *Aspergillus* jsou nepočtené (žádná není z Evropy) a v podstatě všechny se dosud zabývaly jen invazivní aspergilózou.

Během předchozí práce s izoláty *Aspergillus* byl běžně používanými kombinacemi primerů pro β -tubulin (*benA*) namnožen u některých druhů fragment neznámého genu (M. Kolařík, nepublikováno), který vykazoval poměrně značnou divergenci od genu pro β -tubulin (*benA*), který se používá v taxonomii. Při hledání podobností pomocí BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nebyla nalezena buď žádná shoda, nebo při uvolnění parametrů vyhledávání byla nalezena jako nejpodobnější dosti vzdálená taxa.

Jak se později ukázalo díky datům z genomických projektů *Aspergillus* (viz Tab 1.3), jednalo se β -tubulinový paralog *tubC*. Dalším hledáním bylo zjištěno, že jsme zdaleka nebyli prvními, komu se díky nedostatečné specifitě primerů povedlo tento gen amplifikovat. Některé studie dokonce tento gen nevědomě použily i v taxonomických analýzách (viz dále). O možnostech rozpoznání těchto dvou paralogů a o případných "škodách", které byly napáchány nevědomým kombinováním paralogů v taxonomických studiích, nebyly žádné informace. Jedině Peterson (2008) vyslovil domněnku, že oba paralogy pravděpodobně půjdou rozpoznat podle počtu intronů.

Jako nové cíle práce se tedy objevilo charakterizování co nejdelšího úseku genů obou paralogů (taxonomické práce jsou založeny jen na poměrně krátkém úseku genu) napříč co největším spektrem druhů *Aspergillus*. K tomu výborně posloužily klinické izoláty a četné izoláty uložené v českých sbírkách. Charakterizování genů β -tubulinových paralogů tedy posloužilo hned několika cílům, a sice zrevizování izolátů v českých sbírkách podle současných taxonomických změn a preciznímu určení klinických izolátů z českých pacientů.

Genomické a nově amplifikované sekvence obou paralogů potom posloužily jako nástroj pro navržení primerů specifických pro jeden či druhý paralog a především ke zdokonalení současných primerů tak, aby amplifikovaly jen taxonomicky významný gen z dvojice paralogů. Jedním z hlavních cílů práce bylo i nalezení molekulárních markerů, které by jednoznačně oba paralogy odlišily.

Předkládaná práce má tedy dvě hlavní části. Molekulárně-taxonomická část se zabývá diverzitou mezi izoláty *Aspergillus* z českých pacientů a izoláty uchovávanými v českých sbírkách. Na jejím základě bude navrženo několik nových druhů. Druhá část diplomové práce se zabývá zmíněnou problematikou β -tubulinových paralogů, předkládá nově navržené primery a nástroje na úrovni DNA nebo aminokyselkové sekvence použitelné pro odlišení paralogů. V příloze diplomové práce jsou přiloženy čtyři publikace týkající se problematiky nedermatofytických vláknitých hub, které vznikly v průběhu magisterského studia.

Shrnutí cílů práce:

- Molekulárními metodami zhodnotit diverzitu mezi izoláty *Aspergillus* uloženými v českých sbírkách a pocházejících z českých pacientů. Odhalit případné nepopsané druhy.
- Zjistit rozsáhlost problematiky β -tubulinových paralogů u rodu *Aspergillus*. Jaké studie využily pro taxonomické účely nevědomě několik paralogů současně? Jaké jsou taxonomické důsledky?
- Na základě genomických sekvencí navrhnout primery umožňující amplifikaci co nejdelšího úseku genů pro β -tubulin. Na základě těchto primerů charakterizovat β -tubulinové paralogy napříč co nejširším druhovým spektrem rodu *Aspergillus*.
- Nalézt spolehlivé molekulární markery k rozlišení β -tubulinových paralogů (architektonika exon-intron, délka intronů, sekvenční motivy, charakteristiky pracující se zastoupením bazí, "codon usage", apod.).
- Revidovat v současnosti používané primery z hlediska hrozby amplifikace jiného genu než *benA* u rodu *Aspergillus*.
- Vylepšit v současnosti používané a navrhnout nové primery, které by selektivně amplifikovaly jen taxonomicky významný gen *benA*.

V neposlední řadě si práce dává za cíl zpřehlednit situaci kolem paralogních genů pro β -tubulin, k čemuž by měly přispět výše uvedené cíle a uložení anotovaných sekvencí do databáze GenBank.

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. Rod *Aspergillus* - význam, taxonomie a současný druhový koncept

1.1.1 Ekonomický význam

Rod *Aspergillus* je řazen spolu s dalšími anamorfními rody - *Penicillium* a *Paecilomyces* - do čeledi *Trichocomaceae* (Ascomycetes; Eurotiales; Eurotiomycetes) (Malloch et Cain 1972). *Aspergillus* je jedním z nejvíce ekonomicky významných rodů mikroskopických hub. Řada druhů je patogenních pro člověka (viz dále), zvířata i rostliny, působí alergenně, jiné znehodnocují uskladněné potraviny, nebo produkují toxické a kancerogenně působící sekundární metabolity (Varga et al. 2003). Na druhé straně sem patří organismy biotechnologicky významné, užívané např. při fermentaci v potravinářství pro produkci hydrolytických enzymů a organických kyselin (Abarca et al. 2004).

1.1.2 Vnitrodruhové členění

Poslední kompletní monografie rodu byla napsána v r. 1965 (Raper et Fennell 1965). Autoři rozlišovali čistě na podkladě morfologie 132 druhů a 18 variet rozdělených do 18 neformálních skupin založených na mínění autorů o pravděpodobných příbuzenských vztazích. Tyto sekce se ukázaly jako velmi stabilní navzdory velkému množství následujících morfologických, fyziologických a molekulárních studií. Později byl těmto neoficiálním skupinám byl dán status sekce, který je používán dodnes (Gams et al. 1985). V roce 2000 bylo popsáno 182 druhů (Pitt et al. 2000). Nejnovější členění rodu obsahuje 8 podrodů a 23 sekcí (viz Tab. 1.1) (Peterson 2008; Samson et Varga 2010; Varga et al. 2010) obsahujících kolem 280 platných druhů (Peterson 2008; Samson et Varga 2009). Fyziologické vlastnosti (včetně citlivosti na antimykotika), produkované sekundární metabolity a ekologická data většinou dobře korelují s daty molekulárními, proto má smysl rozlišovat i tzv. kryptické druhy, u nichž nemáme dostatek taxonomicky informativních morfologických znaků (např. z důvodu fenotypové plasticity, či jednoduchosti stavby stélky).

Tab 1.1 **Abecední seznam sekcí a souvisejících teleomorf u rodu *Aspergillus*; podle Peterson et al. (2008) a Varga et al. (2010)**

sekce	teleomorfa
<i>Aenei</i>	<i>Emericella</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Bispori</i>	-
<i>Candidi</i>	-
<i>Cervini</i>	-
<i>Circumdati</i>	<i>Neopetromyces</i>
<i>Clavati</i>	-
<i>Cremei</i>	<i>Chaetosartorya</i>
<i>Flavi</i>	<i>Petromyces</i>
<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Neosartorya</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Emericella</i>
<i>Nigri</i>	-
<i>Ochraceorosei</i>	-
<i>Ornati</i>	<i>Sclerocleista</i>
<i>Raperi</i>	-
<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Silvati</i>	-
<i>Sparsi</i>	-
<i>Terrei</i>	-
<i>Usti</i>	<i>Emericella</i>
<i>Warcupi</i>	<i>Warcupiella</i>
<i>Zonati</i>	<i>Penicilliumopsis</i>

1.1.3 Změny v druhovém konceptu - polyfázický přístup

Pojetí druhů u rodu *Aspergillus* se stejně jako u jiných skupin hub měnilo. Současný druhový koncept u rodu *Aspergillus* je založen na tzv. polyfázickém přístupu kombinujícím klasickou morfologii, fyziologii, produkci sekundárních metabolitů s molekulárně genetickými daty, ekologií a studiem reprodukční izolace (Samson et Varga 2009). Objektivně nejpoužívanějším přístupem v identifikaci a popisu nových druhů je kombinace morfologických dat podpořená sekvencemi z několika na sobě nezávislých lokusů. Druh v tomto případě souhlasí s nejmenšími monofyletickými shluky jedinců (clusters), podpořené analýzou několika nezávislých DNA sekvencí (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition - GCPSR) (Avisé et Ball 1990; Dettman *et al.* 2003; Dettman *et al.* 2003; Dettman *et al.* 2006). Omezenou rozlišovací schopnost má u rodu *Aspergillus* oblast rDNA včetně oblasti ITS, která je s oblibou využívána v determinaci a taxonomii u hub. Ta je použitelná jen pro orientační určení do druhových komplexů. Pro jednoznačné vymezení vztahů mezi druhy je nutné využívat sekvence dalších genů. Pro konstrukci fylogeneze a pro identifikaci jsou nejčastěji využívány oblasti genů pro β -tubulin (*benA*), kalmodulin (*camM*), RNA-polymerázu II (*rpb2*) a aktin (*act*) (Houbraken *et al.* 2007; Samson *et al.* 2007; Samson *et al.* 2007; Varga *et al.* 2007; Varga *et al.* 2007; Peterson 2008; Varga *et al.* 2010).

Významný pokrok v taxonomii rodu v posledních letech vyústil v popisování velkého počtu nových druhů, změny v koncepci sekcí a rozpad druhových komplexů včetně těch významných z hlediska patogenity u člověka (Hong *et al.* 2005; Houbraken *et al.* 2007; Samson *et al.* 2007; Samson *et al.* 2007; Varga *et al.* 2007; Yaguchi *et al.* 2007; Pildain *et al.* 2008; Balajee *et al.* 2009).

Kvůli velkému množství kryptických druhů a naopak extrémní fenoplasticitě druhů jiných je morfologický koncept druhu pro rod *Aspergillus* nedostatečný. Aplikace biologického konceptu druhu, který je využíván např. u řady dermatofyt (Symoens *et al.* 2011) a zástupců rodu *Fusarium* (Summerell *et al.* 2003) je u rodu *Aspergillus* limitována jen na nevelký počet známých heterothalických druhů. Z 280 popsáných druhů je teleomorfa známá asi u 70-80 druhů (Eagle 2009), z toho heterothalických je méně než 10 (Tab 1.2). Toto číslo je zřejmě značně podhodnocené. Tvorba teleomorfy vyžaduje často velmi specifické kultivační podmínky a nalezení kompatibilních kmenů. V současnosti se povedlo navodit pohlavní stádium u druhů jako *A. fumigatus* (O'Gorman *et al.* 2009) nebo *A. flavus* (Horn *et al.* 2009), které byly ještě několik let předtím dávány jako příklad striktně asexuálních druhů. V hledání kompatibilních jedinců významně pomáhá zjišťování příslušnosti izolátů k párovacímu typu (mating type) (Dyer *et al.* 2003). Dá se předpokládat, že řada druhů, dnes považovaných za asexuální, jsou ve skutečnosti druhy heterothalické.

Tab 1.2. Heterothalické druhy náležející do rodu *Aspergillus*

druh	popis teleomorfy
<i>Em. heterothallica</i> (Kwon-Chung, Fennell & Raper) Malloch & Cain	(Raper et Fennell 1965)
<i>N. fumigata</i> O'Gorman, H.T. Fuller & P.S. Dyer	(O'Gorman <i>et al.</i> 2009)
<i>N. fennelliae</i> Kwon-Chung & S.J. Kim 1974	(Kwon-Chung et Kim 1974)
? = <i>N. otanii</i> Takada, Y. Horie & Abliz 2001	(Takada <i>et al.</i> 2001)
<i>N. nishimurae</i> Takada, Y. Horie & Abliz 2001	(Takada <i>et al.</i> 2001)
<i>N. spathulata</i> Takada & Udagawa 1985	(Takada et Udagawa 1985)
<i>N. udagawae</i> Y. Horie, Miyaji & Nishim. 1995	(Horie <i>et al.</i> 1995)
<i>P. flavus</i> B.W. Horn, I. Carbone & G.G. Moore	(Horn <i>et al.</i> 2009)
<i>P. nomius</i> B.W. Horn, I. Carbone & G.G. Moore	(Horn <i>et al.</i> 2011)
<i>P. parasiticus</i> B.W. Horn, I. Carbone & J.H. Ramirez-Prado	(Horn <i>et al.</i> 2009)

Problematické je i přezívající duální názvosloví u těch druhů rodu *Aspergillus*, které tvoří teleomorfu (viz Tab 1.1.). Názvy teleomorf mají dle současných pravidel ICBN (Mezinárodní kód botanické nomenklatury) přednost (Hawksworth 2011).

1.1.4 Význam genomiky

Do porozumění druhovému konceptu se výrazně promítly i poznatky z genomiky. Pokud bereme v úvahu počet kompletně osekvenovaných zástupců rodu, potom rod *Aspergillus* zaujímá mezi vláknitými houbami přední místo. Třetí známý genom mezi houbami patřil významnému patogenu člověka - *A. fumigatus* (Nierman et al. 2005). V současnosti je k dispozici genom řady dalších zástupců rodu (viz Tab. 1.3).

Tato data mimo jiné umožňují využití microarray přístupů v identifikaci cílových genů zapojených v patogenezi, sexuálním procesu, majících vztah k rezistenci k antimykotikům apod. (Nierman et al. 2005). Srovnávací genomika také umožnila pochopení metabolických drah vedoucích ke vzniku unikátních sekundárních metabolitů, které jsou velmi často specifické pro jednotlivé druhy, či druhové komplexy (David et al. 2003; Osterman et Overbeek 2003). Schopnosti tvořit unikátní metabolity se využívá i při vymezování nových taxonů (Samson et Varga 2009).

Tab 1.3 Genomické projekty u zástupců rodu *Aspergillus*

druh	status genomické sekvence	publikace/odkaz
<i>A. aculeatus</i> ATCC 16872	neanotovaná	http://genome.jgi-psf.org/Aspac1/Aspac1.download.html
<i>A. carbonarius</i> ITEM 5010	neanotovaná	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=15631
<i>A. clavatus</i> NRRL 1	anotovaná	(Wortman et al. 2006; Fedorova et al. 2008)
<i>A. flavus</i> NRRL 3357 [†]	anotovaná	(Payne et al. 2006)
<i>A. fumigatus</i> Af293	anotovaná	(Nierman et al. 2005; Wortman et al. 2006)
<i>A. niger</i> ATCC 1015	anotovaná	(Baker 2006; Pel et al. 2007)
<i>A. oryzae</i> RIB40 [†]	anotovaná	(Machida et al. 2005; Kobayashi et al. 2007; Machida et al. 2008)
<i>A. parasiticus</i> *	není k dispozici	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=129
<i>A. sojae</i> NBRC 4239*	neanotovaná	(Sato et al. 2011)
<i>A. terreus</i> NIH2624	anotovaná	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=187
<i>Em. nidulans</i> FGSC A4	anotovaná	(Galagan et al. 2005)
<i>N. fischeri</i> NRRL 181	anotovaná	(Wortman et al. 2006; Fedorova et al. 2008)

pozn. Pro řadu uvedených druhů existuje více nezávislých genomických projektů v různě pokročilé fázi (pracujících s jiným kmenem). V tabulce je uveden pro každý druh vždy jen jeden projekt v nejpokročilejší fázi vývoje.

[†]* *A. oryzae*, stejně tak i *A. sojae* nejsou po taxonomické samostatnými druhy, jedná se o domestikované kmeny *A. flavus*, resp. *A. parasiticus*.

1.1.5. Medicínský význam rodu *Aspergillus*, diagnostická kritéria pro potvrzení infekce

Aspergillus je významnou příčinou morbidity a mortality lidí i zvířat, ačkoliv jen malá část z dosud popsáných druhů je patogenní pro člověka (přehled patogenních druhů včetně druhů zachycených v ČR viz manuskript v recenzním řízení v přílohách diplomové práce: "New aetiological agents and clinico-pathologically unique cases revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing"). V současné době je celosvětově invazivní aspergilóza (IA) nejčastější příčinou smrti u pacientů s

leukémii a po transplantaci kostní dřeně (Morgan et al. 2005). Mezi další onemocnění vyvolaná zástupci rodu *Aspergillus* patří aspergilom, chronická plicní aspergilóza, alergická aspergilóza, sinonazální infekce, endokarditidy, fungální keratitis, otomykózy, onychomykóza, kožní léze a infekce postihující takřka jakoukoliv orgánovou soustavu (tyto infekce se vyskytují nejčastěji u diseminované formy IA) (Stevens *et al.* 2000; Campbell et Johnson 2005; Jedličková 2006; Jedličková *et al.* 2008).

Spóry mnoha druhů jsou všudypřítomné v prostředí a jejich nejvýznamnějšími zdroji jsou rozkládající se biomasa, půda, odpadky, prach, vzduch, květináče s rostlinami, jídlo a v neposlední řadě i vodovodní systémy, které mohou být díky schopnosti tvorby biofilmu významným zdrojem nozokomiálních nákaz (Warris et Verweij 2005).

Každá z výše jmenovaných klinických jednotek má pro své potvrzení u pacienta stanovena kritéria, která jsou často obtížně splnitelná. Kritéria pro potvrzení IA zahrnují predispoziční faktory pacienta (imunoprese, imunodeficit), histopatologické vyšetření bioptického vzorku, řadu klinických kriterií a mykologická kritéria (přímá mikroskopie odebraného materiálu, kultivace patogena, průkaz antigenu patogena v tělních tekutinách nebo sekretech) (De Pauw et al. 2008). Bioptické vyšetření je prováděno jen v omezeném počtu případů, proto má IA dvě různé kategorie, a sice pravděpodobná (probable) a potvrzená (proven) IA, které zahrnují různě přísná kritéria. Další jednotky jako plicní aspergilom, chronická plicní aspergilóza a sinusitida mají obdobná kritéria se specifiky v klinické manifestaci (Deshazo 2009; Smith et Denning 2011). U lokalizovaných infekcí jako keratitis a otitis externa má zásadní význam klinická manifestace, kultivace a mikroskopický nález (McLeod 2009; Vennewald et Klemm 2010).

Mezi velké diagnostické problémy patří dermatomykózy, zejména pak onychomykóza vyvolaná nedermatofytickými vláknitými houbami (NVH) včetně rodu *Aspergillus*. Diagnostická kritéria pro onychomykózu způsobenou NVH prošla mnoha modifikacemi a pokusy o zjednodušení (Walshe et English 1966; English et Atkinson 1973; English 1976; Budak *et al.* 1987; Scherer *et al.* 2001; Shemer *et al.* 2007; Shemer *et al.* 2009, 2009). Specifita a senzitivita byla hodnocena jen u některých těchto metod (Gupta et al. 2001; Summerbell et al. 2005). Za zlatý standard s absolutní specifitou, ale nízkou senzitivitou (Summerbell *et al.* 2005) jsou stále považovány kritéria, kdy je k průkazu nutno izolovat stejnou NVH v časově oddělených odběrech v čisté kultuře, bez současného zachytu dermatofyta a za současné podpory přímou mikroskopií, kde musí být nalezen alespoň úlomek vlákna (Summerbell et al. 1989). Tato kritéria jsou ale v praxi velmi obtížně splnitelná. Problematika diagnostiky onychomykózy způsobené NVH je hlouběji diskutována v bakalářské práci (Hubka 2008) a publikacích přiložené v apendixu předkládané diplomové práce (Hubka 2009; Hubka *et al.* 2011; Stuchlík *et al.* 2011).

1.2. Paralogní geny

1.2.1 Riziko paralogních genů pro taxonomii

Paralogní geny (zde chápáno jako více homologních genů v genomu jednoho organismu pro peptid dané třídy - např. β -tubulin - které vznikly genovou duplikací a liší se ve své sekvenci, případně i funkci) jsou obávaným problémem současné taxonomie založené z velké části na molekulárně biologických znacích. Současné použití sekvencí paralogních genů s nehomologní funkcí ve stejné fylogenetické analýze přináší velké riziko.

Problém paralogů se snaží studie řešit užitím tzv. polyfázického přístupu (viz výše). V jedné studii jsou pak využity DNA sekvence několika nezávislých lokusů, morfologická data a v případě rodu *Aspergillus* se dnes stává standardem i stanovení extrolitů (Samson et Varga 2009). Kombinace několika přístupů má mimo jiné tu výhodu, že s určitou šancí eliminuje případný vliv paralogů na výsledné taxonomické závěry. U rychle speciuujících rodů, mezi které rod *Aspergillus* patří (divergence v rámci jednotlivých lokusů mezi sesterskými druhy na úrovni DNA většinou jen mezi 0-5 %) je taxonomický význam morfologie často podružný a řada druhů je popsána jako tzv. kryptických (mikrospecies). Morfologie je využívána často jen jako nástroj k zařazení do druhových komplexů, nebo sekcí. Pro účely taxonomie tak odpadá jeden z pojistných nástrojů, jak eliminovat případný vliv paralogů na taxonomický úsudek.

Gen pro β -tubulin (*benA*) patří v současnosti k nejvíce využívaným genům pro konstrukci fylogeneze u hub i jiných skupin organismů. V genomech hub se vyskytuje nekonstantní počet paralogů pro β -tubulin, které mohou být nahodile amplifikovány při použití málo specifických primerů. Peterson (2008) při použití běžných primerů pro amplifikaci fragmentů genu *benA* amplifikoval v rámci sekcí *Nidulantes*, *Usti* a *Nigri* fragmenty o různém počtu intronů. Z obavy před hrozbou použití paralogního genu byl gen pro β -tubulin vyřazen z fylogenetické analýzy těchto sekcí. Keeling *et al.* (2000) při snaze konstruovat fylogenezi hub na základě genu pro β -tubulin, namnožil u některých druhů vlastními primery 2-3 paralogní geny. Celá analýza tak ztratila na přehlednosti a výpovědní hodnotě. Jak ukazují zde prezentované výsledky (viz dále), nevyhnuły se některé další studie nevědomému použití dvou paralogů pro β -tubulin v jedné analýze.

1.2.2 Vznik paralogních genů procesem duplikace-subfunkcionalizace-komplementární degenerace

Nejvýznamnějším mechanismem, kterým je v současné době vysvětlován vznik genových rodin (zvláště u eukaryot) je genová duplikace. Analýzou genomů organismů napříč říšemi bylo zjištěno, že desítky procent, u některých organismů i nadpoloviční většina, z celkového počtu genů mají svůj původ v genové duplikaci (Zhang 2003). Řada takto duplikovaných genů tvoří celé genové rodiny čítající desítky až stovky genů (Gu *et al.* 2002).

Mechanismy, které vedou k duplikaci genetické informace a vzniku paralogních genů jsou nerovnoměrný (unequal) crossing-over, retrotranspozice, duplikace celých chromosomů (nebo genomu). V případě nerovnoměrného crossing-overu a duplikace chromosomů zůstane zachována struktura genu přerušovaná introny. U retrotranspozice bude výsledný duplikovaný gen prostý intronů a regulačních sekvencí (Zhang 2003).

Existuje několik alternativních hypotéz, jak se z duplikovaného genu stane plnohodnotný gen zajišťující specifické funkce. Jedna z nich předpokládá, že duplikovaný gen je po svém vzniku plně redundantní s mateřským genem a je prostý všech evolučních tlaků na zachování své struktury (Ohno 1970). Z většiny takto

neomezeně mutujících genů se stanou pseudogeny (DNA sekvence vzniká z funkčních genů, která se vlivem mutací stala nefunkční) a jen velmi malá část z nich se vyvine v plnohodnotné geny.

Jiná hypotéza předpokládá multifunkčnost ancestrálních genů před duplikací. Dceřiné duplikované geny pak převzou některou z funkcí původního genu a komplementárně k tomuto procesu mateřský gen ztratí tutéž funkci (subfunkcionalizace). To zajistí, že duplikovaný gen bude udržen v genomu (pak se o něm hovoří jako o paralogu). Tento proces je zajištěn komplementárními degenerativními mutacemi u obou genů (Force *et al.* 1999; Lynch et Force 2000). Existují ale i případy, kdy se u duplikovaného genu vyvinula zcela nová funkce nepřímá u mateřského genu (Yokoyama et Yokoyama 1989). Procesem subfunkcionalizace pravděpodobně vznikly i paralogy tubulinových genů. Nejnázorněji je tento proces dokumentován u tkáňově specifických paralogů (Michiels *et al.* 1987; Solnica-Krezel *et al.* 1990; Torgerson et Singh 2004).

Další osud sekvence duplikovaného genu se může výrazně lišit od původního "mateřského" genu ve smyslu akcelerované evoluce proteinové sekvence. Při srovnání dvojic paralogů u háďátka (*Caenorhabditis*) bylo zjištěno výrazně vyšší množství nesynonymních mutací vzhledem k počtu synonymních mutací (d_N/d_S) než když byly stejnému srovnání podrobeny orthologní geny dvou blízkých příbuzných druhů (Castillo-Davis *et al.* 2004). Poměr d_N/d_S pravděpodobně není výrazněji narušen genovou konverzí, která, jak se předpokládá, se mezi paralogy uplatňuje poměrně často (Castillo-Davis *et al.* 2004; Lin *et al.* 2006). To podporuje představu, že na duplikovaný gen působí menší evoluční tlaky na zachování primární sekvence než na původní "mateřský gen".

1.3. Tubulinová superrodina u eukaryotických organismů

1.3.1 Hlavní zástupci tubulinové superrodiny

Mikrotubuly eukaryotického cytoskeletu jsou tvořeny heterodimery α - a β -tubulinu. γ -tubulin je potřebný pro započítání formování a orientování mikrotubulů (Oakley *et al.* 1990). Většina mnohobuněčných organismů má více kopií těchto genů ve svém genomu (Dutcher 2001). Postupně byli odhaleni další čtyři zástupci členů této superrodiny (Dutcher *et Trabuco* 1998; Chang *et Stearns* 2000; Ruiz *et al.* 2000; Vaughan *et al.* 2000), ale narozdíl od předchozích základních tří typů nejsou jejich geny přítomné u všech eukaryot a nemají příslušné homology v genomech houbových organismů. Vysoký stupeň divergence těchto nově objevených genů u různých organismů předpokládá, že jejich funkce nebude tak úzce spjata s primární sekvencí, jako je tomu u genu pro α -, β - a γ -tubulin, které jsou silně konzervované. Jejich nepřítomnost u vyšších hub a současně i u rostlin koreluje s absencí bazálních tělísek a centriol, na jejichž stavbě se s velkou pravděpodobností spoluúčastní (Dutcher 2001).

Gen pro β -tubulin sestává ze dvou hlavních domén. Těmi jsou doména GTPázová a C-terminální doména zprostředkávající interakci s dalšími proteiny a tvorbu dimerů (Nogales *et al.* 1998). U hub je v terminální části genu hypervariabilní doména bohatá na glutamát. U organismů, které mají v jakémkoliv stádiu životního cyklu bičků či cílie (obsahují 9+2 axonemální struktury), je tato na glutamát bohatá oblast cílem posttranslační modifikace - polyglycylyace na specifických gama-COOH reziduích glutamátu (Xia *et al.* 2000). Organismy, které ztratily axonemální struktury, tj. většina hub (včetně mikrosporidií) mají tubulinové sekvence (i α -tubulinové) více divergentní. Naproti tomu chytridie jako nejpůvodnější skupina hub, kde jsou 9+2 struktury zachované v sexuálním cyklu, mají tubulinové sekvence ještě silněji konzervované (Nielsen *et al.* 2001).

1.3.2 Paralogní geny kódující β -tubulin u rodu *Aspergillus* a jejich nomenklatura

Pro α - i β -tubulinové geny je známa řada paralogů, jejichž značení je poměrně nepřehledné. Překvapivě velké množství možných posttranslačních úprav proteinů tubulinové rodiny se v počátcích výzkumu cytoskeletárních proteinů podílelo na zmatečnosti a nepřehlednosti užívané nomenklatury. Část z tehdy nalézané heterogenity mezi proteiny byla výsledkem posttranslačních modifikací (fosforylace, polyglutamylace, polyglycylyace aj.) (Cleveland *et Sullivan* 1985; Verhey *et Gaertig* 2007), proto existují četná synonyma.

U druhu *Aspergillus nidulans* nacházíme v genomu dva paralogní geny pro β -tubulin - *benA* a *tubC*. Jak ukazují předkládaná data (viz dále), docházelo pravděpodobně k opakovaným ztrátám paralogu *tubC*. Produktem genu *benA* (někdy též značený *tub-2*; *tub-1* je značen jeden z paralogů pro α -tubulin) jsou polypeptidy $\beta 1$ - a $\beta 2$ -tubulinu. *BenA* byl pojmenovaný podle lokusu, v němž se nacházely mutace zodpovědné za změněnou senzitivitu houby k mitotickým jedům, mimo jiné i k fungicidnímu benzimidazolovému derivátu benomylu (Borck *et Braymer* 1974; Sheir-Neiss *et al.* 1978; Orbach *et al.* 1986). Takových lokusů byla u různých modelových organismů nalezena celá řada a byly značeny *benA*, *benB* až *benxy*. Později bylo prokázáno, že v některých těchto lokusech leží strukturální geny pro β -tubulin (Burland *et al.* 1984; Schedl *et al.* 1984).

Polypeptid $\beta 3$ -tubulin (Weatherbee *et Morris* 1984) je kódován genem *tubC* (Weatherbee *et al.* 1985) (kdežto gen *tubA* kóduje polypeptidy $\alpha 1$ - a $\alpha 3$ -tubulinu; gen *tubB* kóduje polypeptid $\alpha 2$ -tubulin). Značení genů pro α - a β -tubulin a jejich proteinové produkty jsou přehledně zaneseny do Tabulky 1.4.

Tab 1.4 Geny kódující α - a β -tubulinové proteiny u *A. nidulans*

označení genu	alternativní označení genu	označení produktu
<i>benA</i>	<i>tub-2</i>	β 1- a β 2-tubulin
<i>tubC</i>		β 3-tubulin
<i>tubA</i>	<i>tub-1</i>	α 1- a α 3-tubulin
<i>tubB</i>		α 2-tubulin

(Sheir-Neiss *et al.* 1978; Morris *et al.* 1979; Weatherbee et Morris 1984; Weatherbee *et al.* 1985)

1.3.3 Funkce paralogů *benA* a *tubC* u rodu *Aspergillus*

Funkce produktů genu *benA* jsou významné během celého vegetativního růstu, účastní se tvorby dělicího vřeténka, pohybu jádra a organel (Oakley et Morris 1980, 1981). Funkce genu *tubC* byla zkoumána u *A. nidulans*, kde participuje v procesu konidiogeneze, ale není pro tento proces nezbytný (May *et al.* 1985; Weatherbee *et al.* 1985; May 1989). Podobná funkční zaměnitelnost byla popsána i pro α -tubulinové paralogy *tubA* a *tubB* (Kirk et Morris 1993).

Oba paralogy *benA* a *tubC* jsou u *A. nidulans* vysoce divergentní (May *et al.* 1987), na úrovni aminokyselinové (AMK) sekvence přesahuje divergence 18 %. U jiných druhů rodu *Aspergillus* nacházíme divergence podobné úrovně, vyšší i výrazně nižší, případně se paralog *tubC* u některých druhů vůbec nevyskytuje (viz výsledky).

1.3.4 β -tubulinové paralogy v říši Fungi

Podobně jako se liší počty paralogů pro β -tubulin v rámci rodu *Aspergillus* (viz výsledky), liší se tyto počty napříč říší hub (viz Tab. 1.5). Ještě větší variabilitu nacházíme u vyšších eukaryot. Například rod *Drosophyla* má čtyři β -tubulinové paralogy (Natzle et McCarthy 1984), u slepice (*Gallus gallus*) bylo takových paralogů nalezeno dokonce šest (Monteiro et Cleveland 1988).

1.3.5 Specifita primerů užívaných k amplifikaci genu pro β -tubulin (*benA*)

Gen pro β -tubulin (*benA*) je oblíbeným genem používaným pro taxonomické účely u hub. Pro tyto účely se používají fragmenty genu lokalizované přibližně v jeho první třetině, kde se u většiny hub nachází několik intronů, které mají velmi vysokou rozlišovací schopnost na úrovni druhů. V současnosti u hub obecně užívané primery byly navrženy především pro použití u rodu *Fusarium* (T1, T10, T2, T22, aj.) (O'Donnell et Cigelnik 1997) a primery navržené na základě sekvenční homologie mezi genem *benA* u *A. nidulans* a *N. crassa* (Bt2a, Bt2b, aj.) (Glass et Donaldson 1995). Jak ukazují naše data (viz dále), specifita některých těchto primerů (především forward primerů) vůči *benA* je u rodu *Aspergillus* nedostatečná, u některých druhů primery dokonce preferenčně amplifikují *tubC* paralog.

Byly navrženy i další primery, kterým se nedostalo širšího uplatnění (Keeling *et al.* 2000; Einax et Voigt 2003) a jejich specifita pro jediný paralog je v případě první jmenované práce velmi nízká, v případě druhé práce přinejmenším diskutabilní (produkty na elektroforéze jsou často dva, nebo i více).

Tab. 1.5 Počet β -tubulinových paralogů v genomech některých hub

taxon	Taxonomické zařazení ‡		Zdroj†
Ascomycota			
<i>Aspergillus</i> spp.	Eurotiomycetes; Eurotiales	1-2	(viz výsledky)
<i>Fusarium</i> spp. (<i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i>)	Sordariomycetes; Hypocreales	2	
<i>Trichophyton</i> spp. (<i>T. rubrum</i> , <i>T. tonsurans</i> , <i>T. equinum</i>)	Eurotiomycetes; Onygenales	1	
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Eurotiomycetes; Onygenales	2	
<i>Microsporum</i> spp. (<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i>)	Eurotiomycetes; Onygenales	1	
<i>Coccidioides</i> spp. (<i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i>)	Eurotiomycetes; Onygenales	1	
<i>Arthroderma benhamiae</i>	Eurotiomycetes; Onygenales	2-3 ?	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Eurotiomycetes; Onygenales	1	
<i>Tuber melanosporum</i>	Pezizomycetes; Pezizales	2	
<i>Candida albicans</i>	Saccharomycetes; Saccharomycetales	1	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetes; Saccharomycetales	1	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Schizosaccharomycetes; Schizosaccharomycetales	1	
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Sordariomycetes; Glomerellales	2	(Panaccione et Hanau 1990)
<i>Neurospora crassa</i>	Sordariomycetes; Sordariales	1	
Zygomycota			
<i>Basidiobolus ranarum</i>	Entomophthorales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)*
<i>Conidiobolus coronatus</i>	Entomophthorales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Spiromyces minutus</i>	Kickxellales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Mortierella verticillata</i>	Mortierellales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Mucorales	3	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Mucorales	5?	
Chytridiomycota			
<i>Allomyces macrogynus</i>	Blastocladiomycetes; Blastocladiales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Spizellomyces punctatus</i>	Chytridiomycetes; Spizellomycetales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
<i>Harpochytrium</i> sp	Monoblepharidomycetes; Monoblepharidales	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)
Microsporidia			
<i>Glugea plecoglossi</i>	Microsporidia	2	(Keeling <i>et al.</i> 2000)

* čísla z této publikace se vztahují k minimálnímu počtu paralogů v genomu (autor pomocí vlastních pramerů náhodně amplifikoval u některých druhů více paralogů)

† Pokud neuveden žádný údaj ve sloupci "Zdroj", pak se počet nalezených paralogů zakládá na vlastním prohledávání genomických databází

‡ Na základě (James *et al.* 2006) a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

1.4 Preference genů v používání kodonů: vztah ke genové expresi a možnosti hodnocení

1.4.1 "Codon usage" a genová exprese

Standardní genetický kód čítá 64 různých kodonů pro 20 aminokyselin a tři stop kodony (Tab 1.6). Každý gen užívá pro kódování aminokyselin určité kodony (**codon usage** - **CU**), v ideálním případě všechny synonymní varianty pro danou aminokyselinu (AMK) se stejnou pravděpodobností. Po získání sekvencí prvních genů a rozluštění genetického kódu bylo u stále většího počtu genů pozorováno, že ne všechny kodony jsou používány s očekávanou frekvencí ("**codon usage bias**" - **CUB**). U aminokyselin, kde je na výběr z většího počtu alternativních kodonů je často silně preferován jen jeden. U řady genů naopak tento jev pozorován nebyl. Omezený repertoár využívaných kodonů byl mezi prvními nalezen u silně konzervovaných genů bakterií a *Saccharomyces cerevisiae* (Ikemura 1981; Bennetzen et Hall 1982). Později byl také mimo jiné zaznamenán u genu *benA* *A. nidulans*, kde si autoři povšimli tohoto rozdílu oproti právě popsanému genu *tubC* (May *et al.* 1987).

Tab. 1.6 Tabulka aminokyselin a příslušných kodonů (standardní genetický kód)

Ala/A	GCU, GCC, GCA, GCG	Leu/L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Arg/R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Lys/K	AAA, AAG
Asn/N	AAU, AAC	Met/M; START	AUG
Asp/D	GAU, GAC	Phe/F	UUU, UUC
Cys/C	UGU, UGC	Pro/P	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln/Q	CAA, CAG	Ser/S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Glu/E	GAA, GAG	Thr/T	ACU, ACC, ACA, ACG
Gly/G	GGU, GGC, GGA, GGG	Trp/W	UGG
His/H	CAU, CAC	Tyr/Y	UAU, UAC
Ile/I	AUU, AUC, AUA	Val/V	GUU, GUC, GUA, GUG
STOP	UAA, UGA, UAG		

CUB bylo záhy dáno do souvislosti se zvýšením efektivity transkripce a translace u silně exprimovaných genů (Sharp *et al.* 1986; Sharp et Devine 1989). Omezení repertoáru kodonů a s tím spojená potřeba menšího počtu tRNA jsou důležitým mechanismem, jak úsporněji a efektivněji exprimovat geny. U rodů jako *Trichoderma* nebo *Aspergillus* se dá sledovat kontinuum genů od těch, které využívají kodony bez jakýchkoliv preferencí (odpovídá slabě exprimovaným genům), až po geny, které preferují jen úzký okruh "optimálních kodonů" (silně exprimované geny). Většina z těchto preferovaných kodonů má ve třetí pozici guanin nebo cytosin (Lloyd et Sharp 1991; Goldman *et al.* 1998).

Jako jedno z vysvětlení pro vysoký obsah G+C na třetí pozici kodonů je ladění síly interakce mezi kodonem a antikodonem. Následkem vysokého zastoupení kodonů s příliš silnými nebo naopak slabými interakcemi kodon-antikodon v genu má za následek nižší rychlost translace (Goldman *et al.* 1998; Tuller *et al.* 2010). Korelace mezi mírou exprese genu a CUB je u řady nižších eukaryot a prokaryot značná, proto se dá již ze samotné sekvence genu odhadovat míra jeho exprese (Roymondal *et al.* 2009). U všech druhů ale nejsou tyto vztahy tak jednoznačné. Asi ve 30 % zkoumaných genomech bakterií nebyla nalezena signifikantní selekce na preferenční CUB (Sharp *et al.* 2005). Ani u vyšších eukaryot není vztah mezi genovou expresí a CU tak jednoznačný.

Dalšími faktory, které mají údajně mít vliv na CU jsou přítomnost signálních oblastí pro sestřích (splicing) v exonech (Willie et Majewski 2004; Takahashi 2009) a efektivní velikost populace daného druhu

(Loewe et Charlesworth 2007). Méně časté užívání "optimálních kodonů" (nižší CUB) je nalézána u dlouhých genů, genů postrádajících introny a genů nacházejících se v oblastech na chromosomu s nízkou intenzitou rekombinace (Moriyama et Powell 1998; Comeron *et al.* 1999; Duret et Mouchiroud 1999; Marais *et al.* 2005; Loewe et Charlesworth 2007).

Nesrovnalosti mezi CU a intenzitou exprese nalezené u řady organismů, nebo jednotlivých genů dobře vysvětluje hypotéza, která CU spíše než s kvantitou exprese spojuje s funkcí proteinu a expresním pattern (Lavner et Kotlar 2005; Najafabadi *et al.* 2009). Spektra koexprimovaných genů a tRNA se mění v závislosti na podmínkách, nebo fázi ontogeneze organismu. Rozsáhlá analýza expresního pattern a funkce genů napříč genomy eukaryot a prokaryot odhalila, že geny přepisované ve stejný okamžik mají podobný CU a funkci. Při změně vnějších podmínek se změni spektrum synchronizovaně přepisovaných skupin genů, které mají jiný, ale vzájemně velmi podobný CU (kvantita jejich exprese se přitom může značně lišit). Podobně dynamicky vzhledem k podmínkám se mění i spektrum intracelulárních tRNA. Není tedy nutné, aby byly v buňce v daný okamžik přítomné všechny typy tRNA, což výrazně šetří energii nutnou k realizaci aktuálního buněčného programu. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že na základě podobného CU se dá predikovat interakce mezi proteiny (Najafabadi et Salavati 2008). Logicky by totiž kooperující proteiny měly být exprimovány současně a tudíž mít podobný CU.

Pro většinu paralogních genů se předpokládá, že mají podobný CU a tudíž i funkci (Najafabadi *et al.* 2009). To ale neplatí pro β -tubulinové paralogy *benA* a *tubC*, jejichž CU a zřejmě i funkce jsou odlišné (May *et al.* 1987). Divergentní vývoj AMK sekvencí duplikovaných genů byl pozorován v řadě případů a je poměrně častým jevem, který postihuje asi 20-30 % duplikovaných genů (Conant et Wagner 2003). V těchto případech se většinou jeden z duplikovaných genů vyvíjí mnohem rychleji než druhý (Conant et Wagner 2003) a jsou často patrné rozdíly v jejich expresi (Gu *et al.* 2002; Gu *et al.* 2004; Ganko *et al.* 2007; Ha *et al.* 2007).

1.4.2 Možnosti hodnocení "codon usage"

Pro objektivizování zastoupení jednotlivých kodonů, charakterizování genu jako celku z hlediska CU, ale také pro hodnocení exprese genů, která s CU přímo souvisí, byly zavedeny některé popisné charakteristiky. Ty mohou být v zásadě rozděleny na skupiny. První skupina shrnuje, jak moc gen používá set jistých "optimálních kodonů" (musí být předem definovány). Druhá skupina porovnává CU genu k variantě, ve které by neexistovaly žádné preference v užívání synonymních kodonů (vlastně jde o nulovou hypotézu H_0).

Mezi nejdéle používané charakteristiky patří tzv. relativní zastoupení synonymních kodonů (**relative synonymous codon usage - RSCU**) (Sharp *et al.* 1986), které vychází z pozorovaného výskytu určitého kodonu děleného očekávaným počtem výskytů, jako kdyby neexistovaly žádné preference a všechny kodony pro danou AMK byly používány se stejnou frekvencí. Hodnoty pro Met a Trp jsou vždy 1, stop kodony jsou z analýzy vynechány. Hodnoty blízké 1 značí, že daný kodon se v genu vyskytuje v očekávané frekvenci (není ani preferován, ani penalizován). Hodnoty RSCU jsou nezávislé na AMK složení a jsou zvláště vhodné pro porovnání CU mezi geny, které se liší AMK složením a délkou. RSCU charakterizuje každý gen 59 proměnnými, což je ale neprakticky velké množství dat.

Tento velký počet hodnot řeší zavedení dalších charakteristik jako např. "**codon adaptation index**" (**CAI**) (Sharp et Li 1987), které charakterizují každý gen pouze jediným číslem. Hodnota CAI vztahuje CU konkrétního genu ke CU reprezentativního setu silně exprimovaných genů. Tzv. relativní adaptabilita každého

kodonu ("relative adaptedness" - ω) je poměr použití kodonu (stop kodony a nesynonymní kodony Met, Trp jsou vynechány z analýzy) vzhledem k nejvíce zastoupenému kodonu ze skupiny synonymních kodonů pro konkrétní AMK. Hodnota CAI je pak definována jako geometrický průměr všech hodnot ω .

"**Codon bias index**" (**CBI**) (Bennetzen et Hall 1982) hodnotí v daném genu výskyt 22 kodonů kódujících 17 AMK, které byly vybrány na základě jejich upřednostňování v silně exprimovaných genech *S. cerevisiae*. Modifikované výběry takových kodonů byly postupně vytvořeny i pro další druhy, což umožňuje přesnější, druhově specifické analýzy (J. Peden; <http://codonw.sourceforge.net>). Hodnoty CBI nad 0,5 značí, že se jedná s vysokou pravděpodobností o silně exprimovaný gen.

Frekvence optimálních kodonů (**frequency of optimal codons** - **F_{op}**) je druhově specifický index pro jehož výpočet je nutné vybrat set nejpoužívanějších kodonů v silně exprimovaných genech u daného druhu. Jde o jednoduchý poměr mezi výskytem těchto optimálních kodonů v genu ku frekvenci výskytu všech synonymních kodonů (Ikemura 1985). Hodnota F_{op} se nachází v rozmezí 0 až 1. V genech, ve kterých se nevyskytují jiné alternativní varianty kodonů než ty, definované jako optimální, je hodnota rovna 1.

Hodnota zvaná efektivní počet kodonů v genu ("**effective number of codons**" - **ENCs**) značí, jak hodně je používání kodonů odchýleno od očekávaného používání synonymních kodonů. Hodnota je nezávislá na délce genu a AMK složení. Výhodou je také, že může být spočítána bez znalosti "optimálních kodonů" pro daný druh. Před vlastním výpočtem je nutné spočítat tzv. "codon homozygotizitu" pro každou AMK, která má synonymní kodony. ENCs nabývá hodnot mezi 20 (geny užívající jen 1 kodon pro každou AMK) a 61 (alternativní synonymní kodony jsou užívány ve stejné míře) (Wright 1990). Ačkoliv se jedná o jeden z nejběžněji používaných parametrů k hodnocení CU u genů, je třeba ve specifických případech použít modifikovaný vzorec k výpočtu (Fuglsang 2004, 2006). Při porovnávání genů z různých oblastí genomu jsou získané výsledky spolehlivější, když ENCs statistika bere v potaz i G+C obsah sekvence. CU a G+C obsah v genech se liší v různých oblastech genomu a může vést k falešným závěrům o rozdílnosti CUB na základě ENCs statistiky (Novembre 2002; Jørgensen *et al.* 2007).

Informativní hodnotu má i **obsah G+C na třetí pozici synonymních kodonů - GC_{3s}**. Tato hodnota vyjadřuje podíl kodonů končících guaninem nebo cytosinem ze skupin synonymních kodonů v daném genu. Podobně může být počítáno zastoupení všech bazí zvlášť pro třetí pozici synonymních kodonů ("silent base composition") - **G3s, C3s, A3s a T3s** (Jukes et Bhushan 1986).

U *S. cerevisiae* statistika CAI nejlépe (ze čtveřice CAI, CBI, ENC a F_{op}) koreluje s množstvím mRNA přítomným v buňce (Coghlan et Wolfe 2000) a dá se tedy nejlépe použít jako indikátor kvantity transkripce určitého genu. Ačkoliv možnosti spolehlivé predikce intenzity genové exprese jen na základě kódující sekvence jsou stále velmi omezené a pravděpodobnost neshody s očekáváním je poměrně vysoká (Friberg *et al.* 2004).

Tab 1.7 Vzorce pro výpočet vybraných statistik vztahujících se ke "codon usage"

$$RSCU = \frac{X_{ij}}{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}$$

X_{ij} - počet výskytů j -tého kodonu pro i -tou AMK, která je kódována n_i synonymními kodony (Sharp *et al.* 1986)

$$CBI = \frac{N_{pfr} - N_{ran}}{N_{tot} - N_{ran}}$$

N_{pfr} - celkový výskyt preferovaných kodonů v sekvenci;
 N_{ran} - očekávaný počet výskytů preferovaných kodonů, kdyby všechny synonymní kodony byly používány ve stejné míře;
 N_{tot} - počet synonymních kodonů v sekvenci
 (Bennetzen *et al.* 1982)

$$F_{op} = \frac{N_{pfr-spec}}{N_{tot}}$$

$N_{pfr-spec}$ - celkový výskyt preferovaných kodonů v sekvenci (druhově specifický);
 N_{tot} - počet synonymních kodonů v sekvenci
 (Ikemura 1985)

$$F = \frac{\left(n \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) - 1}{n - 1}$$

F - homozygizita pro příslušnou AMK
 k - počet synonymních kodonů pro danou AMK
 n - celková frekvence AMK v genu
 p_i - frekvence synonymního kodonu i

$$ENCs = 2 + \frac{9}{F_2} + \frac{1}{F_3} + \frac{5}{F_4} + \frac{3}{F_6}$$

pozn. čísla v čitatelích zlomků vyjadřují počet AMK v každé degenerované skupině (např. F_4 je průměrná homozygizita pro 5 AMK, které mají 4 synonymní kodony - Ala, Gly, Pro, Val, Thr) (Wright 1990), možné modifikace (Novembre 2002; Jørgensen *et al.* 2007)

$$CAI = \exp\left(\frac{1}{L} \sum_{k=1}^L \ln \omega_k\right)$$

ω_k - relativní adaptabilita k -tého kodonu
 L - počet synonymních kodonů v genu
 (Sharp *et al.* 1987)

1.5. Význam intronů a architektiky genů v genomech eukaryot

1.5.1 Mají introny funkci?

Introny jsou nekódující sekvence o délce $<10^2$ až 10^5 bází, které jsou před translací odstraňovány z RNA transkriptu a jejich různé formy se nachází u všech hlavních skupin organismů od bakteriofágů, přes bakterie až po savce (Haugen *et al.* 2005; Hertel 2008). Nekódující DNA (introny a oblasti mezi geny) tvoří hlavní komponentu eukaryotických genomů, přesto je známo jen málo o mechanismech její evoluce. Množství a délka intronů, jsou značně variabilní v rámci genů v genomu jednoho organismu, napříč genomy různých organismů (Tab. 1.8), ale také napříč homology v genomech různých organismů (Haugen *et al.* 2005). O důvodech, které k tomu vedou nepanuje všeobecná shoda.

Dříve bylo předpokládáno, že introny a jiné nekódující sekvence jsou bez funkce, v minulosti sloužily jen jako matrix pro vkládání duplikovaných bloků sekvencí kódujících domény proteinů a umožnily tak rychlý vznik celých proteinových rodin (Gilbert *et al.* 1986). Nicméně, u eukaryot je zhruba pětina až čtvrtina nekódujících sekvencí silně konzervovaná a jejich vývoj odpovídá spíše modelům pro evoluci kódujících sekvencí, i když tlaky na zachování struktury jsou nižší (Bergman *et al.* 2001). Navíc pozice řady intronů jsou napříč eukaryoty velmi konzervovány (Rogozin *et al.* 2003; de Roos 2007; Stajich *et al.* 2007), což bychom jen těžko očekávali od nefunkčního úseku DNA. Tyto evolučně staré introny se preferenčně hromadí v 5' úseku sekvence (Sverdlov *et al.* 2004).

Význam intronů pro správný průběh translace a navazujících dějů je dnes široce akceptován. Specifické mutace v některých intronech mohou způsobit poruchy transkripce a navazujících dějů, nebo úplné zastavení přepisu genu (Vijayraghavan *et al.* 1986; Maxwell *et al.* 1995; Bergman *et al.* 2001; Mattick *et al.* 2001; Gianì *et al.* 2003).

Význam snad může mít i ochranná funkce intronů proti tvorbě RNA-DNA hybridů mezi nascentní mRNA a přepisovanou DNA. Sestříhový aparát vystřihuje introny již během transkripce a redukuje tak rychle míru komplementarity mezi rodící se mRNA a přepisovanou DNA (Niu 2007). Existují, ale i další způsoby, jak prostorově oddělit nascentní mRNA od templátu jako např. SR-proteiny, nebo unikátní proteinový komplex TREX nacházený u *S. cerevisiae* (Reed *et al.* 2005; Li *et al.* 2006).

Tab. 1.8 Počet intronů na gen u vybraných organismů (upraveno dle (Jeffares *et al.* 2006; Koonin 2006; Stajich *et al.* 2007))

<i>Leishmania major</i> ; <i>Giardia lamblia</i>	~0
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	0.0075
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Candida albicans</i>	0.047
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0.96
<i>Neurospora crassa</i>	1,8
<i>Aspergillus nidulans</i>	2,7
hmyz	2-3
rostliny	~4
<i>Cryptococcus</i> spp.; <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5-6
<i>Cenorhabditis</i> spp.	5-6
savci	7-8
člověk	8,4

1.5.2 Co ovlivňuje počet a délu intronů v genu?

V rozporu s představami o úspornosti a rychlosti transkripce se zdá zjištění, že u evolučně konzervovaných genů (většina z nich je i vysoce exprimovaná) docházelo v průběhu evoluce k akumulaci intronů (Carmel *et al.* 2007). Ve skutečnosti spíše než ke ztrátám intronů dochází z ekonomických důvodů k jejich zkracování u silně exprimovaných genů, navíc méně exprimované a tkáňově specifické geny mají vyšší nároky na precizní regulaci a tudíž i v průměru delší sekvence intronů (Castillo-Davis *et al.* 2002; Pozzoli *et al.* 2007; Rao *et al.* 2010).

Dodatečnými faktory, které pravděpodobně modulují délku intronů je intenzita rekombinace, která je odlišná v závislosti na konkrétním chromozomu a vzdálenosti od centromer a telomer (Carvalho et Clark 1999; Comeron et Kreitman 2000; Prachumwat *et al.* 2004) (Bartolomé *et al.* 2002; Rizzon *et al.* 2002). Roli může hrát i architektura uspořádání chromatinu a interchromatinového kompartmentu v jádře. Silně přepisované geny (euchromatin) jsou většinou alokovány v oblastech pod jadernou membránou (odpovídá ramenům chromosomů). Interchromatinový kompartment (enzymy) je efektivněji využíván na omezeném prostoru a existuje tedy tlak na menší rozměry intronů v transkripčně aktivních oblastech a vměstnání aktivně přepisovaných genů do omezených oblastí. Menší tlak na rozměry intronů je směrem od jaderné membrány do centra jádra (Prachumwat *et al.* 2004).

Poněkud výjimečnou pozici má první intron, jehož délka vykazuje největší variabilitu napříč geny, a ve kterém se častěji nachází regulační elementy (Majewski et Ott 2002). Jeho velikost je často větší a narozdíl od velikosti ostatních intronů pozitivně koreluje s úrovní exprese genu (Marais *et al.* 2005; Hughes *et al.* 2008).

1.5.3 Mechanismy získání a ztráty intronů

Mechanismy získání a ztráty intronů nejsou uspokojivě objasněny. Nejčastěji akceptovaný model ztráty intronů zahrnuje homologní rekombinaci mezi cDNA (vzniklou z mRNA revezní transkripcí zajištěnou pravděpodobně retrotranspozony) a genomickou DNA (Roy et Gilbert 2005). Proti ztrátám intronů naopak působí výše uvedené funkční vlastnosti intronů a převládající "exon definition" varianta rozpoznávání sestřihových míst (viz níže). Jako možné cesty získání intronu přicházejí v úvahu inserce transpozony, transpozice existujícího intronu, tandemová genová duplikace, přenos intronu mezi paralogy, případně intronalizace sekvence exonu (Roy 2004; Irimia *et al.* 2008; Roy et Irimia 2009). Významnou roli při získávání i ztrátách intronů mají pravděpodobně reparační mechanismy dvouřetězcových zlomů DNA (Farlow *et al.* 2011; Ragg 2011). Tyto mechanismy se spolu s genovou konverzí s největší pravděpodobností podílely na získání a ztrátách intronů pozorovaných u rodu *Aspergillus* (Zhang *et al.* 2010).

Dřívější spory o datování vzniku intronů buď před samotný vznik genů, nebo teprve v průběhu evoluce eukaryot (tzv. "intron late" nebo "intron early" teorie) se přesunuly do jiné roviny. Majoritně je dnes přijímán názor, že předek eukaryot měl genom bohatý na introny (de Roos 2007; Stajich *et al.* 2007; Koonin 2009). Velmi nejednotný je názor na to jaké procento intronů se dostalo do genomu během další evoluce.

Jedna ze současných hypotéz předpokládá, že většina intronů se do genomu dostala během rané fáze eukaryogeneze. Tato rozsáhlá invaze intronů je dávana do souvislosti s endosymbiózou, která dala vzniknout mitochondriím. V naivních hostitelských buňkách se rychle šířily retroelementy, které s sebou přinesl endosymbiont. Hostitelská buňka neměla v té době efektivní mechanismy pro limitování počtu těchto retroelementů, a proto její přežití záviselo na vyvinutí efektivního mechanismu odstraňování této "sobecké" DNA. Možné důsledky byly dalekosáhlé. Ve snaze oddělit transkript obsahující introny od ribozomů, vyvinula

se údajně kompartmentace jádro-cytosol a spliceosomální aparát lokalizovaný v jádře. Dalšími důsledky snad bylo vyvinutí systému kontroly kvality transkriptu (nonsense-mediated decay) a translátu (signalizace založená na ubiquitinu). Rekombinací mezi takřka identickými introny na vzdálených místech genomu mohlo mít za následek desintegraci cirkulárního genomu do podoby lineárních chromosomů (Koonin 2006; Martin et Koonin 2006; Koonin 2009).

1.5.4 Specifika intronů hub

Introny hub mají některá specifika oproti ostatním eukaryotům. Především jsou v porovnání s ostatními skupinami kratší. Délka většiny intronů nepřesahuje rozmezí 50-100 nt. Výjimku tvoří *S. cerevisiae* s genomem chudým na introny (Tab 1.8), které mají většinou délku mezi 200-500 nt (Hawkin 1988; Kupfer *et al.* 2004). Rozdíly v délce intronů hub a vyšších eukaryot se zdají být uspokojivě vysvětleny rozdílným mechanismem rozpoznávání sestřihových míst u "vyšších" a "nižších" eukaryot. Varianty, kdy sestřihový aparát nejprve hledá sestřihová místa v exonu ("exon definition"), je častější u vyšších eukaryot. Naopak u nižších eukaryot intron sám slouží jako rozpoznávaná jednotka ("intron definition"), ve které jsou uloženy elementy rozpoznávané sestřihovým aparátem (Collins et Penny 2006; Hertel 2008). U "exon definition" varianty, rozměry exonu větší než 300 nt inhibují seskupení spliceosomu, exony nad 500 nt dokonce výrazně zvyšují pravděpodobnost nerozpoznání exonu (exon skipping). Naproti tomu "intron definition" varianta neovlivňuje délku exonů, ale limituje délku intronů. To by mohlo být důvodem, proč u nižších eukaryot nacházíme převážně rozlehlé exony lemované krátkými introny a naopak u obratlovců krátké exony přerušované dlouhými introny (Hertel 2008; Niu 2008).

V říši hub silně dominovala ztráta intronů v průběhu evoluce, v několika liniích dokonce nezávisle došlo k téměř úplné ztrátě intronů. U *S. cerevisiae* může být tento fakt přičítán jinému mechanismu odstraňování intronů než u ostatních eukaryot. Navíc většina intronů, které v genu *S. cerevisiae* přečkávají, plní funkci promotoru, nebo snRNA (Juneau *et al.* 2006).

2. METODIKA

2.1 Zdroje materiálu

Zdrojem kmenů *Aspergillus* byla řada lékařských pracovišť a sbírek kultur hub (oficiálních i osobních studijních sbírek). Hlavní zdroje izolátů jsou uvedeny v Tabulce 2.1. Sběr klinických izolátů probíhal v letech 2007-2011. Kmeny z jiných zdrojů byly získány v letech 2009-2011.

Tab. 2.1 **Hlavní zdroje izolátů** (zahrnutý jen instituce/osoby, které poskytly více než 10 izolátů)

Sbírka kultur hub (CCF), katedra botaniky PřF UK v Praze	RNDr. Alena Kubátová, CSc.
Ústav půdní biologie AV ČR a Sbírka mikroskopických hub ÚPB (CMF ISB); České Budějovice	RNDr. Alena Nováková, CSc.
Mykologická laboratoř dermatovenerologické kliniky VFN a 1.LF FVL; Praha	Doc. MUDr. Skořepová, Csc.
Laboratoř parazitologie a mykologie, Nemocnice České Budějovice	MUDr. Nad'a Mallátová
Oddělení klinické mikrobiologie, Pardubická krajská nemocnice	MUDr. Karel Mencl, CSc.
Zdravotní ústav se sídlem v Praze	RNDr. Pavlína Lysková
Státní zdravotní ústav, Centrum hygieny potravinových řetězců, Brno	MVDr. Vladimír Ostrý, CSc.
Česká sbírka mikroorganismů (CCM), PřF Masarykovy Univerzity, Brno	Ing. Monika Laichmanová, Ph.D.

2.2 Kultivace, rozdělení do morfotypů a uchovávání kultur

Kmeny byly kultivovány ve tmě při teplotě 25 a 37 °C (izoláty sekce *Fumigati* byly testovány ve schopnosti růst až při 50 °C) na médiích doporučených k determinaci v příslušných monografiích (Klich 2002) (Raper et Fennell 1965; Samson *et al.* 2004) - malt extract agar (MEA), Czapek Dox agar (CZA), Czapek yeast agar (CYA), sacharózovém agaru s kreatinem (CREA). Zástupci sekcí *Aspergillus* a *Restricti* se zvýšenými nároky na osmotickou tenzi substrátu byli kultivováni na médiích CY20S a M40Y (Raper et Fennell 1965; Tzean *et al.* 1990).

Rozdělení kmenů do morfotypů na základě vzhledu kolonií na výše uvedených médiích a mikromorfologie bylo provedeno na pracovišti katedry botaniky PřF UK v Praze. Fotodokumentace byla provedena na mikroskopu Olympus BX 51 s fázovým a Nomarského kontrastem vybavený digitálním fotoaparátem.

K dlouhodobému uchovávání byly kultury uloženy v lednici (asi 4 °C) na dvojici šikmých půd (standardně MEA a CYA; kmeny ze sekcí *Aspergillus* a *Restricti* na dvojici MEA a M40Y). Řada izolátů byla uložena do Sbírky kultur hub (CCF - Culture Collection of Fungi) na katedře botaniky PřF UK v Praze, kde jsou uchovávány jako živé kultury, nebo jako lyofilizáty.

2.3 Izolace DNA

DNA byla izolována ze 7 dní starých kultur komerční sadou Microbial DNA Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Inc.) postupem shodným s instrukcemi výrobce. Kontrola kvality izolované DNA byla zpočátku prováděna na

spektrofotometru Nanodrop ND-1000, později bylo od této kontroly kvůli konstantním výsledkům upuštěno. Většina DNA byla izolována RNDr. Miladou Chudíčkovou (za což ji ještě jednou děkuji).

2.4 PCR-fingerprintová metoda s primerem M13-core a typizace do druhu

PCR reakce s nízkou teplotou annealingu s jediným oligonukleotidovým primerem M13-core (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') byla použita pro nalezení zástupců různých druhů uvnitř morfotypů (zde zejména využito u nejpočetnější sekce *Fumigati*). Primer M13-core vykazuje konstantně dobrou rozlišovací schopnost na úrovni druhu u řady rodů hub (Gadkar *et al.* 1997; Gräser *et al.* 1998; Zhou *et al.* 2001).

18,5 µl reakční směsi obsahuje:

deionizovaná H ₂ O	8 µl
dNTP's (2 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Promega Corp., Madison, WI)	2 µl
primer (10 pM/µl)	2 µl
DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy)	2 µl
DynaZyme polymeráza (Finnzymes Oy)	0,5 µl
DNA	2 µl

Amplifikace byla provedena v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf) s následujícími parametry: 94 °C/3 min, 52 °C/1 min, 65 °C/3 min (1×); 45 °C/40 s, 52 °C/1 min, 65 °C/3 min (35×) and 94 °C/40 s, 52 °C/1 min, 65 °C/10 min (1×). Produkty byly zviditelněny na gelové elektroforéze (standard velikosti λBglI, elektroforetický pufr TBE, 2 % agarózový gel, nanoseny 2-3 µl produktu, délka běhu cca 2 hodiny při 130V).

2.5 PCR amplifikace a sekvenace

Reakční směs (viz níže) byla amplifikována v termocykleru Mastercycler Gradient (Eppendorf) v následujícím režimu: 95 °C/3 min, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min (1×), 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min (30×) and 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/10 min (1×).

25 µl reakční směsi obsahuje:

deionizovaná H ₂ O	15 µl
dNTP's (2 mM)	2,5 µl
DynaZyme pufr 10x (Finnzymes Oy)	2,5 µl
primery (10 pM/µl), každý	2 µl
DynaZyme polymeráza (Finnzymes Oy)	0,5 µl
DNA	1 µl

Při očekávané délce fragmentů přesahující 1500 bp byla fáze elongace prodloužena na 2 minuty. Při nedostatečné specifitě reakce byla směs amplifikována v teplotním gradientu. U "slabých" produktů byl počet

cyklů prodloužen na 35-40. Kromě uvedených chemikálií byla u obtížně amplifikovatelných vzorků použita Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) s příslušným pufrem. Další modifikace reakční směsly zahrnovaly PCR enhancery - betain (1,5 M; 2 µl na úkor vody), DMSO 2 % (DUCHEVA Biochemie; 2 µl na úkor vody). Purifikace a sekvenování byly řešeny servisně (Macrogen Corp., Jižní Korea; Macrogen Europe, Holandsko). Sekvence byla provedena koncovými, případně i vnitřními primery.

K amplifikace fragmentů genů *benA*, *caM*, *rpb2* a *ITS* oblasti byly použity primery a jejich kombinace uvedené v Tabulce 2.2 (v případě genu *benA* a jeho paralogu *tubC* byly použity nově navržené primery - viz výsledky). Identita izolátů byla určena na základě shody se sekvencí typového kmenu příslušného druhu uložené v databázi GenBank.

Sekvence uložené do databáze Genbank v této práci jsou uvedeny v Tabulce 3.1.

Tab. 2.2 Primery použité k amplifikaci genů *benA*, *caM*, *rpb2* a *ITS* oblasti

<i>gen</i>	forward primer	reverz primer
<i>benA</i>	T1 (AACATGCGTGAGATTGTAAGT)	T2 (TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG)
	Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)	Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)
	T10 (ACGATAGGTTACCTCCAGAC)	T22 (TCTGGATGTTGTTGGGAATCC)
	T12 (AACAACTGGGCCAAGGGTCAC)	T222 (GACCGGGGAAACGGAGACAGG)
<i>caM</i>	CF1L (GCCGACTCTTTGACYGARGAR)	CF4 (TTTTYTGATCATRAGYTGGAC)
	CF1M (AGGCCGAYTCTYTGACYGA)	cmd6 (CCGATAGAGGTCATAACGTGG)
	cmd5 (CCGAGTACAAGGAGGCCTTC)	
<i>rpb2</i>	fRPB2-5F (GAYGAYMGWGATCAYTTYGG)	fRPB2-7cR (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT)
<i>ITS</i>	ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)	ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)
	ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)	ITS4S (CCTCCGCTTATTGATATGCTTAAG)
	ITS1F (CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA)	NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG)
		LR6 (CGCCAGTTCTGCTTACC)

2.6 Navrhování primerů

Primery navržené pro amplifikaci genu *benA/tubC* byly navrženy na základě sekvencí získaných z genomických projektů *Aspergillus* (viz Tab. 1.3). Sekvence byly alignovány ručně v editoru Bioedit 7.0.5.3 (Hall 1999). Konsenzuální sekvence *benA* respektive *tubC* genů *Aspergillus* spp. má v cílených oblastech jen poměrně krátké konzervativní úseky (15-20bp) specifické pro každý z paralogů, a proto byly primery navrhovány ručně. Základní parametry primerů jako možnost tvorby dimerů, vlásenky, účinnost primerů, "teplota tání" (T_m) a vzájemná kombinovatelnost byly testovány v programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Další generace primerů byla navržena se zahrnutím nově amplifikovaných fragmentů.

2.7 Kontrukce fylogenetických stromu

Pro sestavení fylogenetických stromů/kladogramů byly sekvence příslušného genu alignovány za použití algoritmu ClustalW (Thompson *et al.* 1994). Vlastní strom byl sestaven za použití metody Minimum evolution zahrnuté v programu MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

2.8 Analýza codon usage

Charakteristiky operující s codon usage (viz Tab. 1.7) byly pro β -tubulinové paralogy testovány v programu CodonW (J. Peden; <http://codonw.sourceforge.net>).

2.9 Statistické zpracování dat

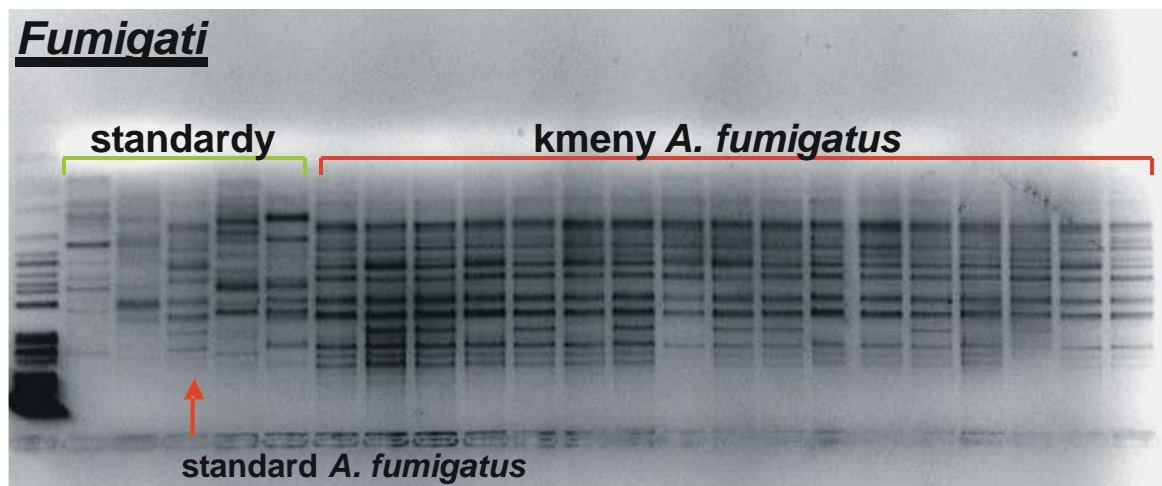
Statistické testování hypotéz bylo prováděno v programu PAST (Hammer *et al.* 2001).

3. VÝSLEDKY

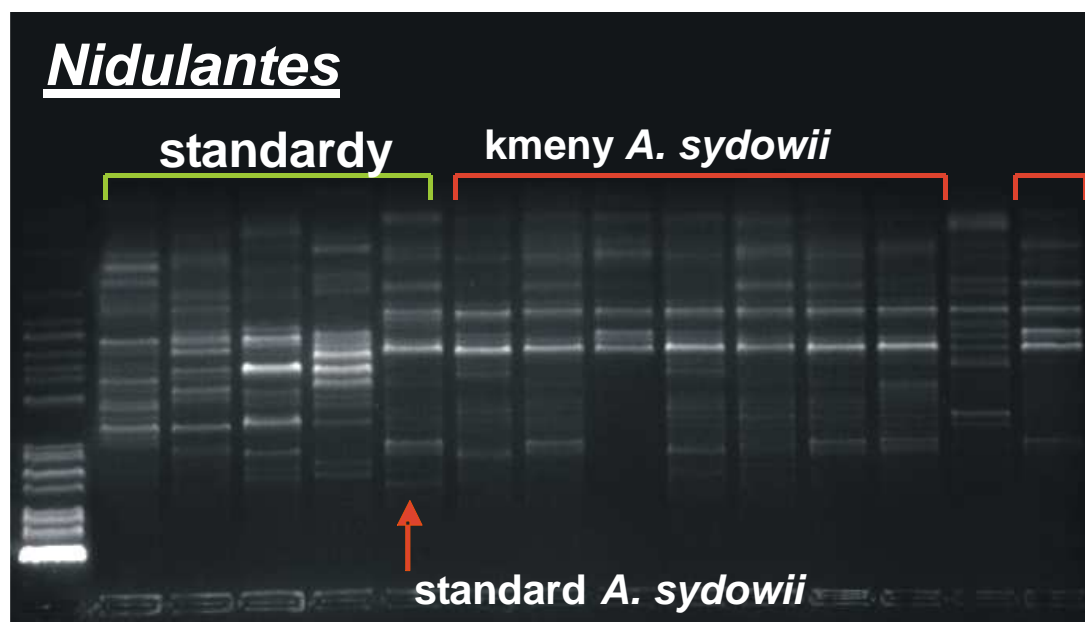
3.1 Diverzitně-taxonomická část

3.1.1 Diversita izolátů uchovávaných v českých sbírkách mikroorganismů

Celkově bylo molekulárními metodami studováno 349 izolátů *Aspergillus*. PCR-fingerprintová metoda s primerem M13 (Obr. 3.1 a 3.2) se ukázala být velmi vhodným nástrojem pro typizaci do druhu u izolátů řazených ke stejnému morfotypu (šlo především o nejvíce zastoupené sekce jako *Fumigati*, *Nidulantes* a *Flavi*). Rozeznatelná pattern proužků dobře odpovídala současnému druhovému konceptu *Aspergillus*.



Obr. 3.1 Příklad fingerprintu získaného po amplifikaci s primerem M13 u zástupců sekce *Fumigati*. Jako standardy byly vybrány dříve osekvenované druhy ze stejné sekce.



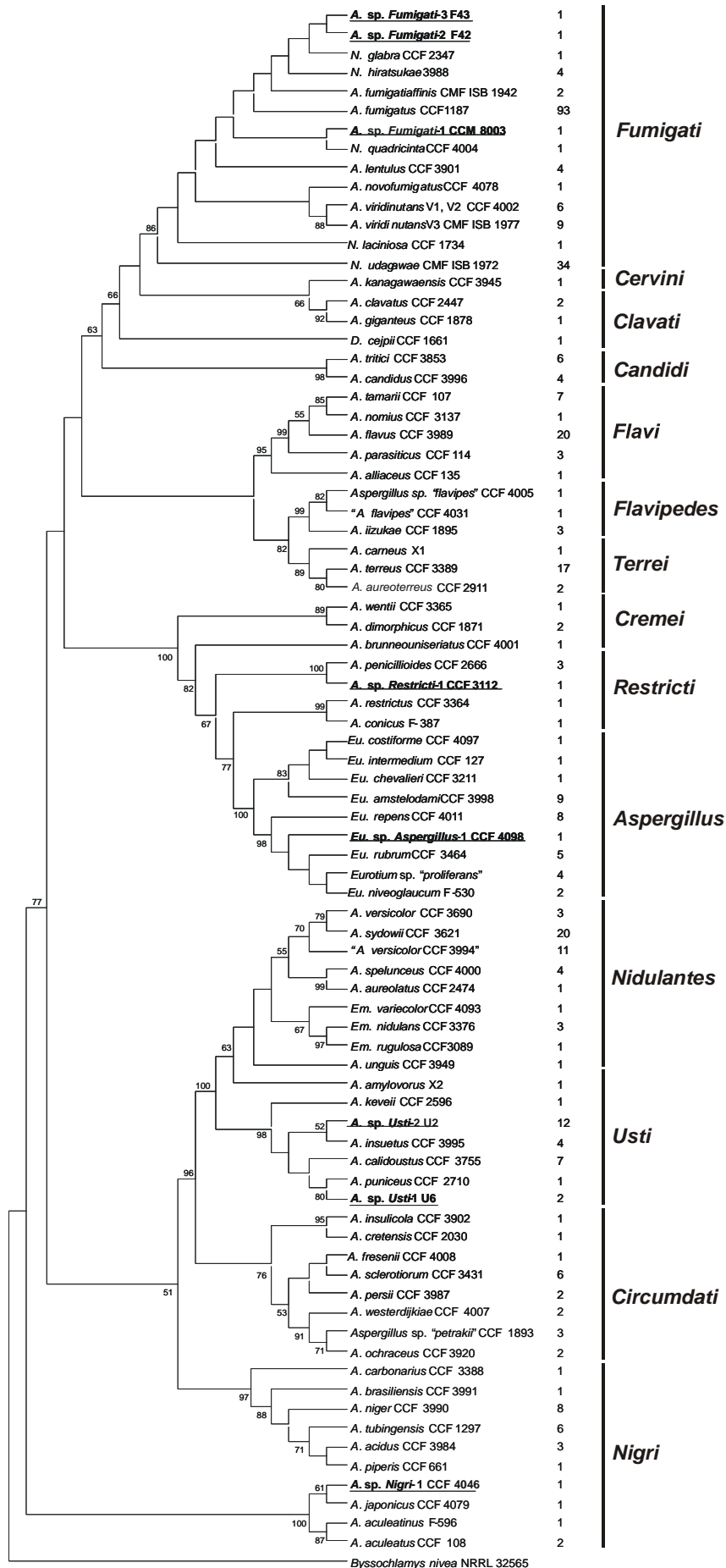
Obr. 3.1 Příklad fingerprintu získaného po amplifikaci s primerem M13 u zástupců sekce *Nidulantes*. Jako standardy byly vybrány dříve osekvenované druhy ze stejné sekce.

Na základě sekvenčních dat ze 4 lokusů bylo mezi 349 izoláty identifikováno 82 taxonů náležejících do 14 sekcí (podle Peterson *et al.* (2008) a Varga *et al.* (2010)), které splňují kritéria druhu dle GCPSR (Avisé et Ball 1990; Dettman *et al.* 2003; Dettman *et al.* 2003; Dettman *et al.* 2006). Všechny izoláty spolu s definitivním určením, substrátem, ze kterého byly izolovány, lokalitou a přístupovými čísly k sekvencím v databázi GenBank jsou zanesena do Tabulky 3.1. Druhové určení a počet izolátů každého taxony jsou přehledně shrnuty v kladogramu na Obr. 3.3.

Mezi zmíněnými 82 taxony bylo identifikováno 8 zcela nových druhů (viz další podkapitoly), jedna nepopsaná teleomorfa (*Eurotium* sp. teleomorfa od *A. proliferans*) a řada druhů, které byly v minulosti zaregistrovány, ale zatím nemají jméno, případně mají jméno neplatné, a proto nemohly být pojmenovány. Mezi takové případy patří izoláty označené jako *A. viridinitans* V1-V3 (viz kapitola 3.1.3.2). Problematické jsou izoláty označené jako "*A. flavipes*" resp. *Aspergillus* sp. "*flavipes*". Jak bylo zjištěno (Peterson 2008), domnělá teleomorfa druhu *A. flavipes* - *Fennellia flavipes*, je samostatný druh, proto je jméno *A. flavipes* neplatné. *Aspergillus* sp. "*flavipes*" CCF 4005 (shodný s kmenem NRRL 295 z Peterson (2008)) je nepopsaný druh morfologicky připomínající *A. flavipes*. Izoláty označené jako "*A. versicolor*" reprezentují kmeny shodné s NRRL 227 a 4642, který jsou sesterským nepopsaným druhem k *A. versicolor* (Peterson 2008). Tyto kmeny byly v této práci ve výrazné převaze oproti kmenům, které je možné označit za *A. versicolor* s. str (viz Tab. 3.1). Kmeny značené jako *Aspergillus* sp. "*petrakii*" jsou kmeny, které morfologicky připomínají *A. petrakii*. Typový kmen *A. petrakii* byl na základě sekvenčních dat ztotožněn s *A. ochraceus*, proto je druh neplatný a linie reprezentovaná kmeny jako NRRL 4748 a 4789 čeká na popsání (Peterson 2008).

Významné je přispění práce ke znalostem o ekologii druhů, které byly popsány v nedávné době na základě nízkého počtu izolátů (*A. novofumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. piperis*, *A. keveii*, aj.), nebo byly od dob svého popisu nalezeny jen velmi vzácně (*Eu. costiforme*, *A. insulicola*, *A. cretensis*, *A. conicus*, *A. amylovorus*, aj.)

Obr. 3.3 Kladogram shrnující druhovou diverzitu 349 analyzovaných izolátů *Aspergillus* (82 druhů). Čísla reprezentují počet zachycení daného taxonu v datasetu, dále je znázorněna příslušnost k sekcím. Kladogram založený na oblasti ITS (vyznačeno je číslo kmenu, ze kterého byla použita sekvence); metoda Minimum Evolution, bootstrap 300 opakování (přednastavené parametry; MEGA5).



Tab. 3.1 Přehled revidovaných izolátů z klinického materiálu a českých sbírek (řazeno abecedně podle sekcí)

číslo izolátu	sekcí/ druh	substrát	lokalita*	metoda použitá k determinaci / GenBank accession number‡					
				ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	<i>tubC</i>	M13 [†]
<i>Aspergillus</i>									
CCF_1952	<i>Eu. amstelodami</i>	krmivo	Praha	FR727111	FR775334				
CCF_4071		kůže krku	Praha	FR839680		FR751449			
CCF_3998		kůže krku	Rakovník	FR727117		FR751447			
CCF_4069		kůže paty	Praha	FR839679	FR775356				
CCF_4070		nehet ruky	Praha	FR848825	FR775335	FR751442			
I_237		nehet ruky	Praha	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>			
CB_41		sputum	České Budějovice						M13
AK_139/97		stěr z okenního parapetu	Olomouc						M13
M_240		zevní zvukovod	Praha						M13
CCF_4097	<i>Eu. costiforme</i>	nehet nohy	Říčany	FR837960	FR837970	FR837974	FR837978		
CCF_3211	<i>Eu. chevalieri</i>	mletý kmín	Brno						M13
CCF_1663		pšeničná krupice	Praha						M13
CCF_1676		pšeničná krupice	Praha						M13
CCF_3291		rýže	Brno	FR727116	HE578085	HE578099	<i>rpb2</i>		
CCF_127	<i>Eu. intermedium</i>	průmyslový materiál	? (Čína)	HE57806 0		HE578100			
F-530	<i>Eu. niveoglaucum</i>	česnek	ČR	HE57806 9	HE578086	HE578092	HE578114		
E1		jeskynní sediment	Cueva del Tesoro (Španělsko)	ITS	<i>benA</i>				
CCF_4011	<i>Eu. repens</i>	kůže zad	Praha	FR839678	FR775358	FR751446	HE578111		
CCF_4072		kůže trupu	Říčany	FR839684					
I_97		nehet nohy	Praha						
I_239		nehet nohy	Praha						
I_91		nehet ruky	Praha						
CCF_1454		půda	Himaláje (Nepál)	FR727113	FR775359				
CCF_3283		plesnivé mýdlo	Praha	FR727114	FR775360		HE578110		
E3		jeskynní sediment	Cueva del Tesoro (Španělsko)						M13
CCF_4104	<i>Eu. rubrum</i>	nehet nohy	Praha	FR848826	FR848830				
I_88		nehet nohy	Praha	HE57806 5	HE578087	HE578098			
CCF_2920		slad	Nymburk	FR727112	FR775357	FR751444			

CCF_3464 F-438		textilie pepř	Praha ČR	FR727115 ITS				
E2	<i>Eu. sp. "proliferans"</i>	jeskynní sediment	Gruta de la Maravillas (Španělsko)	ITS	<i>benA</i>		<i>rpb2</i>	
CCF_4096 CCF_4115		kůže dlaně nehet nohy	Praha Benešov	FR848827 FR851850	FR775375 FR851855	HE578090	<i>rpb2</i> HE578107	
I_93		nehet nohy	Praha	HE57806 7	HE578076		<i>rpb2</i>	
CCF_4098	<i>Eurotium sp. Aspergillus-1</i>	nehet ruky	Benešov	FR848828	FR837968	FR837973	FR837979	
<u>Candidi</u>								
CCF_488 CCF_3962 CCF_4029 CCF_3996 CCF_1649 CCF_3853 SK_339 M_574 CCF_3314 CCF_4030	<i>A. candidus</i> <i>A. tritici</i>	chodbičky lýkožroutů nehet nohy netopýří trus zevní zvukovod mouka nehet nohy nehet nohy nehet nohy ovzduší vermikompost	ČR Praha Meziad cave (Rumunsko) Praha Praha Praha Praha Praha FrydekMístek	FR733811 FR727138 FR733813 FR727137 FR733810 FR727136		<i>caM</i> FR751452 FR751424 FR775325 FR751427 FR775327 <i>caM</i>		M13
<u>Cervini</u>								
CCF_3945	<i>A. kanagawaensis</i>	nehet nohy	Praha	FR733880	FR775332	FR837972	FR837980	
<u>Circumdati</u>								
CCF_2030 CCF_4008 CCF_3901 CCF_512 CCF_3920 CCF_3987 CCF_3110 CCF_4007 CCF_4006 CCF_1870 CCF_4081 CCF_1893	<i>A. cretensis</i> <i>A. fresenii</i> <i>A. insulicola</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. persii</i> <i>A. westerdijkiae</i> <i>A. sp. "petrakii"</i>	půda zevní zvukovod nehet nohy ovzduší sputum nehet nohy zed' bytu kůže nehet nohy kukuřice (<i>Zea mays</i>) kůže ovzduší jeskyně	? (Makedonie) Ostrava Praha Praha Ostrava Praha Chocenická Lhota Praha Polanka Kutná Hora Praha Moravský kras	FR733835 FR733823 FR733834 ITS FR733829 FR733836 FR733828 FR733833 FR733837 FR733831 FR733832 FR733830	FR775328 FR851859 FR775320 <i>benA</i> FR775371 FR851858 FR775366 FR839686 FR775331 FR775370 FR775369 FR775365	FR751420 FR751419 FR751429	HE578108 HE577828 FR732063 HE577833 FR732062	HE577832 HE577832

CMF_ISB_1744	<i>A. sclerotiorum</i>	jeskynní sediment	Altamira Cave (Španělsko)	ITS		<i>caM</i>	
CCF_3434		kukuřice (<i>Zea mays</i>)	Praha	FR733825			HE577827
CCF_3431		kukuřice (<i>Zea mays</i>)	Praha	FR733827	FR775367		FR732059 HE577830
CCF_748		neznámý	? (Čína)	ITS			<i>tubC</i>
AK_147/04		pistácie	Praha	ITS	<i>benA</i>		
CCF_844		průmyslový materiál	? (Čína)	FR733826	FR775368		HE577831
<u>Clavati</u>							
CCF_2447	<i>A. clavatus</i>	kůže	Plzeň	FR733876	FR775374		HE577836
CCF_4084		povrchová půdní krusta	Ralsko	FR733878	FR775373		
CCF_1878	<i>A. giganteus</i>	pistácie	Praha	FR733879	FR775339		HE577835
CCF_1661	<i>D. cejpii</i>	zahradní půda	Praha	FR733877	FR775372		
<u>Cremeri</u>							
CCF_4001	<i>A. brunneouniseriatus</i>	jeskynní sediment	Castañar de Ibor Cave (Španělsko)	FR727121	FR775317		
CCF_3365	<i>A. wentii</i>	nehet nohy	Velké Losiny	FR727118	FR775319		
CCF_1871	<i>A. dimorphicus</i>	povrch listu	Praha	FR727119	FR775318		FR732057
CCF_1726		ovzduší	Praha	FR727120			
<u>Flavi</u>							
CCF_135	<i>A. alliaceus</i>	neznámý	neznámá	HE57807	<i>benA</i>		HE577820
Vo124A	<i>A. flavus</i>	černý čaj	Brno	3			M13
Vo 115		dětská obilná kaše	Brno	ITS		<i>caM</i>	
VO159		hladká pšeničná mouka	Brno				M13
I_555		nehet nohy	Praha	ITS			
AK_128/07		nehet nohy	Praha	ITS			
CCF_4035		nosní polypy	Pardubice	FR733818			
Vo153; VO121		ovesné vločky	Brno				M13
CCF_3168		pšeničná krupice	Brno	ITS			
M_902		sputum	Praha			<i>caM</i>	
CCF_1288		výtěr z krku	Příbram	FR733816	FR775346		HE577823
CCF_3989		zevní zvukovod	České Budějovice	FR733815	FR851861		
CB_44		zevní zvukovod	České Budějovice				M13
ME_9872		zevní zvukovod	Pardubice	ITS			
ME_44		zevní zvukovod	Pardubice	ITS			
CCF_4074		zevní zvukovod	Praha	FR733822			

M_9; M_402; M_404		zevní zvukovod	Praha					M13	
CCF_3137	<i>A. nomius</i>	půda	Pulan Tioman, Pahang (Malajsie)	FR733821					
CCF_1308	<i>A. parasiticus</i>	důlní šachta	Příbram	FR733820	FR775333	FR751450		HE577821	
CCF_106		neznámý	? (Čína)						
CCF_114		neznámý	neznámá	ITS		<i>caM</i>			
CCF_1602	<i>A. tamarii</i>	jídlo	Praha	FR733819					
CCF_107		neznámý	neznámá	FR733817	<i>benA</i>	FR751448		HE577819	
AK_141/08		potraviny	Brno	ITS					
CCF_3361		zelený sáčkový čaj	Praha	ITS		<i>caM</i>			
CCF_4092		zevní zvukovod	Praha	FR837964	FR839685	FR751459			
CCF_3874		zevní zvukovod	Praha	FR851849	FR851856				
M_109		zevní zvukovod	Praha					M13	
<i>Flavipedes</i>									
CCF_1895	<i>A. iizukae</i>	výsypka	Most	FR727134	FR775336 ; HE577840			HE577839	
CCF_4032		výsypka	Cottbus (Německo)			<i>caM</i>			
CCF_4033		výsypka	Most	FR733809	<i>benA</i>				
CCF_4031	<i>"A. flavipes"</i>	půda	Ardales cave (Španělsko)	FR733808					
CCF_4005	<i>Aspergillus sp.</i> <i>"flavipes"</i>	ovzduší nemocnice	Hradec Králové	FR727135	<i>benA</i>				
<i>Fumigati</i>									
CMF_ISB_1942	<i>A. fumigatiaffinis</i>	půda	Málaga (Španělsko)	HE57805 9	HE578074	HE578096	HE578104		
F35		půda výsypky	Wyoming (USA)		HE578083				
CB_28; CB_49	<i>A. fumigatus</i>	BAL	České Budějovice					M13	
M_73		BAL	Praha					M13	
CB_1; CB_3; CB_5; CB_6; CB_9; CB_19-21; CB_20; CB_36; CB_38; CB_39; CB_43;		bronchální sekret	České Budějovice					M13	

CB_48; CB_50						
KL_462	bronchální sekret	Kladno				M13
I_449	bronchální sekret	Praha				M13
CCF_3884	jaterní punktát	Banská Bystrica (Slovensko)				M13
CMF_ISB_1774	kompost	České Budějovice	ITS			
M_356	krev	Praha				M13
CB_37	mozková tkáň	České Budějovice				M13
I_282	nehet ruky	Praha				M13
I_14271	nosní polypy	Pardubice				M13
CB_10	operační rána	České Budějovice				M13
I_3019	operační rána	Praha				M13
ME_695	pleurální punktát	Pardubice				M13
CB_31	pleurální punktát	České Budějovice				M13
CB_11; CB_46	plicní biopsie	České Budějovice				M13
CCF_3522	plicní biopsie	Vratimov	ITS		<i>benA</i>	
I_13; I_14; I_18	popáleniny třetího stupně	Pardubice				M13
CB_7; CB_30	rána po úrazu	České Budějovice				M13
CCF_3623	sinus maxillaris	Olomouc	FR837958		FR775352	
CB_22; CB_35	sinus maxillaris	České Budějovice				M13
I_24	sinus maxillaris	Pardubice				M13
1341Dob	sinus sphenoidalis	Sedliště	ITS		<i>caM</i>	
M_227; M_343;						
I_4136; I_844;	sputum	Praha				M13
M_236; M_238;						
I_14; I_29; PL_15						
CCF_3384	sputum	Hradec Králové	FR733867		FR775354	
CB_2; CB_4; CB_8;						
CB_16-18; CB_23-	sputum	České Budějovice				M13
25; CB_29; CB_32;						
CB_33; CB_40						
ME_43; ME_1834;	sputum	Pardubice				M13
ME_202						
KL_188; KL_220;						
KL_401; KL_523;	sputum	Kladno				M13
KL_504						
AK_78/08	těstoviny	Brno	ITS		<i>caM</i>	
CB_26	tracheální aspirát	České Budějovice				M13
I_15-17	tržná rána	Pardubice				M13
AK_70/01	výtěr pochvy	ČR				M13

CCF_1187		výtěr z krku	Praha	FR733868				
CCF_1292		výtěr z krku	Příbram	FR733870				
CCF_1293		výtěr z krku	Příbram	FR733869				
M_237; M_256; M_261; M_354		zevní zvukovod	Praha					M13
ME_6; ME_10682; ME_32; KOLF_35		zevní zvukovod	Pardubice					M13
42_CB		zevní zvukovod	České Budějovice					M13
CCF_3902	<i>A. lentulus</i>	BAL	Olomouc	FR733864	FR775351		FR732056	
CMF_ISB_1969		půda	Wyoming (USA)	HE57806 4	HE578078			
CCF_4089		sputum	Praha	FR837957	FR837971			
CCF_4059		sputum, pleurální punktát	Praha	FR839681	FR851852	FR751460		
CCF_4078	<i>A. novofumigatus</i>	půda	Castañar de Ibor Cave (Španělsko)	FR733874	FR775377	FR839688	HE578105	
CCF_4002	<i>A. viridinutans V1</i>	půdní krusta	Chvaletice	FR733865	FR775350		FR732055	HE577825
CCF_4003		halda po těžbě	Markovičky	FR733866	FR775349			HE577826
F39		půda	Wyoming (USA)		<i>benA</i>			
CMF_ISB_1936; F49		půda	Wyoming (USA)					M13
F47		ovzduší jeskyně	Gruta de la Maravillas (Španělsko)					M13
CMF_ISB_1975	<i>A. viridinutans V2</i>	půda	Wyoming (USA)	HE57806 3	HE578084	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	
CMF_ISB_1977	<i>A. viridinutans V3</i>	půda	Wyoming (USA)	HE57806 2	HE578077	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	
F9; F10; F12; F24; F31; F53; F60		půda	Wyoming (USA)					
CMF_ISB_1974		půda	Wyoming (USA)	ITS	<i>benA</i>			
CCF_2347	<i>N. glabra</i>	sediment, peloid	Lázně Bělohrad	ITS	FR775353			HE577834
CCF_4102	<i>N. hiratsukae</i>	BAL	Praha	FR837959	FR837969	FR837975	FR837977	
CCF_3988		nehet nohy	Praha	FR733873	FR775343	FR751435		HE577824
I_98		nehet nohy	Praha	HE57806 6	HE578082			
CCF_3544		pasterizovaný jablečný mošt	Staňkovice u Litoměřic	FR733872		FR751434		
CCF_1734	<i>N. laciniosa</i> ^{††}	zahradní půda	Praha	FR733875		FR751445		
CCF_4004	<i>N. quadricincta</i>	těstoviny	Brno	FR733871	FR775330	FR751428		HE577822

F2	<i>N. udagawae</i>	půda	Wyoming (USA)		<i>benA</i>				
CMF_ISB_1971		půda	Wyoming (USA)		<i>benA</i>				
CMF_ISB_1972		půda	Wyoming (USA)	HE57806 1		HE578075			
CMF_ISB_1973		půda	Wyoming (USA)			<i>benA</i>			
CMF_ISB_1970; CMF_ISB_1976; F7; F8; F14-21; F23; F25; F28; F30; F32- F34; F36-F38; F40; F41; F44; F45; F48; F50; F54; F58; F59;		půda	Wyoming (USA)					M13	
CCM_8003	<i>Aspergillus sp. Fumigati-1</i>	voda s vysokým obsahem boritých iontů	Dukovany	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>		
CMF_ISB_2151	<i>Aspergillus sp. Fumigati-2</i>	půda	Wyoming (USA)	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>		
CMF_ISB_2152	<i>Aspergillus sp. Fumigati-3</i>	půda	Wyoming (USA)	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>		
<i>Nidulantes</i>									
CCF_2474	<i>A. aureolatus</i>	lepidlo	Praha	FR733843		FR775316			
U9	<i>A. spelunceus</i>	jeskynní sediment	Wyoming (USA)	ITS			<i>caM</i>		
CCF_4085		povrch boltce <i>Myotis myotis</i>	štola Malá Amerika	ITS		FR775376	<i>caM</i>	HE577838	
CCF_4075		sediment keratinová návnada	Castañar de Ibor Cave (Španělsko)	FR733855					
CCF 4000		vzduch	Ursilor Cave (Rumunsko)	FR733854		FR775321			
CCF_3621	<i>A. sydowii</i>	bronchální sekret	Olomouc	FR733840		FR775355			
CCF_3691		kůže lokte	Praha	FR733845					
ME_225; ME_1393		nehet nohy	Pardubice					M13	
ME_1338		nehet nohy	Pardubice	ITS	<i>benA</i>				
I_458		nehet nohy	Praha	ITS					
SK_211; SK_474; I_144; I_146; I_210; I_305; SK_346; SK_366		nehet nohy	Praha					M13	
I_344		nehet ruky	Praha					M13	
CCF_3622		sputum	Olomouc	FR733849					
CB_47		zevní zvukovod	České Budějovice					M13	

CCF_3997		zevní zvukovod	Praha	FR733852			
M_76		zevní zvukovod	Praha				M13
CCM_8104		žaludek chvostoskoka	ČR	ITS			
CCF_3949	<i>A. unguis</i>	nehet nohy	Praha	FR733842	FR775329		M13
CF_3690	<i>A. versicolor</i>	nehet nohy	Liberec	FR733851	FR775337	FR751430	
CCF_4058		nehet nohy	Praha	FR733838	FR775345	FR751437	
I_445		nehet ruky	Praha	ITS			
CCF_4073	<i>A. sp. "versicolor"</i>	nehet nohy	Benešov	FR733853		FR751441	
CCF_3994		nehet nohy	Praha	FR733848	FR775340		
I_342		nehet nohy	Praha			caM	
I_21; I_65; I_72		nehet nohy	Praha				M13
CCF_4034		nehet nohy	Příbram	FR733839	FR775344	FR751436	
I_440		nehet ruky	Praha	ITS	benA		
PL_63		stěr rány (pes)	Praha		benA		
R1054		vycpaný pták	Opava		benA		
R1056		vycpaný pták	Opava		benA		
CCF_840	<i>Em. nidulans</i>	průmyslový materiál	? (Čína)	FR733841		FR751438	
CCF_4064		sputum	Pardubice	FR733846	FR851853	FR751439	
CCF_3379		zevní zvukovod	Hradec Králové	FR733847	FR851854	FR751431	
CCF_3089	<i>Em. rugulosa</i>	nekrotická tkáň axily a perikardu	Praha	FR733850	FR775322	FR751440	
CCF_4093	<i>Em. varicolor</i>	nehet nohy	Říčany u Prahy	FR839682	FR848829	FR839687	HE578106
<i>Nigri</i>							
CCF_3984	<i>A. acidus</i>	Yerba maté čaj	Praha	FR727131		FR751413	
CCF_3985		Earl grey sáčkový čaj	Praha	ITS		caM	
CCF_3986		Earl grey čaj	Praha	ITS		caM	
F-596	<i>A. aculeatinus</i>	půda	? (Vietnam)	HE57807 0	HE577809	HE578095	
CCF_108	<i>A. aculeatus</i>	průmyslový materiál	? (Čína)	FR727129	FR775311	caM	HE577818
F-719		pepř	ČR	HE57807 1	HE577810	HE578093	HE577816
CCF_3991	<i>A. brasiliensis</i>	ovzduší	Castanar Ibor cave (Španělsko)	FR727133	FR775312		
CCF_3388	<i>A. carbonarius</i>	nehet nohy	Ostrava	FR727127	FR775314; HE577803		
CCF_4079	<i>A. japonicus</i>	půda	? (USA)	FR733805	HE577811	FR751423	
I_250	<i>A. niger</i>	nehet nohy	Praha			caM	

CCF_4067		nehet ruky	Praha	FR733807		FR751443			
CCF_641		průmyslový materiál	? (Čína)	FR727130		FR751417			
AK_211/99		rozinky	Brno	ITS		caM			
CCF_3990		zevní zvukovod	Pardubice	FR727126	FR775364	FR751421			
CCF_4068		zevní zvukovod	Příbram	FR733804		FR751414			
CB_42		zevní zvukovod	České Budějovice					M13	
M_328		zevní zvukovod	Praha					M13	
CCF_661	<i>A. piperis</i>	neznámý	? (Čína)	FR733803	FR775310; HE577807	FR751415			
CCF_2818	<i>A. tubingensis</i>	neznámý	Louny	FR727132	HE577808	FR751416			
CCF_4080		půda	Hluboká nad Vltavou	FR733806		FR751453			
CCF_4086		sputum	České Budějovice			FR751418			
CCF_4087		sputum	České Budějovice	FR851851	FR851860	FR751412			
I_466		sputum	Praha					M13	
CCF_1297		výtěr z krku	Příbram	FR727128	FR775313	FR751422			
CCF_4046	<i>Aspergillus sp. Nigri-1</i>	mandle dovezené z USA	ČR	HE57807 2	HE577817	HE578097	rpb2	HE577815	
<i>Restricti</i>									
F-387	<i>A. conicus</i>	jádro <i>Bertholletia excelsa</i>	ČR	HE57806 8	HE578080	HE578091	HE578113		
CCM_8349	<i>A. penicillioides</i>	boty z Malajsie	ČR	ITS	HE578079	HE578094	HE578112		
CCF_2666		plesnivé kožené boty	Zlín	FR727124	HE578081	HE578102	rpb2		
CCF_3282		čokoládová tyčinka	Praha	FR727123	FR775347	HE578103			
		sklerocium							
CCF_3364	<i>A. restrictus</i>	<i>Corallocytostroma</i> dovezené z Austrálie	Praha	FR727122	FR775348	HE578101	HE578109		
CCF_3112	<i>Aspergillus sp. Restricti-1</i>	kožené boty z Číny	Praha	FR727125	FR775323	FR751451			
<i>Terrei</i>									
X1	<i>A. carneus</i>	půda prémie	Wyoming (USA)	ITS	HE578088				
CCF_3999	<i>A. terreus</i>	bronchální sekret	České Budějovice	FR733882					
CCF_4066		bércový vřed	České Budějovice	FR837961	FR775338				
CB_13		bércový vřed	České Budějovice	ITS					
CB_15; CB_45		bércový vřed	České Budějovice					M13	
M_23; M_37		zevní zvukovod	Praha					M13	
CCF_4065		nehet ruky	Praha	FR733881					

CCF_3389		nehty nohy a přilehlá kůže	Dolní Benešov	FR837962	FR775362	FR837976
CCF_3993		nehet nohy	Praha	FR837963	FR775363	
I_559		nehet nohy	Praha	ITS		caM
I_564		nehet nohy	Praha			caM
SK_276		nehty nohy	Praha			caM
CCF_55		neznámý	neznámá	ITS	benA	caM
CCF_58		neznámý	neznámá	ITS		caM
CCF_57		neznámý	neznámá	ITS		caM
CCF_3315		ovzduší	Praha	FR837967	FR775361	
AK_276/05		prostředí nemocnice	Olomouc	ITS		
CCF_2911	<i>A. aureoterreus</i>	siláž	Mělník	FR837965	FR775342	FR751432
CCF_2539		sediment	? (Vietnam)	FR837966		FR751433

Usti

X2	<i>A. amylovorus</i>	stěna jeskyně	Gruta de la Maravillas (Španělsko)	ITS	HE578089	
CCF_4057	<i>A. calidoustus</i>	BAL	Praha			FR751458
CCF_3755		mozkový pseudoabsces	Praha	FR733859	FR775341	
CCF_4076		půda	Castanar Ibor cave (Španělsko)	FR733862		
U14		půda	Castanar Ibor cave (Španělsko)			caM
CCF_4077		sediment	Castanar Ibor cave (Španělsko)	FR733863		
CCF_2775		sputum	Praha	FR733860		FR751457
F-414		technical oil	ČR	ITS	benA	
CCF_3995	<i>A. insuetus</i>	BAL	Praha	FR733861	FR851857	FR751455
U11		organická hmota	Cueva del Tesoro (Španělsko)		benA	
U7		ovzduší jeskyně	Cueva del Tesoro (Španělsko)			M13
U3		ovzduší jeskyně	Zbrašovské aragonitové jeskyně			caM
CCF_48		průmyslový materiál	? (Čína)	FR733856	FR775315	FR751454
CCF_2596	<i>A. keveii</i>	orná půda	Kostomlaty nad Labem	FR733858	FR775324	FR751456
CCF_2710	<i>A. puniceus</i>	archivní materiál	Praha	FR733857	FR775326	
U2	<i>Aspergillus sp. Usti-1</i>	jeskynní sediment	Gruta de la Maravillas (Španělsko)	ITS	benA	rpb2

U4		jeskynní sediment	Gruta de la Maravillas (Španělsko)	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	
U12; U19	<i>Aspergillus sp. Usti-2</i>	jeskynní sediment	Cueva del Tesoro (Španělsko)					M13
U17		organická hmota	Cueva del Tesoro (Španělsko)	ITS	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	
U16; U20		organická hmota	Cueva del Tesoro (Španělsko)					M13
U6		ovzduší jeskyně	Cueva del Tesoro (Španělsko)	ITS	<i>benA</i>		<i>rpb2</i>	
U1; U8; U10; U12; U21		ovzduší jeskyně	Cueva del Tesoro (Španělsko)					M13
U18		zbytky svíčky	Cueva del Tesoro (Španělsko)					M13

Eu., *Eurotium*; ***Em.***, *Emericella*; ***D.***, *Dichotomyces*; ***N.***, *Neosartorya*; BAL, bronchoalveolární laváž

*U kmenů izolovaných v zahraničí je v závorce za lokalitou příslušná země, u českých izolátů je uvedena jen lokalita

‡ Pokud je v políčku pro accession number vepsán symbol genu, tak gen byl amplifikován, ale příslušná sekvence nebyla uložena do databáze GenBank

† Determinace byla provedena pomocí PCR-fingerprintové metody s primerem M13core

†† Ačkoliv je ve zde prezentované tabulce 3.3 vedena *N. lacinoso* jako možné synonymum *N. paulistensis* (Yaguchi et al. 2010), nepanuje na platnost, či neplatnost taxonů v komplexu *N. spinosa* shoda (Samson et al. 2007; Peterson 2008); zde je *N. lacinoso* prezentována jako platný druh

3.1.2 Nepopsané taxony

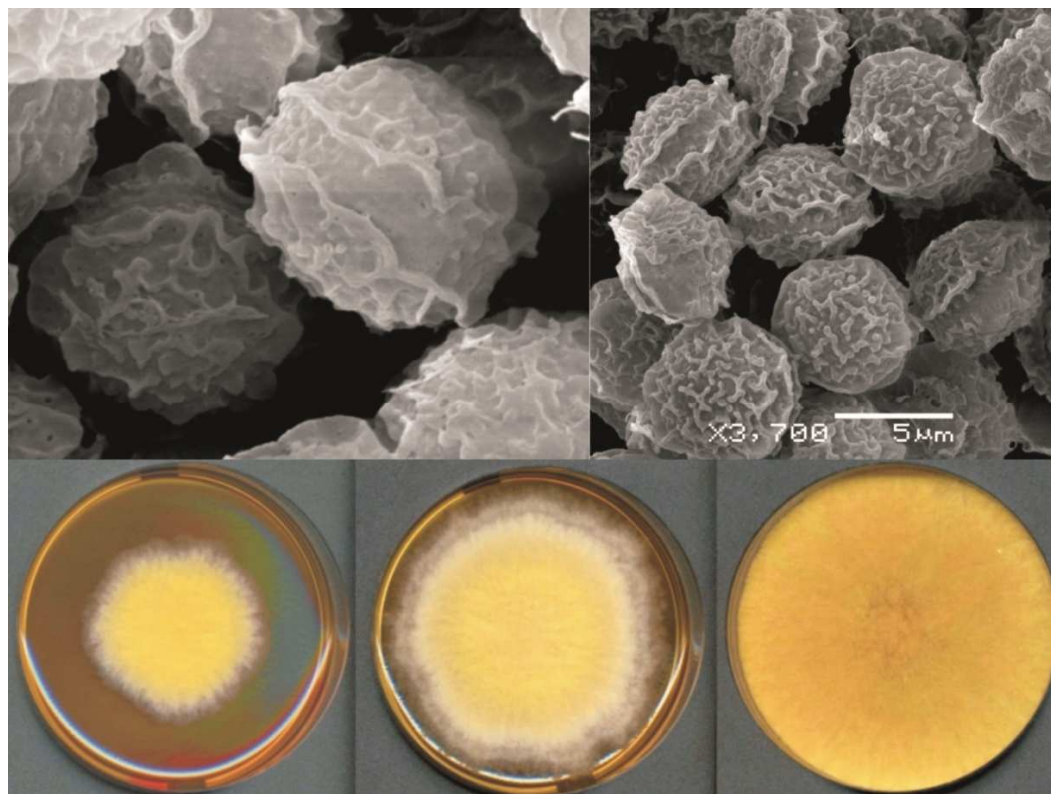
V této podkapitole jsou prezentovány jen druhy poprvé zaznamenané (kdybychom počítali i nepopsané druhy, které byly zachyceny již dříve byl by počet vyšší).

3.1.2.1 Sekce *Aspergillus* (*Eurotium* spp.)

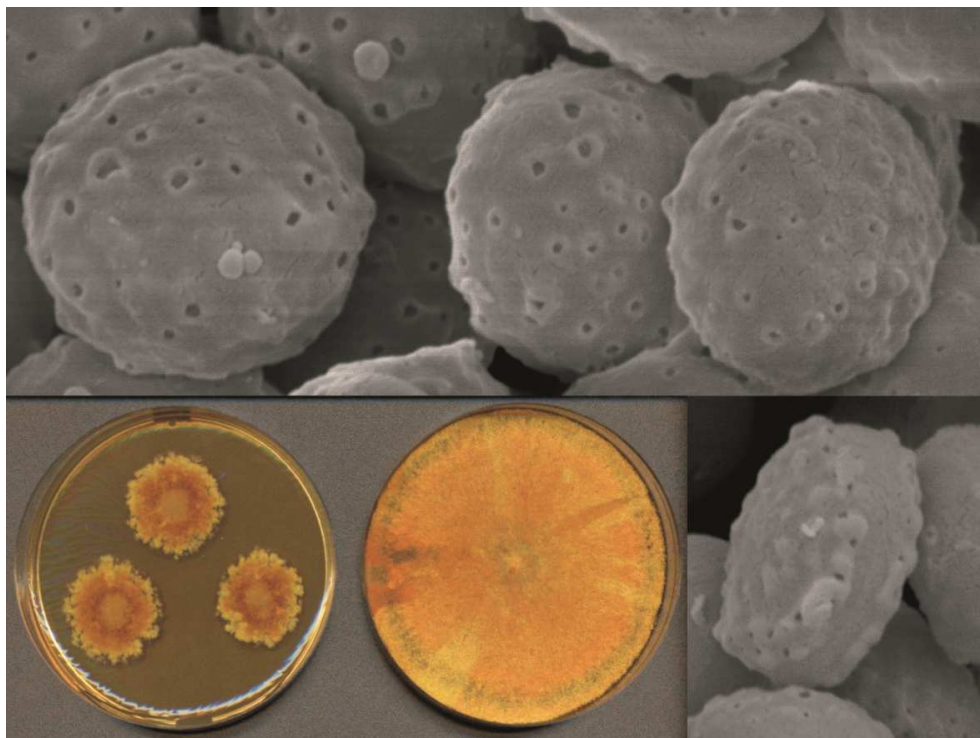
Rod *Eurotium* zahrnuje řadu ekonomicky významných druhů, které se podílí na znehodnocování potravin a krmiv konzervovaných vysušením a vysokou koncentrací solí, nebo cukru. Jde také o významné producenty mykotoxinů

(Samson *et al.* 2004; Pitt et Hocking 2009). Většina kmenů typových kmenů platných druhů byla sekvenována v práci Peterson (2008). Mezi izoláty pocházejícími z klinického materiálu se vyskytly dva izoláty (CCF 4097 a CCF 4098), které nebylo možno ztotožnit s žádným z dosud popsáných a sekvenovaných druhů. Pro potvrzení byly ze zahraničních sbírek objednány a sekvenovány kmeny zbylých popsáných druhů (Tabulka 3.2). Izolát CCF 4097 se ukázal být druhým známým izolátem *E.costiforme* (Obr. 3.4). Kmen CCF 4097 bude pravděpodobně nepopsaný druh (Obr. 3.5), ačkoliv se zatím nepovedlo sekvenovat typovou položku *E. taklimakanense* (k dispozici byla jen sušená položka ošetřená formaldehydem), které ale vykazuje podle originálního popisu řadu morfologických odlišností (Abliz *et al.* 2001). Pět ze sedmi sekvenovaných typových položek se ukázalo být synonymních k již popsáným druhům a reprezentují proto neplatné taxony (Obr. 3.6).

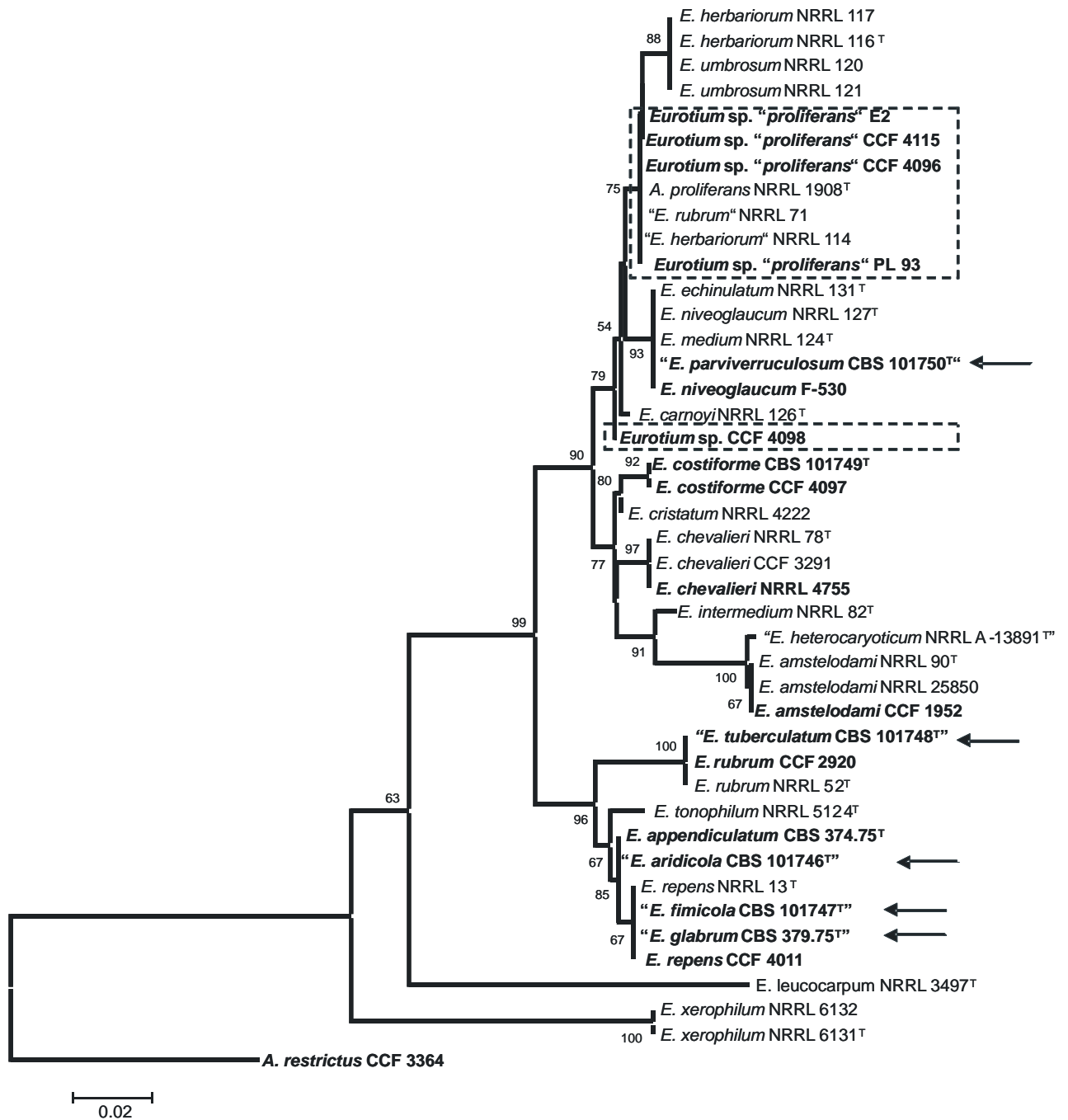
Dále se povedlo izolovat čtyři kmeny totožné s typovým kmenem *A. proliferans* (NRRL 1908), které ale tvoří teleomorfu. *A. proliferans* byl veden jako jediný striktně anamorfní druh v sekci *Aspergillus* (Raper et Fennell 1965).



Obr. 3.4 *Eurotium costiforme* CCF 4098. Detail askospor (nahore) - foto z elektronové skenovací mikroskopie (SEM) (Alena Kubátová). Růst při 25 °C na M40Y (dole) po 7, 14 a 21 dnech.



Obr. 3.5 *Eurotium* sp. CCF 4097. Detail askospor (nahore, dole vpravo) - SEM foto (Alena Kubátová). Kolonie na MEA (dole vlevo) a M40Y (dole vpravo) po 21 dnech.



Obr. 3.4 Vztahy mezi zástupci sekce *Aspergillus*. Fylogenetický strom založený na genu *benA*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování. Sekvence izolátů označených tučně pocházejí z této práce, ostatní sekvence byly získány z práce Peterson (2008). Šipky vyznačují taxony, které na základě sekvencí typových kmenů^T budou synonymizovány s již popsánymi druhy. Přerusované orámování znázorňuje nepopsaný druh CCF 4098 a nepopsanou teleomorfou *A. proliferans*.

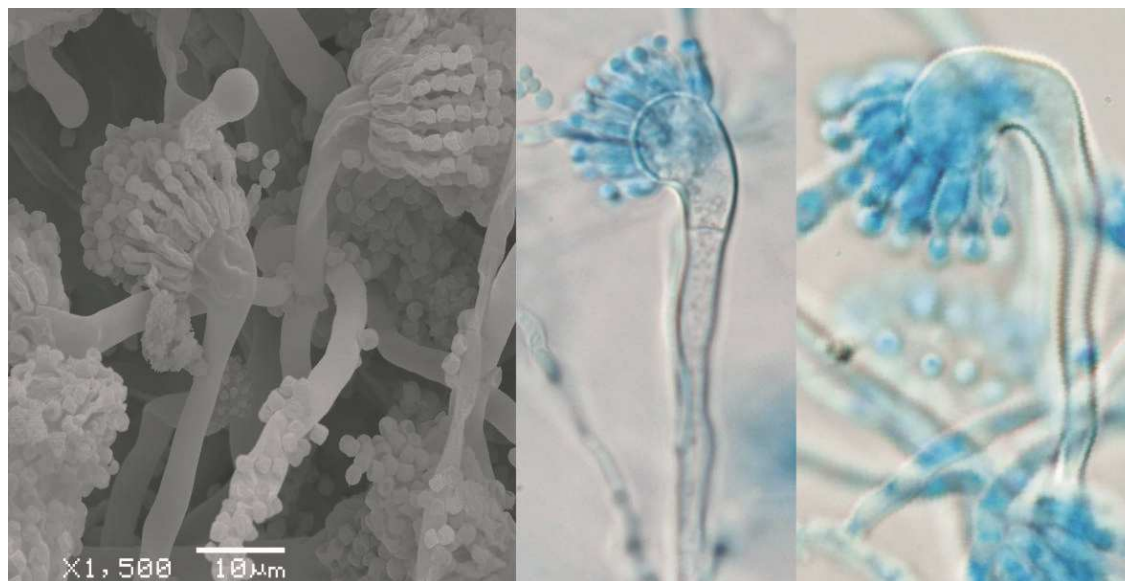
3.1.2.2 Sekce *Fumigati*

Sekce *Fumigati* obsahuje velké množství druhů, řada z nich má slabou morfologickou podporu (velká fenoplasticitata a překrývající se znaky), proto byla velká část druhů popsána teprve nedávno až s nástupem molekulárních metod (Balajee *et al.* 2005; Hong *et al.* 2005; Samson *et al.* 2007; Hong *et al.* 2008; Yaguchi *et al.* 2010). Sekce je významná především z hlediska patogenity velkého počtu zástupců (Padhye *et al.* 1994; Guarro *et al.* 2002; Balajee *et al.* 2005; Vinh *et al.* 2009; Vinh *et al.* 2009). Druhy *Neosartorya* znehodnocují pasterizované potraviny díky jejich termorezistenci (Samson 1989). Některé druhy jsou též producenty významných mykotoxinů (Fujimoto *et al.* 1993; Samson *et al.* 2007) a nebo naopak látek, využívaných jako léčiva (Tomoda *et al.* 1994).

Situace kolem platných druhů je poměrně nepřehledná, ačkoliv většina typových položek byla sekvenována. V databázi GenBank jsou druhy často vedeny jen jako *Neosartorya* sp. Navíc je stejný kmen nezářídka uložen pod několika synonymními označeními v jiných zahraničních sbírkách. Proto jako pomůcku přikládám tabulku, kde jsem se snažil zhodnotit současný pohled na platnost, či neplatnost taxonů v sekci a uvádím i běžně se vyskytující synonyma typových položek. Pro popis nových druhů je určitým usnadněním i vypsaní přístupových čísel k sekvencím týkajícím se typových položek (Tab 3.3).

Mezi zkoumanými izoláty byly nalezeny 3 izoláty, které splňují kritéria nového druhu. Vztahy izolátů k dalším druhům v sekci jsou znázorněny na Obrázku 3.7. Ve všech případech se jedná o druhy, které netvoří teleomorfu. Jedná se tedy buď o druhy heterotalické, striktně anamorfní, nebo tvorba teleomorfy může vyžadovat speciální podmínky. Distribuce anamorfních/heterotalických druhů je také znázorněna na Obr. 3.7.

V současnosti se k rozlišení druhů v sekci *Fumigati* ukázalo použitelné využívat i maximální teploty, při kterých jsou druhy schopné růst (Balajee *et al.* 2007). Izolát CCM 8003 se od ostatních zahrnutých druhů liší schopností růst při 48 °C. Toho byl schopen již jen *A. fumigatus* (Tab. 3.4). Od nejbližších druhů se izolát CCM 8003 liší přítomností tzv. "noddind heads" (známých u *A. viridinutans*) (Obr. 3.8). *A. turcosus* má modrozelené kolonie, narozdíl od světle zelených u izolátu CCM 8003. Typový kmen *A. unilateralis* CBS 126.56 má ostnitě konidie narozdíl od hladkých konidií kmenu CCM 8003 (Obr. 3.9).



Obr. 3.8 *Aspergillus* sp. CCM 8003; detail tzv "noddind heads". Fotka vlevo (SEM; Alena Kubátová)

Tab 3.3 Platné druhy v sekci *Fumigati* (zahrnutý i taxony popsané po roce 1990, které byly synonymizovány)

druh	číslo typového kmenu	originální popis	Genbank accession number				
			<i>ITS</i>	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>RPB2</i>	<i>act</i>
<i>A. brevipes</i> G. Sm.	CBS 467.91; ATCC 16899; CBS 118.53; IFO 5821; IMI 16034; IMI 51494; NRRL 2439; WB 4772; IBT 22571; WB 4078; IBT 22572; KACC 41135	(Smith 1952)	EF669954	EF669812	EF669881	EF669742	DQ094849
<i>A. duricaulis</i> Raper & Fennell	CBS 481.65; ATCC 16900; IMI 172282; JCM 01735; IBT 23177; NRRL 4021; VKM F-3572; WB 4021; KACC 41137	(Raper et Fennell 1965)	EF669971	EF669827	EF669897	EF669758	DQ094854
<i>A. fumigatiaffinis</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	CBS 117186; KACC 41148; IBT 12703	(Hong <i>et al.</i> 2005)	AB299410	DQ094885	DQ094891	-*	DQ094865
<i>A. fumigatus</i> Fresen.	IMI 016152; Thom 118; QM 1981; WB 163; CBS 133.61; NRRL 163; ATCC 1022; LSHB Ac71; NCTC 982; KACC 41143	(Fresenius 1863)	EF669931	EF669791	EF669860	EF669719	-*
<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i> Raper & Fennell	CBS 487.65 ; NRRL 5109	(Raper and Fennell 1965)	EF669989	EF669845	EF669915	EF669776	DQ094857
<i>A. fumisynnematus</i> Y. Horie, Miyaji, Nishim., Taguchi & Udagawa	IFM 42277	(Horie et al. 1993)	AB185274	AB248076	AB259968	-	AB488769
<i>A. lentulus</i> Balajee & K.A. Marr	FH5; KACC 41940; NRRL 35552; IBT 27201	(Balajee et al. 2005)	EF669969	EF669825	EF669895	EF669756	DQ094873
<i>A. novofumigatus</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	CBS 117520; IBT 16806; KACC 41934	(Hong <i>et al.</i> 2005)	AB299411	DQ094886	DQ094893	-*	DQ094868
<i>A. turcosus</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	KACC 42091; IBT 27921	(Hong et al. 2008)	-	DQ534143	DQ534148	-	DQ534179
<i>A. unilateralis</i> Thrower	CBS 126.56; ATCC 16902; IFO 8136; IMI 062876; NRRL 577; QM 8163; WB 4366; WB 4779; IBT 3210; KACC 41140	(McLennan et al. 1954)	EF669997	EF669852	EF669923	EF669784	DQ094847
<i>A. viridinitans</i> Ducker & Thrower	CBS 127.56; ATCC 16901; IMI 062875; NRRL 4365; WB 4081; WB 4782; WB 4365; KACC 41142	(McLennan <i>et al.</i> 1954)	EF661280	EF661252	EF661266	EF661238	DQ094862
<i>N. assulata</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	KACC 41691; IBT 27911	(Hong <i>et al.</i> 2008)	-	DQ114123	DQ114131	-	DQ534189

<i>N. aurata</i> (Warcup) Malloch & Cain	CBS 466.65; ATCC 16894; IFO 8783; IMI 075886; NRRL 4378; QM 7860; WB 4378; IBT 3028	(Raper et Fennell 1965)	EF669979	EF669835	EF669905	EF669766	DQ534112
<i>N. aureola</i> (Fennell & Raper) Malloch & Cain	CBS 105.55; ATCC 16896; IFO 8105; IMI 061451; MUCL 13579; NRRL 2244; QM 1906; WB 2244; IBT 3027; KACC 41204	(Fennell et Raper 1955)	EF669950	EF669808	EF669877	EF669738	DQ094861
= <i>N. indohii</i> Y. Horie	CBM-FA-0934; IFM 52113	(Horie et al. 2003)	-	AB488757	AB488765	-	AB488774
<i>N. australensis</i> Samson, Hong & Varga	CBS 112.55; IMI 061450; NRRL 2392; IBT 3021; WB 2392; Warcup SA14	(Samson et al. 2007)	EF669953	EF669811	EF669880	EF66974	DQ534141
<i>N. coreana</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	CBS 117059; KACC 41659; NRRL 35590; IBT 24945	(Hong et al. 2006)	AB299414	AY870758	AY870718	-	DQ534116
<i>N. denticulata</i> Samson, S.B. Hong & Frisvad	CBS 652.73; KACC 41183	(Hong et al. 2008)	-	DQ114125	DQ114133	-	DQ534181
<i>N. fennelliae</i> Kwon-Chung & S.J. Kim	AF4 = CBS 599.74 = NRRL 5535 = ATCC 24326 = KACC 41150 (A); AF5 = CBS 598.74 = NRRL 5534 = ATCC 24325 = KACC 41125 (a)	(Kwon-Chung et Kim 1974)	EF669995 EF669994	EF669850 EU014108	EF669921 EF669920	EF669782 EF669781	DQ114128 DQ534121
? = <i>N. otanii</i> Takada, Y. Horie & Abliz	CBM-FA-912 (A); CBM-FA-913 (a) - jen sušená položka	(Takada et al. 2001)	-*	-*	-*	-*	-*
<i>N. fischeri</i> (Wehmer) Malloch & Cain	CBS 544.65; ATCC 1020; DSM 3700; IMI 211391; NRRL 181; QM 1983; Thom 4651.2; WB 181; IBT 3018; KACC 41182	(Wehmer 1907)	EF669936	EF669796	EF669865	EF669724	DQ094863
<i>N. galapagensis</i> Frisvad, S.B. Hong & Samson	CBS 117522; KACC 41935; IBT 16756	(Hong et al. 2008)	-	DQ534145	DQ534151	-	DQ534190
<i>N. glabra</i> (Fennell & Raper) Kozak. 1989	CBS 111.55; ATCC 16909; IFO 8789; IMI 061447; NRRL 2163; QM 1903; WB 2163; KACC 41617	(Fennell et Raper 1955)	EF669948	EU014107	EU014120	EF669736	DQ534183
<i>N. hiratsukae</i> Udagawa, Tsub. & Y. Horie	NHL 3008; CBS 294.93; NRRL 20819; IFM 47035; KACC 41127	(Udagawa et al. 1991)	AB185257	AF057324	AY870699	-*	DQ534184
<i>N. multiplicata</i> Yaguchi, Someya & Udagawa	PF 1154; CBS 646.95; IBT 17517; IFM 46955	(Yaguchi et al. 1994)	-	DQ114129	DQ114137	-	DQ534185
<i>N. nishimurae</i> Takada, Y. Horie & Abliz	CBM-FA-910 (A); CBM-FA-911 (a) - jen sušená položka	(Takada et al. 2001)	-	-*	-*	-	-*
<i>N. papuensis</i> Samson, Hong & Varga 2007	CBS 841.96; IBT 27801	(Samson et al. 2007)	EU220280	AY870738	AY870697	-	DQ534140
<i>N. paulistensis</i> Y. Horie, Miyaji &	CBM-FA-0690; IFM 46585; CBS	(Horie et al. 1995)	-	AB488758	AB488766	-	AB488775

Nishim.	114216 (nejspíš zaměněný kmen dle (Yaguchi et al. 2010))								
? = <i>N. laciniosa</i> S.B. Hong, Frisvad & Samson	CBS 117721; NRRL 35589; KACC 41657	(Hong et al. 2006)	AB299413	AY870756	AY870716	-*	DQ534126		
<i>N. pseudofischeri</i> S.W. Peterson	NRRL 20748; CBS 208.92	(Peterson 1992)	EF669946	EF669805	EF669874	EF669734	DQ534187		
<i>N. quadricincta</i> (E. Yuill) Malloch & Cain	CBS 135.52; ATCC 16897; IMI 048583; NRRL 2154; QM 6874; WB 2154	(Yuill 1953)	EF669947	EF669806	EF669875	EF669735	DQ534132		
= <i>N. primulina</i> Udagawa, Toyaz. & Tsub	CBM-SUM-3014; CBS 253.94	(Udagawa et al. 1993)	-	DQ534158	DQ534170	-	DQ534128		
? = <i>N. tsurutae</i> Y. Horie 2003	CBM-FA-0933; IFM 52114	(Horie et al. 2003)	-	AB488760	AB488768	-	AB488777		
<i>N. shendawei</i> Yaguchi, Abliz & Y. Horie	CBM-FA-0958; IFM 57611; NBRC 106417	(Yaguchi et al. 2010)	-	AB488754	AB488762	-	AB488771		
<i>N. spathulata</i> Takada & Udagawa	NHL 2948 = CBS 408.89 = IMI 308593 = NRRL 20549 = KACC 41174 (A); NHL 2949 = CBS 409.89 = IMI 308593 = NRRL 20550 = KACC 41131 (a)	(Takada et Udagawa 1985)	EF669943 EF669944	EF669803 EF669804	EF669872 EF669873	EF669731 EF669732	DQ534138 DQ534139		
<i>N. spinosa</i> (Raper & Fennell) Kozak.	CBS 483.65; ATCC 16898; IFO 8782; IMI 211390; NRRL 5034; WB 5034; IBT 3022; KACC 41162	(Raper et Fennell 1965)	EF669988	EF669844	EF669914	EF669775	DQ094869		
= <i>N. botucatensis</i> Y. Horie, Miyaji & Nishim.	CBM-FA-0672; CBS 11421; IFM 46586	(Horie et al. 1995)	-	AY870763	AY870723	-	-		
? = <i>N. takakii</i> Y. Horie, Abliz & K. Fukush.	CBM-FA-884 (jen sušená položka)	(Horie et al. 2001)	-	-	-	-	-		
<i>N. stramenia</i> (R.O. Novak & Raper) Malloch & Cain	CBS 498.65; ATCC 16895; IFO 9611; IMI 172293; WB 4652; NRRL 4652	(Raper et Fennell 1965)	EF669984	EF669840	EF669910	EF669771	DQ534188		
<i>N. sublevispora</i> Someya, Yaguchi & Udagawa	PF 1207; IFM 53598	(Someya et al. 1999)	-	AB488759	AB488767	-	AB488776		
= <i>N. ferenczii</i> Varga & Samson	CBS 121594; IBT 27813; NRRL 4179; Warcup SA57	(Samson et al. 2007)	EF669977	EF669833	EF669903	EF669764	EU220287		
<i>N. tatenoi</i> Y. Horie, Miyaji, Koji Yokoyama, Udagawa & Camp.-Takagi	CBM-FA-0022; CBS 407.93; IBT 21589	(Horie et al. 1992)	-*	DQ114130	DQ114139	-*	DQ534135		
= <i>N. delicata</i> H.Z. Kong	CBS 101754; HMAS 71159; AS 3.4697	(Kong 1997)	-	DQ114124	DQ114132	-	DQ534117		
<i>N. tsunodae</i> Yaguchi, Abliz & Y. Horie	CBM-FA-0950; IFM 57609; NBRC 106416	(Yaguchi et al. 2010)	-	AB488755	AB488763	-	AB488772		

<i>N. udagawae</i> Y. Horie, Miyaji & Nishim.	CBM-FA-0703 = KACC 41155 = CBS 114217 (A); CBM-FA-0702 = KACC 41155 = CBS 114218 (a)	(Horie <i>et al.</i> 1995)	AB250782 AB250781	AB248303 AB248302	AY689372 AY689373	- -	DQ094859 DQ094858
<i>N. warcupii</i> Peterson, Varga & Samson	NRRL 35723; A-4008	(Samson <i>et al.</i> 2007)	EU220279	EU220283	EU220284		EU220286

pozn. 1) označení (A) a (a) se vztahuje k heterotalickým druhům, které jsou definovány na základě biologického konceptu druhu (teleomorfy je dosaženo párováním kompatibilních kmenů)

pozn. 2) rod *Neosartorya* byl popsán v roce 1972 (Malloch et Cain 1972), proto byly druhy popsána před tímto rokem popsány jen pod jménem anamorfy, příp. jako *A. ficheri* var. xy

* K dispozici je sekvence netypového kmenu

Kmeny z předkládané práce a publikované literatury, které splňují status samostatného druhu

taxon	číslo kmenu	publikace	Accession numbers				
			<i>ITS</i>	<i>benA</i>	<i>caM</i>	<i>rpb2</i>	<i>act</i>
<i>Neosartorya</i> sp. 1	NRRL 185; QM 1984; Thom 5136.11; WB 185 (a NRRL 3535; QM 1984; Thom 5136.11; WB 185)	(Peterson 2008)	EF669940	EF669800	EF669869	EF669728	-
<i>Neosartorya</i> sp. 2	NRRL 1283	(Peterson 2008)	EF669929	EF669790	EF669858	EF669717	-
<i>Neosartorya</i> sp. 3	NRRL 4175	(Peterson 2008)	EF669976	EF669832	EF669902	EF669763	-
<i>Neosartorya</i> sp. 4	NRRL 179	(Peterson 2008)	EF669934	EF669794	EF669863	EF669722	-
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fumigati</i> -1	CCM 8003	<u>diplomová práce</u>	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fumigati</i> -2	CMF ISB 2151 = F42	<u>diplomová práce</u>	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Fumigati</i> -3	CMF ISB 2152 = F43	<u>diplomová práce</u>	+	+	+	+	-

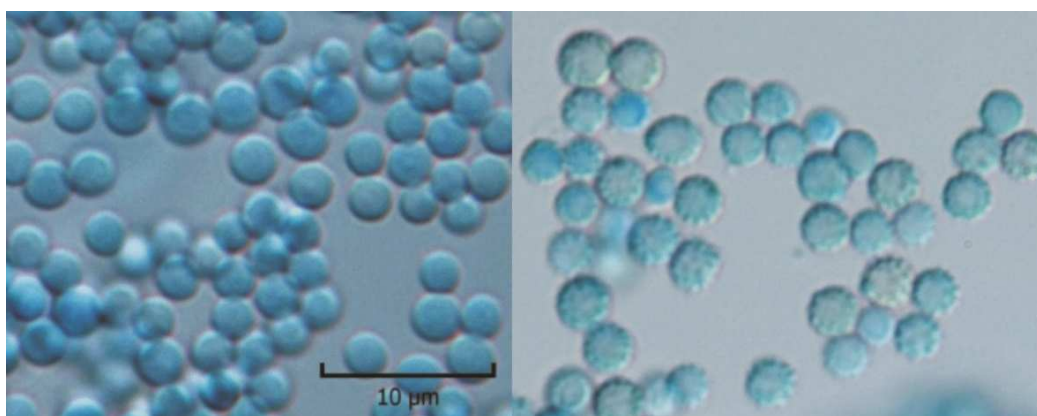
+ sekvence k dispozici, zatím bez GenBank accession numbers



Fig. 3.7 Vztahy mezi nepopsanými taxony v sekci *Fumigati* získané v této práci (tučně) a ostatními druhy v sekci *Fumigati*. Fylogenetický strom založený na genu *caM*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování. Sekvence izolátů označených tučně pocházejí z této práce, ostatní sekvence byly získány z práce Peterson (2008). Plné kroužky značí heterothallické druhy, prázdné kroužky druhy, u nichž není známa teleomorfa. Ostatní druhy jsou homothallické.

Tab. 3.4 Teplotní maxima vybraných druhů sekce *Fumigati*

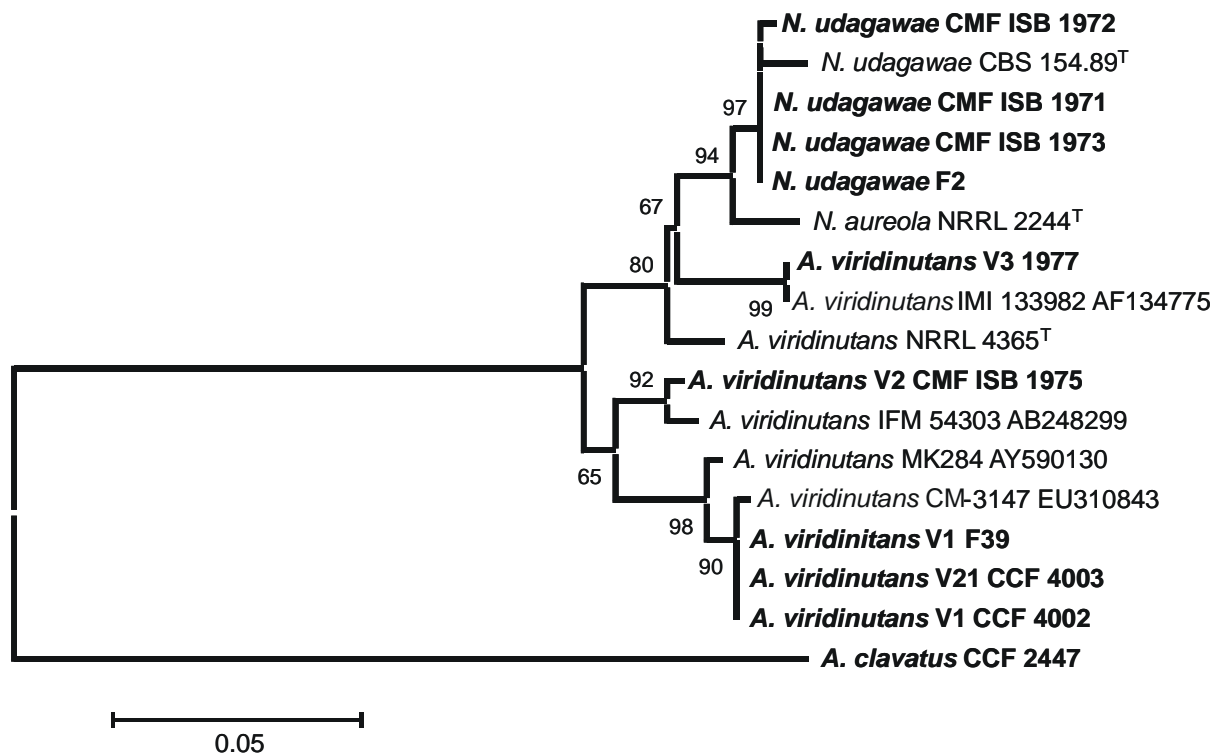
druh (počet test. kmenů)	42 °C	45 °C	48 °C	50 °C
<i>A. fumigatus</i> (3)	+	+	+	+
<i>A. lentulus</i> (3)	+	+	-	-
<i>N. hiratsukae</i> (3)	+	-	-	-
<i>N. udagawae</i> (3)	+	+/-	-	-
<i>A. fumigatiaffinis</i> (1)	+	+/-	-	-
<i>A. viridinutans</i> (3)	+	+/-	-	-
<i>A. novofumigatus</i> (1)	+	+	-	-
<i>A. unilateralis</i> CBS 126.56	+	+/-	-	-
CCM 8003 a NRRL 179	+	+	+	-



Obr. 3.9 Detail konidii kmenu CCM 8003 (vlevo) a *A. unilateralis* CBS 126.56^T (vpravo).

Tři odlišné linie splňující kritéria druhu u *Aspergillus* byly nalezeny mezi izoláty *A. viridinutans* z půdy. Druh *A. viridinutans* byl v minulosti podroben molekulární analýze (Varga *et al.* 2000), ale byl ponechán jako široký druh. Některé izoláty mají sekvence více podobné heterothalické *N. udagawae* a homothalické *N. aureola* než sekvenci typového kmene *A. viridinutans* NRRL 4365. Obecně se dá mezi izoláty nazvanými zde jako *A. viridinutans* vysledovat neostré kontinuum v genetických distancích od kmenů geneticky podobných *N. aureola*, přes kmeny více, či méně podobné typovému kmenu *A. viridinutans*, až po izoláty vzdálené od obou těchto typových položek. Pro rod *Aspergillus* je to poměrně netypické. Mezi druhy většinou existují jasné distance při používání genů s dostatečným rozlišením jako *benA* a *caM*.

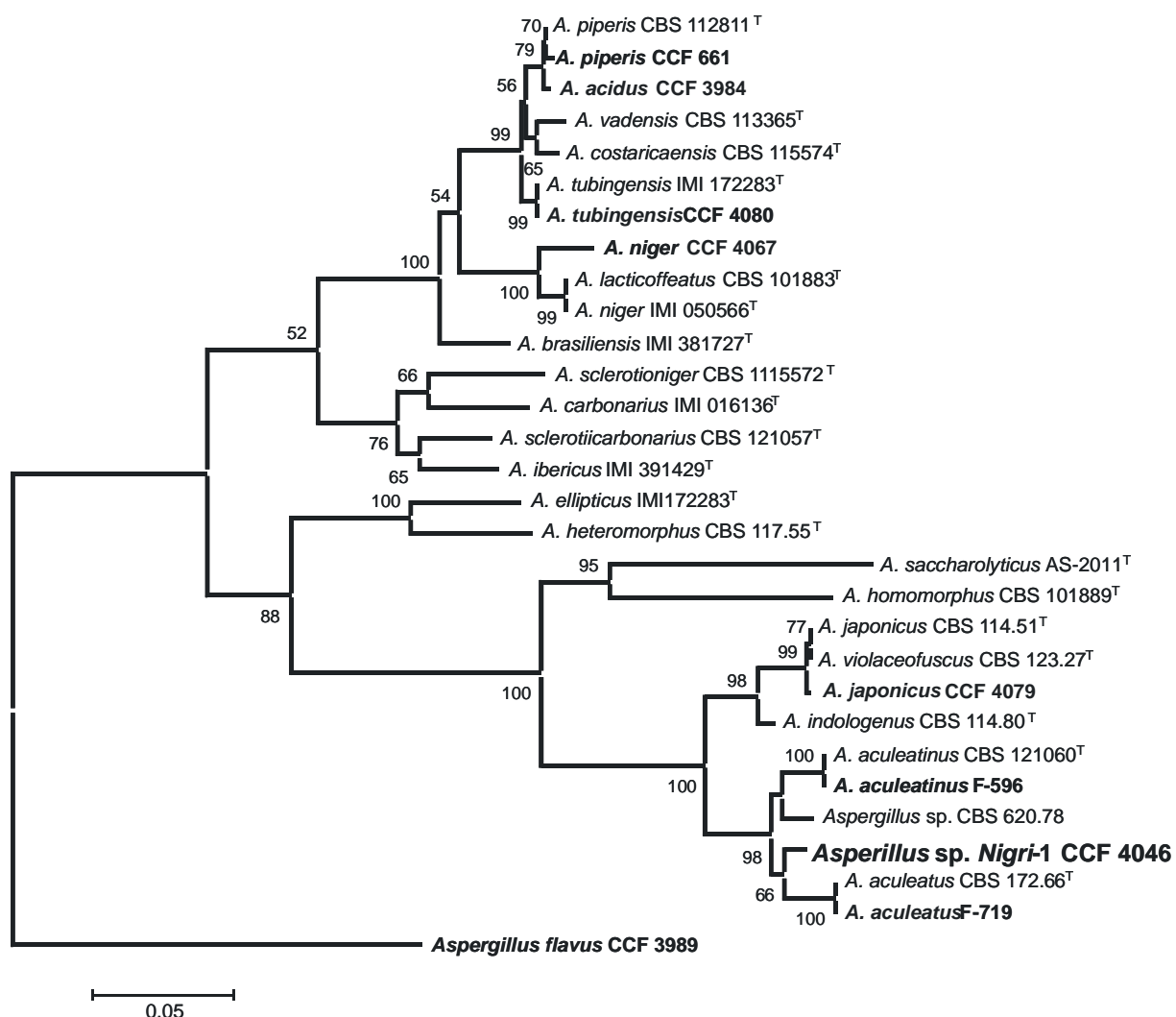
Vztahy mezi izoláty *A. viridinutans* zkoumanými v této práci, typovými kmeny *A. viridinutans*, *N. aureola* a *N. udagawae* jsou znázorněny na Obr. 3.10.



Obr. 3.10 Vztahy studovaných izolátů *A. viridinutans* a *N. udagawae* vzhledem k typovým kmenům a dalším kmenům, jejichž sekvence jsou uloženy v databázi GenBank. Fylogenetický strom založený na genu *benA*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování. Sekvence izolátů označených tučně pocházejí z této práce.

3.1.2.3 sekce *Nigri*

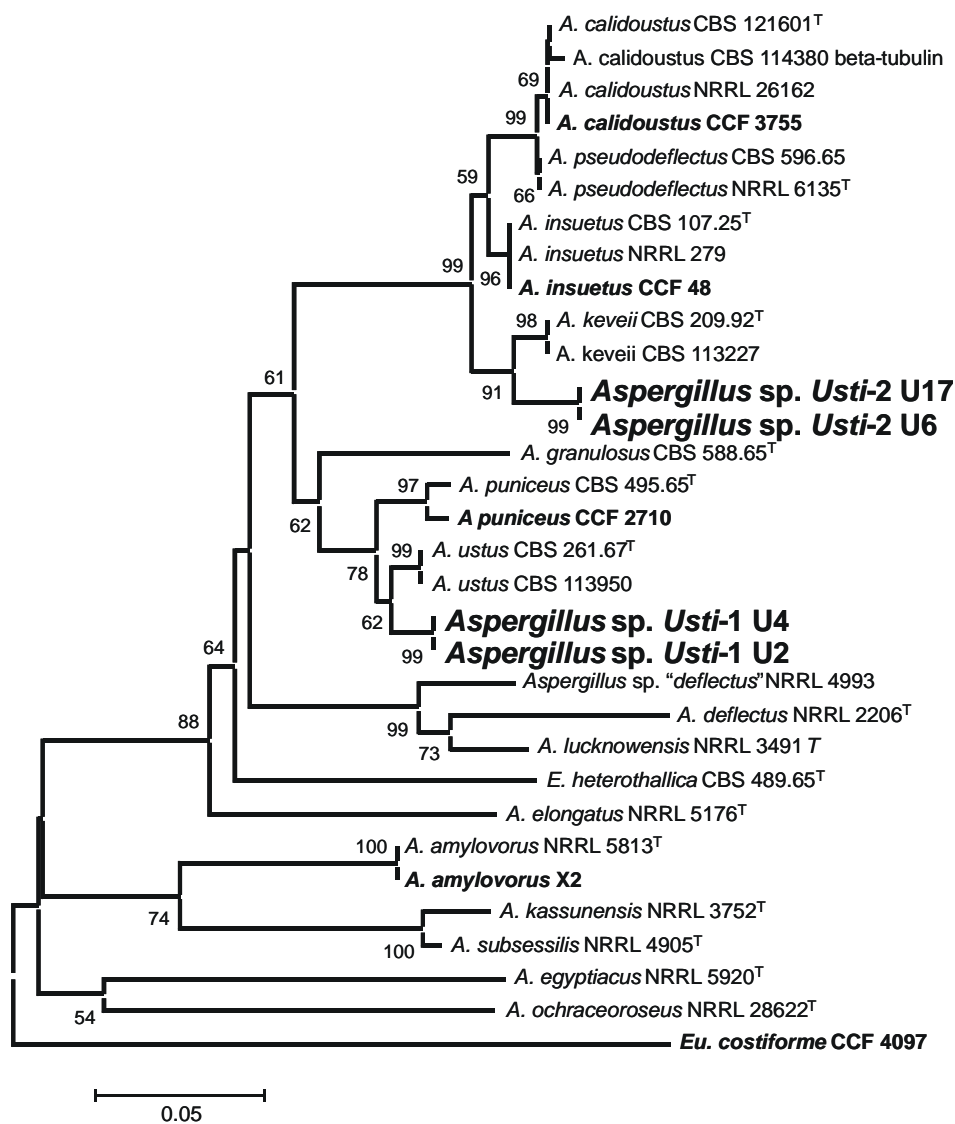
Sekce *Nigri* patří vůbec k nejvýznamnějším sekcím z hlediska produkce mykotoxinů, zejména ochratoxinu A (Schuster et al. 2002). *A. niger* a *A. tubingensis* jsou také významně patogenní druhy (Balajee et al. 2009). Významný je ale i biotechnologický profit z fermentace potravin, nápojů, produkce organických kyselin a enzymů (Yokotsuka et Sasaki 1998; Abarca et al. 2004). V sekci je morfologie v popisu nových druhů upozaděna, koncept recentně popsanych druhů je založen především na kombinaci molekulárních dat (*caM* a *benA*) v kombinaci s produkovanými extrolyty (Samson et al. 2004; de Vries et al. 2005; Varga et al. 2007; Noonim et al. 2008; Perrone et al. 2008; Mogensen et al. 2009; Sørensen et al. 2011; Varga et al. 2011). Vztah izolátu CCF 4046 k popsaným druhům je znázorněn na Obr. 3.11.



Obr. 3. 11 Pozice izolátu CCF 4046 vzhledem k ostatním druhům v sekci *Nigri*. Fylogenetický strom založený na genu *caM*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování.

3.1.2.4 Sekce *Usti*

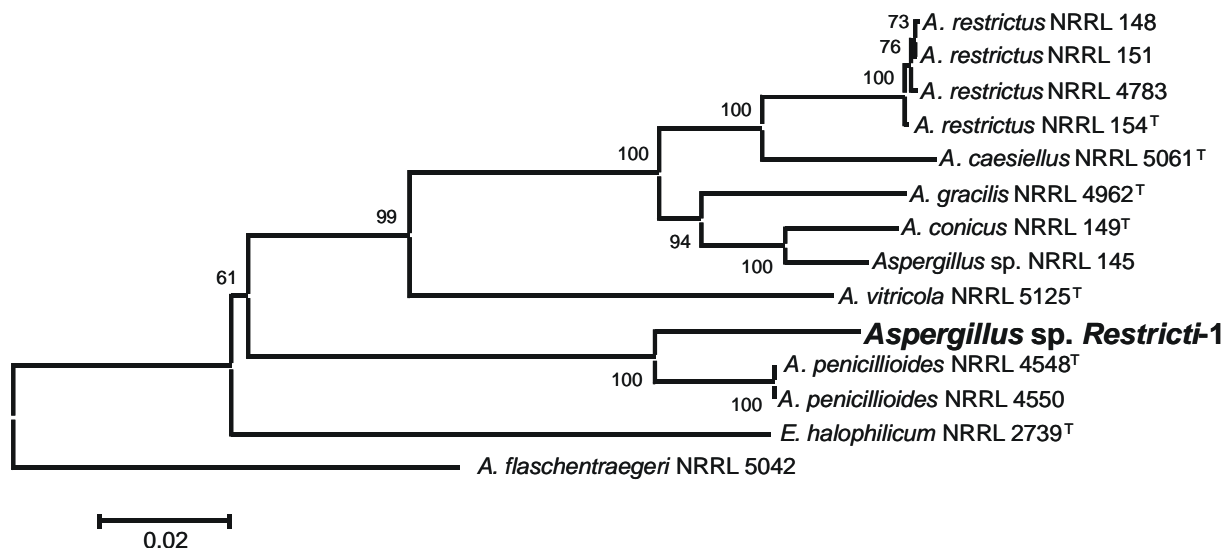
Zástupci sekce *Usti* jsou běžně izolovaní z potravin, ovzduší a půdy. Ekonomický význam druhů z této sekce je ale v porovnání s výše uvedenými sekcemi minimální (Samson *et al.* 2011). Významným patogenem imunosuprimovaných pacientů je *A. calidoustus* (Varga *et al.* 2008; Balajee *et al.* 2009). Mezi zkoumanými izoláty byly nalezeny dva nepopsané druhy. První z nich je sesterským druhem *A. ustus* a je reprezentován dvěma izoláty. Druhý druh tvoří sesterskou linii k nedávno popsánému *A. keveii* a je reprezentován dokonce 12 izoláty (Tab 3.1). Tyto příbuzenské vztahy jsou dobře patrné na Obrázku 3. 12.



Obr. 3.12 Vztahy dvou nepopsaných druhů ze sekce *Usti* vzhledem k ostatním druhům v sekci. Fylogenetický strom založený na genu *caM*; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování.

3.1.2.5 Sekce *Restricti*

Sekce *Restricti* obsahuje sedm popsaných druhů (Peterson 2008). Jedná se o málo studovanou skupinu halofilních organismů s malým ekonomickým významem pro člověka, ačkoliv regionálně může působit škody na uskladněných obilninách (Raper et Fennell 1965). Izolát CCF 3112 tvoří nepopsanou sesterskou větev k *A. penicillioides* (Obr. 3.13).



Obr. 3.13 Pozice izolátu CCF 3112 vzhledem k sedmi popsaným druhům v sekci *Restricti*. Fylogenetický strom založený na kombinaci genů *caM*, *benA* a ITS oblasti; metoda Minimum Evolution (MEGA5); bootstrap 300 opakování.

3.1.3 Diversita klinických izolátů *Aspergillus* z českých pacientů

Z více než 200 klinických izolátů zahrnutých v datasetu byly na základě kritérií pro každou klinickou jednotku zvlášť (De Pauw et al. 2008) (Deshazo 2009; Smith et Denning 2011) (Gupta et al. 2001; Summerbell et al. 2005; McLeod 2009; Vennewald et Klemm 2010) vybrány izoláty reprezentující potvrzené, nebo pravděpodobné původce onemocnění českých pacientů. Nejčastějšími onemocněními působených rodem *Aspergillus* byla invazivní aspergilóza, onychomykóza a otitis externa.

Druhovú diverzitu mezi 178 vybranými izoláty čítala 33 druhů a je do hloubky diskutována v manuskriptu zahrnutém v sekci Přílohy.

3.2 β -tubulinové paralogy u rodu *Aspergillus*

Při amplifikaci genu *benA* běžně používanými kombinacemi primerů pro říši Fungi (T1/T2; T10/Bt2b a Bt2a/Bt2b) byl u různých druhů *Aspergillus* amplifikován fragment genu, který byl poměrně divergentní od genu *benA*. Nejpodobnější sekvence při hledání podobností na serveru BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) patřily buď jiným druhům *Aspergillus* a odporovaly datům z jiných lokusů, nebo dokonce vzdáleným taxonům. Díky datům z genomických projektů (Tab 1.3) a práci Peterson (2008), kde se autor potýkal s podobným problémem u sekce *Nigri*, *Nidulantes* a *Usti*, se povedlo identifikovat, že se jedná o gen *tubC*. Autor dále vyslovil domněnku, že se oba geny dají rozpoznat na základě počtu intronů.

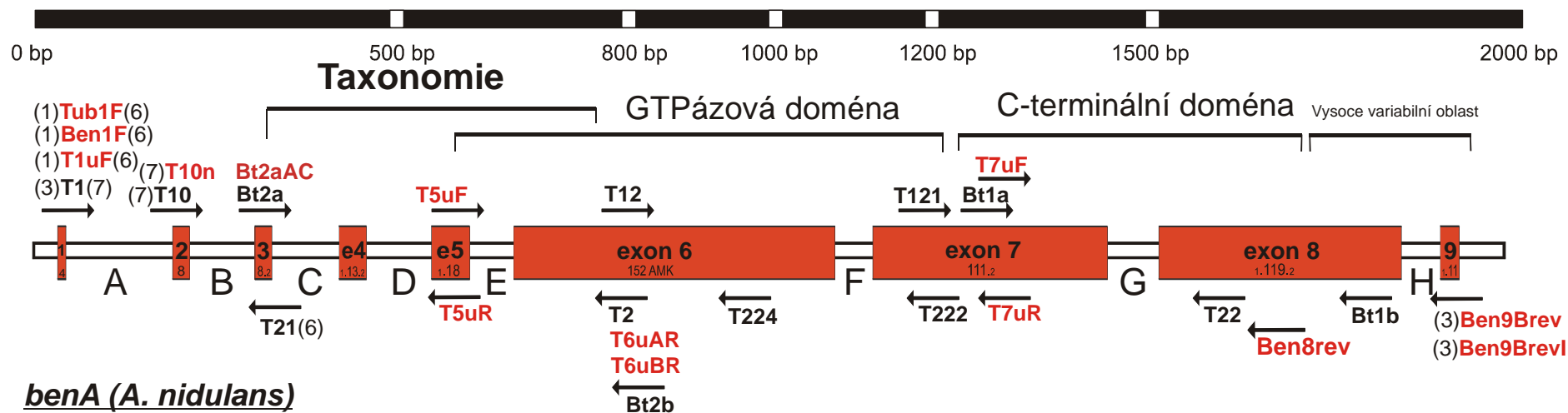
Rozsáhlost problematiky β -tubulinových paralogů jsme se rozhodli zkoumat pomocí amplifikace fragmentu u co největšího počtu zástupců *Aspergillus* reprezentujících druhovou diverzitu rodu. Na podkladu genomických projektů byly navrženy primery specifické pro každý paralog. Oba geny byly zpočátku rozlišovány na základě divergencí od aminokyselinové sekvence *benA* genu *A. nidulans*, u kterého byl gen *benA* i paralog *tubC* pro rod *Aspergillus* poprvé identifikován. Další možnosti, jak oba paralogy odlišit byly zjištěny až po amplifikaci fragmentu *tubC* u širšího spektra druhů.

3.2.1 Nově navržené primery a jejich specifita k β -tubulinovým paralogům

Na základě genu *benA* a *tubC* u druhů se známým genomem, *A. fumigatus*, *N. fischeri*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. terreus*, *A. flavus* a *A. sojae*, byly navrženy primery specifické i nespecifické k oběma paralogům, jejichž sekvence a poloha v genech je vyznačena na Obr. 3.14. Tyto primery byly dále vylepšeny na základě přibývajících množství dat z osekvenovaných genů. Specifita definitivních verzí těchto primerů je diskutována v Tabulce 3.5.

Tab. 3.5 Specifita nově navržených primerů k paralogům *benA* a *tubC*

Ben1F	<i>benA</i> specifický
Tub1F	<i>tubC</i> specifický v sekcích <i>Fumigati</i> , <i>Clavati</i> , <i>Cervini</i> , <i>Circumdati</i> and <i>Nigri</i> ; u druhů, které nemají paralog <i>tubC</i> amplifikuje často gen <i>benA</i>
T10n	vylepšený primer T10 <i>benA</i> specifický, řeší i problém T10 primeru s dvojitými produkty
Bt2aAC	vylepšený primer Bt2a více <i>benA</i> specifický než Bt2a primer, ale u některých druhů sekce <i>Nigri</i> jsou patrné dva produkty
T6uaR a	alternativy k existujícím primerům Bt2b a T2
T6uBR	nespecifické primery, který jsou navrženy přímo pro rod <i>Aspergillus</i> (narozdíl od výše uvedených)
Ben8rev	<i>benA</i> specifický
T5uF, T5uR; T7uF; T7uR	primery použitelné pro amplifikaci, ale i sekvenaci u dlouhých produktů
Ben9Brev; Ben9BrevI	<i>benA</i> specifické, v kombinaci s primerem Ben1F jsou schopné amplifikovat kompletní gen <i>benA</i> u sekcí <i>Nidulantes</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Nigri</i> , <i>Circumdati</i> , <i>Candidi</i> , <i>Restricti</i> , <i>Cremeri</i>



FORWARD PRIMERY:

T1uF MATGCGTGARATYGTRWGT (19)
Ben1F AATGCGTGARATYGTATGT (19)
Tub1F CATGCGTGARATYGTRAGT (19)
T6uAF AAYAAYTGGGCMAAGGGTCA (20)
T6uBF GARCCIGGIACIATGGA (17)
T10n TCCAGACTGGTCAGTGTGTAA (21)
Bt2aAC GGTAACCAAATAGGTGCCGCTTTC (24)

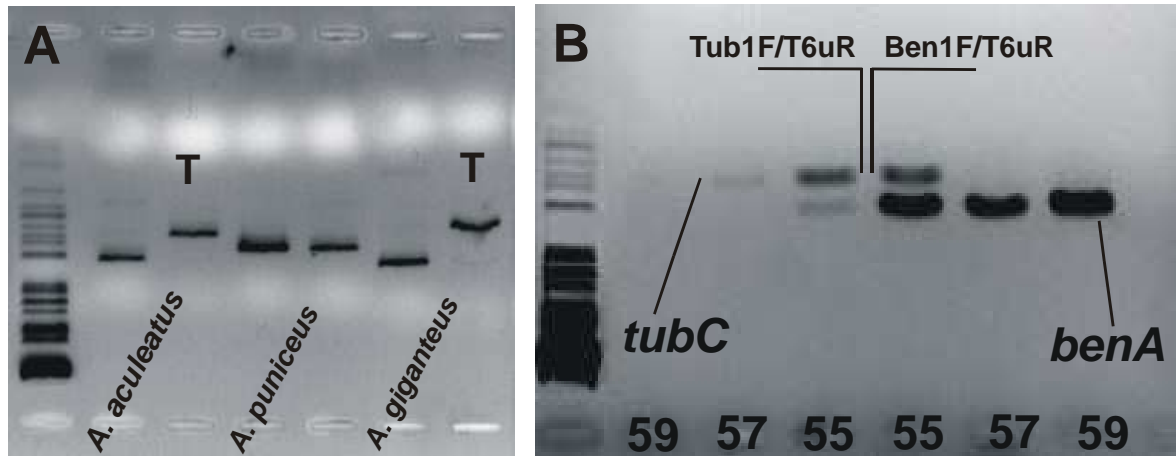
REVERZ PRIMERY:

T6uBR TCCATIGTICCGGYTC (17)
T6uAR TGACCCCTTKGCCARTTRTT (20)
Ben8rev CCRCGGGGRGGRATGGAGCASAG (23)
Tub8rev CATYTTTCAGGCCCYTKGGWGGCA (23)
Ben9Brev CTCCTCCTCRVSRCTG (16)
Ben9BrevI CTCCTCCTCRISICTG (16)

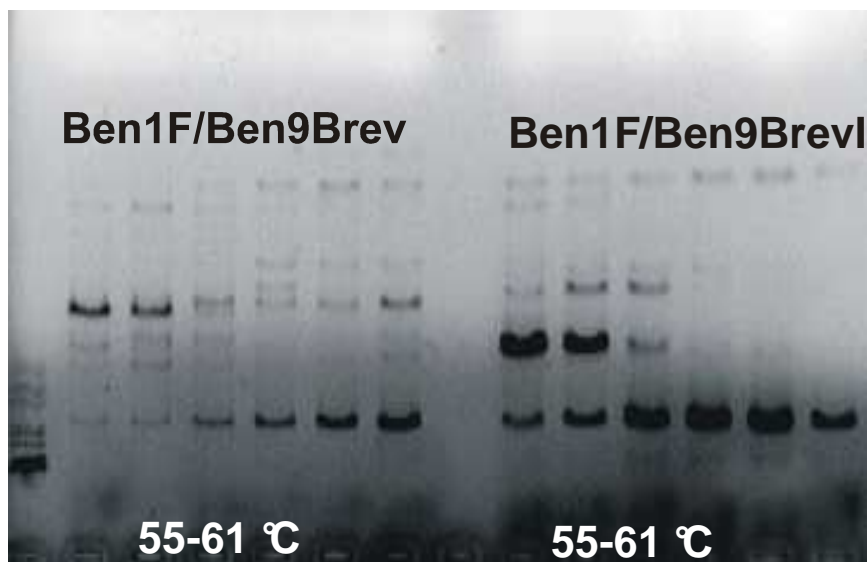
Obr. 3.15 Sekvence a poloha nově navržených primerů zaznamenaná v genu *benA* *A. nidulans*. Primery označené červěně pocházejí z této práce. Závorka před nebo za názvem primeru vyznačeném v místě jeho nasedání na gen značí přesah sekvence primeru (v bp) do intronu. Introny jsou značeny písmeny A-H, exony čísly 1-9. Úsek genu označený nápisem "TAXONOMIE" je oblast genu používaná v taxonomických studiích (odpovídá fragmentu amplifikovanému primery Bt2a a Bt2b).

Pomocí nejrůznějších kombinací těchto primerů se povedlo charakterizovat celý gen *benA* u zástupců většiny sekcí. Gen *tubC* se povedlo charakterizovat v úseku odpovídajícímu prvním šesti exonům genu *benA* *A. nidulans* (Obr. 3.15), který ale obsahuje taxonomicky významný úsek genu.

U některých druhů bylo pro zvýšení specifity primerů nutno měnit teplotu annealingu (Obr. 3.16 a 3.17), případně i složení reakční směsi (viz metodika).



Obr. 3.16 Amplifikace fragmentů genů *benA* a *tubC* pomocí kombinací primerů Ben1F/T6uR a Tub1F/T6uR. U každého ze tří druhů na obr. vlevo (A) byly použity obě kombinace primerů. Vlevo pro každý druh kombinace Ben1F/T6uR (*benA* specifická), vpravo Tub1F/T6uR (*tubC* specifická). Symbol "T" nad fragmentem značí, že se jedná o fragment genu *tubC*. U *A. puniceus* (sekce *Usti*) se oběma kombinacemi amplifikoval gen *benA*. V některých případech nebyly kombinace primerů dostatečně specifické pro jeden paralog (B) při teplotě annealingu 55 °C. Zvýšením teploty annealingu byl získán fragment příslušného genu.



Obr. 3.17 Amplifikace kompletního genu *benA* u *A. restrictus* CCF 3364 pomocí kombinací primerů uvedených na obrázku v teplotním gradientu. Patrný je rozdíl v chování degenerovaného primeru Ben9Brev a primeru Ben9BrevI, kde byly degenerované pozice nahrazeny inosinem. U kombinace Ben1F/Ben9BrevI se povedlo při teplotě annealingu asi 60 °C amplifikovat celý gen *benA*.

3.2.2 Architektonika paralogů *benA* a *tubC*

Jak bylo uvedeno výše, povedlo se gen *benA* amplifikovat v kompletní podobě u řady druhů *Aspergillus*. Napříč zkoumanými sekcemi bylo nalezeno sedm různých typů uspořádání intronů a exonů (viz Obr. 3.18). Brzy bylo jasné, že uspořádání intronů nemůže být objektivním znakem k obecnému rozlišení genů *benA* a *tubC* u rodu *Aspergillus*. U dvou sekcí (*Nidulantes* a *Restricti*) byl navíc pozorován rozdíl v počtu intronů mezi některými jejich zástupci. V sekcích *Flavipedes* a *Usti* se nepovedlo amplifikovat gen *benA* až do konce. Sekvence u těchto sekcí byla získána až po místo nasedání primeru Ben8rev. Primer Ben9Brev a Ben9BrevI mají přesah do intronu (na Obr. 3.15 označený jako H), a proto je možné, že tento intron u těchto dvou sekcí chybí. Tomu odpovídá i situace u blíže příbuzné sekce *Terrei*. Tyto dvě sekce jsou ve stromu (Obr. 3.18) označeny oranžovým rámem.

Protože gen *tubC* byl amplifikován jen u některých druhů a navíc jen jeho část, nebylo možné studovat architektoniku rozložení intronů v plném rozsahu. Na základě těchto dat a díky kompletním sekvencím z genomů byly nalezeny minimálně čtyři různé typy uspořádání intronů (Obr. 3.19). U žádného ze studovaných druhů nebyl nalezen intron specifický pro paralog *tubC*. Gen *tubC* u daného druhu měl vždy méně, nebo stejný počet intronů (*A. terreus*) jako gen *benA*.

Na úrovni fragmentu BT2 (odpovídá kombinaci primerů Bt2a a Bt2b) tedy není možné rozlišit u řady druhů, zda se jedná o jeden, či druhý paralog. Stejný počet intronů v BT2 nacházíme u obou paralogů v sekcích *Cicumdati* (3), *Flavi* (3), *Terrei* (3) a u některých druhů sekce *Nidulantes* (2). Naproti tomu jeden ze tří intronů chybí u paralogu *tubC* v sekcích *Fumigati*, *Clavati*, *Nigri* a některých druhů sekce *Nidulantes* (Obr. 3.19)..

3.2.3 Gen *tubC* není přítomen u všech druhů *Aspergillus*

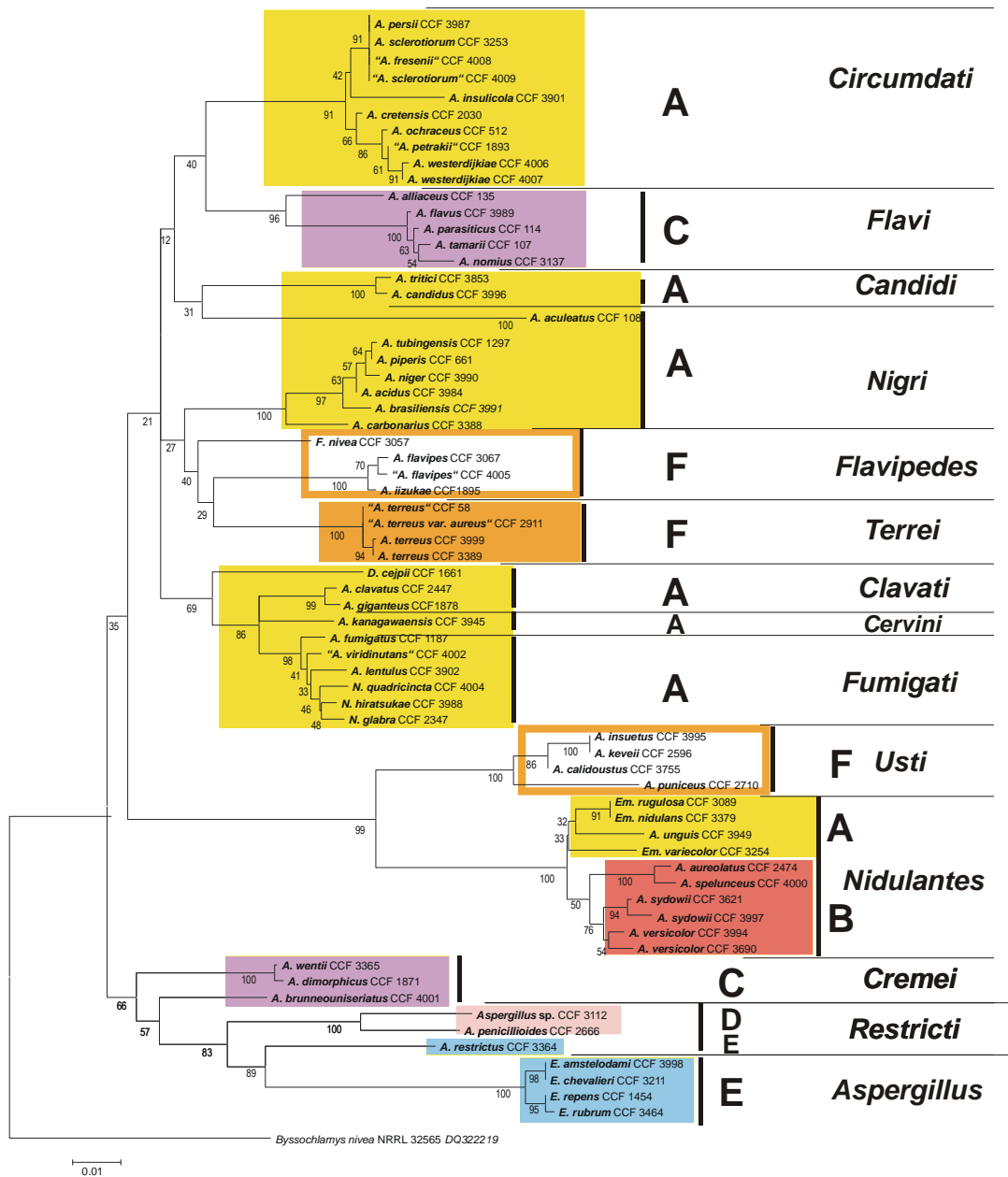
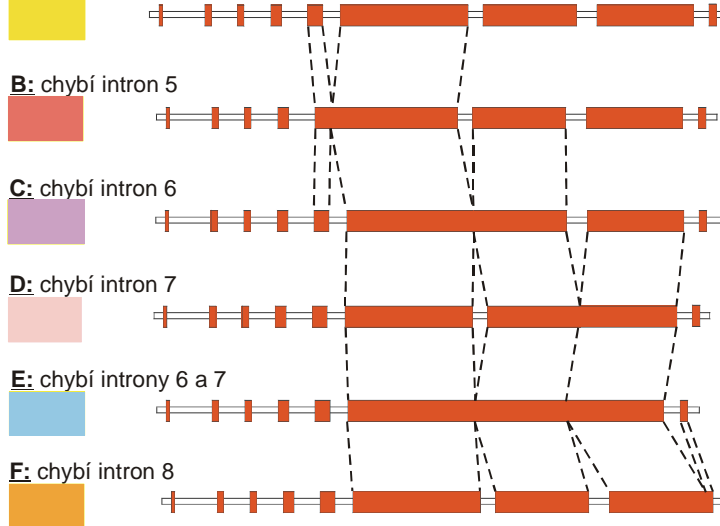
Amplifikace genu *tubC* nebyla úspěšná u řady druhů. Na základě prohledávání genomů bylo zjištěno, že gen *tubC* skutečně nemusí být přítomen. Zářným příkladem může být sekce *Nigri*, kde v genomech *A. niger* a *A. carbonarius* není gen *tubC* přítomen, ale u druhu *A. aculeatus* ze stejné sekce ano. Podobně se v této práci povedlo amplifikovat gen *tubC* u dalších tří druhů ze sekce *Nigri*, u jiných ale byly pokusy neúspěšné. Další sekce, kde pravděpodobně paralog *tubC* chybí jsou sekce *Candidi*, *Usti*, *Cremeri*, *Restricti* a *Aspergillus*. Podobně jako u sekce *Nigri* se dařilo amplifikovat gen *tubC* jen u některých zástupců sekce *Nidulantes*.

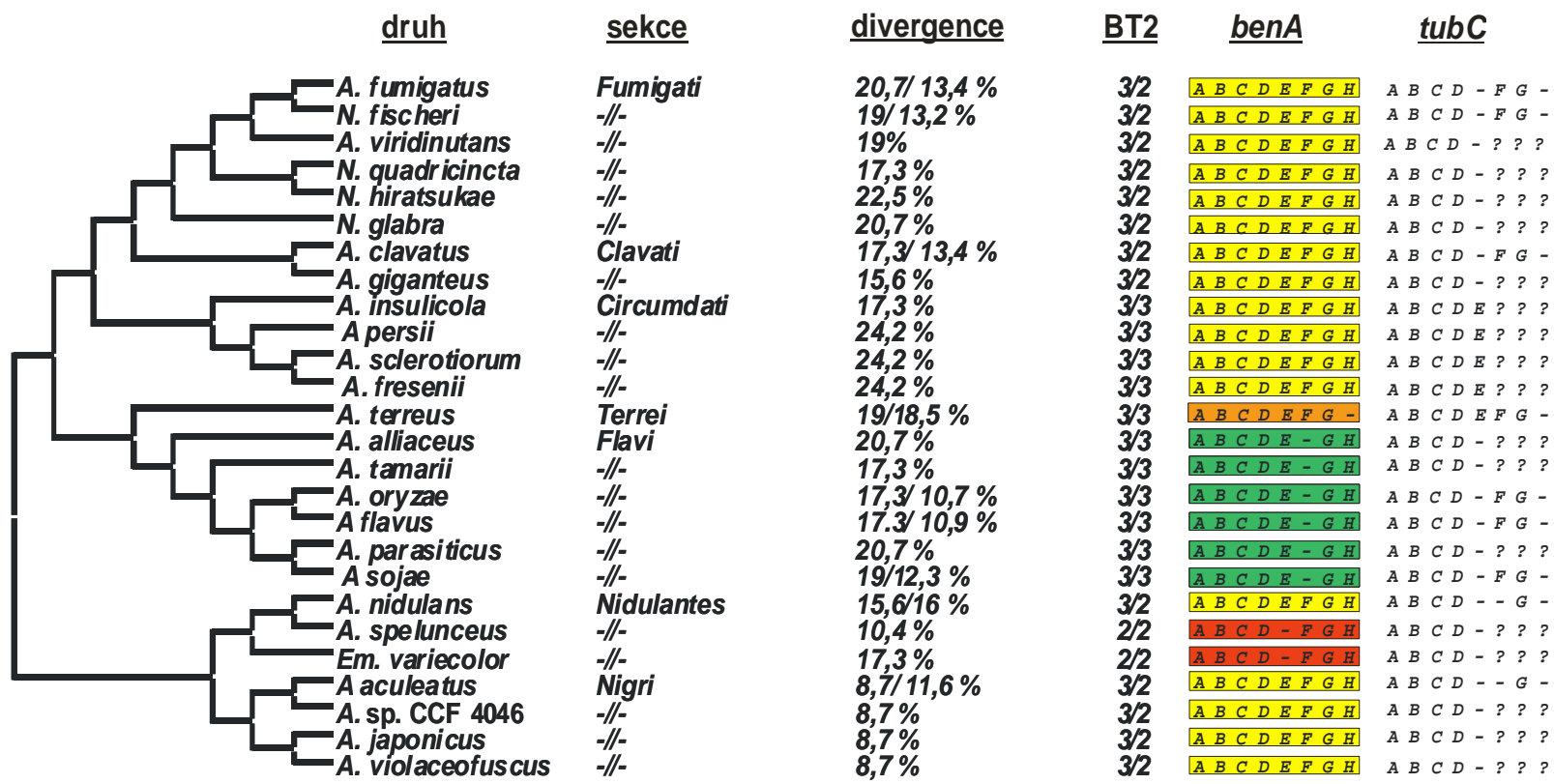
3.2.4 Divergence paralogů se různí mezi druhy

Divergence paralogů *benA* a *tubC* se velmi různily napříč druhy, kde byl *tubC* amplifikován. Na úrovni fragmentu BT2 se divergence aminokyselinové sekvence různily od 8,7 % v sekci *Nigri* až po 24 % v sekci *Circumdati*. Na úrovni celých genů se rozsah těchto divergence (vlivem více konzervované druhé poloviny genu) snížil na rozpětí divergencí od 10,7 % u *A. oryzae* až po 18,5 % u *A. terreus*. Nejvíce divergentní paralog *tubC* nacházíme u *A. terreus* a to jak v rámci tohoto druhu (od *benA* *A. terreus*), tak vzhledem k ostatním genům *tubC* i *benA* u jiných druhů. Nízká divergence genů v oblasti BT2 u sekce *Nigri* způsobuje, že primery navržené pro amplifikaci genu *benA*, velmi často selhávají ve své specifitě (viz dále).

Obr. 3.18 Architektonika exon-intron u genu *benA* napříč sekcemi rodu *Aspergillus*. Každému typu uspořádání je přiřazena barva a písmeno podle legendy a přehledně vyznačena na fylogenetický strom (ITS rDNA; MEGA5, Minimum Evolution, bootstrap 300).

A: nejkomplexnější typ - přítomno všech 8 intronů





Obr. 3.19 Divergence a struktura genů *benA* a *tubC* u druhů, kde byl *tubC* amplifikován. Ve sloupci "divergence" je spočítána rozdílnost aminokyselinové sekvence paralogů *benA* a *tubC* u příslušného druhu. Pokud byly k dispozici sekvence celého genu, je za lomítkem divergence kompletních genů. Ve sloupci "BT2" je porovnán počet intronů v BT2 fragmentu genu *benA* (první číslo) a *tubC* pro daný druh. Uspořádání intronů pro oba geny je zaneseno do posledních dvou sloupců (označení intronů písmeny je podle obrázku 3.15).

3.2.5 V současnosti užívané primery jsou málo specifické

Jak bylo napsáno v úvodu kapitoly 3.2, byl řadou dnes užívaných primerů amplifikován gen *tubC*. Specifita v současnosti užívaných primerů byla testována na spektru druhů reprezentujícím diverzitu rodu. Výsledky a doporučení k užívání těchto primerů jsou shrnuty v Tabulce 3.6.

Tab. 3.6 Komentáře ke specifitě některých běžně užívaných primerů vůči β -tubulinovým paralogům

	navržen pro použití u rodu <i>Fusarium</i> (O'Donnell et Cigelnik 1997) , ale je běžně používán u jiných rodů hub
T1	preferenčně amplifikuje <i>tubC</i> u druhů ze sekcí <i>Circumdati</i> , <i>Fumigati</i> , <i>Clavati</i> a <i>Flavi</i> , u některých dalších druhů nekonstantně amplifikuje <i>benA</i> nebo <i>tubC</i> paralog; pro řadu druhů rodu <i>Aspergillus</i> je nefunkční pravěpodobně kvůli příliš dlouhé sekvenci přesahující do intronu, která je specifická pro rod <i>Fusarium</i>
T10	<i>tubC</i> amplifikován u některých druhů ze sekcí <i>Fumigati</i> a <i>Nidulantes</i> relativně <i>benA</i> specifický, ačkoliv jsou na gelové elektroforéze poměrně často k vidění dva produkty
Bt2a	opakovaně v literatuře zaznamenána amplifikace <i>tubC</i> paralogu u sekce <i>Nigri</i> - specifický pro <i>tubC</i> paralog u druhů <i>A. japonicus</i> , <i>A. aculeatus</i> a <i>A. violaceofuscus</i> při navrhování použity jen sekvence <i>A. nidulans</i> a <i>Neurospora crassa</i> (Glass et Donaldson 1995) sekvence přesně odpovídající primeru je přítomna i v genu <i>tubC</i> u druhů ze sekcí <i>Nidulantes</i> , <i>Fumigati</i> a <i>Circumdati</i>
Bt2b; T2	nespecifický, primer nasedá v místě na sekvenci přítomném u obou paralogů; nutno používat v kombinaci se specifickým forward primerem
T222	<i>benA</i> specifický, úvodní 3pb sekvence jsou specifické pro <i>benA</i>
T22	silně <i>benA</i> specifický

3.2.6 Paralog *tubC* je běžně zaměňován za gen *benA* v sekci *Nigri*

Hledáním podobností nově získaných sekvencí paralogu *tubC* v databázi Genbank byla nalezena řada sekvencí v sekci *Nigri*, které jasně reprezentují paralog *tubC* (viz Tabulka 3.7).

Při pátrání po možném nevědomém použití genu *tubC* paralogu v některých taxonomických studiích v kombinaci s genem *benA* byla identifikována celá řada prací taxonomicky i jinak zaměřených, které paralog *tubC* nevědomě použily (Tab 3.8). Problematika se týká především tří druhů: *A. aculeatus*, *A. japonicus* a *A. violaceofuscus*. V této práci se oba geny podařilo amplifikovat i u izolátu reprezentujícího nepopsaný druh - CCF 4046 (Tab. 3.7).

Ve všech taxonomických pracích izoláty reprezentované genem *tubC* tvořily marginální, dlouhé, dobře podpořené větve. Podobně při kombinaci obou těchto genů jsou oba paralogy ve vzniklém stromě poměrně dobře odděleny a vzájemně se nemíchají (Obr. 3.20).

Tab. 3.7 Sekvence druhů ze sekce *Nigri*, u kterých byl amplifikován *tubC*

<i>A. japonicus</i>	<i>benA</i>	EF661104; <u>HE577804*</u> ; <u>HE577811</u> ;
	<i>tubC</i>	HQ632659; <u>HE577812*</u> ; GU296707*; EU021665; EF661082; EF661081; EF661080; AY820019; AY820018; AY820017; AY585544; AY585543; AY585542*; FJ629286*
<i>A. aculeatus</i>	<i>benA</i>	HQ632721; HQ632670; HQ632669; <u>HE577810</u> ; <u>HE577806*</u> ; EU982087; FR775311; EF661107; EF661106; EF661105; AY820020; AY585539
	<i>tubC</i>	HQ632671; HQ632668; HQ632667; HQ632666; <u>HE577818</u> ; <u>HE577816</u> ; <u>HE577814*</u> ; GQ376123; GU296706*; EF661083; AY585541; AY585540; FJ629271*
<i>A. violaceofuscus</i>	<i>benA</i>	<u>HE577805*</u> ; FJ491692; FJ491689
	<i>tubC</i>	<u>HE577813*</u> ; FJ491687; FJ491686; FJ491685*;
<i>A. sp. CCF 4046</i>	<i>benA</i>	<u>HE578072</u>
	<i>tubC</i>	<u>HE577815</u>

pozn. tučně jsou zvýrazněny sekvence uložené v této práci
* typový kmen

Tab. 3.8 **Práce užívající (nevědomě) sekvenční paralogu *tubC***

Andersen, M. R., et al. (2011) Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 21: 885-897.

Arabatzis, M., et al. (2011) Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3025-3030.

Meijer, M., et al. (2011) Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Stud Mycol* 69: 19-30.

Sørensen, A., et al. (2011) *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *Int J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijms.0.029884-0.

Varga, J., et al. (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 69: 1-17.

Noonim, P., et al. (2008) Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1727-1734.

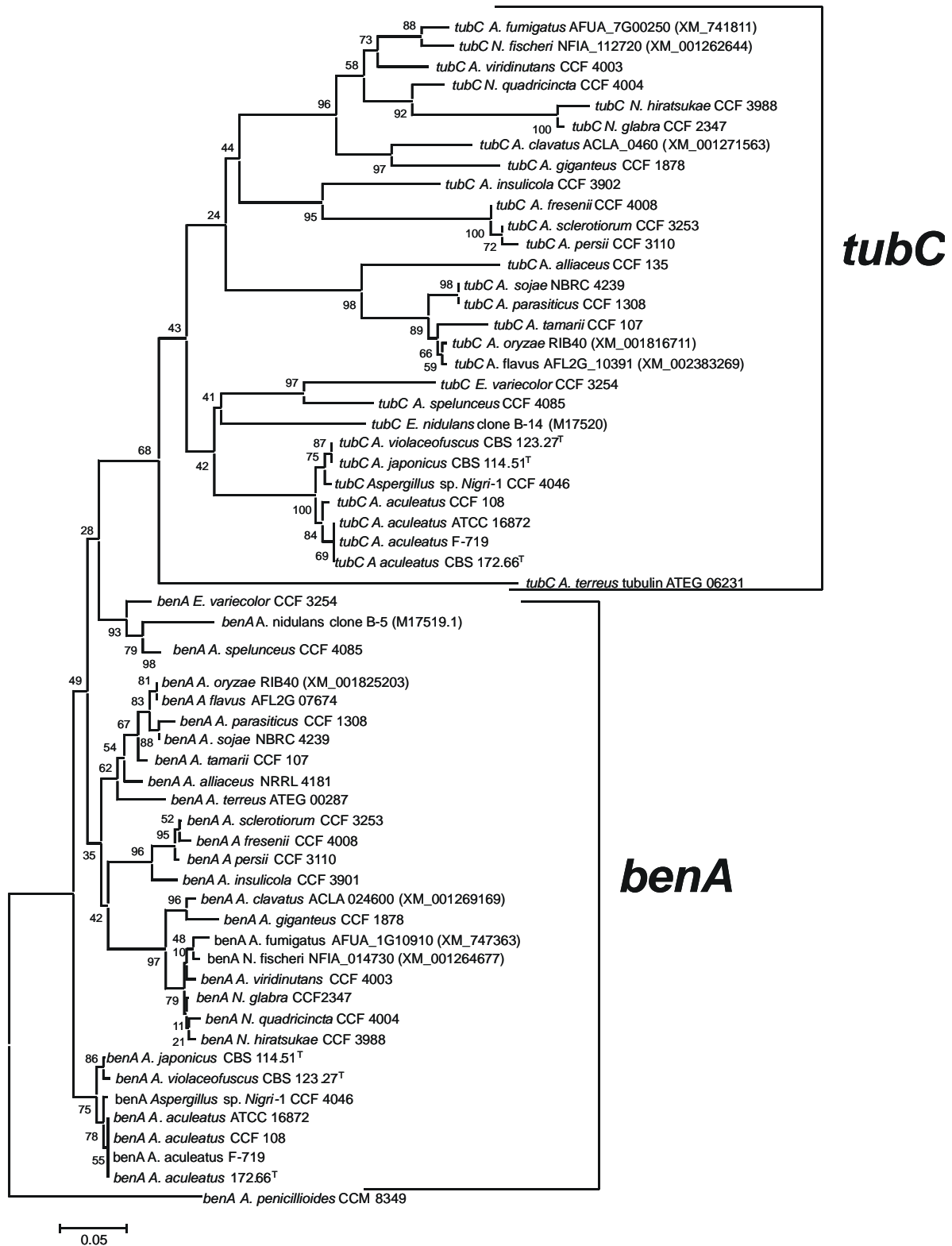
Perrone, G., et al. (2008) *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1032-1039.

Samson, R. A., et al. (2007) Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 59: 129-145.

Varga, J., et al. (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1925-1932.

de Vries, R. P., et al. (2005) *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. *Antonie Leeuwenhoek* 87: 195-203.

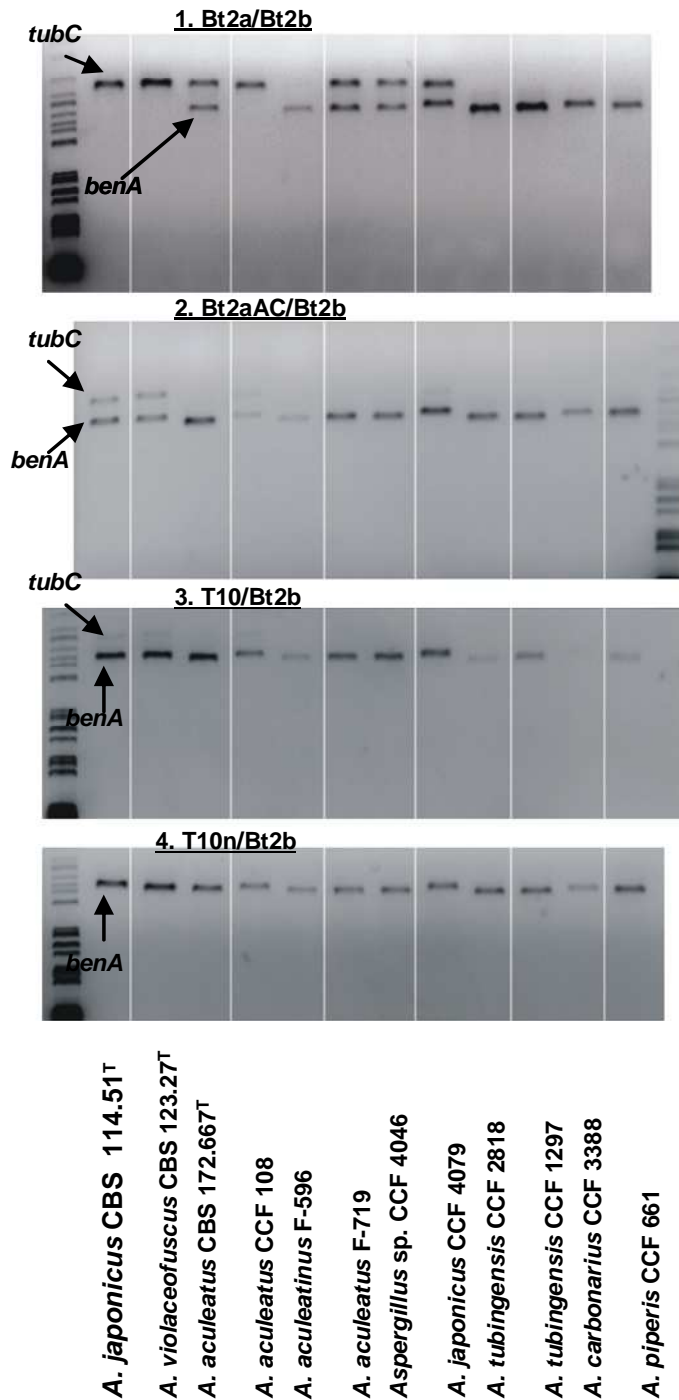
Samson, R. A., et al. (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 50: 45-61.



Obr. 3.20 Kombinovaný fylogenetický strom reprezentovaný 29 sekvencemi *benA* a 29 sekvencemi *tubC*, dvojice genů vždy pochází od stejného kmenu (metoda Minimum Evolution, bootstrap 300, MEGA5). Oba geny se v kombinovaném datasetu nekombinují (ani při použití jiných metod než Minimum Evolution pro konstrukci fylogeneze - data neukázána).

3.2.7 Nesprávnou specifitu primeru Bt2a v sekci *Nigri* řeší primer T10 a nově navržený T10n

Kombinace současných a nově navržených primerů byly testovány u několika druhů sekce *Nigri*. Kombinace v současnosti nejrozšířeněji užívaných primerů Bt2a a Bt2b se ukázala jako velmi nešťastná a amplifikuje buď preferenčně paralog *tubC*, nebo oba paralogy naráz (Obr. 3.21) (samozřejmě u druhů, které mají oba paralogy - viz výše).



Obr. 3.21 Vybrané kombinace primerů a výsledek amplifikace genu pro β -tubulin u několika druhů ze sekce *Nigri*. Nově navržený primer T10n vykazoval nejlepší specifitu ke genu *benA* a eliminoval i rezidua genu *tubC* mezi produkty amplifikace, která byla na gelové elektroforóze patrná při použití primeru T10.

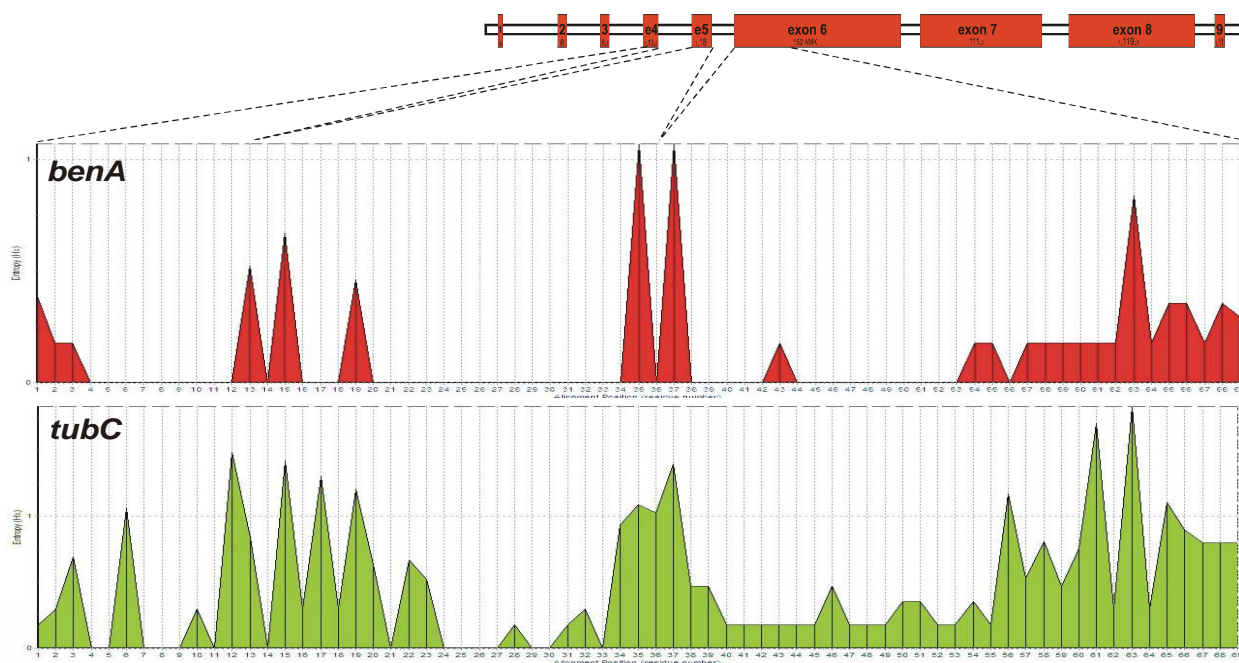
Tento problém nevyřešil ani nově navržený primer Bt2aAB, který je sice více specifický ke genu *benA* než Bt2a primer, ale u *A. japonicus* a *A. violaceofuscus* je dobře patrné, že se amplifikovaly oba paralogy naráz (Obr. 3.21). Tento problém neřeší ani zvýšení teploty annealingu. S vyšší teplotou se primer Bt2aAC, podobně jako primer Bt2a, stává více specifický k paralogu *tubC* (nevyobrazeno).

Použitím primeru T10 je problém s amplifikací genu *tubC* téměř odstraněn, jsou patrné jen zbytkové příměsi *tubC* genu v produktu amplifikace. Naprostou specifitu ke genu *benA* vykazuje zde navržený primer T10n (Obr. 3.21).

3.2.8 Další markery použitelné k odlišení paralogů *benA* a *tubC*

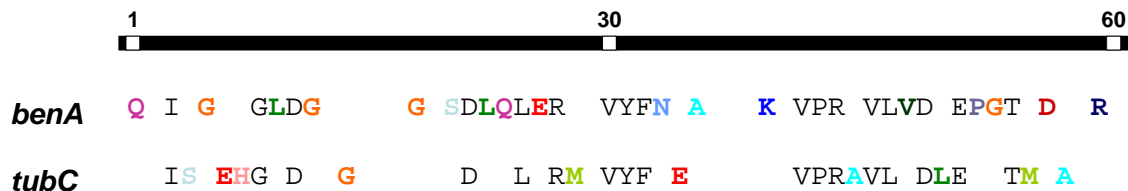
3.2.8.1 Sekvenční motiv jako marker

Nalezení markerové sekvence, která by spolehlivě určila, o který ze dvou paralogů se jedná, je obtížně řešitelný problém kvůli nízké konzervovanosti sekvence paralogu *tubC* napříč druhy *Aspergillus*. Aby taková markerová sekvence byla použitelná, musela by navíc být omezena na úsek BT2 fragmentu, který je naprosto dominantní v databázi GenBank. V tomto úseku se nachází 2-3 introny a konzervovanost sekvence, je u obou genů nižší než pro zbytek genu (Obr. 3.19), to mimo jiné komplikuje i konstrukci primerů v tomto úseku (je v podstatě nemožné sestavit v tomto úseku primer specifický pro *tubC*, který by byl funkční napříč rodem *Aspergillus* a zároveň neamplifikoval i gen *benA*). Vlastní aminokyselinová sekvence v BT2 fragmentu je dlouhá jen asi 60 AMK. Rozdíly v konzervovanosti genu *benA* a *tubC* v oblasti BT2 fragmentu jsou znázorněny na Obr. 3.22.



Obr. 3.22 Konzervovanost sekvence genu *benA* (nahore) a genu *tubC* v úseku ohraničeném primery Bt2a a Bt2b (60 AMK). Použit byl gen *tubC* ze 26 druhů *Aspergillus* a gen *benA* ze stejných druhů (odpovídá druhům z kladogramu na obrázku Obr. 3.19). Barevná oblast znázorňuje počet možných AMK, které se mohou v dané pozici vyskytovat (Entropy plot, Bioedit 7). Gen *tubC* vykazuje větší variabilitu v AMK sekvenci v celém úseku BT2.

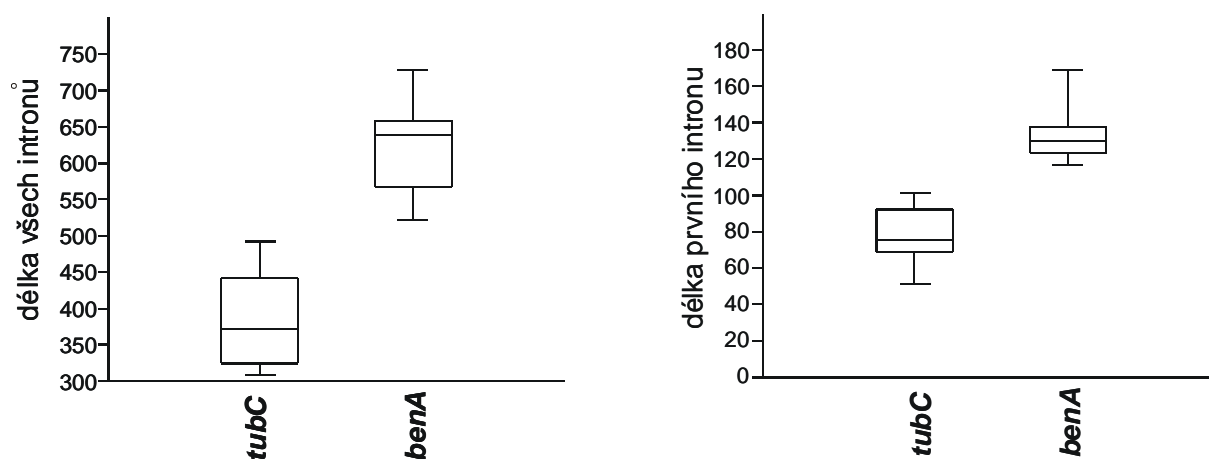
I přes značnou variabilitu BT2 úseku se dají pozice charakteristické pro jeden, či druhý paralog nalézt. Tyto jednotlivé specifické AMK (Obr. 3.23) se dají použít jako "kotvy" při rozlišování obou paralogů, nejlépe v kombinaci s dalšími markery uvedenými dále.



Obr. 3.23 Pozice specifické pro paralog *benA* a *tubC* v úseku BT2 fragmentu (60 AMK). Pro konsenzuální sekvenci genu *benA* bylo použito 450 sekvencí *benA* (vlastních a z práce Peterson (2008)), které reprezentují asi 200 druhů. Konsenzuální sekvence paralogu *tubC* byla zhotovena na základě asi 50 sekvencí - asi 30 druhů. Pozice specifické pro jeden, či druhý paralog jsou znázorněny barevně a tučně. Pozice konsenzuálních sekvencí, které se shodují mezi oběma paralogy byly ponechány v černé barvě.

3.2.8.2 Délka intronů jako marker

Pro paralog *tubC* obecně platí, že počet intronů je menší než u genu *benA*. Proto celková délka intronů v genu dobře rozliší oba paralogy (Obr. 3.24). Značný, statisticky významný rozdíl byl pozorován i v délce prvního intronu (Obr. 3.24). Je ale nutné podotknout, že analyzovaná data byla rozsahem omezena jen na kompletní geny obou paralogů získané z genomických projektů *Aspergillus*.

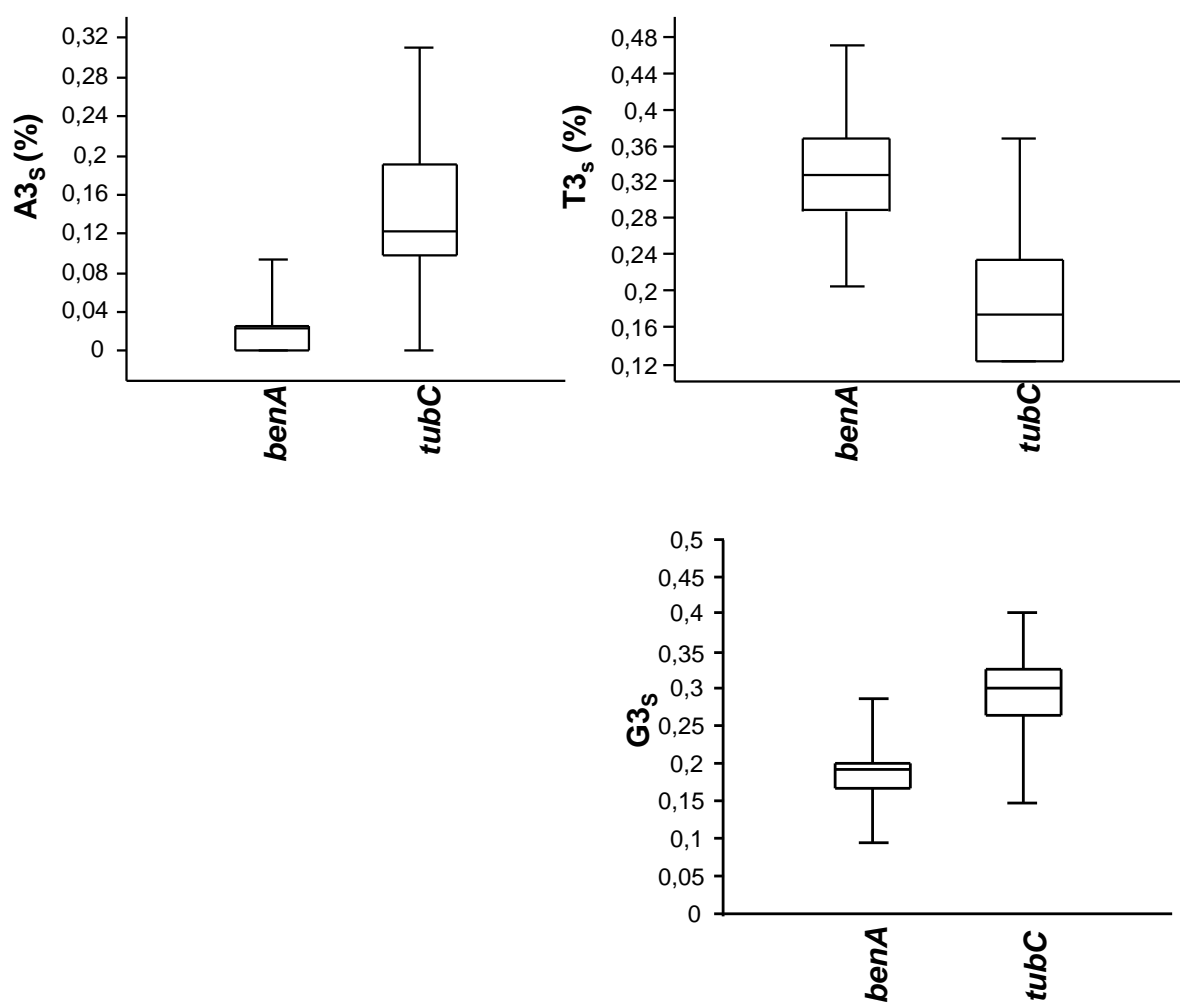


Obr. 3.24 Boxplot znázorňující rozdíly v délce všech intronů (vlevo) a prvního intronu (vpravo) mezi geny *benA* a *tubC*. Data neměla normální rozložení (dle Shapirova testu), rozdíly byly statisticky signifikantní dle Wilcoxonova testu (délka všech intronů $p=0,01532$; délka prvního intronu $p=0,00397$).

3.2.8.3 Charakteristiky "codon usage"

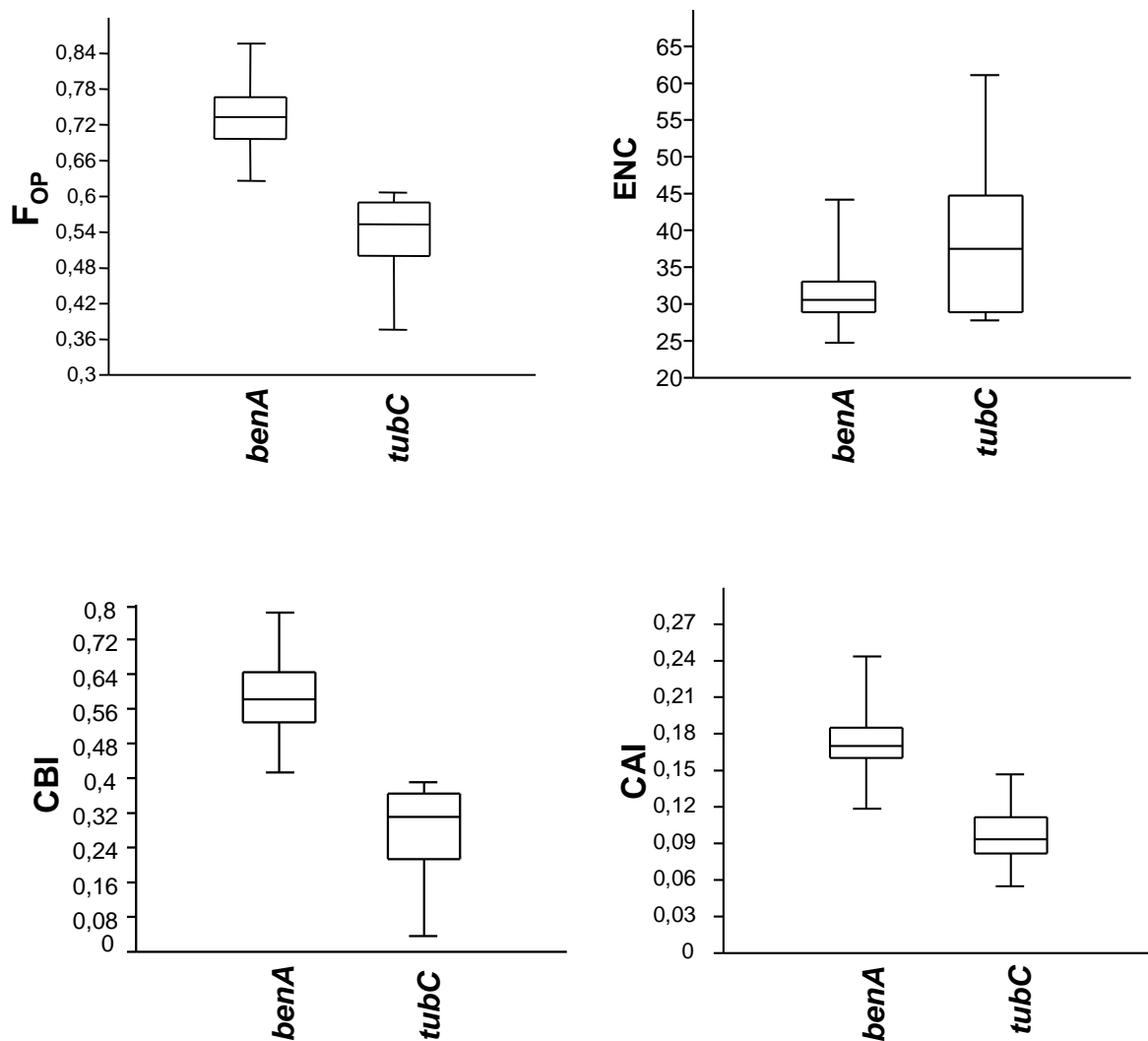
Celá řada charakteristik používaných pro hodnocení "codon usage" (viz kapitola 1.4.2) se ukázaly jako velmi vhodné k odlišení paralogů *benA* a *tubC* u rodu *Aspergillus*, dokonce k tomu postačí irelativně krátká sekvence BT2 fragmentu. Tyto ukazatele byly pro gen *benA* testovány na souboru 450 sekvencí (z práce Peterson (2008) a sekvencích získaných v této práci), které reprezentují set asi 200 druhů *Aspergillus*. Pro gen *tubC* čítal dataset 50 dostupných sekvencí od 30 druhů. Žádná z níže uvedených dat neměla normální rozložení dle Shapirova testu, pro nalezení rozdílů mezi oběma datasety byl zvolen neparametrický Mannův-Whitneyův test (MWt).

Významné rozdíly se dají nalézt již na úrovni třetích bazí kodonů. Kde se jako vhodné ukazatele zdají být obsah adeninu, thyminu i guaninu ve třetí pozici synonymních kodonů ($A3_s$, $T3_s$ a $G3_s$) - viz Obr. 3.25.



Obr. 3.25 Charakteristiky obsahu bazí ve třetí pozici synonymních kodonů, ve kterých se dají nalézt signifikantní rozdíly mezi geny *benA* a *tubC*. Vlevo nahoře: $A3_s$ (MWt $p < 0,0001$); vpravo nahoře: $T3_s$ (MWt $p < 0,0001$); vpravo dole: $G3_s$ (MWt $p < 0,0001$).

Jako další významné markery v odlišení β -tubulinových paralogů se ukázaly být charakteristiky pracující se setem "optimálních" kodonů jako například frekvence optimálních kodonů (F_{OP}), "codon biased index" (CBI) a "codon adaptation index" (CAI). Hodnoty F_{OP} a CBI byly počítány se setem "optimálních" kodonů vytvořeným pro *A. nidulans*. Pro statistiku CAI byl dostupný jen set kodonů optimalizovaný pro *S. cerevisiae* (<http://codonw.sourceforge.net>). Statistika efektivní počet kodonů (ENC) ačkoliv vyšla signifikantně rozdílná mezi oběma geny, existuje významný překryv v hodnotách mezi oběma geny (Obr. 3.26).



Obr. 3. 26 Charakteristiky pracující se setem "optimálních" kodonů a efektivní počet kodonů (ENC) jako vhodné markery pro odlišení paralogů *benA* a *tubC*. Vlevo nahoře: F_{OP} (MWt $p < 0,0001$); vpravo nahoře: ENC (MWt $p < 0,009$); vlevo dole: CBI (MWt $p < 0,0001$); vpravo dole: CAI (MWt $p < 0,0001$).

Data získaná ze statistiky "relativní zastoupení synonymních kodonů" (RSCU) byla podrobena mnohorozměrné analýze komponent, která ukázala, že většinu variability v datech vysvětlují některé kodony pro arginin, serin a prolin. U AMK argininu a serinu, které mají šest synonymních kodonů, preferuje gen *benA* vždy jen jedinou variantu kodonu, u argininu kodon CGT a u serinu TCT. Gen *tubC* používá bez výraznějších preferencí všech šest variant. U aminokyseliny prolinu (4možné kodony) se v genu *benA* téměř nevyskytují kodony CCA a CCG, zatímco u paralogu *tubC* opět není rozdíl v používání všech čtyř alternativních kodonů. Analýza výskytu těchto kodonů v sekvenci genu pro β -tubulin dává další cennou informaci, která může být velmi dobře aplikovatelná s polu s výše uvedenými statistikami v rozlišování obou paralogů.

Statistiky, ve kterých nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly pro odlišení obou genů byly obsah G+C v sekvenci, obsah G+C na třetí pozici synonymních kodonů (GC3_S) a obsah cytosinu na ve třetí pozici synonymních kodonů (C3_S).

4. DISKUZE

4.1 Výsada molekulárních metod u rodu *Aspergillus*

Při současném druhovém konceptu rodu hrají molekulární metody v taxonomii a při identifikaci izolátů *Aspergillus* nepostradatelnou úlohu. Množství popsaných kryptických druhů dává morfologii stále menší šance dosáhnout determinace do druhu. Exaktní determinace druhů je přitom potřebná v řadě případů. Spektrum produkovaných mykotoxinů a citlivosti k antimykotikům se mohou lišit mezi blízkými příbuznými druhy. Množství izolátů, především z klinického materiálu, nemusí vykazovat standardní morfologii a přesná determinace může rozhodnout o volbě léčby.

Protože některé sekce rodu mají obzvláště velký ekonomický význam (*Flavi*, *Nigri*, *Fumigati*, *Aspergillus*) ať již v negativním (znehodnocování potravin, patogenita, produkce mykotoxinů, aj.), nebo pozitivním slova smyslu (produkce unikátních bioaktivních látek použitelných farmakologicky, jsou součástí postupů výroby potravin a produkují důležité enzymy a organické kyseliny), má smysl popisovat nové druhy v rodu *Aspergillus*, protože z jejichž popisu může být profit.

4.2 Je *benA* vhodný pro taxonomii?

Pro současnou taxonomii rodu *Aspergillus* je gen *benA* nepostradatelný. Spolu s genem pro kalmodulin (*caM*) jsou jedinou dvojicí genů, které jsou osekvenovány pro většinu druhů a zároveň jsou dostatečně informativní, aby postačily k rozlišení druhů v rodech, které rychle speciovaly a genetické vzdálenosti mezi druhy jsou v řádech několika procent. Ani jeden z genů ale není sám o sobě schopen rozlišit všechny druhy *Aspergillus* a v závislosti na zkoumané sekci je vhodnější jeden, či druhý gen (Samson *et al.* 2007; Peterson 2008). Proto ani navzdory riziku amplifikace paralogu není důvod od genu *benA* upouštět. Genů s tak dobrou rozlišovací schopností je málo. Výborná je i snadná dosažitelnost genu, protože současné primery velmi dobře fungují napříč širokým spektrem hub, i když jejich specifita pro konkrétní paralog nemusí být ideální. U genu pro kalmodulin se to stejné říci nedá. Je nutné většinou používat primery navržené pro užší skupiny hub a někdy je nutné zkoušet nejrůznější kombinace k úspěšné amplifikaci. Rodina kalmodulinových paralogů je poměrně rozsáhlá (Friedberg et Rhoads 2001), ale o zmínky o amplifikaci takového paralogu v literatuře chybí.

Cesta, kterou se jeví vhodné se ubírat v případě genu *benA* je uvědomovat si riziko existence paralogních genů, znát specifitu používaných primerů u konkrétní skupiny (všímat si vícečetných produktů na elektroforetogramu), navrhovat více specifické primery a prověřovat neobvykle divergentní sekvence, které tvoří dlouhé marginální větve ve fylogenetických stromech. Pomůckou může být i všímání si různého uspořádání intronů u blízkých příbuzných druhů, i když toto kritérium je jen orientační a vyžaduje další zkoumání příslušné sekvence.

Mezi primery nově navrženými v této práci jsou nejen vůbec poprvé primery specifické pro paralog *tubC*, které mají spíše než praktický, výzkumný význam. Podařilo se také navrhnout primery na samém konci genu *benA* v hypervariabilní oblasti, které umožňují amplifikaci celého genu u řady sekcí. Jedním z největších přínosů této práce je bezesporu revize současných primerů pro použití u rodu *Aspergillus* a navržení nových, vhodnějších z hlediska specifity. Významné je také doporučení pro sekci *Nigri*, kde je naprosto nevhodné užívat primer Bt2a. Použití primeru T10 nebo nově navrženého T10n bez výjimky řeší problém amplifikace genu *tubC* v této sekci.

U jiných druhů hub je problematika β -tubulinových paralogů buď jednodušší, protože žádný další paralog ke genu *benA* není přítomen, nebo může být daleko komplexnější (viz Tab. 1.5). U rodu *Rhizopus oryzae* nacházíme hned pět takových paralogů. Dobře je zde patrná neostrá hranice mezi tím, co nazýváme multi-copy geny a tím, čím jsou paralogní geny. Původ obou těchto skupin je pravděpodobně především v genové duplikaci. Divergence některých těchto duplikátů u *R. oryzae* jsou vysoké, srovnatelné s paralogy *benA* a *tubC* u rodu *Aspergillus*. Rozdíly mezi jinými duplikáty jsou naprosto minimální, například jen na úrovni záměn v synonymních pozicích kodonů, nebo malého počtu zaměněných aminokyselin. V těchto případech není úplně jasné, zda hovořit o jednom genu s větším počtem kopií, nebo o paralogu. Není obtížné představit si, jak může být snadné amplifikovat stejným setem primerů jeden, či druhý paralog/kopii, která není identická. Pro taxonomii jsou takové situace problémem. Vliv paralogů je sice minimalizován používáním dat z více genů v jedné taxonomické studii, tyto nepřesnosti a zmatky plynoucí z použití paralogních genů jsou však nezanedbatelné. Proto je trendem dnešní taxonomie, vybírat si především single-copy geny.

4.3 Pozice intronů není nástroj k odlišení paralogů *benA* a *tubC*

Vůbec prvním, kdo zaznamenal možný problém paralogu *tubC* pro taxonomii byl Peterson (2008). Všimnul si variability v počtu intronů v BT2 fragmentu u sekcí *Nigri*, *Nidulantes* a *Usti*. V případě sekce *Nigri* identifikoval dokonce amplifikovaný fragment jako gen *tubC*. U všech těchto sekcí se z opatrnosti vyhnul použití genu *tubC* v analýze. Jak bylo zjištěno v této práci, počet intronů v BT2 fragmentu nemůže sloužit jako kritérium pro rozlišení obou paralogů. Pozice intronů jsou v obou genech značně variabilní a u řady druhů se mezi paralogy neliší (Obr. 3. 15). V případě sekce *Nidulantes* Peterson (2008) amplifikoval ve skutečnosti gen *benA*, který se v rámci sekce liší v počtu intronů v BT2 fragmentu, obavy z jeho použití tedy nebyly na místě. V sekci *Usti* byl údaj o variabilitě intronů chybný, žádný fragment, kde by chyběl intron autor neamplifikoval (osobní komunikace). To je ve shodě se zde prezentovanými daty. Paralog *tubC* nebyl u sekce *Usti* nalezen, ani nebyla zaznamenána variabilita v počtu intronů v genu *benA*.

4.4 Omyly v sekci *Nigri*

Další taxonomické práce zabývající se sekcí *Nigri* nebyly tak obezřetné jako Peterson (2008). Použití genu *tubC* bylo zaznamenáno v celé řadě prací, včetně těch úplně nejaktuálnějších (viz Tab. 3.8). Pozorování Petersona (2008) zůstalo takřka bez povšimnutí. Jedna z mála recentních prací, která zaregistrovala tento problém u sekce *Nigri*, dezinterpretovala nález autora jako odlišnost v počtu intronů u genu *benA* pro druhy *A. japonicus* a *A. aculeatus* (Sørensen et al. 2011). Situace u několika druhů sekce *Nigri*, kde se paralog *tubC* v genomu nachází (Tab. 3.7), je poměrně nepřehledná. Tyto druhy jsou nerozlišitelné morfologicky a koncept druhů je postaven na sekvencích genů *benA*, *caM* a datech o extrolytech (která konkrétně u těchto druhů nejsou dostatečně vyjasněná, navíc se analýza extrolytů rutinně neprovádí). Z hlediska polyfázického přístupu k druhům *Aspergillus*, není druh založený na podpoře jediného lokusu akceptovatelný.

V databázi GenBank jsou přítomné fragmenty genu *tubC* pro tyto druhy v převaze. Pro *A. japonicus* je v databázi uloženo 15 sekvencí označených jako β -tubulin, z toho 14 patří genu *tubC*. Pro *A. aculeatus* je tato bilance 10 fragmentů *benA* ku 10 fragmentům *tubC*. Pro *A. violaceofuscus* je gen *tubC* v převaze 3:2. Alarmující je, že ani u jednoho z těchto druhů není v databázi sekvence *benA* od typového kmenu. Situaci napravila tato práce uložением jak fragmentu *benA*, tak *tubC* od všech tří typových položek spolu s náležitým označením, o jaký

gen se jedná (Tab. 3.7). Navíc se podařilo identifikovat gen *tubC* u nepopsaného druhu ze sekce *Nigri* (CCF 4046), který tak reprezentuje čtvrtý druh, u kterého byl *tubC* v sekci *Nigri* zaznamenán.

Gen *tubC* u sekce *Nigri*, zejména BT2 fragment je v porovnání s ostatními druhy *Aspergillus* nejméně divergentní (asi 9 % na úrovni AMK sekvence) od genu *benA*. Blízkost těchto úseků obou paralogů je pravděpodobně důvod změněné specifity primeru Bt2a u této sekce. I přes poměrně malou divergenci se *tubC* sekvence ve výsledných fylogenetických stromech separují od sekvencí reprezentujících *benA* lokus (podobně jako na Obr. 3.20). To několikrát vzbudilo debaty o nových druzích v sekci *Nigri* (Samson *et al.* 2004; de Vries *et al.* 2005). Řada izolátů v sekci bude zřejmě revidována na základě těchto zjištění.

4.5 β -tubulinové paralogy: příčiny a možné následky rozdílné divergence

U rodu *Aspergillus* byly nalezeny jak rozdíly v přítomnosti resp. nepřítomnosti paralogu *tubC*, tak v jeho divergenci od genu *benA*. Pokud bereme gen *benA* jako původní gen, jehož duplikací vznikl gen *tubC* (tomu by odpovídala všeobecně větší konzervovanost genu napříč druhy), pak musel podle současné představy o vzniku paralogních genů a pseudogenů (viz kapitola 1.2.2) převzít gen *tubC* některou z funkcí mateřského genu *benA*, aby mohl být v genomu zachován.

Různá rychlost evoluce sekvence obou (Obr. 3.20) paralogů je názorně demonstrovatelná i na délce větví ve stromech. Geny *tubC* vykazují větší divergenci napříč druhy *Aspergillus*, větve této části stromu jsou proto delší. U různých druhů probíhá divergence paralogu *tubC* od mateřské sekvence *benA* různě rychle. To je vidět jednak na odlišných divergencích paralogů u různých druhů (Obr. 3.19), ale také na sekvenci paralogu *tubC* u *A. terreus*, která zaujímá ve stromu (Obr. 3.20) naprosto jiné postavení vůči ostatním sekcím než je tomu u genu *benA*.

Je otázkou, zda nižší divergence obou paralogů značí nižší míru subfunkcionalizace a tedy i větší míru redundance obou genů. Nebo zda podobné míry subfunkcionalizace bylo u různých druhů dosaženo různým počtem degenerativních mutací. Vysoce divergentní gen *tubC*, jaký je nacházen např. u *A. terreus*, může snad znamenat, že gen spěje k tomu stát se pseudogenem a posléze bude z genomu eliminován jako u některých dalších druhů *Aspergillus*. Je možné, že funkce *tubC* bude u jistých druhů rodu *Aspergillus* postradatelná zatímco u jiných naopak nenahraditelná v určitých fázích ontogeneze. U různých druhů se snad může funkce genu *tubC* i odlišovat. β -tubulin je multifunkční protein a je proto možné, že u různých druhů převzal paralog *tubC* jinou funkci.

Oněcně nižší konzervovanost sekvence β -tubulinových genů hub je dáována také do souvislosti se ztrátou bazálních tělísek a centriol u většiny hub (Dutcher 2001). Pokud gen ztratí jednu ze svých funkcí, potom logicky působí menší tlaky na jeho zachování primární struktury. Funkce bazálních tělísek a centriol souvisí s C-terminálním koncem, kde se nachází u většiny živočichů konzervovaná oblast bohatá na glutamát. Tato sekvence u rodu *Aspergillus* na řadě míst změněna, výrazněji jsou tyto záměny vyjádřeny u paralogu *tubC*. U genu *tubC* *A. terreus* tato oblast dokonce úplně chybí, protože byl na její počátek zařazen předčasný stop kodon TGA.

4.6 Vztah rozdílů v codon usage a délce intronů ke genové expresi a funkci proteinu

Souvislost mezi snižováním počtu užívaných kodonů u genů s vysokou mírou exprese je dobře známa (Sharp *et al.* 1986; Sharp et Devine 1989), naopak omezené nebo žádné preference ve výběru synonymních kodonů nebyly sledovány u málo přepisovaných genů. V této souvislosti by šlo sledovat jasnou analogii u paralogů *benA* a *tubC*. *BenA* silně preferuje jen omezený počet kodonů, což mimo jiné indikuje i řada charakteristik jako nízký efektivní počet kodonů (ENC), a vysoké statistiky CBI, F_{OP} a CAI (Obr. 3.26). Velmi výrazné preference byly nalezeny pro některé kodony argininu, serinu a prolinu. Naprostý opak platí pro gen *tubC*. Na základě těchto údajů se dá očekávat diametrálně odlišná exprese obou genů.

Podle některých současných hypotéz není souvislost mezi CU a intenzitou exprese tak lineární. Spíše než kvantita exprese je zdůrazňována funkční souvislost a koexprese genů s podobným CU (Lavner et Kotlar 2005; Najafabadi *et al.* 2009). V souhlasu s oběma těmito hypotézami jsou závěry studií na funkci genu *tubC* u *A. nidulans* (May *et al.* 1985; Weatherbee *et al.* 1985; May 1989). Podle nich je paralog *tubC* minimálně přepisován v období vegetativního, vyšší míra exprese byla sledována až během konidiogeneze (stále však podstatně nižší než exprese *benA*). Ani mutanti s nefunkčním genem *tubC* však úplně neztratili schopnost tvorby konidií. Oba geny se tedy pravděpodobně diametrálně liší v míře exprese, jak naznačuje velmi odlišný CU. Navíc odlišná funkční specializace a naprosto rozdílné expresní pattern pravděpodobně dále navyšovaly rozdíly v CU.

Představu o vyšší míře exprese genu *benA* by podporoval i fakt, že sekvence genu je bohatší na introny než sekvence paralogu *tubC*. Podle některých zjištění se introny akumulují přednostně u evolučně konzervovaných genů, které mají vyšší kvantitu exprese (Carmel *et al.* 2007). Navíc délka prvního intronu, který je také u genu *benA* výrazně delší (Obr. 3.24), pozitivně koreluje s úrovní exprese genu (Marais *et al.* 2005; Hughes *et al.* 2008).

Rod *Aspergillus* je ideálním modelem pro studium vztahů mezi expresí paralogních genů, jejich vzájemnou divergencí a mezi rozdíly v codon usage. Sledování genové exprese paralogů během různých fází životního cyklu a při vystavení různým podmínkám by objasnilo, zda existuje vztah mezi divergencí obou paralogů, funkční specializací a mírou exprese. Není jasné zda velká divergence paralogů značí specializaci na určitou funkci, nebo zda vysoce divergentní paralogy akumulací nových mutací směřují k tomu stát se pseudogeny. Je možné, že funkce *tubC* bude u jistých druhů rodu *Aspergillus* naprosto postradatelná bez vlivů na vitalitu, nebo naopak s významější než u *A. nidulans*. U některých druhů byl gen *tubC* z genomu úplně eliminován (některé druhy sekce *Nigri*, v řadě sekcí se paralog *tubC* nepovedlo amplifikovat - viz výsledky).

4.7 Kombinace molekulárních markerů při rozpoznávání β -tubulinových paralogů

Předkládaná práce přináší řadu ukazatelů, které jsou různě přesné v predikování, zda daná sekvence náleží paralogu *benA*, nebo *tubC*. Postulovat absolutní platnost některého z těchto markerů by bylo příliš optimistické. Ačkoliv mohou data např. pro charakteristiky CBI a F_{OP} vypadat velmi jednoznačně a prakticky neexistuje překryv mezi datasey pro gen *benA* a *tubC*, musíme si uvědomit, že data pro gen *tubC* nejsou kompletní a reprezentovala asi 30 druhů (cca desetina popsanych druhů *Aspergillus*), i když je nutno poznamenat, že gen *tubC* pravděpodobně nebude zdaleka přítomen u všech druhů *Aspergillus*.

Kombinace statistik založených na preferenčním užívání určitého setu kodonů, obsahu bazí ve třetí pozici degenerovaných kodonů, spolu se sekvenčním motivem charakteristickým pro každý z paralogů se zdá jako možná cesta k velmi spolehlivému rozlišení obou paralogů.

Platnost výše uvedených zásad pro rozlišování paralogních genů u jiných taxonů než *Aspergillus* zní velmi slibně, ale bude muset být prověřena. Stejně tak nadějně zní použití těchto parametrů pro odhalování případných dalších pochybení jako se tomu stalo u sekce *Nigri*

5. ZÁVĚR

Paralogní geny jsou klasickým problémem, který musí taxonomie řešit. Protože velké procento všech genů vzniklo genovou duplikací, nepřekvapí, že jsou paralogní geny v centru zájmu. Tato práce přináší jeden takový příklad z oblasti taxonomie jednoho z nejdůležitějších rodů vláknitých hub - rodu *Aspergillus*. Nevědomá amplifikace paralogu genu pro β -tubulin přinesla dokonce spekulace o nových druzích v okruhu *A. niger*. Problém, který vznikl kvůli nedostatečné specifitě primerů, trvá dodnes a nechtěně amplifikovaný paralog (zvaný *tubC*) se neustále objevuje v taxonomických i jinak zaměřených studiích. Tato práce se rozhodla daný problém řešit a reviduje specifitu současných primerů pro β -tubulin. Oba paralogy - *benA* i *tubC* se povedlo charakterizovat u poměrně různorodého spektra druhů a na základě těchto dat vytvořit nové, více specifické primery. Pro odlišení obou paralogů byla navržena řada markerů, které charakterizují codon usage. Preference v používání omezeného setu kodonů se ukázaly velmi charakteristické pro jeden z paralogů a statistiky, které s předpoklady omezeného codon usage pracují, s velkou spolehlivostí oba paralogy rozlišují. Preference určitého kodonu je pro některé aminokyseliny se šesti různými synonymními kodony (arginin, serin) téměř absolutní jen pro jeden kodon u genu *benA*. Dalšími charakteristikami, jak odlišit oba paralogy se ukázala i celková délka intronů a délka prvního intronu. byla vytipována i místa specifická pro každý ze dvou paralogů, která mohou sloužit jako jakési kotvy při ověřování, o který ze dvou genů se jedná. Problematika paralogů *benA* a *tubC* je rozsáhlá. Napříč druhy rodu *Aspergillus* vykazuje gen *tubC* velmi různé divergence od paralogu *benA*, u řady druhů dokonce chybí. Ve světle současných poznatků o vzniku paralogních genů je možné se ptát, jestli rozdílné divergence u jednotlivých druhů mají vztah k různé funkční specializaci, nebo míře funkční zaměnitelnosti obou paralogů, nebo jestli silně divergentní paralogy spějí k tomu stát se pseudogeny. Problematika β -tubulinových paralogů se pravděpodobně netýká jen rodu *Aspergillus*, ale i dalších hub. U některých nacházíme i více než dva takové paralogy. Bude zajímavé prozkoumat, zda markery použité pro rozlišení paralogů u rodu *Aspergillus* fungují i u jiných rodů a zda také odhalí podobná taxonomická pochybení jako v případě sekce *Nigri* u rodu *Aspergillus*.

CITOVANÉ ZDROJE

- Abarca, M. L., F. Accensi, J. Cano et F. J. Cabañes (2004) Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 86: 33-49.
- Abliz, P., Y. Horie, Y. Hui, K. Nishimura et R. Li (2001) New and interesting species of *Eurotium* from Chinese soil. *Mycoscience* 42: 289-294.
- Arabatzis, M., M. Kambouris, M. Kyprianou, et al. (2011) Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3025-3030.
- Avise, J. C. et R. M. Ball (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. In: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. D. Futuyma & J. Antonovics. Oxford: Oxford University Press 7: 45-67.
- Baker, S. E. (2006) *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Med Mycol* 44: 17-21.
- Balajee, S. A., J. W. Baddley, S. W. Peterson, et al. (2009) *Aspergillus alabamensis*, a new clinically relevant species in the section *Terrei*. *Eukaryot Cell* 8: 713-722.
- Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle et K. A. Marr (2005) *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4: 625-632.
- Balajee, S. A., J. Houbraken, P. E. Verweij, et al. (2007) *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol* 59: 39-46.
- Balajee, S. A., R. Kano, J. W. Baddley, et al. (2009) Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* 47: 3138-3141.
- Bartolomé, C., X. Maside et B. Charlesworth (2002) On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 19: 926-937.
- Bennetzen, J. L. et B. D. Hall (1982) Codon selection in yeast. *J Biol Chem* 257: 3026-3031.
- Bergman, C. M. et M. Kreitman (2001) Analysis of conserved noncoding DNA in *Drosophila* reveals similar constraints in intergenic and intronic sequences. *Genome Res* 11: 1335-1345.
- Borck, K. et H. D. Braymer (1974) The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* 85: 51-56.
- Budak, A., A. B. Macura, T. Mazur et Z. Laskownicka (1987) Fungal species isolated from skin and nail lesions of hands and feet of patients suspected of mycotic Infection. *Mykosen* 30: 434-439.
- Burland, T. G., T. Schedl, K. Gull et W. F. Dove (1984) Genetic analysis of resistance to benzimidazoles in *Physarum*: differential expression of β -tubulin genes. *Genetics* 108: 123-141.
- Campbell, C. K. et E. M. Johnson (2005) Dermatomycotic molds. In: *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections: Medical Mycology*. W. G. Merz & R. J. Hay. London: Hodder Arnold: 220-243.
- Carmel, L., I. B. Rogozin, Y. I. Wolf et E. V. Koonin (2007) Evolutionarily conserved genes preferentially accumulate introns. *Genome Res* 17: 1045-1050.
- Carvalho, A. B. et A. G. Clark (1999) Genetic recombination: Intron size and natural selection. *Nature* 401: 344.
- Castillo-Davis, C. I., D. L. Hartl et G. Achaz (2004) Cis-regulatory and protein evolution in orthologous and duplicate genes. *Genome Res* 14: 1530.
- Castillo-Davis, C. I., S. L. Mekhedov, D. L. Hartl, E. V. Koonin et F. A. Kondrashov (2002) Selection for short introns in highly expressed genes. *Nat Genet* 31: 415-418.
- Cleveland, D. W. et K. F. Sullivan (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu Rev Biochem* VOL. 54: 331-365.
- Coghlan, A. et K. H. Wolfe (2000) Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16: 1131-1146.
- Collins, L. et D. Penny (2006) Investigating the intron recognition mechanism in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 23: 901-910.
- Comeron, J. M. et M. Kreitman (2000) The correlation between intron length and recombination in *Drosophila*: Dynamic equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics* 156: 1175-1190.
- Comeron, J. M., M. Kreitman et M. Aguadé (1999) Natural selection on synonymous sites is correlated with gene length and recombination in *Drosophila*. *Genetics* 151: 239-249.
- Conant, G. C. et A. Wagner (2003) Asymmetric sequence divergence of duplicate genes. *Genome Res* 13: 2052-2058.
- David, H., M. Åkesson et J. Nielsen (2003) Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry* 270: 4243-4253.
- De Pauw, B., T. J. Walsh, J. P. Donnelly, et al. (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46: 1813-1821.

- de Roos, A. D. G. (2007) Conserved intron positions in ancient protein modules. *Biol Direct* 2: 1-17.
- de Vries, R. P., J. C. Frisvad, P. J. I. van de Vondervoort, *et al.* (2005) *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. *Antonie Leeuwenhoek* 87: 195-203.
- Deshazo, R. S. (2009) Syndromes of invasive fungal sinusitis. *Med Mycol* 47: S309-S314.
- Dettman, J. R., D. J. Jacobson et J. W. Taylor (2003) A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57: 2703-2720.
- Dettman, J. R., D. J. Jacobson et J. W. Taylor (2006) Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* 98: 436-446.
- Dettman, J. R., D. J. Jacobson, E. Turner, A. Pringle et J. W. Taylor (2003) Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora*: Comparing methods of species recognition in a model eukaryote. *Evolution* 57: 2721-2741.
- Duret, L. et D. Mouchiroud (1999) Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4482-4487.
- Dutcher, S. K. (2001) Motile organelles: The importance of specific tubulin isoforms. *Curr Biol* 11: R419-R422.
- Dutcher, S. K. et E. C. Trabuco (1998) The *UNI3* gene is required for assembly of basal bodies of *Chlamydomonas* and encodes δ -tubulin, a new member of the tubulin superfamily. *Mol Biol Cell* 9: 1293-1308.
- Dyer, P. S., M. Paoletti et D. B. Archer (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* 149: 2301-2303.
- Eagle, C. E. Mating-type genes and sexual potential in the Ascomycete genera *Aspergillus* and *Penicillium* [PhD. Thesis]. Nottingham: University of Nottingham; 2009.
- Einax, E. et K. Voigt (2003) Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum fungi. *Organisms Diversity and Evolution* 3: 185-194.
- English, M. P. (1976) Nails and fungi. *Brit J Dermatol* 94: 697.
- English, M. P. et R. Atkinson (1973) An improved method for the isolation of fungi in onychomycosis. *Brit J Dermatol* 88: 237-241.
- Farlow, A., E. Meduri et C. Schlotterer (2011) DNA double-strand break repair and the evolution of intron density. *Trends Genet* 27: 1-6.
- Fedorova, N. D., N. Khaldi, V. S. Joardar, *et al.* (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 4: e1000046.
- Fennell, D. I. et K. B. Raper (1955) New species and varieties of *Aspergillus*. *Mycologia* 47: 68-89.
- Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, *et al.* (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151: 1531.
- Fresenius, G. (1863) 1850-1863. *Beitr Mykol* 3: 81.
- Friberg, M., P. von Rohr et G. Gonnet (2004) Limitations of codon adaptation index and other coding DNA based features for prediction of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 1083-1093.
- Friedberg, F. et A. R. Rhoads (2001) Evolutionary aspects of calmodulin. *IUBMB Life* 51: 215-221.
- Fuglsang, A. (2004) The 'effective number of codons' revisited. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 957-964.
- Fuglsang, A. (2006) Estimating the "effective number of codons": the Wright way of determining codon homozygosity leads to superior estimates. *Genetics* 172: 1301-1307.
- Fujimoto, H., M. Ikeda, K. Yamamoto et M. Yamazaki (1993) Structure of fischerin, a new toxic metabolite from an Ascomycete, *Neosartorya fischeri* var. *fischeri*. *Journal of Natural Products* 56: 1268-1275.
- Gadkar, V., A. Adholeya et T. Satyanarayana (1997) Randomly amplified polymorphic DNA using the M13 core sequence of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. *Canadian Journal of Botany* 43: 795-798.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.
- Gams, W., M. Christensen, A. H. Onions, J. I. Pitt et R. A. Samson (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*: New York: Plenum Press: 55-62.
- Ganko, E. W., B. C. Meyers et T. J. Vision (2007) Divergence in expression between duplicated genes in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* 24: 2298-2309.
- Gianì, S., L. Morello, M. Bardini et D. Breviario (2003) Tubulin intron sequences: Multi-functional tools. *Cell Biol Int* 27: 203-205.
- Gilbert, W., M. Marchionni et G. McKnight (1986) On the antiquity of introns. *Cell* 46: 151-153.
- Glass, N. L. et G. C. Donaldson (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61: 1323-1330.
- Goldman, G. H., C. H. Pellizzon, M. Marins, J. O. McInerney et M. H. S. Goldman (1998) *Trichoderma* spp. genome and gene structure. In: *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy, and genetics*. C. P. Kubicek & G. E. Harman. London: Taylor and Francis 1: 209-224.

- Gräser, Y., M. El Fari, W. Presber, W. Sterry et H. J. Tietz (1998) Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit J Dermatol* 138: 576-582.
- Gu, Z., A. Cavalcanti, F. C. Chen, P. Bouman et W. H. Li (2002) Extent of gene duplication in the genomes of *Drosophila*, nematode, and yeast. *Mol Biol Evol* 19: 256.
- Gu, Z., D. Nicolae, H. H. S. Lu et W. H. Li (2002) Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data. *Trends Genet* 18: 609-613.
- Gu, Z., S. A. Rifkin, K. P. White et W. H. Li (2004) Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species. *Trends Genet* 36: 577-579.
- Guarro, J., E. G. Kallas, P. Godoy, *et al.* (2002) Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerg Infect Dis* 8: 989-991.
- Gupta, A. K., E. A. Cooper, P. MacDonald et R. C. Summerbell (2001) Utility of inoculum counting (Walshe and English Criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 39: 2115-2121.
- Ha, M., W. H. Li et Z. J. Chen (2007) External factors accelerate expression divergence between duplicate genes. *Trends Genet* 23: 162-166.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hammer, D. A. T. Harper et P. D. Ryan (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4: 9.
- Haugen, P., D. M. Simon et D. Bhattacharya (2005) The natural history of group I introns. *Trends Genet* 21: 111-119.
- Hawkin, J. D. (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res* 16: 9893-9908.
- Hawksworth, D. L. (2011) Naming *Aspergillus* species: Progress towards one name for each species. *Med Mycol* 49: S70-S76.
- Hertel, K. J. (2008) Combinatorial control of exon recognition. *J Biol Chem* 283: 1211-1215.
- Hong, S. B., S. J. Go, H. D. Shin, J. C. Frisvad et R. A. Samson (2005) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97: 1316-1329.
- Hong, S. B., H. S. Cho, H. D. Shin, J. C. Frisvad et R. A. Samson (2006) Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 477-486.
- Hong, S. B., H. D. Shin, J. Hong, *et al.* (2008) New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Leeuwenhoek* 93: 87-98.
- Horie, Y., P. Abliz, K. Fukushima, K. Okada et G. M. Campos Takaki (2003) Two new species of *Neosartorya* from Amazonian soil, Brazil. *Mycoscience* 44: 397-402.
- Horie, Y., P. Abliz, K. Fukushima, K. Okada et N. B. Gusmão (2001) *Neosartorya takakii*, a new species from soil in Brazil. *Mycoscience* 42: 91-95.
- Horie, Y., M. Miyaji, K. Nishimura, M. F. Franco et K. I. R. Coelho (1995) Two new species of *Neosartorya* from Brazilian soil. *Mycoscience* 36: 159-165.
- Horie, Y., M. Miyaji, K. Nishimura, M. F. Franco et K. L. R. Coelho (1995) New and interesting species of *Neosartorya* from Brazilian soil. *Mycoscience* 36: 199-204.
- Horie, Y., M. Miyaji, K. Nishimura, H. Taguchi et S. Udagawa (1993) *Aspergillus fumisynnematus*, a new species from Venezuelan soil. *Trans Mycol Soc Japan* 34: 3-7.
- Horie, Y., M. Miyaji, K. Yokoyama, S. Udagawa et G. M. C. Takagi (1992) *Neosartorya tatenoi*, a new species from Brazilian soil. *Mycoscience* 33.
- Horn, B. W., G. G. Moore et I. Carbone (2009) Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia* 101: 423-429.
- Horn, B. W., G. G. Moore et I. Carbone (2011) Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 103: 174-183.
- Horn, B. W., J. H. Ramirez-Prado et I. Carbone (2009) The sexual state of *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 101: 275-280.
- Houbraken, J., M. Due, J. Varga, *et al.* (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Stud Mycol* 59: 107-128.
- Hubka, V. *Nedermatofytické keratinofilní mikromycety doprovázející původce onychomykóz* [Bc. Thesis]. Prague: Charles University in Prague; 2008.
- Hubka, V. (2009) *Nedermatofytické vláknité houby izolované při suspektní onychomykóze*. *Mykol Listy* 107: 23-35.
- Hubka, V., K. Mencl, M. Skorepova, P. Lyskova et E. Zalabska (2011) Phaeohyphomycosis and onychomycosis due to *Chaetomium* spp., including the first report of *Chaetomium brasiliense* infection. *Med Mycol*: 1-10.

- Hughes, S. S., C. O. Buckley et D. E. Neafsey (2008) Complex selection on intron size in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Evol* 25: 247-253.
- Chang, P. et T. Stearns (2000) δ -Tubulin and ϵ -tubulin: Two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nat Cell Biol* 2: 30-35.
- Ikemura, T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J Mol Biol* 151: 389-409.
- Ikemura, T. (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2: 13-34.
- Irimia, M., J. L. Rukov, D. Penny, *et al.* (2008) Origin of introns by 'intronization' of exonic sequences *Trends Genet* 24: 378-381.
- James, T. Y., F. Kauff, C. L. Schoch, *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Jedličková, A. (2006) Systémové mykózy. Praha, Maxdorf.
- Jedličková, A., J. Mašata et M. Skořepová (2008) Lokální mykózy. Praha, Maxdorf.
- Jeffares, D. C., T. Mourier et D. Penny (2006) The biology of intron gain and loss. *Trends Genet* 22: 16-22.
- Jørgensen, F. G., M. H. Schierup et A. G. Clark (2007) Heterogeneity in regional GC content and differential usage of codons and amino acids in GC-poor and GC-rich regions of the genome of *Apis mellifera*. *Mol Biol Evol* 24: 611-619.
- Jukes, T. H. et V. Bhushan (1986) Silent nucleotide substitutions and G+C content of some mitochondrial and bacterial genes. *J Mol Evol* 24: 39-44.
- Juneau, K., M. Miranda, M. E. Hillenmeyer, C. Nislow et R. W. Davis (2006) Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. *Genetics* 174: 511.
- Keeling, P. J., M. A. Luker et J. D. Palmer (2000) Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol* 17: 23-31.
- Kirk, K. E. et N. R. Morris (1993) Either α -tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 13: 4465-4476.
- Klich, M. A. (2002) Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht.
- Kobayashi, T., K. Abe, K. Asai, *et al.* (2007) Genomics of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71: 646-670.
- Kong, H. Z. (1997) *Stachybotrys yunnanensis* sp. nov. and *Neosartorya delicata* sp. nov. isolated from Yunnan, China. *Mycotaxon* 62.
- Koonin, E. V. (2006) The origin of introns and their role in eukaryogenesis: A compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol Direct* 1: 22.
- Koonin, E. V. (2009) Intron-dominated genomes of early ancestors of eukaryotes. *J Hered* 100: 618-623.
- Kupfer, D. M., S. D. Drabenstot, K. L. Buchanan, *et al.* (2004) Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryot Cell* 3: 1088-1100.
- Kwon-Chung, K. J. et S. J. Kim (1974) A second heterothallic *Aspergillus*. *Mycologia* 56: 628-638.
- Lavner, Y. et D. Kotlar (2005) Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene* 345: 127-138.
- Li, X. et J. L. Manley (2006) Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev* 20: 1838-1847.
- Lin, Y. S., J. K. Byrnes, J. K. Hwang et W. H. Li (2006) Codon-usage bias versus gene conversion in the evolution of yeast duplicate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14412-14416.
- Lloyd, A. T. et P. M. Sharp (1991) Codon usage in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 230: 288-294.
- Loewe, L. et B. Charlesworth (2007) Background selection in single genes may explain patterns of codon bias. *Genetics* 175: 1381-1393.
- Lynch, M. et A. Force (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473.
- Machida, M., K. Asai, M. Sano, *et al.* (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161.
- Machida, M., O. Yamada et K. Gomi (2008) Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. *DNA Res* 15: 173-183.
- Majewski, J. et J. Ott (2002) Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res* 12: 1827-1836.
- Malloch, D. et R. F. Cain (1972) The *Trichocomataceae*: ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Canadian Journal of Botany* 50: 2613-2628.
- Marais, G., P. Nouvellet, P. D. Keightley et B. Charlesworth (2005) Intron size and exon evolution in *Drosophila*. *Genetics* 170: 481-485.

- Martin, W. et E. V. Koonin (2006) Introns and the origin of nucleus-cytosol compartmentalization. *Nature* 440: 41-45.
- Mattick, J. S. et M. J. Gagen (2001) The evolution of controlled multitasked gene networks: The role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Mol Biol Evol* 18: 1611-1630.
- Maxwell, E. S. et M. J. Fournier (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* 64: 897-934.
- May, G. S. (1989) The highly divergent β -tubulins of *Aspergillus nidulans* are functionally interchangeable. *J Cell Biol* 109: 2267-2274.
- May, G. S., J. Gambino, J. A. Weatherbee et N. R. Morris (1985) Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* 101: 712-719.
- May, G. S., M. L. S. Tsang, H. Smith, S. Fidel et N. R. Morris (1987) *Aspergillus nidulans* β -tubulin genes are unusually divergent. *Gene* 55: 231-243.
- McLennan, E. I., S. C. Tucker et L. B. Throver (1954) New soil fungi from Australian heathland: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Spegazzinia*. *Aust J Bot* 2: 355-364.
- McLeod, S. D. (2009) Fungal keratitis. In: *Ophthalmology*. M. Yanoff & J. S. Duker. China: Mosby, Elsevier: 271-273.
- Michiels, F., D. Falkenburg, A. M. Müller, *et al.* (1987) Testis-specific β 2 tubulins are identical in *Drosophila melanogaster* and *D. hydei* but differ from the ubiquitous β 1 tubulin. *Chromosoma* 95: 387-395.
- Mogensen, J. M., J. Varga, U. Thrane et J. C. Frisvad (2009) *Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2. *International Journal of Food Microbiology* 132: 141-144.
- Monteiro, M. J. et D. W. Cleveland (1988) Sequence of chicken β 7 tubulin. Analysis of a complete set of vertebrate β -tubulin isotypes. *J Mol Biol* 199: 439-446.
- Morgan, J., K. A. Wannemuehler, K. A. Marr, *et al.* (2005) Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: Interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 43: S49-S58.
- Moriyama, E. N. et J. R. Powell (1998) Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 26: 3188-3193.
- Morris, N. R., M. H. Lai et C. E. Oakley (1979) Identification of a gene for α -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 16: 437-442.
- Najafabadi, H. S., H. Goodarzi et R. Salavati (2009) Universal function-specificity of codon usage. *Nucleic Acids Res* 37: 7014-7023.
- Najafabadi, H. S. et R. Salavati (2008) Sequence-based prediction of protein-protein interactions by means of codon usage. *Genome Biol* 9: R87.
- Natzle, J. E. et B. J. McCarthy (1984) Regulation of *Drosophila* α - and β -tubulin genes during development. *Developmental Biology* 104: 187-198.
- Nielsen, M. G., F. R. Turner, J. A. Hutchens et E. C. Raff (2001) Axoneme-specific β -tubulin specialization: A conserved C-terminal motif specifies the central pair. *Curr Biol* 11: 529-533.
- Nierman, W. C., G. May, H. S. Kim, *et al.* (2005) What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med Mycol* 43: S3-S5.
- Nierman, W. C., A. Pain, M. J. Anderson, *et al.* (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438: 1151-1156.
- Niu, D. K. (2007) Protecting exons from deleterious R-loops: A potential advantage of having introns. *Biol Direct* 2: 11.
- Niu, D. K. (2008) Exon definition as a potential negative force against intron losses in evolution. *Biol Direct* 3: 1-17.
- Nogales, E., S. G. Wolf et K. H. Downing (1998) Structure of the tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-202.
- Noonim, P., W. Mahakarnchanakul, J. Varga, J. C. Frisvad et R. A. Samson (2008) Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1727-1734.
- Novembre, J. A. (2002) Accounting for background nucleotide composition when measuring codon usage bias. *Mol Biol Evol* 19: 1390-1394.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller et P. S. Dyer (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457: 471-474.
- O'Donnell, K. et E. Cigelnik (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7: 103-116.
- Oakley, B. R. et N. R. Morris (1980) Nuclear movement is β -tubulin-dependent in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 19: 255-262.
- Oakley, B. R. et N. R. Morris (1981) A β -tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* 24: 837-845.

- Oakley, B. R., C. E. Oakley, Y. Yoon et M. K. Jung (1990) γ -Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289-1301.
- Ohno, S. (1970) Evolution by gene duplication. London, George Allen & Unwin Ltd.
- Orbach, M. J., E. B. Porro et C. Yanofsky (1986) Cloning and characterization of the gene for β -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol Cell Biol* 6: 2452-2461.
- Osterman, A. et R. Overbeek (2003) Missing genes in metabolic pathways: a comparative genomics approach. *Curr Opin Chem Biol* 7: 238-251.
- Padhye, A. A., J. H. Godfrey, F. W. Chandler et S. W. Peterson (1994) Osteomyelitis caused by *Neosartorya pseudofischeri*. *J Clin Microbiol* 32: 2832-2836.
- Panaccione, D. G. et R. M. Hanau (1990) Characterization of two divergent β -tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Gene* 86: 163-170.
- Payne, G. A., W. C. Nierman, J. R. Wortman, et al. (2006) Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med Mycol* 44: 9-11.
- Pel, H. J., J. H. De Winde, D. B. Archer, et al. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 25: 221-231.
- Perrone, G., J. Varga, A. Susca, et al. (2008) *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1032-1039.
- Peterson, S. W. (1992) *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Mycol Res* 96: 547-554.
- Peterson, S. W. (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100: 205-226.
- Peterson, S. W., J. Varga, J. C. Frisvad et R. A. Samson (2008) Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. In: *Aspergillus in the genomic era*. J. Varga & R. A. Samson. Wageningen: Wageningen Academic Publishers.
- Pildain, M. B., J. C. Frisvad, G. Vaamonde, et al. (2008) Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 725-735.
- Pitt, J. I. et A. D. Hocking (2009) Fungi and food spoilage. Heidelberg, Springer Verlag.
- Pitt, J. I., R. A. Samson et J. C. Frisvad (2000) List of accepted species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus*: Amsterdam: Harwood Academic Publishers: 9-47.
- Pozzoli, U., G. Menozzi, G. P. Comi, et al. (2007) Intron size in mammals: complexity comes to terms with economy. *Trends Genet* 23: 20-24.
- Prachumwat, A., L. DeVincentis et M. F. Palopoli (2004) Intron size correlates positively with recombination rate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 166: 1585-1590.
- Ragg, H. (2011) Intron creation and DNA repair. *Cell Mol Life Sci*: 1-8.
- Rao, Y. S., Z. F. Wang, X. W. Chai, et al. (2010) Selection for the compactness of highly expressed genes in *Gallus gallus*. *Biol Direct* 5: 35.
- Raper, K. B. et D. I. Fennell (1965) The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins Co.
- Reed, R. et H. Cheng (2005) TREX, SR proteins and export of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* 17: 269-273.
- Rizzon, C., G. Marais, M. Gouy et C. Biémont (2002) Recombination rate and the distribution of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res* 12: 400-4007.
- Rogozin, I. B., Y. I. Wolf, A. V. Sorokin, B. G. Mirkin et E. V. Koonin (2003) Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr Biol* 13: 1512-1517.
- Roy, S. W. (2004) The origin of recent introns: transposons? *Genome Biol* 5: 251.
- Roy, S. W. et W. Gilbert (2005) The pattern of intron loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 713-718.
- Roy, S. W. et M. Irimia (2009) Mystery of intron gain: new data and new models. *Trends Genet* 25: 67-73.
- Roymondal, U., S. Das et S. Sahoo (2009) Predicting gene expression level from relative codon usage bias: an application to *Escherichia coli* genome. *DNA Res* 16: 13-30.
- Ruiz, F., A. Krzywicka, C. Klotz, et al. (2000) The SM19 gene, required for duplication of basal bodies in *Paramecium*, encodes a novel tubulin, η -tubulin. *Curr Biol* 10: 1451-1454.
- Samson, R. A. (1989) Filamentous fungi in food and feed. *Journal of Applied Microbiology* 67: 27s-35s.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra et J. C. Frisvad (2004) Introduction to food-and airborne fungi. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A., S. Hong, S. W. Peterson, J. C. Frisvad et J. Varga (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol* 59: 147-203.
- Samson, R. A., J. A. M. P. Houbaken, A. F. A. Kuijpers, J. M. Frank et J. C. Frisvad (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 50: 45-61.

- Samson, R. A., P. Noonim, M. Meijer, *et al.* (2007) Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 59: 129-145.
- Samson, R. A., K. A. Seifert, A. F. A. Kuijpers, J. A. M. P. Houbbraken et J. C. Frisvad (2004) Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Stud Mycol* 49: 175-200.
- Samson, R. A. et J. Varga (2009) What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 47: S13-S20.
- Samson, R. A. et J. Varga (2010) Molecular Systematics of *Aspergillus* and its Teleomorphs. In: *Aspergillus: molecular biology and genomics*. M. Machida & K. Gomi. United Kingdom: Caister Academic Press: 19-40.
- Samson, R. A., J. Varga, M. Meijer et J. C. Frisvad (2011) New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *Stud Mycol* 69: 81-97.
- Sato, A., K. Oshima, H. Noguchi, *et al.* (2011) Draft genome sequencing and comparative analysis of *Aspergillus sojae* NBRC4239. *DNA Res* 18: 165-176.
- Sharp, P. M., E. Bailes, R. J. Grocock, J. F. Peden et R. E. Sockett (2005) Variation in the strength of selected codon usage bias among bacteria. *Nucleic Acids Res* 33: 1141-1453.
- Sharp, P. M. et K. M. Devine (1989) Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do "prefer" optimal codons. *Nucleic Acids Res* 17: 5029-5039.
- Sharp, P. M. et W. H. Li (1987) The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15: 1281-1295.
- Sharp, P. M., T. M. F. Tuohy et K. R. Mosurski (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* 14: 5125-5143.
- Sheir-Neiss, G., M. H. Lai et N. R. Morris (1978) Identification of a gene for β -tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 15: 639-647.
- Shemer, A., B. Davidovici, M. H. Grunwald, H. Trau et B. Amichai (2009) Comparative study of nail sampling techniques in onychomycosis. *J Dermatol* 36: 410-414.
- Shemer, A., B. Davidovici, M. H. Grunwald, H. Trau et B. Amichai (2009) New criteria for the laboratory diagnosis of nondermatophyte moulds in onychomycosis. *Brit J Dermatol* 160: 37-39.
- Shemer, A., H. Trau, B. Davidovici, M. H. Grunwald et B. Amichai (2007) Nail sampling in onychomycosis: Comparative study of curettage from three sites of the infected nail. *Nagelproben bei onychomykose: Vergleichsstudie mit einer kurettage an drei stellen des infizierten nagels* 5: 1108-1111.
- Schedl, T., J. Owens, W. F. Dove et T. G. Burland (1984) Genetics of the tubulin gene families of *Physarum*. *Genetics* 108: 143-164.
- Scherer, W. P., J. P. McCreary et W. W. Hayes (2001) The diagnosis of onychomycosis in a geriatric population: a study of 450 cases in South Florida. *J Am Podiatr Med Assoc* 91: 456.
- Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J. Frisvad et P. Van Dijck (2002) On the safety of *Aspergillus niger* - A review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 426-435.
- Smith, G. (1952) *Aspergillus brevipes* n. sp. *Transactions - British Mycological Society* 35: 241-242.
- Smith, N. L. et D. W. Denning (2011) Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *European Respiratory Journal* 37: 865-872.
- Solnica-Krezel, L., M. Diggins-Gilicinski, T. G. Burland et W. F. Dove (1990) Variable pathways for developmental changes in composition and organization of microtubules in *Physarum polycephalum*. *J Cell Sci* 96: 383-393.
- Someya, A., T. Yaguchi et S. I. Udagawa (1999) *Neosartorya sublevispora*, a new species of soil-borne *Eurotiales*. *Mycoscience* 40: 405-409.
- Sørensen, A., P. S. Lübeck, M. Lübeck, *et al.* (2011) *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a new black *Aspergillus* species isolated in Denmark. *Int J Syst Evol Microbiol* doi: 10.1099/ijs.0.029884-0.
- Stajich, J. E., F. S. Dietrich et S. W. Roy (2007) Comparative genomic analysis of fungal genomes reveals intron-rich ancestors. *Genome Biol* 8: 1-13.
- Stevens, D. A., V. L. Kan, M. A. Judson, *et al.* (2000) Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. *Clin Infect Dis* 30: 696-709.
- Stuchlík, D., K. Mencl, V. Hubka et M. Skořepová (2011) Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*: first records of nail infections due to *Onychocola* in the Czech Republic. *Czech Mycol* 63: 83-91.
- Summerbell, R. C., E. Cooper, U. Bun, F. Jamieson et A. K. Gupta (2005) Onychomycosis: A critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol* 43: 39-59.
- Summerbell, R. C., J. Kane et S. Krajden (1989) Onychomycosis, tinea pedis and tinea manuum caused by non-dermatophytic filamentous fungi. *Mycoses* 32: 609-619.
- Summerell, B. A., B. Salleh et J. F. Leslie (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant disease* 87: 117-128.

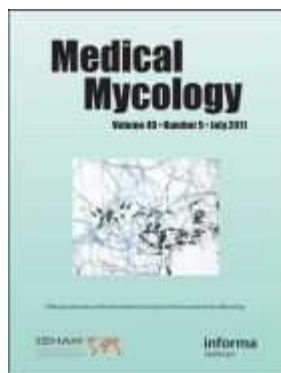
- Sverdlov, A. V., V. N. Babenko, I. B. Rogozin et E. V. Koonin (2004) Preferential loss and gain of introns in 3' portions of genes suggests a reverse-transcription mechanism of intron insertion. *Gene* 338: 85-91.
- Symoens, F., O. Jousson, C. Planard, *et al.* (2011) Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol* 301: 260–266.
- Takada, M., Y. Horie et P. Abliz (2001) Two new heterothallic *Neosartorya* from African soil. *Mycoscience* 42: 361-367.
- Takada, M. et S. I. Udagawa (1985) A new species of heterothallic *Neosartorya*. *Mycotaxon* 24: 395-402.
- Takahashi, A. (2009) Effect of exonic splicing regulation on synonymous codon usage in alternatively spliced exons of *Dscam*. *BMC Evol Biol* 9: 214.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, *et al.* (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* doi:10.1093/molbev/msr121.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins et T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Tomoda, H., H. Nishida, Y. K. Kim, *et al.* (1994) Relative and absolute stereochemistry of pyripropene A, a potent, bioavailable inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT). *Journal of the American Chemical Society* 116: 12097-12098.
- Torgerson, D. G. et R. S. Singh (2004) Rapid evolution through gene duplication and subfunctionalization of the testes-specific $\alpha 4$ proteasome subunits in *Drosophila*. *Genetics* 168: 1421-1432.
- Tuller, T., Y. Y. Waldman, M. Kupiec et E. Ruppin (2010) Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 3645-3650.
- Tzean, S. S., J. L. Chen, G. Y. Liou, C. C. Chen et W. H. Hsu (1990). *Aspergillus* and related teleomorphs from Taiwan. Hsinchu, CCRC Mycological Monographs FIRDI.
- Udagawa, S., N. Toyazaki et H. Tsubouchi (1993) *Neosartorya primulina*, a new species of food-borne ascomycetes. *Mycotaxon* 47: 359-366.
- Udagawa, S., H. Tsubouchi et Y. Horie (1991) *Neosartorya hiratsukae*, a new species of food-borne *Ascomycetes*. *Trans Mycol Soc Japan* 32: 23-29.
- Varga, J., M. Due, J. C. Frisvad et R. A. Samson (2007) Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* 59: 89-106.
- Varga, J., J. C. Frisvad, S. Kocsubé, *et al.* (2011) New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol* 69: 1-17.
- Varga, J., J. C. Frisvad et R. A. Samson (2007) Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* 59: 75-88.
- Varga, J., J. C. Frisvad et R. A. Samson (2010) *Aspergillus* sect. *Aenei* sect. nov., a new section of the genus for *A. karnatakaensis* sp. nov. and some allied fungi. *IMA Fungus* 1: 197-205.
- Varga, J., J. Houbraken, H. A. L. Van Der Lee, P. E. Verweij et R. A. Samson (2008) *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryot Cell* 7: 630-638.
- Varga, J., S. Kocsubé, B. Tóth, *et al.* (2007) *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1925-1932.
- Varga, J., K. Rigó, B. Tóth, J. Téren et Z. Kozakiewicz (2003) Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 41: 29-36.
- Varga, J., B. Tóth, K. Rigó, F. Debets et Z. Kozakiewicz (2000) Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. *Folia Microbiologica* 45: 423-428.
- Vaughan, S., T. Attwood, M. Navarro, *et al.* (2000) New tubulins in protozoal parasites. *Curr Biol* 10: R258-R259.
- Vennewald, I. et E. Klemm (2010) Otomycosis: Diagnosis and treatment. *Clinics in Dermatology* 28: 202-211.
- Verhey, K. J. et J. Gaertig (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6: 2152-2160.
- Vijayraghavan, U., R. Parker, J. Tamm, *et al.* (1986) Mutations in conserved intron sequences affect multiple steps in the yeast splicing pathway, particularly assembly of the spliceosome. *The EMBO Journal* 5: 1683.
- Vinh, D. C., Y. R. Shea, P. A. Jones, *et al.* (2009) Chronic invasive aspergillosis caused by *Aspergillus viridinutans*. *Emerg Infect Dis* 15: 1292-1294.
- Vinh, D. C., Y. R. Shea, J. A. Sugui, *et al.* (2009) Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin Infect Dis* 49: 102-111.
- Walshe, M. M. et M. P. English (1966) Fungi in nails. *Brit J Dermatol* 78: 198-207.
- Warris, A. et P. E. Verweij (2005) Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Mycol* 43: S59-S65.

- Weatherbee, J. A., G. S. May, J. Gambino et N. R. Morris (1985) Involvement of a particular species of beta-tubulin (beta3) in conidial development in *Aspergillus nidulans*. J Cell Biol 101: 706-711.
- Weatherbee, J. A. et N. R. Morris (1984) *Aspergillus* contains multiple tubulin genes. J Biol Chem 259: 15452-15459.
- Wehmer, C. (1907) Zur Kenntnis einiger *Aspergillus* arten. Centr Bakteriol Parasitenk Abt II 18: 385-395.
- Willie, E. et J. Majewski (2004) Evidence for codon bias selection at the pre-mRNA level in eukaryotes. Trends Genet 20: 534-538.
- Wortman, J. R., N. Fedorova, J. Crabtree, et al. (2006) Whole genome comparison of the *A. fumigatus* family. Med Mycol 44: 3-7.
- Wright, F. (1990) The 'effective number of codons' used in a gene. Gene 87: 23-29.
- Xia, L., B. Hai, Y. Gao, et al. (2000) Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*. J Cell Biol 149: 1097-1106.
- Yaguchi, T., Y. Horie, R. Tanaka, et al. (2007) Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. Japanese Journal of Medical Mycology 48: 37-46.
- Yaguchi, T., T. Matsuzawa, R. Tanaka, et al. (2010) Two new species of *Neosartorya* isolated from soil in Xinjiang, China. Mycoscience 51: 253-262.
- Yaguchi, T., A. Someya et S. Udagawa (1994) A new species of *Neosartorya* from Taiwan soil. Mycoscience 35: 309-313.
- Yokotsuka, T. et M. Sasaki (1998) Fermented protein foods in the Orient: shoyu and miso in Japan. In: Microbiology of fermented foods. B. J. B. Wood. London: Blackie Academic and Professional 1: 351.
- Yokoyama, S. et R. Yokoyama (1989) Molecular evolution of human visual pigment genes. Mol Biol Evol 6: 186-197.
- Yuill, E. (1953) A new ascosporic species of *Aspergillus*. Trans Br Mycol Soc 36: 57-60.
- Zhang, J. (2003) Evolution by gene duplication: an update. Trends Ecol Evol 18: 292-298.
- Zhang, L. Y., Y. F. Yang et D. K. Niu (2010) Evaluation of models of the mechanisms underlying intron loss and gain in *Aspergillus* Fungi. J Mol Evol 71: 364-373.
- Zhou, S., D. R. Smith et G. R. Stanosz (2001) Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. Mycol Res 105: 919-926.

INTERNETOVÉ ZDROJE

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=187
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=15631
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=15631
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=129
- <http://www.genome.ou.edu/fungal.html>
- <http://genome.jgi-psf.org/Aspac1/Aspac1.info.html>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- CodonW (J. Peden; <http://codonw.sourceforge.net>)
- <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>

PŘÍLOHY



New aetiological agents and clinico-pathologically unique cases revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular sequencing.

Journal:	<i>Medical Mycology</i>
Manuscript ID:	TMMY-0147-2011
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	18-Jun-2011
Complete List of Authors:	Hubka, Vit; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Botany; Laboratory of Physiology and Genetics of Fungi, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Videnska 1083, Prague 4, 14220 Kubatova, Alena; Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Botany Mallatova, Nada; Hospital Ceske Budejovic, Department of Mycology and Parasitology Sedlacek, Petr; Motol University Hospital, Charles University in Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology Melichar, Jan; Institute for the Care of Mother and Child, Podolske nabrezi 157, Prague 4, 14700 Skorepova, Magdalena; Dermatological Clinic, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague Mencl, Karel; Pardubice Regional Hospital Inc., Department of Clinical Microbiology Lyskova, Pavlina; Regional Institute of Public Health Sramkova, Blanka; Regional Institute of Public Health Chudickova, Milada; Laboratory of Physiology and Genetics of Fungi, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Videnska 1083, Prague 4, 14220 Kolarik, Miroslav
Keyword:	<i>Aspergillus</i> , molecular sequencing, opportunistic infection, non-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	dermatophyte onychomycosis, galactomannan index, imaging methods

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review Only

1
2
3 **New aetiological agents and clinico-pathologically unique cases revealed among 178**
4 **clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterised by molecular**
5 **sequencing.**
6
7
8

9
10 Vit Hubka^{1,2*}, Alena Kubatova¹, Nada Mallatova³, Petr Sedlacek⁴, Jan Melichar⁵, Magdalena
11 Skorepova⁶, Karel Mencl⁷, Pavlina Lyskova⁸, Blanka Sramkova⁸, Milada Chudickova²,
12 Miroslav Kolarik^{1,2}
13
14

15
16
17 ¹Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic;

18 ²Laboratory of Physiology and Genetics of Fungi, Institute of Microbiology, Academy of
19 Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Videnska 1083, Prague 4, 14220;
20

21 ³Department of Mycology and Parasitology, Hospital Ceske Budejovice, Czech Republic;

22 ⁴Department of Pediatric Hematology and Oncology, Motol University Hospital, Charles
23 University in Prague, Czech Republic;
24

25 ⁵Institute for the Care of Mother and Child, Podolske nabrezi 157, Prague 4, 14700, Czech
26 Republic;
27

28 ⁶Dermatological Clinic, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech
29 Republic;
30

31 ⁷Department of Clinical Microbiology, Pardubice Regional Hospital Inc., Czech Republic;

32 ⁸Regional Institute of Public Health, Prague, Czech Republic
33
34

35
36
37 **Keywords** invasive aspergillosis - non-dermatophyte onychomycosis - otomycosis -
38 pulmonary aspergilloma - galactomannan - chronic granulomatous disease
39
40

41
42
43
44
45
46 *Vít Hubka, Corresponding author
47

48
49 Department of Botany

50 Faculty of Science, Charles University in

51 Prague

52 Benatska 2

53 128 01 Praha 2 Czech Republic
54
55
56
57
58
59
60

Email: vit.hubka@seznam.cz

Fax: (+420) 29644 2347

Phone: (+420) 739663218

Abstract

A dataset of 178 *Aspergillus* isolates, recovered from Czech patients mostly from 2007-2011, was subjected to multilocus DNA sequence typing (ITS region, β -tubulin, calmodulin) and morphological analysis. An unusually wide species spectrum included 33 *Aspergillus* species and is discussed in the context of recent taxonomical novelties and previous clinical reports. Invasive aspergillosis (IA), onychomycosis and otitis externa were the predominant clinical entities. Five cases, including species newly discovered as a proven cause of human mycoses, or cases caused by an unusual causal agent with a unique clinical manifestation are discussed in more detail. *Emericella rugulosa* was recovered as the causal agent of a fatal necrotising disseminated infection in a premature newborn and is, for the second time, reported as the cause of IA. Furthermore, we document the first report of an *A. calidoustus* infection in a chronic granulomatous disease (CGD) patient that manifested as a latent brain aspergilloma with an unusual clinico-laboratory manifestation. Three species (*A. insulicola*, *A. westerdijkiae* and *A. tritici*) were identified as the causative agents of non-dermatophyte onychomycosis. In addition to the well-known agents of human mycosis, several rarely isolated or poorly known species were identified. Among them were recently described species, such as *A. lentulus* and *A. calidoustus*, which were characterised by a decreased susceptibility to some common antifungal agents. An isolate of a tentatively new *Eurotium* species was associated with a case of suspected onychomycosis. The notes on the morphology of *A. tritici*, which exhibits substantial differences from the original description, are given, and this taxon needs morphological revision.

Introduction

The genus *Aspergillus* is divided into clusters of closely related species called sections. The polyphasic approach, combining molecular, morphological, physiological and other characteristics, is used to delimit the species within this genus [1]. Presently, of all the abovementioned multilocus data are the most commonly used in the delimitation of species boundaries with genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR) [2]. The majority of *Aspergillus* type strains were sequenced [3], which allows the reliable identification of isolates based on sequence data from variable genes, such as β -tubulin (*benA*), calmodulin (*caM*) and RNA polymerase II (*rpb2*). However, the concept of numerous species had been changed based on molecular data, but appropriate morphological and physiological changes were not published. Thus, the taxonomical status of some species within genus *Aspergillus* awaited revision.

It is difficult to identify the number of clinical isolates to the species level by morphology alone due to overlapping features and the presence of cryptic species. The cryptic species, comprising several medically important taxa, are supported by GCPSR, have unique extrolite profiles (including important mycotoxins) and antifungal susceptibility patterns but lack diagnostic morphological characters. Previous studies have demonstrated notably different antifungal susceptibility profiles across medically important species from the section *Fumigati*, including important differences even between closely related sister species [4,5]. Although these cryptic species are rarely implicated in human diseases, the overall incidence exceeds 5 % of all cases of invasive aspergillosis (IA) caused by species from the section *Fumigati* [6]. Similarly, *A. terreus* comprises several cryptic species [3], one of which was described in 2009 as *A. alabamensis* and is indistinguishable by morphology from *A. terreus* [7]. *A. tubingensis* is a cryptic species in the *A. niger* complex whose phenotypic difference is only detectable by a negative Ehrlich test [8]. Morphological identification based on sexual state in case of teleomorphic species, such as homothallic *Neosartorya*, *Emericella* and *Eurotium*, is time consuming. The features identified on ascospores, and in some cases by scanning electron microscopy, are needed for the exact identification [9,10]. Finding a compatible mating partner is necessary to induce ascomata formation in the heterothallic opportunistic pathogen *N. udagawae* [11], whereas ascomata production may be lacking in some isolates of *N. pseudofischeri* [10]. Therefore, morphology is not a practical method of *Aspergillus* identification for clinical laboratories due to high requirements on time, technological equipment and expertise.

1
2
3 In the medical literature, species recovered from the nails, skin and external auditory canal are
4 usually identified only as *Aspergillus* sp. or in the species complex. The molecular
5 investigations necessary to reliably identify the fungal pathogen are not normally performed,
6 although *Aspergillus* is the most common aetiological agent of otitis externa among
7 filamentous fungi [12,13] and belongs to the most common agent of non-dermatophytic
8 onychomycosis [14]. The *Aspergillus* spp. are reported with varying frequency depending on
9 the geographic area and the criteria used by mycology laboratories [15-17]. However,
10 confirmation of the non-dermatophyte onychomycosis is problematic due to the necessity of
11 repeated sampling. Treatment is often initiated before a second sample is taken or the patient
12 does not present for follow-up sampling; thus, the causality of the isolated non-dermatophyte
13 onychomycosis cannot be confirmed.

14
15 The absence of species identification may lead to inappropriate treatment. Only a reduced
16 number of antifungal drugs are effective against dermatophytes and active against non-
17 dermatophyte filamentous fungi; important differences occur across *Aspergillus* species
18 [6,18].

19
20 The purpose of this study was to summarise the spectrum of *Aspergillus* spp. that occurs in
21 Czech patients. Isolates from superficial infections, IA and some other units are included. The
22 three-step molecular approach based on a comparative sequence analysis of the ITS region,
23 partial β -tubulin and calmodulin genes was used to reliably identify the isolates at the species
24 level and reveal cryptic species as recommended by an international *Aspergillus* working
25 group [9]. Several species that were first implicated in human infection are reported. A
26 number of uncommon species were incorrectly identified by morphology, demonstrating the
27 necessity of molecular markers for *Aspergillus* determination. We hypothesise that these
28 species are frequently misidentified or the identification has not reached the species level.
29 Several studies were recently published that used sequencing to examine the spectrum of the
30 *Aspergillus* species isolated as a cause of IA. A similar study for superficial infections caused
31 by *Aspergillus* is still lacking. In this work, among 178 isolates, over 100 were recovered
32 from superficial infections.

Material and methods

Fungal isolates. A total of 178 clinical isolates of *Aspergillus* originated in the Czech Republic were analysed in this study. The *Aspergillus* isolates were obtained from clinical specimens provided by the following regional institutions from 2007-2010: Department of Mycology and Parasitology, Hospital Ceske Budejovice; Department of Clinical Microbiology, Regional Hospital Pardubice; Dermatological Clinic, First Faculty of Medicine Charles University in Prague; and Institute of Public Health, Prague. The samples originated from well-documented cases that met the inclusion criteria mentioned below and were deposited in the CCF (Culture Collection of Fungi, Department of Botany, Prague) were also included (n=12).

Examined material. The isolates with probable or proven invasive aspergillosis (IA), in accordance with the criteria of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses (EORTC) Study Group [19], were included in dataset as causal agents of IA. Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and pulmonary aspergilloma (PA) were diagnosed based on positive cultivation and microscopy, positive CT or radiograph and positive galactomannan test. Histological specimens were obtained only in some cases: if the EORTC criteria for IA could be applied and the infections could be classified as probable or proven CPA or PA. Material obtained from the airways and lungs (sputum, bronchoalveolar lavage fluid - BAL fluid, endotracheal aspirate, tissue resected from nasal sinuses, pleural punctate, lung biopsy), abscesses, infected wounds and burns was examined microscopically and inoculated onto Sabouraud glucose agar (SGA) plates with and without chloramphenicol and into Sabouraud liquid medium (Bio-Rad) and incubated at 37°C. An additional culture was incubated at 25 °C for specimens recovered from superficial lesions.

The inclusion criteria for isolates from nails used in this study included the following: clinical suspicion of dermatomycosis, a positive KOH test for hyphae not resembling dermatophyte hyphae, the presence of *Aspergillus* in a pure culture and no growth of the dermatophyte. This criteria provided an accurate assessment with a sensitivity of approximately 54 % and a specificity of approximately 70 % for non-dermatophyte onychomycosis according to Summerbell et al. [20], and these cases were designated in Table 1 and Supplementary Table 1 as "suspected onychomycosis" (SO). Temporally separated samples from the same nail that provided a sensitivity of approximately 60 % and a specificity of approximately 100 % [20] were obtained in some cases and were considered to represent "proven non-dermatophyte onychomycosis" (PO). The nail scrapings were inoculated onto slants of Sabouraud glucose

1
2
3 agar (SGA) and onto slants of SGA with chloramphenicol and cycloheximide (both Bio-Rad)
4 and incubated at 25 °C for three weeks.

5
6 Mycotic otitis externa was diagnosed based on the clinical symptoms, the presence of fungal
7 elements in the direct microscopic examination of the scrapped material and a positive
8 cultivation (SGA at 25 °C and 37 °C).
9

10
11 **DNA analysis.** The DNA was extracted from five-day-old colonies using the Microbial DNA
12 Isolation Kit (Mo-Bio Laboratories, Inc.). The Mastercycler Gradient (Eppendorf) was used to
13 amplify the ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) of the rDNA cluster and partial β -tubulin (benA)
14 gene using the primer sets ITS1F or ITS1 and ITS4 or NL4 and Bt2a and Bt2b as described
15 previously [21-23]. The partial calmodulin gene was amplified using the primers CF1M or
16 CF1L and CF4. The mixture (25 μ l) contained 50 ng of genomic DNA, 20 pmol of each
17 primer, 0.2 mM of dNTPs (dNTP master mix, Invitex, Berlin, Germany), and 1 U of
18 DyNAzyme polymerase (Finnzymes) with the respective buffer (Finnzymes, Oy, Finland).
19 The reaction mixtures were subjected to 32 cycles under the following temperature regime: 95
20 °C/3 min, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min (1 \times), 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min (30 \times) and 95
21 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/10 min (1 \times). The PCR products were purified and sequenced using
22 both reverse and forward PCR primers obtained from the Macrogen Corp., South Korea. The
23 species identification was based on sequence similarity with type strains and comparisons
24 with other sequences originating from taxonomical monographs deposited in the GenBank
25 server using the BLAST similarity search. Unique DNA sequences obtained in this study
26 were deposited in GenBank under the accession numbers listed in Supplementary Table 1.
27 The ITS sequences were aligned using the ClustalW algorithm [24]. The cladogram was
28 constructed using the minimum evolution method implemented in MEGA4 [25].
29

30
31 **Morphological observation.** The identity of the isolates was confirmed morphologically. The
32 strains were grown on Czapek-Dox agar, Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA), and malt
33 extract agar (MEA) plates at 25 °C and on CYA at 37 °C. Micromorphology was observed on
34 MEA. For the *Eurotium* species, CZA + 20 % sucrose, in addition to the media listed above,
35 was also used.
36

37
38 **Preservation of strains.** Representative isolates were deposited into the Culture Collection of
39 Fungi (CCF) in the Department of Botany of Charles University in Prague (the internationally
40 recognised culture collection) and are denoted by the prefix CCF (Supplementary Table 1).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Comparative sequence analysis - species spectrum

The identification, site of isolations, frequency and other details from all 178 *Aspergillus* isolates are given in Fig. 1 and listed in Supplementary Table 1.

Forty-six cases of invasive aspergillosis (IA) could be classified according to EORTC criteria as probable or proven IA (Table 1). *Aspergillus fumigatus* was the prevalent causal agent of IA (n=32). Four other isolates belonging to section *Fumigati* were *A. lentulus* and *N. hiratsukae*. The other isolates represented by frequencies below 7 % were *A. calidoustus*, *A. tubingensis*, *A. sydowii*, *E. rugulosa*, *A. flavus* and *A. terreus*.

Fifty-eight isolates representing 24 species were recovered from the nails of patients suspected to have non-dermatophyte onychomycosis. In 18 cases, the infection was confirmed by repeated sampling and classified as proven. *Aspergillus sydowii*, *A. versicolor* s. l. (including *A. versicolor* s. str. and *Aspergillus* sp. "*versicolor*" isolates - see discussion) and *A. terreus* comprised almost 50 % of all isolates. *Aspergillus tritici* and *E. repens* were another species that occurred at a frequency above 5 %. Other species occurred at lesser frequencies (Table 1).

Thirty-two isolates representing 10 species were associated with otitis externa. *Aspergillus flavus* and *A. fumigatus* followed by *A. niger*, *A. tamaritii* and *A. sydowii* were the most common agents (Table 1).

Aspergillus fumigatus (n=8) and *A. terreus* (n=4) were the most common among 20 isolates belonging to nine species isolated from infected wounds and superficial skin lesions (Table 1).

Six of the seven isolates associated with pulmonary aspergilloma were identified as *A. fumigatus*, and in one case, *A. tubingensis* was recovered. All cases (n=6) of chronic pulmonary aspergillosis were caused by *A. fumigatus*. The cases of sinusitis (n=6) were caused by *A. fumigatus*, and *A. flavus* was recovered in one case (Table 1).

Several isolates from our dataset could be identified as previously recognised [3] but still unnamed *Aspergillus* spp. (*Aspergillus* sp. "*petrakii*", *Aspergillus* sp. "*versicolor*", *Eurotium* sp., teleomorphic state of *A. proliferans*). One putative new species of *Eurotium* (see discussion) was discovered.

Case 1: Necrotising disseminated infection due to Emericella rugulosa in a premature newborn

1
2
3 *Emericella rugulosa* was associated with a fatal case of disseminated mycotic infection in a
4 premature newborn. The infant was born at the 25-week gestational age after unsuccessful
5 tocolysis (birth by Internal Podalic Version; weight at birth 790 g). The infant required
6 assisted ventilation. The histology of the placenta and membranes showed signs of purulent
7 chorioamnionitis. The newborn was protected by combined antibiotic therapy. During the first
8 days, respiratory distress syndrome grade III-IV developed, and periventricular-
9 intraventricular haemorrhage stage II-III was discovered. Surfactant doses were administered,
10 and the newborn was transferred to high-frequency oscillatory ventilation. On the 10th day,
11 the infant was haemodynamically unstable, and the hypotension was corrected by
12 catecholamines and volumotherapy. The haemodynamically important ductus arteriosus failed
13 to close after medical treatment (indomethacin) and was surgically ligated (11th day). A
14 necrotic focus, regarded as mycotic, was discovered on the 16th day. Amphotericin B was
15 added to the combined therapy. On the 22th day, the newborn developed septic shock, and
16 respiratory and circulatory support was necessary. On the 24th day, the infant was asystolic,
17 did not respond to cardiopulmonary resuscitation and died. An amphotericin B-resistant
18 (based on disc diffusion method, data not shown) strain, *Emericella rugulosa* (Fig. 2), was
19 cultivated (CCF 3089; FR733850, FR775322, FR751440) from necrotic tissue from the right
20 axilla and pericardial exudate. The central venous catheter entry was considered as the
21 primary site of infection. The thrombophlebitis of the superior vena cava spread via the
22 subclavian vein into the right axilla where a large necrotic lesion developed. Moreover,
23 multiple disseminated metastatic lesions were discovered in the lungs, pleura and kidneys
24 post-mortem.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43
44 ***Case 2: Clinical and laboratory manifestation of latent Aspergillus calidoustus brain***
45 ***pseudoabscess in CGD patient***

46 A case of IA due to *A. calidoustus* was detected in the brain of a 17-year-old boy with X-
47 linked chronic granulomatous disease (X-CGD). The X-CGD was diagnosed at 6 months of
48 age. The patient presented skin and perianal abscesses and fistulae, lymphadenitis and number
49 of respiratory infections in his personal history. More recently, the patient underwent surgery
50 for a bacterial liver abscess and was monitored for gastrointestinal (massive granulomatous
51 changes across the gastrointestinal tract) and urogenital (hyperplastic cystitis) complications
52 of underlying the disease (treated with corticosteroids). At age 17, the boy underwent
53 allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from an unrelated donor.
54 Multiple post-transplant complications occurred, including mucositis, febrile neutropenia,
55
56
57
58
59
60

1
2
3 engraftment syndrome, high blood pressure, progressive renal insufficiency and several
4 reactivations of a cytomegalovirus infection.
5

6
7 The patient was protected by posaconazole and treated in the single isolation room containing
8 a HEPA filter and under positive pressure. On day 39, after the HSCT, the serum
9 galactomannan index (GMI) reached a value of 1.17, and no other clinical signs of IA were
10 present. Although the dose of posaconazole was increased to a therapeutic dose on day 40, the
11 GMI continued to increase (Fig. 3), and the patient became subfebrile with an intermittent
12 headache (C-reactive protein was constantly at a low value; the donor haematopoiesis was
13 98 % on day 42; 2 % was autologous). On day 43, the posaconazole treatment was changed to
14 caspofungin. No signs of mycotic infections were discovered using imaging methods
15 (abdominal ultrasonography, CT of the lungs). The *Aspergillus*-specific RT-PCR from the
16 blood was repeatedly negative. On the 49th day, the patient was febrile with no response to
17 antipyretic therapy, had intensive headaches, and generalised convulsions were present. An
18 MRI of the head revealed evidence of a left temporo-occipital abscess bordered by oedema
19 and petechial haemorrhages (Fig. 4). Due to the suspected mycotic aetiology, voriconazole
20 was added to the caspofungin treatment, anticonvulsive therapy was provided by diazepam,
21 and mannitol was used to decrease the intracranial pressure. The presence of *Aspergillus* was
22 detected in the cerebrospinal fluid (CSF) using RT-PCR. The GMI, although decreased to a
23 value of approximately 1.0, remained positive. On day 63, the focus of infection was
24 surgically extirpated without complications. The boundaries of the focus were poorly defined
25 and corresponded to the definition of a pseudoabscess rather than an abscess. The mycotic
26 hyphae, characteristic of *Aspergillus* species, were observed microscopically. An *Aspergillus*
27 isolate (CCF 3755) with reduced susceptibility to azoles was cultivated (Fig. 4). The species
28 was identified as *A. calidoustus* by sequence data (FR733859, FR775341). The antifungal
29 therapy was changed to amphotericin B, and an MRI of the head (day 83) showed no
30 evidence of a recurrence of infection, although the GMI was positive (1.38). Four ventricular
31 hydrocephaluses developed with signs of acute decompensation. On day 88, the patient
32 suffered from severe headaches, and the level of consciousness was reduced. A
33 ventriculoperitoneal shunt was implanted (the GMI in cerebrospinal fluid was 6.32). Because
34 of the consistently high GMI, liposomal amphotericin B (AmBisome) was applied. The
35 treatment was well tolerated, and the GMI decreased to negative values. On day 119, the
36 serum GMI was positive again, and the MRI examination revealed a recurrence of the brain
37 pseudoabscess. Two foci were excised during the reoperation, and the cultivation was
38 negative, although hyphae were present in the examined material. Postoperatively, the GMI
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 remained consistently negative in blood and in the CSF. No signs of a recurrence of mycotic
4 infection were observed, and the infection was considered as cured. The patient died on day
5 190, after HSCT, because of a brain haemorrhage.

6
7
8 CGD patients with an unrecognised latent infection are at high risk after HSCT. Infections
9 present without any clinical signs, and the GMI is negative in CGD patients. The endured
10 infectious foci are attacked by an increasing number of non-defective granulocytes, and the
11 infection can become reactivated and uncontrolled. The reactivation manifests as a leakage of
12 *Aspergillus* antigens into the body fluids.
13
14
15
16
17

18 19 ***Onychomycosis due to A. insulicola, A. westerdijkiae and A. tritici***

20
21 In all three cases, the non-dermatophyte onychomycosis was confirmed in samples that were
22 temporally separated. The same *Aspergillus* sp. grew repeatedly in pure culture following a
23 positive result by direct microscopy. In all cases, the great toenail was affected.
24
25

26 **Case 3: *A. tritici*** (CCF 3853; FR727136, FR775327) was isolated as the causal agent of
27 distal-lateral subungual onychomycosis of the right great toenail in a 52-year-old man.
28 Conspicuous inflammation of the nail bed was present. The patient was taking regular
29 medication for type 2 diabetes. Treatment of the onychomycosis was not started because of
30 patient's failure to return for therapy.
31
32
33

34
35 **Case 4: *A. westerdijkiae*** (CCF 4006; FR733837, FR775331) was isolated in a 54-year-old,
36 otherwise healthy, woman. The infection manifested as distal-lateral subungual
37 onychomycosis of the left great toenail. There was a history of a successfully treated
38 dermatophyte nail infection of the same nail 10 years ago. Firstly, the patient was treated by
39 oral itraconazole (200mg/day) for a period of 6 months with no improvement. Subsequently, a
40 daily dose of 250 mg of oral terbinafine was administered and the infection was completely
41 cured.
42
43
44
45
46
47

48 **Case 5: *A. insulicola*** (CCF 3901; FR733834, FR775320) was isolated as the cause of white
49 superficial onychomycosis of the right great toenail in a 62-year-old, otherwise healthy,
50 woman. The nail lesion was completely treated by oral terbinafine (250 mg/day).
51
52
53

54 55 ***Notes on the morphology of A. tritici***

56
57 The morphological appearance of two *A. tritici* isolates showed important discrepancies from
58 the original description [26]) and the description published by Varga et al. [27]. The original
59 description is based on one isolate with an atypical morphology showing extensively septated
60 conidiophore, small or inconspicuous vesicles, a reduced number of bulbous sterigmata and

1
2
3 slightly roughened conidia. The micromorphological data from the original description was
4 adapted with minimal changes by Varga *et al.* [27]. We observed following characteristics
5 different from description presented by Varga *et al.* [27]: the vesicle diameter frequently
6 exceeded 11 μm and reached a size 25 μm , the conidia were smooth, and the conidiophores
7 observed on the MEA (medium recommended for micromorphology observation [28]) were
8 without septa. In addition, the photo-documentation of *A. tritici*, published by Varga *et al.*
9 [27], is consistent with these findings. Similarly, Dovicicova [29] observed a disparity
10 between the vesicle diameters from the description of *A. tritici*, although the author observed
11 septate conidiophores on CYA. In this study, *A. tritici* was practically indistinguishable from
12 *A. candidus* based on microscopic features. We examined two additional *A. tritici* isolates
13 maintained in the CCF (CCF 1649 - wheat flour, CCF 3314 - outside air) with the same result.
14 The description of *A. tritici* should be revised based on a higher number of isolates. The
15 growth at 37 °C and colony characteristics, particularly on CZA, seem to be reliable features
16 to distinguish *A. tritici* from *A. candidus*.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 ***Ehrlich reaction in A. calidoustus isolates***

31 The violet reaction should be useful characteristic for distinguishing *A. calidoustus* from some
32 other species within the section *Usti* [30]. We followed the methods of Samson *et al.* [8], and
33 the violet Ehrlich reaction was not observed in the *A. calidoustus* strains included in this study
34 (Suppl. Table 1), not even after new Ehrlich reagent was prepared.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The *Aspergillus* isolates were recovered from Czech patients identified using multilocus DNA sequence typing. The morphology alone was unsatisfactory to provide identification at the species level, although morphological methods were reliably able to identify isolates into sections or species complexes. This fact can be important, particularly when distinguishing species from the section *Fumigati*. In this study, three isolates of *A. lentulus* were revealed among isolates identified as *A. fumigatus*. This cryptic species of *A. fumigatus* is characterised by high MICs to amphotericin B, voriconazole, itraconazole and ravuconazole [4,6,31]. Other species from the section *Fumigati* that had elevated MICs to some antifungals, such as *N. udagawae*, *N. pseudofischeri*, *A. viridinutans* or *A. fumigatiaffinis* [4], were not isolated. One isolate of *Emericella rugulosa* was associated with a fatal disseminated infection (see case report 1). Isolates of *E. rugulosa* show decreased a susceptibility to amphotericin B similar to *E. nidulans* and in contrast to some other *Emericella* spp. [32]. Therefore, distinguishing *Emericella* species may be clinically important. Limited information is available concerning the susceptibility to antifungal agents of species outside the sections *Fumigati*, *Nigri*, *Usti* and *Nidulantes* (*Emericella* spp.). However, these species do not cause life-threatening infections, and the susceptibility pattern can be specific. The treatment of superficial infections might be long term, and recurrences can occur [33]. Molecular identification is not normally performed, although many authors believe that it is important to identify the causal agent in order to use the appropriate treatment. It is also recommended that the choice for an antimycotic treatment should be based on the susceptibility of the identified species to prevent the development of resistance [34,35]

A total of 33 species, based on GCPSR from 12 sections (Fig. 1), were discovered among 178 clinical isolates from Czech patients. Most of the isolates belonged to the section *Fumigati*, although the most species-rich sections were *Nidulantes*, *Circumdati* and *Aspergillus* (Fig. 1). Based on GCPSR (Table 1), the isolates recovered from superficial infections (onychomycosis, skin lesions, otitis externa) involved 29 *Aspergillus* species, and some of them had unresolved taxonomical status. However, we are aware that a part of isolates included in the category "suspected onychomycosis" (Table 1) may represent contaminants according to the liberal simple-association criterion [20]. The limitations in the confirmation of non-dermatophyte onychomycosis are well known (see material and methods). Our data were consistent with the spectrum of previously reported species, and in addition, we revealed a number of species that have never been reported before from clinical material.

1
2
3 Recent molecular studies have revealed several new medically important species inside the
4 section *Fumigati* [36-38]. A number of these species strongly resemble *A. fumigatus* and are
5 frequently misidentified by morphological examinations [10,11,31]. Three species within the
6 section *Fumigati* were recovered from clinical specimens in this study. Of the 73 isolates
7 belonging to section *Fumigati*, 67 were *A. fumigatus*, and from the remaining 6 isolates
8 originally identified as *A. fumigatus* strains with notably poor sporulation, three were *A.*
9 *lentulus* and three were *N. hiratsukae*. *A. fumigatus* was isolated from the broad spectrum of
10 material examined, although the sputum dominated (Table 1). Since its description in 2005
11 [36], *A. lentulus* has been regularly revealed in large clinical studies and comprised a
12 percentage of the isolates from the *A. fumigatus* complex [4,6,31]. *N. hiratsukae* has been
13 isolated as a causal agent of invasive infections and cutaneous lesions in humans [4] and in
14 hedgehog [39]. In contrast to *A. lentulus*, *N. hiratsukae* isolates showed low MICs to all
15 commonly used antifungal agents [4], although only a small number of isolates were tested.
16 The identification of isolates showing elevated MICs of the antifungals used clinically is
17 mandatory, although *in vitro* and *in vivo* correlation studies were not performed. High MICs
18 *in vitro* may not necessarily reflect the decreased susceptibility *in vivo*, especially because
19 growth differences could affect the results [4].
20
21

22
23 The sections *Clavati*, *Cremeri* and *Cervini* have little medical importance and are represented
24 here by a single isolate, respectively. The section *Clavati* is mycotoxicologically important
25 [40], and only sporadic cases of systemic infections [41] and onychomycosis [42] were
26 reported. *Aspergillus wentii* was recently described as a causative agent of otitis externa [43].
27 *Aspergillus kanagawaensis* is a polyphyletic species [3] and has not been reported in
28 connection with clinical material.
29

30
31
32
33 *Aspergillus candidus* has previously been implicated as causative agents in a wide range of
34 human infections, including invasive infections [44,45], otitis externa [46] and
35 onychomycosis [47]. Recently, species from section *Candidi* were examined using the
36 polyphasic approach [27]. The sequence data clarified the validity of the species *A. tritici*,
37 which has been suggested to be synonymous with *A. candidus*. However, according to these
38 data, *A. candidus* cannot grow at 37 °C and is unlikely to cause invasive infections. Therefore,
39 the pathogenic species might be *A. tritici* or white mutants of *A. flavus* [27]. In our dataset,
40 three isolates from the nails and one from the external auditory canal belonging to the section
41 *Candidi* are included. Two isolates identified as *A. candidus* were re-identified, based on
42 sequence data, as *A. tritici*. To our knowledge, we have published here the first case of
43 onychomycosis due to *A. tritici*, although it is possible that *A. tritici* could be the causative
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 agent in some of the previously reported cases of onychomycosis due to *A. candidus* [14,47].
4
5 The isolate CCF 3853 was recovered in two temporally separated samples, and a positive
6
7 KOH test supported the diagnosis of non-dermatophyte onychomycosis. The *A. candidus*
8
9 isolate CCF 3996 was recovered as an aetiological agent of mycotic otitis externa.

10
11 Three species, belonging to the section *Nigri*, were recovered from the sputum, nails and
12
13 external auditory canal. Both isolates from the sputum were identified as *A. tubingensis*. In
14
15 three other cases, rated as airways colonisation, *A. tubingensis* was also isolated (data not
16
17 shown). A recent study on *Aspergillus* isolates recovered from cases of IA in transplant
18
19 patients showed, for the first time, a high percentage of *A. tubingensis* strains among the
20
21 isolates from the *A. niger* complex [6]. Isolates belonging to *A. niger* complex show variable
22
23 susceptibility to azole derivatives [5]. The isolates from the external auditory canal and the nail
24
25 were identified to be *A. niger* and *A. carbonarius* (Table 1).

26
27 *Aspergillus flavus* is treated in medical literature as the second most important *Aspergillus*
28
29 species to cause IA and is known from a broad spectrum of other human and animal diseases
30
31 (summarised by Hedayati et al. [48]). The importance of this fungus increases in regions with
32
33 a dry and hot climate [49]. In this study, *A. flavus* was isolated only once from the sputum,
34
35 and one case of sinusitis due to *A. flavus* was recorded. A high incidence of mycotic otitis
36
37 externa due to species belonging to section *Flavi* was noted. *Aspergillus niger* is usually the
38
39 most common causative agent of otomycosis [34,50,51], and *A. fumigatus* [13] or *A. flavus*
40
41 are rarely dominant [52,53]. A high frequency of *A. niger* might be linked to the different
42
43 sample extraction methods [53]. Among the 11 isolates from the section *Flavi* tested here, 8
44
45 were identified as *A. flavus* and 3 were *A. tamaritii*. As far we know, *A. tamaritii* has only been
46
47 associated once with proven otitis externa [34] in contrast to *A. flavus*, which is regularly
48
49 reported [54]. Previous cases of *A. tamaritii* infections involved eyelid infections, keratitis and
50
51 onychomycosis [55-57]. The species is probably commonly misidentified as *A. flavus*.

52
53 Recently, section *Circumdati* underwent extensive changes [58] and includes taxa with
54
55 unresolved taxonomical position [3]. The species occurs predominantly in specimens from the
56
57 nails and skin. The isolate CCF 4081 from a skin lesion represents an unnamed species that
58
59 was treated in the past as *A. petrakii* [59]. The species is invalid because the type strain was
60
re-identified as *A. ochraceus* [3]. *A. persii* is a newly described species closely related to *A. sclerotiorum* that is known from two cases of onychomycosis [33]. We revealed an additional isolate in our dataset that was implicated in a case of onychomycosis. The morphology was consistent with the original description [60], including the presence of septate club-like enlargements on the hyphae. Another species associated with proven superficial white

1
2
3 onychomycosis was *A. insulicola*, which is rarely isolated from the soil [61,62]. *Aspergillus*
4 *westerdijkiae* was isolated from a nail and superficial skin lesion and represents a newly
5 described species that is morphologically similar to *A. ochraceus* but is unable to grow at
6 37 °C [58]. The case of onychomycosis (isolate CCF 4006) was confirmed by repeated
7 sampling and by a positive microscopic observation. Until now, onychomycosis was
8 reportedly only caused by *A. sclerotiorum*, *A. persii* and *A. ochraceopetaliformis* [33,63,64].
9 The isolate CCF 4008 was recovered as the causative agent of otitis externa and was most
10 closely related to the *A. fresenii* type (the ITS sequence showed a 99 % benA and 98 % caM
11 similarity with strain *A. fresenii* NRRL 6161). *A. fresenii* was treated similarly to *A.*
12 *sulphureus* [65], but recent phylogenetic analysis confirmed its validity [3]. Our results show
13 that the relatively broad spectrum of species belonging to section *Circumdati* might be
14 implicated in nail and skin infections. Six isolates were first identified as *A. sclerotiorum* or *A.*
15 *ochraceus*. Based on the sequence data, all of these isolates were re-identified. Thus,
16 molecular methods should be mandatory to reliably identify species from the section
17 *Circumdati*.
18

19
20
21 ***Aspergillus terreus*** is known from a broad spectrum of infections, including disseminated
22 infections resistant to amphotericin B [66] and cutaneous and nail infections [14]. Invasive
23 infections due to *A. terreus* comprise less than 3 to 10 % of all invasive *Aspergillus* infections
24 [6,67]. In our dataset, the isolates from the nails and skin were dominant, and only one isolate
25 was recovered from sputum. *Aspergillus terreus* was the only *Aspergillus* species isolated
26 from venous ulcerations (Fig. 1, Suppl. Table 1).
27

28
29
30 The section *Usti* includes the recently described human pathogen *A. calidoustus* that is known
31 from approximately 20-30 documented cases of IA, and in half of these cases, skin was
32 suggested as the primary site of infection [6,30]. Isolates that were previously identified as *A.*
33 *ustus* should be considered to be *A. calidoustus* due to the inability of *A. ustus* to grow at
34 37 °C and several other characteristics [30]. Only one case, *A. granulosis*, was reported for
35 another species from the section *Usti* [68]. The resistance of *A. calidoustus* to triazoles and its
36 variable susceptibility to caspofungin is important for managing IA [4-6,69]
37

38
39
40 In present study, three isolates of *A. calidoustus* were recovered from cases of IA. In one case,
41 the brain was infected in a CGD patient. The infection did not manifest clinically before
42 HSCT, and there was no positive *Aspergillus* marker (Fig. 4). The patient was protected by
43 posaconazole and treated in a single isolation room containing a HEPA filter and under
44 positive pressure so that a nosocomial infection was highly improbable. The significant values
45 of circulating galactomannan were detectable after a period of 39 days following HSCT, and
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Aspergillus*-specific RT-PCR failed to detect the pathogen in the blood. The primary site of
4 infection remained unclear. The infection was successfully eliminated using surgical
5 intervention and liposomal amphotericin B.
6
7

8
9 Invasive aspergillosis in CGD patients represents a separate clinical unit with a number of
10 possible exceptions in the clinical presentation. Particularly, the encapsulation of the
11 infectious process and a lower level of angioinvasion could prevent leakage of the *Aspergillus*
12 antigen into the body fluids. Viable fungi could survive in the tissue, while circulating
13 *Aspergillus* markers remained undetectable [70]. The infections caused by *Aspergillus* are one
14 of the most common causes of death in CGD patients [71]. *Aspergillus fumigatus* and
15 *Emmericella nidulans* are the most frequently reported species associated with CGD. An
16 *Aspergillus calidoustus* infection in a CGD patient, as far we know, has not been described.
17
18

19
20 The section *Nidulantes* is a species-rich section that includes a number of medically relevant
21 *Aspergillus* species. *Aspergillus versicolor* s. l. consists of two lineages supported by GCPSR
22 [3]. Eight of the eleven isolates recovered from the nails belonged in the unnamed lineage
23 (isolates designated as *Aspergillus* sp. "*versicolor*"; the lineage includes isolate NRRL 4642
24 [3]), which creates sister clade to the *A. versicolor* s. str. Isolates identified as *Aspergillus*
25 *versicolor* s. l. and *A. sydowii* were the most frequently isolated species recovered from
26 human nails. Torres-Rodriguez et al. [72] previously documented the relatively high
27 incidence of *A. versicolor* as a cause of onychomycosis. The aetiological significance of
28 reported invasive infections [73-76] is controversial because of the absence of growth at 37
29 °C. *A. sydowii* was previously recognised to cause onychomycosis (summarised by Takahata
30 et al. [77]) and peritonitis [78] in patients undergoing dialysis and is an uncommon cause of
31 IA [6]. In this study is represented by two isolates recovered as causative agents of IA. *A.*
32 *unguis* is a rare agent of human onychomycosis [79] and was recovered here from one case of
33 proven onychomycosis. *Emmericella* is a teleomorph associated with the section *Nidulantes*.
34 Invasive infections caused by *Emmericella* spp. appear to occur predominantly in CGD
35 patients. It has been shown that several closely related *Emmericella* spp. are able to cause
36 human and animal infections, including invasive infections, sinusitis, nail and skin infections
37 [6,32,80-82]. Molecular methods or electron microscopy are indispensable tools for
38 distinguishing all of these species [9]. The activity of antifungal agents against some of these
39 species showed elevated MICs to amphotericin B or caspofungin in dependent of the species
40 tested [32]. One case of otitis externa due to *E. nidulans* and a suspected case of
41 onychomycosis due to *E. varicolor* were recorded in this study. An *E. rugulosa* isolate,
42 identified in this study, was recovered as a causal agent of a fatal disseminated infection in a
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 newborn. The isolate had decreased susceptibility to amphotericin B. This lack of
4 susceptibility was discovered too late, and the amphotericin B was unfortunately chosen for
5 treatment. The only previous report of an isolation of *E. rugulosa* in pathological conditions
6 was a case of osteomyelitis in a CGD patient [83]. The isolate, originally identified as *E.*
7 *nidulans*, was reviewed by [32] and re-identified as *E. rugulosa*. Another isolate of *E.*
8 *rugulosa* was associated with bovine abortion [80].

9
10 The species, belonging to the section *Aspergillus* (*Eurotium* spp.), were abundantly
11 recovered from nail and skin lesions. Previous reports involved superficial and disseminated
12 infections caused by *E. amstelodami* (anamorph *A. vitis*), *E. chevalieri* (anamorph *A.*
13 *chevalieri*), *E. herbariorum* (anamorph *A. glaucus*), *E. repens* (anamorph *A. reptans*) and *E.*
14 *rubrum* (anamorph *A. rubrobrunneus*) (summarised by Hoog et al. [84]). In this study, *E.*
15 *amstelodami* with six isolates and *E. repens* (anamorph *A. reptans*) with four isolates were the
16 most frequent species. Although several isolates were previously determined to be *E.*
17 *herbariorum*, all of them were re-identified based on the sequence data. The β -tubulin
18 sequence of two *Eurotium* isolates recovered from nail and skin lesions were 100 % similar to
19 type strain of *A. proliferans* and represent the undescribed teleomorphic state of this species
20 that was considered to be the only strictly anamorphic species in the section *Aspergillus*.
21 Peterson [3] previously associated another two isolates with *A. proliferans*, which created
22 ascomata; nevertheless, a corresponding teleomorph description is still lacking. The β -tubulin
23 and calmodulin sequences of the two isolates, CCF 4097 and CCF 4098, were recovered from
24 nails with suspicious onychomycosis and showed approximately 97 % similarity to sequences
25 deposited in GenBank. The type strain of several species, which was not analysed by Peterson
26 [3], was sequenced (data not shown). The isolate CCF 4097 was identified to be the second
27 known isolate of *E. costiforme*, which was described in 1995 [85]. The isolate CCF 4098
28 represented an undescribed species closely related to *E. herbariorum*, but the morphology of
29 the colonies resembled *E. rubrum*. This species will be described elsewhere.

Conclusion

The isolation of the causal agent of IA and subsequent molecular investigation are essential for an accurate diagnosis and for the initiation of an adequate therapy. The necessity of isolation, correct identification and investigation of antifungal susceptibility are highlighted by three case reports dealing with unusual aetiological agents. In the first fatal case of IA, the causal agent *Emericella rugulosa* was resistant to applied amphotericin B therapy and was isolated post-mortem. In the second case, concerning a brain pseudoabscess in a CGD patient, azole-resistant *A. calidoustus* as the causal agent was eradicated after a subsequent change of treatment following the isolation of the causal agent. Similarly, a case of onychomycosis due to *A. westerdijkiae* was successfully cured after treatment change. Moreover, cryptic species, such as *A. lentulus*, revealed in the dataset have decreased susceptibility to commonly used antifungal agents, and the morphology alone did not lead to an accurate identification. Data on antifungal susceptibility of major causal agents are available, and the susceptibility patterns are usually species-specific; therefore, the correct identification of a causal agent can serve as a prerequisite for a target-related treatment. The identification of clinical isolates recovered from non-IA patients is generally only at the generic or species-complex level. Our study revealed a diverse spectrum, including 29 species recovered from superficial infections. The three case reports presented here are the first clinical descriptions of onychomycosis caused by three *Aspergillus* species that were previously considered as non-pathogenic. The calmodulin and β -tubulin gene sequences served as excellent tools for distinguishing between closely related species and helped to provide reliable species identification.

Acknowledgements

This work was supported by the grants MSM6007665801, MSM0021620828 and AV0Z50200510. The authors wish to thank Dagmar Kozakova from Department of Botany in Prague for the lyophilisation of the cultures.

Disclosure of conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

For Peer Review Only

References

1. Samson RA, Varga J. What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 2009; 47: S13-S20.
2. Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW. Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex. *Mycologia* 2006; 98: 436.
3. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 2008; 100: 205-226.
4. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1244-1251.
5. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4514-4517.
6. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the transplant-associated infection surveillance network. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3138-3141.
7. Balajee SA, Baddley JW, Peterson SW, et al. *Aspergillus alabamensis*, a new Clinically relevant species in the section *Terrei*. *Eukaryot Cell* 2009; 8: 713-722.
8. Samson RA, Noonim P, Meijer M, et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud Mycol* 2007; 59: 129-145.
9. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol* 2007; 59: 39-46.
10. Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, et al. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5996-5999.
11. Sugui JA, Vinh DC, Nardone G, et al. *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an emerging agent of aspergillosis: How different is it from *Aspergillus fumigatus*? *J Clin Microbiol* 2011; 48: 220-228.
12. Vennewald I, Schönlebe J, Klemm E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. *Mycoses* 2003; 46: 12-18.
13. Kaur R, Mittal N, Kakkar M, Aggarwal AK, Mathur MD. Otomycosis: A clinicomycologic study. *Ear Nose Throat J* 2000; 79: 606-609.

- 1
2
3 14. Gianni C, Romano C. Clinical and histological aspects of toenail onychomycosis
4 caused by *Aspergillus* spp.: 34 cases treated with weekly intermittent terbinafine.
5 *Dermatology* 2004; 209: 104-110.
6
7
- 8 15. Koussidou T, Devliotou Panagiotidou D, Karakatsanis G, *et al.* Onychomycosis in
9 northern Greece during 1994-1998. *Mycoses* 2002; 45: 29-37.
10
11
- 12 16. Ng KP, Saw TL, Madasamy M, Soo Hoo TS. Onychomycosis in Malaysia.
13 *Mycopathologia* 1999; 147: 29-32.
14
15
- 16 17. Gupta AK, Jain HC, Lynde CW, *et al.* Prevalence and epidemiology of
17 onychomycosis in patients visiting physicians' offices: A multicenter Canadian survey of
18 15,000 patients. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 244-248.
19
20
- 21 18. Gupta AK, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine,
22 ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro
23 evaluation of combination antifungal activity. *Brit J Dermatol* 2003; 149: 296-305.
24
25
- 26 19. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, *et al.* Revised definitions of invasive fungal
27 disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive
28 Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious
29 Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008; 46:
30 1813-1821.
31
32
33
- 34 20. Summerbell RC, Cooper E, Bun U, Jamieson F, Gupta AK. Onychomycosis: A critical
35 study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of
36 nondermatophytes. *Med Mycol* 2005; 43: 39-59.
37
38
39
- 40 21. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR
41 to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61:
42 1323-1330.
43
44
45
- 46 22. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. *Amplification and direct sequencing of fungal*
47 *ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, J. SJ, White TJ, eds PCR
48 protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990: 315-322.
49
50
- 51 23. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically
52 amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990; 172: 4238-
53 4246.
54
55
- 56 24. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of
57 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap
58 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.
59
60

- 1
2
3 25. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics
4 analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599.
- 5
6 26. Mehrotra BS, Basu M. Some interesting new isolates of *Aspergillus* from stored wheat
7 and flour. *Nova Hedwigia* 1976; 27: 597-607.
- 8
9 27. Varga J, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi*
10 based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* 2007; 59: 75-88.
- 11
12 28. Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A
13 guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.
14 *Stud Mycol* 2004; 49: 1-173.
- 15
16 29. Dovicicova M. *The study of potentially toxigenic species of the genus Aspergillus and*
17 *associated perfects isolated from wheat grains of Slovak origin* [PhD. Thesis]. Nitra: Slovak
18 University of Agriculture in Nitra; 2010.
- 19
20 30. Varga J, Houbraeken J, Van Der Lee HAL, Verweij PE, Samson RA. *Aspergillus*
21 *calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus*
22 *ustus*. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 630-638.
- 23
24 31. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent
25 misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 2006; 5: 1705-
26 1712.
- 27
28 32. Verweij PE, Varga J, Houbraeken J, *et al.* *Emericella quadrilineata* as cause of
29 invasive aspergillosis. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 566-572.
- 30
31 33. Zotti M, Machetti M, Perotti M, Barabino G, Persi A. A new species, *Aspergillus*
32 *persii*, as an agent of onychomycosis. *Med Mycol* 2010; 48: 656-660.
- 33
34 34. Bassiouny A, Kamel T, Moawad MK, Hindawy DS. Broad spectrum antifungal agents
35 in otomycosis. *J Laryngol Otol* 1986; 100: 867-873.
- 36
37 35. Arthur RR, Drew RH, Perfect JR. Novel modes of antifungal drug administration.
38 *Expert Opin Invest Drugs* 2004; 13: 903-932.
- 39
40 36. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov.,
41 a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 625-632.
- 42
43 37. Peterson SW. *Neosartorya pseudofischeri* sp. nov. and its relationship to other species
44 in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Mycol Res* 1992; 96: 547-554.
- 45
46 38. Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of
47 *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 2005; 97: 1316-1329.
- 48
49 39. Han JI, Na KJ. Dermatitis caused by *Neosartorya hiratsukae* in a hedgehog. *J Clin*
50 *Microbiol* 2008; 46: 3119-3123.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
40. Varga J, Due M, Frisvad JC, Samson RA. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* 2007; 59: 89-106.
 41. Opal SM, Reller LB, Harrington G, Cannady Jr P. *Aspergillus clavatus* endocarditis involving a normal aortic valve following coronary artery surgery. *Clin Infect Dis* 1986; 8: 781-785.
 42. Batista AC, Maia HS, Alecrim IC. Onychomycosis due to *Aspergillus clavatonanicus*. *An Fac Med Univ Recife* 1955; 15: 197-203. [Spanish]
 43. Halsey C, Lumley H, Luckit J. Necrotising external otitis caused by *Aspergillus wentii*: a case report. *Mycoses* 2010; 54: e211-e213.
 44. Ribeiro SCC, Santana ANC, Arriagada GH, Martins JEC, Takagaki TY. A novel cause of invasive pulmonary infection in an immunocompetent patient: *Aspergillus candidus*. *J Infect* 2005; 51: e195-e197.
 45. Linares G, McGarry PA, Baker RD. Solid solitary aspergillotic granuloma of the brain. Report of a case due to *Aspergillus candidus* and review of the literature. *Neurology* 1971; 21: 177-184.
 46. Yassin A, Maher A, Moawad MK. Otomycosis: a survey in the eastern province of Saudi Arabia. *J Laryngol Otol* 1978; 92: 869-876.
 47. Piraccini BM, Lorenzi S, Tosti A. 'Deep' white superficial onychomycosis due to molds. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 532-533.
 48. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 2007; 153: 1677-1692.
 49. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: An emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 2009; 52: 206-222.
 50. Fasanla J, Ibekwe T, Onakoya P. Otomycosis in western Nigeria. *Mycoses* 2008; 51: 67-70.
 51. Kumar A. Fungal spectrum in otomycosis patients. *JK Science* 2005; 7: 152-155.
 52. García-Agudo L, Aznar-Marín P, Galán-Sánchez F, *et al.* Otomycosis due to filamentous fungi. *Mycopathologia* 2011; DOI 10.1007/s11046-011-9427-5.
 53. Gutiérrez PH, Álvarez SJ, Sa udo EGC, *et al.* Presumed diagnosis: Otomycosis. A study of 451 patients. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2005; 56: 181-186.
 54. Harley WB, Dummer JS, Anderson TL, Goodman S. Malignant external otitis due to *Aspergillus flavus* with fulminant dissemination to the lungs. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1052-1054.

- 1
2
3 55. Kristensen L, Stenderup J, Otkjær A. Onychomycosis due to *Aspergillus tamarii* in a
4 3-year-old boy. *Acta Derm Venereol* 2005; 85: 261-262.
5
6 56. Kredics L, Varga J, Kocsubé S, *et al.* Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. *J*
7 *Clin Microbiol* 2007; 45: 3464-3467.
8
9 57. Degos R, Segretain G, Badillet G, Maisler A. Aspergillosis of the eyelid. *Bull Soc Fr*
10 *Mycolog Med* 1970; 77: 732-734. [French]
11
12 58. Frisvad JC, Frank JM, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Samson RA. New ochratoxin
13 A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Stud Mycol* 2004; 50: 23-43.
14
15 59. Raper KB, Fennell DI. *The genus Aspergillus*: Baltimore, Williams & Wilkins Co.;
16 1965.
17
18 60. Zotti M, Montemartini Corte A. *Aspergillus persii*: A new species in *Circumdati*
19 section. *Mycotaxon* 2002; 83: 269-278.
20
21 61. Montemayor L, Santiago AR. *Aspergillus insulicola* sp. nov. *Mycopathologia* 1975;
22 55: 125-137.
23
24 62. Göçmen H, Özkan VK. A research on the microfungus flora of some greenhouse soils
25 in the vicinity of LapsekiÇanakkale, Turkey. *Mycopathologia* 2002; 153: 103-112.
26
27 63. Chauvin MF, Bievre C. Nail and periungual wall infection caused by *Aspergillus*
28 *sclerotiorum*. *Bull Soc Fr Mycolog Med* 1985; 144: 77-79. [French]
29
30 64. Brasch J, Varga J, Jensen JM, Egberts F, Tintelnot K. Nail infection by *Aspergillus*
31 *ochraceopetaliformis*. *Med Mycol* 2009; 47: 658-662.
32
33 65. Christensen M. The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils
34 and a synoptic key. *Mycologia* 1982; 74: 210-225.
35
36 66. Steinbach WJ, Benjamin Jr DK, Kontoyiannis DP, *et al.* Infections due to *Aspergillus*
37 *terreus*: A multicenter retrospective analysis of 83 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 192-198.
38
39 67. Iwen PC, Rupp ME, Langnas AN, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive pulmonary
40 aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: 12-year experience and review of the literature. *J Clin*
41 *Microbiol* 1998; 26: 1092-1097.
42
43 68. Fakhri MG, Barden GE, Oakes CA, Berenson CS. First reported case of *Aspergillus*
44 *granulosus* infection in a cardiac transplant patient. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 471-473.
45
46 69. Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Houbraken J, *et al.* In vitro activity of nine antifungal
47 agents against clinical isolates of *Aspergillus calidoustus*. *Med Mycol* 2009; 48: 97-102.
48
49 70. Verweij PE, Weemaes CM, Curfs JHAJ, Bretagne S, Meis JFGM. Failure to detect
50 circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive
51 aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3900-3901.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 71. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston Jr RB, *et al.* Chronic granulomatous disease:
4 Report on a national registry of 368 patients. *Medicine* 2000; 79: 155-169.
- 5
6 72. Torres Rodríguez JM, Madrenys Brunet N, Siddat M, López Jodra O, Jimenez T.
7 *Aspergillus versicolor* as cause of onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing
8 to antifungal drugs. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 11: 25-31.
- 9
10 73. Liu Z, Hou T, Shen Q, Liao W, Xu H. Osteomyelitis of sacral spine caused by
11 *Aspergillus versicolor* with neurologic deficits. *Chin Med J* 1995; 108: 472-475.
- 12
13 74. Pagano DL, Girmenia C, Mele L, *et al.* Infections caused by filamentous fungi in
14 patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GINEMA infection
15 program. *Haematologica* 2001; 86: 862-870.
- 16
17 75. Perri P, Campa C, Incorvaia C, *et al.* Endogenous *Aspergillus versicolor*
18 endophthalmitis in an immuno-competent HIV-positive patient. *Mycopathologia* 2005; 160:
19 259-261.
- 20
21 76. Baddley JW, Stroud TP, Salzman D, Pappas PG. Invasive mold infections in
22 allogeneic bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1319-1324.
- 23
24 77. Takahata Y, Hiruma M, Sugita T, Muto M. A case of onychomycosis due to
25 *Aspergillus sydowii* diagnosed using DNA sequence analysis. *Mycoses* 2008; 51: 170-173.
- 26
27 78. Chiu YL, Liaw SJ, Wu VC, Hsueh PR. Peritonitis caused by *Aspergillus sydowii* in a
28 patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Infect* 2005; 51: e159-e161.
- 29
30 79. Grigoriu D, Grigoriu A. Onychomycoses. *Rev Med Suisse Romande* 1975; 95: 839-
31 849. [French]
- 32
33 80. Knudtson WU, Kirkbride CA. Fungi associated with bovine abortion in the northern
34 plains states (USA). *J Vet Diagn Invest* 1992; 4: 181-185.
- 35
36 81. Gugnani HC, Vijayan VK, Tyagi P, *et al.* Onychomycosis due to *Emericella*
37 *quadrilineata*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 914-916.
- 38
39 82. Horre R, Schumacher G, Marklein G, *et al.* Case Report. Maxillary sinus infection due
40 to *Emericella nidulans*. *Mycoses* 2002; 45: 402-405.
- 41
42 83. Dotis J, Panagopoulou P, Filioti J, *et al.* Femoral osteomyelitis due to *Aspergillus*
43 *nidulans* in a patient with chronic granulomatous disease. *Infection* 2003; 31: 121-124.
- 44
45 84. de Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Utrecht:
46 Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2000.
- 47
48 85. Kong H, Qi Z. Two new species of *Eurotium* Link. *Acta Mycol Sin* 1995; 14: 10-16.
- 49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1 The identification of 178 clinical *Aspergillus* isolates and their clinical classifications

causal agent	Invasive aspergillosis				Onychomycosis				Otitis externa		Infected wounds and skin lesions		CPA ^a	PA ^b	sinusitis	Total	%
	proven	probable	Σ	%	proven	suspected	Σ	%	Σ	%	Σ	%					
<i>A. fumigatus</i>	11	21	32	69.6	0	1	1	1.7	8	25.0	8	38.1	7	6	6	68	38.2
<i>A. sydowii</i>		2	2	4.3	3	8	11	19.0	3	9.4	1	4.8				17	9.6
<i>A. terreus</i>		1	1	2.2	5	1	6	10.3	2	6.3	4	19.0				13	7.3
<i>A. flavus</i>		1	1	2.2	1	0	1	1.7	8	25.0		0.0			1	11	6.2
<i>A. sp. "versicolor"</i>			0	0.0	2	6	8	13.8		0.0		0.0				8	4.5
<i>A. niger</i>			0	0.0	1	1	2	3.4	4	12.5		0.0				6	3.4
<i>Eu. amstelodami</i>			0	0.0	0	3	3	5.2	1	3.1	2	9.5				6	3.4
<i>Eu. repens</i>			0	0.0	0	3	3	5.2		0.0	2	9.5				5	2.8
<i>A. calidoustus</i>	2	1	3	6.5			0	0.0		0.0		0.0				3	1.7
<i>A. lentulus</i>	2	1	3	6.5			0	0.0		0.0		0.0				3	1.7
<i>A. tamaritii</i>			0	0.0			0	0.0	3	9.4		0.0				3	1.7
<i>A. tritici</i>			0	0.0	1	2	3	5.2		0.0		0.0				3	1.7
<i>A. tubingensis</i>		2	2	4.3			0	0.0		0.0		0.0		1		3	1.7
<i>A. versicolor</i> s. str.			0	0.0	1	2	3	5.2		0.0		0.0				3	1.7
<i>A. proliferans</i>			0	0.0	0	2	2	3.4		0.0	1	4.8				3	1.7
<i>N. hiratsukae</i>		1	1	2.2	0	2	2	3.4		0.0		0.0				3	1.7
<i>A. candidus</i>			0	0.0	0	1	1	1.7	1	3.1		0.0				2	1.1
<i>A. westerdijkiae</i>			0	0.0	1	0	1	1.7		0.0	1	4.8				2	1.1
<i>Eu. rubrum</i>			0	0.0	0	2	2	3.4		0.0		0.0				2	1.1
<i>A. carbonarius</i>			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. clavatus</i>			0	0.0			0	0.0		0.0	1	4.8				1	0.6
<i>A. freseni</i>			0	0.0			0	0.0	1	3.1		0.0				1	0.6
<i>A. insulicola</i>			0	0.0	1	0	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. kanagawaensis</i>			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. persii</i>			0	0.0	1	0	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. unguis</i>			0	0.0	1	0	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. wentii</i>			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>A. sp. "petrakii"</i>			0	0.0			0	0.0		0.0	1	4.8				1	0.6
<i>Eu. costiforme</i>			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>Em. nidulans</i>			0	0.0			0	0.0	1	3.1		0.0				1	0.6
<i>Em. rugulosa</i>	1		1	2.2			0	0.0		0.0		0.0				1	0.6
<i>Em. varicolor</i>			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
<i>Eurotium</i> sp.			0	0.0	0	1	1	1.7		0.0		0.0				1	0.6
number of isolates	16	30	46		18	40	58		32		21		7	7	7	178	

species represented by only one isolate are separated by interrupted line; ^aCPA. chronic pulmonary aspergillosis; ^bPA, pulmonary aspergilloma; *Eu.* *Eurotium*; *Em.* *Emericella*; *N.* *Neosartorya*

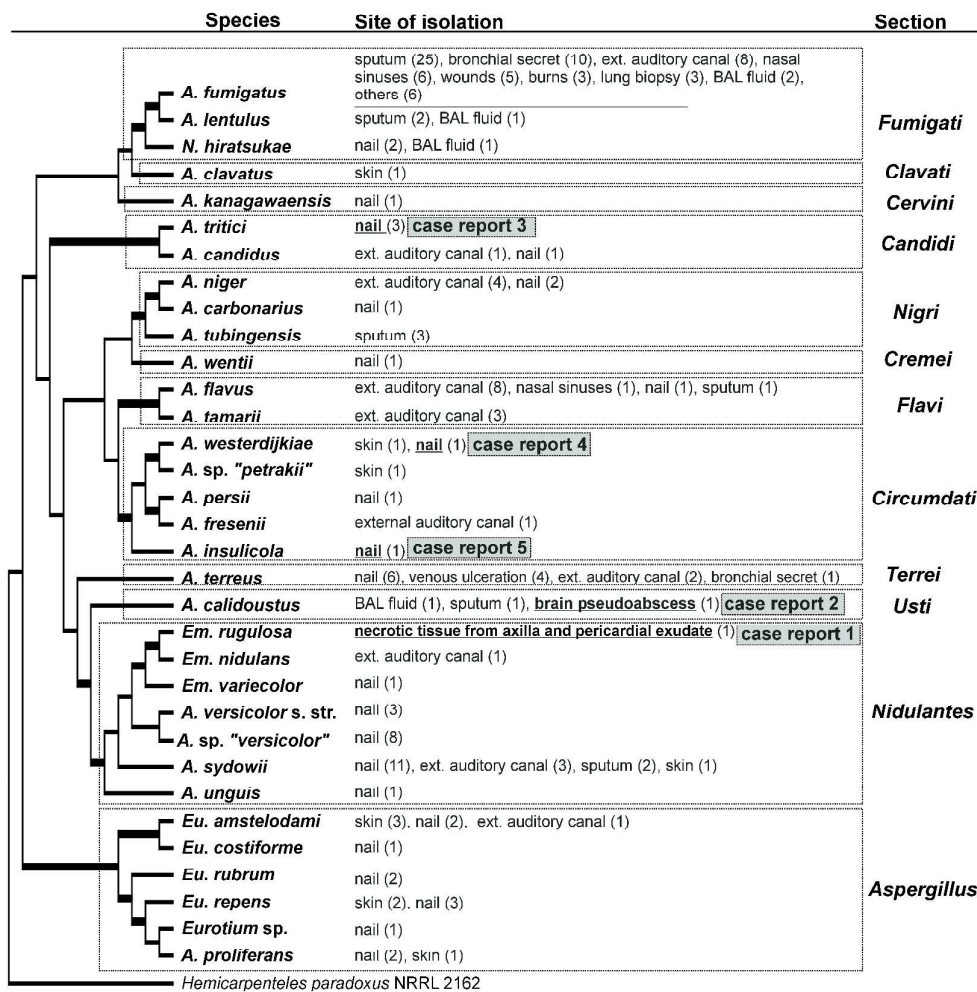


Fig. 1. The cladogram of the 33 *Aspergillus* taxa derived from the ITS region using the minimum evolution method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is presented. The branches were supported with >60 % support and are double thick. The site of the isolation and the number of isolates (in parenthesis) are indicated. N., Neosartorya; Em., Emericella; Eu., Eurotium; ext., external.

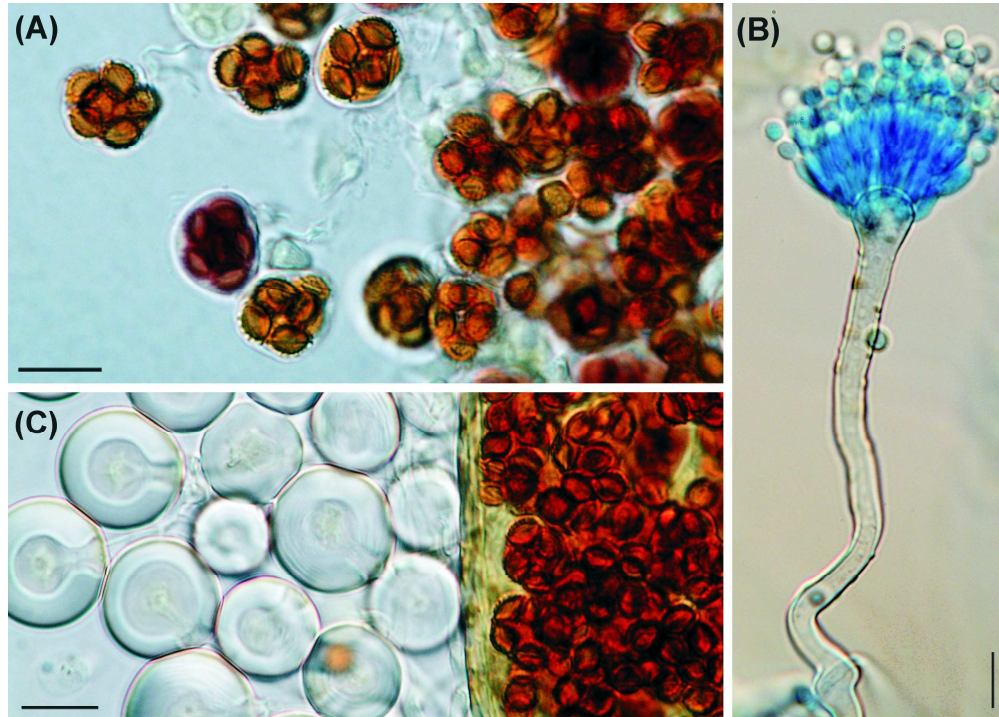


Fig. 2 *Emericella rugulosa* CCF 3089. Eight-spored asci with ascospores containing two equatorial crests and a rugulose convex wall (A); the biseriata conidial head (B); the globose Hülle cells surrounding the surface of the cleistothecia (B); scale bars, 10 µm.

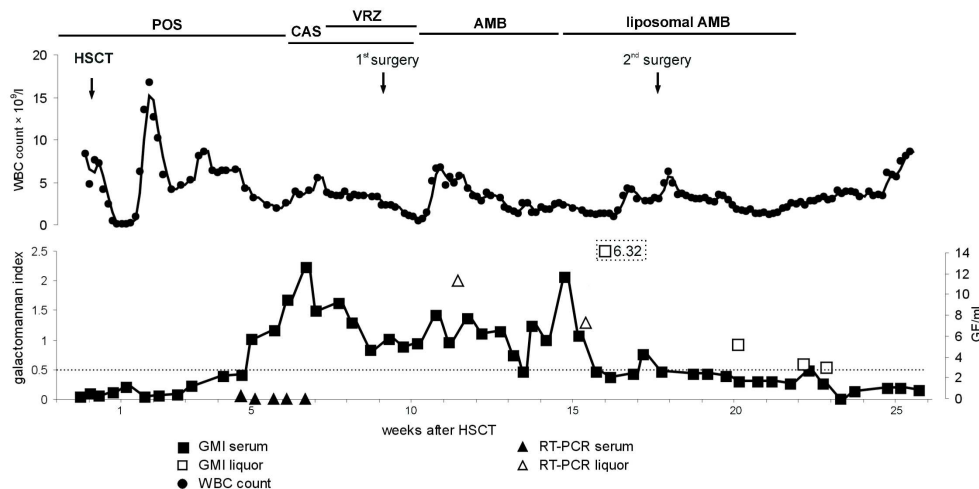


Fig. 3 The results of the galactomannan detection in serum and CSF. A galactomannan index (GMI) >0.5 is considered as positive. The results of the Aspergillus-specific RT-PCR performed with plasma and CSF measured in genomic equivalents per millilitre are indicated (GE/ml). The white blood cell (WBC) count and antifungal agents used in therapy are marked in the upper part of the graph. The fungal antigens began to leak into the blood following the restitution of haematopoiesis after the HSCT. A marked GMI decrease was observed immediately after the therapy with liposomal amphotericin B was initiated. An adequate treatment and surgical intervention were successful in brain infection management.

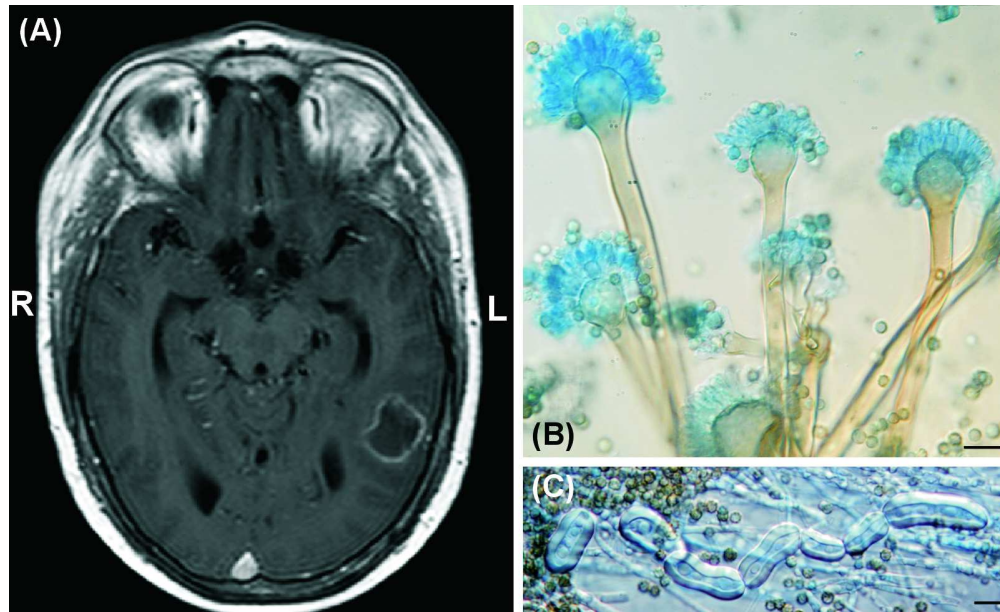


Fig. 4 An MRI of the head showing an abscess in the left temporo-occipital area (A); *Aspergillus calidoustus* CCF 3755 with brown biseriolate conidiophores (B); the elongated Hülle cells (C).

Supplementary Table 1 The complete list of strains used in this study with CCF numbers and EMBL accession numbers.

CCF numbers	section, causal agent	Site of isolation	Status and diagnosis	EMBL accession numbers		
				ITS	benA	caM
<i>Fumigati</i>						
M_356	<i>A. fumigatus</i>	blood	proven IA			
CB_32		brain tissue	proven IA			
CB_6; KL_462		bronchial secret	proven IA			
CCF_3884		liver punctate	proven IA			
CB_11; CB_46		lung biopsy	proven IA			
M_227; M_343; I_4136; I_844		sputum	proven IA			
CB_28		BAL fluid	probable IA			
CB_1; CB_3; CB_38; CB_43		bronchial secret	probable IA			
ME_695		pleural punctate	probable IA			
CCF_3384; CB_4; CB_8; CB_23;		sputum	probable IA	FR733867	FR775354	-
CB_24; CB_33; CB_40; ME_43;						
ME_1834; M_236; M_238; KL_188;						
KL_220; KL_401						
CB_26		tracheal aspirate	probable IA			
CB_9; CB_20		bronchial secret	CPA			
CB_29; I_14; I_29; KL_523;		sputum	CPA			
KL_504						
M_73		BAL fluid	pulmonary aspergilloma			
CB_5; I_449		bronchial secret	pulmonary aspergilloma			
CCF_3522		lung biopsy	pulmonary aspergilloma			
CB_2; ME_202		sputum	pulmonary aspergilloma			
CCF_3623; CB_22; CB_35; I_24		maxillary sinus	sinusitis	FR837958	FR775352	-
I_14271		nasal polyps	sinusitis			
I_1341		sphenoidal sinus	sinusitis			
I_15; I_16; I_17		lacerated wound	infected wound			
CB_10; I_3019		surgical wound	infected wound			
I_13; I_14; I_18		third-degree burn	infected wound			
M_237; M_256; M_261; M_354;		ext. auditory canal	otitis externa			
ME_6; ME_10682; ME_32;						
KOLF_35						
I_282		finger nail	susp. onychomycosis			
CCF_4059	<i>A. lentulus</i>	sputum, pleural punctate	probable IA	FR839681	FR851852	FR751460
CCF_4089		sputum	proven IA			
CCF_3902		BAL fluid	proven IA	FR733864	FR775351	-
CCF_4102	<i>N. hiratsukae</i>	BAL fluid	probable IA	FR837959	FR837969	FR837975
CCF_3988; I_98		toenail	susp. onychomycosis	FR733873	FR775343	FR751435
<i>Clavati</i>						
CCF_2447	<i>A. clavatus</i>	skin	superficial skin lesion	FR733876	FR775374	-
<i>Cervini</i>						
CCF_3945	<i>A. kanagawaensis</i>	toenail	susp. onychomycosis	FR733880	FR775332	FR837972
<i>Candidi</i>						
CCF_3996	<i>A. candidus</i>	ext. auditory canal	otitis externa	FR727137	FR775325	-
CCF_3962		toenail	susp. onychomycosis	FR727138	-	FR751452
CCF_3853	<i>A. tritici</i>	toenail	proven onychomycosis	FR727136	FR775327	-
SK_339; M_574		toenail	susp. onychomycosis			
<i>Nigri</i>						
CCF_3388	<i>A. carbonarius</i>	toenail	susp. onychomycosis	FR727127	FR775314	-
CCF_3990; CCF_4068; CB_42;	<i>A. niger</i>	ext. auditory canal	otitis externa	FR727126	FR775364	FR751421
M_328;				FR733804	FR751414	FR751414
I_250		toenail	proven onychomycosis			
CCF_4067		finger nail	susp. onychomycosis	FR733807	-	FR751443
CCF_4086; I_466	<i>A. tubingensis</i>	sputum	probable IA			
CCF_4087		sputum	pulmonary aspergilloma	FR851851	FR851860	
<i>Cremeri</i>						
CCF_3365	<i>A. wentii</i>	toenails	susp. onychomycosis	FR727118	FR775319	-
<i>Flavi</i>						
M_902	<i>A. flavus</i>	sputum	probable IA			
CCF_4035		nasal polyps	sinusitis			
CCF_3989; CCF_4074; CB_44;		ext. auditory canal	otitis externa	FR733815	FR851861	-
M_9; M_402; M_404; ME_9872;						
ME_44						
I_555		toenail	proven onychomycosis			
CCF_4092; CCF_3874; M_109	<i>A. tamarii</i>	ext. auditory canal	otitis externa	FR837964	FR839685	FR751459
				FR851849	FR851856	
<i>Circumdati</i>						

1							
2	CCF_4008	<i>A. fresenii</i>	ext. auditory canal	otitis externa	FR733823	FR851859	FR751420
3	CCF_3901	<i>A. insulicola</i>	toenail	proven onychomycosis	FR733834	FR775320	-
4	CCF_3987	<i>A. persii</i>	toenail	proven onychomycosis	FR733836	FR851858	FR751419
5	CCF_4007	<i>A. westerdijkiae</i>	skin	superficial skin lesion	FR733833	FR839686	-
6	CCF_4006		toenail	proven onychomycosis	FR733837	FR775331	-
7	CCF_4081	<i>A. sp. "petrakii"</i>	skin	superficial skin lesion	FR733832	FR775369	-
8		<i>Terrei</i>					
9	CCF_3999	<i>A. terreus</i>	bronchial secret	probable IA			
10	CCF_4066; CB_13; CB_15; CB_45		venous ulceration	infected wound	FR837961	FR775338	-
11	M_23; M_37		ext. auditory canal	otitis externa			
12	CCF_4065		finger nail	proven onychomycosis			
13	CCF_3389		toenails and surrounding skin	proven onychomycosis	FR837962	FR775362	FR837976
14	CCF_3993; I_564; I_559		toenail	proven onychomycosis	FR837963	FR775363	-
15	SK_276		toenails	susp. onychomycosis			
16		<i>Usti</i>					
17	CCF_3755	<i>A. calidoustus</i>	brain pseudoabscess	proven IA	FR733859	FR775341	-
18	CCF_2775		sputum	proven IA	FR733860	-	FR751457
19	CCF_4057		BAL fluid	probable IA			
20		<i>Nidulantes</i>					
21	CCF_3621	<i>A. sydowii</i>	bronchial secret	probable IA	FR733840	FR775355	-
22	CCF_3622		sputum	probable IA			
23	CCF_3997; CB_47; M_76		ext. auditory canal	otitis externa			
24	CCF_3691		elbow skin	superficial skin lesion			
25	ME_1393; ME_225; I_458		toenail	proven onychomycosis			
26	I_344		finger nail	susp. onychomycosis			
27	ME_1338; SK_211; SK_474; I_144;		toenail	susp. onychomycosis			
28	I_146; I_210; I_305						
29	CCF_3949	<i>A. unguis</i>	toenail	proven onychomycosis	FR733842	FR775329	-
30	I_445	<i>A. versicolor</i>	finger nail	proven onychomycosis			
31	CCF_4058; CF_3690		toenail	susp. onychomycosis	FR733838	FR775345	FR751437
32					FR733851	FR775337	FR751430
33	CCF_3994; CCF_4034	<i>A. sp. "versicolor"</i>	toenail	proven onychomycosis	FR733848	FR775340	FR751436
34	I_440		finger nail	susp. onychomycosis	FR733839	FR775344	
35	CCF_4073; I_342; I_21; I_65; I_72		toenail	susp. onychomycosis			
36	CCF_3379	<i>Em. nidulans</i>	ext. auditory canal	otitis externa	FR733847	FR851854	FR751431
37	CCF_3089	<i>Em. rugulosa</i>	necrotic tissue from axilla and pericardium	proven IA	FR733850	FR775322	FR751440
38	CCF_4093	<i>Em. varicolor</i>	toenail	susp. onychomycosis	FR839682	FR848829	FR839687
39		<i>Aspergillus</i>					
40	M_240	<i>Eu. amstelodami</i>	ext. auditory canal	otitis externa			
41	CCF_4071		thigh and neck skin	superficial skin lesion			
42	CCF_4069		heel skin	superficial skin lesion	FR839679	FR775356	-
43	CCF_3998		neck skin	susp. onychomycosis			
44	CCF_4070; I_237		finger nail	susp. onychomycosis	FR848825	FR775335	FR751442
45	CCF_4097	<i>Eu. costiforme</i>	toenail	susp. onychomycosis	FR837960	FR837970	FR837974
46	CCF_4011	<i>Eu. repens</i>	back skin	superficial skin lesion	FR839678	FR775358	FR751446
47	CCF_4072		trunk skin	superficial skin lesion			
48	I_97; I_239		toenail	susp. onychomycosis			
49	I_91		finger nail	susp. onychomycosis			
50	CCF_4104; I_88	<i>Eu. rubrum</i>	toenail	susp. onychomycosis	FR848826	FR848830	-
51	CCF_4096	<i>A. proliferans</i>	palm skin	superficial skin lesion	FR848827	FR775375	-
52	CCF_4115; I_93		toenail	susp. onychomycosis	FR851850	FR851855	-
53	CCF_4098	<i>Eurotium sp.</i>	finger nail	susp. onychomycosis	FR848828	FR837968	FR837973

EMBL accession numbers refer to CCF strains bold printed; CPA, chronic pulmonary aspergillosis; **susp.**, suspected; **ext.**, external; *Eu.*, *Eurotium*; *Em.*, *Emericella*; *N.*, *Neosartorya*

Phaeohyphomycosis and onychomycosis due to *Chaetomium* spp., including the first report of *Chaetomium brasiliense* infection

VIT HUBKA*, KAREL MENCL†, MAGDALENA SKOREPOVA‡, PAVLINA LYSKOVA§ & EVA ZALABSKA†

*Department of Botany, Charles University in Prague, Czech Republic, †Department of Clinical Microbiology, Pardubice Regional Hospital Inc., Czech Republic, ‡Dermatological Clinic, Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Czech Republic, and §Regional Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

Chaetomium species have been rarely described as aetiological agents of invasive and dermatomycotic infections in humans. The majority of cases have been reported within the last two decades. Treatment failed in most of these cases. In this paper we present two cases in which *Chaetomium* spp. can be clearly identified as an aetiological agent in pathological conditions. In the first report, we describe a new aetiological agent, *Chaetomium brasiliense*, which was implicated in a case of otitis externa in a patient with spinocellular carcinoma basis cranii. The patient had been repeatedly treated for relapsing otitis externa and had previously undergone surgery several times for otitis media. The fungal aetiology was confirmed by repeated positive culture and histologic studies. The second case involved onychomycosis with strikingly brown nail discoloration due to *Chaetomium globosum* in an otherwise healthy patient. The nail lesion was successfully cured by oral terbinafine. The determination of both species was supported by sequencing of rDNA regions. The morphological aspect of *Chaetomium* spp. identification is also discussed. *In vitro* anti-fungal susceptibility tests demonstrated that both isolates were susceptible to terbinafine and azole derivatives except fluconazole. Amphotericin B was effective only against the *C. brasiliense* strain. We review the literature to summarize clinical presentations, histologic findings, and treatment strategies.

Keywords otitis externa, nail discoloration, antifungal agents, disc diffusion method, cancer patient

Introduction

The increasing incidence of dermatomycotic infections by non-dermatophyte filamentous fungi (NDFF) across several decades is indisputable. However, the incidence of NDFF dermatomycotic infections, particularly onychomycosis, is highly variable and depends upon laboratory methodologies used. The conventional criteria for the diagnosis of NDFF onychomycosis [1] and other dermatomycotic infections were modified and recently re-evaluated [2–5].

Reliable and simplified criteria for the identification of NDFF dermatomycotic infections are an indispensable foundation for the diagnosis and treatment of this problematic clinical entity. It is important to note that only a reduced number of antifungal drugs effective against dermatophytes have action spectra that include NDFF [6].

The term phaeohyphomycosis refers to a heterogeneous group of mycotic infections that are caused by a group of fungi containing melanin pigments in their cell wall. They are called phaeoid fungi (rather than dematiaceous) which also includes members of the genus *Chaetomium*. While there is a variety of definitions, the one based upon histopathological finding is the one most frequently accepted in medical mycology. Employing this definition, phaeohyphomycoses encompass cutaneous, subcutaneous and systemic infections in which the aetiological agent develops

Received 17 December 2010; Received in final revised form 26 February 2011; Accepted: 13 March 2011

Correspondence: Vit Hubka, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benatska 2, 128 01 Praha 2, Czech Republic. Tel: +420 739663218; fax: +420 29644 2347; E-mail: vit.hubka@seznam.cz

in the host tissue in the form of dark-walled phaeoid mycelial elements [7,8].

Chaetomium is a member of the ascomycete family Chaetomiaceae (order Sordariales) and encompasses more than 100 species. Most of the species colonize cellulose-rich substrata, such as plant debris, herbivore dung, paper or textiles [9,10]. Many species produce mycotoxins of medical and agricultural interest [11,12]. *Chaetomium* spp. are generally referred to as soil saprophytes and are also commonly isolated from the soil by techniques for isolation of keratinophilic fungi [13,14]. *Chaetomium globosum* was also detected in the air of special-care units of a hospital [15] and as a contaminant of fluid for peritoneal dialysis [16].

Recently, some species of *Chaetomium* have been reported to be of medical interest as aetiological agents of systemic and dermatomycotic infections [17]. No conidial anamorphs are known in medically important *Chaetomium* species with the exception of *C. strumarium*, which produces small conidia on solitary phialides [18]. Other species propagate strictly by ascospores. Infections due to a fungus without an anamorphic state are exceptional in medical mycology.

In this paper, we report on otitis externa caused by *C. brasiliense* and onychomycosis caused by *C. globosum*. Case report 1 presents the first instance of infection due to *C. brasiliense*. Case report 2 represents the second case of onychomycosis due to *Chaetomium* in Europe in addition to a 2007 Spanish case [19]. Susceptibility to common antifungal agents was characterized in the case isolates and some other clinical strains of *Chaetomium* to approximately assess the antifungal susceptibility pattern. The literature was reviewed to summarize clinico-histopathological presentation and treatment of nail and skin infections due to *Chaetomium* spp. Morphology, as well as sequence data analysis were used in the identification of the isolates. Recommendations and important features for identification of *Chaetomium* spp. are also summarized in this paper.

Case report 1

A 61-year-old woman was admitted to an otorhinolaryngological (ORL) ward in May 2008 with a 2-week history of marked left-sided hearing loss. The patient had had surgery four times for otitis media in her personal history, the last in 1970. She had suffered a head injury with otalgia and infraauricular oedema in 2002 and had previously experienced repeated inflammation in the left auditory canal.

The patient underwent many neurological and ORL examinations in 2007. Hypacusis and hypesthesia anterior to the left tragus and mandible while reclining to the right with an open mouth were diagnosed in August 2007. The frontal wall of the left auditory canal was damaged with

numerous granulations and sanguineous secretions. Progressive, persistent neuralgia of the trigeminal nerve combined with hypaesthesia of the lower lip was followed by incomplete facial paresis in December 2007. Additional symptoms were neurogenic cervicgia and tingling on the left side of the tongue. CT (August 2007) and MRI (June 2007) examinations revealed no clear signs of a tumor. The patient was treated with ciprofloxacin drops for a supposed relapse of bacterial otitis externa (4 drops twice per day for 10 days; this corresponds to 0.6 mg of active substance per day). After 2 weeks of treatment, the patient complained about ringing in her ear and developed fluid in the left ear. Repeated CT examination (May 2008) revealed multiple inflammatory changes in the tympanic cavity and basis cranii. Diagnostic paracentesis of the membrana tympani was performed (June 2008), with several tissue samples recovered for histological and microbiological examination. An invasive, moderately differentiated spinocellular carcinoma was confirmed by histological examination and abundant fungal growth was noted in cultures. The recovery of the fungus led us to perform further examinations of the previously obtained tissue samples (hypertrophic granulation tissue from the external auditory canal and Eustachian tube). Brown walled fungal elements were revealed in the tissue sections. Using Grocott methenamine silver stain (GMS) the fungal structures were highlighted, occasional thick-walled mycotic hyphae and thick-walled spherical mycotic cells were observed (Fig. 1).

Mycotic otitis externa was verified by repeated sampling. The obverse of colonies on Sabouraud glucose agar (SGA) was initially white due to abundant aerial mycelia and later turned grey (Supplementary Fig. 1 – online only), while the reverse was black. The primordia of fruiting bodies with numerous ascotal hairs developed within 2 weeks but failed to mature over several weeks of incubation. The fungus grew rapidly at 37°C. Further studies were conducted on corn meal agar (CMA) and on potato carrot agar

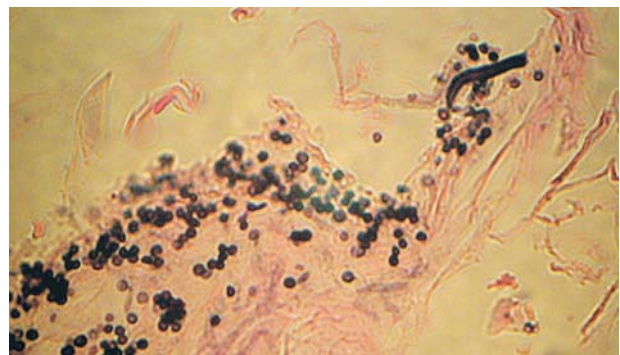


Fig. 1 Histopathology taken from a nodular lesion from the external auditory canal. Occasional thick-walled, mycotic hyphae and thick-walled spherical bodies were discovered using Grocott silver staining.

(PCA) [20]. The fungus grew on these media at 25°C and the isolate was identified as *Chaetomium brasiliense* (Fig. 2, Supplementary Figs. 2–6 – online only) according to Arx *et al.* [10].

Despite these findings, the patient was not subjected to antifungal therapy. Surgical therapy was not indicated due to the advanced stage of the cancer. The patient underwent radiotherapy (70 Gy/33 fractions/7 weeks) and chemotherapy (cis-dichlorodiammineplatinum [II]; 40 mg 4 times in the period of 6 weeks) with no evident improvement. Analgesic therapy was prescribed and the patient was under long-term dispensarization. Serum biochemical and hematological analysis and peripheral blood count remained in the reference limits until the advanced stage of the disease. The patient did not suffer from any other immunosuppressive or chronic disease and died a year later (September 2009) of a bacterial respiratory infection and respiratory failure secondary to advanced cancer.

Case report 2

A 48-year-old male presented with a severe nail infection in December 2006. He first noticed a possible infection in the nail plate of the first digit of the left foot a year earlier following a traumatic haematoma acquired during a basketball game. Later, it spread from the distal margin of the

nail proximally with the nail plate of the left second digit becoming affected. The nails were discoloured, dystrophic and thickened by hyperkeratosis (Fig. 3A).

The patient had previously been treated for flexural eczema with topical corticosteroids. At the time, the eczema manifested intermittently on the hands and was successfully treated by local corticosteroids application. The patient was otherwise healthy and was not regularly taking any other medications.

The direct microscopic examination of the affected nails in 20% KOH mounts revealed aggregates of swollen, thick-walled brown cells and hyphae (Fig. 3B). Nail clippings were inoculated onto SGA slants with and without chloramphenicol (Bio-Rad) and incubated at 27°C. Extensive growth of a non-dermatophyte hyphomycete in pure culture was observed after 2 weeks of incubation and the same fungus was recovered during a subsequent visit. Colonies on SGA were initially white and cottony but became dark olive green with age. Microscopic examination of the colonies showed subglobose perithecia with numerous ascomatal hairs and lemon-shaped ascospores. Growth at 37°C was restricted. Further studies were conducted as described in the first case. The isolate was identified based on its morphology (Fig. 4, Supplementary Figs. 1, 6–8 – online only) as *Chaetomium globosum* according to Arx *et al.* [10].

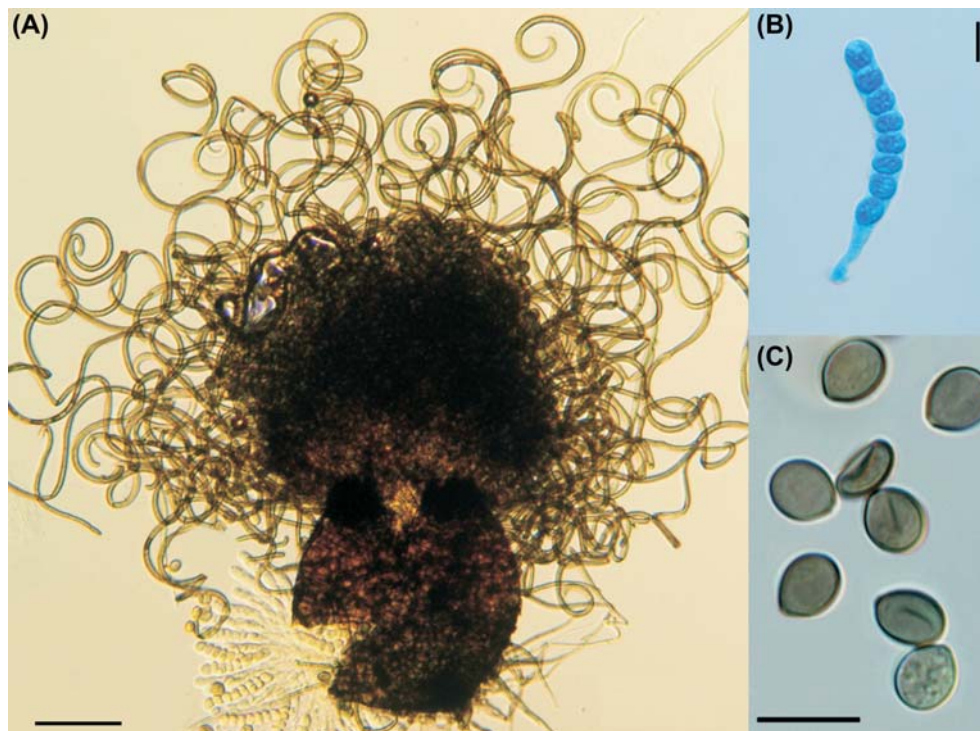


Fig. 2 *Chaetomium brasiliense* CCF 3878 – case 1. Perithecia with spirally coiled ascomatal hairs (A), scale bar, 50 µm; cylindrical ascus (B), scale bar, 10 µm; ovate ascospores (C) with a single germ pore, scale bar, 10 µm.

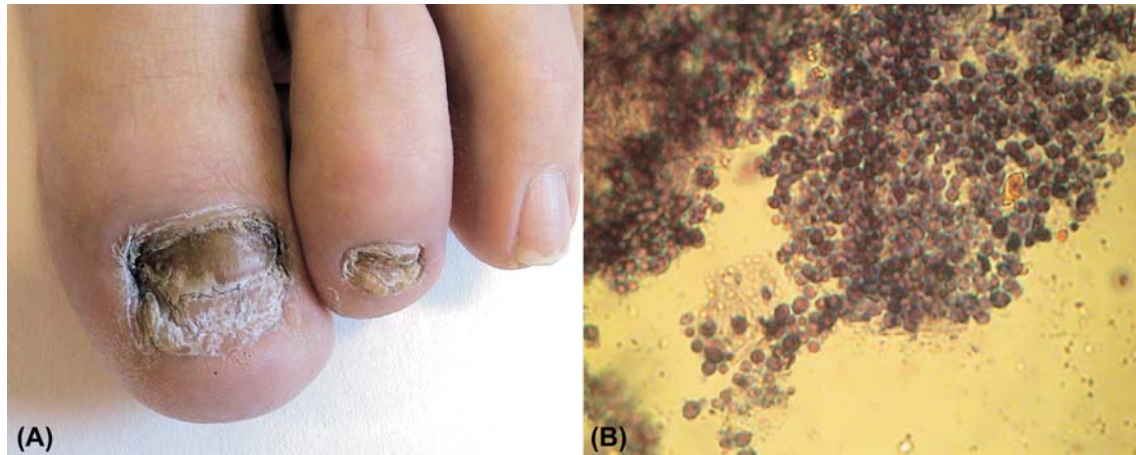


Fig. 3 Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* – case 2. Thickened, dystrophic and hyperpigmented toenails (A). Direct microscopic examination of the nail sample in 20% KOH revealed brown, thick-walled fungal elements (B).

A daily oral dose of terbinafine (250 mg) was administered for 3 months. After 8 months (November 2007), the nail plates showed healthy growth and only slight hyperkeratosis persisted in the nail plate of the left big toe. KOH preparations and cultures were negative.

Materials and methods

Preservation of strains

Cultures of the case isolates were entered into the Culture Collection of Fungi (CCF), Department of Botany, Charles

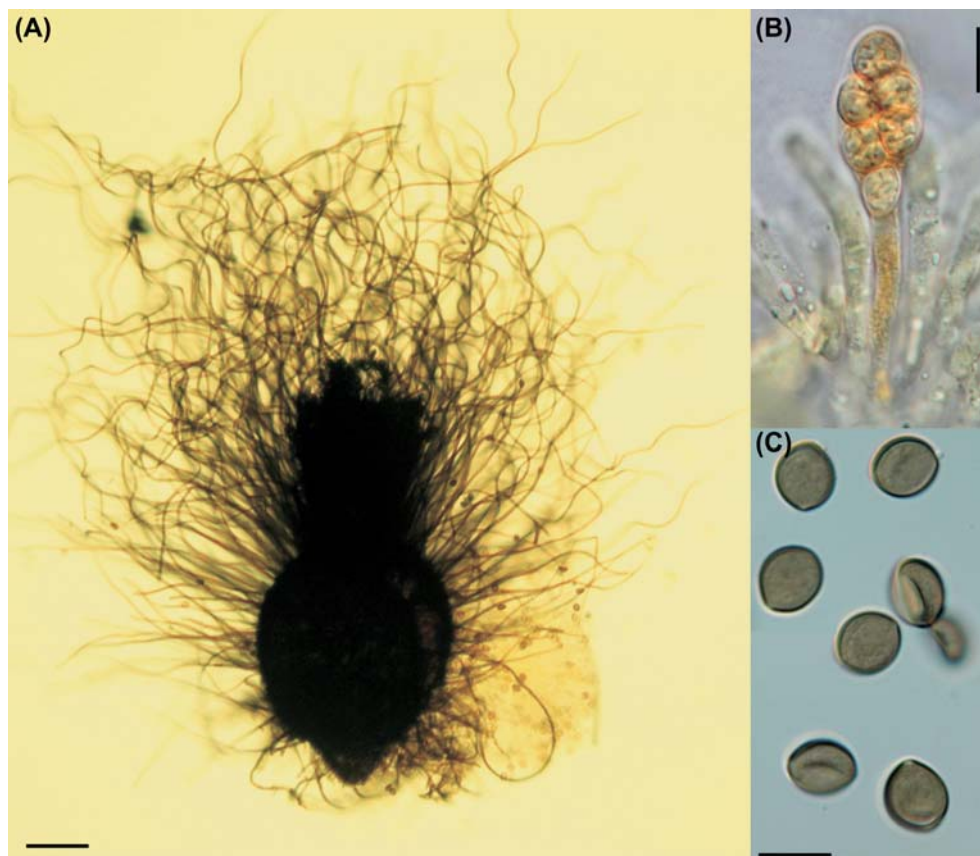


Fig. 4 *Chaetomium globosum* CCF 4060 – case 2. Perithecium with undulate ascomatal hairs (A), scale bar, 100 μm ; clavate ascus (B), scale bar, 10 μm ; limoniform biapiculate ascospores (C), scale bar, 10 μm .

University in Prague, and were designated as stated in Table 1.

Antifungal susceptibility testing

The *in vitro* antifungal drug susceptibility of the *Chaetomium* isolates was investigated by the disc diffusion method. Seven clinical isolates of *Chaetomium* belonging to three species (*C. brasiliense*, *C. globosum*, and *C. funicola*) were chosen for susceptibility testing (Supplementary Table S1 – online only).

Inoculum preparation

The isolates were grown on PCA for 3 weeks at 25°C. The inoculum was prepared by transferring the perithecia via a sterile swab into 15 ml sterile tubes containing 5 ml of sterile distilled water. The suspension was vigorously vortexed for 15 sec. Heavy hyphal fragments and perithecial wall fragments were removed by passing the suspension through a sterile nylon filter (pore size 20 µm). A homogeneous suspension, consisting mainly of ascospores, was adjusted spectrophotometrically at 530 nm by adding sterile water to obtain optical densities that ranged from 0.092–0.110 (78–81% transmittance).

Plate inoculations

Suspensions were applied to the surfaces of 90 mm RPMI 1640 agar plates (TRIOS) by dipping a sterile swab applicator

into the ascospore suspension and streaking it across the surface of the plates in three directions. The plates were allowed to dry at ambient temperature for 20 min.

Disc diffusion method

The paper discs (ITEST) of amphotericin B, 5-fluorocytosine, fluconazole, itraconazole, miconazole, ketoconazole, voriconazole and terbinafine were applied to the surface of the inoculated plates, which were then incubated at 25°C and read after 48 and 72 h. Zone diameters were measured to the nearest whole millimetre at the point where there was a prominent reduction in growth (80%). Zone diameter categories were assigned as susceptible, intermediate (susceptible dose-dependent) and resistant according to the manufacturer's instructions (Supplementary Table S2 – online only).

DNA analysis

Genomic DNA was isolated from 7-day-old cultures using a Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.). Amplification of the rDNA ITS (ITS1-5.8S-ITS2) region was performed using the primers ITS5 and ITS4S. A partial sequence of LSU rDNA was amplified with the primer set NL1 and LR6. PCR amplification was performed using the same cycling conditions for both rDNA regions and followed the procedures described in Kolarik *et al.* [21]. PCR product purification and sequencing was performed

Table 1 Reported cases of dermatomycotic *Chaetomium* infections.

Patient/ Reference	Species	Clinical features	Location	Age/ Sex of patient	Predisposing factor	Treatment outcome
Patient 1	<i>C. brasiliense</i> (CCF [‡] 3878)	Otitis externa [†]	Czech Republic	61/F	Injury of head, surgeries, tumor	No antimycotic therapy
Patient 2	<i>C. globosum</i> (CCF 4060)	Onychomycosis (toenails) [†]	Czech Republic	48/M	Trauma, eczema	Cured
[19]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (toenail)*	Spain	23/M	Football player	Cured
[30]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (toenails)*	USA	83/F	Age	NR
[26]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (fingernails, toenail) [†]	Japan	57/M	Intensive traveling	Improvement
[27]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (fingernails) [†]	Brasil	62/F	Trauma	Failed
[28]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (fingernails) [†]	India	26/M	Trauma	NR
[32]	<i>C. globosum</i>	Onychomycosis (fingernails) [†]	India	25/M	Acid burn	NR
[59]	<i>C. globosum</i>	Subcutaneous phaeohyphomycosis [†]	China	13/M	Farmer	NR
[29]	<i>C. globosum</i>	Subcutaneous phaeohyphomycosis [†]	China	14/M	Immunodeficiency, cardiomyopathy	Failed
[27]	<i>C. globosum</i>	Superficial phaeohyphomycosis [†]	Brasil	64/F	Trauma	Cured
[25]	<i>C. globosum</i>	Superficial phaeohyphomycosis [†]	Italy	46/M	NR	Cured
[60]	<i>C. funicola</i>	Superficial phaeohyphomycosis [†]	Germany	71/M	Age	NR
[58]	<i>C. funicola</i>	Chromoblastomycosis	Panama	83/M	Age, farmer	Failed
[61]	<i>C. murorum</i>	Subcutaneous phaeohyphomycosis [†]	China	25/F	Farmer	NR
[31]	<i>Chaetomium</i> sp.	Onychomycosis (toenails)	Spain	11/F	Eczema	Cured
[47]	<i>Chaetomium</i> sp.	Superficial phaeohyphomycosis [†]	Brazil	8/F	NR	NR

[†]Brown-colored hyphae were observed in direct microscopy.

*Hyaline, septate hyphae were observed in direct microscopy.

[‡]CCF, the isolated are maintained in the Culture Collection of Fungi (CCF), Department of Botany, Charles University in Prague; NR, not reported.

at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Using a BLAST similarity search, obtained sequences were compared with sequences listed on the GenBank server. Sequences were deposited into EMBL database under accession numbers FR718872-3 and FR823008-9.

Results

Disc diffusion method

Drug susceptibility test results for both case isolates are summarized in Table 2 and the results for all seven isolates are included in Supplementary Table S1 – online only. For all antifungal agents, except for amphotericin B, there were no significant differences in the inhibition zone diameters when read after 48 h or 72 h, i.e., the values remained in the same category. For amphotericin B, the diameter of the inhibition zone was markedly reduced after 72 h. *C. funicola* strains, although susceptible after 48 h, were scored as resistant after 72 h (Supplementary Table S1 – online only).

All the *Chaetomium* strains tested showed resistance by the disk diffusion method to 5-fluorocytosine and fluconazole. Conversely, all strains were susceptible to itraconazole, voriconazole, miconazole and ketoconazole. The *C. globosum* strains were resistant to amphotericin B and intermediately susceptible to terbinafine in contrast to the strains of *C. funicola* and *C. brasiliense* that were susceptible.

Molecular data analysis

The morphological identification of the *C. brasiliense* strain CCF 3878 was supported by a partial LSU sequence that was 100% similar to the *C. brasiliense* strain sequenced by Untereiner *et al.* [22]. Sequence of the ITS region showed only a 92–93% similarity to some related *Chaetomium* spp. and to some other genera of ascomycetes. No sequence of the ITS region of *C. brasiliense* had previously been deposited into GenBank.

The ITS, as well as partial LSU sequence of the *C. globosum* strain CCF 4060 was 100% similar to *C. globosum* isolates sequenced by Sugiyama *et al.* [23] and to some

other *C. globosum* isolates deposited in the internationally recognized culture collections. The LSU region was 99% (535/537 bp) similar to *C. globosum* isolate MUCL 39889 sequenced by Untereiner *et al.* [22]. In addition, the ITS sequence showed 100% similarity to '*C. brasiliense*' strain NRRL 22999 (GU183109) and the LSU sequence was 100% similar to '*C. murorum*' strain UOA 9860 (GQ376100).

Discussion

Chaetomium spp. are not considered to be keratinolytic, although they are frequently isolated from soil via the hair baiting technique [13,14]. In the natural process of keratinized substrates degradation, *Chaetomium* spp. may contribute significantly at a certain stage of succession, and participate in the degradation of complex substances in a natural scenario [14,24]. This suggests that *Chaetomium* spp. have the potential to degrade damaged nails and skin. Age-related nail and skin changes, including reduced function, are well known. Phaeohyphomycoses are generally believed to occur as a result of traumatic implantation of fungal material from contaminated plants or soil, other cases have been reported in elderly, as well as immunodeficient patients [8]. Similarly, *Chaetomium* spp. typically cause nail and skin infections secondary to some transient insult or secondary to some underlying problem, although a few cases without evident primary insult have been reported [25,26]. These infections are characterized by chronicity and difficulty in treatment. The infection progresses slowly and patients usually present several years after its initiation [19,27,28].

Nail and skin infections incited by *Chaetomium* spp. occur predominantly in posttraumatic immunocompetent patients, with only one case reported in a patient with evident immunodeficiency [29] (Table 1). Clinical presentations of cutaneous infections include superficial phaeohyphomycosis, deep subcutaneous phaeohyphomycosis, or chromoblastomycosis (Table 1). One case of erythematous epilation in a dog due to *C. globosum* has been described [23]. Nail infections manifest as onychomycosis with strikingly brown to black [27,28,30], or yellow-brown [19,26,31,32] discoloration. Toenails, as well as fingernails may be affected and the lesions may spread to the surrounding skin [27]. Similarly, the intensive brown to brown-black nail discoloration may occur in nail lesions caused by some other filamentous fungi such as *Trichophyton rubrum* var. *nigricans*, *Scytalidium dimidiatum*, *Alternaria alternata*, *Microascus desmosporus* [33], *Curvularia lunata* [34], *Exophiala dermatitidis* [35], *Fusarium oxysporum* [36], *Aspergillus* spp. [37], *Onychocola canadensis* [38,39] and *Scopulariopsis brumptii* [40]. In differential diagnosis it may be important to exclude melanonychia associated with subungual melanoma in some instances [39].

Table 2 Disk diffusion method results after 48 h incubation.

Examined strain	Antifungal agent							
	AMB	VOR	ITR	TER	MIC	KET	5-FC	FLU
<i>C. brasiliense</i> CCF 3878 (case 1)	S	S	S	S	S	S	R	R
<i>C. globosum</i> CCF 4060 (case 2)	R	I	S	I	S	S	R	R

AMB, amphotericin B; VOR, voriconazole; ITR, itraconazole; TER, terbinafine; MIC, miconazole; KET, ketoconazole; 5-FC, 5-fluorocytosine; FLU, fluconazole; S, sensitive; I, intermediately susceptible; R, resistant.

C. globosum is clearly the predominant species in dermatomycotic infections and the only species of the genus *Chaetomium* that has thus far been isolated as an aetiological agent of onychomycosis. Until now, onychomycosis due to *C. globosum* has been described from several tropical countries and from Japan, USA and Spain (Table 1). The present case is the second published case from Europe. Another related species, *C. funicola* and *C. murorum*, were isolated three times from subcutaneous lesions (Table 1). Systemic *Chaetomium* infections include about 20 documented cases in leukemic and transplanted patients and several intravenous drug users (summarized by Al-Aidaros *et al.* [41]). The infections manifested as pneumonia, empyema, and disseminated disease with the brain commonly affected. With several exceptions, these infections were fatal [41,42].

Optimal growth of *C. globosum* occurs at 30°C. This probably explains the predilection of *C. globosum* for cooler body areas such as the superficial skin layers and nails. Although *C. globosum* is ubiquitous and, therefore, has the potential to cause systemic infections in immunocompromised hosts, such cases are typical of other *Chaetomium* spp. with higher growth optima [42]. *Chaetomium atrobrunneum*, *C. strumarium*, and *C. perlucidum* were reported as aetiological agents of systemic infections. In contrast to *C. globosum*, these three species grow rapidly at 37°C [42]. *C. brasiliense* is another *Chaetomium* species with significant growth at this same elevated temperature. In this aspect, *C. brasiliense* resembles the species of *Chaetomium* that cause disseminated infections and differs from *C. globosum* and *C. funicola*.

Chaetomium brasiliense was previously reported (under the synonymous species name *C. perpulchrum*) as a causative agent of onychomycosis [27]. Published pictures clearly show important differences between this strain and the micro-morphology of *C. brasiliense*. The case was reviewed by Guarro *et al.* [43] and Abbott *et al.* [18] and the strain was re-identified as *C. globosum*. Nevertheless, this case report is still occasionally incorrectly cited in the literature [19,44,45]. The morphological features that are useful in

the differentiation of clinically relevant *Chaetomium* spp. recovered from nail and skin infections are summarized in Table 3. PCA medium (or CMA, according to the recommendations of Arx *et al.* [10]) is the most suitable medium for identification of *Chaetomium* spp. When grown on PCA, characteristic features are well-developed, perithecia mature rapidly, and the aerial mycelium is minimized (Supplementary Fig. 1). On SGA, despite rapid growth and mass of the aerial mycelium, the fruiting bodies remain immature for a long period and not all features are well developed. This could explain the frequent erroneous identification of the genus and unsatisfactory photo documentation in some published cases (e.g., immature perithecia are shown [25,26,46,47]). Some of the case reports were subsequently revised, and the etiologic agents were re-identified [18,43]. Use of SGA is inappropriate for the morphological identification of *Chaetomium* spp. despite its prevailing use within the medical community.

Morphological identification of the case isolates was in agreement with ITS and LSU sequence data. Although ITS sequence of the case 2 isolate (FR823008) displayed 100% identity to sequences of *C. globosum*, the results indicated close identity to one of '*C. murorum*' UOA 9860 (GQ376100). Similarly, LSU sequence of the case 2 isolate (FR823009) was identical to one of '*C. brasiliense*' NRRL 22999 (GU183109). The only sequence-based phylogeny dealing with the genus *Chaetomium* is based on LSU data [22]. The partial LSU sequence of strain NRRL 22999 shows 3% dissimilarity (15/500 bp) in LSU sequence to those of *C. brasiliense* (AF286396.1) as published by Untereiner *et al.* [22] and to LSU sequence of case 1 isolate (FR718873). The LSU sequence of the isolate *C. globosum* MUCL 39889 (AF286403) and *C. murorum* MUCL 40179 (AF286405) sequenced by Untereiner *et al.* [22] show 2% (17/100 bp) dissimilarity. It is unlikely for *C. murorum* to have a 100% similar ITS sequence to *C. globosum* isolates and simultaneously a dissimilar LSU sequence. It suggests with high probability that both isolates (NRRL 22999, UOA 9860) are misidentified. The data from taxonomic monographs should be considered as more reliable. *C. brasiliense* has,

Table 3 The morphological features differentiating clinically relevant *Chaetomium* spp. recovered from nail and skin infections^a.

Species name	Ascus	Ascospores: shape; size (µm)	Colonies (CMA, 25°C)	Ascomatal hairs
<i>C. brasiliense</i>	Cylindrical ^b	Ovate; 7–8.5 × 6–7 × 5–6 ^c	Grey; black reverse	Spirally coiled ^f
<i>C. funicola</i>	Clavate ^c	Ovate, slightly apiculate; 6–7.5 × 4–4.5 ^c	White to pale grey; yellow reverse	Partly long unbranched, partly shorter repeatedly dichotomously branched ^g
<i>C. globosum</i>	Clavate ^d	Limoniiform, biapiculate; 9–12 × 8–10 × 6–8 ^e	Olivaceous brown; often with colored exudate	Undulate ^h
<i>C. murorum</i>	Clavate	Ellipsoidal to broadly fusiform; 13–17 × 7–9	Grey to olivaceous brown	Flexuous, often recurved at the apex

^aAccording to Arx *et al.* [10].

^bFig. 2, Suppl. Figs 4 & 5; ^cSuppl. Fig. 10; ^dFig. 4, Suppl. Fig. 8; ^eSuppl. Fig. 6; ^fFig. 1, Suppl. Figs. 2 & 3; ^gSuppl. Fig. 9; ^hFig. 4, Suppl. Fig. 7.

among other typical morphological features (Table 3), cylindrical asci (Fig. 1, Supplementary Figs. 4 & 5) that are present in a limited number of *Chaetomium* species. *C. murorum* can also be easily differentiated from *C. globosum* by morphology (Table 3).

Only three *Chaetomium* spp. have been shown to cause dermatomycotic infections in humans (Table 1). We have updated this observation by identifying a fourth species, *C. brasiliense*, which was implicated in a case of otitis externa in a cancer patient. Mycotic aetiology was confirmed by repeatedly positive recovery of the same fungus and by histology. A possible connection between chronic inflammation of the external auditory canal and development of cancer is questionable. Mycotic aetiology was not investigated in this patient despite the recurrence of her otitis externa. It is a known fact that inflammation is a critical component in tumor progression. Many types of cancer arise from sites of infection, chronic irritation and inflammation [48]. We are not able to establish the beginning of fungal infection. The fungal pathogen could be present for several months or even for several years. *Chaetomium* spp. produce many classes of bioactive secondary metabolites with various biological properties such as immunomodulatory, cytotoxic, and anti-tumor effects that may, together with autoaggressive character of chronic inflammation, participate in cancerogenesis [11,12,49,50]. According to 2006 data, *C. brasiliense* has never been isolated in the Czech Republic [51].

In addition to the two presented case reports, we found that *Chaetomium* spp. are relatively frequently isolated from dermatomycotic specimens. Fourteen isolates were recovered from specimens in the last 4 years (a study on incidence and spectrum of NDFP is a part of the first author's MA thesis and is currently in preparation). This collection included one *C. brasiliense*, three *C. funicola*, and ten *C. globosum* isolates. All isolates are listed in Supplementary Table S3 – online only. Some of the isolates were tested for susceptibility to some antifungal agents (Supplementary Table S1 – online only). In only the two cases presented here was the non-dermatophyte aetiology diagnosed based on repeated examination. In other suspicious cases, the aetiological significance of isolated strains was unclear as repeated sampling was not performed. Some direct microscopic examinations were positive for hyaline, irregular, septate hyphae. In other observations, septate, brown-coloured hyphae or thick-walled brown cells were found. This finding is in agreement with previous reports that variously described either hyaline, septate hyphae or brown-coloured fungal elements (Table 1). Microscopic observation of the infectious fungal elements in samples can possibly demonstrate great variability. The mycelium produced by *Chaetomium* spp. is hyaline, only the fruiting bodies are dark pigmented. The placement of the genus *Chaetomium* in the dematiaceous hyphomycetes is controversial and epistemologically incorrect. The ability to

produce melanins is widespread in fungi and some fungal pathogens traditionally not considered phaeoid have the ability to synthesize melanin *in vivo* during infection. This may lead to confusions in the diagnosis [52]. This is the reason why we prefer the definition of phaeohyphomycosis based on histological findings rather than on phenotypic trait of the aetiological agent being dark-pigmented under laboratory conditions. Enhanced melanins synthesis is generally associated with stress [53] and its production is linked to virulence in pathogenic fungi [54].

Therapy results for *Chaetomium* infections are equivocal. Despite the use of several drugs, either alone or in combination, treatment failed in the majority of cases of systemic infections. Treatment results of the cases of invasive *Chaetomium* infections were summarized by Al-Aidaros *et al.* [41], while those of skin and nail infections are reviewed in Table 1. There are only a few cases of dermatomycotic infections that include information on therapy and only in some was the treatment successful. There have been just three cases of onychomycosis due to *Chaetomium* which describe effective therapy. A case of onychomycosis was partially cured by oral itraconazole [26] and another two cases were completely cured by topical and oral terbinafine [19] or oral itraconazole and topical miconazole [31]. Two cases of superficial skin lesions were successfully treated with topical oxiconazole [27] or oral terbinafine in combination with topical tioconazole [25]. A skin lesion in a dog was cured by systemic and topical ketoconazole [15]. We chose oral terbinafine for treatment of our cases. The nail lesions were nearly cured after 8 months. Only two cases of disseminated infection were cured after the use of amphotericin B [44,55], in most of the other cases the patients died before *Chaetomium* was identified.

Previously published data on antifungal susceptibility obtained by the modified broth microdilution reference procedure of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for filamentous fungi are available for some *Chaetomium* spp. and for some antifungal agents [43,56]. No criteria for susceptibility testing of species that disseminate only via ascospores have been established. Consequently, the results study should be considered to be approximate. In some other studies, only one or two strains of *C. globosum* [23,44,26,28,29] or *C. perucidum* [42] were tested with markedly different results. *C. brasiliense* has never been tested. The disc diffusion method that we chose shows only a low percentage of major, very major and minor errors (shifts between susceptible and intermediately susceptible or between intermediately susceptible and resistant) in filamentous fungi and is not as dependent on incubation time as other methods based on diffusion gradient [57].

Chaetomium isolates showed resistance to 5-fluorocytosine and fluconazole (Supplementary Table S1 – online only). This is in agreement with previous reports [23,26,43,44]

for some *Chaetomium* spp. We expanded this finding to *C. brasiliense*. The described resistance is probably typical for the entire genus *Chaetomium* and is reported frequently in filamentous fungi. Fluconazole therapy was shown to be ineffective *in vivo* as well [58]. Conversely, all the *Chaetomium* isolates tested appeared to be susceptible to azole derivatives excepting fluconazole. Inter-species differences in susceptibility to amphotericin B and terbinafine were found. *C. globosum* strains were resistant to amphotericin B and intermediately susceptible to terbinafine in contrast with the strains of *C. funicola* and *C. brasiliense* that were susceptible (Supplementary Table S1 – online only). The strain of *C. brasiliense* was susceptible to the highest number of antifungal agents tested. Based on limited *in vivo* data, oral terbinafine and oral itraconazole seem to be effective in the treatment of dermatomycotic infections due to *Chaetomium* spp.

Conclusions

In conclusion, nail and skin infections due to *Chaetomium* spp. occur predominantly in immunocompetent patients, typically presenting with secondary to traumatic implantation, or in elderly people. The infection may manifest as phaeohyphomycosis, chromoblastomycosis or onychomycosis with brown discoloration. The infection progresses slowly and patients usually present several years after it first appears. For the first time ever, we report a case of infection caused by *C. brasiliense*, involving otitis externa in a cancer patient that manifested histologically as phaeohyphomycosis. The second report deals with a case of onychomycosis due to *C. globosum* which included such typical signs of nail infection due to *Chaetomium*, as history of nail trauma and brown discoloration of the affected nail. Therapy strategy is not established due to the small number of cases. The infection has been most effectively eradicated when treatment included terbinafine or itraconazole. *Chaetomium* species have a specific antifungal susceptibility pattern that includes primary resistance to 5-fluorocytosine and fluconazole. Important interspecies differences in antifungal susceptibility were observed particularly with amphotericin B.

Acknowledgments

The project was made possible thanks to grant MSM 6007665801. We would like to thank Dr Miroslav Kolarik, Dr Ondrej Koukol, Dr Dagmar Jechova and Dr Alena Kubatova for their support, for reading of the manuscript and their helpful and positive feedback.

Declaration of interest: The authors declare that they have no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

© 2011 ISHAM, *Medical Mycology*, **Early Online**, 1–10

Note

*The EMBL accession numbers for the ITS region and LSU rDNA of *Chaetomium brasiliense* and *C. globosum* are FR718872-3 and FR823008-9.

References

- English MP. Nails and fungi. *Brit J Dermatol* 1976; **94**: 697–701.
- Elewski BE. Diagnostic technique for confirming onychomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1996; **35**: 6–9.
- Ellis DH, Marley JE, Watson AB, *et al.* Significance of nondermatophyte moulds and yeasts in onychomycosis. *Dermatology* 1997; **194**: 40–42.
- Gupta AK, Cooper EA, MacDonald P, *et al.* Utility of inoculum counting (Walshe and English criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2115–2121.
- Shemer A, Davidovici B, Grunwald MH, *et al.* New criteria for the laboratory diagnosis of non-dermatophyte moulds in onychomycosis. *Brit J Dermatol* 2009; **160**: 37–39.
- Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Brit J Dermatol* 2003; **149**: 296–305.
- Revancar SG. Phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; **20**: 609–620.
- Cooper JR. Deep phaeohyphomycosis. In: Merz WG, Hay RJ (eds). *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections, Medical Mycology*, 10th edn. London: Hodder Arnold, 2005: 739–749.
- Morejón KCR. A taxonomic study (morphological and molecular) of the species of the genus *Chaetomium* and related genera. PhD thesis, Universitat Rovira i Virgili, 2003 [Spanish].
- Arx JA, Guarro J, Figueras MJ. The ascomycete genus *Chaetomium*. *Beih Nova Hedwigia* 1986; **84**: 1–162.
- Li GY, Li BG, Yang T, Liu GY, Zhang GL. Secondary metabolites from the fungus *Chaetomium brasiliense*. *Helv Chim Acta* 2008; **91**: 124–129.
- Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, *et al.* Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with *in vitro* and *in vivo* activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood* 2007; **109**: 2579–2588.
- Hubalek Z. Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2000: 93–103.
- Marchisio VF. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2000: 86–92.
- Rainer J, Peintner U, Pöder R. Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. *Mycopathologia* 2000; **149**: 87–97.
- Febre N, Silva V, Medeiros EAS, *et al.* Contamination of peritoneal dialysis fluid by filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 1999; **16**: 238–239.
- Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd edn. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
- Abbott SP, Sigler L, McAleer R, *et al.* Fatal cerebral mycoses caused by the ascomycete *Chaetomium strumarium*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2692–2698.
- Aspiroz C, Gene J, Rezusta A, Charlez L, Summerbell RC. First Spanish case of onychomycosis caused by *Chaetomium globosum*. *Med Mycol* 2007; **45**: 279–282.

- 20 Atlas RM. *Handbook of Microbiological Media*, 2nd edn. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997.
- 21 Kolarik M, Kubatova A, Pazoutova S, Srutka P. Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects. *Mycol Res* 2004; **108**: 1053–1069.
- 22 Untereiner WA, Debois V, Naveau FA. Molecular systematics of the ascomycete genus *Farrowia* (Chaetomiaceae). *Can J Bot* 2001; **79**: 321–333.
- 23 Sugiyama K, Sano A, Murakami M, et al. Three isolations of *Chaetomium globosum* from erythematous epilation of canine skin. *Med Mycol* 2008; **46**: 505–510.
- 24 Kunert J. Physiology of keratinophilic fungi. In: Kushwaha RKS, Guarro J (eds). *Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi*. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2000: 77–85.
- 25 Tullio V, Banche G, Allizond V, et al. Non-dermatophyte moulds as skin and nail foot mycosis agents: *Phoma herbarum*, *Chaetomium globosum* and *Microascus cinereus*. *Fungal Biol* 2010; **114**: 345–349.
- 26 Hattori N, Adachi M, Kaneko T, et al. Case report. Onychomycosis due to *Chaetomium globosum* successfully treated with itraconazole. *Mycoses* 2000; **43**: 89–92.
- 27 Costa AR, Porto E, Lacaz CS, et al. Cutaneous and unguinal phaeo-ophomycosis caused by species of *Chaetomium* Kunze (1817) ex Fresenius, 1829. *J Med Vet Mycol* 1988; **26**: 261–268.
- 28 Naidu J, Singh SM, Pouranik M. Onychomycosis caused by *Chaetomium globosum* Kunze. *Mycopathologia* 1991; **113**: 31–34.
- 29 Yu J, Yang S, Zhao Y, Li R. A case of subcutaneous phaeoophomycosis caused by *Chaetomium globosum* and the sequences analysis of *C. globosum*. *Med Mycol* 2006; **44**: 541–545.
- 30 Stiller MJ, Rosenthal S, Summerbell RC. Onychomycosis of the toenail caused by *Chaetomium globosum*. *J Am Acad Dermatol* 1992; **26**: 775–776.
- 31 Falcón CS, Falcón MMS, Ceballos JD, et al. Onychomycosis by *Chaetomium* spp. *Mycoses* 2008; **52**: 77–79.
- 32 Latha R, Sasikala R, Muruganandam N, Prakash MRS. Onychomycosis due to ascomycete *Chaetomium globosum*: a case report. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; **53**: 572–573.
- 33 Lateur N, Andre J. Melanonychia: diagnosis and treatment. *Dermatol Ther* 2002; **15**: 131–141.
- 34 Kamalam A, Ajithadass K, Sentamilselvi G, Thambiah AS. Paronychia and black discoloration of a thumb nail caused by *Curvularia lunata*. *Mycopathologia* 1992; **118**: 83–84.
- 35 Hata Y, Naka W, Nishikawa T. A case of melanonychia caused by *Exophiala dermatitidis*. *Jpn J Med Mycol* 1999; **40**: 231–234.
- 36 Romano C, Miracco C, Difonzo EM. Skin and nail infections due to *Fusarium oxysporum* in Tuscany, Italy. *Mycoses* 1998; **41**: 433–437.
- 37 Gianni C, Romano C. Clinical and histological aspects of toenail onychomycosis caused by *Aspergillus* spp.: 34 cases treated with weekly intermittent terbinafine. *Dermatology* 2004; **209**: 104–110.
- 38 Gupta AK, Horga-Bell CB, Summerbell RC. Onychomycosis associated with *Onychocola canadensis*: ten case reports and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1998; **39**: 410–417.
- 39 Stuchlik D, Mencl K, Hubka V, Skorepova M. Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*: first records of nail infections due to *Onychocola* in the Czech Republic. *Czech Mycol* 2011; **63**. (accepted)
- 40 Naidu J, Singh SM, Pouranik M. Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brumptii*. *Mycopathologia* 1991; **113**: 159–164.
- 41 Al-Aidaros A, Bin-Hussain I, Solh HE, et al. Invasive *Chaetomium* infection in two immunocompromised pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 2007; **26**: 456–458.
- 42 Barron MA, Sutton DA, Veve R, et al. Invasive mycotic infections caused by *Chaetomium perlucidum*, a new agent of cerebral phaeo-ophomycosis. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5302–5307.
- 43 Guarro J, Soler L, Rinaldi MG. Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; **14**: 613–618.
- 44 Teixeira ABA, Trabasso P, Moretti-Branchini ML, et al. Phaeoophomycosis caused by *Chaetomium globosum* in an allogeneic bone marrow transplant recipient. *Mycopathologia* 2003; **156**: 309–312.
- 45 Otcenasek M, Tomsikova A, Pouzar Z. Filamentous fungal infections in man. Alphabetical overview of mycotic agents with data on their systematic classification and on the localization of individual diseases. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2000; **49**: 64–74.
- 46 Hoppin EC, McCoy EL, Rinaldi MG. Opportunistic mycotic infection caused by *Chaetomium* in a patient with acute leukemia. *Cancer* 1983; **53**: 555–556.
- 47 Almeida F, Gomes JM, Salles C. A study of a strain of *Chaetomium* isolated from a cutaneous lesion. *An Fac Med Sao Paulo Brasil* 1944; **20**: 145–154 [in Portuguese].
- 48 Coussens LN, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420**: 860–867.
- 49 Wijeratne EMK, Turbyville TJ, Fritz A, et al. A new dihydroxanthone from a plant-associated strain of the fungus *Chaetomium globosum* demonstrates anticancer activity. *Bioorg Med Chem* 2006; **14**: 7917–7923.
- 50 Muroga Y, Yamada T, Numata A, Tanaka R. Chaetomugilins I–O, new potent cytotoxic metabolites from a marine-fish-derived *Chaetomium* species. Stereochemistry and biological activities. *Tetrahedron* 2009; **65**: 7580–7586.
- 51 Kubatova A. *Chaetomium* in the Czech Republic and notes to three new records. *Czech Mycol* 2006; **58**: 155–171.
- 52 Kimura M, McGinnis MR. Fontana-Masson-stained tissue from culture-proven mycoses. *Arch Pathol Lab Med* 1998; **122**: 1107–1111.
- 53 Missall TA, Lodge JK, McEwen JE. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress: implications for fungal survival in mammalian hosts. *Eukaryot Cell* 2004; **3**: 835–846.
- 54 Langfelder K, Streibel M, Jahn B, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2003; **38**: 143–158.
- 55 Barale T, Fumey MH, Reboux G, Mallea M. Septicaemia due to *Chaetomium* sp. in a leukaemic child associated with a bone marrow transplant. *Bull Soc Fr Mycol Med* 1990; **19**: 43–46 [in French].
- 56 Serena C, Ortoneda M, Capilla J, et al. In vitro activities of new antifungal agents against *Chaetomium* spp. and inoculum standardization. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3161–3164.
- 57 Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, et al. A multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin-B and caspofungin. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1811–1820.
- 58 Piepenbring M, Mendez OAC, Espinoza AAE, Kirschner R, Schöfer H. Chromoblastomycosis caused by *Chaetomium funicola*: a case report from Western Panama. *Brit J Dermatol* 2007; **157**: 1025–1029.
- 59 Wang J, Zhang Q, Li L, Feng W. Phaeoophomycosis caused by *Chaetomium globosum*: first case report from China. *Chin J Dermatol* 1998; **31**: 273–275.
- 60 Koch HA, Haneke H. *Chaetomium funiculum* as possible aetiological agent of the deep mycosis. *Mykosen* 1965; **9**: 23–28 [in German].
- 61 Lin Y, Li X. First case of phaeoophomycosis caused by *Chaetomium murorum* in China. *Chin J Dermatol* 1995; **28**: 367–369.

This paper was first published online on Early Online on 8 April 2011.

Supplementary material available online

Supplementary Figs 1–10.
Supplementary Tables 1–3.

**Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*:
first records of nail infections due to *Onychocola*
in the Czech Republic**

DAVID STUHLÍK¹, KAREL MENCL², VÍT HUBKA^{3*}, MAGDALENA SKOŘEPOVÁ⁴

¹Regional Hospital Pardubice, Department of Dermatology, Czech Republic

²Regional Hospital Pardubice, Department of Clinical Microbiology, Czech Republic

³Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany, Benátska 2,
128 01 Praha 2, Czech Republic;

vit.hubka@seznam.cz

⁴Charles University in Prague, First Faculty of Medicine, Dermatological Clinic, Czech Republic

*corresponding author

Stuchlík D., Mencl K., Hubka V., Skořepová M. (2011): Fungal melanonychia caused by *Onychocola canadensis*: first records of nail infections due to *Onychocola* in the Czech Republic. – Czech Mycol. 63(1): 83–91.

Onychocola canadensis is a non-dermatophyte filamentous fungus with an unusual ecology. Hitherto, *O. canadensis* has been isolated only from human nails and skin, although attempts to isolate it from the environment have been unsuccessful. We describe two new cases of onychomycosis caused by *O. canadensis* with dissimilar clinical appearance. The first infection manifested itself as distal and lateral onycholysis with conspicuous black pigmentation. As far as we know, this is the first description of *O. canadensis* onychomycosis in the Czech Republic. In connection with this case, the authors emphasise the importance of mycological laboratory examination of dark nail lesions. Based on photodocumentation, a second case of onychomycosis due to *O. canadensis* was identified retrospectively. This case manifested itself as distal and lateral subungual onychomycosis with yellow discoloration, which is more typical of *O. canadensis* onychomycosis. Morphological characteristics important for discrimination of *O. canadensis* from other medically important fungi are discussed.

Key words: onychomycosis, *Arachnomycetes nodosetosus*, fungal infection, elderly people, soil fungi.

Stuchlík D., Mencl K., Hubka V., Skořepová M. (2011): Onychomykóza způsobená houbou *Onychocola canadensis*: nové případy infekce nehtů vlivem houby rodu *Onychocola* v České republice. – Czech Mycol. 63(1): 83–91.

Onychocola canadensis je nedermatofytická vláknitá houba s neobvyklou ekologií. Dosud byla *O. canadensis* izolována pouze z lidských nehtů a kůže. Pokusy o izolaci houby z jiných substrátů byly neúspěšné. V následujícím textu popisujeme dva nové případy onychomykózy způsobené *O. canadensis* s rozdílnými klinickými projevy. První případ se manifestoval jako distální a laterální onycholýza s nápadně černou diskolorací. V souvislosti s tímto případem autoři zdůrazňují důležitost mykologického vyšetření tmavě zbarvených nehtových lézí. Pokud víme, je tento případ vůbec prvním případem onychomykózy způsobené *O. canadensis* v České republice. Druhý případ onychomykózy způsobené *O. canadensis* byl zpětně identifikován na základě fotodokumentace. Postižený nehet se manifestoval jako distální a laterální subunguální onychomykóza se žlutou diskolorací. Tento fenotyp je více příznačný pro onychomykózu způsobenou *O. canadensis*. Dále jsou diskutovány morfologické znaky důležité pro odlišení *O. canadensis* od jiných lékařsky významných hub.

INTRODUCTION

Onychocola canadensis is a non-dermatophyte agent of onychomycosis. It is a relatively new species of fungus that occurs mainly in temperate climates and is probably associated with soil. This fungus was described based on three isolates from Canadian cases of onychomycosis (Sigler & Congly 1990). Since then, cases in New Zealand (Sigler et al. 1994), France (Contet-Audonnet et al. 1997, Koenig et al. 1997), Great Britain (Campbell et al. 1997, O'Donoghue et al. 2003), Italy (Fanti et al. 2003), Belgium (Esbroeck et al. 2003, Sijs et al. 2007) and Spain (Torres-Sangiao et al. 2006) have been reported. Recently, four cases were reported from Slovakia (Volleková & Lisalová 2009). It typically affects elderly gardeners and farmers. The mean age of patients in the previously described cases is almost 70. Most of the cases are described as distal and lateral subungual onychomycosis or white superficial onychomycosis similar to the appearance that might be expected with dermatophytes or other non-dermatophyte moulds such as *Acremonium* spp. Association with melanonychia has as yet been mentioned only in a case described by Gupta et al. (1998).

The description of *Arachnomycetes nodosetosus* – teleomorphic stage of *O. canadensis* (Sigler et al. 1994) was followed by several taxonomical studies focused on the position of the genus *Arachnomycetes* and its anamorph *Onychocola* (5 species described to date) within the Ascomycota (Gibas et al. 2002a, Gibas et al. 2002b, Gibas et al. 2004). It resulted in the creation of the new order *Arachnomycetales* within the *Eurotiomycetes* and description of several new species of the genus *Arachnomycetes*. Except of *A. nodosetosus*, there are reports about several cases of isolation of three other *Arachnomycetes* species and *O. sclerotica* (teleomorph not described) from nails or skin generally of unclear etiological significance (Sigler et al. 1994, Gibas et al. 2002a, Gibas et al. 2002b, Gibas et al. 2004).

MATERIAL AND METHODS

Patient 1: A 51-year-old woman diagnosed with onychodystrophy and black discoloration of the right great toenail of several years' duration (Fig. 1B). She reported no recent progression of the lesion. Due to the long time lapse she could not recall the circumstances that led to the development of the lesion. She recalled no major trauma of the nail but minor repeated traumatisations of the distal nail plate could not be excluded. There was no history of foreign travels except for a holiday in Spain in summer 1997. She used to work in her garden. The family history and personal history of the patient were insignificant.

The toenail showed partial onycholysis, the affected part was thickened and dystrophic. Conspicuous black discoloration was present (Fig. 1B). Because of melanonychia it was crucial to exclude subungual melanoma. Another differential diagnosis was subungual haematoma.

Patient 2: The second patient was an otherwise healthy 68-year-old woman. The patient described progressive discoloration of the left great toenail during the last year. She reported that she often took part in all-day hiking trips. She remembered a trauma of the nail due to tight shoes a year ago. A short time after the trauma, slight discoloration appeared. No history of foreign travels was reported.

The affected nail was raised by hyperkeratosis, friable at the distal border, and demonstrated yellow discoloration (Figs. 1G, H).

Laboratory investigations. Specimens for mycological examination (KOH mount and cultivation) were collected by scraping off the nail plate and observed microscopically in 20 % KOH. Nail fragments were inoculated on slants of Sabouraud glucose agar (SGA) with and without chloramphenicol (Bio-Rad) and incubated at 27 °C.

The macromorphology of the subcultures was observed on a set of media (the producer of the commercial media is referred to in parenthesis, all other media were prepared according to Atlas 1997): MEA (malt extract agar, Oxoid), SGA (Carl Roth), PDA (potato dextrose agar), OA (oatmeal agar), CY20S (Czapek yeast extract sucrose 20 % agar), CDA (Czapek dox agar), PCA (potato carrot agar) and SNA (Synthetic nutrient agar). Cultures grew at a temperature of 25 °C. Growth at a temperature of 37 °C was also tested.

Lactophenol cotton blue wet mount preparations from subcultures growing at 25 °C were prepared at weekly intervals for a period of 8 weeks. Photographs were taken on an Olympus BX-51 microscope using Nomarski contrast or phase contrast.

DNA analysis. Genomic DNA was isolated from 14-day-old cultures using the Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc.). The region including ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 was amplified using primers ITS5 (White et al. 1990) and ITS4S (Kretzer et al. 1996). The SSU rDNA was amplified using the NS1 (White et al. 1990) and NS24 (Gargas & Taylor 1992) primer set. A partial sequence of LSU rDNA was amplified with the NL1 (O'Donnell 1993) and LR6 (Vilgalys & Hester 1990) primer sets. PCR amplification was performed using the same cycling conditions for all three rDNA regions and followed procedures described in Kolařík et al. (2004). PCR product purification and sequencing was carried out at Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Using BLAST similarity search, the obtained sequences were compared with sequences originating from taxonomical monographs deposited on the GenBank server.

RESULTS

Laboratory investigations

Microscopic examination of the nail scrapings in KOH showed septate branched hyphae and masses of arthroconidia (Figs. 1A, C, F). In both mentioned cases slow growth of a pure culture of a non-dermatophyte hyphomycete was observed on SGA with chloramphenicol (Figs. 1D, E). After 3 weeks at 27 °C the colonies were restricted, initially greyish white but gradually darkening. The colony reverse was dark grey-brown to black. After 6 weeks the colonies in the prime culture were almost brown-black. This pigmentation was less accented in the subcultures. The same fungus was isolated and observed in direct microscopy during a subsequent visit.

Therapy

In case 1, an ointment containing 40 % urea without antifungals was applied for atraumatic nail avulsion. When the patient returned after 3 weeks for debridement of the softened nail plate, and a third specimen was collected from the subungual debris. The same fungus grew again in pure culture. The epidermis of the nail bed showed no melanin pigmentation so that subungual melanoma and haematoma could be excluded. Topical antifungal therapy with a 1 % ciclopirox solution was applied and the diseased nail grew out gradually. After nine months of therapy, clinical appearance of the nail was normal and mycological control was negative.

In the second case, a daily oral dose of terbinafine (250 mg) was administered for three months. After 10 months, the nail plates exhibited healthy growth. Mycological examination was negative.

Macro- and micromorphology of subcultures

Growth on all tested media was slow. Colony diameters reached about 10 mm or less after 3 weeks at 25 °C. Growth was even more restricted at 37 °C. On MEA (Fig. 2C), SAB (Fig. 1E) and PDA (Fig. 2B), the colonies were initially glabrous and became velvety or tomentose after 2 weeks due to aerial hyphae that grew on surface of the colonies. The margin of the colonies was irregularly lobate and the height of the colonies increased. They became conical and radially wrinkled. The colour was white, grey-white or yellow-white, old colonies acquired a brownish colour through brown hyphae that had appeared in culture after some weeks. The colour of the reverse was brownish and became dark-brown after some weeks. Submerged mycelium with radial arrangement was a dominant component on nutrient-weak media (PCA, SNA) and CDA. Colonies on OA showed yeast-like

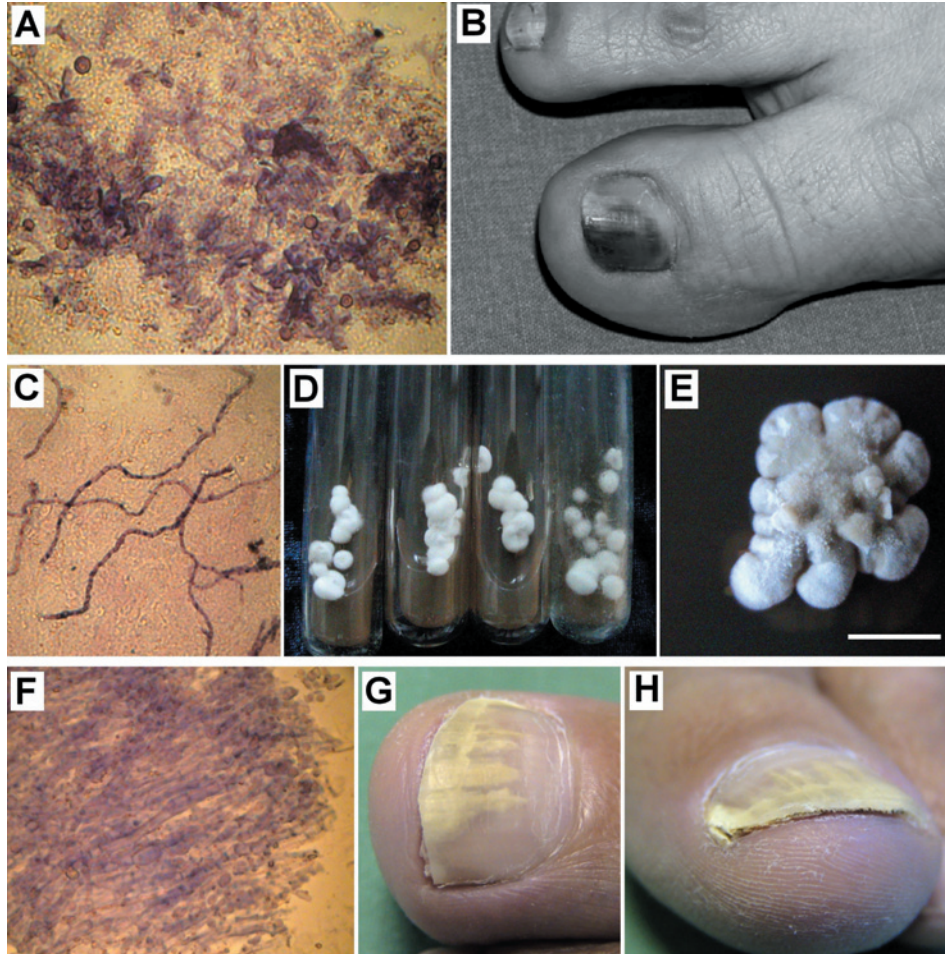


Fig. 1. Onychomycosis by *Onychocola canadensis*. Distal and lateral onycholysis with dark discoloration of the nail (B). Colonies on slants of SGA (D) and on an SGA plate after 21 days (E, scale bar 5 mm). Septate hyphae and arthroconidia in nail debris. KOH mount stained with Parker ink (A, C, F). Affected nail (case 2) raised by hyperkeratosis, friable at the distal border, with yellow discoloration (G, H).

growth and remained glabrous. The most abundant aerial mycelium was developed on CY20S (Fig. 2D).

Micromorphological features were described from MEA, SGA and PDA, on which essentially the same image was observed and all typical morphological characters were well developed. At first, the young vegetative hyphae were smooth, hyaline and up to 2.5 μm wide. Finally, they became roughly verrucose (Fig. 2E). Fertile hyphae were poorly differentiated from vegetative mycelium.

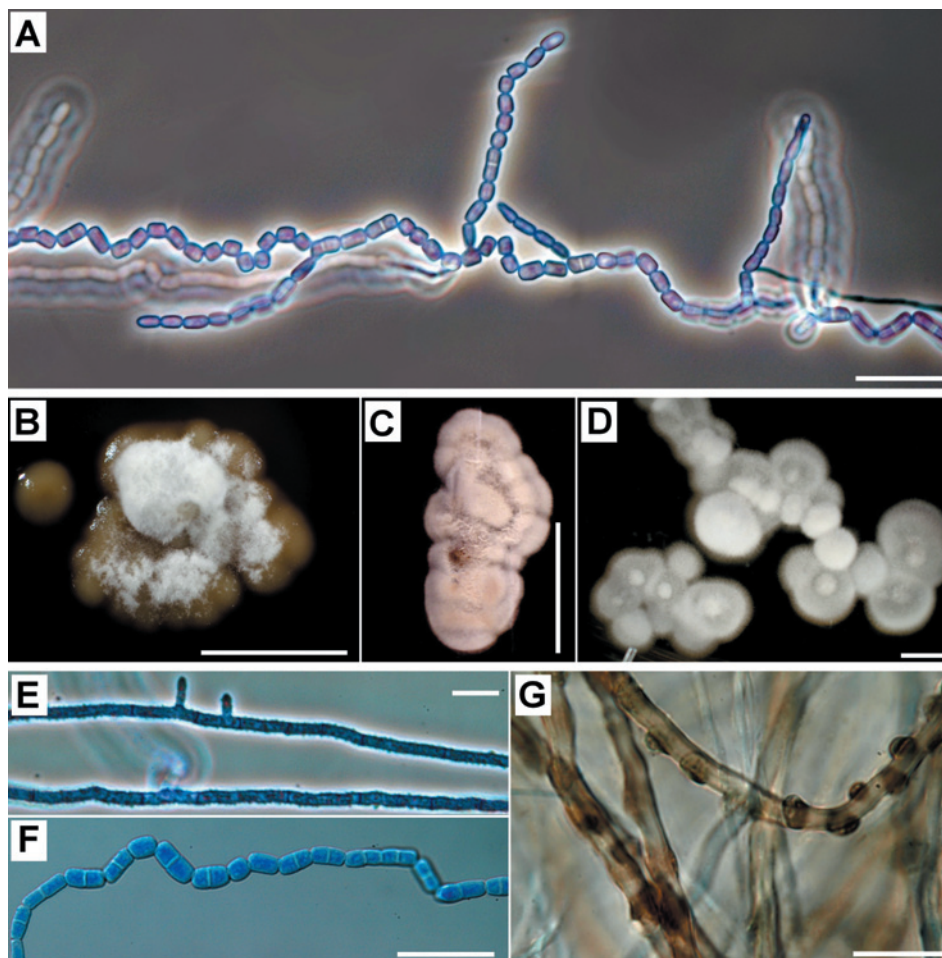


Fig. 2. *Onychocola canadensis*. Fertile hyphae consisting of elliptic arthroconidia seceded by fracture (A, F, scale bar 20 μm). Hyaline, rough-walled hyphae (E, scale bar 10 μm) and pigmented hyphae with dark brown nodosities (G, scale bar 10 μm). Colony detail on PDA (B), MEA (C) and CY20S (D) after five weeks at 25 $^{\circ}\text{C}$; scale bar 5 mm.

Arthroconidia were profusely present in culture after 3–4 weeks of cultivation. They were hyaline, smooth and ellipsoidal with 1 septum or non-septate (Fig. 2A, F). Conidia were released intercalarily or terminally due to constriction of the septum or due to rhexolysis. They often persisted in chains. Brown, infrequently septate hyphae (up to 6 μm wide) were present mainly in old cultures (Fig. 2G). Dark brown nodosities occurred abundantly on their walls.

The case 1 isolate is maintained in the Culture Collection of Fungi (CCF), Department of Botany, Charles University in Prague, as CCF 3957. The case isolate from the second report was identified retrospectively. This identification was possible thanks to accurate photo-documentation of colony morphology and microscopic preparations of the isolate. However, we were not able to revive the isolate.

Molecular data analysis

The morphological identification was supported by rDNA sequence data. The sequence obtained from ITS region (602 bp) showed 100 % similarity to the type strain of *A. nodosetosus* UAMH 5344 (Gibas et al. 2004). The SSU rDNA sequence (814 bp) was 100 % similar to *A. nodosetosus* strain UAMH 6106 (Gibas et al. 2002a). The partial LSU (798 bp) sequence was 100 % similar to *A. nodosetosus* strain CBS 313.90 (Sugiyama and Mikawa 2001).

The sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers HM205102–HM205104.

DISCUSSION

To our knowledge, isolation of *O. canadensis* has not yet been reported from the Czech Republic. Four cases have been recently reported from Slovakia (Volleková & Lisalová 2009).

Onychocola canadensis is a fungus with an unusual ecology. Based on published data, *O. canadensis* has been isolated only from clinical material and has been reported from countries located in the temperate climate zone. However, there are some omissions in this distribution. In particular, *O. canadensis* has not been recorded from the USA.

Onychomycosis due to *O. canadensis* manifests itself mostly as distal and lateral onychomycosis or white superficial onychomycosis. Onychomycosis associated with brown-black nail discoloration (melanonychia, patient 1) is unusual and has been reported only in one case by Gupta et al. (1998). It is necessary to exclude subungual melanoma and subungual haematoma in a differential diagnosis.

O. canadensis has been isolated more frequently in elderly females. The patients often worked as gardeners or farmers. This suggests probable infection from soil (Gupta et al. 1998). This is in agreement with two new reports presented here.

A number of morphological features such as growth parameters, colony morphology and micromorphology make the fungus practically unmistakable. On the other hand, the rare isolation of *O. canadensis* (only dozens of cases worldwide so far) makes its determination nontrivial. The most important features in identifying the fungus are growth parameters, presence of elliptic arthroconidia in

chains together with rough vegetative hyphae and also brown hyphae with dark superficial deformities. All important micro-morphological features (including arthroconidial chains and brown hyphae) develop well in 4–6 week-old cultures. Examination of cultures older than 4 weeks growing on solid media such as SAB, MEA and PDA at 25 °C is likely to lead to a correct determination.

The culture morphology and microscopic appearance before the third week of cultivation may imitate *Trichophyton rubrum* and this might cause misidentification. Conversely, atypical isolates of *T. rubrum* may resemble *O. canadensis* in some features. The occasionally cited report of onychomycosis caused by *O. canadensis* from Turkey (Erbagci et al. 2002) was revised by R.C. Summerbell and the strain was re-identified as atypical *T. rubrum* (Fanti et al. 2003). The possibility to mistake *O. canadensis* for *Scytalidium*, which can appear in our geographical latitude as an etiological agent of imported mycosis, was discussed by Sigler et al. (1990) and Volleková & Lisalová (2009).

In summary, we have reported these two cases because *O. canadensis* is infrequently detected as a human pathogen and had not yet been reported from Czech Republic. Moreover, both cases showed strikingly different clinical appearance. Onychomycosis due to *O. canadensis* is characterised by chronicity and slowly progressing infection, and patients usually appear several months or years after its beginning. It is possible that *Onychocola* spp. are relatively common in dermato-mycological specimens but are overlooked due to their slow growth.

ACKNOWLEDGEMENTS

The project was realised thanks to grant MSM 6007665801. We thank the staff of the Laboratory of Genetics, Physiology and Bioengineering of Fungi, ASCR, v.v.i. for assistance with molecular analyses.

REFERENCES

- ATLAS R. M. (1997): Handbook of microbiological media. Ed. 2. – 1079 p. Boca.
- CAMPBELL C. K., JOHNSON E. M., WARNOCK D. W. (1997): Nail infection caused by *Onychocola canadensis*: report of first four British cases. – J. Med. Vet. Mycol. 35: 423–425.
- CONTET-AUDONNEAU N., SCHMUTZ J. L., BASILE A. M., BIÈVRE C. (1997): A new agent of onychomycosis in elderly: *Onychocola canadensis*. – Eur. J. Dermatol. 7: 115–117.
- ERBAGCI Z., BALCI I., ERKILIÇ S., ZER Y., INCI R. (2002): Cutaneous hyalohyphomycosis and onychomycosis caused by *Onychocola canadensis*: report of the first case from Turkey. – J. Dermatol. 29: 522–528.
- ESBROECK M., WUYTACK C., LOOVEREN K., SWINNE D. (2003): Isolation of *Onychocola canadensis* from four cases of onychomycosis in Belgium. – Acta Clin. Belg. 58: 190–192.

- FANTI F., CONTI S., ZUCCHI A., POLONELLI L. (2003): First Italian report of onychomycosis caused by *Onychocola canadensis*. – *Med. Mycol.* 41: 447–450.
- GARGAS A, TAYLOR J. W. (1992): Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. – *Mycologia* 84: 589–592.
- GIBAS C. F. C., SIGLER L., CURRAH R. S. (2004): Mating patterns and ITS sequences distinguish the sclerotial species *Arachnomyces glareosus* sp. nov. and *Onychocola sclerotica*. – *Stud. Mycol.* 50: 525–531.
- GIBAS C. F. C., SIGLER L., SUMMERBELL R. C., CURRAH R. S. (2002a): Phylogeny of the genus *Arachnomyces* and its anamorphs and the establishment of *Arachnomycetales*, a new eurotiomycete order in the Ascomycota. – *Stud. Mycol.* 47: 131–139.
- GIBAS C. F. C., SIGLER L., SUMMERBELL R. C., HOFSTADER S. L. R., GUPTA A. K. (2002b): *Arachnomyces kanei* (anamorph *Onychocola kanei*) sp. nov., from human nails. – *Med. Mycol.* 40: 573–580.
- Gupta A.K., Horga-Bell C.B., Summerbell R.C. (1998): Onychomycosis associated with *Onychocola canadensis*: ten case reports and a review of the literature. – *J. Am. Acad. Dermatol.* 39: 410–417.
- KOENIG H., BALL C., BIÈVRE C. (1997): First European cases of onychomycosis caused by *Onychocola canadensis*. – *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 71–72.
- KOLAŘÍK M., KUBÁTOVÁ A., PAŽOUTOVÁ S., ŠRŮTKA P. (2004): Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects. – *Mycol. Res.* 108: 1053–1069.
- KRETZER A., LI Y., SZARO T., BRUNS T. D. (1996): Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: phylogenetic and taxonomic implications. – *Mycologia* 88: 776–785.
- O'DONNELL K. (1993): *Fusarium* and its relatives. — In: Reynolds D.R, Taylor J.W., eds., *The fungal holomorph: mitotic, meiotic, and pleomorphic speciation in fungal systematics*, p. 225–233, Wallingford.
- O'DONOGHUE N. B., MOORE M. K., CREAMER D. (2003): Onychomycosis due to *Onychocola canadensis*. – *Clin. Exp. Dermatol.* 28: 283–284.
- SIGLER L., ABBOTT S. P., WOODGYER A. J. (1994): New records of nail and skin infection due to *Onychocola canadensis* and description of its teleomorph *Arachnomyces nodosetosus* sp. nov. – *J. Med. Vet. Mycol.* 32: 275–285.
- SIGLER L., CONGLY H. (1990): Toenail infection caused by *Onychocola canadensis* gen. et sp. nov. – *J. Med. Vet. Mycol.* 28: 405–417.
- SIJS A., TEMMERMAN L., WALLEGHEM L., MAREEN P. (2007): *Onychocola canadensis*: a rare cause of onychomycosis. – *Tijdschr. Geneesk.* 63: 207–210.
- SUGIYAMA M., MIKAWA T. (2001): Phylogenetic analysis of the non-pathogenic genus *Spiromastix* (*Onygenaceae*) and related onygenalean taxa based on large subunit ribosomal DNA sequences. – *Mycoscience* 42: 413–421.
- TORRES-SANGIAO E., DURÁN-VALLE M. T., VELASCO-FERNÁNDEZ D., VILLANUEVA-GONZÁLEZ R. (2006): Disto-lateral subungual onychomycosis in a 71-year-old woman. – *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 24: 527–528. [in Spanish]
- VILGALYS R., HESTER M. (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. – *J. Bacteriol.* 172: 4238–4246.
- VOLLEKOVÁ A., LISALOVÁ M. (2009): *Onychocola canadensis*: first isolates from onychomycoses in Slovakia. – *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 58: 19–24. [in Slovak]
- WHITE T. J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds., *PCR protocols, a guide to methods and applications*, p. 315–322, San Diego.

Vladimír Antonín: First record of *Campanella caesia* (Basidiomycota, Marasmiaceae) in the Czech Republic

The first record of *Campanella caesia* Romagn. in the Czech Republic is published. The fungus was collected in the Pálava Protected Landscape Area, close to the village of Pavlov (southern Moravia) on a small slope covered with scrub (*Lycium barbarum* and *Euonymus europaea*) and grasses, on remnants of these plants. A detailed macro- and microscopic description is given and its European distribution is summarised.

MIKROMYCETY

**NEDERMATOFYTICKÉ VLÁKNITÉ HOUBY IZOLOVANÉ PŘI
SUSPEKTNÍ ONYCHOMYKÓZE**

Vít Hubka

Článek shrnuje různé pohledy na možnou úlohu nedermatofytických vláknitých hub při infekcích nehtů. Okrajově se zabývá schopnostmi nedermatofytických vláknitých hub kolonizovat a rozkládat nehet *in-vitro*. V praktické části je podán přehled určených kmenů nedermatofytických vláknitých hub izolovaných z nehtů a podrobněji je rozvedena problematika rodu *Auxarthron*.

Přestože onemocnění působená houbami nabývají stále většího medicínského významu, zůstává lékařská mykologie poněkud v ústraní zájmu a její rozvoj je v porovnání s ostatními mikrobiologickými obory pomalejší. Dokonce si vysloužila označení "Popelka" v rodině mikrobiologie (Mencl 2007). Právě lékařské mykologie se týká následující článek vypracovaný na podkladě bakalářské práce (Hubka 2008) obhájené na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty UK. Článek má za cíl seznámit čtenáře s problematikou nedermatofytických vláknitých hub (dále jen NVH), izolovaných při podezření na onychomykózu a nesnadným prokazováním jejich vztahu k onemocnění.

Onychomykóza a její původci

Mykotické onemocnění nehtů (onychomykóza) je celosvětovým problémem a jeho léčba stojí každoročně nemalé prostředky. Ve vyspělých zemích postihuje zhruba 2–13 % populace a s rostoucím věkem prevalence (tj. počet nemocných ve vybrané populaci k určitému datu) onychomykózy stoupá až na 25 % i více (Kulíková 2008). Onychomykóza je diagnostikována asi v 50 % ze všech případů onemocnění nehtů. I když se nejedná o život ohrožující infekci, nelze ji považovat za

pouhý kosmetický problém. Některé formy jsou bolestivé a mohou znemožňovat řadu aktivit i výkon některých povolání. Léčení může být dlouhodobé a je typické recidivami (Torres-Rodríguez et López-Jodra 2000).

Kolem 90% ze všech onychomykóz je u nás vyvoláno dermatofyty, především rodem *Trichophyton*. Zbývá procenta připadají na kvasinky a NVH. Kvasinky působí především tzv. paronychii nehtů rukou (zánět kůže v okolí nehtu, popř. nehtového lůžka), při jejímž vzniku se předpokládá zásadní význam faktorů jako je časté máčení rukou ve vodě a dráždění chemickými přípravky (Faergemann 1996). Skupina NVH je značně široká, nesourodá a má i rozmanitou ekologii. V současnosti je popisován trend zvyšujícího se počtu případů onychomykózy vyvolané NVH nejen co do počtu případů, ale i co do počtu druhů vláknitých hub, které jsou takto izolovány. Názory autorů na popsání vývoj nejsou jednotné. Rostoucí význam NVH jako původců onychomykózy je často přičítán stárnutí populace, rostoucímu počtu diabetiků a pacientů s narušenou nebo cíleně tlumenou imunitou, např. po transplantacích. Někteří autoři ale namítají, že vývoj může zčásti souviset i se zdokonalující se metodikou odběrů a zvýšenou pozorností, která je v posledních desetiletích NVH věnována.

Role nedermatofytických vláknitých hub

Úloha NVH izolovaných z nehtu může být různá. Protože spory některých NVH jsou v prostředí široce rozšířeny, jsou tyto houby izolovány často jako kontaminanty. Mohou také hrát úlohu sekundárních kolonizátorů a růst v části nehtu, která byla již částečně rozložena dermatofytem. Rozdíl mezi kontaminanty a sekundárně kolonizujícími houbami je především v tom, že sekundární kolonizátoři v nehtu skutečně dlouhodobě rostou, mohou být identifikováni na mikroskopických preparátech a izolováni v odběrech opakovaných po delším časovém intervalu. To může vést k chybnému přesvědčení, že se jedná o původce onemocnění. Navíc jejich růst v nehtu může být tak masivní, že dovede skrýt přítomnost dermatofyta, k jehož odhalení může dojít až při opakovaném odběru při dalším vyšetření (Ellis et al. 1997).

Stále častější jsou situace, kdy je NVH izolována jako jediný původce onychomykózy. Dříve jakoby onychomykóza způsobená NVH neexistovala, nebo byla velmi vzácná. V posledních dvou až třech desetiletích je celosvětově, ale obzvláště v Evropě, popisován trend rostoucí účasti NVH na vzniku onychomykózy. Tím se k této dříve opomíjené skupině obrací větší pozornost a rozrůstá se spektrum druhů izolovaných buď přímo jako původců, anebo jsou zjišťovány druhy potenciálně patogenní, schopné růst na lidském nehtu (Gianni et al. 2000).

Touto tzv. nedermatofytickou onychomykózou jsou nejčastěji postiženi pacienti po traumatu nehtu, staří lidé nebo již výše zmínění diabetici. V takových pří-

padech hovoříme o NVH jako o sekundárních patogenech. Byly ale popsány případy onychomykózy vyvolané NVH u zdravého člověka. Řada z těchto případů je ale jinými autory napadána z důvodu nedodržení všech metodických náležitostí nutných k označení NVH jako patogena (viz níže). Status primárních patogenů některých NVH, jako např. rodu *Acremonium* nebo *Fusarium*, je proto stále sporný a subjektivní pohled na význam NVH různými lékaři hraje často zásadní roli (Richardson et Edward 2000). Výjimkou mezi NVH je v tomto ohledu rod *Scytalidium*, který je často izolován jako evidentně primární patogen v tropických a subtropických oblastech. Medicínsky významným zástupcem tohoto rodu je pouze tmavě pigmentovaný druh *Scytalidium dimidiatum* (popř. jeho synanamorfa *Nattrassia mangiferae*) spolu s jeho bezbarvou mutací zvanou *Scytalidium hyalinum*. Kožní mykózy a onychomykózy působené tímto druhem jsou dokonce mezilidsky přenosné artrokonidiiemi v kožních šupinách. Podobně se i u druhu *Scopulariopsis brevicaulis*, který je u nás nejběžnějším původcem onychomykózy ze skupiny NVH, předpokládá schopnost napadnout i zdravý nehet (Campbell et Johnson 2005).

V některých soudobých studiích je uváděna účast NVH jako původců onychomykózy vysoká, v jiných velmi nízká. Obecně přijatelná čísla se pohybují kolem 2–12 % ze všech případů onychomykózy. Výrazně odlišné hodnoty mohou značit chyby v metodice odběrů a kultivaci (de Araújo et al. 2003). Uvedeným číslům se mohou výrazně vymykat některé oblasti v tropech a subtropech, jako je Nigérie, Thajsko a Jamajka, kde zástupci rodu *Scytalidium* působí 10–50 % případů onychomykóz (Elewski 1996).

Druhové spektrum nedermatofytických původců onychomykózy se mění v závislosti na geografických oblastech. To je případ právě rodu *Scytalidium*, jenž je popisován z tropických oblastí, ale např. v Evropě bývá zachycen nanejvýš jako importovaná mykóza. Na druhé straně se výskyt onychomykózy způsobené mnoha NVH zdá být vyšší v mimotropických oblastech. To je příklad druhu *Aspergillus versicolor*, který je často popisován jako původce onychomykózy ve Španělsku a jižní Evropě vůbec. Druh *Scopulariopsis brevicaulis* je také více hlášen z mimotropických oblastí, hlavně z mírného pásma Evropy (Torres-Rodríguez et López-Jodra 2000); zatímco v Evropě zastává místo nejfrekventovanějšího původce onychomykózy mezi NVH, v Severní Americe tento primát přebírají rody *Fusarium* a *Acremonium* (Ghannoum et al. 2000).

Ne všechny práce ale rostoucí význam NVH potvrzují. Ojedinelá studie, kterou provedli Ellis et al. (1997), domněnky o stále se zvyšujícím počtu nových případů onychomykózy způsobené NVH nepotvrdila a tento trend autoři přičítají spíše malému počtu odběrů a jejich nedokonalé metodice. Autoři odebírali během jednoho roku 8–12 vzorků od každého ze 118 pacientů s onychomykózou za jejich

současného léčení. Ve výsledku byl z nehtu všech pacientů izolován dermatofyt, i když k jeho odhalení bylo někdy zapotřebí většího počtu odběrů. Stejný druh NVH v následujících odběrech se podařilo izolovat jen ve dvou případech, ale opět v doprovodu dermatofyta. Data shromážděná uvedenou studií se vymykají současnému pohledu na NVH jako na stále běžnější původce onychomykózy. Bylo by zajímavé srovnat je s výsledky nějaké jiné studie, ale žádná taková s podobně velkým počtem odběrů z jednoho pacienta není. Odebrat 8–12 vzorků ze stejného pacienta v rozmezí několika měsíců až roku není v praxi uskutečnitelné.

Protože nedermatofytická onychomykóza způsobená jinými houbami než druhem *Scopulariopsis brevicaulis* a zástupci rodu *Fusarium* je u nás spíše vzácným jevem, není mnoho lékařů, kteří by byli schopni a ochotni tyto houby určovat. Samotné určení nemusí být jednoduché, a i když se zdaří, nemá většinou pro léčbu zásadní význam. V léčbě nedermatofytické onychomykózy totiž neexistují jednotné postupy, a to vzhledem k heterogenitě této skupiny hub a také pro nízkou frekvenci výskytu některých druhů NVH jako patogenů. Proto původci těchto vzácnějších forem nedermatofytické onychomykózy nebývají určeni, pokud není na pracovišti odborný mykolog nebo není vzorek zaslán referenční laboratoří. Bez určení původce se ale ztrácí cenná data.

Problematika odběrů a interpretace narostlých kultur

Určení houby na základě klinického obrazu onychomykózy není většinou možné, ačkoliv je známo, že některé druhy hub mohou být spojeny s určitými typy onychomykózy. Navíc některé kožní choroby, zejména psoriáza, mohou vyvolávat podobnou představbu nehtu jako onychomykóza. Proto je pro stanovení diagnózy vždy nutné laboratorní potvrzení (Baran et al. 1999).

Posouzení role izolovaného kmene NVH je možné jen ze správně odebraného materiálu. Obecně je pro potvrzení významu NVH jako patogena přijímáno několik kritérií. Těmi jsou pozitivní nález při přímé mikroskopii odebraného materiálu, masivní růst houby v čisté kultuře a izolace stejného druhu i při opakovaných odběrech. Poslední kritérium není možné v praxi často dodržet, protože při pozitivním mikroskopickém nálezu je ihned zahájena léčba a při dalším odběru již houbu nemusíme zjistit, anebo se pacient už nemusí dostavit. O to větší důraz je kladen na zbývající dvě kritéria. Ideální je, když jsou při přímé mikroskopii rozeznány znaky později vykultivované houby (Skořepová 2008). Protože ale nehet nepředstavuje pro NVH přirozené prostředí, najdou se v preparátu většinou jen různě modifikované hyfy. Konidie se daří pozorovat většinou jen u druhu *Scopulariopsis brevicaulis* a druhů rodu *Fusarium* (de Araújo et al. 2003).

Fakt, že k potvrzení nedermatofytické onychomykózy je třeba opakované laboratorní zkoušky, se snažila řešit dříve široce užívaná metoda počítání inokula dle

Walshe et English (1966). Ta měla zajistit potvrzení nedermatofytické onychomykózy při jediné návštěvě lékaře. Na agarovou plotnu je při této metodě naneseno 20 fragmentů zkoumaného nehtu, v případě že alespoň z pěti fragmentů roste stejná NVH a byla pozitivní přímá mikroskopie, je NVH označena za původce. Nespolehlivost metody ověřili teprve Gupta et al. (2001b). Uvedený postup se nedá zobecnit na všechny NVH a zdá se být při svém původním nastavení použitelný jen pro onychomykózu vyvolanou rodem *Acremonium*. Pro *Scopulariopsis brevicaulis* je metoda směrodatná teprve když houba roste z více než dvou třetin fragmentů. Pro potvrzení onychomykózy vyvolané rody *Fusarium* a *Aspergillus* je metoda nepoužitelná.

Častá izolace rodů jako *Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria* nebo *Chrysosporium* může být klamná. I když jsou z nehtu izolovány bez dermatofyta, nemusí být příčinou změn pozorovaných na nehtu. Nehet může trpět úplně z jiného důvodu než je houbová infekce a rody těchto všudypřítomných hub mohou být jen kontaminací – někdy dokonce tak masivní, že může vést k chybné diagnóze a léčbě. O to větší význam má skutečné potvrzení houby přímou mikroskopií napadeného nehtu a opakovanými odběry (Torres-Rodríguez et López-Jodra 2000). Ke špatnému závěru může vést i nesprávná interpretace narostlé kultury. Některé kontaminanty, např. rod *Alternaria*, dokáží rychle přerůst pomalu rostoucí kolonii dermatofyta, a ta může být přehlédnuta. To je v praxi alespoň zčásti řešeno zařazením selektivní půdy pro dermatofyty do sestavy půd, na které se izolace provádí (Elewski 1996).

Jak je z předchozích odstavců zřejmé, je ke správnému stanovení diagnózy zapotřebí zkušeností jak laboratorních, tak i v interpretaci výsledků. Je otázkou, jak velkou metodickou chybou v odběrech jsou zatížena jednotlivá mykologická pracoviště a jak moc se tyto chyby projevují na četnosti nedermatofytické onychomykózy, ať už jejím přehlížením nebo chybnou diagnostikou. Další otázkou je, nakolik tyto metodické nepřesnosti ovlivňují dnes popisovaný trend vzestupu účasti NVH jako původců onychomykózy a nakolik je tento vývoj způsoben faktem, že si této skupiny hub v posledních desetiletích více všímáme.

Léčení onychomykózy vyvolané nedermatofytickými vláknitými houbami

V odborné literatuře můžeme najít záznam o více než 90 druzích nebo rodech NVH, které byly dosud popsány jako původci onychomykózy; údaj vychází z excerptce v bakalářské práci (Hubka 2008). Opakovaně je popisována schopnost některých NVH dlouho přežívat v nehtu navzdory léčbě.

Problematická může být především léčba pacientů s onychomykózou způsobenou druhy rodu *Fusarium*, kde je popisována vysoká odolnost k léčivům užíva-

ným v terapii proti dermatofytům. Úplného vyléčení, kdy nehet roste po léčbě normálně ("clinical cure"), je dosaženo jen u 40–60 % pacientů (Tosti et al. 2000, Ranawaka et al. 2008). Časté jsou případy, že je sice docíleno negativního mikroskopického obrazu a negativních kultur z odběrů, ale nehet po léčbě již neroste normálně ("mycological cure"). Přítomnost rodu *Fusarium* v napadeném nehtu může navíc představovat nebezpečí propuknutí diseminované infekce, zejména u pacientů po transplantacích léčených imunosupresivou (Arrese et al. 1996).

Ani 70–80% úspěšnost léčení onychomykózy vyvolané druhem *Scopulariopsis brevicaulis* a druhy rodu *Acremonium* není uspokojivá. Jako nejsnáze léčitelná se jeví onychomykóza působená zástupci rodu *Aspergillus*, kde je léčba úspěšná takřka bez výjimky (Gupta et al. 2001a).

Greer (1995) se dokonce domníval, že v případech smíšené infekce nehtu dermatofytem a současně NVH, by měla následovat odlišná terapie než při čistě dermatofytických infekcích nehtů. Myšlenka, že přítomnost NVH může léčení onychomykózy komplikovat a že i po odléčení dermatofyta dokáže NVH v některých případech v nehtu přetrvávat a udržovat chorobné změny, byla řadou autorů přijata a dále citována. Ellis et al. (1997) naproti tomu nezjistili při léčbě žádný vliv přítomnosti kontaminujících hub ani hub kolonizujících nehet sekundárně. Všechny zmizely spolu s odléčením dermatofyta. Návrhy, že by případy s izolací smíšených kultur měly vyžadovat speciální léčbu, označili autoři za chybné.

Keratinolýza a proces rozkladu nehtu nedermatofytickými vláknitými houbami

K ověření a porovnání potenciálu hub stát se původcem kožního onemocnění byla aplikována řada metod. Protože za chemické a fyzikální vlastnosti epidermis a jejich derivátů odpovídá především skupina α -keratinů, byla většina těchto metod zaměřena na porovnávání schopností keratinolýzy. Keratinolytická aktivita houby může být brána jako jeden z nejdůležitějších faktorů virulence. Lze ji kvantifikovat, takže se na první pohled zdá být ideálním parametrem pro porovnávání patogenních schopností hub.

Keratinolýza může být hodnocena kvantitativně, úbytkem hmotnosti keratinu v médiu, mikroskopicky, změnami pH média nebo měřením množství vyprodukovaných metabolitů. Míra pozorovaného rozkladu závisí na tvrdosti použitého keratinizovaného materiálu. Čím vyšší je obsah cystinu v substrátu, tím je materiál tzv. tvrdší. Disulfidické můstky v molekule cystinu mají hlavní podíl na odolnosti keratinu vůči štěpení. Cystin tvoří asi 10–14 % hmotnosti vlasu, u nehtu dokonce více než 22 % (Marchisio 2000). Při úbytku váhy keratinizovaného materiálu o méně než 20 % nemůže být houba brána jako skutečně keratinolytická a štěpí pouze nekeratinové proteiny, kterých je až 10 % i u tvrdého keratinu. U slabě kerati-

nolytických hub úbytek většinou nepřesahuje 40 % ani po 8 a více týdnech kultivace (Kunert 2000).

Proces rozkladu keratinizovaných tkání dermatofyty byl intenzivně studován, obdobných studií u NVH je znatelně méně. Zvláště málo je uspokojivých experimentálních modelů studujících rozklad lidského nehtu houbami. Určitou podobu s nehtovou ploténkou nalézáme u vlasové kůry. Ta je svou odolností, ale i ontogeneticky s nehtem srovnatelná a bývá až poslední rozkládanou částí vlasu. Ve způsobu jejího rozkladu a také v úrovni dosažené destrukce byla shledána velká podobnost s nehtem (Marchisio 2000).

Vzhledem k rozdílné metodice jsou mezi sebou výsledky různých autorů jen omezeně porovnatelné a navíc, nebo právě proto, se data získaná různými autory u stejného druhu často nezanedbatelně liší. Důvodů může být řada. Při vzniku onychomykózy spolupůsobí mnoho faktorů, které jen těžko můžeme simulovat podmínkami *in-vitro*. Je také možné, že u některých druhů jsou významné vnitrodruhové rozdíly ve schopnosti keratinolýzy a dalších fyziologických vlastnostech.

V experimentálních podmínkách prorůstá houba do nehtu převážně ze spodní strany, což je díky její menší odolnosti méně energeticky náročné. Při mikroskopickém hodnocení rozkladu nehtu nebo vlasu je popisována buď jen povrchová eroze, nebo přítomnost kolmo na povrch prorážejících hyf. Ty mohou být několika typů – od úzkých u druhů se slabou keratinolytickou aktivitou až po výrazně širší hyfy hub schopných rychlého rozkladu substrátu (Ali-Shtayah et Jamous 2000). Při pronikání kompaktní vrstvou kůry vlasu nebo povrchovou vrstvou nehtu byly opakovaně u různých druhů dermatofyt, ale také u druhu *Scopulariopsis brevicaulis* (Marchisio et al. 2000) a druhů rodu *Chrysosporium* (Mitola et al. 2002) popsány útvary podobné apresoriím rostlinných patogenů, z nichž vyrůstá prorážející hyfa k méně odolným vrstvám vlasu a nehtu.

Richardson et Edward (2000) simulovali v *in-vitro* podmínkách rozklad nehtové ploténky běžnými původci onychomykózy mezi NVH, a to *Scopulariopsis brevicaulis*, *Acremonium* sp., *Fusarium* sp. a *Aspergillus versicolor*. Sledovaný růst hub v nehtu nebyl srovnatelný s růstem hub sledovaným v praxi při odběrech. Druhy *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus versicolor* a *Acremonium* sp. rostly jen na povrchu nehtu a rozklad byl omezen na nekeratinizovanou mezibuněčnou hmotu. Pouze u kmenů rodu *Fusarium* byl pozorován růst ve všech vrstvách nehtu.

Mechanismus vstupu a stupeň rozkladu vlasu a nehtu různými kmeny *Scopulariopsis brevicaulis* studoval také Marchisio et al. (2000). Použity byly kmeny izolované jako prokázaní původci onychomykózy i kmeny izolované z ovzduší. Schopnost keratinolýzy se nezdála být specifická pro druh jako celek; byla pozorována jen u třetiny testovaných kmenů.

Oyeka et Gugnani (1997) studovali rozklad nehtových odstřížků druhů *Fusarium solani*, *Scytalidium dimidiatum* a *S. hyalinum*. Zahrnuli pro srovnání i druhy dermatofyt *Trichophyton rubrum* a *T. mentagrophytes*. Zkoumané nedermatofytické druhy vykázaly schopnost rozložit 38–43 % nehtové ploténky oproti 70–73 % ploténky rozložené dermatofyty. Obdobně koncipovaná práce na izolátech druhů rodu *Chrysosporium* prokázala jejich schopnost rozložit 50–80 % vlasové kůry a kutikuly, tedy nejdolnějších částí vlasu (Mitola et al. 2002).

Praktická část

Materiál k praktické části bakalářské práce (Hubka 2008) byl získán od MUDr. Magdaleny Skořepové, CSc. z Centra pro dermatomykózy I.LF UK a VFN. Určované kmeny NVH byly odebrány z pacientů se suspektní onychomykózou z Prahy a Středočeského kraje v období od února do dubna 2008.

Z celkového počtu 29 primokultur NVH izolovaných z nehtů bylo získáno 32 kmenů (viz tab.1). Žádný z kmenů nebyl průkazně patogenní, protože nebyly prováděny opakované odběry a některé kmeny byly izolovány spolu s dermatofytem. Mezi určenými kmeny byly ale některé potenciálně patogenní druhy, především dva kmeny druhu *Fusarium oxysporum*, který patří k nejčastěji izolovaným původcům onychomykózy mezi NVH. Přímá mikroskopie ale v obou případech byla negativní. Až na výjimky patřila většina kmenů k typicky kontaminujícím a sekundárně kolonizujícím druhům. Kmeny *Auxarthron* sp. a *Chaetomium funicola* byly předány do sbírky CCF pod evidenčními čísly CCF 3835 a CCF 3809.

Auxarthron sp.

Za detailnější přiblížení stojí izolace kmenu *Auxarthron* sp. z nehtu 29-leté pacientky s klinicky suspektní onychomykózou. O izolaci zástupce tohoto rodu z klinického materiálu nejsou v literatuře zmínky. Přímá mikroskopie nehtové tkáně byla negativní a opakovaný odběr nebyl proveden, takže vztah kmenu k onemocnění nebyl prokázán.

Rod *Auxarthron* je se svými přibližně 13 popsány druhy (Sigler et al. 2002, Solé et al. 2002a, Solé et al. 2002b) relativně širokým rodem v rámci čeledi *Onygenaceae*. Druhy do něj náležející jsou nápadně složitě utvářenými červenohnědými plodnicemi. Rodové jméno *Auxarthron* je používáno teprve od roku 1963. Do té doby byly nálezy této houby řazeny do rodů *Gymnoascus* a *Myxotrichum*. Proto se můžeme setkat s četnými synonymy (Currah 1985).

Tab. 1: Přehled určených kmenů.		
+ taxony popsané v literatuře jako původci onychomykózy		
- taxony neuváděné v literatuře jako původci onychomykózy		
(srovnání s excerpcí uvedenou v bakalářské práci Hubka 2008)		
Taxon	počet	+/-
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	2	+
<i>Arthriniium phaeospermum</i> (Corda) M.B. Ellis	1	-
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	1	+
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1	+
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	2	+
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud var. <i>pullulans</i>	2	-
<i>Auxarthron</i> sp. CCF 3835	1	-
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	2	-
<i>Chaetomium funicola</i> Cooke CCF 3809	1	-
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	1	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	2	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	1	+
<i>Eurotium amstelodami</i> L. Mangin	1	-
<i>Fusarium</i> cf. <i>avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	1	-
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	2	+
<i>Penicillium expansum</i> Link	3	-
<i>Penicillium spinulosum</i> Thom	2	-
<i>Phoma</i> sp.	2	+
<i>Trichoderma viride</i> Pers.	1	-
<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss	3	+

Zralá askomata jsou kulovitá, krytá síťovitou peridií zvanou retikuloperidie, která sestává z tlustostěnných větvících se a anastomózujících hyf. Plodnice s tímto typem peridie jsou často označovány jako gymnothecia. Nacházíme je u třídy Eurotiomycetes u rodů *Auxarthron*, *Pectinotrichum*, *Arthroderma* a *Gymnoascus*, ale také u třídy Leotiomycetes u rodů *Myxotrichum*, *Pseudogymnoascus* a *Gymnascella*. Velmi nápadná je podoba mezi plodnicemi rodu *Auxarthron* a plodnicemi nepřibuzného rodu *Myxotrichum*, které mají velmi podobnou retikuloperidii. Jak ukazují molekulárně-fylogenetické studie (Sugiyama et al. 1999), vznikla konvergentním vývojem pravděpodobně jako adaptace na šíření členovci. Chlupy na těle členovců propíchnou snadno oka v retikuloperidii a celá plodnice je tím přichycena na tělo členovce a šířena dále na příslušné substráty (Greif et Currah 2003). Zařazení rodu *Myxotrichum* mezi inoperkulární diskomycety na základě sekvencí SSU rDNA mohlo být poněkud překvapivé. Studie zaměřené na ontogenezi plodnic ale

dospěly k závěru, že askoma rodu *Myxotrichum* je ve skutečnosti modifikované apothecium a retikuloperidie vzniká z excipula (Tsuneda et Currah 2004), kdežto u rodu *Auxarthron* se jedná z ontogenetického pohledu o pravé kleistothecium (Skinner et al. 2006).

Nynější koncepce rodu je dobře podpořena i fylogenetickými analýzami (Solé et al. 2002a, Sugiyama et al. 2002). Mezi morfologické znaky, které korespondují dobře s fylogenetickými daty, patří struktura askospor spolu s tvarem a délkou peridiálních přívěsků. Askospory se tvoří ve věckách, jejichž stěna se v době zralosti rozplývá. Jsou kulovité nebo oploštělé, na povrchu síťovité, nebo poseté jamkami (Currah 1985).

Zástupci teleomorfního rodu *Auxarthron* jsou často izolováni jako keratinofilní druhy, dále jsou nacházeni jako saprotrofové na trusu, ve hnízdech a norách zvířat. Rozšíření je pravděpodobně kosmopolitní. Údaje o keratinolytických schopnostech nejsou jednotné a bylo by třeba je znovu experimentálně ověřit. Currah (1985) uváděl všechny druhy jako keratinolytické, stejně tak Hubálek (2000), naproti tomu Udagawa (1997) a Sugiyama et al. (2002) předpokládají ztrátu schopnosti keratinolýzy během evoluce. Anamorfa typu *Malbranchea*, tvořící jednobuněčné nebo dvoubuněčné artrokonidie, je široce rozšířena i v jiných čeledích řádu *Onygenales* (Stchigel et Guarro 2007). Byl zdokumentován případ, kdy byl rod *Malbranchea* určen jako původce zánětu nosních dutin (Benda et Corey 1994).

Záznam o nálezů dvou druhů rodu *Auxarthron* u nás pochází z roku 1974, kdy byly izolovány z peří a hnízd tří druhů ptáků (Hubálek 1974).

P o d ě k o v á n í

Děkuji školiteli bakalářské práce Mgr. Karlu Prášilovi, CSc. za přečtení článku a připomínky, RNDr. Aleně Kubátové CSc. za pomoc s určováním kmenů a zapůjčenou literaturu a přečtení článku. Také děkuji MUDr. Magdaleně Skořepové CSc. za poskytnutý materiál k praktické části.

L i t e r a t u r a

- Ali-Shtayeh M. S. et Jamous R. M. F. (2000): Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 51–59, Bilbao.
- Araújo A. J. G. de, Bastos O. M. P., Souza M. A. J. et Oliveira J. C. de (2003): Onychomycosis caused by emergent fungi: clinical analysis, diagnosis and revision. – *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78: 445–455.
- Arrese J. E., Piérard-Franchimont C. et Piérard E. (1996): Fatal hyalohyphomycosis following *Fusarium* onychomycosis in an immunocompromised patient. – *Am. J. Dermatopathol.* 18: 196–198.

- Baran R., Hay R., Haneke E., Tosti A. et Piraccini B. M. (1999): Onychomycosis: the current approach to diagnosis and therapy. – 74 p., London.
- Benda T. J. Jr. et Corey J. P. (1994): *Malbranchea pulchella* fungal sinusitis. – Otolaryngol. Head Neck Surg. 110: 501–504.
- Campbell C. K. et Johnson E. M. (2005): Dermatophytic molds. – In: Merz, W. G., Hay, R. J. [eds.], Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections: Medical Mycology, 10th ed., p. 220–243, London.
- Currah R. S. (1985): Taxonomy of the *Onygenales*: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. – Mycotaxon 24: 1–216.
- Elewski B. E. (1996): Diagnostic technique for confirming onychomycosis. – J. Am. Acad. Dermatol. 35: 6–9.
- Ellis D. H., Marley J. E., Watson A. B. et Williams T. G. (1997): Significance of non-dermatophyte moulds and yeasts in onychomycosis. – Dermatology 194: 40–42.
- Faergemann J. (1996): The role of yeasts in onychomycosis. – Mycoses 39: 223–224.
- Ghannoum M. A., Hajjeh R. A., Scher R., Konnikov N., Gupta A. K., Summerbell R., Sullivan S., Daniel R., Krusinski P., Fleckman P., Rich P., Odom R., Aly R., Pariser D., Zaiac M., Rebell G., Leshner J., Gerlach B., Ponce-De-Leon G. F., Ghannoum A., Warner J., Isham N. et Elewski B. (2000): A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. – J. Am. Acad. Dermatol. 43: 641–648.
- Gianni C., Cerri A. et Crosti C. (2000): Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. – Mycoses 43: 29–33.
- Greer D. L. (1995): Evolving role of nondermatophytes in onychomycosis. – Int. J. Dermatol. 34: 521–524.
- Greif M. D. et Currah R. S. (2003): A functional interpretation of the role of the reticulopodium in whole-ascoma dispersal by arthropods. – Mycol. Res. 107: 77–81.
- Gupta A. K., Gregurek-Novak T., Konnikov N., Lynde C. W., Hofstader S. et Summerbell R. C. (2001a): Itraconazole and terbinafine treatment of some nondermatophyte molds causing onychomycosis of the toes and a review of the literature. – J. Cutan. Med. Surg. 5: 206–210.
- Gupta A. K., Cooper E. A., MacDonald P. et Summerbell R. C. (2001b): Utility of inoculum counting (Walshe and English criteria) in clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. – J. Clin. Microbiol. 39: 2115–2121.
- Hubka V. (2008): Nedermatofytické keratinofilní mikromycety doprovázející původce onychomykóz. [Bakal. pr., depon. in: Knih. kat. bot. UK v Praze, PřF].
- Hubálek Z. (1974): Fungi associated with free-living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. – Acta Sci. Nat. Brno 8; 1–62.
- Hubálek Z. (2000): Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, p. 93–103, Bilbao.
- Kulíková Z. (2008): Onychomykózy. – Dermatol. praxi 2: 19–21.
- Kunert J. (2000): Physiology of keratinophilic fungi. – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, p. 77–85, Bilbao.

- Marchisio V. F. (2000): Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 86–92, Bilbao.
- Marchisio V. F., Fusconi A. et Querio F. L. (2000): *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or keratinolytic fungus? – *Mycoses* 43: 281–292.
- Mencl K. (2007): Lékařská mykologie – "Popelka" v rodině mikrobiologie. – *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.* (13): 135.
- Mitola G., Escalona F., Salas R., García E. et Ledesma A. (2002): Morphological characterization of in-vitro human hair keratinolysis, produced by identified wild strains of *Chrysosporium* species. – *Mycopathologia* 156: 163–169.
- Oyeka C. A. et Gugnani H. C. (1997): Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. – *Mycoses* 41: 73–76.
- Ranawaka R. R., Silva N. de et Ragnathan R. W. (2008): Onychomycosis caused by *Fusarium* sp. in Sri Lanka: Prevalence, clinical features and response to itraconazole pulse therapy in six cases. – *J. Dermatol. Treat.* DOI: 10.1080/09546630801974912 (published 29 April 2008).
- Richardson M. et Edward M. (2000): Model systems for the study of dermatophyte and non-dermatophyte invasion of human keratin. – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 115–121, Bilbao.
- Sigler L., Hambleton S., Flis A. L. et Paré J. A. (2002): *Auxarthron* teleomorphs for *Malbranchea filamentosa* and *Malbranchea albolutea* and relationships within *Auxarthron*. – *Stud. Mycol.* 47: 111–122.
- Skinner S. J., Tsuneda A., Currah R. S. (2006): Morphology and development of the reticuloperidial ascomata of *Auxarthron conjugatum*. – *Mycologia* 98: 447–454.
- Skořepová M. (2008): *Dermatomykologie v obrazech*. – 95 p., Praha.
- Solé M., Cano J. et Guarro J. (2002a): Molecular phylogeny of *Amauroascus*, *Auxarthron* and morphologically similar onygenalean fungi. – *Mycol. Res.* 106: 388–396.
- Solé M., Cano J., Stchigel A. M. et Guarro J. (2002b): Two new species of *Auxarthron* morphologically and genetically close to *A. kuehnii*. – *Stud. Mycol.* 47: 103–110.
- Stchigel A. M. et Guarro J. (2007): A reassessment of cleistothecia as a taxonomic character. – *Mycol. Res.* 111: 1100–1115.
- Sugiyama M., Ohara A. et Mikawa T. (1999): Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) sequences. – *Mycoscience* 40: 251–258.
- Sugiyama M., Summerbell M. C. et Mikawa T. (2002): Molecular phylogeny of onygenalean fungi based on small subunit (SSU) and large subunit (LSU) ribosomal DNA sequences. – *Stud. Mycol.* 47: 5–23.
- Torres-Rodríguez J. M. et López-Jodra O. (2000): Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi. – In: Kushwaha R. K. S. et Guarro J. (eds.), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, p. 122–135, Bilbao.
- Tosti A., Piraccini B. M. et Lorenzi S. (2000): Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: Clinical features and response to treatment of 59 cases. – *J. Am. Acad. Dermatol.* 42: 217–224.

- Tsuneda A. et Currah R. S. (2004): Ascomatal morphogenesis in *Myxotrichum arcticum* supports the derivation of the Myxotrichaceae from a discomycetous ancestor. – *Mycologia* 96: 627–635.
- Udagawa S. (1997): Taxonomic studies on Plectomycetes (Cleistotheacial ascomycetes). – *Nippon Kingakukai Kaiho* 38: 143–157.
- Walshe M. M. et English M. P. (1966): Fungi in nails. – *Brit. J. Dermatol.* 78: 198–207.

Vít H u b k a : Non-dermatophytic filamentous fungi isolated from onychomycosis-suspected nails

Non-dermatophytic filamentous fungi are often isolated from nails as contaminants or secondary invaders in dermatophyte onychomycosis. Their possible role as pathogens, particularly of some rarely isolated species, is subject of discussion. This article summarises various points of view on the significance of non-dermatophytic filamentous fungi in nail infections. Marginally it deals with the ability of non-dermatophytic filamentous fungi to invade nail tissue *in-vitro*.

Adresa autora: Vít Hubka, katedra botaniky, Universita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Benátská 2, 128 49 Praha 2; e-mail vit.hubka@seznam.cz

OSOBNÍ

K NEDOŽITÝM OSMDESÁTÝM NAROZENINÁM ING. JANA KUTHANA (1929–1997)

Helena Deckerová a Bronislav Hlůza

Na 22. duben 2009 připadlo 80. výročí narození významného českého mykologa s evropským rozhledem – ing. Jana Kuthana. Narodil se v Brně 22. 4. 1929, obecnou školu začal navštěvovat ve Znojmě, pokračoval v Lesonicích a dokončil ji v Brně, kde v roce 1940 nastoupil na reálné gymnázium. Zájem o organickou chemii jej však v roce 1944 přivedl na chemickou průmyslovou školu, na níž maturoval v roce 1948. Pak začal studovat chemicko-technologické inženýrství se zaměřením na organickou chemii a chemii paliv na Vysokém učení technickém v Brně. Protože měl od mládí velký zájem o přírodu, navštěvoval na technice i nepovinné přednášky ze všeobecné a speciální botaniky, zoologie a mikroskopie včetně zbožiznalství. Tam také jako vysokoškolského učitele poznal botanika a mykologa prof. dr. Jana Macků. Rok 1950 však strávil ve vazbě v souvislosti s obviněním jeho otce ze spolupráce s tehdy souzenými vedoucími funkcionáři