

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Tereza Veselská**

Evoluční ekologie rodu *Geosmithia*

*Evolutionary ecology of the genus Geosmithia*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 13. 8. 2013

Podpis

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, podporu a čas, který mi věnoval. Mgr. Žanetě Růžičkové, RNDr. Janu Svobodovi a RNDr. Petru Baldrianovi Ph.D. pak za pomoc s experimenty a za cenné rady. Za poskytnuté konzultace bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Janu Sudovi, Ph.D., Mgr. Tomáši Urfusovi, Ph.D. a Mgr. Martinu Weiserovi. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat všem lidem, kteří mě během mého studia podporovali, především pak své rodině.

## Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract .....	7
1 Úvod .....	8
1.1 Rod <i>Geosmithia</i> .....	8
1.2 Symbiosa podkorního hmyzu s houbami .....	11
1.2.1 Floémofágní kůrovci .....	12
1.2.2 Ambrosioví brouci .....	12
1.3 Role velikosti genomu .....	13
1.4 Představení použitých metod.....	14
1.4.1 Průtoková cytometrie.....	14
1.4.2 Enzymatické analýzy.....	18
2 Cíle práce .....	22
3 Metodika .....	23
3.1 Organismy.....	23
3.2 Kultivace .....	23
3.3 Průtoková cytometrie (FCM) .....	28
3.3.1 Nastavení FCM.....	28
3.3.2 Zpracování dat z FCM .....	28
3.3.3 Barvení jader .....	28
3.3.4 Standardizace .....	32
3.3.5 Optimalizace metodiky FCM.....	32
3.4 Konfokální mikroskopie.....	33
3.5 Výpočet objemu konidií.....	33
3.6 Analýza extracelulárních enzymů.....	34
3.6.1 Extrakce extracelulárních enzymů.....	34
3.6.2 Stanovení aktivit extracelulárních enzymů .....	35

3.7	Metoda Biolog .....	38
3.7.1	Příprava destiček FF MicroPlate™ .....	38
3.7.2	Příprava destiček Phenotype MicroArrays™ .....	38
3.7.3	Analýza dat z metody Biolog .....	39
3.8	Extrakce ergosterolu .....	41
3.9	Extrakce celkových mastných kyselin (MK) .....	41
3.10	Statistické analýzy .....	43
4	Výsledky .....	44
4.1	Průtoková cytometrie .....	44
4.1.1	Optimalizace metodiky .....	44
4.1.2	Standardizace .....	47
4.1.3	Velikost genomu vybraných druhů rodu <i>Geosmithia</i> .....	48
4.2	Objemy konidií .....	49
4.3	Korelace mezi velikostmi genomu a objemy konidií .....	50
4.4	Extracelulární enzymy .....	52
4.5	Metoda Biolog .....	54
4.6	Množství ergosterolu a obsah MK .....	65
5	Diskuze .....	68
5.1	Průtoková cytometrie .....	68
5.1.1	Optimalizace metodiky .....	68
5.1.2	Velikost genomu vybraných druhů rodu <i>Geosmithia</i> .....	69
5.2	Enzymatické analýzy .....	71
5.3	Ergosterol a mastné kyseliny .....	73
6	Závěr .....	75
7	Reference .....	77
	Přílohy .....	90

## Abstrakt

Rod *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales) patří mezi houby žijící v symbiose s podkorním hmyzem. Původní asociací rodu je vazba na floémofágní kůrovce (Coleoptera: Scolytinae). Sběry z celého světa nasvědčují silné vazbě na vektor (podkorní hmyz), kdy spektrum hostitelských rostlin druhů *Geosmithia* odpovídá šířce niky vektoru. V rodě nalezneme speciality na čeleď Pinaceae, ale i generalisty s širokým spektrem hostitelských rostlin, především listnatých dřevin. U druhu *G. morbida* došlo k přechodu od saprotrofního způsobu života k patogennímu. Tento druh způsobuje úhyn ořešáků *Junglans nigra* v USA. Vlastnosti, které tomuto druhu patogenizi umožňují, nejsou zatím známy. Jinou odvozenou strategií, ke které došlo nejméně dvakrát nezávisle na sobě, je asociace s ambrosiovými brouky. Ambrosioví brouci vytvářejí požerek v xylému chudém na živiny, kde si pěstují svou asociovanou houbu, na které jsou nutričně zcela závislí. Jedná se tedy o přechod z fakultativní na obligátní asociaci na vektor. Ambrosiové houby sdílí konvergentní fenotyp, který vede k tvorbě velkých terminálních konidií a ke schopnosti kvasinkového růstu.

Ve své diplomové práci se zabývám studiem znaků, které jsou důležité pro jednotlivé ekologické skupiny: specialisty na Pinaceae, patogena, ambrosiové houby a generalisty. Jelikož se ukazuje, že nejdůležitějším bodem symbiosy hub s podkorním hmyzem je nutriční benefit brouka, který je získán skrze mycetofagii, zaměřila jsem se na studium schopností hub získávat živiny a zpřístupňovat je tak broukovi (enzymatický profil) a na jejich nutriční potenciál (množství ergosterolu a mastných kyselin). Jelikož je u širokého spektra organismů nalézána pozitivní korelace mezi velikostí genomu a buňky, bylo zjišťováno, zda bylo zvětšení objemu konidií ambrosiových hub spojeno se zvětšením jejich genomu.

Enzymatické analýzy zřetelně oddělily specialisty od generalistů. Generalisti vykazovali mnohem širší enzymatický potenciál (metoda Biolog) a afinitu k hemicelulose. Specialisti naopak produkovali enzymy štěpící lignocelulosu. Zajímavým druhem pak byl patogen *G. morbida*, který měl schopnost štěpit jak hemicelulosu tak lignocelulosu. Tato enzymatická všestrannost zřejmě tomuto druhu propůjčuje schopnost patogenity. Ambrosiové druhy se značně odlišovaly produkcí mastných kyselin, především pak kyseliny olejové. Podobaly se jim sesterské druhy ambrosiové *G. microcorthyli*, *G. sp. 8* a *G. sp. CCF4200*. Ambrosiové houby produkovaly konidie s největším objemem a zároveň s největší velikostí genomu v rodě (velikost genomu ambrosiové *G. microcorthyli* byla přibližně dvojnásobná než jejich sesterských druhů). To ukazuje na význam velikosti genomu v evoluci ambrosiových hub.

**Klíčová slova:** evoluční ekologie, *Geosmithia*, podkorní hmyz, velikost genomu, enzymatický profil, mastné kyseliny, ergosterol.

## Abstract

The genus *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales) belongs to fungi living in symbioses with bark beetles. Its original strategy is association with phloeophagous bark beetles (Coleoptera: Scolytinae). The *Geosmithia* shows strong affiliation to vector (bark beetles) worldwide and the spectrum of host plants is delimited by niche of vector. The genus includes the specialists to family Pinaceae, but also the generalists with wide range of host plants mainly belonging to broad-leaved trees. *G. morbida* changed its ecology from saprotrophic to pathogenic way of life and causes decline of *Junglans nigra* in the USA. Characteristics which allow its pathogenesis are not known. Another derived strategy, which occurred at least twice independently, is association with the ambrosia beetles. The ambrosia beetles create galleries in xylem with low nutritive value, and thus they cultivate ambrosia fungus, on which they are entirely nutritively dependent. The ambrosia fungi share convergent phenotype which leads to large terminal conidia and to ability of yeast growth.

This master thesis is focusing on study of the features, which are important for individual ecological groups: the specialists to family Pinaceae, the pathogene, the ambrosia fungi and the generalists. It is becoming apparent that the most important point in the symbiosis between fungi and bark beetles is nutritive benefit of the beetle, which is acquired through mycetophagy. For that reason I have focused on study of capability of fungi to acquire nutrition, thus make them available to the beetle (enzymatic profile), and on their nutrition potential (quantity of ergosterol and fatty acids). Because the correlation between the genome size and the cell size is found among wide range of organisms, it has been studied whether enlargement of conidia volume of ambrosia fungi is connected to enlargement of their genome sizes.

The enzymatic analysis clearly separated specialists from generalists. The generalists showed much broader enzymatic potential (Biolog method) and affinity with hemicellulose. On the other hand the specialists produced enzymes which decompose lignocellulose. Interesting species was pathogen *G. morbida* with ability to decompose both hemicellulose and lignocellulose. This enzymatic universality apparently bestows pathogenicity on this species. The ambrosia species were considerably distinguished by production of oleic fatty acid. Similar oleic fatty acid production showed sister species of ambrosial *G. microcorthyli*, *G. sp. 8* and *G. sp. CCF4200*. The ambrosia fungi produced conidia with largest volumes and genome sizes in genus (genome size of ambrosial *G. microcorthyli* was approximately double in size than its sister species). This demonstrates the significance of genome size in evolution of ambrosia fungi.

**Key words:** evolutionary ecology, *Geosmithia*, bark beetles, genome size, enzymatic profile, fatty acids, ergosterol.

# 1 Úvod

## 1.1 Rod *Geosmithia*

Rod *Geosmithia* vyčlenil v roce 1979 Pitt [1] pro několik druhů dříve popsanych v rodě *Penicillium*. Odlišujícími znaky od rodu *Penicillium* jsou odlišná barva kolonií a konidií (chybí šedo-modrá a šedo-zelená barva), drsný povrch konidioforu a cylindrické fialidy a konidie. Taxonomií rodu *Geosmithia* se dále zabýval Ogawa [2] a zjistil, že se jedná o polyfyletický rod patřící do nejméně tří skupin v rámci Ascomycota. Typový druh rodu, *G. lavendula*, patří do čeledi Bionectriaceae v řádu Hypocreales a právě touto skupinou se zabývá má diplomová práce.

Rod *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales, Bionectriaceae) zahrnuje 22 publikovaných (11 popsanych) [3-10] a cca 20 nepublikovaných druhů (obr. 1) hub asociovaných s podkorním hmyzem, především s kůrovci (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), či vzácně nacházených na alternativních substrátech (dřevo, půda, potraviny) [10, 11]. Sběry z celého světa ukazují na kosmopolitní rozšíření rodu. Oproti ophiostomatálním houbám (viz kapitola 1.2.1) netvoří *Geosmithia* lepkavé spory, přesto však vykazuje vysokou efektivitu při přenosu podkorním hmyzem. To ukazuje, že tvorba lepkavých spor nemá pro asociaci zásadní význam. O funkci rodu *Geosmithia* v symbiose s podkorním hmyzem není mnoho známo. U druhů vytvářejících fialový až červený pigment byla zjišťována tvorba sekundárních metabolitů [12, 13] a bylo detekováno celkem 13 různých polyhydroxylovaných antrachinonů majících různé biologické aktivity (např. antibakteriální).

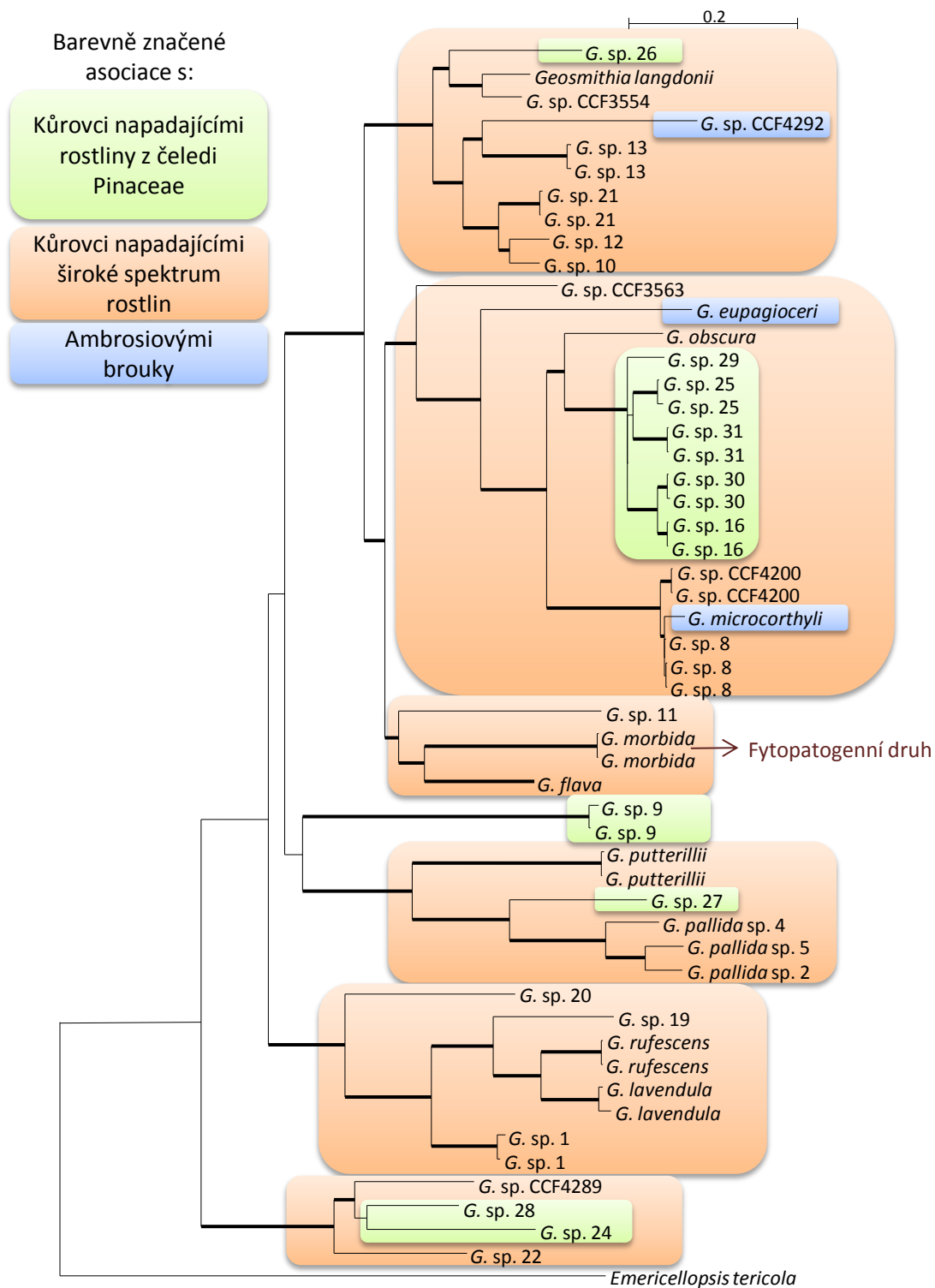
Podrobné studium výskytu jednotlivých druhů *Geosmithia* v evropském temperátním a mediteránním pásmu [7-9] prokázalo úzkou vazbu druhů na vektor (podkorní hmyz). Podobně jako u jiných hub asociovaných s podkorním hmyzem [14, 15] je míra vektorové specifity *Geosmithia* spp. dána šíří niky vektoru. Druhy hmyzu, které sdílí stejného rostlinného hostitele, přenášejí obdobné spektrum hub. Naopak kůrovci s odlišnou nikou se liší i asociovanými druhy hub. To je způsobeno tím, že asociovaná houba jednoho kůrovce může prorůst až do vedlejšího požerku a je následně broukem přenesena dále. Příkladem mohou být druhy hmyzu vytvářející požerky ve floému rostlin z čeledi Pinaceae, které hostí zcela jiné druhy *Geosmithia* než druhy hmyzu listnatých dřevin [7-9]. Většina druhů *Geosmithia* žije v symbiose s floémofágním hmyzem konifer a listnáčů. Nejméně dvakrát nezávisle na sobě došlo k přechodu k ambrosiovému způsobu života [5]. Jedná se o druhy izolované z požerků a fekálních pelet ambrosiových brouků *Microcorthyus* sp., *G. microcorthyli*, a *Eupagiocerus dentipes*, *G. eupagioceri*. Tyto druhy sdílejí morfologické znaky typické pro ambrosiovou houbu, např. tvorba velikých terminálních spor a střídání myceliální a kvasinkovité fáze růstu [16]. Dosud nepopsaný druh *G. sp.* CCF4292 byl nalezen v požercích ambrosiového brouka *Cnesius lecontei*. I když se pravděpodobně jedná o ambrosiovou houbu, přímý doklad o jejím významu pro brouka doložen nebyl. Zajímavým druhem je *G. rufescens*, který doprovází *G.*



*eupagioceri* a *G. sp. CCF4292* v požercích a je považována za auxiliární (sekundární) ambrosiovou houbu [5]. Tato houba nese přechodný fenotyp mezi ambrosiovými a floémovými druhy *Geosmithia* ve formě tvorby jak elipsoidních, malých konidií v řetízkách, tak i velikých, „ambrosiových“ konidií. Ambrosiová *G. microcorthyli* je blízce příbuzná svým sesterským druhům žijícím ve floému rostlin, *G. sp. 8* a *G. sp. CCF4200*. Tyto druhy nejsou odlišitelné ITS rDNA sekvencí, zcela se však liší morfologií, rozšířením i ekologií. Další variabilní geny (*TEF1α*, *Tub2*, *IGS rDNA*) potvrzují, že jde o dva odlišné, byť velmi příbuzné druhy (5). Tato náhlá změna v morfologii ambrosiové *G. microcorthyli* byla zřejmě způsobena koevolucí s ambrosiovým broukem. Evoluční procesy, které utvářely její fenotyp, nejsou zatím známy.

Jinou významnou změnou v ekologii rodu je přechod od saprotrofního způsobu života k patogennímu. Patologický účinek některých druhů byl zjišťován v pracích [17, 18]. U druhů izolovaných z brouka *Cryphalus piceae*, který napadá *Abies alba*, nebyla prokázána patogenita [18]. Druhy *G. pallida* a *G. langdonii* však inhibovaly růst kořenů rostliny *Lepidium sativum*, *G. langdonii* inhibovala i růst stonku [17]. U izolátu IVV7 (*G. pallida*) byla v práci Scala et al. [19] nalezena produkce toxinu cerato-ulminu, který způsobuje symptomy holandské nemoci jilmů. Toto onemocnění způsobovalo hromadné odumírání jilmů v Evropě a Americe. Symptomy způsobují houby *Ophiostoma ulmi* a *O. novo-ulmi*, u kterých byla také dříve prokázána produkce zmíněného toxinu [20]. Zmíněný izolát *Geosmithia* je doposud jediný houbový druh mimo *O. ulmi* a *novo-ulmi*, který produkuje cerato-ulmin. Autoři Scala et al. [19] předpokládají, že gen pro cerato-ulmin byl do genomu izolátu IVV7 vnesen prostřednictvím horizontálního genového transferu umožněnému mezidruhovými hyfálními anastomosami. Nicméně směr tohoto přenosu zůstává nejistý. V provedených inokulačních testech na *Ulmus glabra* však izolát IVV7 nebyl schopen vyvolat symptomy onemocnění [19]. Jediným prokazatelně fytopatogenním druhem rodu je *G. morbida* [6], která způsobuje onemocnění Thousand Cankers Disease [21]. Onemocnění bylo poprvé pozorováno v roce 2001 na ořešáku *Juglans nigra* v Coloradu, USA, kam byl ořešák introdukován ze svého přirozeného výskytu na východním pobřeží USA. Projevem onemocnění je žloutnutí listů a následné odumírání větví končící odumřením celého stromu. Onemocnění je způsobeno agresivním žírem brouka *Pityophthorus junlandis* a vytvářením nekrotických ložek jím přenášenou houbou *G. morbida*. Nekrózy mohou následně splývat po celém obvodu větve, což vede k jejímu odumření.

Ve své diplomové práci se zabývám charakterizací vlastností, které se uplatnily v evoluci rodu *Geosmithia* a umožnily jeho velikou ekologickou diverzitu. Druhy jsou v práci rozděleny na generalisty (izolovány z řady rostlin z více čeledí převážně listnatých stromů), specialisty na *Fraxinus* (*G. sp. 12*) a *Ulmus* (*G. sp. 13*), specialisty na čeleď Pinaceae, ambrosiové druhy, auxiliárně ambrosiový druh *G. rufescens* a patogenní druh *G. morbida*. Druhy, které zatím nemají známou šíři hostitelských rostlin, jsou v práci zařazeny mezi generalisty, jelikož je to nejčastější ekologie druhů listnatých dřevin.



**Obr. 1** Fylogenetický strom ukazující vzájemnou příbuznost druhů rodu *Geosmithia* použitých v této práci. Strom vypočtený pomocí Bayeské metody v programu MrBayes. K výpočtu byl použit spojený dataset genů Tub2, RPB2, TEF1 $\alpha$  TSR1 a MCM7 (3600 bp). Větvě s velkou statistickou podporou (PP  $\geq$  0,98) jsou ztluštěny, nižší statistické podpory nejsou ukázány. Větev vedoucí k outgroupu (*Emericellopsis tericola*) je osmkrát zkrácena. Strom založený na nepublikovaných datech poskytl M. Kolařík.

Vzhledem ke znalosti taxonomie, diverzity, rozšíření a bohatosti ekologických strategií v rodě *Geosmithia* (fakultativní asociace s floémofágním hmyzem, obligátní asociace s ambrosiovými brouky a přechod od saprotrofie k parazitismu) představuje tento rod vynikající model pro hledání znaků důležitých při vzniku nových ekologických strategií hub asociovaných s podkorním hmyzem.

## 1.2 Symbiosa podkorního hmyzu s houbami

Nejčastěji studovaní brouci (Coleoptera), kteří se zavrtávají pod kůru rostlin a využívají její pletiva (xylém i floém), patří mezi kůrovce (Coleoptera: Scolytinae). Tito brouci si v rostlinných pletivech vytvářejí chodbičky (galerie), ve kterých mohou následně pěstovat asociovanou houbu. Jedná se o mutualistický vztah, kdy brouk houbu využívá nutričně a v boji proti rostlinné obraně a houba je broukem přenášena a inokulována na nový substrát. Houboví symbionti patří nejčastěji mezi vláknité houby. Celá asociace je však mnohem komplexnější a zahrnuje i antagonistické a komenzální houby, roztoče [22], kvasinky a bakterie [23-26] s jistou mírou specificity. Zřejmě celé mutualisticky asociované mikrobiální společenstvo má pro symbiosu velký význam, který může spočívat např. v obraně proti patogenům, vzpřístupění živin z pletiv rostlin a v modifikaci rostlinných látek (souhrnně v [27]). Síla vazby mezi broukem a houbou je různá, od příležitostné až po obligátní. Berryman [28] rozděluje kůrovce podle jejich způsobu výživy na saprofágy, kteří napadají odumřelé části stromů a asociace s houbou je spíše příležitostná, fytofágy (*bark beetles*), kteří napadají živá pletiva rostlin a jsou často asociováni s houbou, která jim usnadňuje průnik do rostliny, a na mycetofágy (*ambrosia beetles*), kteří jsou potravně závislí na pěstované houbě a zavrtávají se do xylému mrtvých stromů. Mikroorganismy se také podílejí na produkci feromonů důležitých při ataku zdravých stromů. Berryman [28] proto vyvozuje, že původní strategií kůrovců byla saprofagie. Náhodným společným výskytem brouka a houby v odumřelém floému a xylému vznikla asociace založená na využití metabolismu houby (tvorby agregačních feromonů při detoxikaci pryskyřice). Tato asociace se dále vyvíjela až k fytofagii a mycetofagii.

Nutriční vztahy jsou zřejmě nejdůležitějším faktorem v udržení asociace mezi broukem a houbou. Vliv mutualistické houby na lokální zvýšení obsahu dusíku a fosforu v pletivech rostlin (pro dusík změna koncentrace z 0,4 % v broukem nenapadeném floému na 0,86 % ve floému v úspěšně se vyvíjejícím požerku brouka) byl sledován v práci Ayres et al. [29]. V téže práci bylo také zjištěno, že antagonistická houba pro kůrovce *Dendroctonus frontalis*, *Ophiostoma minus*, způsobovala mnohem nižší akumulaci dusíku v pletivech než mutualistické houby *Ceratocystiopsis ranaculosus* a *Entomocortium* sp. A. Zároveň *Ips grandicollis*, který nepřenáší žádnou houbu, musel hloubit mnohem delší galerie než *D. frontalis*, aby dosáhl potřebného množství dusíku. Rostlinná pletiva nejsou chudá jen na dusík, ale i na další látky, např. steroly. Hmyz není schopen syntézy sterolů, které jsou součástí membrán a prekurzorem pro tvorbu hormonů. Steroly musí přijímat skrze potravu.

Schopnost využití určitého typu sterolu závisí na způsobu výživy daného hmyzu [30]. Ambrosioví brouci rodu *Xyleborus* nebyli schopni dokončit svůj vývoj, pokud jim ve výživě chyběl houbový sterol, ergosterol [31]. Relativní zvýšení obsahu ergosterolu v pletivech rostlin v galeriích kůrovců *Dendroctonus ponderosae* a *D. rufipennis* asociovaných s houbami *Ophiostoma montium*, *O. clavigerum* a *Leptographium abietinum* oproti pletivům nekolonizovaných bylo prokázáno v práci Bentz et Six [32]. Rozdíl v obsahu ergosterolu v myceliu jednotlivých druhů hub však nalezen nebyl, což bylo v rozporu s těsností jejich asociace. Některé houby mají schopnost degradace celulosy a ligninu, vysoce zastoupených složek v rostlinných pletivech. Především u ambrosiových hub by se dalo předpokládat, že tuto schopnost mají. Kim et al. [33] však u ambrosiové houby *Raffaelea quercus-mongolicae* přítomnost enzymů potřebných k degradaci těchto látek nezjistil. Schopnost rozkladu celulosy však detekoval u kvasinek často asociovaných v požercích. To jen ukazuje na složitost a provázanost organismů v rámci symbiosy hub a podkorního hmyzu.

### 1.2.1 Floémofágní kůrovci

Floémofágní kůrovci se živí pletivy rostlin a zároveň většinou i myceliem asociované houby. Asociace mezi broukem a houbou vznikla pravděpodobně před 63 – 97 mil. let a první úživné rostliny patřily do rodu *Araucaria* [34]. Paine et al. [35] dále floémofágní kůrovce rozděluje na primární kůrovce, kteří vykazují agresivní životní strategii (zabíjejí zdravé stromy), a sekundární kůrovce, kteří napadají oslabené stromy.

Floémofágní kůrovci jsou často asociováni s patogenní houbou, která jim usnadňuje obejít obranu rostlin [36] a proniknout do rostlinných pletiv [35, 37]. Přenášené houby nejčastěji patří do rodů *Ophiostoma*, *Ceratocystis* a *Ceratocystiopsis* [15] (souhrnně označovány jako ophiostomatální houby). Tyto houby vytvářejí lepkavé masy spor, které lépe ulpí na povrchu brouka a minimalizují tak ztráty během přenosu na nový substrát [34]. Spory *Ceratocystis* spp. nejsou schopny disperze ve vodě, naproti tomu se velmi dobře rozptylují v pryskyřici, což jim zřejmě pomáhá při inokulaci floému konifer [38]. Na rozdíl od ophiostomatálních hub (vazba především na floémofágní kůrovce konifer) představuje rod *Geosmithia* dominantního symbionta floémofágního hmyzu listnáčů. Asociace *Geosmithia* spp. s floémofágními kůrovci napadajícími čeleď Pinaceae je nacházena zvláště u kůrovců, kteří jsou chudí na ophiostomatální houby [9].

### 1.2.2 Ambrosioví brouci

Většina ambrosiových brouků patří do skupin Platypodini, Corthylini a Xyleborini. Nejstarší fosilie ambrosiových brouků pocházejí z 30 mil. let starého jantaru [39]. Ambrosiový způsob života vznikl v evoluci nejméně sedmkrát nezávisle na sobě [40] a je odvozený od floémofágního [39]. Doposud není znám přechod zpět od ambrosiového způsobu života, což poukazuje na veliké a zřejmě nezvratné změny, které tento přechod doprovázejí [27]. Ambrosioví brouci žijí převážně v tropech

a od floémofágních brouků se liší tím, že se provrtávají až do xylému, kde pěstují houbu, na které jsou nutričně zcela závislí. Tato potravní závislost broukům umožňuje, na rozdíl od floémofágních brouků, využívat široké spektrum hostitelských rostlin [23, 41, 42]. Ambrosiová houba je často doprovázena přídatnými, auxiliárními, houbami, které také brouku slouží jako potrava. Primární ambrosiová houba však v galerii převažuje a její dominance je zajišťována aktivně broukem. Pokud brouk požerok opustí, je ambrosiová houba v galerii nahrazena jinými houbami [43]. Ambrosiová houba v galerii vytváří ambrosiovou vrstvu, která se skládá z hyf nesoucích na svých koncích palisádu konidií či chlamidospor. Průběžné konzumování spor broukem nezpůsobuje asociovaným houbám škodu, ale naopak vede k indukci další sporulace [44]. Morfologie ambrosiových hub podléhá konvergentní evoluci. Většina z nich vytváří kvasinkovitou fázi, která přechází do myceliální. Konidiofory jsou moniloidní a konidie vyrůstají terminálně a soliterně [16]. Houba je broukem přenášena na nový substrát a k jejímu transportu často slouží speciální útvary zvané mycangia [23]. Mycangia jsou různého typu [15]. Některé mohou obsahovat žlázy produkující mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly a aminokyseliny, které podporují růst asociované houby [43]. Houby jsou v mycangích přenášeny ve formě ambrosiových propagulí (*yeast-like growth*) [44], které si jsou mezidruhově morfologicky velmi podobné. Tyto propagule se nevytvářejí bez přítomnosti brouka a je tedy možné, že růstovou konverzi ovlivňuje přímo brouk. Mycangia nejsou specifická pouze pro ambrosiové brouky, ale byly popsány i u některých floémofágních kůrovců, např. u rodu *Dendroctonus*. Vertikální přenos konidií broukem vede, v porovnání se často se sexuálně rozmnožujícími houbami doprovázejícími floémofágní kůrovce, ke striktně asexuálnímu způsobu rozmnožování ambrosiových hub.

### 1.3 Role velikosti genomu

Velikost genomu eukaryotických organismů se liší 80 000 krát [45] a tento rozsah se předpokládá i větší [46]. Velikost genomu však nijak nekoreluje s komplexitou organismů [47]. Tato nesrovnalost byla pojmenována *C-value<sup>1</sup> paradox*. *C-value paradox* byl vysvětlen objevením nekódující DNA, která může vytvářet i většinu jaderné DNA [46, 49]. Již v roce 1971 Bennett [50] poukázal, že vývoj organismu neovlivňují pouze geny, ale také celková hmota DNA. Celkovou DNA Bennett pojmenovat jako *nucleotype*, aby ji odlišil od *genotype* (tedy informace nesenou geny). Od té doby se stále více objevují studie nacházející korelace mezi velikostí genomu a celou řadou znaků. Nejčastější korelace platící přes celou eukaryotickou říši (souhrnně v [46]) je pozitivní korelace mezi velikostí genomu (*C-value*) a velikostí buňky. Velikost genomu dále ovlivňuje rychlost buněčného

---

<sup>1</sup> *C-value*, haploidní velikost genomu, kde „C“ je zkratkou *class* či *constancy* 48. Swift, H., *The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1950. **36**: p. 643-653.

dělení a růstu [51-54] a odpověď druhů na podmínky prostředí [55, 56]. Z toho lze usuzovat na existenci selekce ovlivňující velikost genomu.

Mechanismus, který udržuje korelaci mezi velikostí genomu a buňky, není doposud známý. Z toho důvodu byl tento jev pojmenován *C-value enigma* [46], tedy záhadou haploidní velikosti genomu. Jedním z předpokládaných mechanismů, který představil Cavalier-Smith [49, 57], je potřeba zachování poměru mezi objemem jádra a cytoplasmy (*karyoplasmic volume ratio*) a selekcí na velikost buňky danou ekologií organismu. Nárůst objemu jádra je pak dosažen odlišným svinutím DNA [49, 57], ve větších měřítkách pak zvýšením počtu intronů, pseudogenů nebo repetitivních sekvencí či allo- nebo autopolyploidizací (souhrnně v [58]).

U hub byla korelace mezi velikostí genomu a buňky nalezena u *Benjaminiella poitrasii* [59], *Schizosaccharomyces pombe* [60], *Saccharomyces cerevisiae* [61], *Candida albicans* [62], *Neotyphodium* spp. a *Epichloe* spp. [63, 64]. U chorošovitých hub byly studovány korelace mezi velikostí spor a životními strategiemi těchto hub [65]. Autoři zjistili, že biotrofní parazité produkovali větší spory než saprotrofové a houby bílé hniloby měly větší spory než houby hnědé hniloby. Větší velikost spor u biotrofních parazitů oproti saprotrofům podle autorů spočívá v nutnosti přemoci obranyschopnost stromu. Větší spory by mohly obsahovat více živin, které může houba zužitkovat. Podobný vztah by mohl fungovat i u ambrosiových hub, kde by se mohlo jednat o akumulaci živin ambrosiovými houbami v důsledku koevoluce s broukem. Větší buňky mají vyšší poměr protoplastu k nestravitelné buněčné stěně a zároveň obsahují více DNA a tedy i fosforu.

## **1.4 Představení použitých metod**

### **1.4.1 Průtoková cytometrie**

Průtokový cytometr (FCM, *flow cytometry*) je v dnešní době oblíbeným přístrojem pro analýzu různých parametrů buněk či pro třídění buněčných kultur k jejich dalšímu zpracování. Jeho hlavní kvalitou je rychlost měření (tisíce buněk za sekundu), vysoká rozlišovací schopnost a možnost detekce i malých subpopulací. Původní využití FCM ve 30. letech 20. stol. bylo ve zjištění procentuálního zastoupení jednotlivých typů krevních buněk v krvi. Kvůli výše uvedeným výhodám a zároveň relativně rychlé, jednoduché a neinvazivní přípravě vzorků, našel FCM brzy uplatnění i v mnoha jiných biologických oborech. Nejčastěji se používá k měření relativní či absolutní velikosti jaderného genomu a k zjištění imunofenotypu.

#### **1.4.1.1 Obecný princip**

Základním předpokladem pro analýzu vzorku metodou FCM je použití roztoku obsahujícího izolované částice (buňky, jádra,...). Takový roztok je pak nasáván do průtokové komory, kde dochází hydrodynamickým zaostřením k seřazení částic tak, aby procházely jedna za druhou. Princip FCM pak

spočívá v měření intenzity světla, které je po ozáření laserem nebo jiným zdrojem světla rozptýlováno částicí. Během měření se zachycuje světlo pokračující ve směru přímém od zdroje světla (FSC, *forward-scatter*) a světlo s bočním rozptylem v úhlu 90° (SSC, *side-scatter*), kam patří i emitované fluorescenční světlo (FL, *fluorescence*). Intenzita FSC závisí na velikosti částice (větší částice má vyšší intenzitu), intenzita SSC je pak vyšší, čím větší je vnitřní komplexita buněk. Pokud použijeme fluorescenční barviva, která se vážou na specifické organely či buněčné komponenty (např. proteiny, DNA), můžeme analogicky změřit jejich relativní množství/velikost. V průtokovém cytometru LSRII (využit v této práci) je rozptýlené světlo usměrněno do *pinhole* (otvoru) a optickým kabelem přivedeno do oktagonu (obr. 2) nebo trigonu. Ten se skládá z osmi či tří fotodetektorů, ke kterým světlo prochází přes optické filtry. Optické filtry rozdělujeme na několik typů. *Bandpass* (BP) propouští světlo o vlnové délce v úzkém okruhu od dané vlnové délky, *shortpass* filtry (SP) propouští světlo o vlnové délce stejné nebo kratší než zadaná vlnová délka, zatímco *longpass* filtry (LP) pracují na opačném principu. Fotodetektory dále přemění optický signál na elektronický. Pro detekci FSC se používají fotodiody, pro SSC a FL fotonásobiče (PMTs). Nejsilnější intenzitu světla generuje částice, když se nachází v centru laserového paprsku (obr. 4). Na PMTs je elektrický signál amplifikován. Zesílení signálu může být logaritmické nebo lineární podle nastaveného napětí na dynodě. Pomocí elektronického prahu (*threshold*) lze limitovat události, které budou zaznamenány (obr. 4). Pouze signály se stejnou nebo větší intenzitou, než je hodnota *threshold*, jsou odeslány k dalšímu zpracování do počítače. Čas, během kterého se puls nachází nad prahovou hodnotou, se nazývá *window gate*. Čím se zvýší hodnota *threshold*, tím se zkrátí doba *window gate*, a tím méně šumu při měření zachytíme. Nakonec je analogový signál převeden do digitálního a data jsou uložena do počítače.

#### **1.4.1.2 Zpracování dat při zjišťování velikosti genomu**

##### 1.4.1.2.1 Grafické znázornění

Nejpoužívanějším grafickým znázorněním distribuce jsou histogramy. Uvádějí počet událostí přiřazených k určitému kanálu (odpovídá určité intenzitě signálu). Dvoupřímé měření se zobrazují bodovým grafem (každé události přísluší jeden bod), kde každé ose náleží jeden parametr. Bodové grafy s „třetím rozměrem“ jsou denzitní (určité hustotě buněk náleží určitá barva) a obrysové (propojení bodů se stejným počtem událostí). Alternativně lze použít více než tříparametrové grafy. Taková znázornění jsou už ale těžko prostorově představitelná, takže se většinou setkáváme s maximálně trojrozměrným rozložením.

#### 1.4.1.2.2 Zjištění velikosti genomu

Relativní velikost genomu (rGS) je získána jako průměrná hodnota intenzity fluorescence daného vzorku. Míra přesnosti měření se pak obvykle uvádí variačním koeficientem (CV, *coefficient of variation*). CV se udává v procentech a vypočítá se jako směrodatná odchylka (SD) dělená průměrnou hodnotou fluorescence a násobena 100. Alternativně lze odečíst rGS z mediánu fluorescence daného vzorku a vypočíst *robust coefficient of variation* (rCV). Rozdíl je v tom, že rCV se počítá jako SD od populačního mediánu, tím pádem není rCV zatíženo odlehlými hodnotami [66]. Pokud má vzorek normální distribuci, pak nabývá rGS vypočtená z populačního průměru či mediánu stejných hodnot, to samé platí pro CV a rCV. Pro zjištění absolutní velikosti genomu (GS) je potřeba použít standard, tedy organismus se známou velikostí genomu. Výpočet je pak proveden podle vzorce:

$$GS = F_{sam}/F_{std} \cdot GS_{std},$$

kde  $GS_{sam}$  a  $GS_{std}$  znamenají velikost genomu neznámého vzorku a standardu a  $F_{sam}$  a  $F_{std}$  jsou naměřené intenzity fluorescence neznámého vzorku a standardu.

Jako standard je doporučováno použít organismus s obdobnou velikostí genomu, jako má vzorek, jelikož již trojnásobný rozdíl v GS mezi vzorkem a standardem může vést k chybným výsledkům [67]. Průměrná GS u hub je 0,0378 pg [45], přesto byly v mykologii jako standard použity kuřecí erytrocyty (např. [68, 69]) s diploidní velikostí genomu 2,33 pg. Důvodem je absence vhodného standardu mezi druhy hub [70]. Standard dále může být smíchán přímo se vzorkem a připravován zároveň s ním (interní standard), nebo připravován separátně (externí standard). Pro kritické analýzy je doporučováno použít interní standard [71].

#### 1.4.1.2.3 Gating

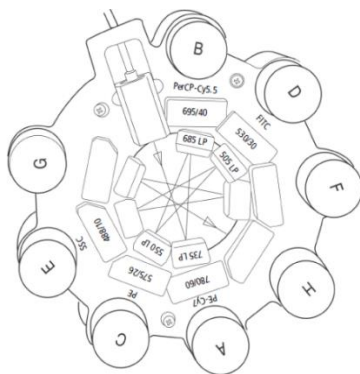
Pokud nás z naměřených dat zajímá pouze podmnožina, která splňuje určitá kritéria, můžeme tato data numericky nebo graficky definovat, tzn. provést *gating*, a následně analyzovat vybrané podmnožiny. *Gating* lze provádět během měření nebo až po uložení dat. U neznámých vzorků je lepší provést *gating* až po uložení dat kvůli zachycení celé variability vzorku. *Gating* lze při zjišťování GS použít i k odlišení signálů generovaných jednou, či více spojenými částicemi. K tomu poslouží výnos výšky signálu k jeho ploše. Pokud má signál velkou plochu ale malou výšku, jedná se o signál ze spojených částic. Pokud má velkou plochu a zároveň i výšku, jedná se o velkou částici (obr. 3).

#### **1.4.1.3 Použití FCM při studiu velikosti genomu u hub**

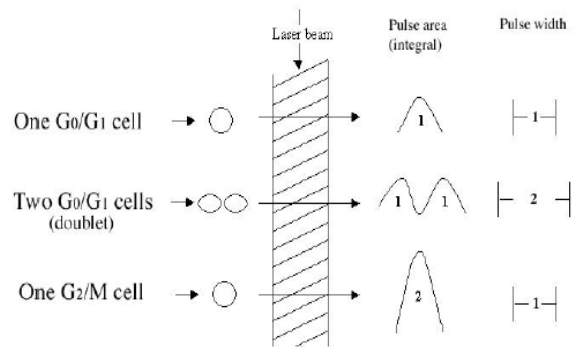
Rutinní používání FCM u hub je limitováno relativně malou GS hub, absencí vhodného standardu [70] a málo rozvinuté metodiky. Na rozdíl od situace v botanice [67, 72-79], existuje v mykologii jen malé množství metodologických prací [80-82] a zcela chybí přehledové práce. Nejčastěji jsou studovány kvasinkovité organismy či fáze růstu [80, 81, 83-89], z vláknitých hub pak



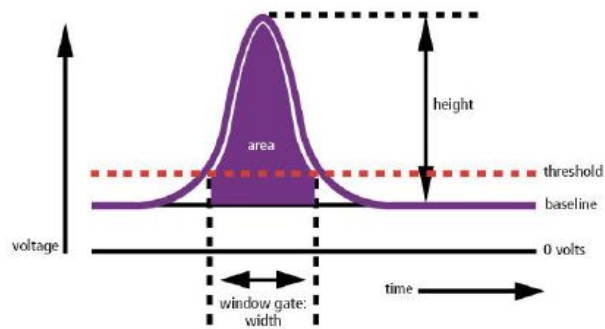
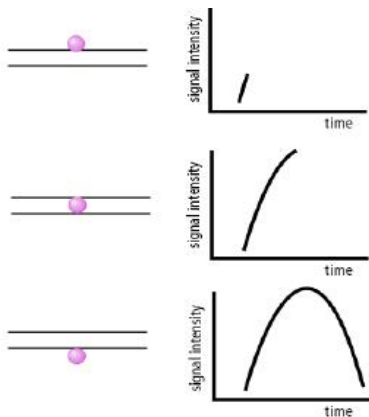
především fytopatogenní houby [68, 90, 91]. Chemikálie používané ve FCM při studiu hub jsou uvedeny v tab. 1. Nejpoužívanějším fluorochromem pro barvení DNA u hub, podobně jako u jiných organismů, je propidium iodide (PI), i když byly použity i SYBER Green, SYTOX Green nebo ethidium bromide. Nejčastěji pufr vycházejí z Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan), u kvasinkovitých organismů se dále používá citrónan sodný, dalším pufrům může být fosfátový pufr, PBS. Jelikož PI neprochází do živých buněk a váže se nejen na dsDNA ale i k dsRNA, musí se buňky nejdříve fixovat a pro odbourání dsRNA inkubovat s RNAsou. K fixaci buněk se téměř ve všech případech používá 70% ethanol.



**Obr. 2 Příklad oktagonu LSR II cytometru.** Šipka znázorňuje trajektorii odražených paprsků světla od LP filtrů [92].



**Obr. 3 Příklad tvaru pulzu.** Na rozdíl od pulzu jedné  $G_0/G_1$  či  $G_2$  částice má pulz generovaný dvěma částicemi dvojnásobnou šířku pulzu. Rozdíl mezi  $G_0/G_1$  či  $G_2$  částicemi je v ploše jejich pulzu [93].



**Obr. 4 Charakter pulzu generovaného jednou částicí po ozáření laserem.** Maximální intenzita je dosažena, když se částice nachází v centru paprsku. Intenzita se zvyšuje při vchodu do paprsku a snižuje, když ho částice opouští (vlevo). Na pulzu rozlišujeme jeho výšku (*height*), šířku (*width*) a plochu (*area*). Další charakteristikou je délka trvání pulzu (*time*), prahová hodnota zaznamenané intenzity fluorescence (*threshold*) a čas během kterého se puls nachází nad prahovou hodnotou (*window gate*) (vpravo) [92].

## 1.4.2 Enzymatické analýzy

### 1.4.2.1 Detekce aktivit extracelulárních enzymů

Produkce extracelulárních enzymů je závislá na substrátu, na kterém houby rostou. Z toho důvodu jsou houby pěstovány na médiu, které podporuje tvorbu studovaných enzymů, např. na slámě [94], nebo se k analýzám používají přímo environmentální vzorky, např. [95, 96]. Naměřené aktivity extracelulárních enzymů dále závisí na způsobu jejich extrakce, především na složení a pH použitého pufru [97]. Pro půdní vzorky je doporučován fosfátový pufr (pH 7), pro lignocelulosevé materiály pak pufr z octanu sodného (pH 5). Podle Baldrian [97] jsou jako doporučené metody pro analýzu exoenzymů uváděny substráty založené na *p*-nitrofenolu (pNP) či na 4-methylumbelliferonu (MUF) a amidomethylcoumarinu (AMC). PNP má oproti MUF/AMC nižší senzitivitu. MUF a AMC jsou fluorogenní substráty. Aktivity enzymů jsou vypočteny z naměřených hodnot fluorescence pro jednotlivé enzymy, od kterých je odečteno fluorescenční pozadí. Hodnoty jsou dále srovnány se standardní křivkou MUF a AMC, čímž se odstraní vliv komponentů, které mohou způsobovat zhášení fluorescence. Aktivita lakasy a peroxidasy je zjišťována spektrofotometricky za použití substrátů, které mají po oxidaci barevný produkt. Pro detekci lakasy se používá ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina), pro manganovou peroxidasu DMAB (3,3-dimethylaminobenzoová kyselina) a MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon hydrazon). Aktivity endoenzymů (endoglukanasa, endoxylanasa) jsou měřeny pomocí barvených substrátů. Během enzymatického štěpení dochází k uvolňování barevného produktu, jehož množství je následně spektrofotometricky měřeno. Aktivity jsou vypočteny podle standardní křivky, která koreluje množství uvolněného barviva s množstvím uvolněného substrátu.

### 1.4.2.2 Metoda Biolog

Metoda Biolog umožňuje zjišťovat schopnost růstu jednotlivce nebo společenstva na daném typu substrátu. Tyto substráty jsou součástí jednotlivých mikrotitračních destiček, které obsahují 96 jamek. Většina destiček se skládá z jedné negativní kontroly (neobsahuje žádný substrát) a 95 jamek s odlišnými substráty (každá jamka obsahuje jeden substrát). Výjimkou jsou např. destičky z řady *Phenotype MicroArrays*<sup>TM</sup> (PM) PM5, která obsahuje kromě negativní kontroly i pozitivní kontrolu, a PM4A, která obsahuje dvě negativní kontroly. Destičky *FF MicroPlate*<sup>TM</sup> obsahují kromě jednotlivých substrátů i barvivo, tetrazolium violet, což umožňuje kvantifikovat respiraci. Redukcí tohoto barviva se v jamkách vytváří fialové barvivo s maximální absorbancí při 490 nm. Barvivo se během inkubace akumuluje v jamkách, což umožňuje kvantifikaci respirace v čase. U některých hub ale akumulace barviva neodpovídala houbovému růstu [98], proto např. Druzhinina et al. [99] použili pro analýzu absorbanci při 750 nm, která odpovídá přírůstku houbové biomasy v čase. Kubicek et al. [100] dále uvádí, že absorbanční spektrum hyalinního mycelia dosahuje i 490 nm. Proto při použití respiračních

dat (čtení při 490 nm) by od absorbance při 490 nm měla být odečtena hodnota absorbance při 750 nm.

Výběr prací využívající metodu Biolog včetně cíle studie a základního zpracování dat je uveden v tab. 2. Data získaná metodou Biolog bývají obvykle zpracovávána kvantitativně (hodnoty absorbancí), nebo také kvalitativně (skórování 01). Na základě dat se dále počítá substrátová aktivita (SA, *substrate activity*) a substrátová bohatost (SR, *substrate richness*), průměrná tvorba barviva/mycelia na destičce (AWCD/AWTD, *average well color/turbidity development*), diverzita růst podporujících substrátů nebo růstové křivky a plochy pod absorbančními křivkami na jednotlivých substrátech. SA je počítána jako součet všech absorbancí v rámci jedné destičky, SR jako počet substrátů dosahujících určité prahové absorbance (většinou 0,1) a AWCD/AWTD je počítán jako součet absorbancí pro jednotlivé substráty, od kterých byla odečtena negativní kontrola, dělený celkovým počtem jamek na jedné destičce. Diverzita růst podporujících substrátů je pak počítána Shannonovým indexem diverzity nebo Gini koeficientem. AWCD/AWTD je doporučováno použít v momentě, kdy u jednotlivých vzorků nemůžeme zaručit stejně koncentrované inokulum. Růst i respirace v jamkách jsou totiž značně závislé na hustotě inokula (shrnuto v [101]). Transformace dat prostřednictvím výpočtu plochy pod absorbanční křivkou je ovlivnitelná dobou, po kterou je utilizace zjišťována [102]. Pokud je tato doba příliš dlouhá, značně se navýší vypočtená plocha u substrátů, na kterých je respirace/růst velmi rychlý (substrát se brzy vyčerpá a profil má dlouhou asymptotu). Pokud je naopak kultivace příliš krátká, podhodnotí se substráty, které jsou využívány relativně pomaleji.

**Tab. 1 Přehled prací využívajících průtokovou cytometrii k změření velikosti genomu u hub.**

Houba	Pufr	Redukce shlukování	Fluorochrom	Fixace	Reference
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	PBS, pH 7,2	Tween 80	PI	70% ethanol	[59]
<i>Armillaria</i> spp.	Tris, pH 7,4	Triton X-100	PI	4% formaldehyd	[68]
<i>Glomales</i> spp.	PBS, Tris, pH 7,0	Triton X-100	PI, DAPI	4% formaldehyd	[69]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tris, pH 7,5	Sonikace	SYTOX Green	70% ethanol	[80]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Citronan sodný, pH 7,5	Sonikace , Triton X-100	SYBR Green	70% ethanol	[81]
<i>Candida albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropical</i>	PBS, pH 7,4	Triton X-100	M	Carnoy fixative	[83]
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Tris, pH 8,0	Sonikace	PI	70% ethanol	[84]
<i>Ca. utilis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Tris, pH 7,5	Žádná	PI	70% ethanol	[85]
<i>S. cerevisiae</i>	Citronan sodný, pH 7,0	Žádná	SYTOX Green	70% ethanol	[86]
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Citronan sodný, pH 8,0	Sonikace , Triton X-100	PI	70% ethanol	[87]
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Citronan sodný, pH 7,0	Sonikace	PI	70% ethanol	[88]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tris, pH 7,4 nebo 8,0	Triton X-100	Hoechst 33258, M + EB	70% ethanol	[89]
<i>Phialophora gregata</i> , <i>Acremonium</i> sp.	Tris, pH 8,0	Triton X-100	PI	70% ethanol	[90]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Tris, pH 8,0	Tween 80	PI	70% ethanol	[91]

PBS – phosphate buffered saline (fosfátový pufr), Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan, PI – propidium iodide, DAPI – 4',6-diamidino-2-fenylindol, M – mithramycin, EB – ethidium bromide.

**Tab. 2 Přehled prací využívajících metodu Biolog.**

Předmět studie	Typ dat	Zpracování dat	Reference
enzymatická kapacita <i>Hypocrea jecorina</i> a z ní odvezených mutantů a transformovaných kmenů	kvantitativní	srovnání absorbancí po určité délce kultivace, odečet sporulace	[99]
metabolická diverzita v rodě <i>Trichoderma</i>	kvantitativní	srovnání absorbancí po určité délce kultivace	[100]
mikrobiální funkční diverzita (FD) z půdy, vody a rhizosféry	kvantitativní	AWCD, transformace hodnot substrátů: substrát-voda/AWCD	[103]
FD v půdě podél gradientu nadmořské výšky a vliv lidské disturbance	kvantitativní	SA, SR	[104]
FD půdního bakteriálního společenstva	kvantitativní	AWCD, Shannonův index diverzity, Gini koeficient	[105]
vliv půdy a rostliny na FD mikrobiálního společenstva ve rhizosféře	kvantitativní	gildy substrátů a jejich průměrná absorbance	[106]
odpověď mikrobiální komunity na zahřátí substrátu	kvantitativní	součet ploch pod absorbanční křivkou a procentuální plocha pro jednotlivé substráty	[107]
funkční změna mikrobiálního společenstva se změnou substrátu	kvantitativní	plocha pod absorbanční křivkou jednotlivých substrátů	[108]
vliv hostitelské rostliny na FD mikrobiálního společenstva ve rhizosféře	kvantitativní	AWCD	[109]
FD hub měnící se podél gradientu nadmořské výšky zahrnující pět vegetačních pásem	kvantitativní	SA, SR, vývoj SR během kultivace	[110]
FD hub z prachu na policích knihovny	kvantitativní	AWCD a AWTD, průměrná absorbance pro jednotlivé substrátové gildy	[111]
FD hub v odlišných nadmořských výškách s odlišným rostlinným společenstvem	kvantitativní	SA, SR, rozdělení substrátů do gild	[112]
vymezení druhu <i>Oidiodendron fomicola</i> v rámci rodu	kvalitativní	porovnání O1 matice	[113]
vliv zdroje uhlíku a světla na sporulaci <i>Hypocrea atroviridis</i>	kvantitativní	srovnání absorbancí po určité délce kultivace	[114]
změny ve FD v půdním společenstvu	kvantitativní	SA, SR	[115]
vliv genotypu a prostředí na metabolickou diverzitu <i>Fusarium compactum</i>	kvalitativní	porovnání O1 matice	[116]

Použité zkratky jsou vysvětleny v textu kapitoly 1.4.2.2.

## 2 Cíle práce

- 1) Vyvinout metodiku průtokové cytometrie (FCM) vhodnou pro rod *Geosmithia*.
- 2) Nalézt vhodný standard pro zjištění velikosti genomu metodou FCM u hub.
- 3) Zjistit zda v rodě *Geosmithia* platí korelace mezi velikostí genomu a konidií a zda velikost genomu hrála roli v evoluci ambrosiových druhů.
- 4) Porovnat enzymatické schopnosti druhů rodu *Geosmithia* vzhledem k jejich ekologii.
- 5) Zjistit zda těsnost vztahu s vektorem (podkorním hmyzem) ovlivňuje „úživnost“ *G.* spp. Jako látky nutričně významné pro brouka byly vybrány ergosterol a mastné kyseliny.

## 3 Metodika

### 3.1 Organismy

Soupis všech použitých izolátů rodu *Geosmithia* (uložený ve sbírce *Culture Collection of Fungi*, označení CCF, a v Laboratoři genetiky a metabolismu hub, MBÚ AVČR v.v.i.) včetně provedených analýz je uveden v tab. 3. Mimo druhy rodu *Geosmithia* byly zařazeny i kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743aa), *Aspergillus niger* (CBS513.88, NRRL350), *A. fumigatus* (Af293, CEA10) a *A. aculeatus* (CBS172.66), které byly testovány jako potenciální standardy pro FCM.

### 3.2 Kultivace

Složení kultivačních médií je uvedeno v tab. 4. Ke kultivaci hub byl použit 2% malt extrakt agar (MEA), popřípadě 2% sladinový agar (2°SL). Výjimkou byl kmen BY4743aa, který byl kultivován na médiu *yeast peptone dextrose* (YPD). Kultivace probíhala v plastových Petriho miskách o průměru 9 cm při teplotě 23 – 25 °C. Pro analýzu extracelulárních enzymů bylo vyvinuto polopřirozené médium, které lépe simulovalo prostředí požerku. Pro přípravu polopřirozeného média byly použity živé větve lípy a borovice (průměr max. cca 5 cm), které se nechaly zaschnout tři týdny, aby lépe simulovaly větve, které jsou brouky vyhledávány. Lýko lípy a borovice bylo vybráno, jelikož je běžným izolačním substrátem druhů vyskytujících se na listnácích či koniferách. Větve byly zbaveny borky a lýko bylo nožem odebráno, vysušeno a namixováno mixérem na piliny okolo 1 cm délky. Piliny byly smíchány s vysušenými a namixovanými kůrovci (*Ips typographus*) v poměru kůrovci: lípa: borovice 1: 23: 23. Směs byla dvakrát sterilizována v autoklávu. Poté byla směs znovu vysušena a bylo naváženo 6 g směsi na 1 skleněnou Petriho misku (průměr cca 9 cm). Misky byly znovu autoklávovány na suchý program. Ke směsi ve skleněné misce bylo následně přidáno 18 ml očkovacího roztoku (vlhkost výsledného média 75 %). Očkovací roztok se skládal z Bacto-peptonu a Bacto-yeats extaktu (PYE), do kterého byly přidány spory hub z čerstvě narostlých kultur na 2°SL. Koncentrace spor byla počítána přímo v PYE (4 ml) v Bürkerově komůrce. Koncentrace spor se pohybovala v rozmezí 3,2 – 4,5 × 10<sup>6</sup> spor/ml. Jedinou výjimkou byl druh *G. microcorthyli*, který neprodukoval dostatečné množství spor (pouze 1,9 × 10<sup>6</sup> spor/ml) a u kterého byly k inokulaci z tohoto důvodu použity i fragmenty mycelia. Pro každý druh byla dále připravena Erlenmeyerova baňka se sterilním PYE roztokem o objemu 68 ml. Do každé Erlenmeyerovy baňky byly následně přidány spory daného druhu (napočítané ve 4 ml PYE). Obsah Erlenmeyerovy baňky byl promíchán. Tento očkovací roztok sloužil k očkování čtyř skleněných misek se 6 g kůrovco-lýkové směsi. Skleněné misky byly ve 4 bodech slepeny izolepou, aby se při manipulaci neotevřely. Houby rostly 4 týdny při 23 – 25 °C v uzavřené nádobě, přičemž byly po čtveřicích vloženy do igelitového sáčku. Sáček nebyl uzavřený, aby mohlo docházet k výměně plynů.

**Tab. 4 Složení kultivačních médií.**

2°malt extrakt agar (MEA)	20 g malt extraktu (Oxoid), 20 g glukosy, 1 g Bacto-peptonu (Difco), 20 g agaru (RNDr. Jan Kulich s.r.o.), 1 l destilované vody
2°sladinový agar (2°SL)	1 l pivovarské sladiny zředěné destilovanou vodou na stupeň cukernatosti 2, 20 g agaru
yeast peptone dextrose agar (YPD)	10 g Bacto-yeast extraktu (Difco), 20 g Bacto-peptonu, 100 ml 20% dextrosy, 20 g agaru, 900 ml destilované vody
polopřirozené médium (množství na jednu Petriho miskou)	6g směsi kůrovci: lýko lípy: lýko borovice (1: 23: 23), 18 ml očkovacího roztoku
očkovací roztok (PYE)	1 g Bacto peptonu, 1 g Bacto-yeast extraktu, 1 l destilované vody



Tab. 3 Přehled analyzovaných kmenů rodu *Geosmithia*.

Druh <i>Geosmithia</i>	Ref.	Ekologie	Kmen	Průtoková cytometrie	Biolog FF	Biolog PM + sporulace	Extracelulární enzymy	HPLC + GC-MS
<i>G. sp. 1</i>	[8]	F, G	CCF4529	+	+	+	+	+
<i>G. pallida sp. 2</i>	[8]	F, G	CCF4270	-	+	-	-	-
<i>G. pallida sp. 4</i>	[8]	F, G	CCF4278	-	+	-	-	-
<i>G. pallida sp. 5</i>	[8]	F, G	CCF4215	-	+	-	-	-
			CCF4271	-	+	-	-	-
			MK980	-	+	-	-	-
			U1.2c.25	-	+	-	-	-
			U6.3e.35	-	+	-	-	-
			U7.8b	-	+	-	-	-
			U8.12b	-	+	-	-	-
			U8.1a	-	+	-	-	-
U8.1b	-	+	-	-	-			
<i>G. putterillii</i>	[3]	F, G	CCF3342	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. flava</i>	[3]	F, G	CCF3354	+	+	+	+	+
<i>G. sp. 8</i>	[8]	F, UN	CCF3350	-	+	-	-	-
			CCF4277	-	+	-	-	+
			CCF4528	+	+	+	+	+
			CCF4207	+	+	+	+	+
<i>G. sp. 9</i>	[8, 9]	F, SP	CCF3703	+	+	+	+	+
<i>G. sp. 10</i>	[8]	F, G	CCF4286	-	+	-	-	-
			MK942	-	+	-	-	-
			CCF3560	-	+	-	-	+

			U2.6a	-	+	-	-	-
			U7.5a	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 11</i>	[8]	F, G	CCF3555	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 12</i>	[8]	F, SF	CCF4274	-	+	+	-	-
			CCF4300	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 13</i>	[8]	F, SU	MK924	-	+	+	-	-
<i>G. langdonii</i>	[8]	F, G	CCF3562	-	+	-	-	-
			CCF4272	-	+	-	-	-
			MK1645	-	+	-	-	-
			CCF4276	-	+	-	-	-
			U5.3a	-	+	-	-	-
			U7.9a	-	+	-	-	-
			U8.12a	-	+	-	-	-
			U8.6c	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 16</i>	[8]	F, SP	CCF4201	+	+	+	+	+
<i>G. obscura</i>	[8]	F, G	CCF3424	-	+	-	-	-
<i>G. lavendula</i>	[7]	F, G	CCF4268	-	+	-	-	-
			CCF4285	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 19</i>	[7]	F, G	CCF3658	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 20</i>	[7]	F, G	CCF4527	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. sp. 21</i>	[7]	F, G	CCF4531	+	-	-	-	-
			CCF4530	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. sp. 22</i>	[7]	F, G	CCF3645	+	+	-	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. sp. 24</i>	[9]	F, SP	CCF4525	+	+	+	+	+
			CCF4294	+	-	-	-	+

<i>G. sp. 25</i>	[9]	F, SP	CCF4205	+	+	+	+	+
<i>G. sp. 26</i>	[9]	F, SP	CCF4223	+	+	+	+	+
			CCF4314	-	-	-	-	+
<i>G. sp. 27</i>	[9]	F, SP	CCF4206	+	+	+	+	+
<i>G. sp. 28</i>	[9]	F, UN	CCF4210	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 29</i>	[9]	F, SP	CCF4221		+	-	-	-
<i>G. sp. 30</i>	[9]	F, SP	CCF4209	-	+	-	-	-
			CCF4208	-	+	-	-	-
<i>G. sp. 31</i>	[9]	F, SP	CCF4526	+	+	+	+	+
<i>G. microcorthyli</i>	[5]	AH	CCF3861	+	+	+	+	+
<i>G. eupagioceri</i>	[5]	AH	CCF3754	+	+	+	+	+
<i>G. morbida</i>	[6]	F, P	CCF3879	+	+	+	+	+
			1259	-	+	+	+	+ <sup>1</sup>
			CCF4576	-	+	+	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. rufescens</i>	[5]	AAH	CCF4524	+	+	+	+	+
			CCF3752	-	-	-	-	+
<i>G. sp. CCF3554</i>	UNP	F, G	CCF3554	+	+	+	+	+ <sup>1</sup>
<i>G. sp. CCF3563</i>	UNP	F, G	CCF3563	-	+	-	-	-
<i>G. sp. CCF4200</i>	UNP	F, UN	CCF4200	+	+	+	+	+
			CCF4290	-	-	-	-	+
<i>G. sp. CCF4289</i>	UNP	F, UN	CCF4289	-	-	-	-	+
<i>G. sp. CCF4292</i>	[5]	AH	CCF4292	+	+	+	+	+

UNP – nepublikováno F – floémofágní, G – generalista, SP – specialista na Pinaceae, SF – specialista na *Fraxinus*, SU – specialista na *Ulmus*, P – patogen, AH – ambrosiová houba, AAH – auxiliárně ambrosiová houba, UN – neznámé hostitelské spektrum, HPLC – kapalinová chromatografie (*high-performance liquid chromatography*), GC-MS – plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (*gas chromatography-mass spectrometry*) +/- – analýza byla/nebyla provedena, <sup>1</sup> – chybí analýza ergosterolu dva dny starých kultur.

### 3.3 Průtoková cytometrie (FCM)

#### 3.3.1 Nastavení FCM

Měření probíhalo na přístroji LSRII (Becton Dickinson, USA) vybaveného programem FACSDiva 6 Software. K excitaci byl použit laser Melles Griot 85-YCA-025 o vlnové délce 561 nm a výkonu 25 mW. Signál fluorescence byl veden přes 590 LP a 610/20 BP filtr k detektoru o napětí 400 mV. Detektory pro zachycení FSC a SSC byly při měření GS v rodě *Geosmithia* nastaveny na napětí 190 a 150 mV za použití logaritmické škály kvůli velikému rozpětí ve velikostech spor v rodě *Geosmithia*. Během optimalizačních kroků bylo možné signál zachycovat lineárně. Fluorescenční signál byl vždy měřen lineárně. *Threshold* pro zachycovanou intenzitu fluorescence byl nastaven na 200. Zaznamenány byly všechny měřené události nad hodnotou *threshold*. Měření vzorku bylo ukončeno, pokud v definované oblasti odpovídající signálu značených jader bylo zachyceno 30 000 událostí. Data byla ukládána ve formátu FCS3 (*flow cytometry standard format version 3*) a následně byla zpracována v programu FlowJo 7.6.1. (Tree Star, Inc., USA).

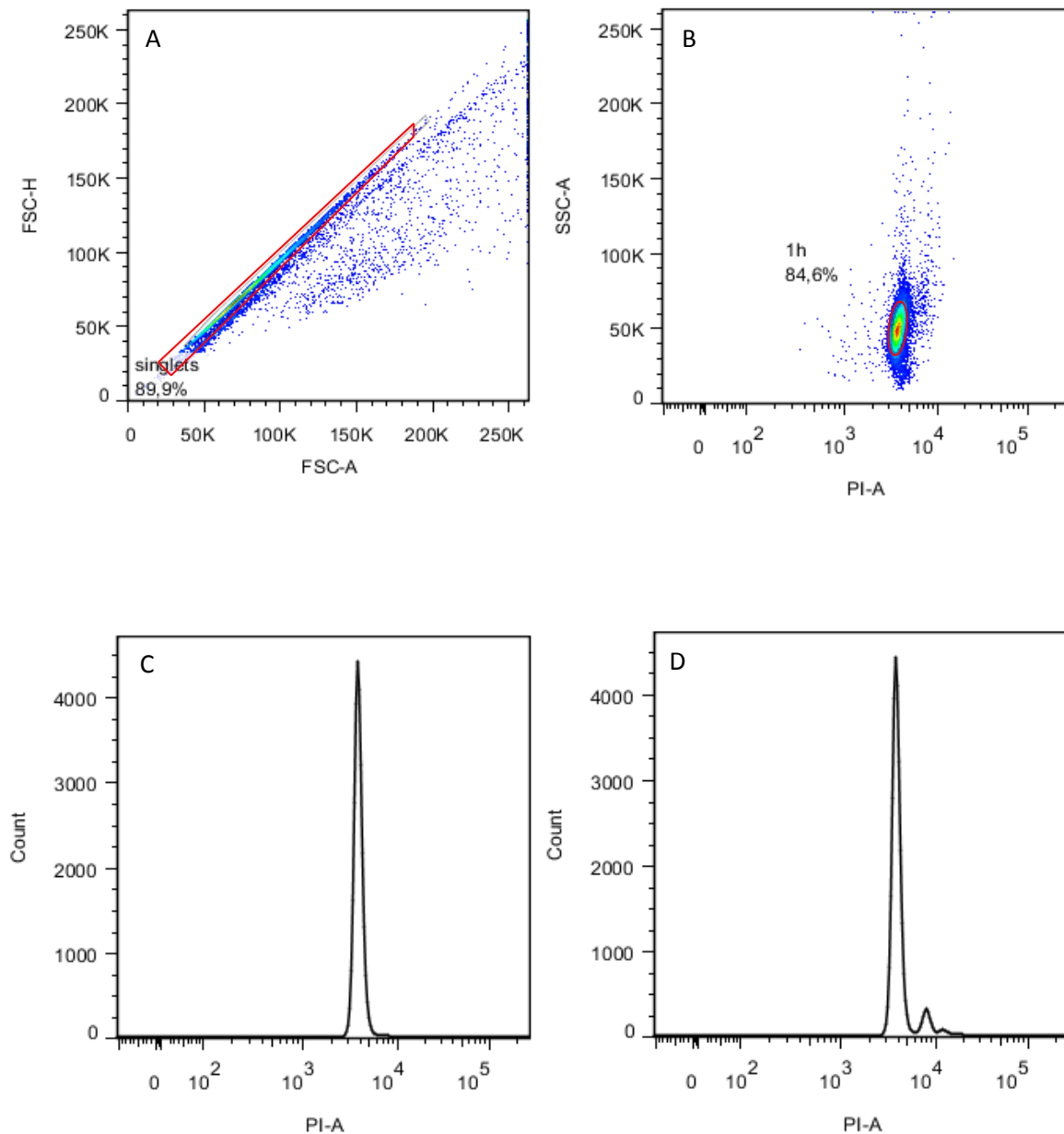
#### 3.3.2 Zpracování dat z FCM

Data byla nejdříve prohlédnuta na výnosu FSC-A – FSC-H (obr. 5), kde A a H značí plochu respektive výšku FSC signálu. Tento výnos umožňuje odhalit signály generované jednou konidií od signálů z více slepených konidií. Kolem oblasti odpovídající signálu unikátních konidií byla provedena funkce *gating* a označená subpopulace byla nazvána „singlets“. Dále se pracovalo pouze s touto oblastí. Události v subpopulaci „singlets“ byly následně zobrazeny ve výnosu SSC-A – PI-A. Velikost genomu byla počítána jako medián fluorescenční intenzity populace ohraničené funkcí *gating* v tomto výnose. Chyba měření byla vyjádřena pomocí rCV. Výpočet GS byl proveden podle vzorce uvedeného v kapitole 1.4.1.2.2.

#### 3.3.3 Barvení jader

Konidie hub byly přeneseny do 10 ml zkumavek s 20% glycerolem. Koncentrace byla upravena v Bürkerově komůrce na  $3 - 5 \times 10^6$  buněk/ml. Zásobní suspenze byla dlouhodobě uchovávána cca po šesti ml při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pro analýzu byl odebrán 1 ml buněčné suspenze a centrifugován 10 min při 14 000 rpm, aby se vytvořila na dně Eppendorfovy zkumavky pevná peleta. Objem nad peletou byl odstraněn a do Eppendorfovy zkumavky bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  fixačního roztoku. Poté byly buňky promyty od fixačního činidla detergentem Triton X-100. Po následné centrifugaci byl odebrán detergent a byl přidán pufr a RNasa A (MP Biomedicals). Na závěr bylo ke vzorku přidáno 50  $\mu\text{l/ml}$  fluorescenční barvy propidium iodide (PI) (Fluka), 1 mg/ml v PBS (viz tab. 5). Barvení probíhalo při pokojové teplotě v temnu 30 min. Shlukování buněk bylo redukováno při každém resuspendačním kroku opakovaným nasáváním a vypouštěním roztoku pipetou. Seznam

použitých chemikálií včetně jejich použitých zkratk a referencí je v tab. 5. Podrobná metodika k jednotlivým optimalizačním krokům a výsledná metodika měření GS je uvedena níže v závěru kapitoly. Jako interní standard byly použity *AlignFlow™ flow cytometry alignment beads, 2.5 μm for 488 nm excitation* (Invitrogen). Kuličky byly použity k zachycení míry stability stroje. Fluorescenční hodnota pro každý vzorek byla upravena o procentuální odchylku jeho interního standardu vztaženému k prvnímu naměřenému vzorku.



**Obr. 5 Příklad vyhodnocení vzorků z FCM.** A – červeně je zvýrazněn *gating* subpopulace „singlets“, tedy signálu odpovídajícímu jednotlivým konidiím, B – červeně je označen *gating* subpopulace „1h“ vzniklý vynesemím „singlets“, ze kterého byla počítána velikost genomu a rCV, C – histogram PI fluorescence subpopulace „singlets“, D – histogram PI fluorescence vzorku bez provedení *gating*.

**Tab. 5 Chemikálie použité v optimalizačních krocích.**

Zkr.	Složení	Ref.	Zkr.	Složení	Ref.
4F	4 % formaldehyde v TE pufru	[68]	PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)	[59, 69, 83]
MA	methanol: kyselina octová (3: 1 v/v)	[117]	TE*	10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA (pH 8)	[91]
MA+	methanol: kyselina octová (3: 1 v/v) 10% DMSO (Duchefa Biochemie), 0,1% Triton-X 100, 5mM EDTA	[118]	Tris-MgCl <sub>2</sub>	200 mM Tris, 4 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0,5% (v/v) Triton X-100 (pH 7,5)	[119]
70E	70% ethanol ve vodě	[59, 80, 81, 84-91]	Otto buffer**	Otto I: 100 mM kyselina citronová, 0,5% (v/v) Tween 20 (pH 2 – 3) Otto II: 400 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (pH 8 – 9)	[120]
95E	95% ethanol ve vodě	[121]	LB01	15 mM Tris, 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 0,5 mM spermine.4HCl (Sigma), 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100 (pH 7,5)	[73]
90M	90% methanol ve vodě	[117]			

DMSO – dimethyl sulfoxide, EDTA – etylendiaminotetraoctová kyselina, \*ve FCM studiích na houbách se často používají pufrы Tris [85, 90] nebo pufrы Tris doplněné stabilizátorem chromatinu a/nebo chelatačním činidlem [68, 69, 80, 84, 89]. V této práci byl použit TE pufr podle De Lucas et al. [91].

\*\*K barvení jader dochází ve směsi Otto I a Otto II pufru v poměru 1: 3 za dosažení pH 7,5.

## 1 Optimalizace metodiky:

### 1 Obecný postup (OP)

- centrifugovat 1 ml buněčné suspenze 10 min při 14 000 rpm
- odstranit objem nad peletou a přidat 500 µl fixačního roztoku, promíchat
- inkubovat buňky při 4 °C při stálém míchání (300 rpm)
- centrifugovat 5 min při 14 000 rpm
- promýt buňky od fixačního činidla detergentem Triton X-100 (500 µl, 0,1%)
- centrifugovat 5 min při 14 000 rpm
- odebrat detergent a přidat pufr s RNAsou A, inkubovat za stálého míchání (300 rpm) při 37 °C
- přidat 50 µl/ml PI (1 mg/ml v PBS), barvit při pokojové teplotě v temnu 30 min

### **1A Vliv koncentrace a délky inkubace RNAsy A**

- a) OP
- b) fixační roztok = ethanol
- c) inkubace = přes noc
- d) –f) OP
- g) pufr = TE, koncentrace RNAsy A \*, délka inkubace s RNAsou A\*\*
- h) OP

\*testované koncentrace RNAsy A [mg/ml]: 0; 0,05; 0,07; 0,1; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 (délka fixace byla 1 hodina)

\*\*testované délky inkubace RNAsy A [min]: 60, 45, 30, 15, 5 a 0 (0 minut znamená, že RNAsa A byla ke vzorku přidána až společně s PI, koncentrace RNAsy A byla 0,1 mg/ml).

### **1B Optimalizace délky a typu fixace**

- a) OP
- b) testované fixační roztoky: 4F, MA, MA+, 70E, 95E, 95M
- c) délka fixace: přes noc, 60 min, 30 min, 15 min
- d) –f) OP
- g) TE pufr, RNAsa A 0,1 mg/ml, inkubace 15 min
- h) OP

### **1C Optimalizace pufru**

- a) OP
- b) MA+
- c) 15 min
- d) –f) OP
- g) RNAsa A 0,1 mg/ml, inkubace 15 min. Testované pufrы: PBS, TE, Otto buffer, Tris-MgCl<sub>2</sub>, LB01 (bez spermin.4HCl), LB01 (včetně spermin.4HCl)
- h) OP

### **Výsledná metodika pro zjištění velikosti genomu v rodě *Geosmithia***

Vychází z obecného postupu a z optimalizačních kroků.

- a) centrifugovat 1 ml buněčné suspenze 10 min při 14 000 rpm
- b) odstranit objem nad peletou a přidat 500 µl MA+, promíchat
- c) inkubovat 15 min při 4 °C při stálém míchání (300 rpm)
- d) centrifugovat 5 min při 14 000 rpm
- e) promýt od fixačního činidla detergentem Triton X-100 (500 µl, 0,1%)

- f) centrifugovat 5 min při 14 000 rpm
- g) odebrat detergent a přidat 950 µl Tris-MgCl<sub>2</sub> pufru (pH 7,5) a 0,1 mg/ml RNAsy A, inkubovat 15 min za stálého míchání (300 rpm) při 37 °C
- h) přidat 50 µl/ml PI (1 mg/ml v PBS), barvit při pokojové teplotě v temnu 30 min

### 3.3.4 Standardizace

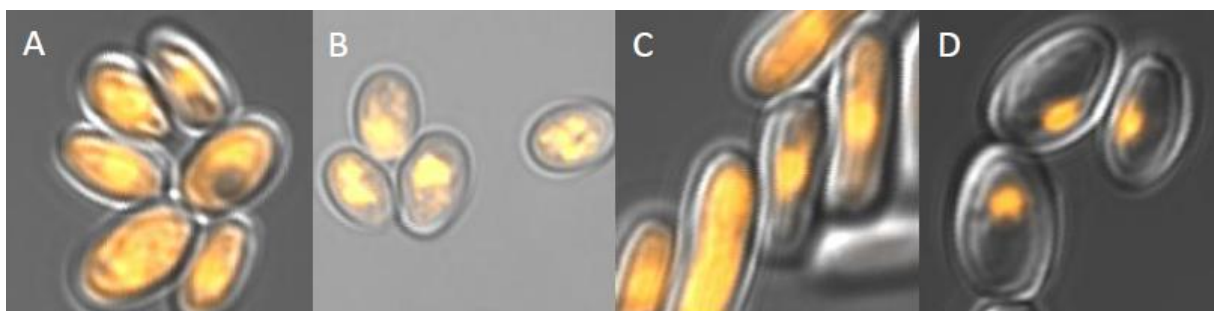
Jako potenciální standardy byly testovány *Saccharomyces cerevisiae* BY4743αα (24,1 Mb [122]), *Aspergillus niger* CBS513.88 (33,9 Mb [123]) a NRRL350 (34,9 Mb [124]), *A. fumigatus* Af293 (29,4 Mb [125]) a CEA10 (29,2 Mb [126]) a *A. aculeatus* CBS172.66 (35,2 Mb DOE Joint Genome Institute, nepublikováno). Barvení jader bylo provedeno stejně jako pro rod *Geosmithia*. Pouze u *A. fumigatus* CEA10 byla zároveň použita i metodika použitá pro tento druh v práci De Lucas et al. [91].

### 3.3.5 Optimalizace metodiky FCM

Pro testování metodiky FCM byly vybrány druhy *G. flava* (CCF3354), *G. sp. 8* (CCF4528), *G. sp. 24* (CCF4525) a *G. sp. 25* (CCF4205). Pouze při testování koncentrace RNAsy A byl místo kmene CCF3354 zahrnut druh *G. sp. 26* (CCF4223). Druhy byly vybrány tak, aby zahrnovaly druhy s odlišnou ekologií (možnost odlišných sekundárních metabolitů) a tvorbou pigmentu. *G. sp. 24* a *G. sp. 26* byly dále vybrány pro známou vnitrokmennou variaci ve velikosti konidií.

Výchozí metodika pro její následnou optimalizaci byla sestavena tak, aby zahrnovala nejčastěji používané chemikálie a postupy podle publikovaných mykologických prací. Jedinou výjimkou byla koncentrace PI, která byla určena podle botanických prací (viz [75]). Důvodem bylo velké rozpětí hodnot PI koncentrací používaných v mykologických studiích. Jelikož FCM neumožňuje vizuální kontrolu měřených buněk, byla FCM kombinována s konfokální mikroskopií. Během optimalizace metodiky byl sledován variační koeficient (rCV) naměřené intenzity fluorescence PI, kvalita měření (lokalizace PI do jádra buňky) a u vlivu pufru byla sledována i variance v naměřených intenzitách fluorescence mezi opakováním (V). Variance V byla počítána jako SD/průměrná hodnota PI intenzity tří replikací. Lokalizace PI do jádra byla rozdělena do tří stupňů (obr. 6) od zcela nevyhovující s vysokým barvením cytoplazmy až po vysokou lokalizaci bez viditelného barvení cytoplazmy. Optimalizační kroky následovaly jeden za druhým, až vytvořily metodiku vhodnou pro rod *Geosmithia*.





**Obr. 6 Příklady lokalizačního stupně PI.** A – (-) nevhodné barvení s vysokým stupněm barvení cytoplazmy, B–C – (0) nevhodné barvení s nižším stupněm barvení cytoplazmy nebo s nerovnoměrným barvením v rámci jednoho vzorku, D – (+) vysoký stupeň PI lokalizace do jádra bez viditelného barvení cytoplazmy.

### 3.4 Konfokální mikroskopie

Pro pozorování buněk na konfokálním mikroskopu Olympus FV1000 (Olympus Corporation, USA) bylo odebráno 65  $\mu\text{l}$  vzorku připraveného pro FCM. Buňky byly centrifugovány a k peletě bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  20% glycerolu. Glycerol redukoval pohyb buněk v preparátu a zpomaloval jeho vysychání. Focení bylo provedeno servisně v Servisním centru pro cytometrii a mikroskopii, MBÚ, AVČR, v.v.i. Buňky byly foceny při 100 násobném zvětšení za použití imerzního oleje (Olympus) a následně ještě třikrát zvětšeny. Excitační vlnová délka laseru o výkonu 2,2 mW byla 559 nm a emise se snímala na detektoru od 570 nm do 670 nm. Buňky byly zároveň foceny při použití Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Pokud byl objekt řezán, byla tloušťka řezu 0,42  $\mu\text{m}$ . Ke kolorizaci, sloučení fotografií z fluorescence a DIC a k 3D vizualizaci byl použit program FluoView™ FV1000 Ver.2.0c (Olympus).

### 3.5 Výpočet objemu konidií

Preparáty byly připraveny přenesením konidií z kultur narostlých na 2°SL agaru kličkou do kyseliny mléčné. Spory byly foceny na mikroskopu Olympus BX51 při 100 násobném zvětšení za použití DIC. U každé konidie (nejméně 100) byla v programu QuickPhoto změřena její délka a šířka. Objem konidií byl vypočítán podle rovnice pro protáhlý elipsoid [65]. Protáhlý elipsoid byl vybrán jako aproximace tvaru konidií *Geosmithia* spp. Vzorec pro objem protáhlého elipsoidu má tvar:

$$V = 3/4 \pi (a/2)^2 b/2,$$

kde  $a$  je naměřená šířka spory a  $b$  je naměřená délka spory. V rámci jednotlivých kmenů byla počínána procentuální variabilita ve vypočítaných objemech konidií. Variance byla vypočtena jako směrodatná odchylka dělená mediánem objemu konidií a násobená 100.

### 3.6 Analýza extracelulárních enzymů

Složení použitých pufrů a roztoků k analýzám extracelulárních enzymů je uvedeno v tab. 6.

**Tab. 6 Složení pufrů a roztoků použitých pro analýzu extracelulárních enzymů.**

sukcinát-laktátový pufr (100 mM, pH 4,5)	0,146 g kyseliny jantarové, 1,64 g DL-mléčnanu sodného, 100 ml deionizované vody
fosfátový pufr (100 mM, pH 6,5)	0,95 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,54 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 ml deionizované vody
citrát-fosfátový pufr (pH 5,0)	2,1 g kyseliny citronové (monohydrát), 3,56 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 100 ml deionizované vody
octanový pufr (50m, pH 5,0)	2,78 g octanu sodného, 900 $\mu\text{l}$ kyseliny octové, 1000 ml deionizované vody
ABTS (0,08%)	40 mg ABTS, 50 ml deionizované vody
DMAB (25 mM)	0,0826 g DMAB, 20 ml fosfátového pufru
MBTH (1 mM)	0,0043 g MBTH, 20 ml deionizované vody
$\text{MnSO}_4$ (2 mM)	0,0169 g $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml deionizované vody
$\text{H}_2\text{O}_2$ (1 mM)	10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_2$ , 80 ml deionizované vody
EDTA (2 mM)	0,074 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 50 ml deionizované vody
Azo-CM celuloza*	1 g Azo-CM-celulosa, 40 ml deionizované vody, 5 ml 2 M octanového pufru (pH 5,0), 0,02 g azidu sodného, doplněno na 50 ml deionizovanou vodou
Azo-xylan	1 g azo-xylanu, doplněno na 100 ml deionizovanou vodou
precipitant (pH 5,0)	10 g octanu sodného (trihydrát), 1 g octanu zinečnatého, 50 ml deionizované vody, 200 ml 95% ethanolu, (pH upraveno pomocí HCl, resp. NaOH)

\*Azo-CM celuloza byla nejdříve smísena s horkou vodou (85 – 90 °C) a míchána 15 min. Po jejím úplném rozpuštění byl přidán zbytek použitých chemikálií.

#### 3.6.1 Extrakce extracelulárních enzymů

Extrakce byla provedena z kultury rostoucí jeden měsíc na polopřirozeném médiu. Obsah Petriho misky s narostlou kulturou (6 g sušina média) byl přenesen do plastové zkumavky a bylo k němu přidáno 30 ml extrakčního pufru (octanový pufr). Pufr byl se dřevem promíchán na vortexu (cca 20 s). Extrakce probíhala za stálého míchání (100 rpm) při 4 °C po dvě hodiny. Zkumavky byly centrifugovány 8 min při 3000 rpm. Supernatant byl následně filtrován přes papírový filtr do nových plastových zkumavek. Vzorky byly uchovávány při teplotě -44 °C až do doby měření aktivit.

### 3.6.2 Stanovení aktivit extracelulárních enzymů

#### 3.6.2.1 Aktivity enzymů stanovené pomocí fluorogenních substrátů methylumbellyferone (MUF) a amidomethylcoumarin (AMC)

Fluorogenní substráty MUF a AMC (Sigma) použité ke zjištění aktivit enzymů jsou uvedeny v tab. 7. Pro analýzu aktivit extracelulárních enzymů byla použita metoda vyvinutá Vepsäläinen et al. [127] a upravená podle Baldrian [97]. V 96 jamkové destičce bylo ke 40  $\mu\text{l}$  daného substrátu (výsledná koncentrace 500  $\mu\text{M}$ ) přidáno 200  $\mu\text{l}$  enzymového extraktu (pro každý kmen čtyři replikace). Pro zjištění fluorescence pozadí byla od každého vzorku naměřena jedna jamka bez přidání MUF/AMC substrátu. Pro každý vzorek byla také zjištěna MUF/AMC standardní křivka, která sloužila ke zjištění uhasínání fluorescence a výpočtu enzymových aktivit. Destičky byly inkubovány při teplotě 40 °C po dobu 125 min. Měření fluorescence bylo provedeno po 5 a 125 min na přístroji INFINITE M200 TECAN (Tecan Instruments, Austria) s použitím softwaru MAGELLAN. Fluorescence byla měřena při vlnových délkách excitace 355 nm a emise 460 nm. Enzymové aktivity byly vypočteny na základě změřené fluorescence podle rovnice uvedené níže. Od každé hodnoty fluorescence daného enzymového extraktu s MUF/AMC substrátem byla odečtena hodnota fluorescenčního pozadí. Výsledná hodnota byla dále porovnána se standardní křivkou MUF/AMC, čímž byla zjištěna koncentrace uvolněného fluorogenního MUF/AMC substrátu. Pro výpočet aktivit enzymů daného kmene houby byl vypočten průměr ze čtyř nezávislých opakování. Tento průměr byl dále přepočten tak, aby odpovídal enzymové aktivitě na 1 g sušiny. Rovnice výpočtu aktivit extracelulárních enzymů:

$$\text{Aktivita (U/g)} = (F_{t_2}/k_{t_2} - F_{t_1}/k_{t_1}) \cdot V_2/V_1 \cdot \Delta t \cdot m,$$

kde  $F$  je naměřená fluorescence po odečtení fluorescenčního pozadí,  $k_t$  je směrnice standardní křivky MUF/AMC  $F(c) = k_t \cdot c$  v čase  $t$ ,  $c$  je koncentrace MUF/AMC substrátu,  $t_1$  je 5 minut,  $t_2$  je 125 minut,  $\Delta t$  je rozdíl  $t_1 - t_2$ ,  $V_2$  je objem extrakčního pufru,  $V_1$  je objem reakční směsi a  $m$  je hmotnost sušiny média.

**Tab. 7 Použité substráty MUF/AMC.**

Enzym	EC	Substrát	Aktivní v procesu
$\beta$ -glukosidasa	3.2.1.21	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	degradace celulosy
$\alpha$ -glukosidasa	3.2.1.3	4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	degradace polysacharidů
celobiohydrolasa	3.2.1.91	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-cellobioside	degradace celulosy
$\beta$ -xylosidasa	3.2.1.37	4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	degradace hemicelulosy

N-acetylglukosaminidasa	3.2.1.52	4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β-D-glucosaminide	degradace polysacharidů
arylsulfatasa	3.1.6.1	4-methylumbelliferyl sulfate	získání S
fosfomonoesterasa	3.1.3.1	4-methylumbelliferyl phosphate	získání P
fosfodiesterasa	3.1.4.1	bis-(4-methylumbelliferyl) phosphate	získání P
alanin aminopeptidasa	3.4.11.12	L-alanine-7-amido-4- methcoumarin	získání N
leucin aminopeptidasa	3.4.11.1	L-leucine-7-amido-4- methylcoumarin	získání N

### 3.6.2.2 Stanovení aktivit extracelulárních enzymů pomocí změny absorbance

Mezi aktivity enzymů stanovovaných pomocí změny absorbance patřily: lakasa, Mn-peroxidasa, Mn-nezávislé peroxidasy, oxidasa, endoglukanasa a endoxylanasa. Aktivity byly vypočteny podle rovnice:

$$\text{Aktivita (U/g)} = \Delta A / \varepsilon \cdot V_1 / V_2 \cdot V_3 / m,$$

kde  $\Delta A$  je změna absorbance za 1 min,  $\varepsilon$  je molární extinkční koeficient,  $V_1$  je objem reakční směsi,  $V_2$  je objem vzorku v reakční směsi,  $V_3$  je objem extrakčního pufru a  $m$  je hmotnost sušiny média.

Enzymové aktivity byly vyjádřeny v jednotce 1 U (unit, 1 U = 1 μmol/min) na gram sušiny. Jednotka 1U je v literatuře nejvíce používána a vyjadřuje množství enzymu potřebné pro vytvoření 1 μmol produktu za 1 minutu.

### 3.6.2.3 Stanovení aktivity lakasy (EC 1.10.3.2)

Aktivita lakasy byla zjišťována měřením oxidace ABTS v citrát-fosfátovém pufru [128]. Reakční směs obsahovala: 150 μl citrát-fosfátového pufru, 50 μl roztoku ABTS (Sigma) a 50 μl enzymového extraktu. Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byl nejdříve pipetován citrát-fosfátový pufr a enzymový extrakt. Poté byl do směsi přidán roztok ABTS, čímž byla reakce iniciována. Absorbance při vlnové délce 405 nm byla odečítána v sedmi měřeních opakovaných po 120 s (celkový čas měření 12 min). Molární extinkční koeficient má při  $\lambda = 405$  nm hodnotu  $\varepsilon = 36\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 3.6.2.4 Stanovení aktivity manganové peroxidasy (MnP, EC 1.11.1.13), mangan nezávislých peroxidas a oxidas

Aktivita enzymů byly stanoveny podle protokolu Ngo et Lenhoff [129]. Aktivita byla detekována prostřednictvím oxidačního propojení DMAB a MBTH (Sigma), které vede ke vzniku

fialového indaminového barviva detekovaného spektrofotometricky při  $\lambda = 595$  nm. Reakční směs obsahovala 200  $\mu\text{l}$  roztoku AR, AP nebo AB (složení v tab. 8) a 50  $\mu\text{l}$  enzymového extraktu.

Absorbance byla odečítána při vlnové délce 595 nm v sedmi měřeních po 120 s (celkem 12 min). Molární extinkční koeficient při  $\lambda = 595$  nm má hodnotu  $\epsilon = 32\,900 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Hodnota aktivity při reakci s roztokem AR odpovídá aktivitě všech peroxidas (Mn-závislé i Mn-nezávislých) a oxidas. Při reakci s roztokem AP odpovídá hodnota aktivity Mn-nezávislých peroxidas a oxidas a při reakci s roztokem AB se jedná o hodnotu aktivit oxidas. Hodnota aktivit s roztokem AB tedy odpovídá aktivitě oxidas, hodnota získaná odečtením hodnoty aktivity s roztokem AB od AP odpovídá aktivitě Mn-nezávislých peroxidas a hodnota získaná odečtením hodnoty aktivity s roztokem AP od AR odpovídá aktivitě Mn-závislé peroxidasy.

**Tab. 8 Složení roztoků AR, AP, AB.**

Chemikálie	AR [ $\mu\text{l}$ ]	AP [ $\mu\text{l}$ ]	AB [ $\mu\text{l}$ ]
Sukcinát-laktátový pufr	150	150	150
DMAB	20	20	20
MBTH	10	10	10
MnSO <sub>4</sub>	10	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	10	-
EDTA	-	10	10
H <sub>2</sub> O	-	-	10

### 3.6.2.5 Stanovení aktivity endo-1,4- $\beta$ -glukanasy (EC 3.2.1.4) a endo-1,4- $\beta$ -xylanasy (EC 3.2.1.8)

Ke stanovení enzymových aktivit byly použity chromogenní substráty Azo-CM celulóza (pro endo-1,4- $\beta$ -glukanasu) a Azo-xylan (pro endo-1,4- $\beta$ -xylanasu) (Megazyme). V důsledku enzymatického štěpení je barvivo substrátu uvolňováno do roztoku, zatímco vysokomolekulární materiál zůstává po precipitaci a centrifugaci na dně zkumavky.

V 1,5 ml Eppendorfových zkumavkách bylo ke 150  $\mu\text{l}$  enzymového extraktu přidáno 150  $\mu\text{l}$  daného chromogenního substrátu. Směs byla rychle promíchána na vortexu a inkubována při teplotě 40 °C po dobu 120 min. Jako kontrola byla místo enzymového extraktu použita destilovaná voda. Reakce byla zastavena přidáním precipitantu. Po promíchání na vortexu (10 s), vychladnutí a centrifugaci (10 min, 10 000 rpm) byla směs spektrometricky měřena při vlnové délce 595 nm. Měření bylo provedeno na spektrofotometru Lambda 11 UV/VIS (Perkin Elmer, USA). Pro určení enzymové aktivity byly použity kalibrační vztahy z příbalových letáků dodavatele reagentů.

Kalibrační vztah pro aktivitu endo-1,4- $\beta$ -glukanasu:

$$\text{pro } A < 0,7: y \text{ (U/ml)} = 0,914(A - A_0)$$

$$\text{pro } 0,7 < A < 1,0: y \text{ (U/ml)} = (A - 0,7)1,067 + (0,7 - A_0)0,914$$

Kalibrační vztah pro aktivitu endo-1,4- $\beta$ -xylanasu:

$$\text{pro } A < 0,6: y (U/ml) = 1,036(A - A_0)$$

$$\text{pro } 0,6 < A < 0,9: y(U/ml) = (A - 0,6)0,850 + (0,6 - A_0)1,036$$

Výsledná enzymová aktivita byla následně počítána podle rovnice:

$$\text{Aktivita } (U/g) = y/t \cdot V_1/V_2 \cdot V_3/m$$

$A$  je absorbance vzorku,  $A_0$  je absorbance kontroly,  $y$  je hodnota enzymové aktivity vypočtená podle kalibračních vztahů,  $t$  je čas inkubace,  $V_1$  je objem chromogenního substrátu,  $V_2$  je objem vzorku,  $V_3$  objem extrakčního pufu a  $m$  je hmotnost sušiny média.

## 3.7 Metoda Biolog

### 3.7.1 Příprava destiček FF MicroPlate™

Destičky *FF MicroPlate™* (FF) byly použity ke zjištění utilizace zdrojů uhlíku (p. 1). Postup byl převzat z instrukcí výrobce (Biolog, Inc., USA). Houbové izoláty byly kultivovány na MEA popřípadě 2°SL agaru při teplotě 23 – 25 °C dokud nebyla dosažena dostatečně masivní sporulace (1 – 2 týdny). Poté byly spory přeneseny do sterilního inokulačního roztoku (FF-IF) pomocí sterilního vatového tampónu. Roztok FF-IF obsahoval 0,25 g phytagelu (Sigma), 30  $\mu$ l Tween 40 a 100 ml deionizované vody. Tampónem bylo jemně přejížděno po místech se sporulací tak, aby se zamezilo přenesení živin z média do FF-IF. Roztok spor byl promíchán, aby byl vzorek homogenní. Hustota spor v FF-IF byla stanovena na spektrofotometru Lambda 11 UV/VIS (Perkin Elmer, USA) při vlnové délce 490 nm. Hustota byla stanovena na transmitanci  $T = 75 \pm 2 \%$ , při nastavení transmitance sterilního FF-IF jako  $T = 100 \%$ . Suspenze spor v FF-IF s upravenou transmitancí sloužila přímo k inokulaci destičky FF (100  $\mu$ l suspenze na 1 jamku). Pro každý kmen byla provedena dvě opakování. Destičky s houbovou kulturou byly uchovávány při teplotě 23 – 25 °C po jeden týden. Měření absorbance při vlnových délkách 490 a 750 nm, odpovídajících oxido-redukčnímu potenciálu a houbového růstu, bylo provedeno po 0, 24, 48, 72, 96 a 168 hodinách. Měření probíhající v den inokulace destičky bylo bráno jako měření v čase 0.

### 3.7.2 Příprava destiček Phenotype MicroArrays™

Destičky *Phenotype MicroArrays™* (PM) (p. 1) sloužily ke zjištění utilizace zdrojů dusíku (PM3B), fosforu a síry (PM4A) a nutričních doplňků (PM5). Postup byl proveden podle instrukcí výrobce (Biolog, Inc., USA). Kultivace hub a úprava hustoty spor v FF-IF roztoku odpovídala přípravě destiček FF s tím rozdílem, že transmitance byla upravena na hodnotu  $62 \pm 2 \%$ . Poté bylo 25  $\mu$ l této sporové suspenze přidáno k 11,975 ml PM inokulačním roztokům (složení viz tab. 9). Takto

připravený PM inokulační roztok sloužil k inokulaci dané PM destičky (100 µl/jamku). Pro každý kmen bylo provedeno jedno opakování. Uchovávání destiček a měření absorbcí probíhalo stejně jako u destiček FF.

**Tab. 9 Složení PM inokulačních roztoků.** Koncentrace složek je uvedena po přidání suspenze spor.

PM zásobní roztoky		PM3B, PM5		PM4A	
		[ml]	[mM]	[ml]	[mM]
FF-IF		10	0,833×	10	0,833×
D-glukosa (3 200 mM)		0,375	100	0,375	100
PM aditiva (12×)	60 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,0)	1	5	-	-
	24 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2		-
spory ve FF-IF roztoku		0,025	-	0,025	-
destilovaná voda		0,6	-	1,6	-
celkem		12	-	12	-

### 3.7.3 Analýza dat z metody Biolog

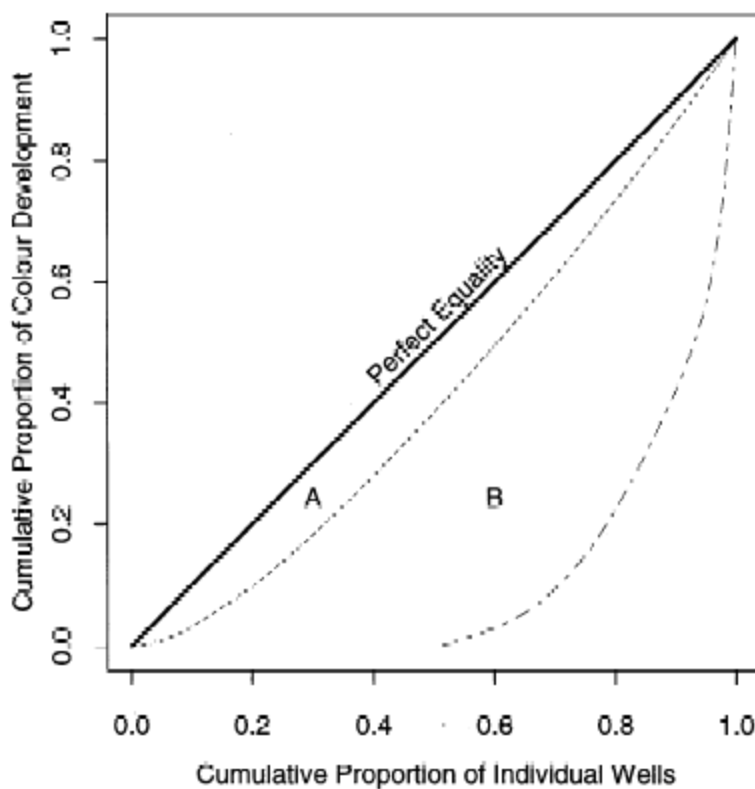
K vyhodnocení dat získaných metodou Biolog byly použity hodnoty získané při absorpci 750 nm, která odpovídá houbovému růstu v dané jamce. K analýze využívání substrátů bylo použito měření po 96 hodinách. Až do tohoto dne utilizace narůstala, poté se již objevovala sporulace, která může ovlivnit čtení absorbcí [130]. Pro zjištění vlivu stáří kultury (doby udržování kultury ve sbírce) byl porovnán utilizační profil starých a nových kultur (zpracovány do měsíce od izolace čisté kultury) druhů *G. langdonii* a *G. pallida* sp. 5, u kterých byl k dispozici větší počet starých i nových kultur. Mezi staré kultury byly zařazeny kmeny udržované od roků 2004 – 2007. Nové kultury byly izolovány v roce 2010. Od hodnot jednotlivých jamek dané destičky byla odečtena hodnota její negativní kontroly a záporné hodnoty byly dány na nulu. U destiček FF byly k analýzám použity průměrné hodnoty pro dvě opakování. Na destičkách PM byla odečítána pod binokulární lupou sporulace po 168 hodinové inkubaci. Výskyt sporulace byl skórován jako 0 (žádná sporulace), 1 (alespoň 1 konidiofor), 1,5 (sporulace do 1/3 jamky), 2 (sporulace do 2/3 jamky), 3 (sporulace nad 2/3 jamky).

Pro každý kmen byla spočítána substrátová bohatost (SR), substrátová aktivita (SA) a Shannonův index diverzity. Shannonův index diverzity byl dále u vybraných druhů na FF destičkách porovnán s diverzitou vypočítanou pomocí Giniho koeficientu. Giniho koeficient se vypočítá jako poměr plochy mezi Lorenzovou křivkou a diagonálou jednotkového čtverce k celkové ploše pod diagonálou. Lorenzova křivka byla získána podle Harch et al. [105]. Substráty v rámci destičky byly seřazeny vzestupně podle odečtené absorpce a pak byly vyneseny v grafu jako kumulativní procentuální efekt substrátů ke kumulativnímu procentuálnímu efektu jamek. Získanou funkcí byl protnut polynom a jeho rovnice byla použita pro výpočet Giniho koeficientu. Giniho koeficient byl spočítán podle rovnice:

$$G = 1 - 2 \int_0^1 L dF,$$

kde  $L$  je Lorenzova křivka a  $F$  je standardizovaná kumulativní distribuce standardizované populace (viz obr. 7).

SR byla vypočtena jako součet jamek s hodnotou větší než 0,1 (FF, PM3B) nebo 0,01 (PM4A, PM5). SA byla počítána jako součet absorbcí v rámci jedné destičky. Na destičkách FF byly dále substráty podle typu rozděleny do gild podle práce Dobranic et Zak [110] (p. 2) pouze skupina aminokyseliny a aminy/amidy byla spojena do jedné gildy a polymery byly spojené se skupinou nazvanou „Miscellaneous“, tedy skupinou obsahující rozdílné typy zdrojů. Sloučení skupin bylo provedeno kvůli vyloučení špatně rozpustných substrátů (viz kapitola 4.5). Při výpočtu významu jednotlivých gild na růst hub byla nejprve spočtena průměrná absorbance při 750 nm v rámci každé gildy. Získaná hodnota byla upravena vynásobením poměru počtu jamek v rámci gildy k počtu jamek v největší gildě. Procentuální růst v gildě byl pak vyjádřen jako upravený průměr v gildě vydělený součtem upravených průměrů. Výsledky byly zobrazeny sloupcovým grafem pro jednotlivé ekologické skupiny (průměrné hodnoty v gildě).



**Obr. 7 Lorenzova křivka při výpočtu Gini koeficientu [105].** Plná čára odpovídá zcela rovnoměrnému růstu v rámci celé destičky, přerušované čáry představují Lorenzovy křivky. Plochy mezi plnou a přerušovanou křivkou: A – odpovídá malému Gini koeficientu a velké funkční diverzitě vzorku, B – odpovídá vysokému Gini koeficientu a nízké funkční diverzitě.



### 3.8 Extrakce ergosterolu

Pro analýzu množství ergosterolu byly spory ve sterilizované vodě (250  $\mu$ l/1 Petriho misku) pipetou přeneseny na Petriho misku s MEA, jejíž povrch byl překryt celofánem. Voda se sporami byla skleněnou kličkou rozetřena tak, aby byl pokryt celý povrch misky. Houby rostly dva a jedenáct dní. Dvoudenní kultivace byla zahrnuta, aby se předešlo výskytu sporulace, která by mohla ovlivnit výsledky. Vzorky rostoucí dva dny (2 replikace na kmen) jsem extrahovala vlastnoručně, vzorky rostlé 11 dní (tři replikace na kmen) byly extrahovány servisně. Samotné množství ergosterolu ve vzorku bylo měřeno vždy servisně v Laboratoři environmentální biotechnologie, MBÚ, AVČR v.v.i.

Narostlá kultura byla sterilně přenesena do předvážených 8 ml skleněných zkumavek, ve kterých byla následně lyofilizována. Lyofilizované vzorky byly znovu zváženy a množství sušiny bylo vypočítáno jako rozdíl hmotnosti zkumavek s lyofilizátem a prázdné zkumavky. K lyofilizátu byl přidán 1 ml cyklohexanu a 3 ml 10% KOH v methanolu. Takové vzorky byly dále inkubovány v ultrazvuku (90 min, 70 °C). Po inkubaci byly ke vzorku přidány 2 ml cyklohexanu a 1 ml destilované vody. Směs byla třepána 30 s na vortexu a následně centrifugována (5 min, 3 500 rpm). Supernatant byl odebrán do nových zkumavek. Do zkumavky s lyofilizátem byly znovu přidány 2 ml cyklohexanu a 1 ml destilované vody a celá procedura se opakovala ještě dvakrát. Odebraný supernatant (obsahující supernatant ze všech tří extrakcí) byl odpařen pod atmosférou dusíku do sucha a následně rozpuštěn v 1 ml methanolu. Vzorek s vyextrahovaným ergosterolem v methanolu byl třepán na vortexu 30 min, a poté inkubován ve vodní lázni (15 min, 40 °C) a znovu protřepán (30 s). Obsah zkumavek byl pipetou přenesen do Eppendorfových zkumavek a centrifugován (3 min, 6 000 rpm). Ze zkumavek pak bylo odebráno 800  $\mu$ l směsi do nových skleněných zkumavek, které byly pevně uzavřeny a do analýzy uchovávány při teplotě -20 °C.

Obsah ergosterolu ve vzorcích byl měřen na přístroji Waters Alliance HPLC (Waters, USA) s použitím 100% methanolu jako mobilní fáze (průtok 1 ml/min). Ergosterol byl detekován při 282 nm. Kalibrační křivka byla připravena lineární regresí pěti koncentrací (0,02 – 50  $\mu$ g/ml). Naměřené množství ergosterolu bylo dále přepočteno na jeho množství na gram sušiny (naměřené množství ergosterolu/vypočtená hmotnost sušiny lyofilizátu).

### 3.9 Extrakce celkových mastných kyselin (MK)

Vzorky pro analýzu MK byly připravovány stejně jako pro analýzu ergosterolu (kapitola 3.8) až po lyofilizaci vzorku a výpočtu hmotnosti sušiny. Extrakce a měření byly provedeny servisně v Laboratoři environmentální biotechnologie, MBÚ, AVČR v.v.i.

Extrakční směs obsahovala 0,625 ml chloroformu, 1,25 ml methanolu a 0,5 ml fosfátového pufru (50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_2$ , pH 7,4). Vzorky byly vortexovány s extrakční směsí 1 min, poté se nechaly extrahovat 1 hod ve tmě při pokojové teplotě. Po extrakci byly vzorky centrifugovány (5 min,

3 500 rpm) a supernatant byl přendán do nové vialy. Vialy se supernatantem byly uchovávány ve tmě. Pro druhou a následně třetí extrakci bylo k lyofilizátu přidáno 0,625 ml chloroformu a 1,25 ml methanolu, dále vše probíhalo jako u první extrakce. Ke spojeným supernatantům bylo přidáno 1,88 ml fosfátového pufru a 1,88 ml chloroformu a směs byla vortexována 1 min. Protřepané vzorky byly uchovány přes noc v ledničce a poté centrifugovány (5 min, 3 500 rpm). Spodní chloroformová část byla přenesena do nové vialy. Ke vzorku bylo přidáno 1,88 ml chloroformu, vzorek byl vortexován (1 min) a centrifugován (5 min, 3 500 rpm). Spodní chloroformové části byly spojeny. Vialy s chloroformovou částí byly uchovávány v mrazáku při -20 °C. V další fázi byl vzorek odpařen pod atmosférou dusíku a promíchán se 100 µl chloroformu. Chloroformová směs byla nanesa na kolonu (Lichrolut Si 60, Merck), která byla nejprve promyta 1,5 ml chloroformu. Prázdňá viala byla promyta 100 µl chloroformu a celý objem byl také nanesen na kolonu. Na kolonu byly postupně přidávány 2 ml chloroformu (vymytí neutrálních lipidů), 6 ml acetonu (vymytí glykolipidů) a 2 ml methanolu (vymytí fosfolipidů). Všechny frakce byly zachycovány do nové vialy, ta poté byla uchovávána při -20 °C. Vzorek byl znovu odpařen atmosférou dusíku a ke vzorku bylo přidáno 50 µl C<sub>19</sub> (200 ng/µl hexanu), který sloužil jako vnitřní standard. Vzorek byl znovu vysušen pod atmosférou dusíku. Pro uvolnění MK z fosfolipidů a jejich převedení na methylestery bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu a směs byla vortexována 1 min. Ke směsi byl přidán 1 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v bezvodném methanolu a směs byla inkubována 15 min při 37 °C. K vzorku bylo dále přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml 1 M kyseliny octové a 2 ml čerstvě redestilované vody. Směs byla vortexována 1 min a centrifugována (10 min, 2 500 rpm). Horní fáze byla přenesena do nové vialy a k spodní fázi bylo přidáno 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu. Směs byla vortexována 1 min a poté znovu centrifugována (10 min, 2 500 rpm). Znovu byly odděleny frakce a třetí extrakce probíhala stejně jako druhá. Takto připravený vzorek bylo možné uchovávat při -20 °C. Před měřením na plynovém chromatografu byl vzorek odpařen atmosférou dusíku a naředěn 1 ml hexanu, se kterým byl vortexován 30 s. Poté byl 1 ml směsi přenesen do 2 ml vial.

Vzorek byl analyzován plynovým chromatografem – hmotnostním spektrometrem (Varian 3400, ITS-40, Finnigan). Množství jednotlivých MK bylo přepočteno na gram sušiny. Data byla následně transformována na procentuální příspěvek jednotlivých MK k jejich celkové sumě v rámci jednoho izolátu.

### 3.10 Statistické analýzy

Regresní analýzy byly počítány v programu PAST [131] za použití lineárního RMA (*Reduced Major Axis*) modelu. Regresní analýzou byly zjišťovány vztahy mezi: velikostí genomu a objemem konidií, Shannonovým indexem diverzity a Gini koeficientem, Shannonovým indexem diverzity a SA/SR.

Aktivity extracelulárních enzymů, data získaná metodou Biolog a množství ergosterolu a mastných kyselin byly analyzovány v programu PAST a CANOCO for Windows 4.5 (Microcomputer Power, USA). Metodou DCCA (*Dentrended Canonical Correspondence Analysis*) s Hillovým škálováním os byla v programu CANOCO nejprve vypočtena délka gradientů. Délka gradientů poukazuje na heterogenost dat a usnadňuje rozhodnutí mezi lineární nebo unimodální analýzou [132]. Data byla zobrazena analýzou PCA (*Principal Component Analysis*) v programu PAST, kde byla následně zjišťována významnost jednotlivých ekologických skupin metodou one-way ANOSIM (distance Bray-Curtis). Významnost těchto skupin byla analyzována i v programu CANOCO RDA analýzou (*Redundancy Analysis*), nebo CCA analýzou (*Canonical Correlation Analysis*) v případě dat ze sporulace, za použití automatické *forward selection* a Monte Carlo permutačního testu. Environmentální proměnné nezahrnuté do analýzy byly začleněny jako kovariáty. V PCA analýze byly zobrazeny všechny zahrnuté kmeny. Pokud bylo od jednoho druhu analyzováno více kmenů, byla do testování významnosti ekologických skupin zařazena průměrná hodnota pro tento druh. Výjimkou byl druh *G. morbida*, u kterého byly do analýz začleněny jeho jednotlivé kmeny pro zachování vnitrodruhové variability. Významnost skupiny auxiliárně ambrosiové houby *G. rufencens* nebyla testována, jelikož byl k dispozici pouze jeden popřípadě dva kmeny tohoto druhu.

Rozdílnost ekologických skupin v množství ergosterolu, Shannonově indexu diverzity, SA a SR a zastoupení jednotlivých gild (FF Biolog) byla zjišťována v programu PAST prostřednictvím statistiky Kruskal-Wallis doplněné o *Mann-Whitney pairwise comparison* (M-W) a *Bonferroni correction* (BC). Tato metoda byla použita i u testování vlivu fixace a pufru na rCV a V během optimalizace FCM metodiky.

## 4 Výsledky

### 4.1 Průtoková cytometrie

#### 4.1.1 Optimalizace metodiky

##### 4.1.1.1 *Vliv koncentrace a délky inkubace RNAsy A*

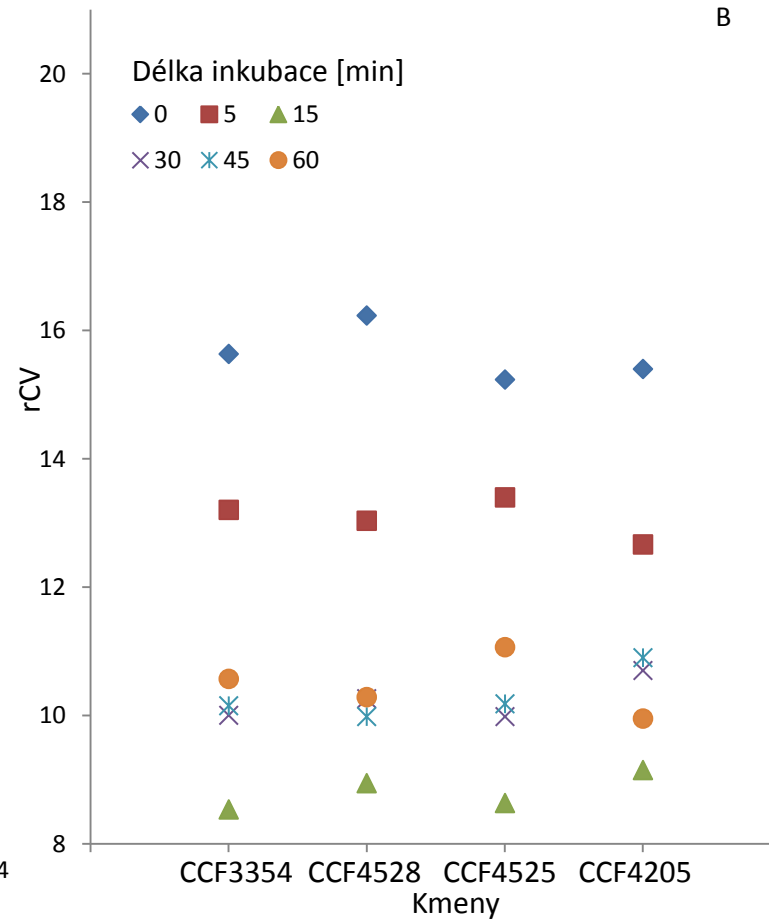
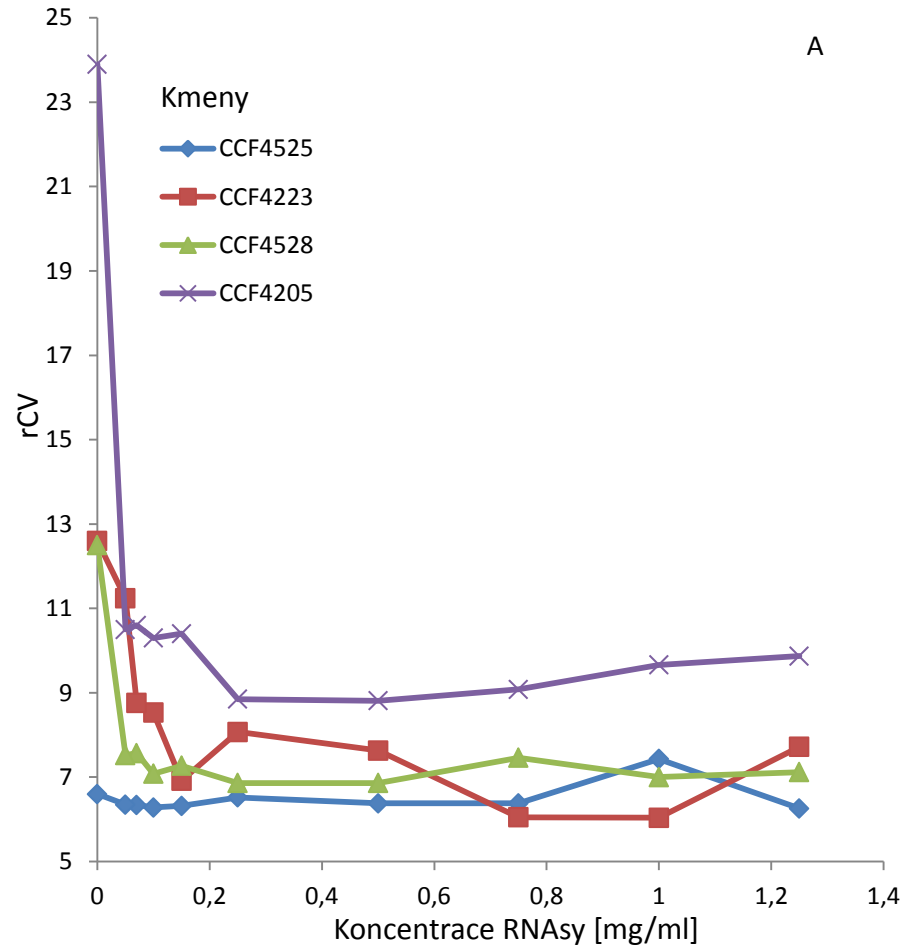
Vliv RNAsy A na rCV byl sledován v deseti různých koncentracích v rozmezí 0 – 1,25 mg/ml podle metodiky 1A (kapitola 3.3.3). Na obr. 8A je v grafu vynesena závislost rCV na koncentraci RNAsy A. Kmen CCF4525 vytvářel dvě populace s odlišnou velikostí genomu a nebyla u něj znatelná žádná závislost rCV na koncentraci. RCV populace s menší velikostí genomu (p1) se pohyboval v rozmezí od 6,3 % do 7,4 %. K výraznému zvýšení rCV v důsledku chybějící RNAsy A došlo u všech zbývajících kmenů (CCF4223, CCF4205, CCF4528). Při vyšších koncentracích než 0,1 mg/ml docházelo u všech druhů k fluktuacím v hodnotách rCV. Pouze silné odpovědi druhů (rCV) na koncentraci RNAsy A byly brány jako významné. Při následných analýzách byla tedy RNAsa A přidávána v koncentraci 0,1 mg/ml. V dalším kroku byly vzorky inkubovány v časech: 60, 45, 30, 15, 5 a 0 min. Výrazně vyšší rCV prokazovaly druhy při inkubaci 0 a 5 min. Inkubace delší než 15 min vedla ke zvýšení rCV. (obr. 8B). Pro další analýzy byla pokládána 15 min inkubace vzorku s RNAsou A (0,1 mg/ml) za dostatečnou.

##### 4.1.1.2 *Vliv typu a délky fixace*

Celkem bylo testováno 6 různých fixací podle metodiky 1B (kapitola 3.3.3). Výsledky jsou shrnuty v tab. 10. Jedinou statisticky odlišnou fixací ( $p < 0,04$ ; M-W) byl 4% formaldehyd, který dosahoval nejvyššího rCV. Tato varianta vedla ke sníženému pronikání PI do buňky (nižší intenzita barvení) a vysoké frekvenci výskytu zcela nenaznačených buněk. U kmene CCF4525 dokonce nebylo možné rozlišit dvě populace buněk ve vzorku, které byly v ostatních případech dobře rozpoznatelné. U všech testovaných druhů se nejvíce osvědčila fixace metanol: kyselina octová s aditivou (MA+). Ve všech opakováních bylo PI lokalizováno do jádra bez významného barvení cytoplazmy. RCV byl lehce nižší než u ostatních fixativ, i když to nebylo statisticky významné. Fixace MA+ byla vybrána jako nejlepší pro rod *Geosmithia*. Další optimalizace se zabývala délkou fixace. Fixace MA+ probíhala přes noc, 1 hod, 30 min a 15 min. Mezi jednotlivými časy fixace nebyl pozorován rozdíl ( $p > 0,6$ ; M-W, tab. 11). Pro další měření tedy byla vybrána nejkratší fixace MA+, 15 min.

##### 4.1.1.3 *Vliv pufru*

Mezi testované pufrы byly zahrnuty dva nejčastěji používané pufrы v mykologii: TE a PBS a dále oblíbené pufrы v botanice: Tris-MgCl<sub>2</sub>, Otto buffer, LB01 a jeho varianta bez spermin.4HCl (tab. 12). Metodika je shrnutá v bodě 1C v kapitole 3.3.3. U Otto buffer docházelo ke zvýšenému slepování



**Obr. 8** Vliv RNAsy na rCV. A – vliv koncentrace, B – vliv délky inkubace.

buněk, což se projevilo zvýšením rCV u všech testovaných druhů. Otto buffer se dále od všech ostatních pufrů lišil vyšší variancí v naměřených PI intenzitách mezi jednotlivými dny ( $p < 0,04$ ; M-W). Při použití pufrů Tris-MgCl<sub>2</sub> a LB01 + spermin.4HCl nedocházelo k barvení cytoplazmy. Pro další analýzy byl vybrán pufr Tris-MgCl<sub>2</sub>, který vykazoval mezidruhově obdobnou varianci v PI intenzitách i nižší rCV (statisticky odlišný od TE a Otto buffer,  $p < 0,04$ ; M-W).

**Tab. 10 Vliv fixace na rCV [%] a PI lokalizaci (Loc.) do jádra.**

Kmen	Typ fixace											
	4F		MA		MA+		70E		95E		90M	
	rCV	Loc.	rCV	Loc.	rCV	Loc.	rCV	Loc.	rCV	Loc.	rCV	Loc.
CCF3354	18,2	-	9,6	0	9,2	+	12,7	-	10,7	0	9,8	+
CCF4528	19,3	-	8,7	0	7,8	+	8,3	-	9,3	-	8,8	+
CCF4525	19,9	-	8,8	0	8,9	+	9,1	-	9,6	-	9,2	0
CCF4205	16,9	-	11,9	+	14,2	+	13,7	-	16,3	-	11,3	0

**Tab. 11 Vliv délky MA+ fixace na rCV [%].**

Kmen	rCV			
	15 min	30 min	60 min	Přes noc
CCF3354	8,3	8,1	9,1	9,6
CCF4528	7,2	8,2	7,9	7,9
CCF4525	10,3	11,0	10,5	8,0
CCF4205	9,2	10,2	9,0	11,9

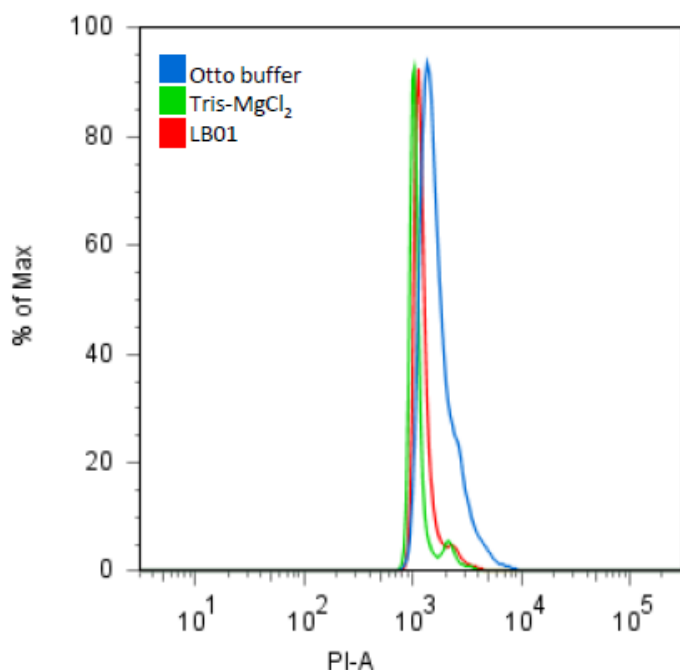
**Tab. 12 Vliv pufru na stabilitu PI intenzity (V), rCV a lokalizaci (Loc.).**

Kmen	PBS			TE			Tris-MgCl <sub>2</sub>		
	V [%]	rCV [%]	Loc.	V [%]	rCV [%]	Loc.	V [%]	rCV [%]	Loc.
CCF3354	6,7	15,6	0	4,1	9,3	+	3,3	8,5	+
CCF4528	4,8	8,7	+	1,5	8,9	+	3,6	8,6	+
CCF4525	0,6	8,4	+	4,9	9,7	+	3,8	8,7	+
CCF4205	2,0	9,1	+	6,3	11,5	0	3,6	7,4	+
Kmen	Otto buffer			LB01 - spermin.4HCl			LB01 + spermin.4HCl		
	V [%]	rCV [%]	Loc.	V [%]	rCV [%]	Loc.	V [%]	rCV [%]	Loc.
CCF3354	18,6	14,4	-	4,4	15,9	0	1,9	7,4	+
CCF4528	11,2	11,3	0	4,0	10,5	+	1,2	9,7	+
CCF4525	52,0	15,8	0	4,2	8,4	+	5,5	9,2	+
CCF4205	15,4	15,2	0	1,9	8,9	0	3,2	8,4	+

#### 4.1.1.4 Závěrečná poznámka

Hodnota rCV byla vyšší u vzorků s vysokým barvením cytoplazmy a s nízkou uniformitou barvení vzorku. Hodnota rCV byla tedy sama o sobě vhodným znakem pro hodnocení kvality měření a mohla být sama o sobě použita k vyhodnocování optimalizačních kroků. Vysoká hodnota rCV znemožňuje zachytit aneuploidii ve vzorku a může tak zapříčinit nesprávné změření GS. Vysoké barvení cytoplazmy vede k vyšší zachycené intenzitě fluorescence, což zapříčiní zcela mylné výsledky

(obr. 9). Jelikož vysoké rCV způsobí i vzorek s nízkou uniformitou barvení, je patrné, že kvalita použité metodiky má značný dopad na získané výsledky.

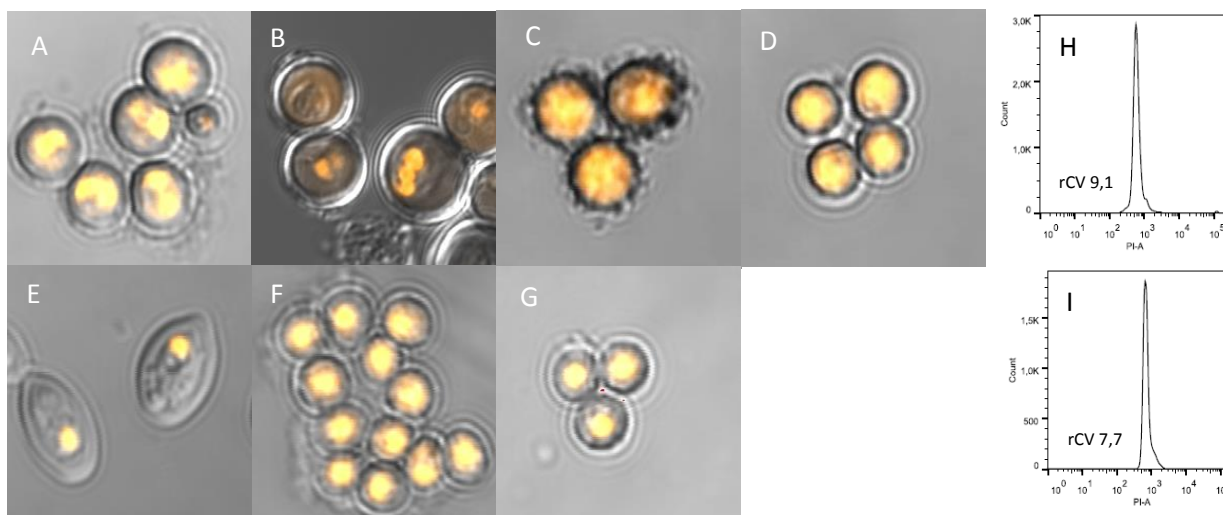


**Obr. 9** Příklad vlivu rCV na detekovanou intenzitu fluorescence. Se zvyšujícím se rCV roste detekovaná intenzita. Hodnoty rCV [%]: Otto buffer – 15,2, Tris-MgCl<sub>2</sub> – 7,4, LB01 – 8,4.

#### 4.1.2 Standardizace

Výsledky ukázaly (obr. 10), že *A. fumigatus* CEA10 a *S. cerevisiae* BY4743aα jsou vhodné jako standardy. Oba kmeny druhu *A. niger* vytvářely mnohoaderné konidie (1–3 jádra na konidii). Všechny kmeny vyjma *A. fumigatus* CEA10, *Aspergillus niger* CBS513.88 a *S. cerevisiae* BY4743aα prokazovaly vysoké barvení cytoplazmy. Výsledky zároveň poukazují na to, že kmeny jednoho druhu se mohou lišit v odpovědi na použitou metodiku. Dále byla srovnána metodika vyvinutá De Lucas et al. [91] s metodikou vyvinutou pro rod *Geosmithia* (v této práci). Metoda vyvinutá pro rod *Geosmithia* byla vhodná i pro *A. fumigatus* CEA10. Použití fixace MA+ a pufru Tris-MgCl<sub>2</sub> vedlo k nižšímu barvení cytoplazmy v porovnání se 70% ethanolem a TE puftrem [91]. Na základě výsledků byly *A. fumigatus* CEA10 a *S. cerevisiae* BY4743aα zahrnuty do FCM analýz jako externí standardy.

Velikost genomu *A. fumigatus* CEA10 změřená metodou FCM (29,7 Mb) a vypočtená podle *S. cerevisiae* jako standard byla v dobré shodě s GS, která byla pro tento druh zjištěna sekvenováním genomu (29,2 Mb). V následujícím textu jsou uváděny GS přepočtené podle *S. cerevisiae*. Hodnoty získané podle *A. fumigatus* CEA10 jsou uvedené v tab. 13.



**Obr. 10** PI barvení jader u testovaných standardů. A – *A. niger* NRRL350, B – *A. niger* CBS513.88, C – *A. aculeatus* CBS172.66, D – *A. fumigatus* Af293, E – *S. cerevisiae* BY4743, F – *A. fumigatus* CEA10, metodika podle De Lucas et al. [91], G – *A. fumigatus* CEA10 (metodika z této práce), H – FCM histogram *S. cerevisiae* BY4743, I – FCM histogram *A. fumigatus* CEA10 (metodika z této práce).

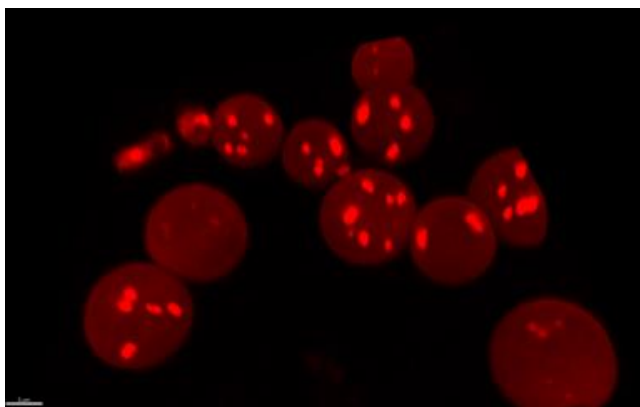
#### 4.1.3 Velikost genomu vybraných druhů rodu *Geosmithia*

Velikost genomu byla zjišťována u 21 druhů *Geosmithia* (tab. 13, p. 3). Vybrané druhy zahrnovaly 7 generalistů, 7 druhů nalézáných pouze na čeledi Pinaceae, 1 patogenní druh, 3 ambrosiové druhy, 1 auxiliárně ambrosiový druh a dva druhy s neznámou hostitelskou diverzitou. Použitá metodika 2 je uvedena v kapitole 3.3.3.

Velikost genomu vybraných druhů se pohybovala v rozmezí 1 – 1,4 násobku nejmenšího zjištěného genomu (CCF4527). Výjimku tvořily ambrosiové druhy *G. microcorthyli* a *G. eupagioceri*, jejichž genom byl 2,6 a 17,8 násobek nejmenšího genomu, přičemž *G. eupagioceri* dosahovala nejvyšší GS. Některé kmeny dále vytvářely dvě populace spor s odlišnou GS. Jednalo se o ambrosiovou houbu *G. sp.* CCF4292 a čtyři druhy izolované z Pinaceae: CCF4525 a CCF4294 (*G. sp.* 24), CCF4223 (*G. sp.* 26), CCF4206 (*G. sp.* 27) a CCF4526 (*G. sp.* 31). U těchto kmenů nabývala populace spor s větším genomem (p2) 1,8 – 1,9 násobku populace s menším genomem (p1). Kmeny *G. sp.* 24 (CCF4525, CCF4294) měly stejnou GS obou populací i jejich poměr, 1: 1,3 ve prospěch p2. Poměr p1 k p2 byl u kmenů CCF4223 1: 4,2, u CCF4292 2: 1 a u CCF4526 1: 8,4. Auxiliárně ambrosiová *G. rufescens* (CCF4524) vytváří cylindrické spory, typické pro rod *Geosmithia*, s malou frekvencí i velké kulaté „ambrosiové“ spory. U tohoto druhu však dvě populace spor nalezeny nebyly pravděpodobně právě kvůli málo častému výskytu „ambrosiových“ konidií. Oproti ostatním druhům *Geosmithia* (až na *G. sp.* 21 CCF4530) vykazovaly ambrosiové druhy horší kvalitu měření (vyšší rCV) a zároveň i nedokonalou lokalizaci PI do jádra buněk. U těchto druhů se zřejmě v konidiích nacházejí komponenty, které interagují s PI. Kmen CCF4531 (*G. sp.* 21) měl oproti kmenu CCF4530 (*G. sp.* 21) mnohem vyšší kvalitu měření (rCV 8,9 % oproti rCV 17,4 %) i nižší barvení cytoplazmy. Tyto kmeny se značně lišily i naměřenou GS. Velikost genomu CCF4531 měla hodnotu 27,9 Mb a GS CCF4530 byla



42,9 Mb. Tento výsledek znovu potvrdil, že nevhodné barvení vzorku může značně ovlivnit výsledky. U *G. eupagioceri* bylo konfokální mikroskopií zjištěna přítomnost většího počtu jader na buňku v rozmezí 3 – 7 (obr. 11). Jádra se často sdružovala k sobě do několika skupin. Nerovnoměrný počet jader na konidii způsobil dva vrcholy histogramu s nízkým rozlišením. Zároveň u tohoto druhu nebylo možné vypočítat GS (pouze celkovou genomovou hmotu).



Obr. 11 Konidie *G. eupagioceri*. Barveno PI a foceno konfokálním mikroskopem.

## 4.2 Objemy konidií

Objemy konidií jsou uvedeny v tab. 13. Objemy dosahovaly hodnot od  $4,0 \mu\text{m}^3$  u *G. sp. 9* (CCF3703) až  $259,2 \mu\text{m}^3$  u *G. eupagioceri* (CCF3754), medián byl  $6,6 \mu\text{m}^3$ . Variance v objemu konidií se pohybovala většinou okolo 25 %. Některé druhy ale vykazovaly vysokou varianci (nad 30 %). Jednalo se o druhy *G. sp. 24*, *G. sp. 26*, *G. sp. 27*, *G. microcorthyli*, *G. eupagioceri*, *G. rufescens* a *G. sp. CCF4292*. Vysoká variance v objemu konidií byla tedy nacházena především u kmenů vytvářejících dvě populace při měření GS pomocí FCM.

Tab. 13 Velikost genomu a objem konidií druhů *Geosmithia*.

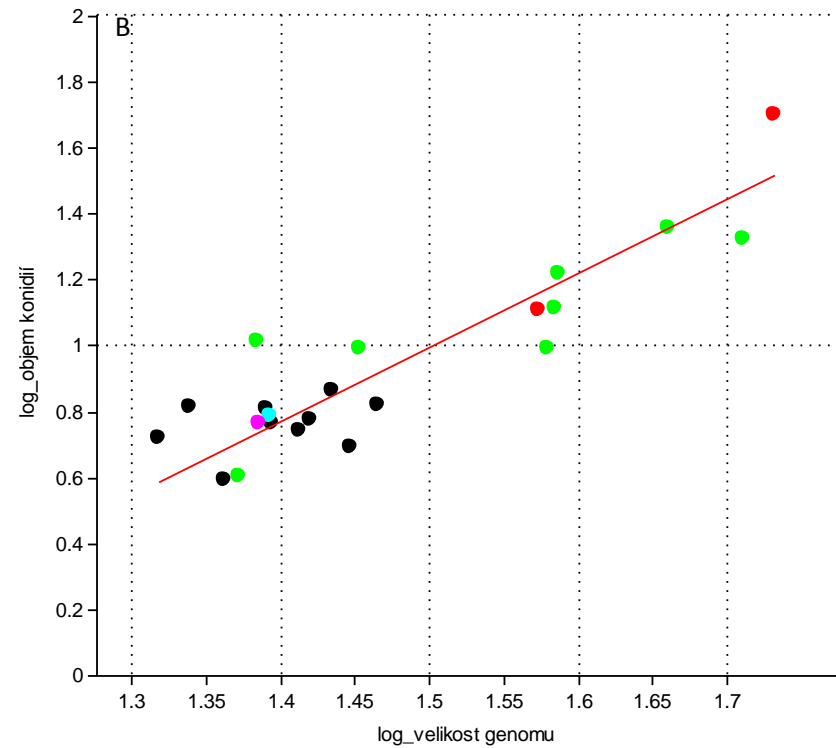
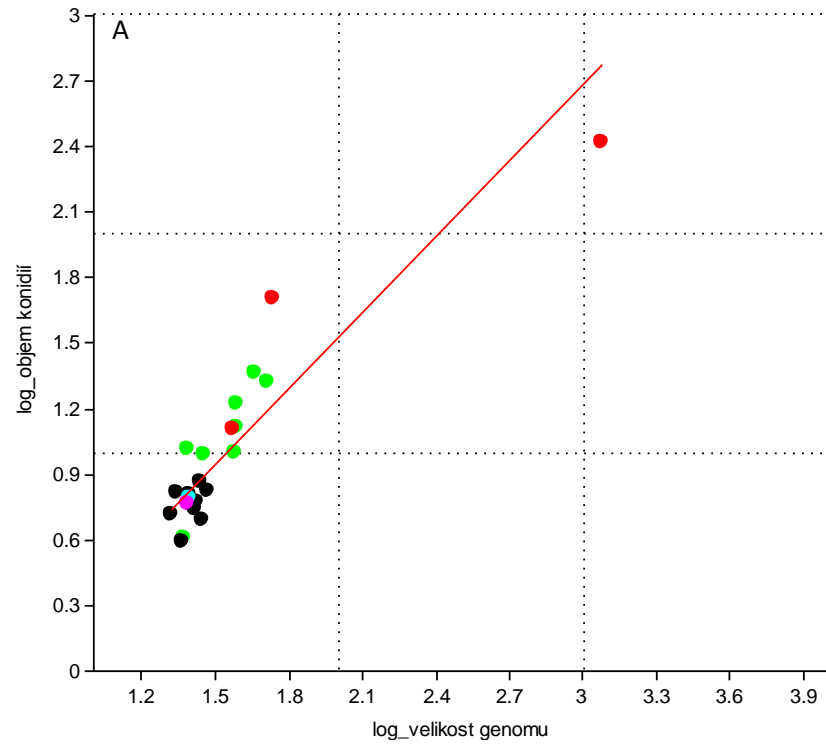
Druh <i>Geosmithia</i>	Kmen	GS [Mb] <i>S. cerevisiae</i> BY4743aa jako standard	GS [Mb] <i>A. fumigatus</i> CEA10 jako standard	rCV [%]	Objem konidií [ $\mu\text{m}^3$ ]	Variance v objemu konidií [%]
<i>G. sp. 1</i>	CCF4529	21,8	21,5	7,4	6,5	25,0
<i>G. putterillii</i>	CCF3342	26,3	26,0	10,5	5,9	25,5
<i>G. flava</i>	CCF3354	25,8	25,5	7,2	5,5	22,0
<i>G. sp. 8</i>	CCF4528	24,8	24,5	8,2	5,8	27,7
<i>G. sp. 8</i>	CCF4207	27,2	26,9	9,4	7,3	23,6
<i>G. sp. 9</i>	CCF3703	23,5	23,3	9,3	4,0	29,9
<i>G. sp. 16</i>	CCF4201	28,4	28,0	8,7	9,7	25,0
<i>G. sp. 20</i>	CCF4527	20,8	20,5	7,4	5,2	21,8
<i>G. sp. 21</i>	CCF4530	42,9	42,4	17,4	4,9	26,1
<i>G. sp. 21</i>	CCF4531	27,9	27,6	8,9	4,9	26,6
<i>G. sp. 22</i>	CCF3645	23,0	22,8	7,8	3,9	24,7

G. sp. 24	CCF4525	p <sup>1</sup> 24,5	p <sup>2</sup> 45,2	p <sup>1</sup> 24,2	p <sup>2</sup> 44,7	p <sup>1</sup> 8,2	p <sup>2</sup> 8,1	16,4	83,9
		p <sup>1p2</sup> 38,6		p <sup>1p2</sup> 38,2		p <sup>1p2</sup> NA			
G. sp. 24	CCF4294	p <sup>1</sup> 24,9	p <sup>2</sup> 44,8	p <sup>1</sup> 24,6	p <sup>2</sup> 44,3	p <sup>1</sup> 7,9	p <sup>2</sup> 7,1	12,9	77,9
		p <sup>1p2</sup> 38,4		p <sup>1p2</sup> 38,0		p <sup>1p2</sup> NA			
G. sp. 25	CCF4205	24,2		24,0		6,6		10,3	22,5
G. sp. 26	CCF4223	p <sup>1</sup> 25,7	p <sup>2</sup> 48,5	p <sup>1</sup> 25,5	p <sup>2</sup> 48,0	p <sup>1</sup> 8,4	p <sup>2</sup> 8,7	22,7	52,6
		p <sup>1p2</sup> 45,7		p <sup>1p2</sup> 45,2		p <sup>1p2</sup> NA			
G. sp. 27	CCF4206	p <sup>1</sup> 23,6	p <sup>2</sup> 44,4	p <sup>1</sup> 23,4	p <sup>2</sup> 43,9	p <sup>1</sup> 10,2	p <sup>2</sup> 7,6	9,8	44,3
		p <sup>1p2</sup> 37,9		p <sup>1p2</sup> 37,5		p <sup>1p2</sup> NA			
G. sp. 31	CCF4526	p <sup>1</sup> 28,3	p <sup>2</sup> 51,1	p <sup>1</sup> 28,0	p <sup>2</sup> 50,5	p <sup>1</sup> 7,5	p <sup>2</sup> 6,6	20,8	29,7
		p <sup>1p2</sup> 51,3		p <sup>1p2</sup> 50,7		p <sup>1p2</sup> NA			
<i>G. microcorthyli</i>	CCF3861	53,9		53,3		15,6		49,7	34,0
<i>G. eupagioceri</i>	CCF3754	p <sup>1</sup> 369,1	p <sup>2</sup> 1665,5	p <sup>1</sup> 365,0	p <sup>2</sup> 1646,9	p <sup>1</sup> 19,8	p <sup>2</sup> 24,0	259,2	36,0
		p <sup>1p2</sup> 1189,7		p <sup>1p2</sup> 1176,4		p <sup>1p2</sup> NA			
<i>G. morbida</i>	CCF3879	24,7		24,4		9,7		6,1	23,1
<i>G. rufescens</i>	CCF4524	24,3		24,1		10,1		5,8	41,4
G. sp. CCF3554	CCF3554	24,5		24,3		8,3		6,4	25,2
G. sp. CCF4200	CCF4200	29,2		28,9		16,4		6,6	20,7
G. sp. CCF4292	CCF4292	p <sup>1</sup> 27,8	p <sup>2</sup> 50,7	p <sup>1</sup> 27,5	p <sup>2</sup> 50,2	p <sup>1</sup> 11,3	p <sup>2</sup> 10,4	12,7	31,4
		p <sup>1p2</sup> 37,4		p <sup>1p2</sup> 37,0		p <sup>1p2</sup> NA			

GS – velikost genomu, p<sup>1</sup>/p<sup>2</sup> – populace s menším/větším genomem, p<sup>1p2</sup> – medián přes obě populace, NA – nezjištěvaný údaj.

### 4.3 Korelace mezi velikostmi genomu a objemy konidií

Hodnoty GS i objemy konidií byly logaritmovány před analýzou. U kmenů, které vykazovaly dvě populace konidií s odlišnou GS, byla do korelace zahrnuta hodnota mediánu přes obě populace. Kmen CCF4530 nebyl zahrnut do analýzy. Velikost genomu byla silně korelována s objemem spor (obr. 12A,  $R^2 = 0,83$ ,  $p < 0,0001$ ) a to i v případě vynechání mnohojaderného druhu *G. eupagioceri* (obr. 12B,  $R^2 = 0,81$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Obr. 12 Regresní analýza velikostí genomu a objemů konidií.** A – vyneseny všechny druhy ( $R^2 = 0,83$ ,  $p < 0,0001$ ), B – *G. eupagioceri* vyřazena z analýzy ( $R^2 = 0,81$ ,  $p < 0,0001$ ). ● ambrosiové druhy, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● auxiliárně ambrosiový druh, ● patogen

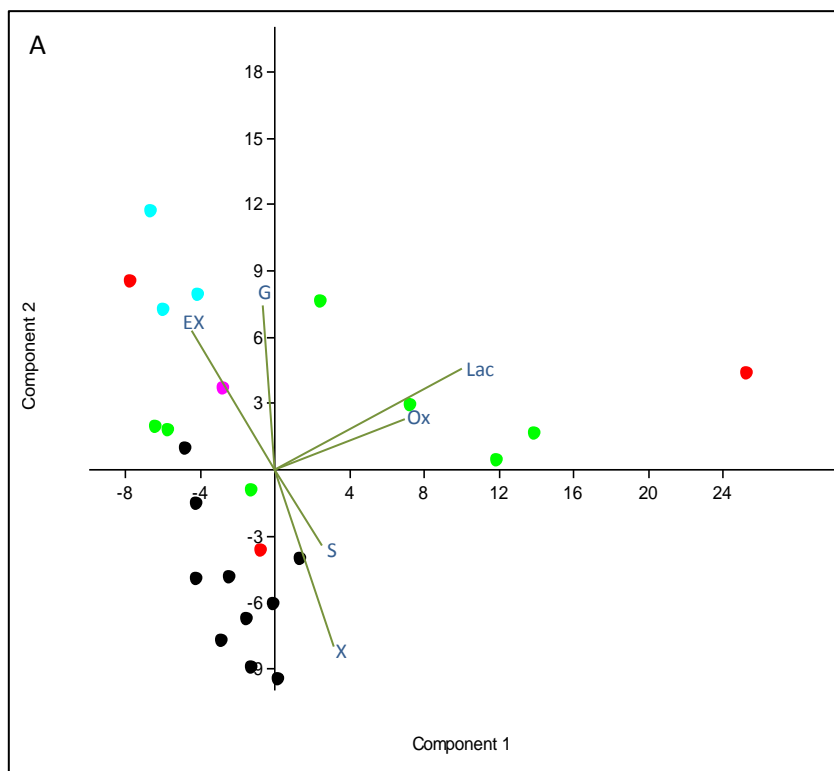
#### 4.4 Extracelulární enzymy

Analýza extracelulárních enzymů (p. 4) odhalila, že generalisti jsou odlišní od všech ostatních ekologických skupin,  $p < 0,04$  (tab. 14, obr. 13). Generalisti vysvětlovali největší procento (16 %) z celkové variability (32 %) vysvětlené testovanými environmentálními proměnnými v RDA analýze. Zajímavé pak bylo, že se patogenní *G. morbida* značně odlišovala na substrát podobným druhům (floém listnáčů). *G. morbida* se výrazně odlišovala kombinací produkce  $\beta$ -glukosidasy, endoxylanasy a lakasy, což jsou enzymy, které se podílejí na degradaci rostlinných pletiv (celulosa, hemicelulosa, lignin). *G. morbida* byla Monte Carlo permutačním testem odlišena i od specialistů na Pinaceae, a to především produkcí endoxylanasy. Výraznou produkci lakasy projevovaly některé druhy specifické pro čeleď Pinaceae. Tyto druhy také produkovaly enzymy na degradaci celulosy,  $\beta$ -glukosidasu a celobiohydrolasu. Endoglukanasová aktivita však chyběla. Ambrosiové druhy se navzájem značně lišily aktivitami extracelulárních enzymů. *G. microcorthyli* se vyznačovala vysokou lakasovou aktivitou (24,3 mU/g, nejvyšší detekovanou pro *G. spp.*). Naproti tomu *G. eupagioceri* dosahovala mezi *G. spp.* téměř nejvyšší aktivity endoxylanasy. *G. sp.* CCF4292 a auxiliárně ambrosiová *G. rufescens* neprojevily schopnost rozkládat lignocelulosu. Ani u jednoho z testovaných druhů nebyla detekována aktivita  $\alpha$ -glukosidasy, fosfodiesterasy, alanin aminopeptidasy, leucin aminopeptidasy a Mn-nezávislé peroxidasy. Endoglukanasa byla u většiny druhů nepřítomna. Nízké aktivity tohoto enzymu (okolo 1 mU/g) byly zjištěny u CCF4200, CCF3645, CCF3342, CCF3703, vyšší pak u 1259 (3,5 mU/g), CCF4530 (6 mU/g) a CCF3354 (11,3 mU/g). N-acetylglucosaminidasa byla produkována všemi druhy v obdobné míře. Generalisti pak dosahovali vyšších aktivit  $\beta$ -xylosidasy a menší měrou arylsulfatasy.

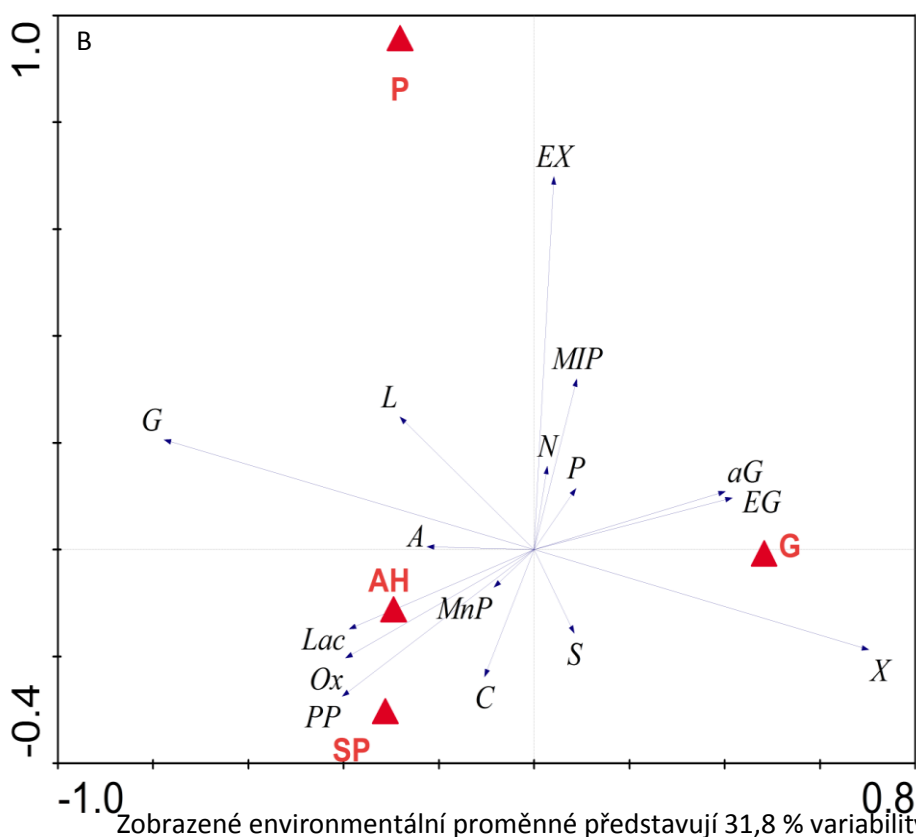
**Tab. 14 Výsledky analýzy extracelulárních enzymů.**

	G	SP	P	AH
G	-	0,0002	0,0036	0,0179
SP	0,0080	-	0,1587	0,2997
P	0,0140	0,0380		0,1049
AH	0,0360	0,2440	0,0700	-

V horním trianglu jsou p-value získané z one-way ANOSIM, v dolním získané Monte Carlo permutačním testem. Červeně jsou značené signifikantní hodnoty:  $p < 0,05$ . G – generalisti, SP – specialisti na čeleď Pinaceae, P – patogen, AH – ambrosiová houba.



Zobrazeno 56,6 % variability, zobrazeny jsou jen významné proměnné

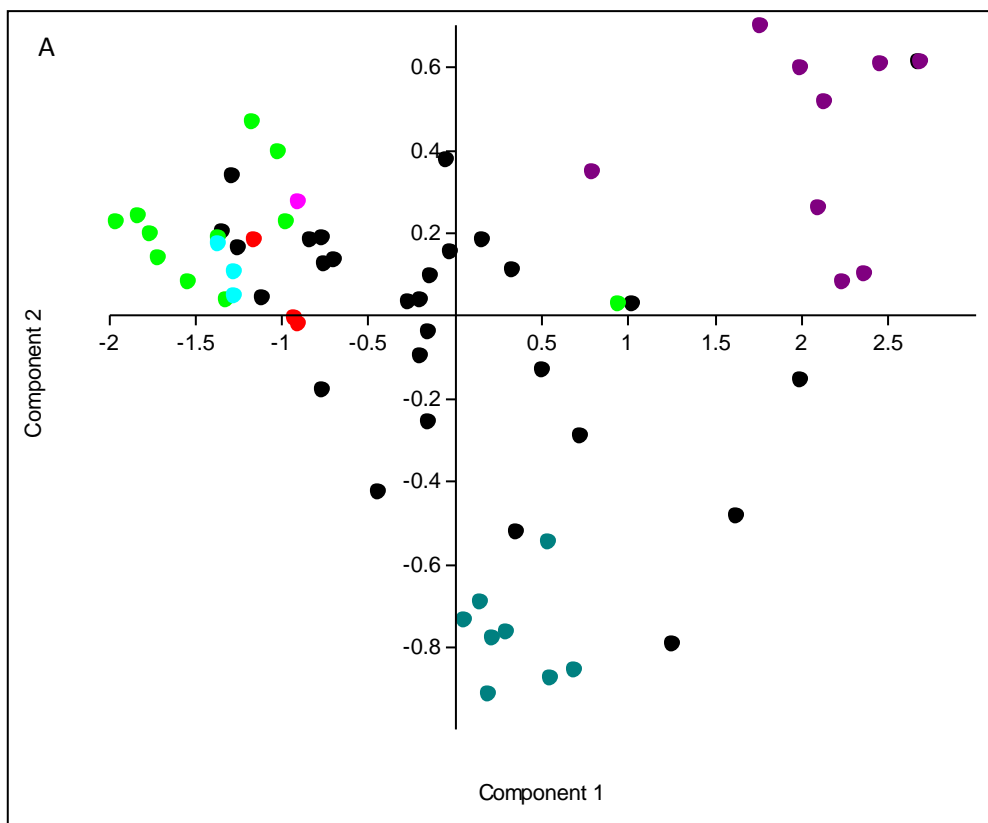


Zobrazené environmentální proměnné představují 31,8 % variability

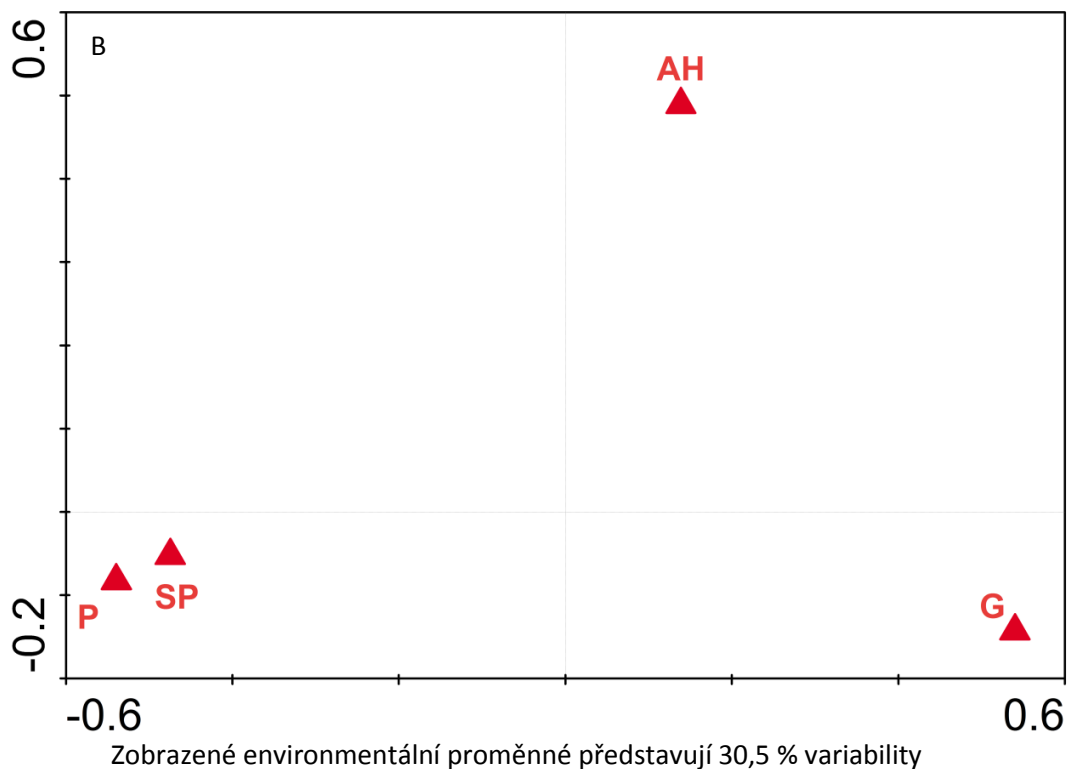
**Obr. 13 PCA a RDA analýza aktivit extracelulárních enzymů.** A – PCA, B – RDA  
 ● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti,  
 ● patogen, AH – ambrosiové houby, SP – specialisti na Pinaceae, G – generalisti, P – patogen, A – alanin aminopeptidasa, aG –  $\alpha$ -glukosidasa, C – celobiohydrolasa, EG – endoglukanasa, EX – endoxylanasa, G –  $\beta$ -glukosidasa, L – leucin aminopeptidasa, Lac – lakasa, MIP – Mn-nezávislá peroxidasa, MnP – Mn-peroxidasa, N – N-acetylglukosamidasa, Ox – oxidasa, P – fosfomonoesterasa, PP – fosfodiesterasa, S – arylsulfatasa, X – xylosidasa

## 4.5 Metoda Biolog

PCA a RDA/CCA grafy jsou uvedeny na obr. 14 (FF), obr. 15 (PM3B), obr. 16 (PM4A), obr. 17 (PM5), obr. 18 (FF+PM) a obr. 19 (sporulace). Staré a nové kmeny druhů *G. langdonii* a *G. pallida* sp. 5 tvořily jednotné skupiny (PCA analýza), z čehož vyplynulo, že stáří kultury nemá vliv na utilizační potenciál izolátů. Tabulky 15A-C shrnují párové porovnání ekologických skupin na FF a PM destičkách. Na všech testovaných Biolog mikrotitračních destičkách kromě PM5 došlo k signifikantnímu rozlišení skupiny druhů z Pinaceae od generalistů ( $p < 0,004$ ). Patogenní druh *G. morbida* byl statisticky odlišný od generalistů ( $p < 0,04$ ) a tvořil jednotnou skupinu se specialisty na čeleď Pinaceae ( $p > 0,6$ ). Pouze na destičce PM4A byl patogen těsně neodlišen od generalistů Monte Carlo permutačním testem ( $p = 0,07$ ). Ambrosiové druhy pak vytvářely přechodný stav mezi těmito skupinami. Specialisti na *Fraxinus* a *Ulmus* se podobali generalistům. Proto nebyli dále vyhodnocováni samostatně, ale byli zahrnuti do skupiny generalistů. Hodnoty absorbcí na PM5 destičce byly také, kvůli velikým mezidruhovým rozdílům, prohlédnuty po zlogaritmování (obr. 17A). One-way ANOSIM byl počítán před transformací absorbcí. Rozlišujícím znakem mezi skupinami nebyl kvalitativní rozdíl mezi využívanými substráty ale jejich kvantita. Generalisti dosahovali nejvyšší hodnoty SR, SA i Shannonova indexu diverzity na destičkách FF a PM4A, ambrosiové houby na PM3B a PM5 (vyjma Shannonova indexu diverzity na PM3B, který byl lehce nižší než u generalistů) (obr. 20, p. 5). Kromě destičky PM5 byl vždy nalezen signifikantní rozdíl v SA a SR mezi generalisty a specialisty na Pinaceae, a to i s použitím BC (p. 5). Další signifikantní rozdíly zjištěné M-W byly nepotvrzené BC v důsledku malého počtu hodnot v některých skupinách. Prvních deset substrátů s největším růstem (rozděleno podle typu destičky) je uvedeno v tab. 16. Obecně druhy nejlépe rostly na FF a PM3B destičkách, naopak na destičkách PM4A a PM5 byl růst mnohem nižší (p. 6). V některých jamkách došlo ke špatnému rozpouštění substrátu (zjištěno během měření v čase 0), takové jamky byly z analýzy vyřazeny. K těmto jamkám patřily na FF destičce: B1 ( $\alpha$ -cyklodextrin), B3 (dextrin), G2 (sebaková kyselina) a H10 (adenosin), na PM3B: C1 (L-tyrosin) a G1 (xantin) a na PM4A: A3 (pyrofosfát) a B9 (guanodin-3'-monofosfát). Z PM5 byla mimo negativní kontrolu také z analýzy odebrána pozitivní kontrola (A2). Diverzita utilizovaných substrátů zjišťovaná prostřednictvím Shannonova indexu diverzity byla ve shodě s diverzitou počítanou přes Gini koeficient (obr. 20E,  $R^2 = 0,99$ ,  $p < 0,001$ ). Shannonův index diverzity byl dále silně korelován s SA a SR (obr. 21). Na rozdíl od one-way ANOSIM, CCA analýza sporulace výrazně odlišila ambrosiové druhy od všech ostatních ekologických skupin ( $p < 0,03$ ), patogenní *G. morbida* nebyla odlišena pouze od generalistů (tab. 15C). Ambrosiové druhy se odlišovaly sporulací na nutričních doplňcích (PM5), *G. morbida* pak sporulací na zdrojích fosforu a síry (PM4A) (obr. 19). Sporulací na PM4A se *G. morbida* podobaly druhy *G. sp. 12* a *G. sp. 13*, které také mohou být pokládány za specializované druhy, jelikož byly izolovány pouze z jednoho rodu



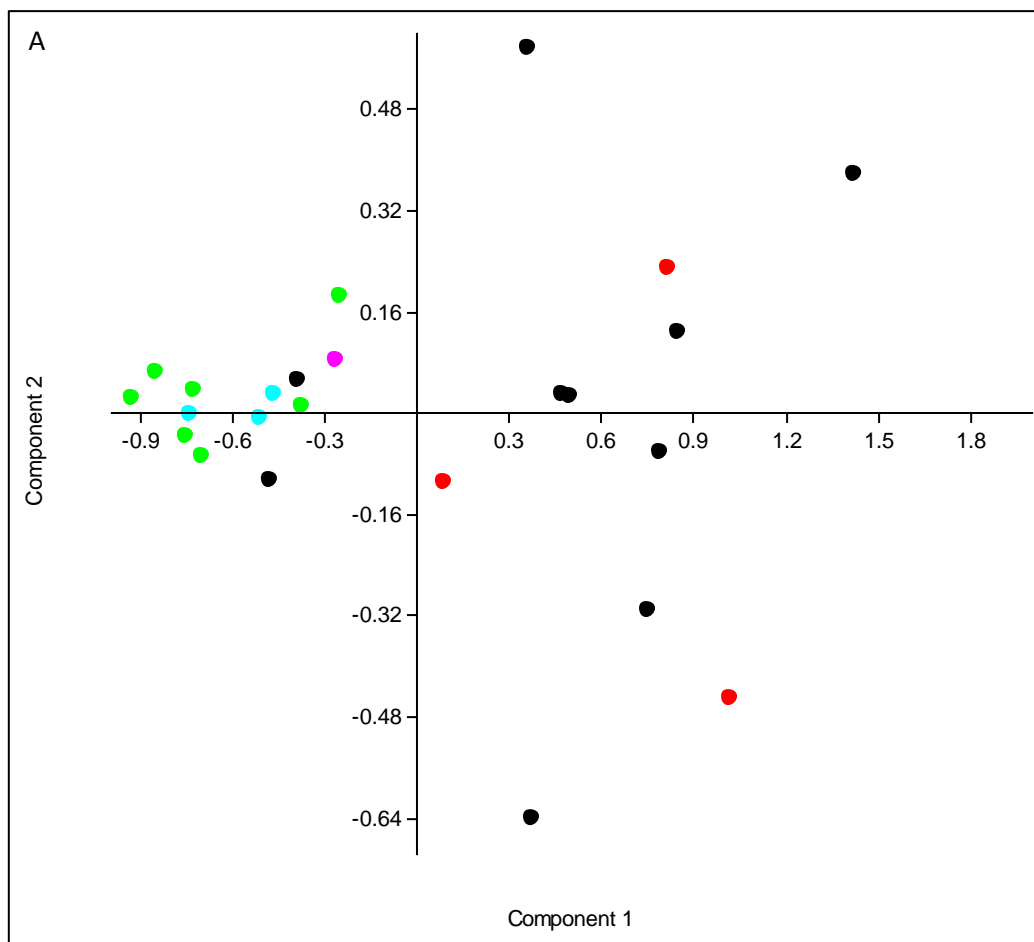
Zobrazeno 73,6 % variability



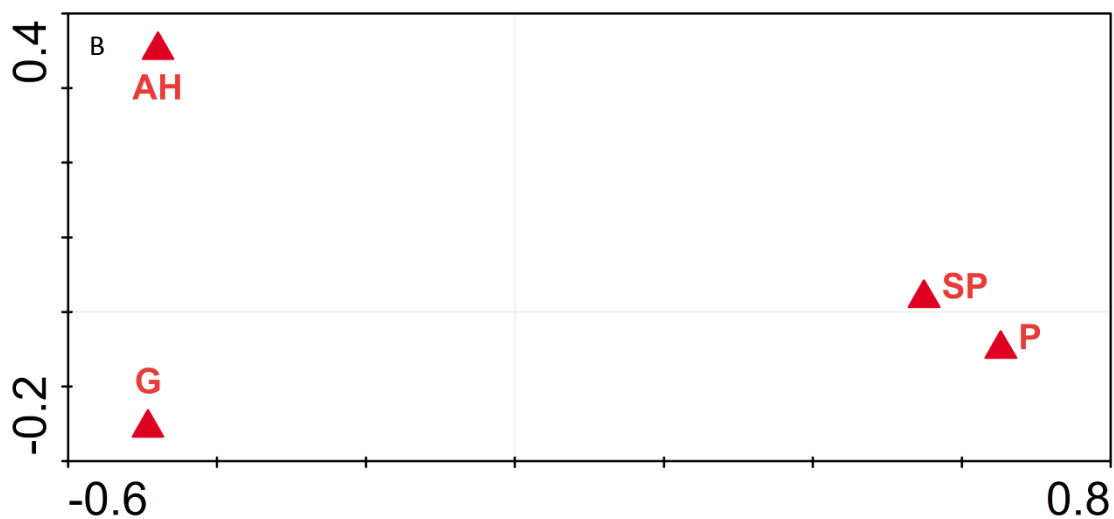
Zobrazené environmentální proměnné představují 30,5 % variability

**Obr. 14 PCA a RDA analýza FF destiček. A – PCA, B – RDA**

● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen, ● *G. langdoni*, ● *G. pallida* sp. 5, ▲ ambrosiové houby, ▲ specialisti na Pinaceae, ▲ generalisti, ▲ patogen



Zobrazeno 63,5 % variability

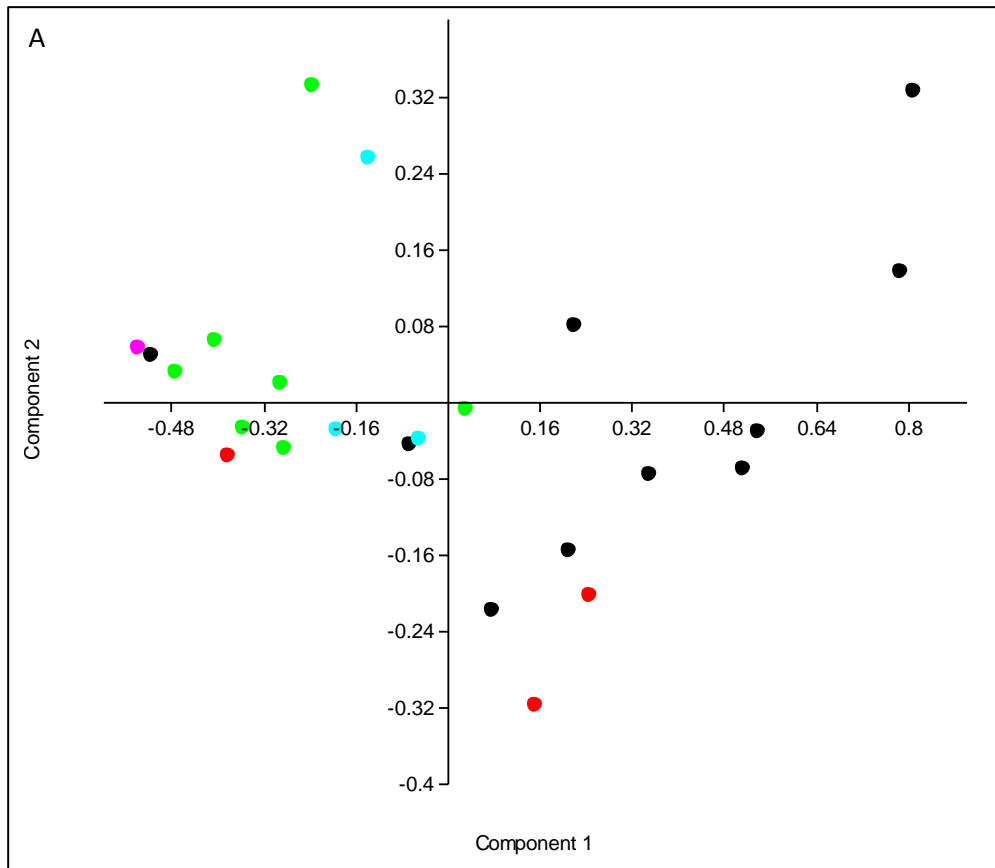


Zobrazené environmentální proměnné představují 32,2 % variability

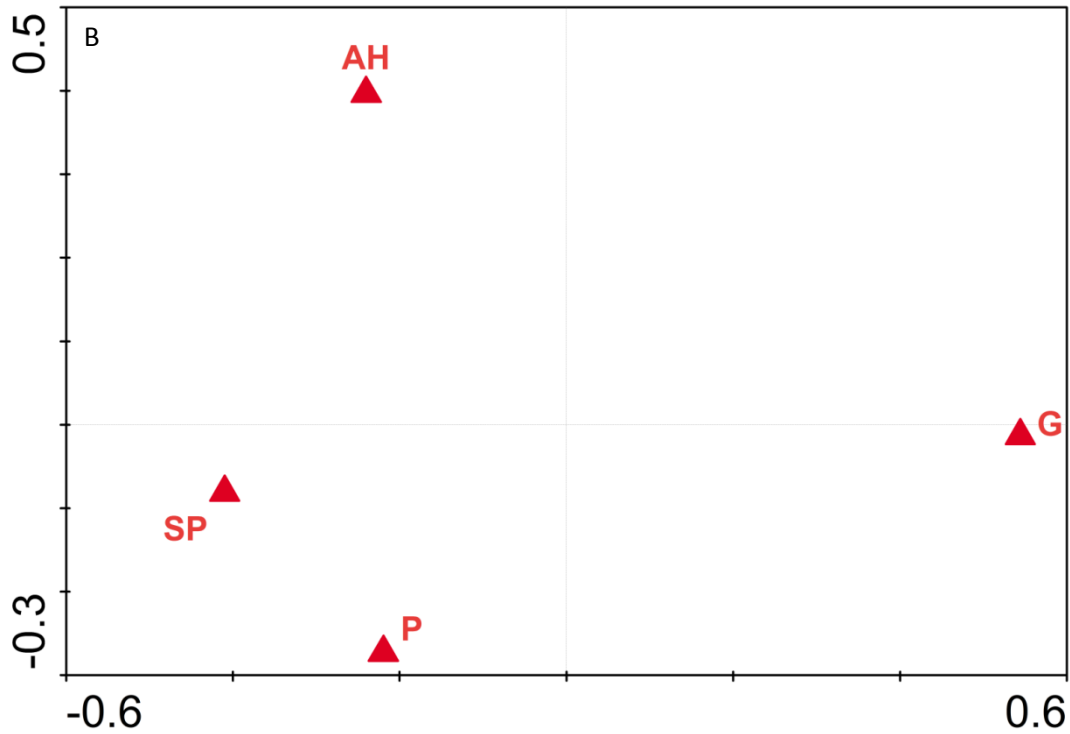
**Obr. 15 PCA a RDA analýza PM3B destiček.** A – PCA, B – RDA

- ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen, ▲ AH – ambrosiové houby, ▲ SP – specialisti na Pinaceae, ▲ G – generalisti, ▲ P – patogen





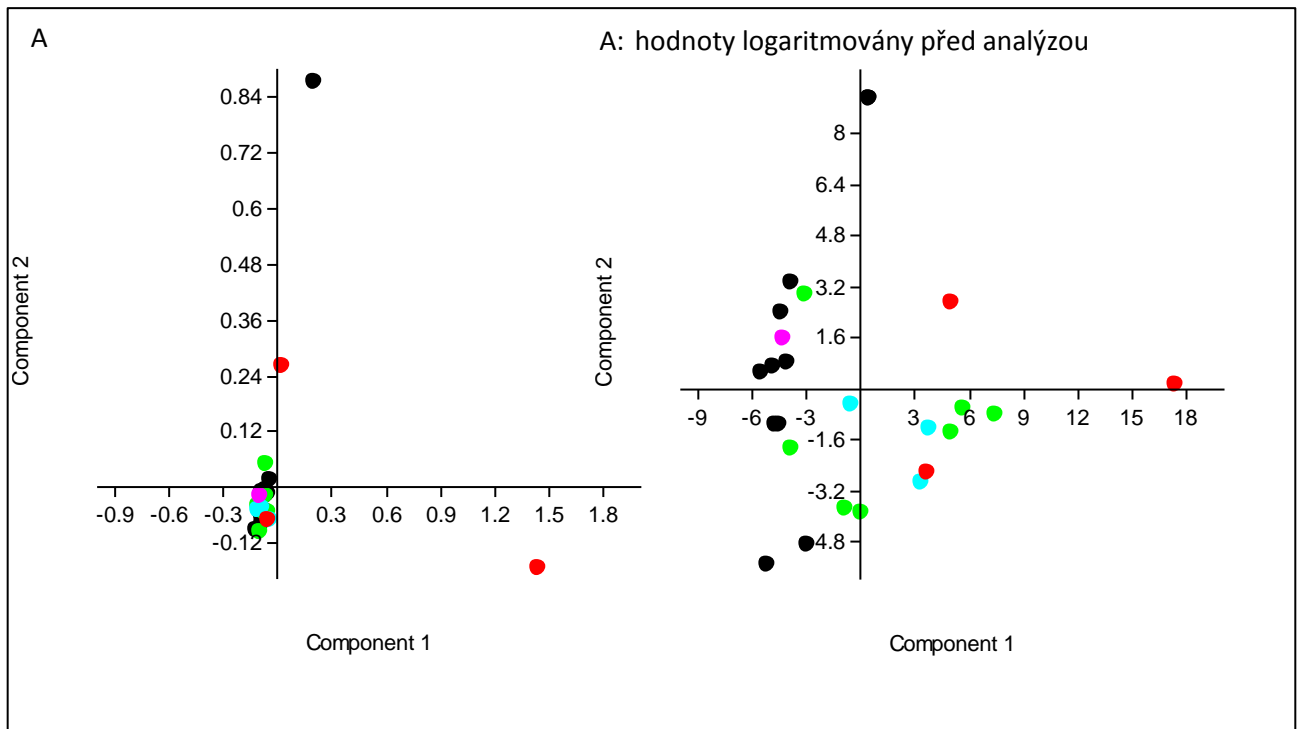
Zobrazeno 57,1 % variability



Zobrazené environmentální proměnné představují 24,4 % variability

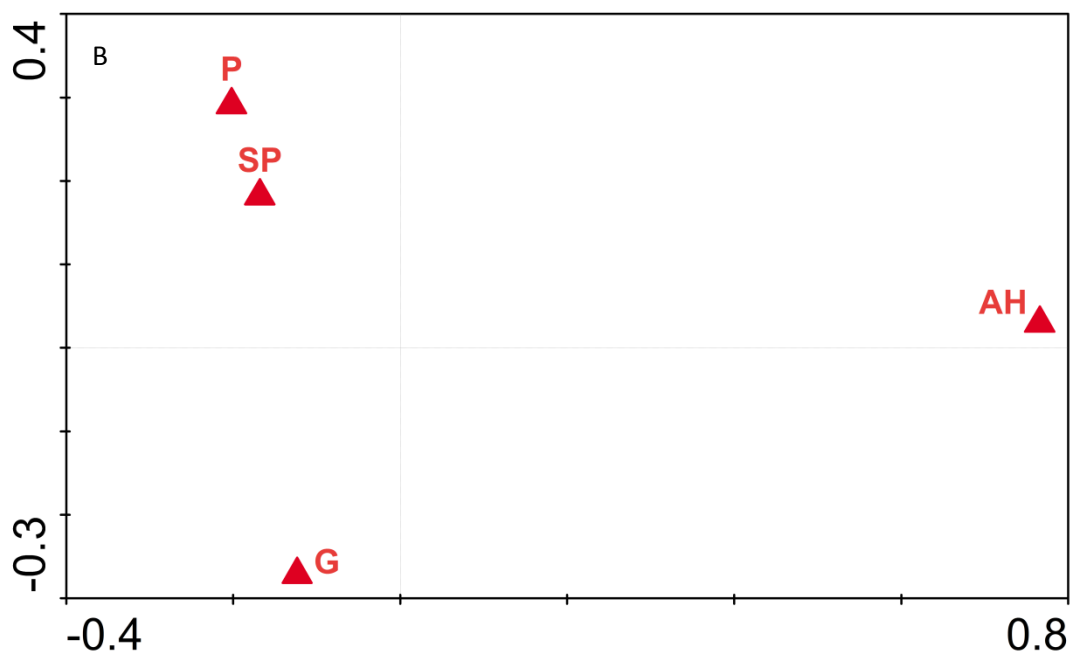
**Obr. 16 PCA a RDA analýza PM4A destiček.** A – PCA, B – RDA

● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen, AH – ambrosiové houby, SP – specialisti na Pinaceae, G – generalisti, P – patogen



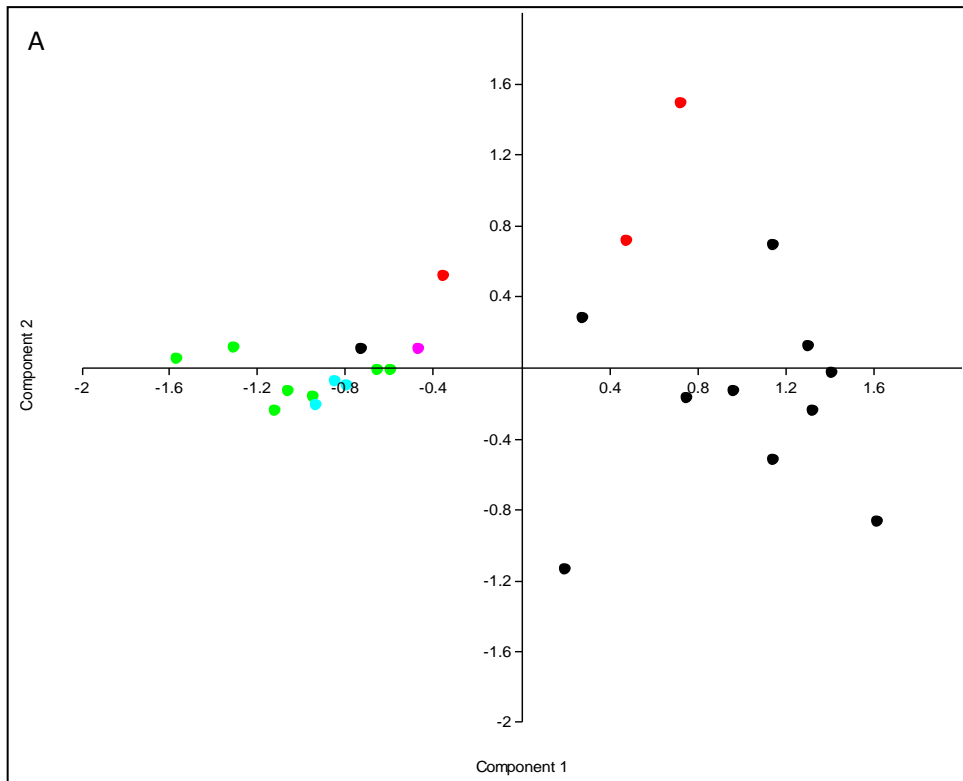
Zobrazeno 59,2 % variability

Zobrazeno 48,4 % variability

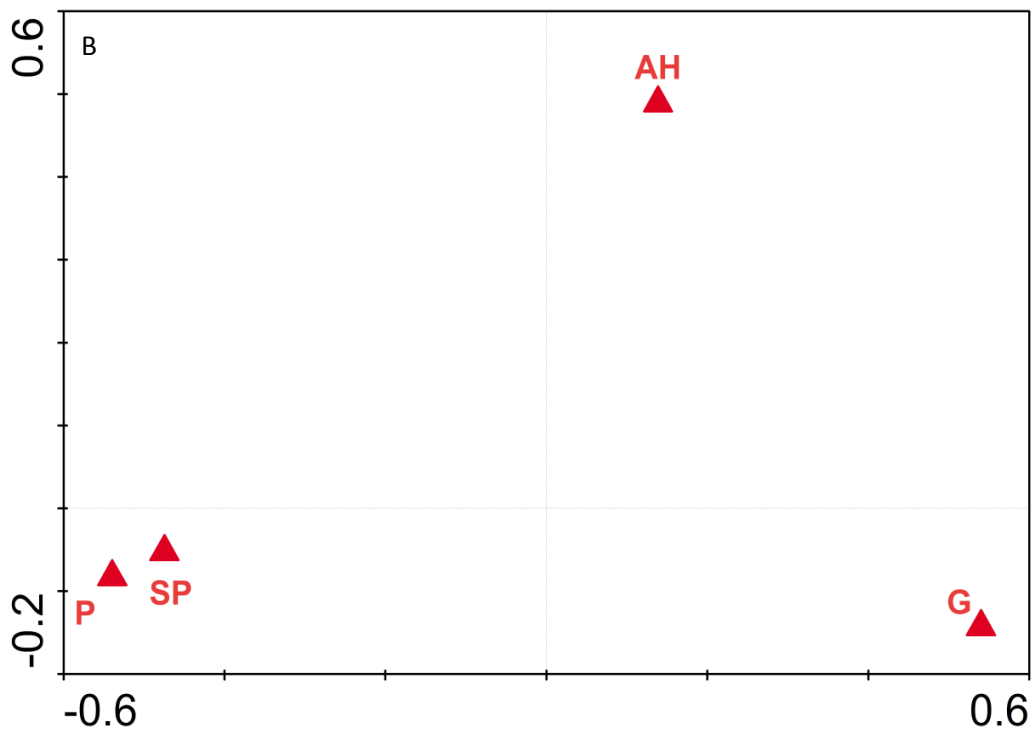


**Obr. 17 PCA a RDA analýza PM5 destiček.** A – PCA, B – RDA

● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti,  
● patogen, AH – ambrosiové houby, SP – specialisti na Pinaceae, G – generalisti, P –  
patogen



Zobrazeno 49,8 % variability



Zobrazené environmentální proměnné představují 30,5 % variability

**Obr. 18 PCA a RDA analýza FF + PM destiček. A – PCA, B – RDA**

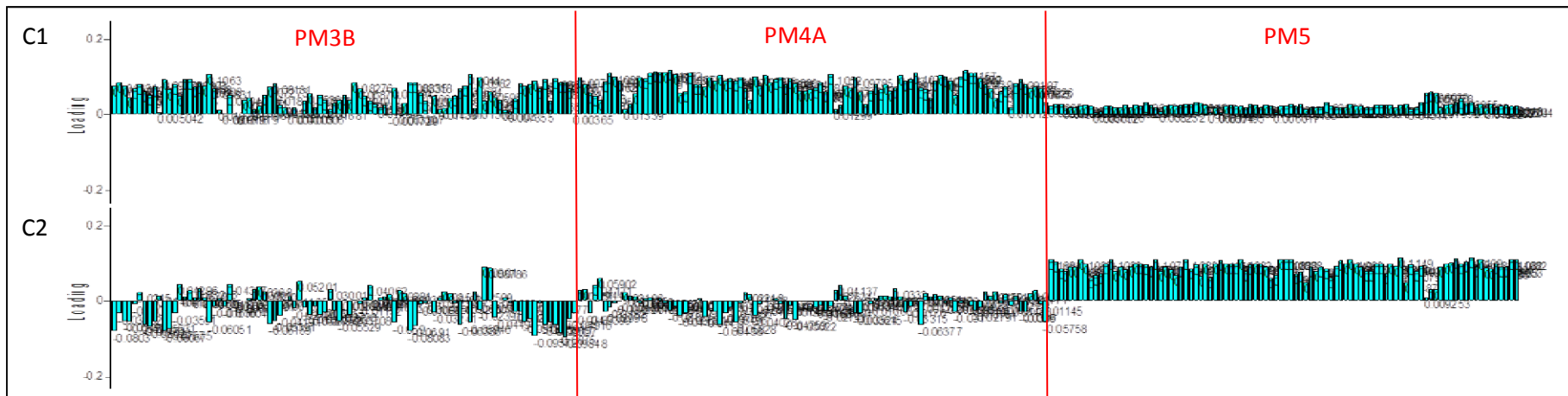
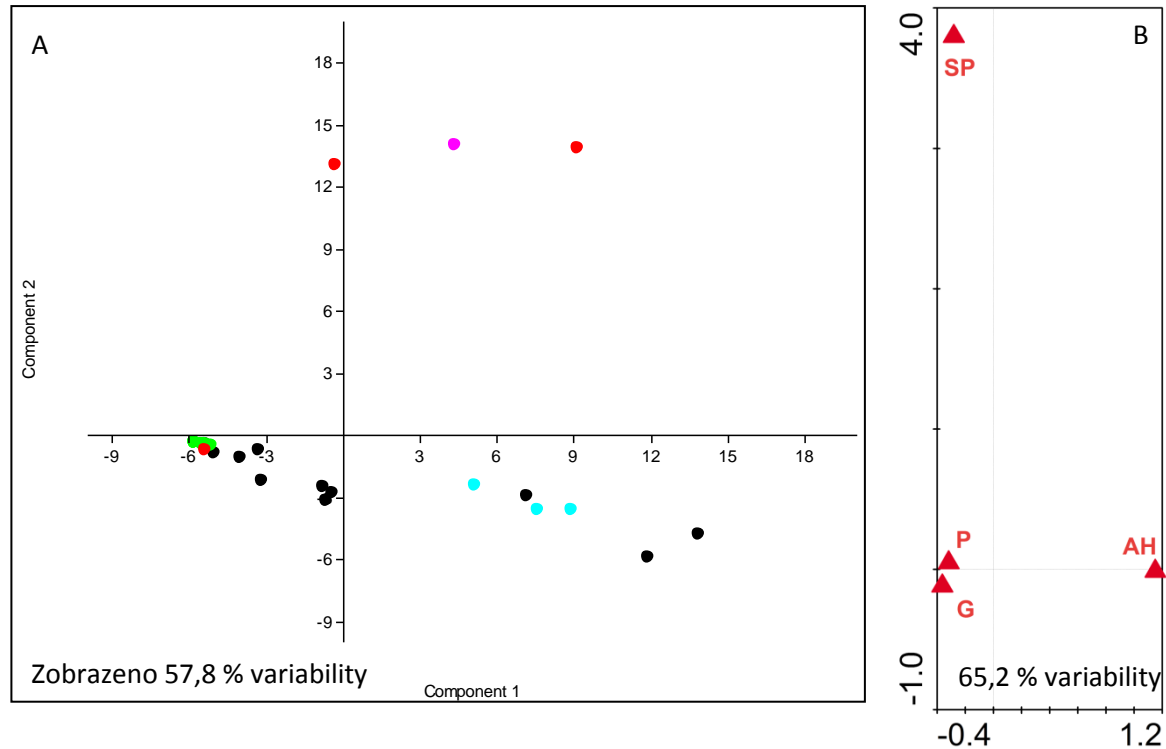
- ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen, AH – ambrosiové houby, SP – specialisti na Pinaceae, G – generalisti, P – patogen

**Obr. 19 PCA a CCA analýza výskytu sporulace na PM destičkách.**

A – PCA, B – CCA, C – Loading z PCA analýzy zobrazující korelaci daného substrátu k dané ose (component), C1 – component 1, C2 – component 2, červeně jsou odděleny jednotlivé PM destičky.

- ambrosiové houby
- auxiliárně ambrosiová houba
- specialisti na Pinaceae
- generalisti
- patogen

- AH: ambrosiové houby
- SP: specialisti na Pinaceae
- G: generalisti
- P: patogen



**Tab. 15 Výsledky metody Biolog.**

Červeně jsou značené signifikantní hodnoty,  $p < 0,05$ . G – generalisti, SP – specialisti na Pinaceae, P – patogen, AH – ambrosiové houby. V horních částech tabulek jsou uvedeny p-value z one-way ANOSIM, v dolních z Monte Carlo permutačního testu.

**Tab. 15A Jednotlivé FF a PM destičky.**

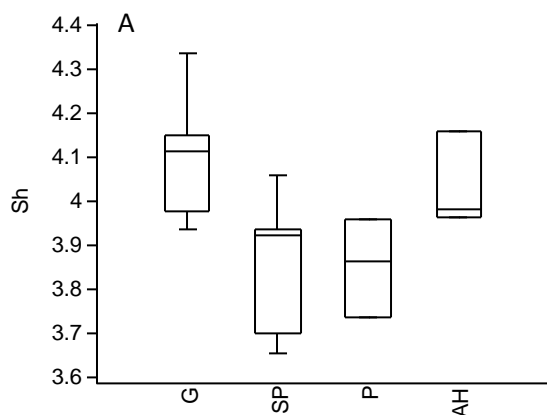
	FF	PM3B	PM4A	PM5	FF	PM3B	PM4A	PM5	FF	PM3B	PM4A	PM5
G	-	-	-	-								
SP	0,0000	0,0002	0,0040	0,1265	-	-	-	-				
P	0,0010	0,0041	0,0339	0,3143	0,6482	0,9927	0,8322	0,8246	-	-	-	-
AH	0,0197	0,5266	0,1397	0,2375	0,3628	0,0086	0,3128	0,1653	0,1013	0,1008	0,0971	0,1008
	G	G	G	G	SP	SP	SP	SP	P	P	P	P
G	-	-	-	-								
SP	0,0020	0,0020	0,0020	0,4340	-	-	-	-				
P	0,0100	0,0120	0,0660	0,4520	0,8280	0,9640	0,6340	0,8820	-	-	-	-
AH	0,0600	0,2020	0,1240	0,0220	0,4160	0,0040	0,1300	0,0280	0,6640	0,0180	0,2220	0,0540

**Tab. 15B Celkové výsledky z metody Biolog (FF+PM).**

	G	SP	P	AH
G	-	0,0000	0,0041	0,0823
SP	0,0020	-	0,9138	0,0170
P	0,0040	0,9140	-	0,1008
AH	0,0620	0,0240	0,0640	-

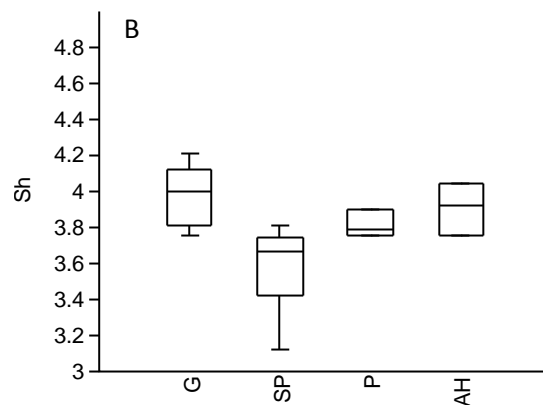
**Tab. 15C Sporulace na PM destičkách.**

	G	SP	P	AH
G	-	0,0001	0,7672	0,0444
SP	0,0300	-	0,1289	0,148
P	0,3700	0,0400	-	0,0961
AH	0,0020	0,0160	0,0020	-



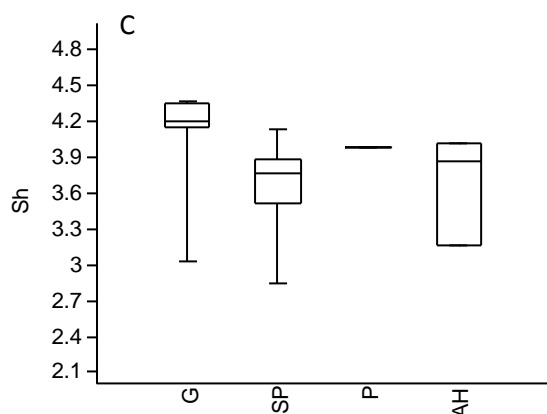
p-value pro M-W/BC. FF biolog

	G	SP	P	AH
G	-	<b>0,0028</b>	<b>0,0195</b>	0,6404
SP	<b>0,0168</b>	-	0,8197	0,0683
P	0,1171	1	-	0,0809
AH	1	0,4095	0,4851	-



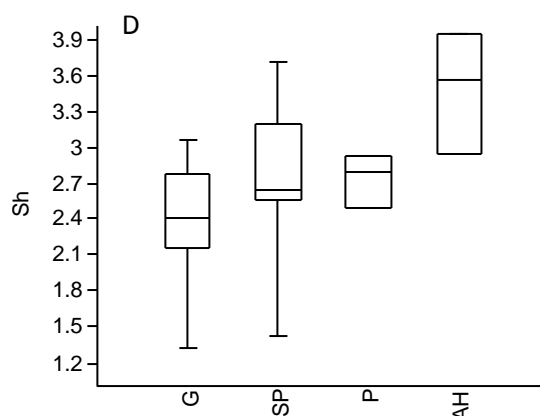
p-value pro M-W/BC. PM3B biolog

	G	SP	P	AH
G	-	<b>0,0015</b>	0,0868	0,4363
SP	<b>0,0092</b>	-	0,0683	<b>0,0402</b>
P	0,5206	0,4095	-	0,3827
AH	1	0,2414	1	-



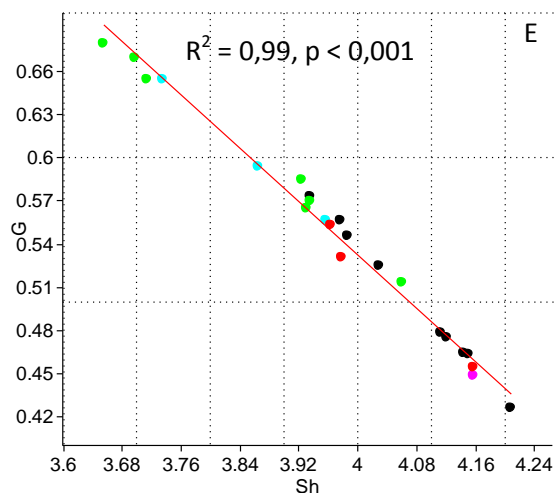
p-value pro M-W/BC. PM4A biolog

	G	SP	P	AH
G	-	<b>0,0038</b>	<b>0,0430</b>	<b>0,0430</b>
SP	<b>0,0225</b>	-	0,1106	0,8197
P	0,2578	0,6637	-	0,6625
AH	0,2578	1	1	-



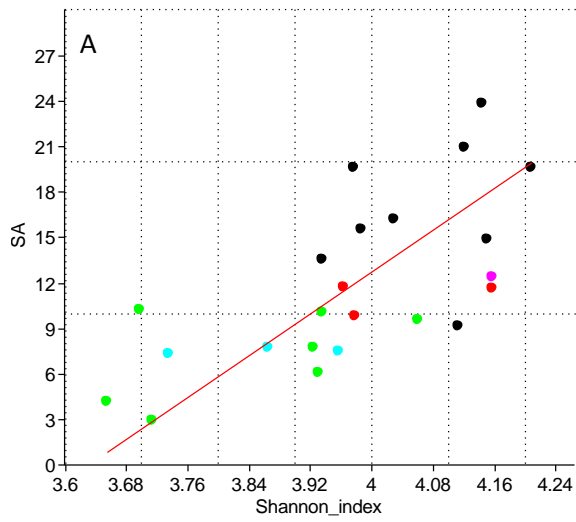
p-value pro M-W/BC. PM5 biolog

	G	SP	P	AH
G	-	0,3254	0,2199	<b>0,0253</b>
SP	1	-	0,8973	0,1556
P	1	1	-	0,0809
AH	0,1516	0,9335	0,4851	-

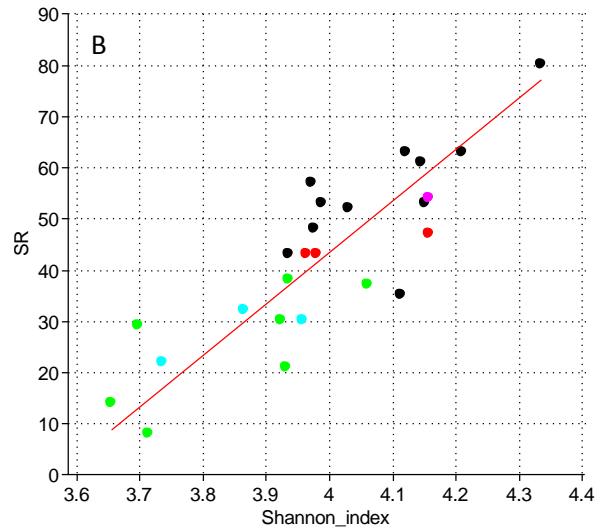


**Obr. 20 Výstup z metody Biolog.** A-D

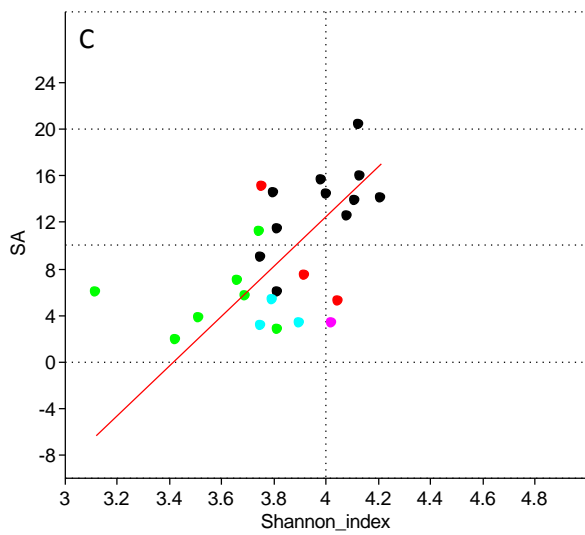
Krabicový graf Shannonova indexu diverzity (Sh) testovaných ekologických skupin doplněný o jejich párové srovnání: A – FF, B – PM3B, C – PM4A, D – PM5; E – regresní analýza Shannonova indexu diverzity (Sh) a Gini koeficientu (G); generalisti – G, černě, specialisti na čeleď Pinaceae – SP, zeleně, patogen – P, modře, ambrosiové houby – AH, červeně, auxiliárně ambrosiová houba – růžově; červeně psaný text značí signifikantní hodnoty:  $p < 0,05$



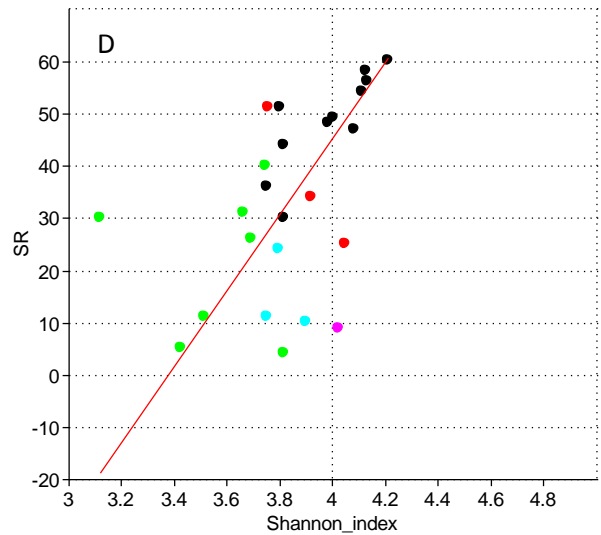
$R^2 = 0,53; p < 0,0001$



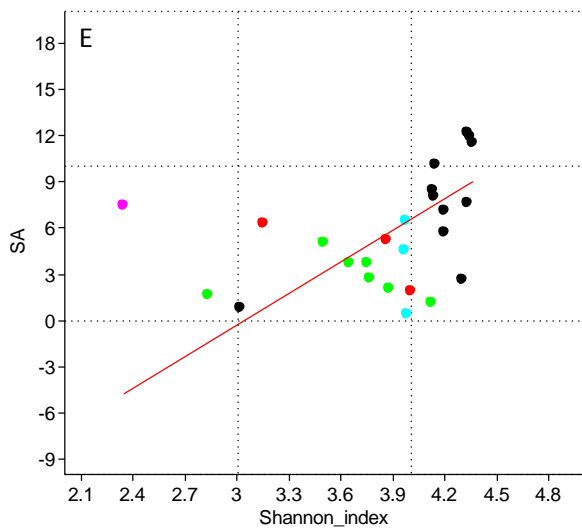
$R^2 = 0,72; p < 0,0001$



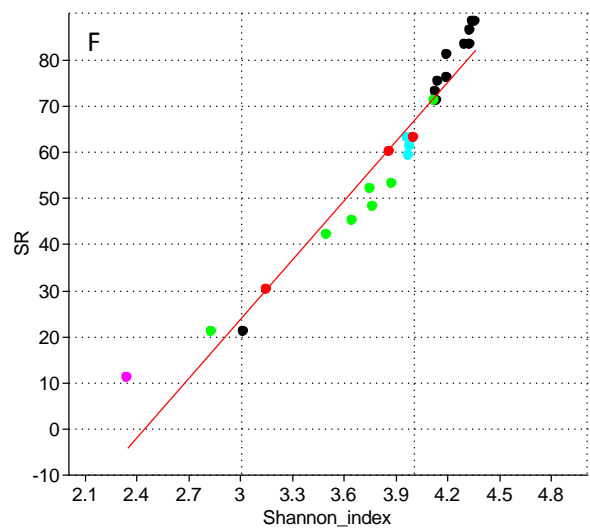
$R^2 = 0,61; p < 0,0001$



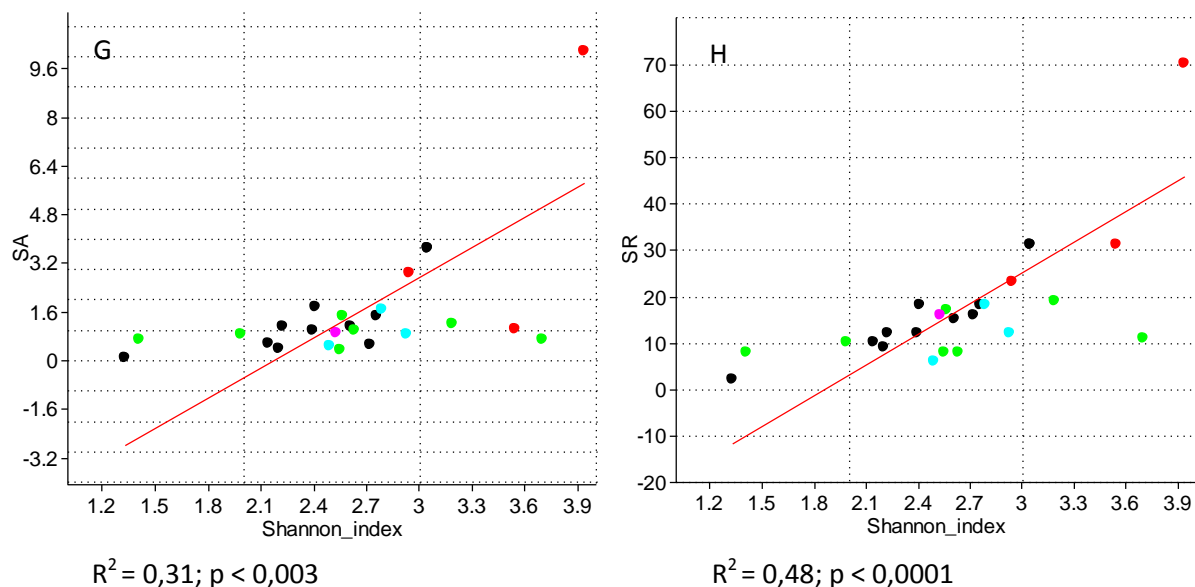
$R^2 = 0,83; p < 0,0001$



$R^2 = 0,12; p > 0,08$



$R^2 = 0,94; p < 0,0001$



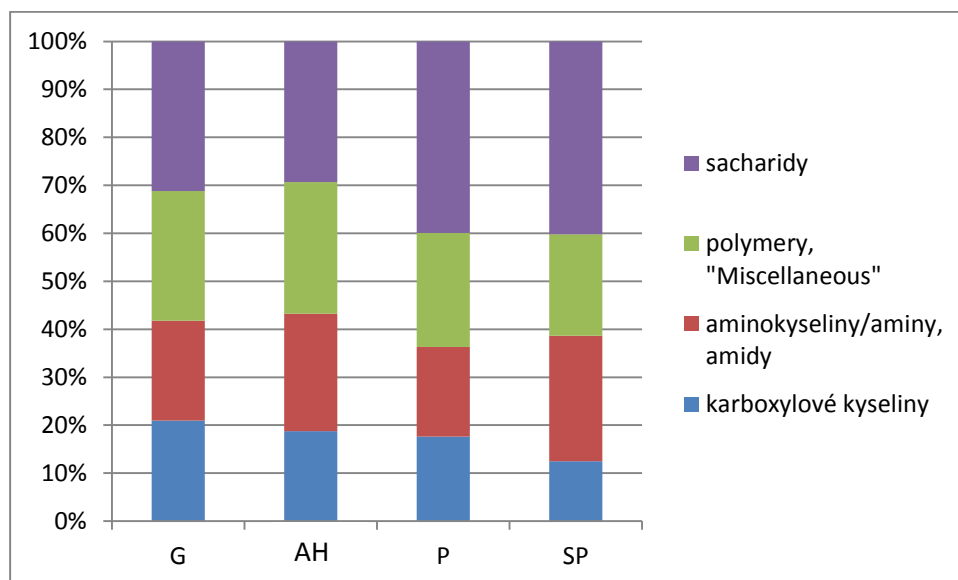
**Obr. 21 Regresní analýzy SA a SR se Shannonovým indexem diversity.** A-B – analýza pro FF destičky, C-D – analýza pro PM3B destičky, E-F – analýza pro PM4A destičky, G-H – analýza pro PM5 destičky  
 ● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiová houba, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen

**Tab. 16 Prvních 10 substrátů nejvíce podporujících růst *Geosmithia* spp.**

FF	PM3B	PM4A	PM5
α-D-glukosa	L-glutamová kyselina	cystidine-2'-monofosfát	D-biotin
D-fruktosa	Ala-Asp	6-fosfo-glukonová kys.	inosin+thiamin
β-methyl-D-glukosid	Ala-Gly	adenosin-2'-monofosfát	thiamin pyrofosfát
sacharosa	Gly-Asn	adenosin-5'-monofosfát	thiamin
D-glukonová kyselina	L-asparagová kyselina	guanosin-2'-monofosfát	cholin
D-manitol	L-glutamin	guanosin-5'-monofosfát	L-isoleucin + valin
maltosa	Ala-Glu	O-fosfo-L-Serine	pyridoxamin
maltotriosa	Ala-gly	fosfát	pyrrolochinolin chinon
D-manosa	Gly-Gln	adenosin-3'-monofosfát	α-ketobutanová kyselina
D-arabitol	močovina	guanosin-3'-monofosfát	D, L-mevalonová kyselina



hostitelské rostliny. Druhy specializované na čeled' Pinaceae vykazovaly velmi řídkou sporulaci, která se jen v některých případech zvýšila po dvoutýdenní kultivaci (data nejsou uvedena). Obecně druhy nejlépe sporulovaly na zdrojích N, řidčeji pak na zdrojích P a S a nejméně na nutričních doplňcích (vyjma ambrosiových druhů *G. microcorthyli* a *G. sp. CCF4292*) (p. 7). Ekologické skupiny hub se nelišily ve využívání jednotlivých gild na FF destičce (obr. 22, tab. 17).



**Obr. 22 Procentuální zastoupení jednotlivých gild na destičce FF v rámci ekologických skupin.**  
G – generalisti, AH – ambrosiové houby, P – patogen, SP – specialisti na Pinaceae

**Tab. 17 Rozdíly mezi skupinami ve využití jednotlivých C gild.**

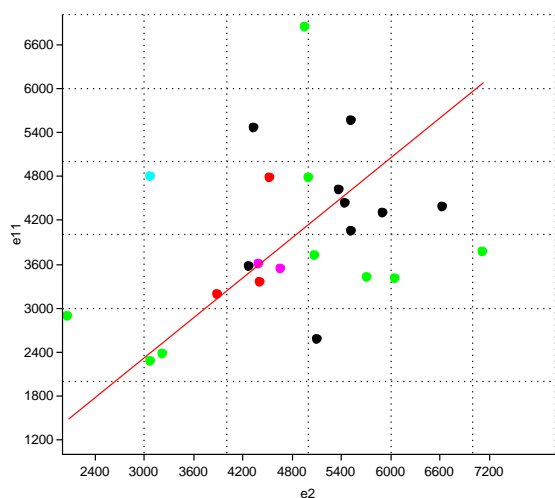
	G	SP	P	AH
G	-	0,8852	0,6650	0,8852
SP	1	-	0,8852	0,8852
P	1	1	-	0,4705
A	1	1	1	-

V horním trianglu jsou zobrazeny p-value z M-W porovnání a v dolním z porovnáním s BC. G – generalisti, AH – ambrosiové houby, P – patogen, SP – specialisti na Pinaceae.

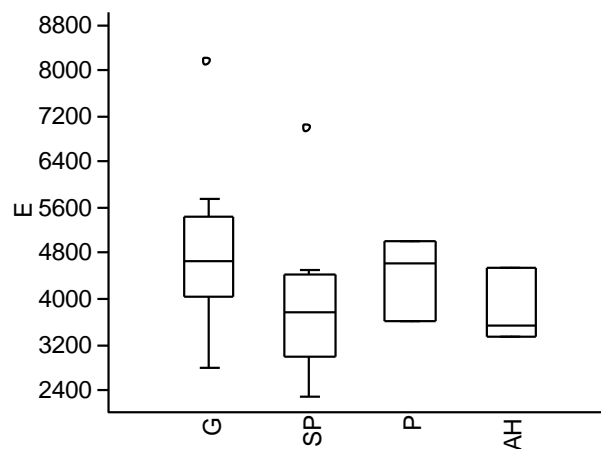
#### 4.6 Množství ergosterolu a obsah MK

Změřené množství ergosterolu v sušině záviselo na délce kultivace daného izolátu. Více ergosterolu v sušině bylo až na výjimky zjištěno u kmenů kultivovaných dva dny (p. 8). Zastoupení ergosterolu v kulturách starých dva dny nekorelovalo s jeho množstvím po 11 denní kultivaci (obr. 23  $R^2 = 0,1$ ,  $p = 0,16$ ). Množství ergosterolu v sušině po dvou denní kultivaci se pohybovalo od 0,21 % (CCF4205) do 0,71 % (CCF4206) s průměrem 0,48 %, po 11 denní kultivaci od 0,23 % (CCF4526) do 0,81 % (CCF3554) a průměrem 0,42 %. Již u kultur rostoucích dva dny došlo ke sporulaci (např. CCF4528), proto byla finální analýza provedena na kulturách rostoucích 11 dní. Množství ergosterolu nebylo možno vysvětlit na základě znalosti ekologie druhů *Geosmithia* (obr. 24), p-value > 0,08 (M-

W). U některých druhů byla nalezena značná vnitrodruhová variabilita (např. *G. sp. 26*), jiné byly uniformní (např. *G. rufescens*).



**Obr. 23 Regresní analýza mezi množstvím ergosterolu [ppm] v myceliu starém 2 dny (e2) a 11 dní (e11).** ● ambrosiové druhy, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● auxiliárně ambrosiové kmeny, ● patogen.



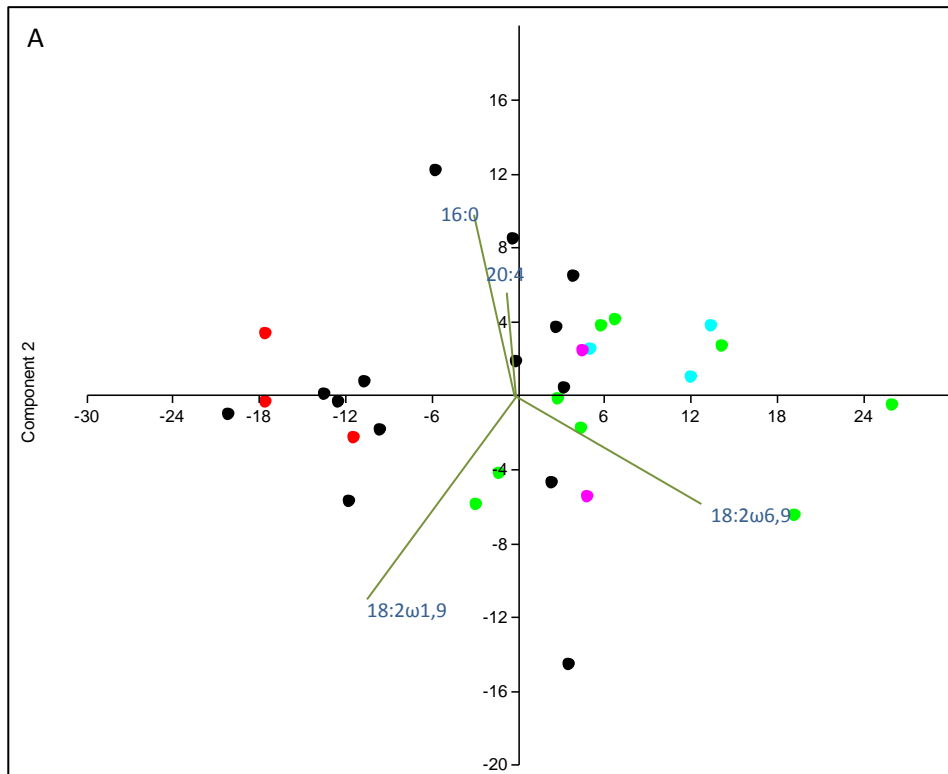
**Obr. 24 Krabicové grafy množství ergosterolu (E) v sušině 11 denního mycelia [ppm].** G – generalisti, SP – specialisti na Pinaceae, P – patogen, AH – ambrosiové houby.

Celkem bylo detekováno 24 různých MK s délkou řetězce od 14 uhlíků po 24 (p. 8). MK nalézané ve vysokých množstvích byly 16:0 (kyselina palmitová), 18:2 $\omega$ 6,9 (kyselina linolová), 18:1 $\omega$ 9 (kyselina olejová), u některých druhů pak i 18:0 (kyselina stearová) a blíže neidentifikovaná MK se čtyřmi dvojnými vazbami, 20:4. MK 18:1 $\omega$ 9 výrazně oddělila ambrosiové druhy doprovázené sesterskými druhy ambrosiové *G. microcorthyli* (obr. 25). Ambrosiové houby představovaly 25 % z celkové variability (39 %) vysvětlené v RDA environmetálními proměnnými. Specialisti na Pinaceae byli odlišní jak od generalistů tak od ambrosiových hub ( $p < 0,04$ , tab. 18) a měli relativně vyšší zastoupení 18:2 $\omega$ 6,9. Výjimkou byly druhy *G. sp. 1* a *G. flava*, které byly specialistům na Pinaceae podobné. Generalisti měli relativně vyšší zastoupení MK 16:0 a 20:4. Oba testované druhy auxiliárně ambrosiové *G. rufescens* byly odlišné od ambrosiových druhů a ležely v blízkosti druhů rostoucích ve floému. Patogenní *G. morbida* ležela na PCA výnosu mezi generalisty a specialisty na Pinaceae. Procentuální zastoupení lipidů v sušině, bylo u všech druhů obdobné, okolo 9,5 %.

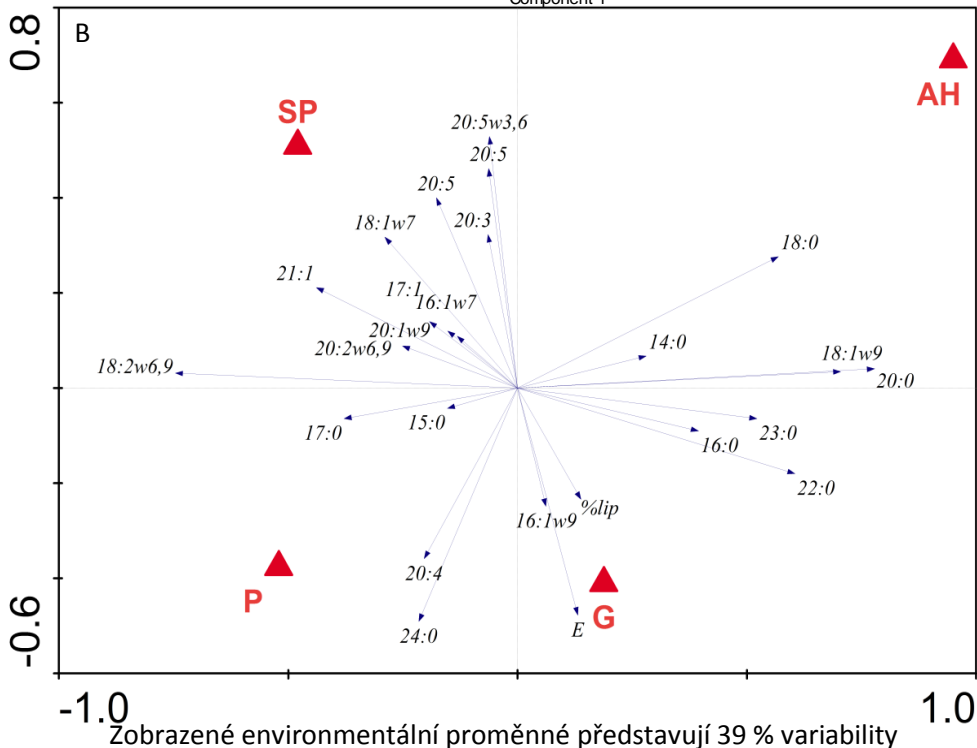
**Tab. 18 Mezi skupinové rozdíly v MK a ergosterolu.**

	G	SP	P	AH
G	-	0,0343	0,3001	0,0247
SP	0,0040	-	0,8847	0,0084
P	0,0200	0,8580	-	0,1019
AH	0,0140	0,0020	0,0020	-

Horní triangl jsou p-value z one-way ANOSIM, dolní triangl jsou p-value z Monte Carlo testu analýzy. Červeně jsou označeny signifikantní hodnoty,  $p < 0,05$ .



Zobrazeno 83,4 % variability, zobrazeny jsou jen významné proměnné



Zobrazené environmentální proměnné představují 39 % variability

**Obr. 25** PCA a RDA analýza mastných kyselin a ergosterolu. A – PCA, B – RDA, ● ambrosiové houby, ● auxiliárně ambrosiové houby, ● specialisti na Pinaceae, ● generalisti, ● patogen, AH – ambrosiové houby, SP – specialisti na Pinaceae, G – generalisti, P – patogen, E – ergosterol, %lip – celkové zastoupení lipidů v sušině.

## 5 Diskuze

### 5.1 Průtoková cytometrie

#### 5.1.1 Optimalizace metodiky

V rámci optimalizace metodiky FCM pro měření GS v rodě *Geosmithia* byl sledován vliv koncentrace a délky inkubace RNAsy A, typu a délky fixace a pufru na kvalitu měření. Jelikož FCM neumožňuje analyzované částice zároveň pozorovat, byla kombinována s konfokální mikroskopií.

O sekundárních metabolitech je známo, že hrají významnou roli v zjišťování GS metodou FCM [133]. *G. spp.* produkují hydroxylované antrachinony jako pigmenty [12, 13]. Přestože se druhy zahrnuté do optimalizace lišily produkcí pigmentů, vykazovaly obdobnou kvalitu měření. Z toho lze usuzovat, že zmíněné pigmenty neovlivňují kvalitu barvení PI.

Mezi kvalitou měření FCM (rCV) a lokalizací PI do jádra buněk pozorovanou mikroskopicky byla nalezena úzká závislost. Vysoké barvení cytoplazmy způsobilo nadhodnocení GS (extrémním případem jsou kmeny druhu *G. sp 21*, CCF4530 a CCF4531, které se lišily 1,5 násobně v GS právě díky nevhodnému barvení u CCF4530). Pokud však bylo dosaženo správné lokalizace PI do jádra, byla FCM pokládána za vhodnou metodu pro zjištění GS u hub.

##### 5.1.1.1 Vliv koncentrace a délka inkubace RNAsy A

Použitá koncentrace RNAsy a délka inkubace vzorku s RNAsou se značně liší mezi FCM studii na houbách. Koncentrace se většinou pohybuje okolo 1 mg/ml [84, 87, 91] a inkubace většinou trvá od jedné hodiny [59, 81, 91] až po celonoční [82]. Pro *Paracoccidioides brasiliensis* bylo experimentálně doporučena inkubace RNAsy A po dobu jedné hodiny při koncentraci 0,75 mg/ml [81]. Pro rod *Geosmithia* byla dostatečná koncentrace RNAsy A 0,1 mg/ml a 15 minutová inkubace. Podobný časový úsek (20 minut) byl použit pro štěpení RNA u *Phialophora gregata* a *Acremonium sp.*, kde byly ke zjišťování GS také použity spory [90]. Většina FCM studií na houbách pracuje s kvasinkovitými organismy. Nízká koncentrace RNAsy A a krátká inkubační doba s RNAsou A dostatečná pro *Geosmithia spp.* může tedy být způsobena měřením GS na sporách, které jsou metabolicky méně aktivní než rostoucí kvasinky. V případě *P. brasiliensis* i *Geosmithia spp.* bylo naprosté vynechání RNAsy A doprovázeno významným zvýšením CV a zvýšením barvení cytoplazmy. Takové zjištění je v souladu se znalostmi o způsobu vazby barviva, tedy k vazbě na dsDNA i dsRNA.

##### 5.1.1.2 Vliv typu a délky fixace

Zajímavým výsledkem optimalizace metodiky bylo zjištění, že v mykologii nejčastěji používaná fixace 70% ethanolem není v kombinaci s barvením PI příliš vhodná. Podobného výsledku bylo dosaženo u druhů *Candida*, kde však byl k barvení DNA použit fluorochrom mithramycin místo PI

[83]. Za nejkvalitnější fixaci byla považována směs MA+ (3: 1 methanol: kyselina octová, 5 mM EDTA, 10% DMSO a 0,1% Triton X-100), který byl použit k fixaci cyst obrněnek s velmi pevnou buněčnou stěnou [118]. Jednalo se o modifikaci fixace methanol: kyselina octová (3: 1), která se používá v botanice pro promytí buněk od autofluorescenčních látek [117]. O sekundárních metabolitech je známo, že mohou mít velký vliv na naměřenou GS (vazbu PI na DNA) např. [133]. Pro rod *Geosmithia* je známa produkce sekundárních metabolitů [12, 13, 134]. Proto fixace, a tedy zároveň i promytí od sekundárních metabolitů, může mít velký vliv na kvalitu naměřeného PI signálu. Nejméně vhodnou fixací byl 4% formaldehyd, který nebyl dostatečný k usmrcení buněk. V mykologických pracích [68, 69] byl formaldehyd použit pouze v kombinaci s mechanickou izolací jader. Tedy v případech, kdy se PI vázalo přímo k DNA bez nutnosti prostupu přes buněčnou stěnu.

### 5.1.1.3 Vliv pufru

Posledním krokem optimalizace bylo testování vlivu pufru. Testované pufrы vedly k obdobným výsledkům. Výrazně odlišný byl pouze Otto buffer, který způsoboval slepování buněk a vysoké barvení cytoplazmy. Podobně jako v práci Bainard et al. [135] bylo nejlepších výsledků dosaženo při použití pufrů, které obsahovaly stabilizátory DNA, Tris-MgCl<sub>2</sub> a LB01. Lze tedy předpokládat, že stabilizace chromatinu je významná pro dosažení kvalitních výsledků při měření GS metodou FCM. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo s pufrem Tris-MgCl<sub>2</sub>. Tento pufr obsahuje, oproti ostatním pufrům, vyšší koncentraci detergentu. Spory druhů *Geosmithia* jsou hydrofobní [8], pufr Tris-MgCl<sub>2</sub> tedy má vyšší kapacitu redukce shlukování spor, což následně zvyšuje kvalitu měření [77].

### 5.1.2 Velikost genomu vybraných druhů rodu *Geosmithia*

Velikost genomu byla zjišťována u 21 druhů (24 kmenů) rodu *Geosmithia*. Jako standardy byly použity *S. cerevisiae* BY4743aa a *A. fumigatus* CEA10. Pozitivní korelace mezi GS a buňky je známa u širokého spektra eukaryotických organismů (shrnuto v [46]) a je zřejmě přítomná i u hub [60-64, 136]. Během diplomové práce byla tato korelace potvrzena i pro rod *Geosmithia*. Mnoho studií nalézá vztah mezi velikostí spor a ekologií hub [60-64, 136]. Data jsou vysvětlována na základě fyzikálních vlastností spor (minimalizace tření a schopnost letu při disperzi větrem, schopnost nalezení vhodného substrátu, množství živin a vody). I když jsou u množství organismů nalézány korelace mezi GS a jejich ekologií (např. [51, 55, 137]), u hub je vliv GS na ekologii přehlížen a měl by být také brán v úvahu.

Druhy *Geosmithia* měly podobnou relativní GS, v rozmezí 1 – 1,4 násobku nejmenší GS (20,8 Mb). Výjimkou byly ambrosiové druhy a některé druhy specializované na Pinaceae, které vytvářely dvě populace s odlišnou GS. Tyto druhy také vykazovaly nejvyšší varianci v objemech konidií (až 84 %). Je známo, že houbový genom je značně plastický. Přírozená vnitrodruhová variabilita v GS je známa u celé řady hub [138-143], dokonce i v rámci jednoho kmene [144, 145], a může být

způsobena řadou mechanismů [146, 147]. Jedním z nich je parasexuální cyklus, který umožňuje přechodný vznik diploidních jader. Během následujících mitotických dělení postupně dochází k haploidizaci genomu, přičemž může dojít i k rekombinaci genetické informace. Je tedy možné, že vznik p2 u *Geosmithia* spp. je umožněn právě parasexuálním cyklem. Zajímavé je, že sesterské druhy, floémové *G. sp. 8* a *G. sp. CCF4200* a ambrosiová *G. microcorthyli*, mající stejnou ITS sekvenci ale značně se lišící ekologií [5], se zcela odlišovaly jak v objemu spor ( $5,7 - 7,3 \mu\text{m}^3$  vs.  $49,7 \mu\text{m}^3$ ) tak v GS ( $24,8 - 29,2 \text{ Mb}$  vs.  $53,9 \text{ Mb}$ ). Sesterské floémové druhy dosahovaly přibližně poloviny GS ambrosiové *G. microcorthyli*. Takto rozsáhlé a náhlé změny v GS je možné docílit spíše polyploidizací než postupným zvětšováním genomu [58]. Je tedy možné, že genom *G. microcorthyli* vznikl diploidizací genomu jejích sesterských druhů, přímé doklady o této události však nejsou. Je známo, že polyploidie hrála významnou roli v evoluci rostlin i živočichů [148]. U hub byla polyploidie dlouho přehlížena a omezovala se především na celo-genomovou duplikaci (WGD) v evoluci kvasinek [149, 150]. Recentně Albertin et Marullo [151] shrnuli výskyt polyploidie i v dalších liniích pokrývajících celou říši Fungi. Nejprostudovanější polyploidní událostí ale stále zůstává WGD kvasinek, která vedla k mnohonásobné speciaci způsobenou reciproční genovou ztrátou [152]. U kvasinek se předpokládá, že duplikace určitých genů umožňuje rychlejší využití daného zdroje živin, což polyploidie zvýhodňuje oproti haploidním předkům [153, 154]. Podobný mechanismus se mohl uplatnit i v evoluci ambrosiových hub, kdy navýšení genové dóze v důsledku diploidizace genomu způsobilo selekční výhodu oproti haploidním předkům. Jiné vysvětlení navýšení GS u ambrosiových hub může být ve zvýšení nutriční hodnoty větších spor v porovnání s druhy s malými spory (zvýšení poměru stravitelné složky k nestravitelné) a v korelaci mezi GS a buňky. Ambrosioví brouci jsou nutričně zcela závislí na pěstované houbě. Produkce větších spor u ambrosiových hub tedy mohla ovlivnit *fitness* brouka, což následně vedlo k pozitivní selekci mutantů s většími spory. Větší genom zároveň poskytuje větší množství fosforu a dusíku [155], což jsou často limitující faktory.

Taxonomicky nepříbuzné druhy s širokým spektrem hostitelských rostlin (generalisti) dosahovaly podobné, relativně malé GS a vytvářely konidie malého objemu. Naproti tomu u druhů specifických pro čeled' Pinaceae a ambrosiových druhů byla pozorována tendence pro tvorbu objemnějších konidií s větší GS. Velikost genomu je korelovaná s velkým množstvím *life-history* znaků [55, 137, 156]. Negativní korelace GS a rychlosti metabolismu byla nalezena u rozličných organismů [51-54]. Vysoká rychlost metabolismu a růstu bývá spojována s r-strategií, tedy s investicí do kvantity. R-strategie může být výhodná v prostředí s vysokou kompeticí, jako je požerek floémofágních brouků, kde existuje pouze slabá závislost mezi houbou a broukem. Rychlý růst houbě umožňuje rychle kolonizovat požerek a získat tím větší pravděpodobnost pro přenos broukem na nový substrát. Objem spor je u anemochorních druhů aerodynamicky omezen, jelikož velké spory jsou přenášeny na kratší vzdálenosti. Na druhou stranu ale obsahují více živin potřebných ke klíčení [65, 157, 158].

Tendence specialistů k větším genomům pak může být důsledkem jejich užšího vztahu s vektorem (překonání aerodynamického omezení) a uvolnění z prostředí s vysokou kompeticí.

## 5.2 Enzymatické analýzy

Výsledky ukázaly, že enzymatická výbava druhů rodu *Geosmithia* je značně ovlivněná jejich ekologií. Druhy specifické pro čeleď Pinaceae se vyznačovaly mnohem užším spektrem využívaných substrátů (zjišťováno metodou Biolog) oproti druhům žijícím na širokém spektru převážně listnáčových druhů. Podobně jako u druhů *Trichoderma/Hypocrea* [100] lze usuzovat, že rychlý růst a schopnost asimilovat široké spektrum substrátů umožňuje listnáčovým druhům obsazovat široké spektrum hostitelských rostlin. Podkorní hmyz se vyvinul během Křídly na koniferách [115] a teprve později začal napadat krytosemenné rostliny. I v rodě *Geosmithia* je zřejmě asociace s koniferovými kůrovci ancestrální [9]. Specificita na čeleď Pinaceae a následná koevoluce s podkorním hmyzem zřejmě vedla ke ztrátě „nepotřebných“ metabolických drah postupnou ztrátou genetické a fyziologické variability, což je tendence známá u řady specialistů [159]. Nápadná pak je i enzymatická podobnost patogenního druhu *G. morbida* s koniferovými druhy. Také u tohoto druhu došlo ke ztrátě schopnosti růstu na řadě zdrojů živin (metoda Biolog) zřejmě také způsobena specializací. Na druhou stranu druhy specializované na *Fraxinus* a *Ulmus* vykazovaly obdobné schopnosti růstu jako generalisti. Je to možná způsobeno absencí silných selekčních tlaků, které mohly uspišit evoluci u patogenního druhu *G. morbida* a dlouhé koevoluce s vektorem hrající roli u specialistů na čeleď Pinaceae. Ambrosiové druhy vytvářely, na základě metody Biolog, přechodnou skupinu mezi generalisty a specialisty. Ke snížení substrátové diverzity u těchto druhů došlo na jednoduchých zdrojích uhlíku, tedy zdrojích, které jsou v porovnání s floémem, v bělovém dřevě chudé (obsahuje především lignocelulosu a škrob). Substrátová diverzita naopak zůstala vysoká na zdrojích P a N, tedy zdrojích živin rozváděných xylémem [160].

Rostlinné tělo je tvořeno převážně celulosou, ligninem (lignocelulosou) a hemicelulosou. Mezi enzymy, které se nejvíce podílejí na degradaci celulosy, patří endoglukanasa (EG), celobiohydrolasa (CBH) a  $\beta$ -glukosidasa [161]. Současné působení EG a CBH značně urychluje proces rozkladu, jelikož EG odkrývá nový substrát pro působení CBH [162]. Synergismus byl nalezen i u různých typů celobiohydrolas, např. u druhu *Trichoderma reesei* [163], kde CBH1 působí na redukcí konci a CBH2 na neredukující konci celulosového řetězce. U druhů rodu *Geosmithia* byly změřeny relativně vysoké aktivity CBH, ale nízké nebo žádné aktivity EG. Rozklad celulosy pouze CBH je pomalejší než při současném působení EG, ale i tak může dojít k jejímu celému rozložení [162]. Aktivita CBH je inhibována hlavním produktem reakce, celobiosou [161]. Odebírání celobiosy je tedy zásadní pro udržování vysoké aktivity CBH. *G. spp.* specifické na čeleď Pinaceae a rostlinný patogen *G. morbida* vykazovaly relativně k ostatním druhům vysoké aktivity  $\beta$ -glukosidasy, enzymu

umožňujícím štěpit celobiosu na molekuly glukosy. U těchto druhů by se tedy dala očekávat schopnost degradace celulosy. Naproti tomu generalisti vykazovali produkci endoxylanasy i xylosidasy spíše afinitu k hemicelulosám. Více než polovina studovaných listnáčových druhů velmi dobře rostla (v prvních 18 substrátech) na arabinose a galaktose, které jsou zároveň nejčastějšími sacharidy nalézány v řetězcích hemicelulos [164, 165]. Lakasa byla ve většině případů detekována jako jediný ligninolytický enzym. Byla produkována spíše specialisty (druhy z Pinaceae, *G. microcorthyli*, *G. morbida*) než generalisty. Lakasa u některých hub může sloužit jako jediný ligninolytický enzym [166]. Specialisti tedy měli spíše afinitu k lignocelulose (hlavní kostře buněčné stěny rostlin), zatímco generalisti k hemicelulose. *G. morbida*, u které endoxylanasa působila v relativně vysokých aktivitách, produkovala i celobiohydrolasu,  $\beta$ -glukosidasu, v menší míře i lakasu. Patogen *G. morbida* se tak zdá jako jediný druh rodu, který je schopen modifikace hlavních složek rostlinných pletiv (lignocelulosy, hemicelulosy), což mu zřejmě umožňuje vytvářet nekrotická ložiska na *J. nigra* a způsobit jeho odumření.

Mezi zdroje uhlíku, které nejvíce podporovaly růst, patřily jednoduché látky běžně nacházené v pletivech rostlin (glukosa, fruktosa, sacharosa, kys. glukonová), dále pak arabitól, manitol a manosa. Tři posledně jmenované látky byly nalezeny jako významné u houbových patogenů rostlin [167-169]. Během růstu houby dochází k akumulaci právě těchto látek v pletivech rostlin, kde zřejmě slouží jako zásobní látky houby. Další jejich funkce může spočívat v obraně proti osmotickému stresu [167]. I další zdroje živin, glycerol a erythritol, které jsou spojovány s odolností proti osmotickému stresu [167], byly vhodné pro některé *Geosmithia* spp. Manitol je významný pro fytopatogeny, kdy je použit k překonání oxidativního stresu způsobenému rostlinným obranným systémem [167]. Rostliny produkují *reactive oxygen species* (ROS): superoxid radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál [170] jako indukovanou obranu proti patogenům, které mohou způsobit i smrt buněk v místě infekce patogenem. Produkci manitolu, působí jako antioxidant, snižují patogeni množství ROS produkovaného rostlinou, a tím snižují její obranyschopnost [167, 170]. Manitol pak může být houbou využit jako zdroj energie [167, 168]. Generalisti a *G. morbida* pak měli afinitu k maltose, maltotriose, některé druhy i k cyklodextrinu, což ukazuje na schopnost hub využívat zásobní látku rostlin, škrob. Jako hlavní enzym štěpící škrob se udává  $\alpha$ -amylasa [171-173], která štěpí škrob uvnitř řetězce a generuje maltosu a malto-oligosacharidy. Dalším enzymem může být  $\alpha$ -glukosidasu, která funguje jako exoenzym. Absence  $\alpha$ -glukosidasy u *Geosmithia* spp. nemusí znamenat neschopnost degradace škrobu, jelikož tento enzym byl postradatelný u *Trichoderma viride* [173]. Z testovaných nutričních doplňků byly, podobně jako u dalších hub asociovaných s podkorním hmyzem [174], pro růst nejvíce vhodné vitamíny B (thiamin a biotin) a cholin. Cholin patří mezi esenciální látky nutné pro růst vláknitých hub. Je součástí membránových fosfolipidů a uplatňuje se i v metabolismu sulfátu [175].



Hlavním bodem symbiosy hub s podkorním hmyzem je zřejmě nutriční benefit brouka, který získává skrze mycetofagii. Nejdůležitější je pak zisk dusíku [29, 176], jelikož koncentrace dusíku v pletivech rostlin je mnohem nižší než v tělech herbivorů [176]. Experimentálně bylo zjištěno, že larvy brouka asociovaného s houbou hloubí kratší chodbičky než při absenci houby. Velký rozdíl je pak mezi bělovým dřevem a floémem, kdy floém obsahuje přibližně 10 – 100 krát více N a 100 krát více cukrů než bělové dřevo. Hmyz živící se pouze bělovým dřevem by tedy musel zkonzumovat velké množství potravy, aby uspokojil potřebu N [176]. Rozdíl je i mezi stále zelenými nahosemennými a opadavými krytosemennými rostlinami, kde nahosemenné obsahují cca poloviční koncentraci dusíku [176]. Z toho vyplývá, že brouci žijící v pletivech nahosemenných rostlin a ambrosioví brouci budou více závislí na houbovém partnerovi. Kromě aminokyselin byla pro většinu druhů vhodná močovina, pro některé i amoniak, tedy výkaly asociovaného hmyzu. Houby tedy dokáží výkaly metabolizovat, a tím recyklovat dusík a znovu ho tak zpřístupňovat hmyzu.

### 5.3 Ergosterol a mastné kyseliny

Podobně jako u hub asociovaných s kůrovci *Dendroctonus ponderosae* a *D. rufipennis* [32] nebyl u *Geosmithia* spp. nalezen vztah mezi množstvím ergosterolu v sušině a silou vazby houby na vektor. Oproti houbám *Ophiostoma montium*, *O. clavigerum* a *Leptographium abietinum* (0,88 – 1,06 %) ze zmíněné práce obsahovaly *Geosmithia* spp. méně ergosterolu (průměr 0,42 %). Je známo, že zastoupení ergosterolu v sušině je závislé na stáří kultury [177], kdy ergosterol zaujímá největší podíl biomasy během počátku růstu, se stářím jeho množství znovu klesá. Stejná tendence byla nalezena u *Geosmithia* spp., kde mycelia stará dva dny obsahovala relativně více ergosterolu než starší. Extrahované lipidy u *G.* spp. odpovídaly lipidům známým u hub [178-181]. Kok [31] studoval zastoupení mastných kyselin a sterolu u ambrosiových hub. Podobně jako ve zmíněné práci měly olejová, palmitová, stearová a linolová kyselina největší zastoupením u ambrosiových hub v rodě *Geosmithia*. Zajímavé je, že olejová kyselina, která byla významným znakem pro ambrosiové druhy i druhy sesterské s *G. microcorthyli*, je známá jako repelent proti hmyzu. Olejová a linolová mastná kyselina slouží u hmyzu k rozpoznání mrtvého jedince, který zemřel následkem onemocnění nebo predace. Takovému jedinci se pak ostatní vybíhají, čímž se sami chrání [182]. Ambrosiové druhy v rodě *Geosmithia* jsou asociovány s ambrosiovými brouky ze tří odlišných rodů, přesto všechny vykazovaly vysoké zastoupení právě olejové kyseliny (tvořila téměř 50 % všech MK). U ambrosiových brouků *Trypodendron lineatum* a *Gnathotrichus* spp. olejová kyselina zřejmě nepůsobí jako silný repelent, i když její použití vedlo k opoždění a k částečnému snížení napadení douglasky [183]. Ke ztrátě rozpoznání olejové kyseliny jako varovného signálu u tří nepříbuzných ambrosiových brouků asociovaných s druhy *Geosmithia* a částečně i u *T. lineatum* a *Gn.* spp. mohlo dojít získáním nové funkce olejové kyseliny. Pokud by ambrosiový brouk přestal být odpuzován olejovou kyselinou

produkovanou asociovanou ambrosiovou houbou, získal by tak obranu proti ostatnímu hmyzu, který by mu mohl konkurovat nebo na něm parazitovat. Pro ostatní hmyz by pak jeho galerie byla místem, jemuž se mají vyhnout.

## 6 Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jaké znaky jsou důležité v evoluční ekologii rodu *Geosmithia*, který žije v symbiose s podkorním hmyzem. Z dosud provedených studií vyplývá, že nutriční benefit, který brouk získává skrze mycetofagii, je nejdůležitějším faktorem v udržení této symbiosy. Nutriční závislost se prohlubuje se silou asociace a vede až k obligátní závislosti u ambrosiových brouků. Jimi pěstované ambrosiové houby pak procházejí selekcí vedoucí ke konvergentnímu fenotypu v podobě tvorby velkých terminálních konidií a schopnosti kvasinkovitého růstu. Jaké vlastnosti umožňují houbě udržet funkční symbiosu s podkorním hmyzem a získat tím dobrý prostředek pro rozšiřování sama sebe nejsou zatím známy. Hledáním těchto znaků na modelovém rodě *Geosmithia* se zabývala má diplomová práce.

Během diplomové práce byla vyvinuta metodika měření velikosti genomu hub průtokovou cytometrií a byly představeny nové standardy (*S. cerevisiae* BY4743aa a *A. fumigatus* CEA10), což umožnilo studovat vznik konvergentního fenotypu ambrosiových hub (korelace objemů konidií s velikostmi genomů). Dále byl zjištěn vliv ekologie hub na schopnost získání a tedy i zpřístupnění zdrojů živin broukovi (enzymatický potenciál) a na nutriční benefit, který brouk získá skrze mycetofagii (množství ergosterolu a skladba a množství mastných kyselin).

Všechny sledované znaky byly značně ovlivněné ekologií studovaných druhů, pouze u množství ergosterolu se tento vliv nepotvrdil. Velikost genomu ovlivňuje ekologii mnoha živočichů i rostlin a její vliv se potvrdil i v rodě *Geosmithia*. Síla vazby na vektor zřejmě působí jako určující faktor, kdy specialisti na Pinaceae s delší koevolucí s vektorem dosahovali větších velikostí genomu než generalisti. Nejvíce se síla vazby projevila u ambrosiových hub s největšími velikostmi genomu v rodě. Změna ve velikosti genomu u ambrosiové *G. microcorthyli* musela být náhlá (molekulárně značně podobná svým sesterským floémovým druhům), z čehož usuzuji, že k nárůstu velikosti genomu došlo spíše polyploidizací než postupným nárůstem repetitivních sekvencí. Tento výsledek potvrdil naši hypotézu, že konvergentní fenotyp velko-sporých ambrosiových hub byl spjat s nárůstem velikosti jejich genomu.

Specializace neovlivnila pouze velikost genomu, ale i enzymatický a biochemický profil studovaných hub. Specialisti na čeleď Pinaceae a patogenní *G. morbida* měli nižší enzymatický potenciál než generalisti (testováno metodou Biolog), ambrosiové houby tvořily přechod mezi těmito skupinami. Ambrosiové houby jsou sice obligátní symbionti ambrosiových brouků (specializace na vektor), ale jsou na druhou stranu generalisti co se týče hostitelské rostliny (brouk napadá celou řadu hostitelských rostlin). Z toho důvodu mohlo u ambrosiových druhů dojít k zachování většího počtu metabolických drah než u specialistů na Pinaceae nebo patogenu. Analýza extracelulárních enzymů poukázala na způsob patogeneze *G. morbida*, která produkovala enzymy potřebné k modifikaci

lignocelulosity a hemicelulosity, tedy základních složek rostlinných pletiv. *G. morbida* měla dále afinitu k manitolu, což této houbě umožňuje snižovat efektivitu rostlinné obrany. Ambrosiové druhy a sesterské druhy *G. microcorthyli* se značně odlišovaly od ostatních druhů spektrem mastných kyselin, kdy nejnápadnější byla kyselina olejová. Mezi další patřily kyselina stearová, palmitová a linolová. Stejně spektrum mastných kyselin bylo významné i pro další dříve studované ambrosiové houby a lze tak usuzovat na jejich obecnou významnost v asociaci s ambrosiovým broukem. Zajímavou mastnou kyselinou pak je kyselina olejová, která může sloužit ambrosiovým broukům jako obrana proti hmyzím konkurentům a parazitům.

## 7 Reference

1. Pitt, J. I., *Geosmithia gen. nov. for Penicillium lavendulum and related species*. Canadian Journal of Botany, 1979. **57**: p. 2021-2030.
2. Ogawa, H., Yoshimura A., and Sugiyama J., *Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus Geosmithia and the relationships of the cleistothecial genera: evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses*. Mycologia, 1997. **89**: p. 756-771.
3. Kolařík, M., et al., *Morphological and molecular characterisation of Geosmithia putterillii, G-pallida comb. nov and G-flava sp nov., associated with subcorticolous insects*. Mycological Research, 2004. **108**: p. 1053-1069.
4. Kolařík, M., et al., *A complex of three new white-spored, sympatric, and host range limited Geosmithia species*. Mycological Research, 2005. **109**: p. 1323-1336.
5. Kolařík, M. and Kirkendall L. R., *Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in Geosmithia Pitt (Ascomycota: Hypocreales)*. Fungal Biology, 2010. **114**: p. 676-689.
6. Kolařík, M., et al., *Geosmithia morbida sp nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (Pityophthorus juglandis) on Juglans in USA*. Mycologia, 2011. **103**: p. 325-332.
7. Kolařík, M., Kostovčík M., and Pažoutová S., *Host range and diversity of the genus Geosmithia (Ascomycota : Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area*. Mycological Research, 2007. **111**: p. 1298-1310.
8. Kolařík, M., et al., *Geosmithia fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: Evidence from their community structure in temperate Europe*. Microbial Ecology, 2008. **56**: p. 198-199.
9. Kolařík, M. and Jankowiak R., *Vector affinity and diversity of Geosmithia fungi living on subcortical insects inhabiting Pinaceae species in Central and Northeastern Europe*. Microbial Ecology, 2013. DOI: **10.1007/s00248-013-0228-x**: p. (in press).
10. Kubátová, A., et al., *Bark beetles and their galleries: Well-known niche for little known fungi, case of Geosmithia*. Czech Mycology, 2004. **55**: p. 1-18.
11. Pitt, J. I. and Hocking A. D., *Fungi and Food Spoilage*. 2009, Springer: New York.
12. Stodůlková, E., et al., *Hydroxylated anthraquinones produced by Geosmithia species*. Folia Microbiologica, 2009. **54**: p. 179-187.
13. Stodůlková, E., et al., *High-performance liquid chromatography–off line mass spectrometry analysis of anthraquinones produced by Geosmithia lavendula*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**: p. 6296-6302.

14. Gebhardt, H., Begerow D., and Oberwinkler F., *Identification of the ambrosia fungus of Xyleborus monographus and X. dryographus (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae)*. Mycological Progress, 2004. **3**: p. 95-102.
15. Six, D. L., *Bark Beetle-Fungus Symbiosis*, in *Insect Symbiosis*, K. Bourtzis and Miller, T. A., Editors. 2003, CRC Press: Florida. p. 97-114.
16. Batra, L. R., *Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species*. Mycologia, 1967. **59**: p. 976-1017.
17. Čížková, D., et al., *Assessing the pathogenic effect of Fusarium, Geosmithia and Ophiostoma fungi from broad-leaved trees*. Folia Microbiologica, 2005. **50**: p. 59-62.
18. Jankowiak, R. and Kolařík M., *Fungi associated with the fir bark beetle Cryphalus piceae in Poland*. Forest Pathology, 2010. **40**: p. 133-144.
19. Scala, A., et al., *A non-Ophiostoma fungus expresses the gene encoding the hydrophobin cerato-ulmin*. Journal of Plant Pathology, 2007. **89**: p. 233-240.
20. Scala, A., et al., *Dutch elm disease progression and quantitative determination of cerato-ulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with Ophiostoma novo-ulmi and O. ulmi*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997. **50**: p. 349-360.
21. Tisserat, N., et al., *Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and Thousand Cankers Disease*. Plant Health Progress, 2009. doi:10.1094/PHP-2009-0811-01-RS.
22. Hofstetter, R. W., et al., *Antagonisms, mutualisms and commensalisms affect outbreak dynamics of the southern pine beetle*. Oecologia, 2006. **147**: p. 679-691.
23. Batra, L. R., *Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles*. Transactions of the Kansas Academy of Science, 1963. **66**: p. 213-236.
24. Rivera, F. N., et al. *Yeasts associated with bark beetles of the genus Dendroctonus Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): Molecular identification and biochemical characterization*. in *Proceedings from the Third Workshop on Genetics of Bark Beetles and Associated Microorganisms*. 2007: RMRS-P-45. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.
25. Vasanthakumar, A., et al. *Gut bacteria of bark and wood boring beetles*. in *Proceedings from the Third Workshop on Genetics of Bark Beetles and Associated Microorganisms*. 2007: RMRS-P-45. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.
26. Hulcr, J., et al., *Mycangia of ambrosia beetles host specialized communities of bacteria*. Microbial Ecology, 2012. **64**: p. 784-793.
27. Mueller, U. G., et al., *The evolution of agriculture in insects*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2005. **36**: p. 563-595.

28. Berryman, A. A., *Adaptive pathways in scolytid-fungus associations*, in *Insect Fungus Interactions*, N. Wilding, et al., Editors. 1989, Academic Press: London. p. 145-159.
29. Ayres, M. P., et al., *Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi*. *Ecology*, 2000. **81**: p. 2198-2210.
30. Clayton, R. B., *The utilization of sterols by insects*. *Journal of Lipid Research*, 1964. **5**: p. 3-19.
31. Kok, L. T., *Lipids of ambrosia fungi and the life of mutualistic beetles*, in *Insect-Fungus Symbiosis: Nutrition, Mutualism and Commensalism: Proceedings of a Symposium*, L. R. Batra, Editor. 1979, Allanheld, Osmun & Co.: Montclair, New Jersey.
32. Bentz, B. J. and Six D. L., *Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae)*. *Annals of the Entomological Society of America*, 2006. **99**: p. 189-194.
33. Kim, S. H., et al. *Yeasts associated with the ambrosia beetle, *Platypus koryoensis*, vectoring oak wilt disease caused by *Raffaelea quercus-mongolicae**. in *XVI Congress of European Mycologists 2011*. Halkidiki, Greece.
34. Harrington, T. C., *Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners*, in *Insect-Fungal Associations Ecology and Evolution*, F. E. Vega and Blackwell, M., Editors. 2005, Oxford university press: Oxford.
35. Paine, T., Raffa K., and Harrington T., *Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers*. *Annual Review of Entomology*, 1997. **42**: p. 179-206.
36. Franceschi, V. R., et al., *Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests*. *New Phytologist*, 2005. **167**: p. 353-376.
37. Krokene, P., *The role of blue-stain fungi in tree-killing by bark beetles*. 1996, Dr. Scient. Thesis, University of Oslo: Norway.
38. Whitney, H. S. and Blauel R. A., *Ascospore dispersion in *Ceratocystis* spp. and *Europhium clavigerum* in conifer resin*. *Mycologia*, 1972. **64**: p. 410-414.
39. Farrell, B. D., et al., *The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae)*. *Evolution*, 2001. **55**: p. 2011-2027.
40. Mueller, U. G. and Gerardo N., *Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**: p. 15247-15249.
41. Kirkendall, L. R. and Jordal B. H., *The bark and ambrosia beetles (Curculionidae, Scolytinae) of Cocos Island, Costa Rica and the role of mating systems in island zoogeography*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2006. **89**: p. 729-743.
42. Beaver, R. A., *Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles*, in *Insect Fungus Interactions*, N. Wilding, et al., Editors. 1989, Academic Press: London. p. 121-143.

43. Norris, D. M., *The mutualistic fungi of Xyleborus beetles*, in *Insect-Fungus Symbiosis Nutrition, Mutualism and Commensalism: Proceedings of a Symposium*, L. R. Batra, Editor. 1979, Allanheld, Osmun & Co.: Montclair, New Jersey.
44. Batra, L. R., *Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles*. *Science*, 1966. **153**: p. 193-195.
45. Gregory, T. R., et al., *Eukaryotic genome size databases*. *Nucleic Acids Research*, 2006. **35**: p. D332-D338.
46. Gregory, T. R., *Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cellsize, and the C-value enigma*. *Biological Reviews*, 2001. **76**: p. 65-101.
47. Mirsky, A. E. and Ris H., *The Desoxyrinonucleic acid content of animal cells and it evolutionary significance*. *Journal of General Physiology*, 1951. **34**: p. 451-462.
48. Swift, H., *The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1950. **36**: p. 643-653.
49. Cavalier-Smith, T. and Beaton M., *The skeletal function of non-genic nuclear DNA: new evidence from ancient cell chimaeras*. *Genetica*, 1999. **106**: p. 3-13.
50. Bennett, M. D., *The duration of meiosis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 1971. **178**: p. 277-299.
51. Beaulieu, J. M., et al., *Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms*. *New Phytologist*, 2008. **179**: p. 975-986.
52. Opazo, J. C., Soto-Gamboa M. S., and Fernandez M. J., *Cell size and basal metabolic rate in hummingbirds*. *Revista Chilena De Historia Natural*, 2005. **78**: p. 261-265.
53. Wyngaard, G. A., et al., *The relationship between genome size, development rate, and body size in copepods*. *Hydrobiologia*, 2005. **532**: p. 123-137.
54. Gregory, T. R., *A bird's-eye view of the C-value enigma: genome size, cell size, and metabolic rate in the class aves*. *Evolution*, 2002. **56**: p. 121-130.
55. Knight, C. A. and Ackerly D. D., *Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis*. *Ecology Letters*, 2002. **5**: p. 66-76.
56. Smith, E. and Gregory T., *Patterns of genome size diversity in the ray-finned fishes*. *Hydrobiologia*, 2009. **625**: p. 1-25.
57. Cavalier-Smith, T., *Economy, speed and size matter: Evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion*. *Annals of Botany*, 2005. **95**: p. 147-175.
58. Gregory, T. R. and Hebert P. D. N., *The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences*. *Genome Research*, 1999. **9**: p. 317-324.



59. Ghormade, V., et al., *Determination of ploidy of a dimorphic zygomycete Benjaminiella poitrasii and the occurrence of meiotic division during zygospore germination*. Journal of Agricultural Technology, 2005. **1**: p. 97-112.
60. Neumann, F. R. and Nurse P., *Nuclear size control in fission yeast*. The Journal of Cell Biology, 2007. **179**: p. 593-600.
61. Jorgensen, P., et al., *The size of the nucleus increases as yeast cells grow*. Molecular Biology of the Cell, 2007. **18**: p. 3523-3532.
62. Suzuki, T., et al., *Variance of ploidy in Candida albicans*. Journal of Bacteriology, 1982. **152**: p. 893-896.
63. Kuldau, G. A., Tsai H. F., and Schardl C. L., *Genome sizes of Epichloe species and anamorphic hybrids*. Mycologia, 1999. **91**: p. 776-782.
64. Moon, C. D., et al., *The evolutionary origins of three new Neotyphodium endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere*. Mycologia, 2002. **94**: p. 694-711.
65. Kausrud, H., Colman J. E., and Ryvarden L., *Relationship between basidiospore size, shape and life history characteristics: a comparison of polypores*. Fungal Ecology, 2008. **1**: p. 19-23.
66. Anonymus, *Robust Statistics in BD FACSDiva™ Software*. 2012: Becton, Dickinson & Company.
67. Doležel, J., Sgorbati S., and Lucretti S., *Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants*. Physiologia Plantarum, 1992. **85**: p. 625-631.
68. Kim, M. S., et al., *Characterization of North American Armillaria species: genetic relationships determined by ribosomal DNA sequences and AFLP markers*. Mycologia, 2000. **92**: p. 874-883.
69. Hosny, M., Gianinazzi-Pearson V., and Dulieu H., *Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales*. Genome, 1998. **41**: p. 422-428.
70. D'Hondt, L., et al., *Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status*. Molecular Plant Pathology, 2011. **12**: p. 815-828.
71. Greilhuber, J., Tensch E. M., and Loureiro J., *Nuclear DNA content measurement*, in *Flow Cytometry with Plant Cells*, J. Doležel, Greilhuber, J., and Suda, J., Editors. 2007, WILEY-VCH: Weinheim. p. 67-101.
72. Doležel, J. and Bartoš J., *Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size*. Annals of Botany, 2005. **95**: p. 99-110.
73. Doležel, J., Binarová P., and Lucretti S., *Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry*. Biologia Plantarum, 1989. **31**: p. 113-120.
74. Doležel, J. and Greilhuber J., *Nuclear genome size: Are we getting closer?* Cytometry Part A, 2010. **77A**: p. 635-642.

75. Doležal, J., Greilhuber J., and Suda J., *Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry*. Nature Protocols, 2007. **2**: p. 2233-2244.
76. Loureiro, J., et al., *Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species*. Annals of Botany, 2007. **100**: p. 875-888.
77. Loureiro, J., et al., *Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry*. Annals of Botany, 2006. **98**: p. 679-689.
78. Kron, P., Suda J., and Husband B. C., *Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2007. **38**: p. 847-876.
79. Suda, J. and Trávníček P., *Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research*. Cytometry Part A, 2006. **69A**: p. 273-280.
80. Haase, S. B. and Reed S. I., *Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle*. Cell Cycle, 2002. **1**: p. 132-136.
81. Almeida, A. J., et al., *New insights into the cell cycle profile of Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genetics and Biology, 2006. **43**: p. 401-409.
82. Kullman, B., *Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi*. Folia Cryptogamica Estonica, 2000. **36**: p. 31-46.
83. Dvorak, J. A., et al., *Flow cytometric analysis of the DNA synthetic cycle of Candida species*. Infection and Immunity, 1987. **55**: p. 1490-1497.
84. Sia, R. A., Lengeler K. B., and Heitman J., *Diploid strains of the pathogenic basidiomycete Cryptococcus neoformans are thermally dimorphic*. Fungal Genetics and Biology, 2000. **29**: p. 153-163.
85. Hutter, K. J. and Eipel H. E., *Simultaneous measurements of DNA and protein content of microorganisms by flow cytometry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1979. **6**: p. 223-231.
86. Gerstein, A., C., et al., *Genomic convergence toward diploidy in Saccharomyces cerevisiae*. Plos Genetics, 2006. **2**: p. 1396-1401.
87. Carr, J. and Shearer G., Jr., *Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus Histoplasma capsulatum*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**: p. 6697-6703.
88. Solieri, L., et al., *Genome size and ploidy level: new insights for elucidating relationships in Zygosaccharomyces species*. Fungal Genetics and Biology, 2008. **45**: p. 1582-1590.
89. Carlson, C. R., et al., *Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry*. Yeast, 1997. **13**: p. 1329-1335.

90. Gourmet, C., Gray L. E., and Rayburn A. L., *Flow cytometric analysis of conidia of fungi isolated from soybean vascular tissue*. Journal of Phytopathology, 1997. **145**: p. 405-408.
91. De Lucas, J. R., et al., *Use of flow-cytometry to distinguish between haploid and diploid strains of Aspergillus fumigatus*. Fungal Genetics Newsletter, 1998. **45**: p. 7-9.
92. Anonymus, *BD LSR II User's Guide. Part No. 64221 Rev A*. 2007: Becton, Dickinson & Company.
93. MacLeod and Aldaz, *DNA Content Protocol*.  
sciencepark.mdanderson.org/fcores/flow/files/dna\_pi.html, 2006.
94. Valášková, V. and Baldrian P., *Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus Piptoporus betulinus—production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases*. Microbiology, 2006. **152**: p. 3613-3622.
95. Pritsch, K., et al., *A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system*. Journal of Microbiological Methods, 2004. **58**: p. 233-241.
96. Šnajdr, J., et al., *Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes*. Enzyme and Microbial Technology, 2008. **43**: p. 186-192.
97. Baldrian, P., *Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis*. Plant, Soil, and the Environment, 2009. **55** p. 370-378
98. Atanasova, L. and Druzhinina I. S., *Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi*. Journal of Zhejiang University Science B, 2010. **11**: p. 151-168.
99. Druzhinina, I. S., et al., *Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of Hypocrea jecorina*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**: p. 2126-2133.
100. Kubicek, C. P., et al., *Genetic and metabolic diversity of Trichoderma: a case study on South-East Asian isolates*. Fungal Genetics and Biology, 2003. **38**: p. 310-319.
101. Preston-Mafham, J., Boddy L., and Randerson P. F., *Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique*. FEMS Microbiology Ecology, 2002. **42**: p. 1-14.
102. Garland, J. L., Mills A. L., and Young J. S., *Relative effectiveness of kinetic analysis vs single point readings for classifying environmental samples based on community-level physiological profiles (CLPP)*. Soil Biology and Biochemistry, 2001. **33**: p. 1059-1066.

103. Garland, J. L. and Mills A. L., *Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. **57**: p. 2351-2359.
104. Sobek, E. A. and Zak J. C., *The Soil FungiLog procedure: method and analytical approaches toward understanding fungal functional diversity*. Mycologia, 2003. **95**: p. 590-602.
105. Harch, B. D., et al., *Using the Gini coefficient with BIOLOG substrate utilisation data to provide an alternative quantitative measure for comparing bacterial soil communities*. Journal of Microbiological Methods, 1997. **30**: p. 91-101.
106. Buyer, J. S., et al., *Analysis of fungal communities by sole carbon source utilization profiles*. Journal of Microbiological Methods, 2001. **45**: p. 53-60.
107. Pietikäinen, J., Hiukka R., and Fritze H., *Does short-term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes?* Soil Biology and Biochemistry, 2000. **32**: p. 277-288.
108. Guckert, J. B., et al., *Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats*. Journal of Microbiological Methods, 1996. **27**: p. 183-197.
109. Garland, J. L., *Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization*. Soil Biology and Biochemistry, 1996. **28**: p. 213-221.
110. Dobranic, J. K. and Zak J. C., *A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity*. Mycologia, 1999. **91**: p. 756-765.
111. Pinzari, F., Cialei V., and Barbabietola N., *Measurement of the fungal deteriorating potential in the dust of indoor environments*. e-Preservation Science Journal, 2010. **7**: p. 29-34.
112. Grizzle, H. W. and Zak J. C., *A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity on nitrogen substrates*. Mycologia, 2006. **98**: p. 353-363.
113. Rice, A. V. and Currah R. S., *Profiles from Biolog FF plates and morphological characteristics support the recognition of *Oidiodendron fimicola* sp. nov.* Studies in Mycology, 2005. **53**: p. 75-82.
114. Friedl, M. A., Kubicek C. P., and Druzhinina I. S., *Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis**. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**: p. 245-250.
115. Duda, J. J., et al., *Differences in native soil ecology associated with invasion of the exotic annual chenopod, *Halogeton glomeratus**. Biology and Fertility of Soils, 2003. **38**: p. 72-77.
116. Talbot, N. J., Vincent P., and Wildman H. G., *The influence of genotype and environment on the physiological and metabolic diversity of *Fusarium compactum**. Fungal Genetics and Biology, 1996. **20**: p. 254-267.

117. Lajeunesse, T. C., et al., *Symbiodinium (Pyrrophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates*. Journal of Phycology, 2005. **41**: p. 880-886.
118. Kremp, A. and Parrow M. W., *Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, Scrippsiella hangoei*. Journal of Phycology, 2006. **42**: p. 400-409.
119. Pfosser, M., et al., *Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disornic and ditelosornic wheat-rye addition lines*. Cytometry, 1995. **21**: p. 387-393.
120. Otto, F., *Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis*, in *Flow Cytometry and Cell Sorting*, A. Radbruch, Editor. 1992, Springer-Verlag, Berlin. p. 101-104.
121. Jarret, R. L., et al., *DNA contents in Paspalum spp. determined by flow cytometry*. Genetic Resources and Crop Evolution, 1995. **42**: p. 237-242.
122. Goffeau, A., et al., *Life with 6000 genes*. Science, 1996. **274**: p. 546-567.
123. Pel, H. J., et al., *Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88*. Nature Biotechnology, 2007. **25**: p. 221-231.
124. Andersen, M. R., et al., *Comparative genomics of citric-acid-producing Aspergillus niger ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88*. Genome Research, 2011. **21**: p. 885-897.
125. Nierman, W. C., et al., *Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus Aspergillus fumigatus*. Nature, 2005. **438**: p. 1151-1156.
126. Fedorova, N. D., et al., *Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus Aspergillus fumigatus*. Plos Genetics, 2008. **4**: p. e1000046.
127. Vepsäläinen, M., et al., *Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment*. Soil Biology and Biochemistry, 2001. **33**: p. 1665-1672.
128. Bourbonnais, R. and Paice M. G., *Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation*. FEBS Letters, 1990. **267**: p. 99-102.
129. Ngo, T. T. and Lenhoff H. M., *A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions*. Analytical Biochemistry, 1980. **105**: p. 389-397.
130. Baldrian, P., et al., *Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil*. Plant Soil, 2011. **338**: p. 111-125.
131. Hammer, O., Harper D. A. T., and Ryan P. D., *PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis*. Palaeontologia Electronica, 2001. **4**: p. 1-9.
132. Lepš, J. and Šmilauer P., *Mnohorozměrná analýza ekologických dat*. 2000, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích: České Budějovice.
133. Price, H. J., Hodnett G., and Johnston J. S., *Sunflower (Helianthus annuus) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence*. Annals of Botany, 2000. **86**: p. 929-934.

134. Tylová, T., Kolařík M., and Olšovská J., *The UHPLC-DAD fingerprinting method for analysis of extracellular metabolites of fungi of the genus Geosmithia (Acomycota: Hypocreales)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**: p. 2943-2952.
135. Bainard, J. D., Fazekas A. J., and Newmaster S. G., *Methodology significantly affects genome size estimates: Quantitative evidence using bryophytes*. Cytometry Part A, 2010. **77A**: p. 725-732.
136. Nielsen, K. and Yohalem D. S., *Origin of a polyploid Botrytis pathogen through interspecific hybridization between Botrytis aclada and B. byssoidea*. Mycologia, 2001. **93**: p. 1064-1071.
137. Smith, E. M. and Gregory T. R., *Patterns of genome size diversity in the ray-finned fishes*. Hydrobiologia, 2009. **625**: p. 1-25.
138. Yeater, K. M., Grau C. R., and Rayburn A. L., *Flow cytometric analysis of Phialophora gregata isolated from soybean plants resistant and susceptible to brown stem rot*. Journal of Phytopathology, 2002. **150**: p. 258-262.
139. Eilam, T., Bushnell W. R., and Anikster Y., *Relative nuclear DNA content of rust fungi estimated by flow cytometry of propidium iodide-stained pycniospores*. Phytopathology, 1994. **84**: p. 728-734.
140. Almeida, A. J., et al., *Genome size and ploidy of Paracoccidioides brasiliensis reveals a haploid DNA content: flow cytometry and GP43 sequence analysis*. Fungal Genetics and Biology, 2007. **44**: p. 25-31.
141. Kim, M. S., et al., *Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific matings of Armillaria species*. Mycological Research, 2001. **105**: p. 153-163.
142. Goodwin, S. B., et al., *Finished genome of the fungal wheat pathogen Mycosphaerella graminicola reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis*. Plos Genetics, 2011. **7**: p. e1002070.
143. Ezov, T. K., et al., *Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast Saccharomyces cerevisiae from "Evolution Canyon": microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status*. Genetics, 2006. **174**: p. 1455-1468.
144. Bridge, P. D., et al., *Investigation of variation in phenotype and DNA content between single-conidium isolates of single Penicillium strains*. Journal of General Microbiology, 1987. **133**: p. 995-1004.
145. Kullman, B. *Diversity in the spore print of the hybrid of Lentinula and Pleurotus on the basis of nuclear DNA content*. in *Proceedings of the XVI Symposium of Mycologists and Lichenologists of Baltic State*. 2005. Cesis, Latvia.

146. Aguilera, G., et al., *Chapter 3 Genome evolution in plant pathogenic and symbiotic fungi*. Advances in Botanical Research, 2009. **49**: p. 151-193.
147. Zolan, M. E., *Chromosome-length polymorphism in fungi*. Microbiological Reviews, 1995. **59**: p. 686-698.
148. Soltis, D. E. and Soltis P. S., *Polyploidy: recurrent formation and genome evolution*. Trends in Ecology & Evolution, 1999. **14**: p. 348-352.
149. Dujon, B., et al., *Genome evolution in yeasts*. Nature, 2004. **430**: p. 35-44.
150. Goffeau, A., *Evolutionary genomics: seeing double*. Nature, 2004. **430**: p. 25-26.
151. Albertin, W. and Marullo P., *Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2012. **279**: p. 2497-2509.
152. Scannell, D. R., et al., *Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts*. Nature, 2006. **440**: p. 341-345.
153. Conant, G. C. and Wolfe K. H., *Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast*. Molecular Systems Biology, 2007. **3**: p. 1-12.
154. Talbot, N. and Wayman M., *Increase in ploidy in yeasts as a response to stressing media*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989. **32**: p. 167-169.
155. Maheshwari, R., *Nuclear behavior in fungal hyphae*. FEMS Microbiology Letters, 2005. **249**: p. 7-14.
156. Barow, M., *Endopolyploidy in seed plants*. BioEssays, 2006. **28**: p. 271-281.
157. Meerts, P., *The evolution of spore size in Agarics: Do big mushrooms have big pores?* Journal of Evolutionary Biology, 1999. **12**: p. 161-165.
158. Kauserud, H., et al., *Mushroom's spore size and time of fruiting are strongly related: is moisture important?* Biology Letters, 2011. **7**: p. 273-276.
159. Kelley, S. T. and Farrell B. D., *Is specialization a dead end? The phylogeny of host use in Dendroctonus bark beetles (Scolytidae)*. Evolution, 1998. **52**: p. 1731-1743.
160. Meerts, P., *Mineral nutrient concentrations in sapwood and heartwood: a literature review*. Annals of Forest Science, 2002. **59**: p. 713-722.
161. Baldrian, P. and Valášková V., *Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi*. FEMS Microbiology Reviews, 2008. **32**: p. 501-521.
162. Teeri, T. T., *Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases*. Trends in Biotechnology, 1997. **15**: p. 160-167.
163. Fägerstam, L. G. and Pettersson L. G., *The 1.4- $\beta$ -glucan cellobiohydrolases of Trichoderma reesei QM 9414: A new type of cellulolytic synergism*. FEBS Letters, 1980. **119**: p. 97-100.

164. Santiago, R., Barros-Rios J., and Malvar R. A., *Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**: p. 6960-6980.
165. Cosgrove, D. J., *Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1997. **13**: p. 171-201.
166. ten Have, R. and Teunissen P. J., *Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi*. Chemical Reviews-Columbus, 2001. **101**: p. 3397-3414.
167. Solomon, P. S., Waters O. D. C., and Oliver R. P., *Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi*. Trends in Microbiology, 2007. **15**: p. 257-262.
168. Talbot, N. J., *Having a blast: exploring the pathogenicity of Magnaporthe grisea*. Trends in Microbiology, 1995. **3**: p. 9-16.
169. Holligan, P. M., Chen C., and Lewis D. H., *Changes in the carbohydrate composition of leaves of Tussilago farfara during infection by Puccinia poarum*. New Phytologist, 1973. **72**: p. 947-955.
170. Wojtaszek, P., *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. Biochemical Journal, 1997. **322**: p. 681.
171. Sharma, A. and Satyanarayana T., *Microbial acid-stable  $\alpha$ -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications*. Process Biochemistry, 2013. **48**: p. 201-211.
172. Silva, A., et al., *Starch metabolism in Leucoagaricus gongylophorus, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants*. Microbiological Research, 2006. **161**: p. 299-303.
173. Schellart, J. A., et al., *Starch degradation by the mould Trichoderma viride I. The mechanism of starch degradation*. Antonie van Leeuwenhoek, 1976. **42**: p. 229-238.
174. Kaarik, A., *Growth and sporulation of Ophiostoma and some other blueing fungi on synthetic media*. Symbolae Botanicae Upsaliensis, 1960. **16**: 1-168.
175. Markham, P., et al., *Choline: Its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology*. FEMS Microbiology Letters, 1993. **104**: p. 287-300.
176. Mattson, W. J., *Herbivory in relation to plant nitrogen content*. Annual Review of Ecology and Systematics, 1980. **11**: p. 119-161.
177. Van Etten, J. L. and Gottlieb D., *Biochemical changes during the growth of fungi II. Ergosterol and fatty acids in Penicillium atrovenetum*. Journal of Bacteriology, 1965. **89**: p. 409-414.
178. Dey, P., Banerjee J., and Maiti M. K., *Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates Colletotrichum sp. and Alternaria sp. having potential utilities as biodiesel feedstock*. Bioresource Technology, 2011. **102**: p. 5815-5823.
179. Gottlieb, D., Molitoris H. P., and van Etten J. L., *Changes in fungi with age*. Archiv für Mikrobiologie, 1968. **61**: p. 394-398.



180. Shimp, J. L. and Kinsella J. E., *Lipids of Penicillium roqueforti. Influence of culture temperature and age on unsaturated fatty acids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977. **25**: p. 793-799.
181. Stahl, P. D. and Klug M. J., *Characterization and differentiation of filamentous fungi based on Fatty Acid composition*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. **62**: p. 4136-4146.
182. Yao, M., et al., *The ancient chemistry of avoiding risks of predation and disease*. Evolutionary Biology, 2009. **36**: p. 267-281.
183. Nijholt, W., *Pine oil and oleic acid delay and reduce attacks on logs by ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae)*. The Canadian Entomologist, 1980. **112**: p. 199-204.

# Přílohy

## P. 1 Substráty obsažené na FF a PM Biolog destičkách.

### FF MicroPlate™

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-D-Galactosamine	A4 N-Acetyl-D-Glucosamine	A5 N-Acetyl-D-Mannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 α-Cyclodextrin	B2 β-Cyclodextrin	B3 Dextrin	B4 D-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 α-D-Glucose
C1 Glucose-1-Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucuronic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 α-D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 α-Methyl-D-Galactoside	D6 β-Methyl-D-Galactoside	D7 α-Methyl-D-Glucoside	D8 β-Methyl-D-Glucoside	D9 Palatinose	D10 D- Psicose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turanose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 γ-Amino-butyric Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 β-Hydroxy-butyric Acid	F5 γ-Hydroxy-butyric Acid	F6 p-Hydroxyphenyl-acetic Acid	F7 α-Keto-glutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quinic Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebacic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L-Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Alanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Ornithine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyroglutamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Threonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Putrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5'-Monophosphate

### PM3B MicroPlate™ Nitrogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Ornithine
D-1 N-Acetyl-D,L-Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L-Glutamic Acid	D3 L-Pyroglutamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamine	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethylamine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D-Galactosamine	E10 D-Mannosamine	E11 N-Acetyl-D-Glucosamine	E12 N-Acetyl-D-Galactosamine
F1 N-Acetyl-D-Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N-Butyric Acid	G8 γ-Amino-N-Butyric Acid	G9 ε-Amino-N-Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino-Caprylic Acid	G11 δ-Amino-N-Valeric Acid	G12 α-Amino-N-Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

## PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sulfur Sources

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta-phosphate	A5 Tripoly-phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine- 2'-monophosphate	A9 Adenosine- 3'-monophosphate	A10 Adenosine- 5'-monophosphate	A11 Adenosine- 2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphate	B3 D,L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	B4 $\beta$ -Glycerol Phosphate	B5 Carbamyl Phosphate	B6 D-2-Phospho-Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho-Glyceric Acid	B8 Guanosine- 2'-monophosphate	B9 Guanosine- 3'-monophosphate	B10 Guanosine- 5'-monophosphate	B11 Guanosine- 2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho-Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1-Phosphate	C4 D-Glucose-6-Phosphate	C5 2-Deoxy-D-Glucose 6-Phosphate	C6 D-Glucosamine-6-Phosphate	C7 6-Phospho-Gluconic Acid	C8 Cytidine- 2'-monophosphate	C9 Cytidine- 3'-monophosphate	C10 Cytidine- 5'-monophosphate	C11 Cytidine- 2',3'-cyclic monophosphate	C12 Cytidine- 3',5'-cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1-Phosphate	D2 D-Mannose-6-Phosphate	D3 Cysteamine-S-Phosphate	D4 Phospho-L-Arginine	D5 O-Phospho-D-Serine	D6 O-Phospho-L-Serine	D7 O-Phospho-L-Threonine	D8 Uridine- 2'-monophosphate	D9 Uridine- 3'-monophosphate	D10 Uridine- 5'-monophosphate	D11 Uridine- 2',3'-cyclic monophosphate	D12 Uridine- 3',5'-cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D-Tyrosine	E2 O-Phospho-L-Tyrosine	E3 Phosphocreatine	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl-Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine- 3'-monophosphate	E10 Thymidine- 5'-monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphate	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteinyl-Glycine	F10 L-Cysteic Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfonic Acid
G1 N-Acetyl-L-Cysteine	G2 S-Methyl-L-Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L-Methionine	G10 N-Acetyl-D,L-Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio- $\beta$ -D-Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Taurocholic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaurine	H8 p-Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 2-Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

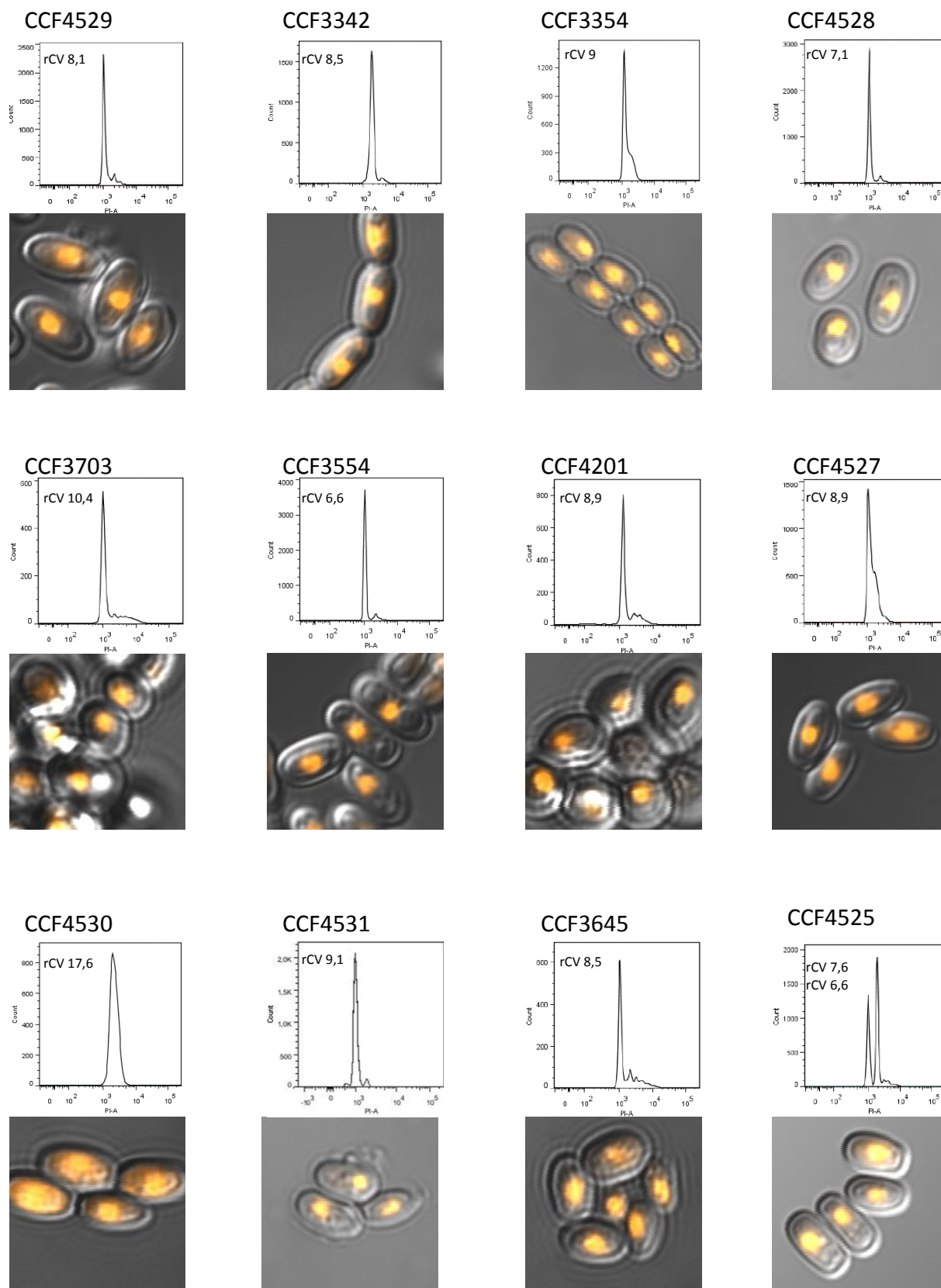
## PM5 MicroPlate™ Nutrient Supplements

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenine	A11 Adenosine	A12 2'-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L-Phenylalanine	B9 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanine	B11 Guanosine	B12 2'-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine + L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (5) 4-Amino-Imidazole-4(5)-Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2'-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Chorismic Acid	D4 (-)-Shikimic Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L- $\alpha$ , $\epsilon$ -Diamino-pimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2'-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 $\beta$ -Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Orotic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2'-Deoxy Uridine
F1 Quinolinic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide	F5 $\delta$ -Amino-Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Deferoxamine Mesylate	F8 D-(+)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyano-Cobalamin	G4 $p$ -Amino-Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyrolo-Quinoline Quinone	G11 Menadione	G12 Myo-Inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L- $\alpha$ -Hydroxy-Butyric Acid	H3 $\alpha$ -Ketobutyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L- $\alpha$ -Lipoic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevalonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80

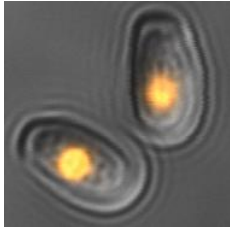
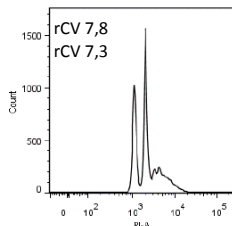
**P. 2. Rozdělení substrátů FF do gild podle Dobranic et Zak [110].**

Carbohydrates	Carboxylic acids	Amino acids	Amines/Amides	Polymers	Miscellaneous
Adonitol	acetic acid	D,L-carnitine	2-amino ethanol	α-cyclodextrin	2,3-butanediol
α-D-glucose	α-hydroxybutyric acid	D-alanine	alaninamide	dextrin	bromo-succinic acid
α-D-lactose	α-keto butyric acid	D-serine	glucuronamide	glycogen	D,L-α-glycerol phosphate
β-methyl-D-glucoside	α-keto glutaric acid	γ-aminobutyric acid	phenyl-ethylamine	tween 40	glucose-1-phosphate
cellobiose	α-keto valeric acid	glycyl-L-aspartic acid	putrescine	tween 80	glucose-6-phosphate
D-arabitol	β-hydroxybutyric acid	glycyl-L-glutamic acid	succinamic acid		glycerol
D-fructose	cis-aconitic acid	hydroxy-L-proline			inosine
D-galactose	citric acid	L-alanine			thymidine
D-mannitol	D,L-lactic acid	L-alanyl-glycine			uridine
D-mannose	D-galactonic acid lactone	L-asparagine			urocanic acid
D-melibiose	D-galacturonic acid	L-aspartic acid			
D-psicose	D-gluconic acid	L-glutamic acid			
D-raffinose	D-glucosaminic acid	L-histidine			
D-sorbitol	D-glucuronic acid	L-leucine			
D-trehalose	D-saccharide acid	L-ornithine			
gentiobiose	formic acid	L-phenylalanine			
i-erythritol	γ-hydroxybutyric acid	L-proline			
L-arabinose	itaconic acid	L-pyroglutamic acid			
L-fucose	malonic acid	L-serine			
L-rhamnose	p-hydroxy-phenylacetic acid	L-threonine			
lactulose	propionic acid				
m-inositol	quinic acid				
maltose	sebacic acid				
methyl pyruvate	succinic acid				
mono-methyl succinate					
N-acetyl-D-galactosamine					
N-acetyl-D-glucosamine					
sucrose					
turanose					
xylitol					

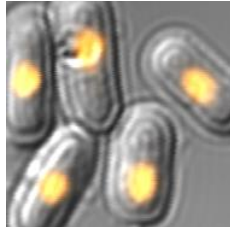
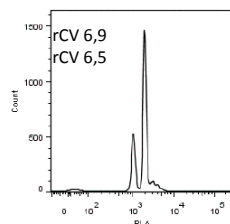
**P. 3 Příkladů PI histogramů a lokalizace PI do jádra u *Geosmithia* spp.**



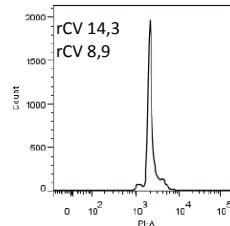
CCF4294



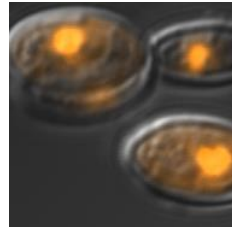
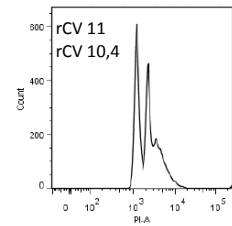
CCF4223



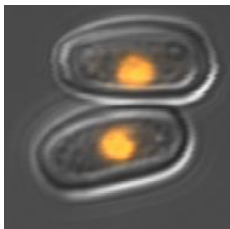
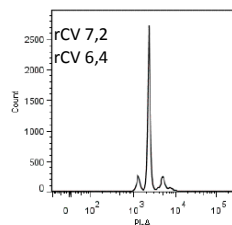
CCF4206



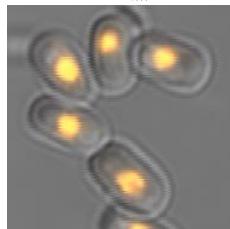
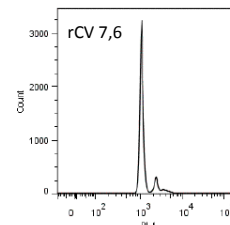
CCF4292



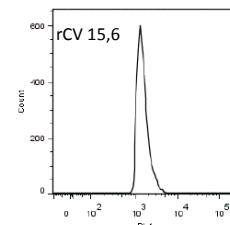
CCF4526



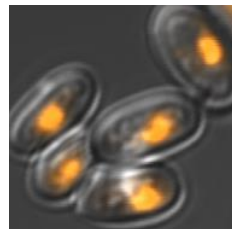
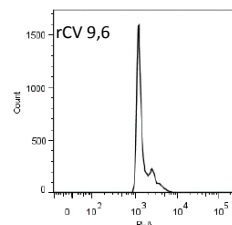
CCF4205



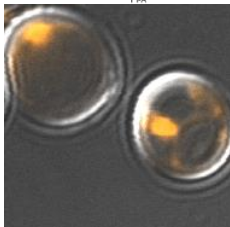
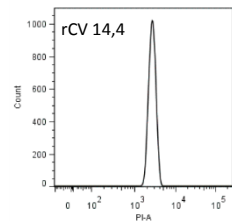
CCF4200



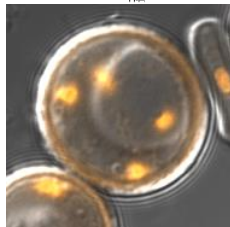
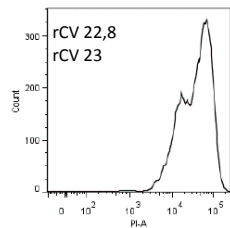
CCF4207



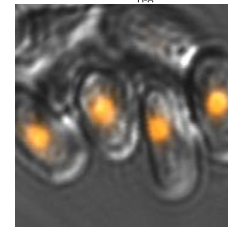
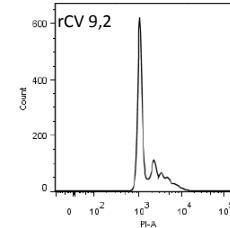
CCF3861



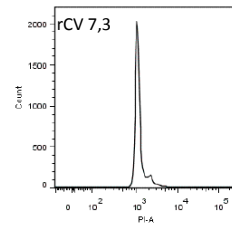
CCF3754



CCF3879



CCF4524



**P. 4A Aktivita extracelulárních enzymů.**

Kmeny <i>Geosmithia</i>	Aktivita extracelulárních enzymů mU/g									
	G	aG	C	X	N	S	P	A	L	PP
CCF4529	2,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	11,8 ± 1,6	11,9 ± 0,8	5,8 ± 0,5	8,4 ± 1,5	4,6 ± 1,1	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3342	2,4 ± 0,4	0,3 ± 0,0	16,5 ± 0,5	8,8 ± 0,1	7,1 ± 0,5	1,5 ± 0,7	5,0 ± 0,5	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3354	5,3 ± 0,6	0,3 ± 0,1	10,6 ± 0,5	5,6 ± 0,3	7,0 ± 0,3	2,3 ± 1,4	13,5 ± 0,4	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4528	6,4 ± 0,6	0,2 ± 0,0	9,4 ± 0,7	12,2 ± 0,9	7,7 ± 0,4	9,8 ± 0,6	13,4 ± 0,5	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4207	2,2 ± 0,3	0,4 ± 0,0	9,2 ± 0,9	13,1 ± 0,6	6,1 ± 0,2	13,1 ± 0,5	9,7 ± 0,2	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3703	12,2 ± 0,3	0,4 ± 0,0	12,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1	7,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	11,1 ± 0,8	0,0	0,5 ± 0,2	1,8 ± 0,0
CCF4201	11,6 ± 0,3	0,3 ± 0,1	10,9 ± 1,5	9,2 ± 0,4	6,5 ± 0,6	4,8 ± 1,0	13,3 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1
CCF4527	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1	10,1 ± 0,6	14,8 ± 0,6	1,2 ± 0,0	3,7 ± 0,9	15,0 ± 0,5	0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0
CCF4530	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,3	8,4 ± 1,2	14,1 ± 1,2	6,9 ± 0,3	4,1 ± 0,5	13,8 ± 0,2	0,0	0,0	0,2 ± 0,0
CCF3645	0,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1	11,8 ± 0,4	13,5 ± 0,8	6,7 ± 0,5	3,2 ± 1,9	14,4 ± 0,4	0,0	0,0	0,0
CCF4525	10,0 ± 2,3	0,0	2,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	3,7 ± 0,2	6,3 ± 0,8	2,6 ± 0,1	0,0	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1
CCF4205	7,4 ± 2,4	0,1 ± 0,0	2,5 ± 1,9	1,0 ± 0,5	3,9 ± 1,0	1,8 ± 0,7	4,1 ± 1,9	0,0	0,0	0,3 ± 0,1
CCF4223	3,2 ± 0,7	0,1 ± 0,1	12,6 ± 0,7	9,5 ± 1,7	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,8	14,1 ± 0,7	0,0	0,0	2,4 ± 0,2
CCF4206	7,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	16,2 ± 0,2	7,1 ± 0,3	7,0 ± 0,1	3,7 ± 1,9	13,3 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,1	2,8 ± 0,4
CCF4526	5,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0	14,0 ± 1,3	11,2 ± 2,4	6,7 ± 0,3	3,3 ± 0,5	13,1 ± 0,7	0,0	0,0	0,8 ± 0,1
CCF3861	5,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1	16,4 ± 0,5	9,8 ± 0,4	7,0 ± 0,2	12,1 ± 0,3	12,4 ± 0,6	0,0	0,0	0,3 ± 0,0
CCF3754	8,4 ± 0,9	0,1 ± 0,0	13,4 ± 0,9	3,0 ± 0,5	3,2 ± 1,1	3,7 ± 0,7	13,6 ± 0,3	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
U173	10,3 ± 0,3	0,3 ± 0,0	8,2 ± 0,5	3,6 ± 0,3	6,6 ± 0,2	2,5 ± 0,2	11,9 ± 0,7	0,0	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,0
CCF3879	9,1 ± 0,6	0,4 ± 0,0	9,2 ± 0,4	4,1 ± 0,2	6,9 ± 0,3	1,8 ± 0,1	8,8 ± 2,6	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
1259	11,7 ± 0,2	0,4 ± 0,0	7,8 ± 1,7	2,4 ± 0,2	6,5 ± 0,3	3,8 ± 1,6	14,4 ± 0,2	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4524	11,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	17,4 ± 0,2	0,9 ± 0,0	7,1 ± 0,2	4,5 ± 0,3	7,9 ± 0,9	0,1 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3554	3,3 ± 0,6	0,8 ± 0,1	6,3 ± 1,2	10,4 ± 0,7	6,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	15,3 ± 0,7	0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4200	4,3 ± 0,4	0,3 ± 0,0	11,3 ± 0,4	11,7 ± 0,4	7,4 ± 0,2	9,5 ± 0,4	9,0 ± 1,6	0,0	0,0	0,3 ± 0,0
CCF4292	5,7 ± 0,7	0,2 ± 0,0	14,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3	7,1 ± 0,2	8,9 ± 0,9	10,3 ± 0,4	0,0	0,0	0,1 ± 0,0

G – β-glukosidasa, aG – α-glukosidasa, C – celobiohydrolasa, X – β-xylosidasa, N – N-acetylglukosaminidasa, S – arylsulfatasa, P – fosfomonoesterasa, A – alanin aminopeptidasa, L – leucin aminopeptidasa, PP – fosfodiesterasa.

**P. 4B Aktivita extracelulárních enzymů.**

Kmeny <i>Geosmithia</i>	Aktivita extracelulárních enzymů mU/g					
	Ox	MIP	MnP	Lac	EG	EX
CCF4529	0,9 ± 0,1	0,0	0,8 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0,2 ± 0,2
CCF3342	1,7 ± 0,01	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,0	1,2 ± 0,9	8,4 ± 0,9
CCF3354	1,5 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	11,3 ± 2,1	6,5 ± 2,2
CCF4528	2,2 ± 0,6	0,0	0,6 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,0	1,5 ± 0,1
CCF4207	2,5 ± 0,4	0,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,3	2,0 ± 0,9
CCF3703	4,7 ± 1,8	0,0	0,5 ± 0,1	4,8 ± 0,1	1,6 ± 0,0	2,4 ± 0,3
CCF4201	5,3 ± 0,6	0,0	0,0	10,1 ± 3,1	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,0
CCF4527	0,9 ± 0,2	0,0	1,5 ± 2,4	0,0	0,9 ± 0,3	11,0 ± 1,6
CCF4530	0,9 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,0	6,0 ± 3,0	5,2 ± 0,2
CCF3645	3,6 ± 0,4	0,0	0,0	4,1 ± 0,5	2,3 ± 0,4	7,4 ± 1,7
CCF4525	1,9 ± 0,3	0,0	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,0	0,5 ± 0,3
CCF4205	2,1 ± 0,7	0,0	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3	0,0	0,2 ± 0,2
CCF4223	11,2 ± 0,9	0,0	1,9 ± 0,6	14,4 ± 1,2	0,6 ± 0,4	0,9 ± 0,5
CCF4206	1,9 ± 0,1	0,0	0,4 ± 0,9	0,0	0,9 ± 0,9	2,0 ± 0,2
CCF4526	11,2 ± 4,0	0,0	0,0	10,9 ± 1	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,2
CCF3861	16,0 ± 1,0	0,0	1,7 ± 0,4	24,3 ± 1,4	0,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2
CCF3754	1,6 ± 0,6	0,0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,0	16,7 ± 1,5
U173	2,5 ± 0,2	0,0	0,0	1,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	11,0 ± 1,5
CCF3879	3,2 ± 0,3	0,0	0,7 ± 0,1	4,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	12,2 ± 1,7
1259	2,5 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	3,4 ± 0,7	3,5 ± 1,6	17,4 ± 2,3
CCF4524	1,7 ± 0,1	0,0	0,3 ± 0,3	0,0	0,7 ± 0,5	0,4 ± 0,2
CCF3554	1,8 ± 0,2	0,0	0,2 ± 0,1	0,0	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,3
CCF4200	1,4 ±	0,0	0,3	0,0	2,9 ± 1,4	2,8 ± 1,7
CCF4292	1,7 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,0	0,0	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1

Ox – oxidasy, MIP – Mn-nezávislé peroxidasy, MnP – Mn-peroxidasy, Lac – lakasa, EG – endoglukanasa, EX – endoxylanasa.



**P. 5 Hodnoty substrátové aktivity (SA), bohatosti (SR), Shannonova indexu diverzity (Sh) a Gini koeficientu (Gini) a párové porovnání skupin.**

		FF				PM3B			PM4A			PM5		
		SA	SR	Sh	Gini	SA	SR	Sh	SA	SR	Sh	SA	SR	Sh
Generalisti	Min.	9,1	35	4,0	0,43	5,5	26	3,8	0,7	21	3,0	0,05	2	1,3
	Med.	16,2	53	4,1	0,48	13,7	49	4,0	8,0	81	4,2	1,1	15	2,4
	Max.	25,5	63	4,2	0,57	20,2	60	4,2	12,1	88	4,6	3,7	31	3,0
Specialisti na Pinaceae	Min.	2,9	8	3,7	0,51	1,8	4	3,1	1,1	21	2,8	0,7	8	1,4
	Med.	7,7	29	3,9	0,58	3,2	11	3,7	2,6	48	3,8	0,8	10	2,6
	Max.	9,5	38	4,1	0,68	7,0	31	3,8	5,7	71	3,9	1,4	19	3,7
Ambrosiové houby	Min.	9,8	43	4,0	0,45	8,9	36	3,8	1,9	30	3,2	1,0	23	3,0
	Med.	11,6	43	4,0	0,45	14,9	51	3,9	6,4	60	3,9	2,8	31	3,5
	Max.	11,7	47	4,2	0,55	15,5	48	4,1	7,4	63	4,0	10,1	70	4,0
Patogen	Min.	7,3	22	3,7	0,51	3,3	9	3,8	3,7	59	4,0	0,4	6	2,5
	Med.	7,5	30	3,9	0,56	5,1	24	3,8	4,5	61	4,0	0,8	12	2,8
	Max.	7,7	32	4,0	0,59	5,3	25	3,9	5,0	63	4,0	1,7	18	2,9

U ambrosiových druhů a patogenu jsou pro celkovou představu v tabulce uvedeny přímo hodnoty zjištěné pro jednotlivé druhy/kmeny.

SR: FF

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SR:PM3B

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SR: PM4A

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SR: PM5

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SA: FF

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SA: PM3B

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

SA:PM4A

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

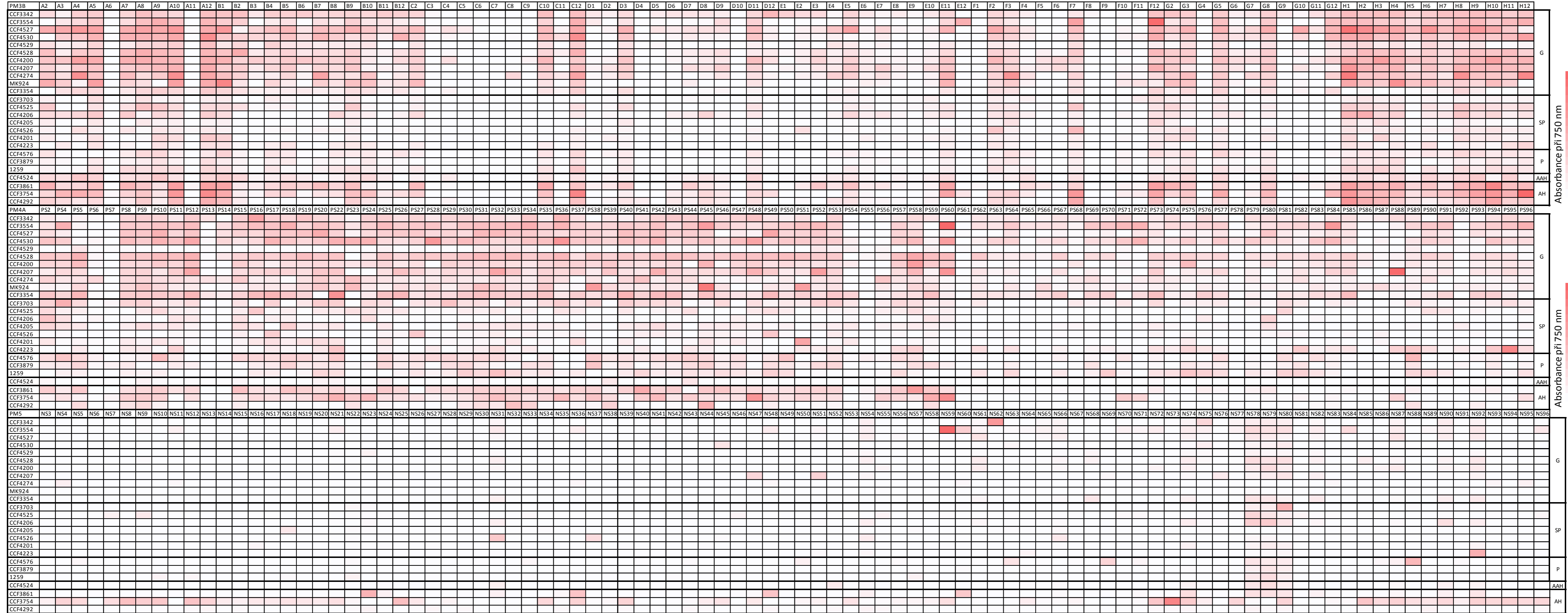
SA:PM5

	G	SP	P	AH
G	-	*	*	*
SP	*	-	*	*
P	*	*	-	*
AH	*	*	*	-

Červeně jsou značené signifikantní rozdíly,  $p < 0,05$ . Horní triangl představuje porovnání M-W, spodní porovnání s BC.



P. 6 Růst kmenů na destičkách FF a PM.



G - generalisti, S - *G. pallida* sp. 5, GI - *G. langdoni*, SP - specialisti na Pinaceae, P - patogen, AAH - auxiliárně ambrosiová houba, AH - ambrosiová houba



**P. 8 Procentuální zastoupení lipidů a ergosterolu v sušině.**

Kmeny	14:0	15:0	16:1w9	16:1w7	16:0	17:1	17:0	18:2w6,9	18:1w9	18:1w7	18:0	20:5	20:5
CCF4529	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1	19,7 ± 1,8	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	29,1 ± 3,0	39,0 ± 6,6	0,3 ± 0,1	5,2 ± 0,5	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
CCF3342	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	20,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	27,5 ± 0,9	34,7 ± 0,4	0,0	6,7 ± 0,6	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3354	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	11,1 ± 5,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	32,8 ± 3,4	44,1 ± 4,5	0,2 ± 0,0	4,8 ± 0,3	0,0	0,0
CCF4277	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	21,1 ± 1,5	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,5	17,5 ± 3,1	42,8 ± 1,5	0,1 ± 0,1	8,1 ± 0,8	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
CCF4528	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,6 ± 0,1	16,0 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	8,1 ± 0,9	49,3 ± 0,9	0,7 ± 0,0	2,9 ± 0,1	0,0	0,0
CCF4207	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	25,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	14,8 ± 4,1	44,6 ± 7,0	0,2 ± 0,0	6,9 ± 2,1	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3703	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	21,8 ± 0,6	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	28,3 ± 0,7	31,1 ± 1,1	0,5 ± 0,0	6,4 ± 0,2	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3560	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	20,9 ± 1,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	23,9 ± 3,6	35,3 ± 4,3	0,0 ± 0,0	7,8 ± 0,8	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
CCF4201	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,0	13,1 ± 0,2	0,0	0,1 ± 0,0	42,7 ± 0,5	30,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	6,4 ± 0,0	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4527	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	28,1 ± 0,3	0,0	0,1 ± 0,0	16,3 ± 0,2	32,5 ± 0,9	0,1 ± 0,1	8,2 ± 0,3	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4530	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	21,8 ± 0,8	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	25,3 ± 0,3	29,8 ± 0,3	0,0	10,9 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,0
CCF3645	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	28,7 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	22,6 ± 1,0	31,9 ± 1,4	0,1 ± 0,0	7,9 ± 0,5	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4525	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0	6,6 ± 0,7	22,3 ± 3,3	1,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1	26,6 ± 4,9	34,0 ± 4,0	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,7	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0
CCF4294	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3,7 ± 1,1	22,2 ± 4,4	0,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	29,2 ± 8,0	34,9 ± 2,5	1,5 ± 0,2	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
CCF4205	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	17,8 ± 4,3	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	24,4 ± 12,1	38,5 ± 3,1	0,4 ± 0,1	9,7 ± 4,3	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
CCF4223	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	22,7 ± 5,4	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	35,7 ± 7,0	26,5 ± 6,5	0,3 ± 0,0	6,5 ± 0,5	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0
CCF4314	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2	20,7 ± 0,5	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	25,3 ± 11,2	42,4 ± 11,2	0,4 ± 0,2	3,7 ± 0,7	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0
CCF4206	0,2 ± 0,0	0,0	0,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	22,0 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,0	29,3 ± 0,8	30,7 ± 1,0	0,7 ± 0,0	4,9 ± 0,3	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4526	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	17,3 ± 1,8	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	45,8 ± 5,6	21,5 ± 6,8	0,1 ± 0,1	7,6 ± 0,8	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
CCF3861	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	26,5 ± 0,9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	9,9 ± 5,4	44,3 ± 6,1	0,1 ± 0,0	11,7 ± 2,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
CCF3754	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,2	24,7 ± 0,8	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	11,0 ± 15,0	46,4 ± 12,7	0,4 ± 0,2	10,8 ± 1,9	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
CCF3879	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1	20,5 ± 2,3	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	34,2 ± 10,7	28,8 ± 2,2	0,2 ± 0,1	6,9 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,0
1259	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0	20,5 ± 1,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	27,8 ± 1,7	32,0 ± 0,6	0,4 ± 0,0	5,5 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
CCF4576	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	21,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0	34,3 ± 0,8	26,4 ± 0,5	0,3 ± 0,0	5,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
CCF4524	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,1	18,9 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	31,2 ± 5,4	37,3 ± 5,9	0,2 ± 0,2	8,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,0
CCF3752	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0	0,5 ± 0,0	22,0 ± 0,6	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	28,0 ± 1,0	32,4 ± 0,9	0,1 ± 0,1	10,2 ± 0,2	0,0	0,0
CCF3554	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,0 ± 0,2	24,7 ± 0,8	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	26,5 ± 1,0	33,6 ± 0,8	0,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,1
CCF4200	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,1	24,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	15,5 ± 1,7	44,1 ± 6,4	0,2 ± 0,1	7,5 ± 0,2	0,0	0,1 ± 0,0
CCF4290	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,2	21,1 ± 1,8	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,0	18,3 ± 0,6	47,8 ± 8,8	0,1 ± 0,1	6,3 ± 2,3	0,0	0,0
CCF4289	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,7	27,0 ± 1,5	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	17,0 ± 6,5	42,6 ± 4,1	0,6 ± 0,3	7,1 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
CCF4292	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	22,4 ± 2,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	16,6 ± 11,7	44,1 ± 10,5	0,3 ± 0,3	10,5 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0

Kmeny	20:5w3,6, 9,12,15	20:3	20:4	20:2w6,9	20:1w9 - 20:1w7	20:0	21:1	22:0	23:0	24:0	%lip	E11	E2
CCF4529	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,2	1,4 ± 2,2	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,0	0,8 ± 0,1	16,2 ± 10,5	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1
CCF3342	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	6,7 ± 0,4	0,5 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	10,0 ± 0,6	0,5 ± 0,0	-
CCF3354	0,0	0,1 ± 0,2	1,8 ± 3,1	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,0	1,0 ± 0,1	10,4 ± 1,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
CCF4277	0,1 ± 0,1	1,2 ± 0,5	3,6 ± 6,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,2	8,1 ± 4,8	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,3
CCF4528	0,0	0,6 ± 0,1	17,8 ± 1,9	1,0 ± 0,0	0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	9,6 ± 0,4	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
CCF4207	0,0	0,7 ± 0,3	3,3 ± 5,7	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,0	0,7 ± 0,2	7,9 ± 0,5	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
CCF3703	0,0	0,7 ± 0,1	6,9 ± 0,8	0,5 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0	1,4 ± 0,1	14,6 ± 2,9	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
CCF3560	0,0	0,5 ± 0,1	6,7 ± 5,7	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,3	10,7 ± 1,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1
CCF4201	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0	5,0 ± 0,2	0,9 ± 0,0	0,0	0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,0	12,1 ± 0,6	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
CCF4527	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	11,3 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0	0,5 ± 0,1	11,1 ± 0,6	0,5 ± 0,0	-
CCF4530	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	8,9 ± 0,9	0,6 ± 0,1	0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,0	0,4 ± 0,1	9,7 ± 0,6	0,3 ± 0,0	-
CCF3645	0,0	0,2 ± 0,0	5,4 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0	0,7 ± 0,0	10,2 ± 0,5	0,5 ± 0,0	-
CCF4525	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,9 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,1	0,0	0,0	0,6 ± 0,4	6,7 ± 2,4	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,2
CCF4294	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,5	1,3 ± 2,1	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0	0,0	0,1 ± 0,1	6,5 ± 2,6	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,0
CCF4205	0,2 ± 0,2	1,3 ± 0,8	1,5 ± 2,3	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,9	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,1	6,9 ± 4,5	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
CCF4223	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,7	3,7 ± 6,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,0	0,4 ± 0,1	5,0 ± 4,0	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,2
CCF4314	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4	1,6 ± 2,3	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0	0,4 ± 0,1	7,1 ± 2,2	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1
CCF4206	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	9,5 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,0	8,8 ± 1,6	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,0
CCF4526	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,4	3,0 ± 2,7	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,0	0,5 ± 0,1	8,7 ± 2,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0
CCF3861	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,2	2,9 ± 4,8	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	13,0 ± 7,3	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
CCF3754	0,1 ± 0,1	1,3 ± 0,7	1,1 ± 1,8	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	9,8 ± 2,3	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
CCF3879	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,7	4,1 ± 6,9	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,0	1,6 ± 0,6	8,7 ± 1,9	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
1259	0,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1	7,8 ± 1,1	0,5 ± 0,1	0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0	0,9 ± 0,1	10,6 ± 1,4	0,4 ± 0,1	-
CCF4576	0,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1	5,9 ± 0,6	0,4 ± 0,0	0,0	0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,0	1,4 ± 0,0	12,3 ± 1,6	0,5 ± 0,1	-
CCF4524	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,8	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	8,3 ± 7,7	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
CCF3752	0,0	0,3 ± 0,0	4,0 ± 1,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0	13,4 ± 0,6	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
CCF3554	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	6,3 ± 1,5	0,4 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	12,5 ± 0,3	0,7 ± 0,1	-
CCF4200	0,1 ± 0,0	0,8 ± 0,2	3,4 ± 5,8	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,2	7,1 ± 0,8	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0
CCF4290	0,0	0,3 ± 0,2	2,6 ± 4,5	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,1	10,1 ± 1,6	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0
CCF4289	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,3	0,9 ± 1,3	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0	0,5 ± 0,4	9,4 ± 6,1	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1
CCF4292	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,4 ± 2,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,2	7,5 ± 1,6	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0

E11 – ergosterol z mycelia starého 11 dní, E2 – ergosterol z mycelia starého 2 dny, - chybějící údaj