

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NBOTA



Bc. Celie Korittová

Molekulární fylogeneze rodu *Geosmithia*
Molecular phylogeny of the genus *Geosmithia*

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 6. 5. 2013

Podpis

Obsah

Obsah	0
Abstrakt	1
Abstract.....	2
Úvod	3
Literární přehled	4
Co je známo o rodu <i>Geosmithia</i>	4
Význam molekulárních znaků pro systematiku a identifikaci hub	7
DNA barcoding.....	8
Geny využívané pro fylogenetiku a barcoding.....	9
<i>Cox1</i>	9
Ribosomální RNA	10
<i>RPB1</i> a <i>RPB2</i>	11
Další geny kódující proteiny	13
Metodika.....	16
Studované vzorky	16
Amplifikace pomocí PCR a sekvenace	21
Zpracování sekvencí.....	23
Výsledky.....	25
Výběr genů	25
Barcoding druhového komplexu 8, 36, 37 a 38.....	26
Fylogenetická analýza	26
Diskuse	33
Úspěšnost PCR a možnosti barcodingu.....	33
Vhodnost použitých lokusů pro fylogenezi rodu.....	34
Fylogeneze rodu <i>Geosmithia</i>	34
Poděkování	36
Literatura	37

Abstrakt

Rod *Geosmithia* zahrnuje 11 popsanych a několik desítek dosud nepopsanych druhů hub, které se vyskytují téměř výhradně v požercích podkorního hmyzu (zejména kůrovců). V rámci předkládané diplomové práce byla provedena fylogenetická analýza na základě sekvencí čtyř genů kódujících proteiny, konkrétně *TEF-1 α* , *RPB2*, *Mcm7* a *Tsr1*.

Tato analýza potvrdila, že ekologické strategie geosmithií (tzn. vazba na listnáče či jehličnany a adaptace na symbiózu s ambrosiovými brouky) se vyvinuly několikrát opakovaně.

Na základě získaného fylogenetického stromu jsem rozlišila 51 druhů (ve smyslu „Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition“).

Dále jsem testovala schopnost těchto genů sloužit jako „barcode“ pro identifikaci blízké příbuzných druhů geosmithií.

Klíčová slova: *Geosmithia*, *TEF-1 α* , *RPB2*, *Mcm7*, *Tsr1*, identifikace druhů

Abstract

The genus *Geosmithia* contains 11 described and several tens of undescribed species of fungi living nearly exclusively in galleries of subcorticolous insects, especially bark beetles.

In this work, a phylogenetic analysis of the genus was made using DNA sequences of four protein-coding genes, namely *TEF-1 α* , *RPB2*, *Mcm7* and *Tsr1*.

The analysis has confirmed that ecological strategies of these fungi (such as association with conifers or broad leaved trees or symbiosis with ambrosia beetles) have evolved several times in this genus.

51 species are recognized based on the obtained phylogenetic tree according to Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition.

I have also tested utility of the above mentioned genes to serve as "barcode" for identification of closely related *Geosmithia* species.

Key words: *Geosmithia*, *TEF-1 α* , *RPB2*, *Mcm7*, *Tsr1*, species identification

Úvod

Houby rodu *Geosmithia* žijí téměř výhradně v požercích podkorního hmyzu (zejména kůrovců) v širokém spektru hostitelských dřevin, které zahrnuje jak listnaté tak i jehličnaté druhy. Zatímco většina druhů je asociovaná s floemofágním hmyzem, některé druhy se adaptovaly na symbiózu s tzv. ambrosiovými brouky, kteří žijí v nutričně chudém dřevě a živiny získávají právě prostřednictvím symbiotické houby. Mezi saprotrofními geosmithiemi je atypická *Geosmithia morbida*, která je patogenem ořešáků.

Díky této ekologické diverzitě mezi blízkce příbuznými houbami může být rod *Geosmithia* vhodným modelovým systémem pro studium evolučních adaptací. Pro správnou interpretaci těchto adaptací je ovšem třeba znát příbuzenské vztahy mezi geosmithiemi.

Vzhledem k nedostatku morfologických odlišností mezi druhy je třeba k jejich určování využívat molekulární metody. Bohužel, jak ukazuje příklad sesterských druhů OTU 8 a OTU 38, molekulární marker *ITS* standardně používaný pro molekulární identifikaci hub není dostatečně variabilní pro odlišení druhů rodu *Geosmithia*.

Cíle mé diplomové práce byly:

- Otestovat co největší množství genů z hlediska jejich využitelnosti pro DNA barcoding na příkladu komplexu druhů OTU 8, OTU 36, OTU 37 a OTU 38.
- Vybrat geny vhodné pro rekonstrukci fylogeneze rodu.
- Získat sekvence čtyř genů u zástupců všech známých druhů rodu *Geosmithia* a na jejich základě rekonstruovat fylogenezi rodu.
- Stanovit mezidruhové hranice podle „Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition“ (Taylor *et al.*, 2000).

Literární přehled

Co je známo o rodu *Geosmithia*

Rod *Geosmithia* byl vyčleněn z rodu *Penicillium* na základě souboru tří znaků:

- jiná barva kolonie než šedomodrá nebo šedozeleň,
- drsný povrch konidioforů
- a válcovitý tvar fialid i konidií (Pitt, 1979).

Pozdější molekulární analýza ale ukázala, že takto vymezený rod je polyfyletický a obsahuje zástupce ze dvou různých řádů. Druh *Geosmithia putterillii* a typový druh rodu *G. lavendula* byly zařazeny do řádu Hypocreales, ostatní tehdy známé druhy do řádu Eurotiales, čili do příbuznosti původního rodu *Penicillium* (Ogawa *et al.*, 1997). Přesto bohužel zůstávalo jméno *Geosmithia* dlouhou dobu platným i pro eurotiální zástupce a mnohdy je v tomto smyslu používáno dodnes (Machouart *et al.*, 2011, De Ravin *et al.*, 2011, Giraud *et al.*, 2010, Sohn *et al.*, 2013), což může vést k zavádějícím interpretacím (Bastian *et al.*, 2009). V posledních letech je postupně sjednávána náprava. Pro *G. argillacea*, *G. eburnea*, *G. emersonii*, *G. cylindrospora* a další dva druhy termotolerantních až termofilních hub byl vytyčen rod *Rasamsonia* (Houbraken *et al.*, 2012). *G. viridis* a *G. swiftii* byly převedeny do rodu *Talaromyces s.str.* (Samson *et al.*, 2011, Houbraken *et al.*, 2011) a *G. namyslowskii* a *G. malachiteum* patří do rodu *Penicillium s.str.* (Houbraken *et al.*, 2011).

Hypokreální zástupci, čili rod *Geosmithia sensu stricto*, jsou považovány za houby anamorfní (tj. rozmnožující se nepohlavně, klonálně). Teleomorfní (pohlavní) stadium u nich nebylo nikdy pozorováno (Kolařík *et al.*, 2004, Kolařík *viva voce*, 2013, Dudová *viva voce*). Klonální povaze geosmithií nasvědčují také výsledky populační studie červenospořých geosmithií ze Středomoří (Kostovčík, 2006).

Molekulární studie řádu Hypocreales ukázaly, že geosmithie náleží do čeledi Bionectriaceae, konkrétně do slabě podpořené větve obsahující rody buď anamorfní nebo s plodnicemi typu kleistothecium (na rozdíl od většiny zástupců čeledi Bionectriaceae, kteří mají plodnice peritheciální). Za sesterský taxon rodu *Geosmithia* byl považován druh *Acremonium alternatum* (Ogawa *et al.*, 1997, Rossman *et al.*, 2001), novější studie s větším počtem zastoupených druhů rodu *Acremonium* přisuzuje toto postavení druhu *Acremonium sclerotigenum* (Summerbell *et al.*, 2011). Nelze ovšem obecně říci, že sesterským rodem geosmithií je rod *Acremonium*, neboť tento

anamorfní rod je polyfyletický a jeho zástupce lze kromě řádu Hypocreales nalézt i v řádech Glomerellales a Sordariales a ve třídě Leotiomycetes (Summerbell *et al.*, 2011).

Geosmithie sensu stricto jsou charakteristické zejména svou ekologií – jedná se o symbionty podkorního hmyzu (Kirschner, 2001, Kubátová *et al.*, 2004, Kolařík *et al.*, 2004, Kolařík *et al.*, 2005, Kolařík *et al.*, 2007, Kolařík *et al.*, 2008, Kolařík *et al.*, 2010, Kolařík *et al.*, 2011). Mimo prostředí požerků podkorního hmyzu jsou nalézány jen vzácně (Pitt, 1979, Kolařík *et al.*, 2004). Po morfologické stránce se hypokreální geosmithie vyznačují charakteristickým útvarem, který se vyskytuje na bázích konidioforů – tzv. „peg foot“ (Kolařík *et al.*, 2004).

K dnešnímu dni bylo popsáno 11 druhů (viz tabulku 1) a několik desítek dalších druhů rozlišených metodou RAPD, morfologicky a na základě sekvencí *ITS* zůstává dosud nepopsáno (Kolařík, nepublikováno).

Tabulka 1: Platně popsané druhy rodu *Geosmithia*.

druh	publikace
<i>G. lavendula</i>	Pitt, 1979
<i>G. putterillii</i>	Pitt, 1979
<i>G. pallida</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2004
<i>G. flava</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2004
<i>G. langdonii</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2005
<i>G. fassatae</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2005
<i>G. obscura</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2005
<i>G. eupagioceri</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2010
<i>G. microcorthyli</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2010
<i>G. rufescens</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2010
<i>G. morbida</i>	Kolařík <i>et al.</i> , 2011

Výskyt geosmithií byl intenzivně studován ve střední Evropě (Kubátová *et al.*, 2004, Kolařík *et al.*, 2004, Kolařík *et al.*, 2005, Kolařík *et al.*, 2008, Jankowiak *et al.*, 2010), ve Středomoří (Kolařík *et al.*, 2007) a v několika oblastech USA (Kolařík *et al.*, 2011, Kolařík, nepublikováno). Ve všech těchto oblastech byly geosmithie ve vzorcích z kůrovců nebo jejich požerků velmi běžné, a to na širokém spektru hostitelských rostlin zahrnujícím jak listnáče, tak jehličnany. Například z 94 vzorků hmyzu zařazených do evropské studie geosmithie chyběly jen u 13 vzorků reprezentujících 4 druhy kůrovců (Kolařík *et al.*, 2008).

Význam geosmithií pro hostitelskou rostlinu a pro hmyzího přenašeče ve většině případů není znám. U ekologicky podobných, ale lépe prostudovaných ophiostomatálních hub se předpokládá, že svému přenašeči prospívají tvorbou esenciálních látek (např. sterolů, lipidů, vitaminů...) a

koncentrací živin z rostlinných pletiv do mycelia, které je přenašečem následně spásáno. Pro lýkožravé brouky (na rozdíl od dřevních) není tato symbióza obligátní, nicméně v některých případech bylo prokázáno, že přítomnost symbiotické houby zvyšuje rozmnožovací úspěšnost brouků. Další výhodou houby může spočívat v patogenním působení na hostitelskou rostlinu, které vede k jejímu oslabení a usnadňuje tak přenašeči rostlinu kolonizovat (Six, 2003, Byers, 2004, Lieutier, F., 2004, Kirisits, 2004). Podobný efekt mohou mít i rychle rostoucí houby, které svým myceliem ucpou pryskyřičné kanálky a ochrání tak brouka před obrannou reakcí rostliny (Farrell *et al.*, 2001).

Zatímco lýko je poměrně výživným zdrojem potravy, dřevo je živinami chudé a brouci v něm žijící jsou ve většině případů obligátně závislí na přítomnosti symbiotické houby (Sauvard, 2004, Byers, 2004, Kirisits, 2004, Mueller *et al.*, 2005, Farrell *et al.*, 2001). U těchto tzv. xylomycetofágních nebo mycetofágních brouků a jejich houbových průvodců se vyvinula velmi těsná symbióza doprovázená morfologickými adaptacemi. Na straně brouků jsou to mykangia – specializované orgány sloužící k přenosu symbiotických hub (mykangia se ovšem často vyskytují i u floemofágních brouků). V typickém případě se jedná o vchlípeniny kutikuly, do nichž ústí žlázy. V širším pojetí mohou mít mykangia i podobu kartáčků z chlupů, na nichž se výtrusy hub mohou zachytit (Six, 2003). Houby účastníci se této symbiózy se nazývají ambrosiové a přizpůsobily se jí tvorbou různých útvarů funkčně analogických plodům kulturních rostlin. Jedná se například o zvětšené spory nebo o vylučování kapek. Účelem těchto útvarů je maximalizovat poměr výživného obsahu ku nestravitelnému obalu (Kolařík *et al.*, 2010, Hulcr *et al.*, 2007, Mueller *et al.*, 2005).

Pokud jde o rod *Geosmithia*, většina dosud známých druhů žije v symbióze s lýkožravými kůrovci (Kolařík *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2008). Znaky ambrosiových hub vykazují v různé míře čtyři vzájemně nepříbuzné druhy geosmithií, z toho dva druhy jsou zřetelně typické ambrosiové houby (tzn. dominují v požercích svého přenašeče a tvoří velké „krmné“ spory) (Kolařík *et al.*, 2010).

Ve vztahu k rostlině jsou téměř všechny geosmithie saprotrofové kolonizující již mrtvá pletiva. Výjimkou je *Geosmithia morbida*, která je patogenní a způsobuje chorobu „thousand canker disease“ amerických ořešáků. Stromy druhu *Juglans nigra*, který je nejnáchylnější k této chorobě, umírají obvykle během tří až čtyř let (Kolařík *et al.*, 2011). Dále se spekuluje o možnosti patogenního působení některých geosmithií z jilmů, u nichž byl nalezen fyto toxický protein ceratoulmin získaný horizontálním genovým přenosem z *Ophiostoma novo-ulmi* (Scala *et al.*, 2007).

Vzhledem k velké ekologické diverzitě (výskyt na jehličnanech i listnáčích, asociace s floemofágními i xylomycetofágními brouky) v rámci blízce příbuzných hub může být rod *Geosmithia* velmi užitečným modelovým systémem pro studium adaptací k těmto způsobům života. Zvláště slibným je v tomto směru komplex druhů OTU 8 (*G. „quercina“*), OTU 36 (*G. „cedrii“*), OTU 37 (*G. „acaciae“*) a OTU 38 (*G. microcorhylii*). Tyto druhy mají totožnou sekvenci *ITS*, nicméně se velmi liší ekologicky i morfologicky. Zatímco OTU 8 se vyskytuje v požercích floemofágních kůrovců na dubech ve střední Evropě, OTU 38 byla nalezena jako symbiont xylomycetofágního kůrovce v Kostarice (Kolařík *et* Kirkendall, 2010). Další velmi blízké druhy jsou OTU 36 izolovaná z cedrů v severní Africe a OTU 37 nalezená na avokádu v Austrálii (Kolařík, *viva voce*). V jejich evoluci tedy došlo k velmi rychlému vzniku adaptací nezbytných pro příslušné způsoby života (Kolařík *et* Kirkendall, 2010).

Význam molekulárních znaků pro systematiku a identifikaci hub

Molekulární znaky se v poslední době staly nepostradatelné pro systematiku. Pod tíhou molekulárních argumentů byli lichokopytníci spojeni s letouny do monofyletické skupiny Pegasoferae (Nishihara *et al.*, 2006), bércoun se svým „chobůtkem“ byl uznán za příslušníka příbuzenstva slonů (Balter, 1997), původce malárie se sbratřil s obrněnkami (Simpson *et* Roger, 2004), „prvok“ *Pneumocystis carini* napadající plicní sklípky byl zařazen na bázi askomycetů (Edman *et al.*, 1988), mikrosporidie se staly houbami (Hirt *et al.*, 1999, James *et al.*, 2006) a Eccrinales jimi být přestaly (Cafaro, 2005). Přesto, že tyto radikální změny byly zpočátku šokem pro tradiční morfologické systematiky, v mnoha případech se ukázalo, že systém založený na molekulárních znacích lépe vysvětluje distribuci biologicky významných znaků.

Typickým příkladem takové situace je pododdělení Kicxellomycotina (patřící do polyfyletických „Zygomycota“). Jeho zástupci byli i přes výraznou synapomorfii v podobě přehrádek se soudečkovitými póry se zátkou tradičně řazeni do odlišných tříd – řády Dimargaritales a Kicxellales do třídy Zygomycetes, Harpelales a Asellariales do třídy Trichomycetes (Kalina *et* Váňa, 2005). Teprve molekulární studie umožnily jejich smysluplné spojení (Tanabe *et al.*, 2004, James *et al.*, 2006, Hibbett *et al.*, 2007).

Dalším velkým přínosem molekulární taxonomie je, že umožňuje oprostít se od zažitého zvyku rozlišovat patogeny rostlin podle hostitele. Přestože v mnoha případech jsou houby skutečně hostitelsky specifické, není tomu tak vždy. Odstraněním apriorního předpokladu, že na jiném hostiteli je jiný druh patogenu, se otevírá prostor pro poznávání skutečné biologie hub a mechanismů, které se v interakci patogenu s hostitelem uplatňují (Blackwell, 2011).

Ačkoli molekulární znaky dnes hrají důležitou roli v systematice všech organismů, u mikroorganismů je jejich význam ještě větší. Důvodem je jejich nižší morfologická komplexita (minimálně v měřítku, na které je adaptováno lidské vnímání) a z ní plynoucí menší počet potenciálních tvarů dostupných pro evoluci. Následkem toho jsou mikroorganismy náchylnější ke konvergenci (Blackwell, 2011).

Taxony velmi podobné nebo i morfologicky nerozlišitelné nezdědka patří do rozdílných čeledí, řádů či tříd (Koukol, 2010; Okada *et al.*, 1998, Diezmann *et al.*, 2004, Summerbell *et al.* 2011). To platí i pro samotný rod *Geosmithia*, který, tak jak je v současnosti definován, má zástupce ve třídách Sordariomycetes a Eurotiomycetes (Ogawa *et al.*, 1997).

DNA barcoding

Klasický odhad, který říká, že na Zemi existuje 1,5 milionu druhů hub (Hawksworth, 1991), je dnes již považován za podhodnocený (Crous *et al.*, 2006). Hawksworth svůj odhad založil na poměru rostlin a hub na ně vázaných 1:6. Ukazuje se ale, že u některých skupin je tento poměr mnohem vyšší (až 1:33 u palem) a že saprotrofní houby vykazují větší míru substrátové specifity, než se předpokládalo. Zároveň do odhadu nebyla započtena dosud téměř neprozkoumaná diverzita hub žijících jako endosymbionti nebo parazité hmyzu (Crous *et al.*, 2006). Nové odhady tedy hovoří o 3,5 až 5,1 milionu druhů hub, z nichž jen zhruba 99 000 bylo dosud popsáno (Blackwell, 2011).

A molekulární studie stále přinášejí nové kryptické druhy (Peterson *et al.*, 2010, Zhao *et al.*, 2011, Begerow *et al.*, 2010, Lutzoni *et al.*, 2004). Ovšem objevují se i případy, kdy molekulární studie ukazují, že diverzita v některých skupinách je nadsazená (Leavitt *et al.*, 2011).

Počet taxonomů nemůže stačit na udržování znalostí a zkušeností potřebných k morfologickému určování mikroorganismů ani v těch případech, pro které se morfologické znaky podařilo nalézt. DNA barcoding je způsob, jak čelit této situaci. Jedná se o automatické určování organismů pomocí úseku DNA, který je přirovnáván k čárovému kódu identifikujícímu zboží v obchodech (Hebert *et al.*, 2003, Gilmore *et al.*, 2009, Eberhardt, 2010). Ovšem zatímco výrobci obalů si jednoznačné kombinace čar tisknou sami, molekulární taxonomové stále pátrají po ideálním úseku DNA, který by jim tuto službu poskytl. Základními požadavky jsou spolehlivé univerzální primery, které by umožnily amplifikovat příslušný gen ze všech organismů, a variabilita dostatečná pro rozlišení příbuzných druhů.

Kromě nezvládnutelných rozměrů biodiverzity je dalším argumentem pro využívání DNA barcodingu možnost určení organismu nezávisle na tom, v jakém stadiu životního cyklu se právě nachází. Morfologické znaky jsou v mnoha případech přítomné pouze na pohlavně se

rozmnožujících stádiích – na dospělých v případě hmyzu, v květní stavbě v případě rostlin (Hebert *et al.*, 2003). V ekologických studiích ale není možné smířit se s tím, že jen zlomek organismů se nachází ve stadiu nesoucím morfologické znaky. V případě hub se jedná o početnou skupinu „sterilních mycelií“, která v ekologických studiích zpravidla zůstávají jako neinterpretovatelný „odpad“. (Kowalski *et Kehr*, 1992, Griffith *et Boddy*, 1990, Sieber, 1989, Sieber *et al.*, 1991).

Rozmach barcodingu s sebou nese riziko, že vědci podlehnou pokušení a zcela se spolehnou na sekvence. Při studiu mikroorganismů ale mnohdy nelze jinak, než se smířit s tím, že budeme studovat bezejmenné sekvence, o jejichž nositelích nic nevíme (Eberhardt, 2010). Je to totiž v mnoha případech jediná cesta, jak o jejich nositelích něco zjistit.

Geny využívané pro fylogenetiku a barcoding

Aby umožnily odhalit příbuzenské vztahy mezi organismy, měly by zkoumané geny splňovat následující podmínky:

Měly by být v genomu každého organismu přítomny pouze v jedné kopii (v opačném případě může dojít k osekvenování odlišných paralogů u různých vzorků, takže rozdíly mezi kopiemi v rámci jednoho organismu zastíní rozdíly mezi ortologními sekvencemi),

měly by pro ně existovat spolehlivé univerzální primery umožňující PCR amplifikaci u co největšího množství organismů

a jejich sekvence by měly poskytovat dostatečné množství variabilních znaků při současné přítomnosti konzervovaných pozic umožňujících alignment (Feau *et al.*, 2011).

Nicméně výběr genů pro fylogenetické studie byl a dosud ve většině případů je řízen historickými náhodami. Geny, které se začaly používat v prvních molekulárně fylogenetických studiích, byly kvůli srovnatelnosti jednotlivých studií používány nadále, přestože důvody, které původně vedly k jejich výběru, přestaly být relevantní a že tyto geny mnohdy nebyly nejvhodnější (například proto, že v evoluci prodělaly duplikace, jsou náchylné k horizontálnímu transferu nebo jsou u některých taxonů pod odlišným selekčním tlakem než u jiných) (Aguileta *et al.*, 2008, Feau *et al.*, 2011). Gueidan *et al.* (2007) našli rozpor dokonce i mezi dvěma regiony jednoho genu, konkrétně se jednalo o *RPB1*, jehož dva úseky ukazovaly na odlišnou fylogenetickou pozici druhu *Verrucaria nigrescens*.

Cox1

Cox1 neboli *COI*, čili gen pro cytochrom c oxidázu I, byl vybrán jako vhodný gen pro barcoding živočichů. Mitochondriální genom má u živočichů výhodu, že na rozdíl od rekombinujícího genomu jaderného je klonální. Mitochondriální geny pro ribosomální RNA

obsahují příliš mnoho indelů. *Cox1* byla vybrána ze 13 genů, které u živočichů kódují proteiny, jednak díky konzervovaným univerzálním primerům a jednak díky velkému rozsahu, v němž poskytuje informace o taxonomické příslušnosti (od vnitrodruhové úrovně rozlišitelné variabilní třetí pozicí kodonů po vysoké taxonomické jednotky identifikovatelné pomocí sekvence aminokyselin, kterou tyto geny kódují) (Hebert *et al.*, 2003).

Ovšem zatímco taxonomům živočichů dal tento gen víru, že během 20 let „sesterské druhy budou rozeznatelné, taxonomická rozhodnutí budou objektivní a všechna životní stadia budou identifikovatelná“ (Hebert *et al.*, 2003), pokusy využít ho pro barcoding hub skončily zklamáním.

Vialle *et al.* (2009) analyzovali dostupné mitochondriální genomy stopkovýtrusých hub a srovnávali geny pro jednotlivé proteiny z hlediska jejich vhodnosti pro DNA barcoding. Velkou část (včetně *Cox1*) vyloučili kvůli množství intronů potenciálně znesnadňujících amplifikaci. Když dále zohlednili délku, zůstaly ve výběru tři mitochondriální geny: *atp6* (podjednotka 6 ATP syntázy), *CO3* (podjednotka 3 cytochrom oxidázy) a *nad6* (podjednotka 6 NADH dehydrogenázy). Jiné studie ale ukázaly, že *atp6* se u některých askomycetů vyskytuje ve více různých kopiích a *nad6* naopak u některých hub zcela chybí. Pro *nad6* také neexistují dostatečně univerzální primery (Eberhardt, 2010). Každopádně ani jeden z genů nepřekonal svou schopností spolehlivě zařadit vzorek do správného taxonu tradičně používaný úsek *ITS* (Vialle *et al.*, 2009).

U rodu *Fusarium* se objevila ještě další překážka bránící v užívání *Cox1* pro DNA barcoding hub. Gen se u těchto hub vyskytuje v několika kopiích (byly detekovány až čtyři v jednom izolátu), jejichž vnitrogenomová variabilita převyšuje variabilitu mezi druhy a brání tak správnému taxonomickému přiřazení sekvencí (Gilmore *et al.*, 2009).

Konečně u rodu *Penicillium* *Cox1* selhala proto, že nebyla dostatečně variabilní a nebyla tudíž schopna rozlišit jednotlivé druhy v několika druhových komplexech (Chen *et al.*, 2009).

Možná ale hlavním důvodem zavržení tohoto genu byla skutečnost, že iniciativa živočišných taxonomů založit barcoding na genu *Cox1* přišla v době, kdy mezi mykology bylo již běžnou praxí využívat k podobným účelům region *ITS* (Seifert, 2009, Eberhardt, 2010).

Ribosomální RNA

Geny pro ribosomální RNA a úseky DNA mezi nimi (*ITS*, *IGS*) byly v systematice a identifikaci hub používány nejčastěji (Lutzoni *et al.*, 2004, Eberhardt, 2010). Jejich široká obliba měla dva hlavní důvody. Jednak pro ně byly navrženy primery už na počátku molekulární éry, a to hlavně kvůli velmi konzervovaným úsekům srovnatelným napříč celým stromem buněčného života. A jednak proto, že jsou v genomu přítomny ve velkém počtu opakování, což usnadňuje jejich amplifikaci ze vzorku (Blackwell, 2011, Miller *et Huhndorf*, 2005).

Tyto geny se v genomu vyskytují v podobě tzv. RNA operonu, v němž se nacházejí geny pro *18S RNA*, *5,8S RNA* a *28S RNA*, které jsou odděleny nekódujícími regiony *ITS 1* a *ITS 2*. Výraz *ITS* region se obvykle používá ve významu *ITS 1 – 5,8S – ITS 2*. RNA operony jsou v genomu uspořádány repetitivně a jednotlivé kopie jsou odděleny nekódujícím regionem *IGS*. Předpokládá se, že všechny kopie RNA operonu v genomu jsou udržovány ve vzájemně identické podobě procesem „concerted evolution“ (Elder *et* Turner, 1995, Ganley *et* Kobayashi, 2007). Na příkladu rodu *Laetiporus* však bylo prokázáno, že variabilita *ITS* v rámci jedince může přehlušit fylogenetický signál mezidruhových vztahů (Linder *et* Banik, 2011).

O'Donnell *et* Cigelnik (1997) navíc zdokumentovali případ dvou odlišných typů *ITS* sekvencí v genomu. U různých blízce příbuzných druhů z rodu *Fusarium* převažuje vždy jeden typ *ITS*, což vede k zavádějícím vztahům ve fylogenetickém stromě. Přítomnost dvou variant *ITS* je zřejmě důsledkem mezidruhové hybridizace nebo genové duplikace, k níž došlo před rozrůzněním druhového komplexu. Proces „concerted evolution“ v tomto případě zřejmě probíhá pomaleji, než speciace.

V mnoha případech se také ukazuje, že *ITS* není dostatečně variabilní (Zhao *et al.*, 2011, Lieckfeldt *et* Seifert, 2000, Cannon *et al.*, 2012, O'Donnell *et* Cigelnik, 1997).

Ovšem i přesto, že stále více studií ukazuje, že ribosomální geny nejsou pro fylogenetické studie a pro barcoding ideální, je pravděpodobné, že množství sekvencí těchto genů, které byly nashromážděny, jim zajistí privilegované postavení i do budoucna a věda se podřídí dostupným datům (Eberhardt, 2010). Ve prospěch *ITS* jako genu pro barcoding hovoří také to, že díky velkému počtu kopií stále představuje spolehlivěji amplifikovatelný marker, než jsou proteinové geny přítomné v genomu v jediné kopii (Schoch *et al.*, 2012).

Zejména ve studiích usilujících o odhalení hlubších fylogenetických vztahů mezi houbami se ukazovalo, že geny pro ribosomální RNA neposkytují dostatek informací. Proto byly do mezinárodního projektu zaměřeného na vícegenovou fylogenezi celé říše hub – Assembling the Fungal Tree of Life (AFTOL) - zařazeny také geny kódující proteiny: *RPB1*, *RPB2*, *TEF-1 α* (translační elongační faktor 1 α) a *mitATP6* (podjednotka 6 mitochondriální ATP syntázy, viz výše) (Lutzoni *et al.*, 2004, Seifert, 2009, www.aftol.org).

RPB1 a RPB2

RPB2, čili druhá největší podjednotka RNA polymerázy II, je - stejně jako ostatní proteiny, které se účastní replikace, transkripce a translace – pro organismy nezbytná a má tudíž malé předpoklady pro horizontální genový transfer. Zároveň obsahuje velmi konzervované úseky, které umožňují její amplifikaci, a vyskytuje se v genomu hub jen v jedné kopii. Z těchto důvodů byla

vybrána jako první proteinová alternativa, když se geny pro ribosomální DNA začaly jevit nedostatečné (Liu *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 1999, Miller *et al.*, 2005). Na vyšší taxonomické úrovni byla s úspěchem použita například k odhalení monofylie hub s askolokulární ontogenezí (Liu *et al.*, 2004) nebo monofylie zygomycetů se soudečkovitými póry se zátkou (Tanabe *et al.*, 2004) a naopak k vyvrácení monofylie polysporických lišejníků (Reeb *et al.*, 2004). Na nižší taxonomické úrovni přispěla k vyjasnění příbuzenských vztahů mezi různými druhy rodu *Candida* (Diezmann *et al.*, 2004) a *Inocybe* (Matheny, 2005) a ke zpochybnění koncepce rodů v řádu Sordariales (Miller *et al.*, 2005).

Hofstetter *et al.* (2007) porovnávali schopnost genů *nucSSU*, *nucLSU*, *mitSSU*, *RPB1* a *RPB2* a jejich kombinací odhalit příbuzenské vztahy mezi houbami na různých úrovních od blízce příbuzných druhů po podtřídy. Jako míru použili podíl počtu signifikantně podpořených větví ve fylogenezi založené na daném genu/kombinaci ku počtu signifikantně podpořených větví ve fylogenezi získané spojením všech pěti genů. Z tohoto srovnání vyšla nejlépe *RPB1*, čili gen pro největší podjednotku RNA polymerázy II s třiceti osmi podpořenými větvemi ze šedesáti šesti možných. *RPB2* ji následovala s třiceti šesti podpořenými větvemi, zatímco *mitSSU* a *nucLSU* daly signifikantní podporu jen devatenácti větvím a *nucSSU* pouhým patnácti. Z kombinací dvou genů mělo nejlepší výsledky spojení *RPB1* a *RPB2* (čtyřicet sedm podpořených větví), z kombinací tří genů to byly *RPB1*, *RPB2* a *mitSSU* (55 větví) a z kombinací čtyř genů *RPB1*, *RPB2*, *mitSSU* a *nucSSU* (59 větví). Přestože užití *RPB2* bylo původně zavedeno kvůli vztahům na úrovni tříd (Liu *et al.*, 2004), větve podporované lépe RNA polymerázovými geny než geny pro ribosomální RNA byly většinou uvnitř čeledí, zatímco větve, pro něž dávaly lepší výsledky ribosomální geny byly spíše na úrovni podtříd či řádů (Hofstetter *et al.*, 2007).

Podobné srovnání provedli Diezmann *et al.* (2004) na fylogenezi uvnitř řádu Saccharomycetales. I z jejich studie vyšly nejlépe *RPB1* (18 podpořených větví) a *RPB2* (15 podpořených větví). Další testované geny – kódující elongační faktor 2, 18S rDNA a 26S rDNA – poskytly statistickou podporu jen deseti z celkem třiceti osmi větví a poslední – gen pro aktin – pouze osmi větvím. Pozoruhodné je, že ze 35 větví statisticky podpořených kombinací všech čtyř genů kódujících proteiny jich sedm podporu ztratilo připojením genů kódujících ribosomální RNA.

Miller *et al.* (2005) porovnávali *RPB2* s *LSU* a *β -tubulinem* na vnitrořádové úrovni. Přestože délka všech tří fragmentů byla srovnatelná, *RPB2* poskytla více než dvojnásobné množství pozic nesoucích informaci pro parsimonii oproti zbylým dvěma genům, což vedlo k vyššímu počtu statisticky podpořených větví.

Matheny (2005) použil *RPB1*, *RPB2* a *LSU* pro fylogenezi rodu *Inocybe*. I v tomto případě poskytovala nejvyšší statistickou podporu *RPB1*, nicméně u druhů *Inocybe fastigiella* a *Hypholoma*

fasciculare byly nalezeny dvě odlišné kopie *RPB1*. *RPB2* se u všech studovaných vzorků zdála být přítomna jen v jediné kopii a její schopnost objasnit příbuzenské vztahy v rodu *Inocybe* byla rovněž velmi dobrá v porovnání s *LSU*. Autor selhání *LSU* přičítá velké nevyrovnanosti evolučních rychlostí mezi různými úseky tohoto genu.

Hofstetter *et al.* (2007) také ověřili, že v rámci Lecanoromycetes nedochází na třetí pozici *RPB1* a *RPB2* k substituční saturaci. Naopak u Saccharomycetales k substituční saturaci na třetí pozici dochází (Diezmann *et al.*, 2004). Určitá míra substituční saturace na třetí pozici *RPB2* byla objevena i v rámci Sordariales, nicméně tato byla dostatečně malá, aby bylo možné ji zanedbat (Miller *et Huhndorf*, 2005). Podobné výsledky měli i Tanabe *et al.* (2004) s *RPB1* u zygomycetů: K substituční saturaci tohoto genu došlo, ale byla mnohem menší, než u druhého genu použitého v této studii – *TEF-1 α* .

Ačkoli *RPB1* poskytovala ve všech studiích, do nichž byla zařazena, podporu nejvyššímu počtu větví, Tanabe *et al.* (2004) zpochybnili její vhodnost. V jejich studii se sice tento gen osvědčil na úrovni řádů zygomycetů, ale dával nesmyslné výsledky pro vztahy některých askomycetů a bazidiomycetů, což mohlo být důsledkem genových duplikací nebo horizontálního genového transferu.

Další geny kódující proteiny

β -tubulin byl použit například v kombinaci s *nucLSU* pro odlišení rodů *Ceratocystiopsis* a *Grosmannia* od rodu *Ophiostoma* (Zipfel *et al.*, 2006), a to přesto, že „partition homogeneity test“ nepotvrdil kongruenci těchto genů. Autoři to přičítali velké konzervovanosti *β -tubulinu* (do analýzy nebyly zahrnuty introny, neboť byly přítomny jen u některých taxonů). Zda v takovém případě β -tubulin relevantně přispívá k výsledné podobě fylogenetického stromu ovšem autoři dále nediskutovali.

Problémem β -tubulinu je také existence paralogů, která brání jeho univerzálnímu užití. Nicméně například pro *Penicillium* podrod *Penicillium* se β -tubulin ukázal být vhodným genem pro barcoding, protože u tohoto taxonu nedocházelo k amplifikaci paralogů a zařazení izolátů na základě sekvencí β -tubulinu korelovalo s jejich morfologií (Samson *et al.*, 2004).

EF-1 α se ukázala jako velmi problematická pro vyšší taxonomickou úroveň, zejména kvůli velké míře substituční saturace (Tanabe *et al.*, 2004). Pro nižší taxonomickou úroveň a pro barcoding ale může být užitečná. Například ve studii zaměřené na nalezení vhodného genu pro barcoding rodu *Neonectria* byly srovnávány úseky *ITS*, *β -tubulinu*, *EF-1 α* a *RPB2* na základě jejich mezidruhové divergence a snadnosti jejich amplifikace. Žádný z těchto genů neumožnil zařazení všech vzorků do druhu, protože největší vnitrodruhové rozdíly převyšovaly nejmenší rozdíly

mezidruhové. Proto autoři navrhuji kombinaci EF-1 α a *RPB2*, která byla ve všech případech úspěšná (Zhao *et al.*, 2011).

Přibývající kompletně osekvenované genomy nabídly možnost oprostít se od historických náhod a vybrat geny, které budou opravdu nejvhodnější pro odhalování příbuzenských vztahů mezi houbami. Za tímto účelem Aguilera *et al.* (2008) analyzovali 23 plně osekvenovaných genomů hub. Nejprve vyfiltrovali geny, které se vyskytovaly ve všech studovaných genomech, ale vždy pouze v jedné kopii. Každý z takto vybraných genů použili k vytvoření fylogenetického stromu a následně zjišťovali, do jaké míry se tyto stromy shodují se stromem vytvořeným na základě spojení všech genů dohromady. Stoprocentní shody stromů dosáhly pouze dva geny: *Mcm7* a *Tsr1*. Naopak shoda, již dosáhly běžně užívané geny, byla nízká, a některé z nich neprošly dokonce ani prvním sítím, protože byly alespoň u některých taxonů přítomny ve více kopiích nebo naopak v některých genomech nebyly přítomny vůbec.

Tsr1 (TwentyS rRNA accumulation protein 1) kóduje protein, který ovlivňuje zpracování prekurzorů ribosomální RNA (Aguilera *et al.*, 2008, Gelperin *et al.*, 2001, Morgenstern *et al.*, 2012).

Mcm7 (Minichromosome maintenance protein 7) patří do šestičlenné rodiny proteinů *Mcm* (rozpor v číslování není způsoben překlepem, nýbrž tím, že název *Mcm1* byl původně přiřazen proteinu, který není homologický se členy *Mcm* rodiny), která se účastní regulace spouštění replikace DNA (tzv. „licencing-like reaction“). Původně byly tyto proteiny popsány u modelových kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe*, později byly jejich homology nalezeny u dalších eukaryot. Zdá se, že k rozrůznění *Mcm* na šest známých paralogů došlo u společného předka eukaryot a následně zůstala tato rodina konzervována a přinejmenším u opisthokont má vždy právě šest členů. Homology *Mcm* genů byly nalezeny i u archeí (což odpovídá společnému původu replikačního aparátu eukaryot a archeí), nicméně tam je počet *Mcm* v genomu variabilní a jednotlivé geny neodpovídají konkrétním členům této rodiny u eukaryot (Kearsey & Labib, 1998, Aguilera *et al.*, 2008, Morgenstern *et al.*, 2012).

Schmitt *et al.* (2009) následně navrhli primery pro tyto geny (přesněji pro jejich fragmenty dlouhé 640-740 bází v případě *Mcm7* a 750 bází v případě *Tsr1*) a úspěšně otestovali jejich použitelnost od vnitrorodové úrovně po vztahy mezi třídami v rámci oddělení Pezizomycotina. Geny se zdají být perspektivní i pro barcoding. Schmitt *et al.* ověřili jejich variabilitu mezi jednotlivými druhy rodů *Malcomiella*, *Aspergillus* a *Lecanora*. Raja *et al.* (2011) srovnávali *Mcm7* s LSU na úrovni tříd a na úrovni rodů. V jejich studii se LSU jevila vhodnější pro vyšší taxony, *Mcm7* pro rodovou úroveň.

Husson *et al.* (2011) úspěšně použili geny *Mcm7* a *Tsr1* pro odlišení dvou kryptických druhů rodu *Chalara/Hymenoscyphus* vyskytujících se na jasanech v severovýchodní Francii. Autochtonní avirulentní druh *Hymenoscyphus albidus* se od invazního virulentního druhu *H. pseudoalbidus* lišil ve 2,1% bázi genu *Mcm7* a ve 3,8% bázi genu *Tsr1*. Běžně používaný gen *ITS* vykazoval jen 1,6% variability.

Hermet *et al.* (2012) studovali systematickou příslušnost izolátů rodu *Mucor* ze sýrů pomocí genů *ITS*, *18S*, *28S*, *RPB1* a *Mcm7*. *Mcm7* se z nich osvědčil nejvíce díky procentuálně nejvyšší mezidruhové variabilitě.

Geny *Mcm7* a/nebo *Tsr1* využilo ještě několik dalších studií, ačkoli zatím jich není mnoho. Ve studii zabývající se rodem *Hamigera* a příbuznými houbami z řádu Eurotiales byly *Mcm7* a *Tsr1* použity v kombinaci s *RPB2*. Spojením těchto tří genů byl získán fylogenetický strom s většinou větví dobře podpořenou, ale žádný z genů samostatně nedosáhl srovnatelných výsledků (Peterson *et al.*, 2010). Ve studii druhové diverzity lichenizovaných hub rodu *Xanthoparmelia* v Severní Americe byl *Mcm7* použit v kombinaci s β -*tubulinem* a geny pro ribosomální RNA. V tomto případě se ovšem proteinové geny spíše neosvědčily a i po spojení všech použitých genů zůstala značná část mezidruhových vztahů nevyjasněná (Leavitt *et al.*, 2011). *Tsr1* spolu s dalšími geny použili také Houbraken *et al.* (2012) při definování rodu *Rasamsonia*, do nějž přeřadili čtyři z eurotiálních „geosmithií“.

Podobnou metodu jako Aguilera *et al.* použili i autoři další studie zabývající se výběrem optimálních genů pro fylogenetické studie (Feau *et al.*, 2011). Jejich cílem ovšem nebylo nalézt univerzálně použitelné geny, nýbrž vyvinout metodu umožňující pro každou konkrétní studii vybrat nejvhodnější geny. Geny, které vybrali pro modelovou studii, poskytly lepší statistickou podporu pro zjištěné fylogenetické vztahy padlí než *ITS*. Tento přístup je ovšem užitečný jen pro konkrétní studie a neumožňuje využít získaná data pro obecnější srovnání.

Aguilera *et al.*, se rovněž zabývali otázkou, jaký počet genů by měl být ve fylogenetických studiích používán. Postupně přidávali do analýzy další geny (v pořadí podle vhodnosti) a srovnávali získané podpory větví. Dva nejlepší daly dohromady všem větvím bootstrap nad 70%, tři geny nad 80%, ale ani 25 genů nedalo všem větvím 100%.

Metodika

Studované vzorky

Studované izoláty jsou součástí sbírky mého školitele Miroslava Kolaříka. Pracovala jsem převážně s izoláty, které již byly předběžně zařazeny do operačně taxonomických jednotek (OTU, řádově na úrovni druhů,) na základě morfologie a sekvencí *ITS*. Kde to bylo možné, studovala jsem tři izoláty od každé OTU. V některých případech byl k dispozici jen jeden či dva izoláty (tento problém se týkal zejména tropických linií), naopak od OTU s širokým hostitelským spektrem nebo geografickým rozšířením jsem použila více izolátů. Do analýzy jsem zařadila také sekvence, které získali můj školitel (73 sekvencí) a Mgr. Martin Kostovčík (11 sekvencí) v rámci dřívějších výzkumů. Celkem jsem použila 215 izolátů geosmithií a outgroup. Jako outgroup jsem použila izolát druhu *Emericellopsis terricola* CCF 3815 (Hujšlová, 2010), což je druh patřící mezi nejbližší příbuzné rodu *Geosmithia* (Rossman *et al.*, 2001). Seznam konkrétních kmenů, které jsem použila pro fylogenetickou analýzu, je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Studované izoláty s uvedením hostitelských rostlin (případně jiných substrátů, ze kterých byly získány) a zemí původu. Čísla kmenů odpovídají číslování ve sbírce M. Kolaříka. 1 = sekvence získané v této práci, Kol. = sekvence poskytnuté M. Kolaříkem, Kos. = sekvence poskytnuté M. Kostovčíkem. Typové kmene popsaných druhů jsou označeny červeně.

druh	OTU	kmen	CCF-kód	jiné kódy	TEF	Mcm	Tsr	rpb2	dřevina	země
OTU 1	1	MK 1724	3660		1	1	1	1	<i>Clematis vitalba</i>	CZ
OTU 1	1	MK 1766			1	1	1	Kol.	<i>Ficus carica</i>	TR
OTU 1	1	MK 573	3659, 3395		1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	FR
OTU 1	1	MK 1790			1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	AZ
OTU 1	1	MK 1914			1	1	1	1	<i>Celtis africana</i>	JAR
OTU 1	1	MK 1918			1	1	1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 1	1	MK 1919			1	1	1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 2	2	MK 985			1	1	1	1	<i>Ulmus</i>	CZ
OTU 2	2		3320	cabi 190744	1	1	1	1	<i>Cucumis melo</i>	PE
OTU 2	2	MK 642			1	1	1	1	<i>Fraxinus ornus</i>	HU
OTU 2	2	MK 1709						Kol.	<i>Quercus sp.</i>	BG
OTU 2	2	MK 1807			1	1	1	1	<i>Acacia smithii</i>	AU
OTU 2	2		3319	IMI 155478a	1	1	1	1	<i>Malus domestica</i>	CY
OTU 2	2	U 107			1	1	1	1	<i>Prunus sp.</i>	USA, CA
OTU 2	2	MK 1903			1	1	1	Kos.	broadleaved tree	JAR
OTU 3	3	MK 250			1	1	1	1	<i>Quercus delechampii</i>	SK
OTU 3	3	MK 114	3344		1	1	1	Kol.	<i>Quercus robur</i>	CZ
OTU 3	3	MK 612	3481		1	1	1	1	<i>Carpinus betulus</i>	HU
OTU 3	3		O309		1			1	soil	CZ

OTU 4	4	MK 1722			1	1	1	Kol.	<i>Ulmus laevis</i>	CZ
OTU 5	5	RJ 137m			1	1	1	1	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 5	5	AK 162/98			1	1	1	Kol.	<i>Quercus robur</i>	CZ
OTU 5	5	MK 1715			1	1	1	1	<i>Tilia sp.</i>	BG
OTU 5	5	AK 108/97	3341		1	1	1	1	<i>Quercus petraea</i>	CZ
OTU 5	5		3325	IMI192499				1		UK
<i>G. putterillii</i>	6	IMI 40212	3052		1	1	1	Kol.	<i>Beilschmiedia tawa</i>	NZ
<i>G. putterillii</i>	6	MK 103	3342		1	1	1	1	<i>Prunus sp.</i>	CZ
<i>G. putterillii</i>	6	MK 596	3442		1	1	1	1	<i>Laurus nobilis</i>	FR
<i>G. putterillii</i>	6	U 307			1	1	1	1	<i>Pinus ponderosae</i>	USA, CA
<i>G. putterillii</i>	6	U 47						1	<i>Umbellularia californica</i>	USA, CA
<i>G. flava</i>	7	MK 101	3333		1	1	1	1	<i>Castanea sativa</i>	CZ
<i>G. flava</i>	7	MK 581	3640					Kol.	<i>Ficus carica</i>	FR
<i>G. flava</i>	7		3323	cabi 158645	1			1	<i>Hordeum sp. grain</i>	UK
<i>G. flava</i>	7	U 56			1	1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
<i>G. flava</i>	7	MK 1736			1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	BG
<i>G. flava</i>	7	MK 1808			1	1	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
<i>G. flava</i>	7	1743b						Kol.	<i>Thuja occidentalis</i>	CZ
<i>G. flava</i>	7	1564			1	1	1	1	<i>Fraxinus excelsior</i>	CZ
<i>G. flava</i>	7	MK 1563			1				<i>Fraxinus excelsior</i>	CZ
OTU 8	8	MK 1712a			1	1	1	1	<i>Quercus cerris</i>	BG
OTU 8	8	MK 124	3350,3551		1	1	1	1	<i>Quercus sp.</i>	CZ
OTU 8	8	MK 1708						Kol.	<i>Quercus sp.</i>	BG
OTU 8	8	AK 36/97	3358			1	1	1	<i>Quercus petraea</i>	CZ
OTU 8	drive 37	MK 1806			1	1	1	Kol.	<i>Acacia smithii</i>	AU
OTU 9	9	RJ 0266			Kol.	1	1	Kol.	<i>Larix decidua</i>	PL
OTU 9	9	RJ 1210	3703		1	1	1	1	<i>Abies alba</i>	PL
OTU 9	9	RJ 10m			Kol.	1	1	Kol.	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 9	9	RJ 0751	3702		Kol.	1	1	Kol.	<i>Abies alba</i>	PL
OTU 9	9	D 4			Kol.				<i>Picea abies</i>	CZ
OTU 9	9	RJ 0372			Kol.			Kol.	<i>Abies alba</i>	PL
OTU 9	9	D 3, též MK1783	3564					Kol.	<i>Picea abies</i>	CZ
OTU 10	10	MK 910						Kol.	<i>Ficus carica</i>	BG
OTU 10	10	MK 1707			1		11		<i>Fraxinus excelsior</i>	BG
OTU 10	10	Cabi 1904089	3321	cabi 1904089	1	1	1	1	air	IL
OTU 10	10	MK 1530			1	1	1	1	<i>Juniperus phoenicea</i>	HR
OTU 10	10	MK 1516			1	Kos.	1	1	<i>Hedera helix</i>	CZ
OTU 10	10	MK 441	3553		1	1	1	1	<i>Ulmus minor</i>	CZ
OTU 10	10	MK 88	3335,355		1	1	1	1	<i>Prunus sp.</i>	CZ
OTU 10	10	MK 1915			1	1	1	Kos.	<i>Celtis africana</i>	JAR
OTU 10	10	MK 2000			1	1	1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 11	11	MK 551	3555		1	1		1	<i>Quercu pubescens</i>	HU
OTU 11	11	MK 1629			1	1	Kos.	1	<i>Olea europea</i>	ES
OTU 11	11	MK 933			1	1	1	1	<i>Olea europea</i>	HR
OTU 12	12	MK 273			1	1	1	1	<i>Fraxinus excelsior</i>	CZ
OTU 12	12	MK 661	3557		1	1	1	1	<i>Fraxinus excelsior</i>	HU

OTU 12	12	MK 1693			1	1	1	1	<i>Fraxinus excelsior</i>	CZ
OTU 12	12	U164			1	1	1	1	<i>Fraxinus sp.</i>	USA, CA
OTU 13	13	MK 977	3559		1	1	1	1	<i>Ulmus minor</i>	CZ
OTU 13	13	MK 924				1			<i>Ulmus minor</i>	CZ
OTU 13	13	MK 972						Kol.	<i>Ulmus minor</i>	CZ
OTU 13	13	MK 1519			1	1	1	1	<i>Ulmus minor</i>	CZ
OTU 13	13	U1.6a_26			1	1	1	1	<i>Ulmus sp.</i>	CZ
<i>G. fassataiae</i>	14	AK 73/98	3468		1				<i>Quercus polycarpa</i>	CZ
<i>G. fassataiae</i>	14	AK 31/98			1	1	1	1	<i>Quercus polycarpa</i>	CZ
<i>G. fassataiae</i>	14	U 72			1	1	1	1	<i>Salix sp.</i>	USA, CA
<i>G. fassataiae</i>	14	AK14/93	3334		1	1	1	1	<i>Quercu pubescens</i>	CZ
<i>G. langdonii</i>	15	MK 1619	3650		1	1	1	11	<i>Pistacia lentiscus</i>	PT
<i>G. langdonii</i>	15	MK 110						Kol.	<i>Quercus robur</i>	CZ
<i>G. langdonii</i>	15	AK 142/98	3332		1	1	1	1	<i>Quercus robur</i>	CZ
<i>G. langdonii</i>	15	U61			1				<i>Sequoia sempervirens</i>	USA, CA
<i>G. langdonii</i>	15	MK 127	3338		1	1	1	1	<i>Quercus robur</i>	CZ
OTU 16	16	RJ 08m			1	1	1	1	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 16	16	RJ 34m			Kol.	1			<i>Picea abies</i>	PL
OTU 16	16	RJ 42m			Kol.	1			<i>Picea abies</i>	PL
OTU 16	16	RJ 41m						Kol.	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 16	16	MK 860	3558		1	1	1	1	<i>Abies alba</i>	SK
<i>G. obscura</i>	17	MK 616	3425		1	1	1	Kol.	<i>Carpinus betulus</i>	HU
<i>G. obscura</i>	17	MK 391	3424		1	1	1	1	<i>Fagus sylvatica</i>	CZ
<i>G. obscura</i>	17	MK 86	3422		1	1	1	1	<i>Quercus robur</i>	CZ
<i>G. Lavendula</i>	18	NRRL2146	3051			1	1		air	USA, IL
<i>G. lavendula</i>	18	mk 447	3394		1	1	1		<i>Ficus carica</i>	HR
<i>G. lavendula</i>	18	IMI141053	3460		1	1	1	Kos.	air	IN
OTU 19	19	MK 941	3655		1	1	1	Kos.	<i>Ficus carica</i>	HR
OTU 19	19	MK 1085a	3658		1	1	1	Kos.	<i>Ficus carica</i>	IT
OTU 19	19	H2_V12			1	1	1	1	<i>Salix alba</i>	SK
OTU 19	19	H4_V1			1	1	1	1	<i>Salix alba</i>	CZ
OTU 19	19	H5-V2			1	1	1	1	<i>Salix alba</i>	CZ
OTU 20	20	MK 578			1	1			<i>Ficus carica</i>	FR
OTU 20	20	MK 766			1	1		1	<i>Ficus carica</i>	Sy
OTU 20	20	MK 999			1				<i>Artemisia sp.</i>	IT
OTU 20	20	MK 590	3641		1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	FR
OTU 20	20	MK 1769			1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	TR
OTU 20	20	U193			1			1	<i>Ulmus pumila</i>	USA, CA
OTU 20	20	U119b			1				<i>Calocedrus decurrens</i>	USA, CA
OTU 20	20	MK 1900			1	1	1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 21	21	MK 592			1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	FR
OTU 21	21	MK 844	3642		1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	CY
OTU 21	21	MK 1761			1	1	1	1	<i>Ficus carica</i>	IL
OTU 21	21	MK 1760						Kol.	<i>Ficus carica</i>	IL
OTU 21	21	MK 815			1			1	<i>Ficus carica</i>	JO
OTU 21	21	U198			1	1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 21	21	U 52			1	1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA

OTU 22	22	MK 739	3645		1	1	1	1	<i>Olea europea</i>	JO
OTU 22	22	MK 761			1	1	1	1	<i>Malus domestica</i>	TR
OTU 22	22	MK 935	3652		1	1	1	Kol.	<i>Olea europea</i>	HR
OTU 22	22	MK 753b						Kol.	<i>Ficus carica</i>	TR
OTU 22	22	MK 1913			1	1	1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 23	23	MK 930	3638		1	1		1	<i>Amygdalus comunis</i>	HR
OTU 23	23	MK 781	3639		1	1	1	1	<i>Prunus armeniaca</i>	TR
OTU 23	23	MK 762	3483		1	1	1	1	<i>Malus domestica</i>	TR
OTU 23	23	U 160				1	1	1	<i>Ulmus pumila</i>	USA, CA
OTU 23	23		3318	051240b	1	1	1	1	<i>Persea gratissima</i>	SC
OTU 23	23		3322	IMI 191599	1	1	1	1	<i>Malus pumila</i>	CY
OTU 23	23	roki 2612a			1	1	1	1	<i>Camellia sinensis</i>	TW
OTU 23	23	RokiBork1			1			Kos.	<i>Mangifera indica</i>	TW
OTU 24	24	RJ 06ka			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 24	24	MK 1837			1				<i>Pinus sylvestris</i>	FI
OTU 24	24	MK 1772			1	1	1	Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 24	24	MK 1838			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 25	25	MK 1805			1	1	1	Kol.	broadleaved tree	AU
OTU 26	26	MK 1797			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 26	26	RJ 26			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 26	26	MK 1828			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 26	26	U 25			1	1	1	1	<i>Pinus sabiniana</i>	USA, CA
OTU 27	27	RJ 0919			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 27	27	RJ 91b						Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 27	27	RJ 0911			1	1	11		<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 27	27	U 308B			1	1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 28	28	RJ 279m			1	1	1	1	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 29	29	MK 1802b			1	1	1	1	<i>Croton draco</i>	CR
OTU 29	29	MK 1820			1	1	1		<i>Croton draco</i>	CR
OTU 30	30	RJ 152m			Kol.	1	1	Kol.	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 30	30	MK 1824					1		<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 30	30	RJ 09m			Kol.	1	1	1	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 30	30	RJ 27m			1			1	<i>Picea abies</i>	PL
OTU 30	30	MK 1843			Kol.	1		Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	EE
OTU 30	30	156m			Kol.				<i>Picea abies</i>	PL
OTU 30	30	153m			Kol.	1			<i>Picea abies</i>	PL
OTU 30	30	MK 1801			Kol.	1	1	Kol.	<i>Larix decidua</i>	CZ
OTU 30	30	RJ 0363			Kol.	1	1	Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 30	30	MK 1836			Kol.			Kol.	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 30	30	MK 1834c			Kol.	1	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 30	30	MK_1829				1	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 30	30	U 196				1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 31	31	RJ 15ak			Kol.	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 31	31	MK 1793			1	1	1	1	<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 31	31	RJ 74k			Kol.	1	1	Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 31	31	RJ 73k			Kol.			Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 31	31	MK 1811b			Kol.				<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 31	31	RJ 22k			Kol.			Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 31	31	RJ 49k			Kol.			Kol.	<i>Pinus sylvestris</i>	PL
OTU 31	31	U309			1	1	1	1	<i>Pinus nigra</i>	USA, CA

OTU 31	31	U 407					1	1	<i>Pinus sabiniana</i>	USA, CA
OTU 31	31	U 316					1	1	<i>Pinus muricata</i>	USA, CA
OTU 31	31	MK 1825				Kol.			<i>Pinus sylvestris</i>	CZ
OTU 31	31	172m							<i>Picea abies</i>	PL
OTU 33	33	1827b				Kol.	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 33	33	1809b				1	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 35	35	MK 1829a				Kol.			<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 35	35	MK 1832							<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 35	35	MK 1835				Kol.	1	1	<i>Abies alba</i>	CZ
OTU 36	36	MK 1811a				1	1	1	<i>Cedrus atlantica</i>	MA
OTU 36	36	MK 1814				1	1	1	<i>Cedrus atlantica</i>	MA
OTU 36	36	MK1810a				1	1	1	<i>Cedrus atlantica</i>	MA
<i>G. microcorthyli</i>	38	A2-Ab	3861			Kol.	1	1	<i>Cassia grandis</i>	CR
<i>G. eupagioceri</i>	39	A1-b	3754			1	1	1	<i>Paullinia renesii</i>	CR
OTU 40	40	ROKI	3563			1	1		<i>Chamaecyparis sp.</i>	TW
<i>G. morbida</i>	41	1217	3881	CBS 124663		1	1	1	<i>Juglans nigra</i>	USA, CA
<i>G. morbida</i>	41	1218	3879	CBS 124664		1	1	1	<i>Juglans nigra</i>	USA, CA
<i>G. morbida</i>	41	U 173		syn. U 170		1	1	1	<i>Juglans hindsii</i>	USA, CA
<i>G. rufescens</i>	42	MK 1803	3752			1	1	1	<i>Croton (Euphorbiaceae)</i>	CR
<i>G. rufescens</i>	42	MK 1800	3751			1	1	1	<i>Passiflora sp.</i>	CR
<i>G. pallida s. str.</i>	43	MK 1756				1	1	1	<i>Gymnacranthera paniculata</i>	PG
<i>G. pallida s. str.</i>	43	MK 1755					1		<i>Gymnacranthera paniculata</i>	PG
<i>G. pallida s. str.</i>	43		3324	IMI 054224		1	1	1	soil	NG
<i>G. pallida s. str.</i>	43	NRRL 2037	3053	IMI 40214			1	1	cotton yarn	UK
<i>G. pallida s. str.</i>	43	Roki 5.Bork3				1			deciduous tree	TW
<i>G. pallida s. str.</i>	43	MK 1907				1	1	1	<i>Podocarpus henkelii</i>	JAR
<i>G. pallida s. str.</i>	43	MK 1908				1	1	1	<i>Podocarpus henkelii</i>	JAR
<i>G. pallida s. str.</i>	43	pap27				1		1	<i>Gymnacranthera paniculata</i>	PG
OTU 47	47	U 418				1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 48	48	U 79				1	1	1	<i>Lithocarpus densiflorus</i>	USA, CA
OTU 48	48	U 95				1	1	1	<i>Quercus acrifolia</i>	USA, CA
OTU 49	48	U143				Kos.	1	1	<i>Pinus ponderosae</i>	USA, CA
OTU 49	48	U307a					1	1	<i>Pinus muricata</i>	USA, CA
OTU 49	48	U306a				Kos.	1	1	<i>Pinus radiata</i>	USA, CA
OTU 50	50	MK 1804				1	1		<i>Mangifera indica</i>	AU
OTU 51	51	U 417				1	1	1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 51	51	U 218				1	1	1	<i>Calocedrus decurrens</i>	USA, CA
OTU 51	51	U 197				1		1	<i>Pseudotsuga douglasii</i>	USA, CA
OTU 52	52	U130				1			<i>Sequoia sempervirens</i>	USA, CA
OTU 52	52	MK 538	3554			1	1	1	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	CZ
OTU 52	52	MK 1625	3648			1	1	1	<i>Olea europea</i>	ES
OTU 54	54	U205				1	1	1	<i>Pinus ponderosae</i>	USA, CA

OTU 55	55	U 154					1	<i>Pinus ponderosae</i>	USA, CA
OTU 55	55	U 166			1		1	<i>Chamaecyparis</i> sp.	USA, CA
OTU 55	55	U 185 b			1		1	<i>Prunus</i> sp.	USA, CA
OTU 55	55	U 29/30				1	1	<i>Amygdalus communis</i>	USA, CA
OTU 56	56	MK1812			1	1	1	broadleaved tree	PG
OTU 57	57	U 86			1	1	1	<i>Toxicodendron diversilobum</i>	USA, CA
OTU 57	57	U 215				1	1	<i>Artemisia arborea</i>	USA, CA
OTU 57	57	U 64				1	1	<i>Umbellularia californica</i>	USA, CA
OTU 59	59	MK 777				1	1	<i>Ficus carica</i>	JO
OTU 59	59	MK 1901				1	1	broadleaved tree	JAR
OTU 59	59	MK 1902			1	1	1	broadleaved tree	JAR
<i>E. terricola</i>	OUT	MH 231			1	1	1	soil	CZ

Amplifikace pomocí PCR a sekvenace

Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce 4. Pro amplifikace, které jsem prováděla na začátku své práce, jsem používala polymerázu Dynazyme (Finnzymes), později jsem přešla k používání srovnatelné polymerázy PerfectTaq (5 PRIME, Inc. Gaithersburg, MD). V tabulce 3 je uveden standardní cyklus teplot pro PCR.

Sekvence primerů spolu s publikacemi, z nichž pocházejí, jsou uvedeny v tabulce 5. V tabulce 6 jsou uvedeny primery, které byly předběžně testovány, ale nakonec nebyly vybrány pro další použití.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR (objemy jsou uvedeny v μl na 26,5 μl reakční směsi)

H ₂ O	15
pufr (dle použité polymerázy)	2,5
dNTP (2 mM)	2,5
primer forward (10 pmol/ μl)	2
primer reverse (10 pmol/ μl)	2
Dynazyme (2U/ μl)/ PerfectTaq(5U/ μl)	0,5/0, 13
vzorek DNA (5-100 ng/ μl)	2

Tabulka 4: Standardní cyklus teplot při PCR.

1) počáteční denaturace	95 °C	2:30 min	
2) denaturace	95 °C	0:30 min	30 ×
3) nasedání	55 °C	0:30 min	
4) extenze	72 °C	1:00 min	
5) závěrečná extenze	72 °C	9:00 min	

V případech, kdy se amplifikace pomocí standardního protokolu nezdařila, použila jsem některou z následujících optimalizací:

- Gradient teplot pro nasedání (45,4 °C, 48 °C, 50,7 °C a 53,5 °C).
- Prodloužená doba nasedání (1 min).
- Metoda „touchdown“ (V prvních pěti cyklech se teplota nasedání snižuje o stupeň z 58 °C na 53 °C, následuje 30 cyklů s teplotou nasedání 50 °C).
- Přidání 1, 5 nebo 10% dimethylsulfoxidu (DMSO) do reakční směsi.
- Nahrazení polymerázy Perfect Taq polymerázou Perfect Taq Plus (5 PRIME, Inc. Gaithersburg, MD) nebo polymerázou Maximo Taq (GeneOn).

Úspěšnost amplifikace jsem ověřovala elektroforézou na agarózovém gelu (0,5 g agarózy - SeaKem LE agarose, FMC, 70 ml pufru TBE a roztok etidiumbromidu do výsledné koncentrace 150 ng/ml), do kterého jsem nanášela 1,5 µl amplifikovaného vzorku smíchaného s nanášecím pufrům. Následně jsem amplifikované fragmenty vizualizovala v UV světle. Pro ověření přibližné velikosti a koncentrace amplifikovaného fragmentu jsem jako referenční vzorek používala genom lambda-fága (Biolabs) naštípáný restriční endonukleázou Bgl I (Fermentas) a naředěný na koncentraci 100 µg DNA/ml .

V případech, kdy byla koncentrace fragmentu nízká, jsem amplifikaci opakovala, přičemž místo vzorku DNA jsem použila dva mikrolitry reakční směsi s amplifikovaným fragmentem z předchozí reakce.

Čištění amplifikované DNA a sekvenaci prováděla firma Macrogen (Korea/Holandsko). Sekvenační primery byly totožné s primery pužitými k amplifikaci. Pro sekvenaci genu *Mcm* byl ve většině případů použit pouze primer *Mcm7- 709F*.

Tabulka 5: Primery použité pro fylogenetickou analýzu

gen	primer forward	sevence primeru forward	
elongační faktor 1-alfa	EF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf
Mcm	Mcm7- 709F	ACIMGIGTITCVGAYGTHAARCC	Schmitt <i>et al.</i> 2009
Tsr	Tsr1-1453F	GARTTCCCIGAYGARATYGARCT	Schmitt <i>et al.</i> 2009
RPB2	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu <i>et al.</i> , 1999
gen	primer reverz	sekvence primeru reverz	
elongační faktor 1-alfa	EF1-2218R	ATGACACCRACRGCRCRGRGTYTG	http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf
Mcm (druhá volba)	Mcm7-1447R	CATIACIGCIGCIGTRAGRCC	Schmitt <i>et al.</i> 2009
Mcm (první volba)	Mcm7-1348R	GAYTTDGCACICCCIGGRTCWCCCAT	Schmitt <i>et al.</i> 2009
Tsr	Tsr1-2308R	CTTRAARTAICCRTGIGTICC	Schmitt <i>et al.</i> 2009
RPB2	fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGYYTRCCCAT	Liu <i>et al.</i> , 1999

Tabulka 6: Ostatní testované primery

gen	primer forward	sevence primeru forward	
aktin	Act1Ex6	AACCACCGATCCAGACAGAGT	Craven <i>et al.</i> , 2001
cyklofilin	CycF	TAGYTTCTTCGAYMTYGAGTGGGAGG	Guidot <i>et al.</i> 2003
párovací faktor 1	M1F1	CG(A/G)GC(A/T)AA(A/G)CG(A/G)CCATT(G/T)AA(C/T)GC	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004
párovací faktor 2	M2F2	ACGCATATATT(T/C)TGACCG(T/C)AA	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004
mitochondriální SSU	MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	White <i>et al.</i> , 1990
endochitináza 42	Chit42-1a	GCTYTCCATCGGTGGC-TGGAC	Lieckfeldt <i>et al.</i> , 2000
kalmodulin	CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	Carbone <i>et Kohn</i> , 1999
elongační faktor 1-alfa	EF1-526F	GTC GTY GTY ATY GGH CAY GT	http://www.aftol.org/pdfs/EF1primer.pdf
elongační faktor 1-alfa	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Carbone <i>et Kohn</i> , 1999
mitochondriální ATP syntáza	ATPC1A	AGAWCAATTYGAARTRAGAG	Castlebury <i>et al.</i> , 2004
Beta-tubulin	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donell <i>et Cigel'nik</i> , 1997
gen	primer reverz	sekvence primeru reverz	
aktin	Act1Ex1	TAATCAGTCACATGGAGGGT	Craven <i>et al.</i> , 2001
cyklofilin	CycR	CGAACTTCTCGCGTAGATGGTCTT	Guidot <i>et al.</i> 2003
párovací faktor 1	M1R1	TT(G/T)CCCATCTC(A/G)TC(A/G)CGGA(C/T)(A/G)AA(A/G)GA	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004
párovací faktor 2	M2R2	GAAGGCTTTCG(A/T)GGT(T/ C)TGAC	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004
mitochondriální SSU	MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC	White <i>et al.</i> , 1990
endochitináza 42	Chit42-2a	GGAGTTGGGGTA-GCTCAGC	Lickfeldt <i>et al.</i> , 2000
kalmodulin	CAL-737R	CATCTTCTGCCCATCATGG	Carbone <i>et Kohn</i> , 1999
elongační faktor 1-alfa	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTACC	Carbone <i>et Kohn</i> , 1999
mitochondriální ATP syntáza	ATPC2A	ACAAAYACTTGWGCTTGKATWAAIGC	Castlebury <i>et al.</i> , 2004
Beta-tubulin	Bt-2b	ACCCTCAGTGATGTACCCTTGCC	Glass <i>et Donaldson</i> , 1995

Zpracování sekvencí

Kvalitu sekvencí jsem kontrolovala vizuálně na základě chromatogramů. Editaci sekvencí jsem prováděla v programu BioEdit (Hall, 1999).

Alignment sekvencí jsem prováděla rovněž v programu BioEdit, pomocí aplikace ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Následnou kontrolu a manuální úpravy jsem dělala s přihlédnutím na alignment translatovaný do proteinové sekvence. Z alignmentu *Tsr1* jsem před analýzou odstranila hypervariabilní region.

BioEdit jsem použila také pro spojení alignmentů pro čtyřgenovou analýzu. Chybějící sekvence jsem nahradila řetězcem „N“.

Velikost konečných alignmentů a počty variabilních pozic jsou uvedeny v tabulce číslo 7.

Nejlepší substituční model jsem pro každý alignment určila na základě Bayesiánského informačního kritéria (BIC) spočítaného programem MEGA 5 (www.megasoftware.net)(Tamura *et al.* 2011). Vybrané modely jsou uvedeny v tabulce 7.

Fylogenetickou analýzu algoritmem Maximum likelihood jsem provedla v programu MEGA 5.05. Parametry standardního nastavení jsem neměnila, kromě substitučního modelu a počtu bootstrapů, který jsem zvýšila na 500.

Bayesovskou analýzu jsem prováděla prostřednictvím www.biportal.uio.no (Kumar *et al.*, 2009) programem MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck *et Ronquist*, 2001, Ronquist *et Huelsenbeck*, 2003) metodou Markov Chain Monte Carlo se dvěma paralelními běhy po čtyřech řetězcích o teplotě 0,2. Parametry modelu byly počítány pro každou pozici zvlášť (unlink revmat = (all); unlink Tratio = (all); unlink statefreq = (all); unlink shape = (all); unlink pinvar = (all);). Nastavení substitučního modelu bylo nst=2 pro Mcm a Tsr, nst=6 pro *TEF-1α* a *RPB2*. Analýzy jednotlivých genů běžely 5 000 000 generací, analýza spojeného datasetu běžela přibližně 20 000 000 generací a byla ukončena. Zaznamenán byl každý tisící strom. Jako “burn-in” bylo odstraněno prvních 20% stromů. V rámci genů byly 1., 2. a 3. pozice tripletů brány jako odlišné “partitions”, spojený dataset byl navíc rozdělen na “partitions” jednotlivých genů. To, zda se řetězce ustálily na maximum, jsem kontrolovala v programu Tracer v1.5 (Rambaut and Drummond 2007). Výsledný strom byl vytvořen metodou “50% majority rule consensus”.

Grafické úpravy vypočítaných stromů byly prováděny v programech MEGA 5.05, SeaView version 4 (Galtier *et al.*, 1996, Gouy *et al.*,2010) a v PowerPointu.

Tabulka 7: Délka použitých alignmentů, počty variabilních a informativních pozic a zvolené substituční modely. Čísla v závorkách se týkají datasetů s vyloučením outgroupu.

lokus	<i>Mcm7</i>	<i>RPB2</i>	<i>TEF-1alfa</i>	<i>Tsr1</i>
počet pozic zahrnutých do analýzy	593	1081	924	807
počet variabilních pozic	244 (228)	523 (434)	258 (238)	422 (394)
počet pozic informativních pro parsimonii	216 (215)	415 (412)	224 (223)	377 (377)
relativní zastopení informativních pozic	36,40%	38,40%	24,20%	46,70%
substituční model	T92+G+I	GTR+G+I	TN93+G+I	TN93+G+I

Výsledky

Výběr genů

Úspěšnost PCR pro jednotlivé kombinace primerů je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8: Úspěšnost PCR testovaných kombinací primerů

gen	primer forward	primer reverz	podíl úspěšnosti PCR
aktin	Act1Ex6	Act1Ex1	PCR neúspěšná
Aktin - 40°C	Act1Ex6	Act1Ex1	1/10 vzorků
cyklofilin	CycF	CycR	7/20 vzorků
			nízká úspěšnost sekvenace
mitochondriální ATP syntáza	ATPC1A	ATPC2A	2/17 vzorků
mitochondriální SSU	MS1	MS2	1/10 vzorků
chitin syntáza 42	Chit42-1a	Chit42-2a	PCR neúspěšná
kalmodulin	CAL-228F	CAL-737R	PCR nespecifická
elongační faktor 1-alfa	EF1-526F	EF1-986R	1/10 vzorků
elongační faktor 1-alfa	EF1-728F	EF1-986R	20/20 vzorků
			krátký fragment
elongační faktor 1-alfa	EF1-983F	EF1-2218R	102/130 vzorků
elongační faktor 1-alfa	EF1-728F	EF1-2218R	nespecifická PCR
Mcm	Mcm7- 709F	Mcm7- 1348R	78/100 vzorků
Tsr	Tsr1-1453F	Tsr1-2308R	63/102 vzorků
RPB2	fRPB2-5F	fRPB2-7cR	23/62
párovací faktor 1	M1F1	M1R1	PCR neúspěšná
párovací faktor 2	M2F2	M2R2	2/16 vzorků
Beta-tubulin	T1	Bt-2b	20/20 vzorků

Většina testovaných kombinací primerů měla velmi nízkou úspěšnost.

Pro *TEF-1 α* jsem zkoušela různé kombinace primerů. Z nich EF1-278F a EF1-986R měly vysokou úspěšnost (76/82 vzorků). Velikost tohoto fragmentu u rodu *Geosmithia* ovšem byla pouze okolo 280 bází a proto tento fragment nebyl použit. Pro analýzu byl nakonec vybrán fragment ohraničený kombinací primerů EF1-983F a EF1-2218R. Pro rodovou fylogenezi byly vybrány geny pro *TEF-1 α* , *RPB2*, *Tsr1* a *Mcm7*. Oproti původnímu plánu nebyl do analýzy zařazen gen pro β -tubulin, který se sice ve většině případů dařilo amplifikovat, ale nebylo možné provést spolehlivý alignment v měřítku celého rodu. Zvolené kombinace primerů jsou uvedeny v tabulce 5 v kapitole Metodika.

Barcoding druhového komplexu 8, 36, 37 a 38

Z genů, které nebyly zařazeny do fylogenetických analýz se podařilo získat sekvence pouze od cyklofilinu. Primery CycF a CycR umožnily amplifikaci všech druhů komplexu OTU8, 36,37,38, ačkoli pro část vzorků bylo potřeba zvýšit teplotu nasedání, neboť při standardní PCR vznikaly dva fragmenty odlišné délky. Spolehlivě čitelné chromatogramy ale byly získány jen od kmenů AK 36/97 (OTU 8), MK 1712a (OTU 8) a A2-Ab (OTU 38).

Od beta-tubulinu, *RPB2*, *Tsr1* a *Mcm7* byly získány sekvence od všech studovaných izolátů. Od *TEF-1α* se nepodařilo získat sekvenci OTU 38.

Počty variabilních pozic pro jednotlivé lokusy jsou uvedeny v tabulce 9.

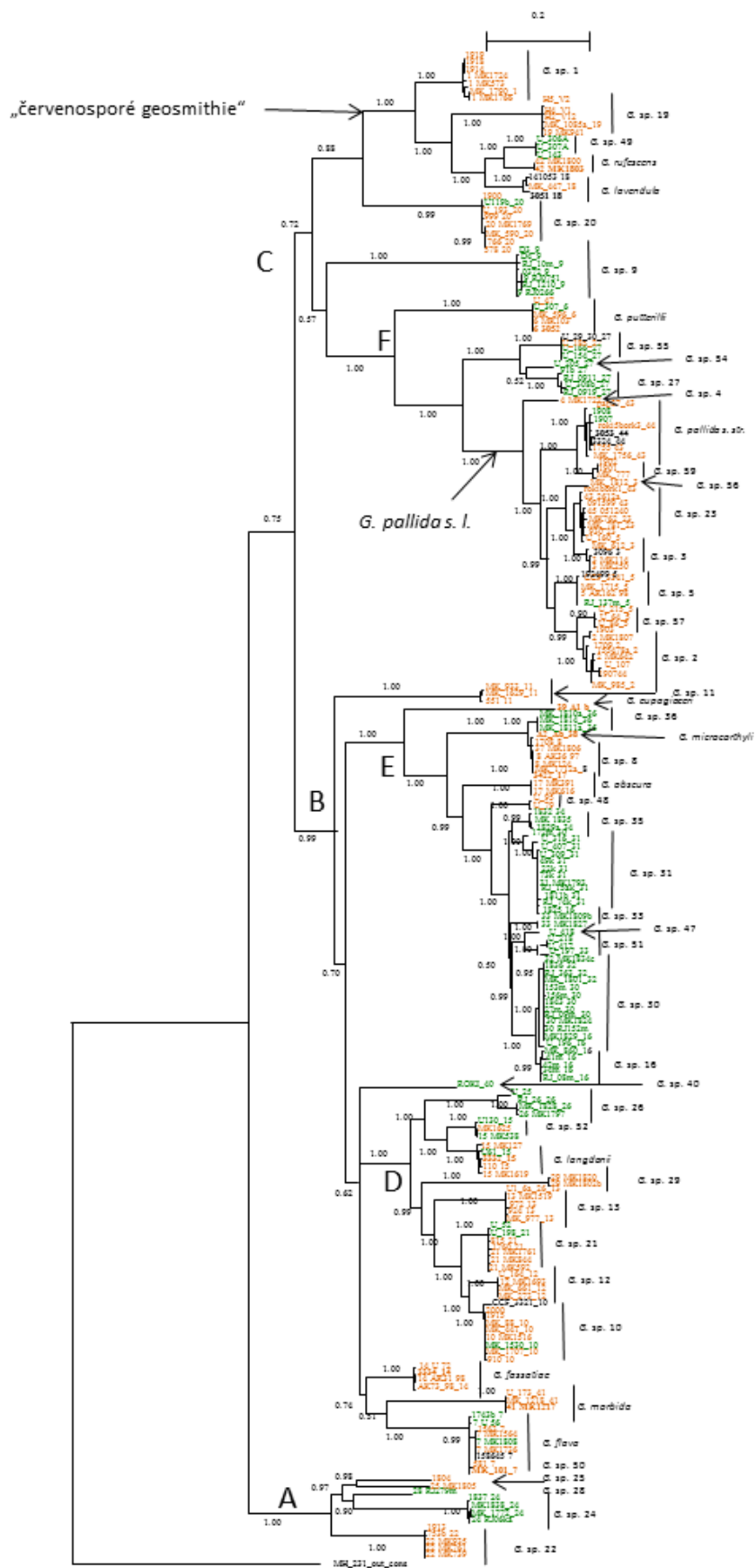
Tabulka 9: Variabilní pozice jednotlivých lokusů v druhovém komplexu OTU 8, OTU 36, OTU 37 a OTU 38

lokus	cyklofilin	tub	mcm	rpb	tef	tsr
délka alignmentu	510	620	580	944	825	741
zahrnuté OTU	8,38	8, 36, 37, 38	8, 36, 37, 38	8, 36, 37, 38	8, 36,37	8, 36, 37, 38
8 vs. 36		2	2	3	10	9
8 vs. 37		1	0	0	0	0
8 vs. 38	2 (+1x2)	2 (+1)	0	1		3
počet variabilních pozic mezi OTU 8 a 38	4	3	0	1		9
procento variabilních pozic mezi OTU 8 a 38	0,78	0,48	0,00	0,11	0,00	1,21

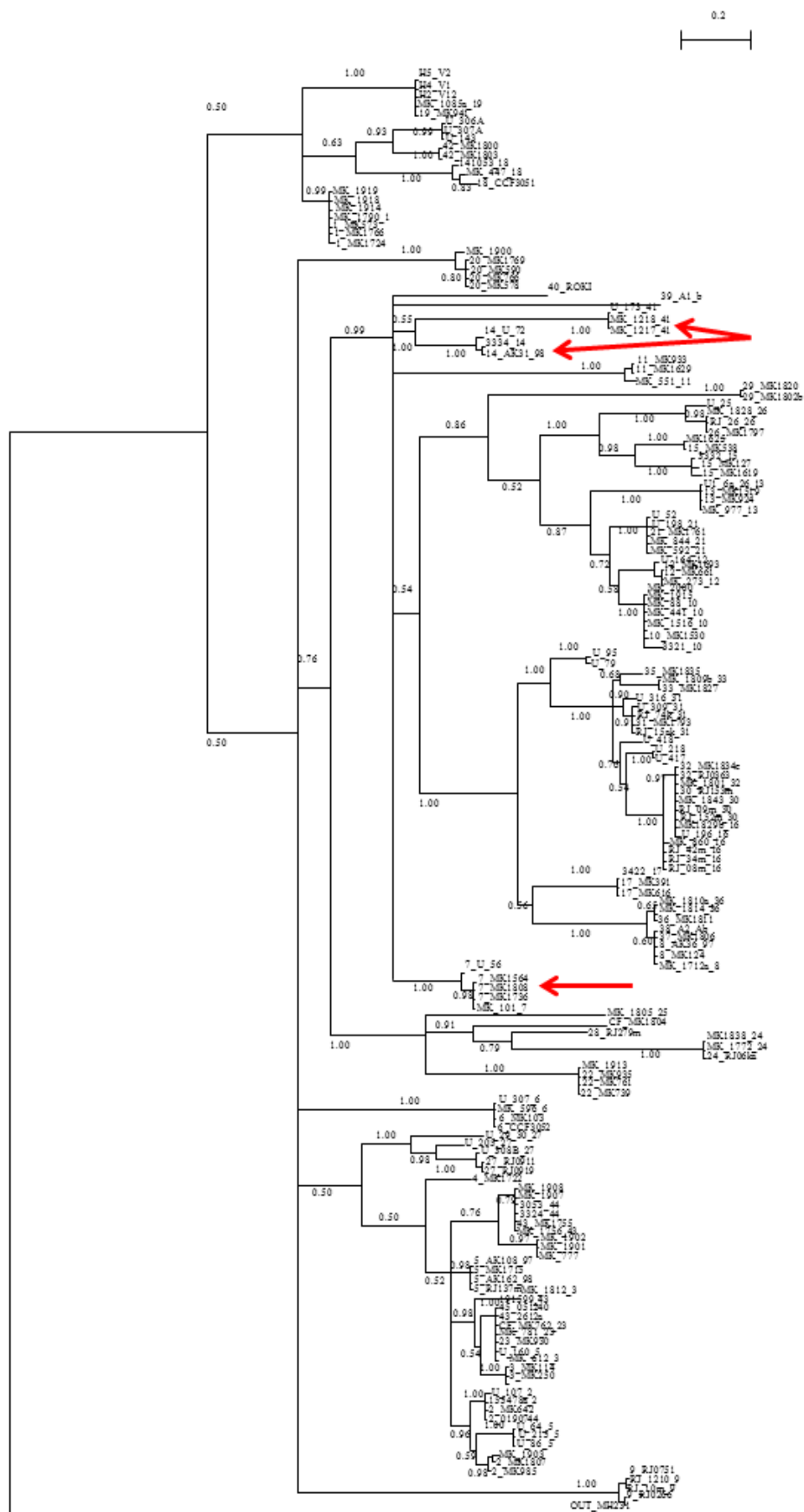
Fylogenetická analýza

Pro fylogenetickou analýzu rodu jsem použila sekvence *TEF-1α* od 181 vzorků, *Mcm7* od 168 vzorků, *Tsr1* od 162 vzorků a *RPB2* od 192 vzorků. Alignmenty ve formátu NEXUS (tak, jak byly použity pro bayesovskou analýzu) jsou přílohami elektronické verze mé diplomové práce.

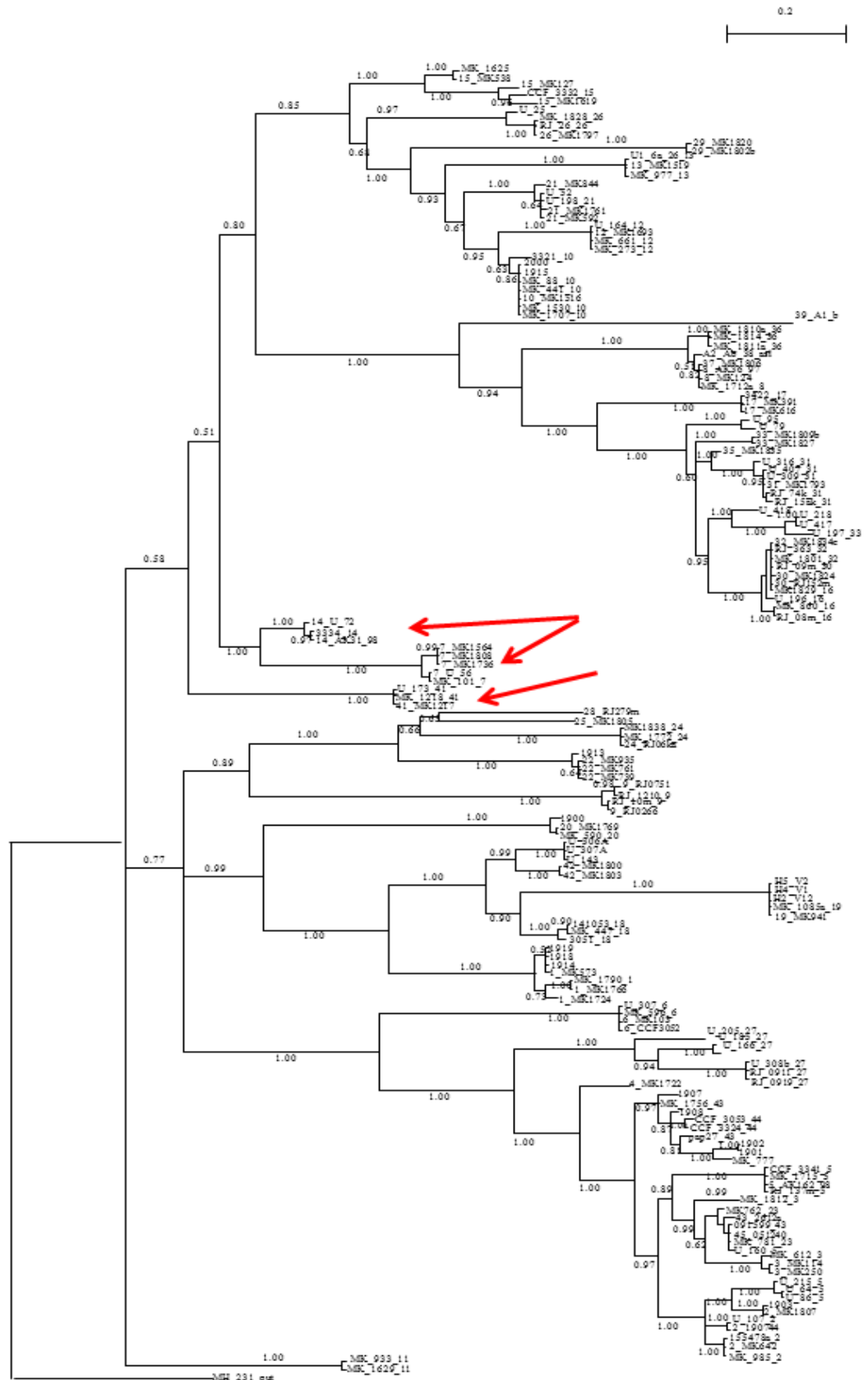
Stromy z Bayesovské analýzy jsou na obrázcích 1-5. Na obrázku 1 jsou na fylogenetický strom namapovány ekologické znaky, jsou na něm vyznačeny popsané druhy i rozlišené linie. Fylogenetické stromy získané metodou Maximum likelihood a bayesovské stromy v lepším rozlišení jsou přílohou elektronické verze mé diplomové práce.



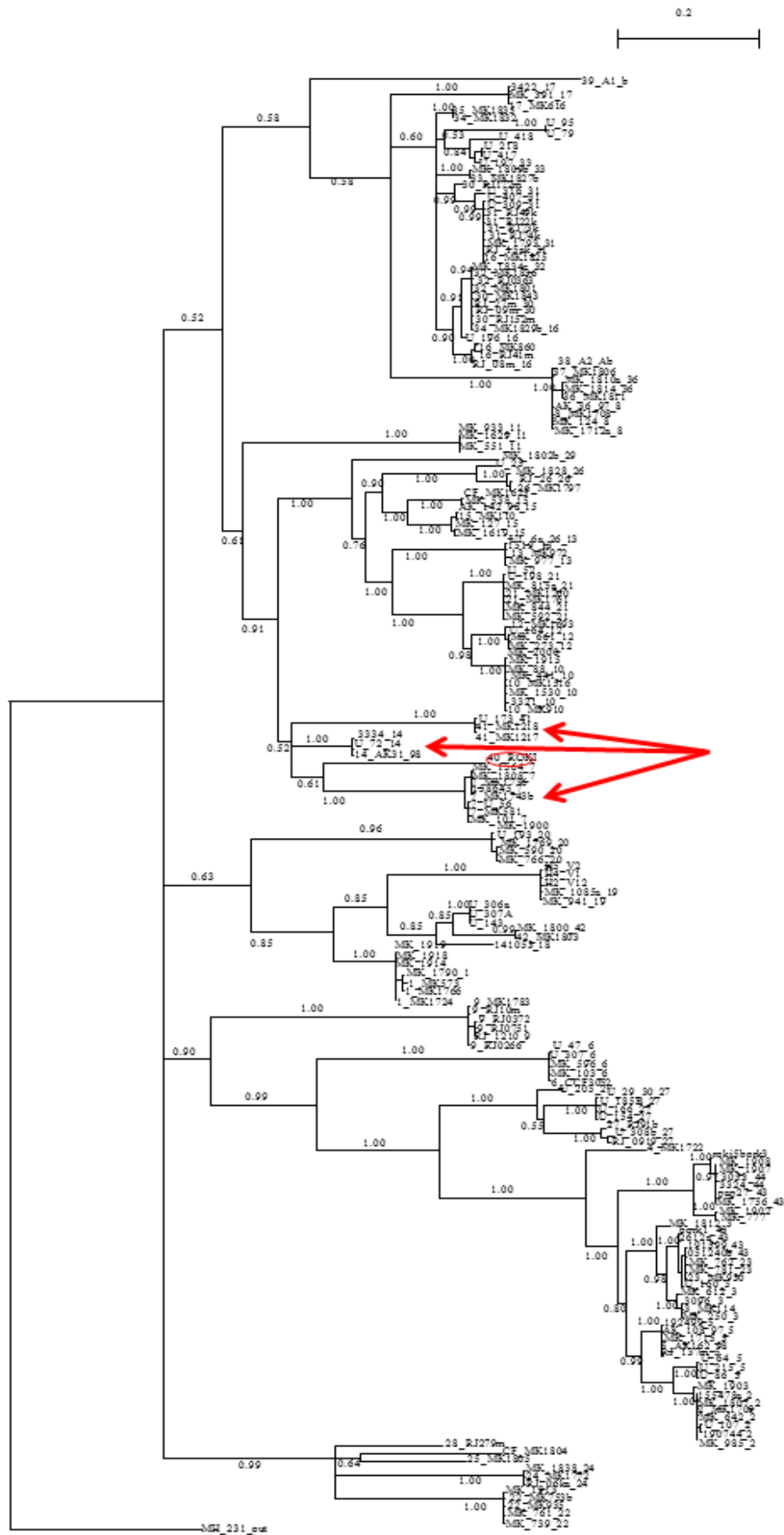
Obrázek 1: Fylogenetický strom vzniklý spojením všech datasetů. Izoláty z jehličnanů jsou značeny zeleně, izoláty z listnáčů okrově. Větev vedoucí k outgroupu byla krácena 4x.



Obrázek 2: Fylogenetický strom založený na genu Mcm7. Šipky označují druhy, v jejichž pozici jsou mezi jednotlivými geny rozpory.



Obrázek 3: Strom založený na genu Tsr1. Šipky označují druhy, v jejichž pozici jsou mezi jednotlivými geny rozpory. Větev vedoucí k outgroupu byla krácena 6x.



Obrázek 4: Strom založený na genu RPB2. Šipky označují druhy, v jejichž pozici jsou mezi jednotlivými geny rozpory. Větev vedoucí k outgroupu byla krácena 10x.

Bayesovská analýza rozlišila tři hlavní linie.

Bazální linie A, jejíž monofylie je stoprocentně podpořena, obsahuje australské izoláty MK 1804 (OTU 50) a MK 1805 (OTU 25), dále druhy OTU 24 a OTU 28 známé z evropy z hostitelských rostli čeledi Pinaceae a OTU 22 z listnáčů.

V rámci dobře podpořené linie B je bazální OTU 11 z listnáčů (nalézána nejčastěji ve Středomoří na olivovnicích). Dále tato linie obsahuje stoprocentně podpořenou skupinu E zahrnující ambrosiovou *G. eupagioceri*, komplex blízce příbuzných druhů OTU 8, OTU 36 a OTU 38, a dobře podpořenou větev s druhy *G. obscura* a OTU 48 z listnáčů a komplexem druhů z čeledi Pinaceae (OTU 16, OTU 30, OTU 31, OTU 33, OTU 35, OTU 47 a OTU 51). třetí skupinou v rámci linie B je slabě podpořená větev obsahující taiwanský izolát ROKI (OTU 40), dále druhy *G. obscura*, *G. morbida* a *G. flava*, jejichž vzájemné příbuzenské vztahy se nepodařilo spolehlivě rozřešit, a dobře podpořenou linii D, v rámci které jsou rozlišeny dvě další větve s dobrými podporami. První z nich zahrnuje OTU 26 z čeledi Pinaceae a sesterské druhy *G. langdonii* a OTU 52 se širokým hostitelským spektrem, druhá obsahuje OTU 29, která byla nalezena v Kostarice asociována s ambrosiovými kůrovci, a OTU 13, OTU 21, OTU 12 a OTU 10 z listnáčů.

Linie C má slabou podporu a obsahuje skupinu červenosporých geosmithií (*G. lavendula*, *G. rufescens*, OTU 1, OTU 19 a OTU 49) a jejich sesterský druh OTU 20, dále OTU 9 z Pinaceae a stoprocentně podpořenou linii F. V rámci této je bazální druh *G. putterillii* (OTU 6) a dále zde jsou dvě stoprocentně podpořené větve. Jedna obsahující druhy OTU 27, OTU 54 a OTU 55, druhá představující komplex *G. pallida sensu lato*.

Diskuse

Úspěšnost PCR a možnosti barcodingu

Většina testovaných kombinací primerů se pro rod *Geosmithia* nesvědčila kvůli nízké úspěšnosti amplifikace. U genů pro párovací faktory to může být způsobeno tím, že u rodu *Geosmithia* není známo pohlavní rozmnožování a je možné, že párovací faktory ztratily svou funkci a následně i konzervovanost sekvencí, k nimž jsou primery navrženy.

Nízká úspěšnost PCR u různých kombinací primerů není ničím výjimečným. Například Feau *et al.* (2011) srovnávali účinnost standardní PCR amplifikace při teplotě nasedání primerů 55°C pro různé geny. Zatímco u některých (*TEF-1 α* , *kalmmodulin*) se jim požadovaný fragment nepodařilo amplifikovat vůbec, u jiných (*γ -aktin*, *histon 4*, *chitin syntáza I*, *β -tubulin*) naopak došlo k nespecifické amplifikaci více fragmentů. Nespecifická amplifikace se objevila i u *RPB1*, kde pravděpodobně docházelo zároveň k amplifikaci dalších podjednotek RNA polymerázy I a III (Tanabe *et al.*, 2004).

Od druhového komplexu OTU 8, 36, 37 a 38 se podařilo získat sekvence pouze od β -tubulinu, *TEF-1 α* , *RPB2*, *Tsr1*, *Mcm7* a cyklofilinu. Kromě OTU 36 se ale v sekvencích vyskytovalo jen málo odlišností. V sekvencích *Mcm7* se dokonce ostatní OTU nelišily vůbec. OTU 8 a OTU 37 měly shodné i sekvence *RPB2* a *Tsr1*. Od cyklofilinu a *TEF-1 α* se nepodařilo získat sekvence všech OTU. Z genů, u nichž byly k dispozici sekvence všech OTU, se jako nejslibnější jeví *Tsr1* odlišující OTU 36 devíti substitucemi a OTU 38 třemi substitucemi od zbylých dvou OTU. Pro rozlišení OTU 8 a OTU 37 ale selhává. Kolařík *et Kirkendall* (2010) zkoumali variabilitu *ITS*, beta-tubulinu, *RPB2* a *TEF-1 α* a *IGS* mezi OTU 8 a OTU 38. Z jejich srovnání vyšel nejlépe fragment *TEF-1 α* o délce 265 bází se čtyřmi odlišnými pozicemi (tj. s podílem variabilních pozic 1,51%), který se tedy pro účely barcodingu jeví jako vhodnější než mnou zkoumané lokusy. Zde se ovšem jedná o intron, zatímco já jsem z genu *TEF-1 α* amplifikovala exon (vybrala jsem jej za účelem rodové fylogeneze, možností využití pro barcoding jsem se u tohoto lokusu zabývala až sekundárně). Výhodou *Tsr1* pro účely barcodingu je relativně snadná amplifikace univerzálními primery.

Vhodnost použitých lokusů pro fylogenezi rodu

Gen pro β -tubulin se ukázal být příliš variabilní, takže většinu pozic nebylo možné spolehlivě přiřadit. Příčinou je, že se jedná z větší části o intronovou sekvenci a druhy v rámci rodu *Geosmithia* nejsou dostatečně blízce příbuzné, aby bylo na tubulinových sekvencích možné provést jednoznačný alignment. K podobnému závěru došli i Roets *et al.* (2009), kteří se pokoušeli použít beta-tubulin pro rekonstrukci evoluce rodu *Ophiostoma* na čeledi Proteaceae v kapské oblasti.

Geny *Mcm7*, *Tsr1*, *TEF-1 α* a *RPB2* jsou až na výjimky amplifikovatelné univerzálními primery a vzhledem ke kódujícímu charakteru sekvencí je lze snadno a jednoznačně alignovat. Pro rekonstrukci fylogeneze na rodové úrovni se jeví vhodnější geny *Tsr1* a *RPB2*, zatímco geny *Mcm7* a *TEF-1 α* selhávají v rozlišení hlubších fylogenetických vztahů. Gen *Tsr1* má relativně nejvíce pozic informativních pro parsimonii vzhledem ke své délce.

Fylogeneze rodu *Geosmithia*

V rodu *Geosmithia* se vyskytuje několik samostatných linií vázaných na čeleď Pinaceae. Jedná se o druhy OTU 24 a OTU 28 v linii A, OTU 26 v linii D, OTU 27 a snad i sesterskou OTU 54 v linii F, OTU 9, OTU 49 patřící mezi červenosporé geosmithie a v rámci linie E jednak OTU 36 z cedrů a jednak diverzifikovanou skupinu druhů OTU 16, OTU 30, OTU 31, OTU 33, OTU 35, OTU 47 a OTU 51. Tato ekologie se zřejmě vyvinula v rodu *Geosmithia* mnohokrát a je stabilní, neboť vyžaduje výrazné adaptace na nehostinné prostředí (Kolařík *et al.* Jankowiak, in press).

Podobně je tomu v případě „ambrosiové“ ekologie. Podle fylogenetických vztahů lze předpokládat, že každá ze tří známých „ambrosiových“ geosmithií - *G. microcorthyli*, *G. eupagioceri* a OTU 29 - získala adaptace potřebné k této ekologické strategii nezávisle.

Z evolučního hlediska je zajímavé, že dobře podpořená linie E obsahuje jak 2 ze tří známých ambrosiových geosmithií, tak zároveň i diverzifikovanou skupinu druhů specifických pro hostitelské rostliny čeledi Pinaceae. Je možné, že tato linie má nějakou fyziologickou preadaptaci, která umožňuje snazší osidlování nehostinných substrátů nebo usnadňuje vznik silné symbiózy s přenašečem.

Čtyřgenová analýza potvrdila, že již dříve popsána (Kolařík *et al.* Kirkendall, 2010) rychlá ekologická diferenciace v druhovém komplexu OTU 8, OTU 36 a OTU 38 je opravdu velmi recentní událostí. OTU 38 se od OTU 8 lišila jen v několika málo pozicích a izolát MK 1806 z australských akácií, který byl původně na základě odlišného hostitele považován za samostatný druh OTU 37, měl všechny sekvence zcela totožné s ostatními izoláty OTU 8.

Druhým podobným případem recentní ekologické diferenciaci je OTU 19. Typické izoláty MK 941 a MK 1085a byly asociovány s kůrovci na smokvoních v mediteránní oblasti. Ukázalo se však, že jim velmi blízké jsou další tři izoláty (H4-V1, H5-V2 a H2-V12), které byly izolovány ve střední Evropě jako endofyté vrb. Nejedná se ovšem o projev široké ekologické valence, nýbrž o dvě značně vyhraněné alternativní ekologie.

Bohužel se nepodařilo vyjasnit fylogenetické vztahy patogenní *G. morbida*. Ve čtyřgenové analýze se jako její sesterský druh jeví *G. flava* a k nim oběma sesterský druh *G. fassatae*, ale v obou případech se slabou podporou. Gen *Mcm7* ukazuje jako sesterské druhy *G. morbida* a *G. fassatae*, ale opět se špatnou podporou. Gen *Tsr1* ukazuje se stoprocentní podporou jako sesterské druhy *G. flava* a *G. fassatae*, zatímco druh *G. morbida* umísťuje na bázi špatně podpořené větve, která kromě *G. flava* a *G. fassatae* obsahuje i zhruba polovinu zbylých druhů geosmithií. Gen pro *TEF-1α* naopak ukazuje rovněž se stoprocentní podporou sesterskou pozici druhů *G. flava* a *G. morbida*, bez vztahu ke *G. fassatae*. Gen pro RPB2 spojuje všechny 3 druhy do slabě podpořené linie ještě s OTU 40, vztahy uvnitř této linie ovšem nerozlišuje.

Zajímavým výsledkem je také rozdělení izolátů do druhů *G. langdonii* a OTU 52. Předpokládalo se, že americké izoláty podobné druhu *G. langdonii* by mohly představovat samostatnou linii. Izoláty blízké *G. langdonii* se skutečně rozdělily do dvou zřetelných a stoprocentně podpořených linií, avšak nezávisle na geografickém původu – oba taxony obsahují jak evropské, tak i americké zástupce.

Podobná situace nastala i u druhů OTU 27, OTU 54 a OTU 55. OTU 54 a OTU 55 sice obsahují výhradně americké izoláty, ale do OTU 27 se kromě evropských izolátů zařadil též americký izolát U 308b.

Obecně lze říci, že celá řada druhů má kosmopolitní rozšíření a vyskytují se jak v Euroasii, tak i v USA a/nebo v Jihoafrické republice (např. OTU 1, OTU 20, *G. putterillii*, OTU 21, *G. fassatae*, *G. flava* a další).

Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D., Mgr. Martinovi Kostovčíkovi a RNDr. Sylvě Pažoutové CSc. za četné rady, dále své fakultě, svým rodičům a přátelům za podporu morální, materiální a intelektuální, a též daňovým poplatníkům, kteří mou práci podpořili prostřednictvím grantu GAUK 0788/2012.

Literatura

Aguileta G, Marthey S, Chiapello H, Lebrun MH, Rodolphe F, Fournier E, Gendrault-Jacquemard A, Giraud T (2008) Assessing the Performance of Single-Copy Genes for Recovering Robust Phylogenies. *Systematic Biology* **57**: 613-627

Ahmad I, Malloch D (1999) An evaluation of carbon and nitrogen assimilatory patterns for taxonomic differentiation of *Penicillium* species. *Mycologia* **91**: 1031-1044

Balter M (1997) Evolutionary biology - Morphologists learn to live with molecular upstarts. *Science* **276**: 1032-1034

Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2009) The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1456-1462

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 99-108

Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**: 426-438

Byers JA (2004) Chemical Ecology of Bark Beetles in a Complex Olfactory Landscape Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. *In* F Lieutier, KR Day, A Battisti, J-C Grégoire, HF Evans, eds. Springer Netherlands, pp 89-134

Cafaro MJ (2005) Eccrinales (Trichomycetes) are not fungi, but a clade of protists at the early divergence of animals and fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 21-34

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 181-213.

Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **91**: 553-556

Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW (2004) Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research* **108**: 864-872

Chen W, Seifert KA, Levesque CA (2009) A high density COX1 barcode oligonucleotide array for identification and detection of species of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Molecular Ecology Resources* **9 Suppl s1**: 114-129

Cizkova D, Srutka P, Kolarik M, Kubatova A, Pazoutova S (2005) Assessing the pathogenic effect of *Fusarium*, *Geosmithia* and *Ophiostoma* fungi from broad-leaved trees. *Folia Microbiologica* **50**: 59-62

Craven KD, Hsiau PTW, Leuchtman A, Hollin W, Schardl CL (2001) Multigene phylogeny of *Epichloe* species, fungal symbionts of grasses. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 14-34

Crous PW, Rong IH, Wood A, Lee S, Glen H, Botha W, Slippers B, de Beer WZ, Wingfield MJ, Hawksworth DL (2006) How many species of fungi are there at the tip of Africa? *Studies in Mycology* **55**: 13-33

De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, Marquesen M, Decastro R, Liu YC, Sutton DA, Wickes BL, Kammeyer PL, Sigler L, Sullivan K, Kang EM, Malech HL, Holland SM, Zelazny AM (2011) *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases* **52**: 136-143

Diezmann S, Cox CJ, Schonian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG (2004) Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5624-5635

Eberhardt U (2010) A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. *New Phytologist* **187**: 265-268

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* **334**: 519-522

Elder JF, Jr., Turner BJ (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology* **70**: 297-320

Farrell BD, Sequeira AS, O'Meara BC, Normark BB, Chung JH, Jordal BH (2001) The evolution of agriculture in beetles (*Curculionidae*: *Scolytinae* and *Platypodinae*). *Evolution* **55**: 2011-2027

Feau N, Decourcelle T, Husson C, Desprez-Loustau ML, Dutech C (2011) Finding single copy genes out of sequenced genomes for multilocus phylogenetics in non-model fungi. *PLoS One* **6**: e18803

Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 543-548

Ganley AR, Kobayashi T (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research* **17**: 184-191

Gelperin D, Horton L, Beckman J, Hensold J, Lemmon SK (2001) Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA* **7**: 1268-1283

Gilmore SR, Grafenhan T, Louis-Seize G, Seifert KA (2009) Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. *Molecular Ecology Resources* **9 Suppl s1**: 90-98

Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrere J, Degand N, Mely L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A (2010) *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 2381-2386

Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1323-1330

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2012) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 221-224

Griffith GS, Boddy L (1990) Fungal decomposition of attached angiosperm twigs. 1. Decay community development in ash, beech and oak. *New Phytologist* **116**: 407-415

Grizzle HW, Zak JC (2006) A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity on nitrogen substrates. *Mycologia* **98**: 353-363

Gueidan C, Roux C, Lutzoni F (2007) Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in Verrucariaceae (Verrucariales, Ascomycota). *Mycological Research* **111**: 1145-1168

Guidot A, Johannesson H, Dahlberg A, Stenlid J (2003) Parental tracking in the postfire wood decay ascomycete *Daldinia loculata* using highly variable nuclear gene loci. *Molecular Ecology* **12**: 1717-1730

Hall TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98

Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity – magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* **95**: 641-655

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Sciences* **270**: 313-321

Hermet A, Meheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* **116**, 692-705.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547

Hirt RP, Logsdon JM, Jr., Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM (1999) Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**: 580-585

Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, Lutzoni F (2007) Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 412-426

Houbraken J, Samson RA (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, 1-51

Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC (2012). *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **101**: 403-421

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**:754-755

Hujšlova M, Kubatova A, Chudickova M, Kolarik M (2010) Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Natural Reserve, Czech republic. *Mycological Progress* **9**: 1-15

Hulcr J, Kolarik M, Kirkendall LR (2007) A new record of fungus-beetle symbiosis in Scolytodes bark beetles (Scolytinae, Curculionidae, Coleoptera). *Symbiosis* **43**: 151-159

Husson C, Scala B, Caël O, Frey P, Feau N, Ioos R, Marçais B (2011) *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology* **130**: 311-324

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822

Jankowiak R, Kolařík M (2010) Fungi associated with the fir bark beetle *Cryphalus piceae* in Poland. *Forest Pathology* **40**: 133-144

Kalina T, Váňa J (2005) *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum, Praha

Kearsey SE, Labib K (1998) MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochimica et Biophysica Acta* **1398**: 113-136

Kirisits T (2004) Fungal Associates of European Bark Beetles With Special Emphasis on the Ophiostomatoid Fungi. *In* F Lieutier, KR Day, A Battisti, J-C Grégoire, HF Evans, eds. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. Springer Netherlands, pp 181-236

Kirschner R (2001) Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in Central Europe. *In* JK Misra, BW Horn, eds, Trichomycetes and Other Fungal Groups. Science publishers, Enfield, NH

Kolarik M, Freeland E, Utley C, Tisserat N (2011) *Geosmithia morbida* sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (*Pityophthorus juglandis*) on *Juglans* in USA. *Mycologia* **103**: 325-332

Kolarik M, Jankowiak R (in press) Vector affinity and diversity of *Geosmithia* fungi living on subcortical insects inhabiting Pinaceae species in Central and Northeastern Europe. *Microbial Ecology*

Kolarik M, Kirkendall LR (2010) Evidence for a new lineage of primary ambrosia fungi in *Geosmithia* Pitt (Ascomycota: Hypocreales). *Fungal Biology* **114**: 676-689

Kolarik M, Kostovcik M, Pazoutova S (2007) Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota : Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *Mycological Research* **111**: 1298-1310

Kolarik M, Kubatova A, Cepicka I, Pazoutova S, Srutka P (2005) A complex of three new white-spored, sympatric, and host range limited *Geosmithia* species. *Mycological Research* **109**: 1323-1336

Kolarik M, Kubatova A, Hulcr J, Pazoutova S (2008) *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: Evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology* **55**: 65-80

Kolarik M, Kubatova A, Hulcr J, Pazoutova S (2008) *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: Evidence from their community structure in temperate Europe. *Microbial Ecology* **56**: 198-199

Kolarik M, Kubatova A, Pazoutova S, Srutka P (2004) Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov and *G. flava* sp nov., associated with subcorticolous insects. *Mycological Research* **108**: 1053-1069

Kostovčik M (2006) Molekulárne genetická a morfológická analýza komplexu *Geosmithia lavendula*. Diplomová práca PŕF UK.

Koukol O (2010) Revision of “*Septonema ochraceum*” revealed three new species of Venturiaceae and Herpotrichiellaceae. *Mycological Progress* **9**: 369-378

Kowalski T, Kehr RD (1992) Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia* **44**: 31

Kubátová A, Kolařík M, Prášil KB, Novotný D (2004) Bark beetles and their galleries: well known niches for little known fungi on the example of *geosmithia*. *Czech mycology* **56**: 1-18

Kumar S, Skjæveland Å, Orr RJS, Enger P, Ruden T, Mevik B, Burki F, Botnen A, Shalchian-Tabrizi K (2009) AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC Bioinformatics* **10**:357

Leavitt SD, Johnson L, St Clair LL (2011) Species delimitation and evolution in morphologically and chemically diverse communities of the lichen-forming genus *Xanthoparmelia* (Parmeliaceae, Ascomycota) in western North America. *American Journal of Botany* **98**: 175-188

Lieckfeldt E, Cavignac Y, Fekete C, Borner T (2000) Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. *Microbiological Research* **155**: 7-15

Lieckfeldt E, Seifert KA (2000) An evaluation of the use of ITS sequences in the taxonomy of the Hypocreales. *Studies in Mycology* **45**: 35-44

Lieutier F (2004) Host Resistance to Bark Beetles and Its Variations. *In* F Lieutier, KR Day, A Battisti, J-C Grégoire, HF Evans, eds. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Springer Netherlands, pp 135-180

Lindner DL, Banik MT (2011) Intragenomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. *Mycologia* **103**: 731-740

Liu YJ, Hall BD (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**: 4507-4512

Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1799-1808

Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung GH, Lucking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim YW, Matheny B, Nishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I, Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R (2004) Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* **91**: 1446-1480

Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A, Debourgogne A, Coignard H, Lecuit M, Bougnoux ME, Blanche S, Lortholary O (2011) Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 1681-1683

Matheny PB (2005) Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 1-20

Miller AN, Huhndorf SM (2005) Multi-gene phylogenies indicate ascomal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the Sordariales (Ascomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **35**: 60-75

Morgenstern I, Powlowski J, Ishmael N, Darmond C, Marqueteau S, Moisan MC, Quenneville G, Tsang A (2012). A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal Biology* **116**, 489-502.

Mueller UG, Gerardo NM, Aanen DK, Six DL, Schultz TR (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **36**: 563-595

Nishihara H, Hasegawa M, Okada N (2006) Pegasoferae, an unexpected mammalian clade revealed by tracking ancient retroposon insertions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **103**: 9929-9934

Odonnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **7**: 103-116.

Ogawa H, Yoshimura A, Sugiyama J (1997) Polyphyletic origins of species of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analysis. *Mycologia* **89**: 756-771

Okada G, Seifert KA, Takematsu A, Yamaoka Y, Miyazaki S, Tubaki K (1998) A molecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1495-1506

Peterson SW, Jurjevic Z, Bills GF, Stchigel AM, Guarro J, Vega FE (2010) Genus *Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *Mycologia* **102**: 847-864

Pitt JI (1970) *Geosmithia* gen. nov. for *Penicillium lavendulum* and related species. *Canadian Journal of Botany* **57**: 2021-2030

Raja HA, Schoch CL, Hustad VP, Shearer CA, Miller AN (2011) Testing the phylogenetic utility of *MCM7* in the Ascomycota. *MycKeys* **1**: 63-94

Reeb V, Lutzoni F, Roux C (2004) Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 1036-1060

Roets F, Wingfield MJ, Crous PW, Dreyer LL (2009) Fungal radiation in the Cape Floristic Region: An analysis based on *Gondwanamyces* and *Ophiostoma*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 111-119

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574

Rossman AY, McKemy JM, Pardo-Schultheiss RA, Schroers HJ (2001) Molecular studies of the Bionectriaceae using large subunit rDNA sequences. *Mycologia* **93**: 100-110

Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AFA, Houbraken J, Frisvad JC (2004) Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial P-tubulin sequences. *Studies in Mycology* **49**: 175-200

Samson RA, Yilmaz N, Houbraken J, Spierenburg H, Seifert KA, Peterson SW, Varga J, Frisvad JC (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* **70**: 159-183.

Schmitt I, Crespo A, Divakar PK, Fankhauser JD, Herman-Sackett E, Kalb K, Nelsen MP, Nelson NA, Rivas-Plata E, Shimp AD, Widhalm T, Lumbsch HT (2009) New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* **23**: 35-40

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **16**: 6241-6246

Seifert KA (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* **9 Suppl s1**: 83-89

Sieber TN (1989) Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research* **92**: 322-326

Sieber TN, Siebercanavesi F, Dorworth CE (1991) Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Canadian Journal of Botany* **69**: 407-411

Simpson AG, Roger AJ (2004) The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* **14**: 693-696

Six D (2003) Bark Beetle-Fungus Symbioses. *In* K Bourtzis, J Miller, eds, *Insect Symbioses*. CRC PRESS, Boca Raton London New York Washington D.C., pp 97-114

Sohn JY, Jang MA, Lee JH, Park KS, Ki CS, Lee NY (2013). Isolation and Identification of *Geosmithia argillacea* from a Fungal Ball in the Lung of a Tuberculosis Patient. *Annals of Laboratory Medicine* **33**, 136-140.

Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Rosete YA, Guarro J, Scott JA (2011) *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* **68**: 139-162

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731-2739

Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 α and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**: 438-449

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal genetics and Biology* **31**: 21-32

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680

Vialle A, Feau N, Allaire M, Didukh M, Martin F, Moncalvo JM, Hamelin RC (2009) Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Molecular Ecology Resources* **9**: 99-113

White TJ, Bruns T, Lee SB, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds, *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California, pp 315-322

Xia, X. (2013). DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* doi:[10.1093/molbev/mst064](https://doi.org/10.1093/molbev/mst064)

Yokoyama E, Yamagishi K, Hara A (2004) Development of a PCR-based mating-type assay for Clavicipitaceae. *Fems Microbiology Letters* **237**: 205-212

Zhao P, Luo J, Zhuang W, Liu X, Wu B (2011) DNA barcoding of the fungal genus *Neonectria* and the discovery of two new species. *Science in China / Life Sciences* **54**: 664-674

Zhao P, Luo J, Zhuang WY (2011) Practice towards DNA barcoding of the nectriaceous fungi. *Fungal Diversity* **46**: 183-191

Zipfel RD, de Beer ZW, Jacobs K, Wingfield BD, Wingfield MJ (2006) Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* **55**: 75-97

Zoller S, Scheidegger C, Sperisen C (1999) PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *Lichenologist* **31**: 511-516