

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Lukáš Janošík**

Pohlavný systém vreckatých húb radu Pezizales

Sexual system of the ascomycetes from order Pezizales

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha, 2018

### **Prohlášení**

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

V Praze, 10. 5. 2018

.....

Lukáš Janošík

## **Pod'akovanie**

Veľké pod'akovanie patrí predovšetkým môjmu školiteľovi, doc. Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D., za množstvo dobrých rád a hodnotných pripomienok, obetavé vedenie a zasvätenie do štúdia mikroskopických askomycétov. Ďakujem tiež Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D., za podnetné diskusie o rozmnožovaní húb a metódach používaných pri ich štúdiu. Veľmi vďačný som aj mojim priateľom a rodine, obzvlášť Bc. Kláre Daňkové, Mgr. Helene Janošíkovej a Mgr. Michaelu Mikátovi, za cenné rady, pomoc a gramatickú korektúru.

## **Abstrakt**

Pohlavné rozmnožovanie je nevyhnutnou súčasťou života mnohých vrekatých húb. Na základe toho či tvorba plodníc s askospórmi vyžaduje dvoch opačne ladených partnerov, sa pritom jednotlivé druhy zvyknú deliť na homothalické a heterothalické. Z recentnejších štúdií je však zrejmé, že toto rozdelenie pohlavných systémov je výrazne zjednodušené a pod homothalizmom sa skrýva väčšie množstvo rozmanitých mechanizmov. Prvá časť bakalárskej práce sa venuje rozmnožovaniu, pohlavným systémom a ich evolúcii u vrekatých húb (Ascomycota). Jadrom práce je následne súhrn doterajších poznatkov o pohlavných systémoch húb z radu Pezizales. Postupne sú diskutované známe údaje o zástupcoch jednotlivých čeľadí, ktoré sú potom aj sumarizované a zhodnotené vo svetle ich fylogeniezy a ekológie.

## **Kľúčové slová**

Pezizales, Ascomycota, rozmnožovanie, pohlavné systémy, homothalizmus, heterothalizmus, *MAT* gény

## **Abstract**

Sexual reproduction is essential part of life for numerous ascomycetes. Based on their requirement for opposite partner to produce fruiting bodies with ascospores, fungi can be in general divided into two mating systems – homothallism and heterothallism. However, several recent studies suggest that this division is clearly simplified and homothallism is an umbrella term for diverse sexual behaviours. First part of this thesis is focused on the reproduction, mating systems and their evolution in division Ascomycota. The main part summarizes present knowledge about the mating systems of the fungi from order Pezizales. Observations about the members of individual families are discussed, summed up and reviewed in the light of phylogeny and ecology.

## **Key words**

Pezizales, Ascomycota, reproduction, mating systems, homothallism, heterothallism, *MAT* genes

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Rozmnožovanie vrekatých húb.....	1
2.1 MAT gény .....	2
2.2 Pohlavné systémy .....	3
2.2.1 Heterothalizmus.....	4
2.2.2 Homothalizmus .....	4
2.2.3 Evolúcia pohlavných systémov .....	7
3 Metódy používané na určenie pohlavného systému.....	8
3.1 Kultivačné experimenty .....	8
3.2 Analýza MAT génov .....	8
3.3 Populačne-genetické analýzy .....	10
4 Čiaškotvaré (Pezizales) .....	13
4.1 Pohlavný systém zástupcov radu Pezizales .....	14
4.2 Konzervovanosť pohlavného systému.....	21
4.3 Vzťah pohlavného systému a ekológie.....	23
4.4 Štruktúra MAT lokusu.....	23
5 Záver.....	26
6 Literatúra .....	27

## 1 Úvod

Vreckaté huby (Ascomycota) sú druhovo najbohatšia skupina húb s veľmi rozmanitými ekologickými stratégiami aj morfológiou. Patrí tu množstvo druhov jednobunkových kvasiniek, ako aj široké spektrum vláknitých húb. Veľkú časť tvoria napríklad saprofágovia schopní rozkladať organickú hmotu, avšak početnými skupinami sú aj mutualisti a paraziti rôznych živočíchov, rastlín či iných eukaryot. Jednotliví zástupcovia sú pritom schopní osídliť rôznorodé a občas aj extrémne ekosystémy, v ktorých mnohokrát zohrávajú aj dôležitú rolu (McLaughlin & Spatafora, 2014).

Askomycéty dosahujú veľkú rozmanitosť zároveň aj v rozmnožovacích stratégiách. Vo všeobecnosti sa dá povedať, že u väčšiny druhov sa aspoň do určitej miery vyskytuje pohlavné rozmnožovanie, no poznáme aj druhy, ktoré sú takmer výlučne asexuálne (Nieuwenhuis & James, 2016). Podľa toho či pri pohlavnom rozmnožovaní môžu spolu splynúť bunky jedného jedinca, alebo sa musia stretnúť dva opačne pohlavne ladené jedince, delíme pritom huby na homothalické a heterothalické (Blakeslee, 1904; Coppin et al., 1997). Recentné práce ale ukazujú, že pod pojmom homothalizmus sa ukrýva množstvo rôznych mechanizmov a pohlavné systémy húb sú omnoho rozmanitejšie a dynamickejšie než by sa mohlo zdať (Gioti et al., 2012; Ni et al., 2011; A. M. Wilson et al., 2015)

Historicky sa veľká časť štúdií homothalizmu a heterothalizmu venovala hubám z radu Pezizales. Väčšina predstaviteľov tejto čeľade sa rozmnožuje prevažne pohlavne a pochopenie pohlavných systémov je tak dôležité nie len pre lepšie porozumeniu ich reprodukcie a evolúcie, ale hrá zásadnú rolu aj pri kultivácii či výskume šírenia mnohých ekonomicky významných zástupcov (Belfiori et al., 2013; Du et al., 2017; Andrea Rubini et al., 2011). Cieľom mojej bakalárskej práce je stručne charakterizovať rozmnožovanie vreckatých húb, pohlavné systémy a základné metódy používané na ich určenie a predovšetkým zhrnúť doterajšie poznatky o homothalizme a heterothalizme u zástupcov radu Pezizales.

## 2 Rozmnožovanie vreckatých húb

Rozmnožovanie húb je veľmi rôznorodé a len u máloktovej skupiny eukaryot dosahuje podobnej rozmanitosti a komplexnosti (Paul S. Dyer, 2008). Nepohlavné rozmnožovanie zabezpečujú predovšetkým asexuálne spóry a úlomky hýf. Jedná sa pritom o bunky produkované mitózou, ktoré sú tak geneticky zhodné s pôvodným mycéliom. Ich produkcia je obvykle rýchlejšia než v prípade askospór, keďže nevyžadujú oplodnenie ani tvorbu špecializovaných plodníc (Billiard et al., 2012). Striktne asexuálnym druhom ale môžu chýbať výhody plynúce z rekombinácie, a môžu tak napríklad trpieť v dôsledku akumulácie delečných mutácií (Muller, 1964). Vreckaté huby sú ale obvykle po väčšinu svojho života haploidné, čo má za následok, že selekčný tlak proti škodlivým mutáciám je

u nich v porovnaní s prevažne diploidnými organizmami oveľa silnejší (Orr & Otto, 1994). U mnohých z nich môže navyše vďaka parasexuálnemu procesu dochádzať aj k mitotickej rekombinácii (Pontecorvo, 1956; Schoustra et al., 2007). Počas tohto procesu totiž dochádza po fúzii vegetatívnych buniek k vzniku diploidnej bunky, ktorá sa následne postupne mitoticky delí, v priebehu čoho ale u nej môže vzácne dochádzať aj k rekombinácii. Pohlavné rozmnožovanie ale okrem rekombinácie poskytuje aj mnohé ďalšie výhody, ako napríklad ochranu pred šírením vírusov a transpozónov (Coenen et al., 1997; Van Diepeningen et al., 2008, Galagan & Selker, 2004). Askospóry sú navyše aj výrazne odolnejšie a dlhovejšie než spóry asexuálne (Perkins & Turner, 1988; Piit & Christian, 1970), hoci to sa môže vzhľadom na veľkú morfológickú variabilitu jednotlivých typov spór u rôznych skupín húb pomerne výrazne líšiť.

Pohlavné rozmnožovanie je u vreckatých húb relatívne konzervované a jeho schéma platí s menšími modifikáciami pre väčšinu vláknitých zástupcov (Nieuwenhuis & James, 2016). Začína plazmogamiou, pri ktorej dochádza k fúzii samičieho askogónia a samčieho anterídia. Pohlavné orgány môžu byť pritom u jednotlivých húb rozdielne diferencované a v niektorých skupinách tak napríklad nájdeme do rôznej miery rozlíšený receptívny trichogyn vyrastajúci z askogónia či hýfový obal. Anterídia sú navyše zase často nahradené asexuálnymi spórmi – spermáciami (Swingle, 1934). Jednotlivé haploidná jadrá obvykle ihneď po oplodnení nespĺývajú, ale dávajú vzniknúť dikaryotickým hýfam. Na nich potom vzniká aj dvojjadrový prekurzor vrecka, proaskus, v ktorom dôjde ku karyogamii a tvorbe diploidnej zygoty. Tá sa následne delí meiózou, počas ktorej dochádza ku crossing-overu, a je tak zásadným krokom z hľadiska zvyšovania genetického polymorfizmu. Štyri jadrá sa ešte zvyčajne mitoticky rozdelia, čím vznikne osem haploidných jadier predstavujúcich základ ôsmich výtrusov.

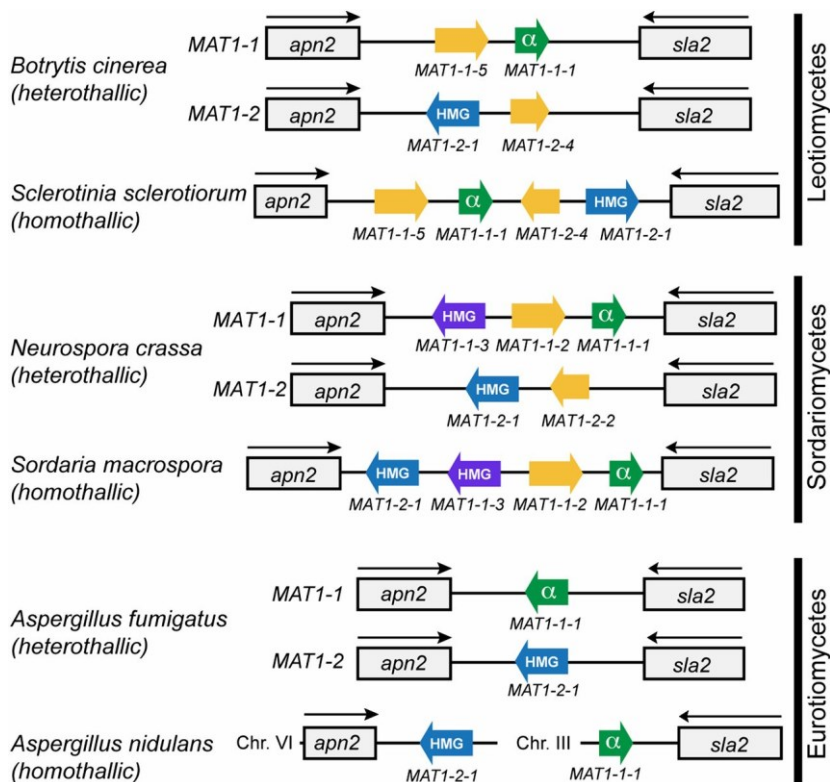
Proporcia striktne asexuálnych či naopak sexuálnych druhov je pritom zrejme veľmi nízka. Zdá sa, že väčšina húb sa nachádza skôr niekde na kontinuu medzi nimi a vyskytujú sa u nich oba spôsoby rozmnožovania, ktoré sú akurát u jednotlivých predstaviteľov rôzne časté (Nieuwenhuis & James, 2016).

## 2.1 *MAT* gény

Centrálnu rolu pri riadení pohlavného rozmnožovania zastávajú párovacie *MAT* (mating type) gény (Hiscock & Kües, 1999; Kronstad & Staben, 1997). U vreckatých húb sa obvykle nachádza jeden *MAT* lokus s dvoma alelami *MAT1-1* a *MAT1-2*, hoci obzvlášť u niektorých modelových organizmov sa stretáme aj s inými označeniami (Turgeon & Yoder, 2000). Vzhľadom na to, že sú ale jednotlivé alely sekvenčne výrazne odlišné a je otázne či majú spoločný evolučný pôvod, zvyknú sa obvykle označovať ako idiomorfy (Metzenberg & Glass, 1990). Obe pritom kódujú DNA väzobné domény, ktoré pôsobia ako transkripčné faktory regulujúce širokú paletu ďalších génov podieľajúcich sa na pohlavnom procese

(Herskowitz, 1989; Jacobsen et al., 2002). Kľúčový je predovšetkým gén *MAT1-1-1* kódujúci proteín s alfa doménou a gén *MAT1-2-1* kódujúci proteín s HMG (high mobility group) doménou (Coppin et al., 1997). Pre pohlavné rozmnožovanie a jeho iniciáciu je pritom u väčšiny druhov nevyhnutná expresia oboch týchto génov (Ni et al., 2011).

Presná organizácia celého *MAT* lokusu je však variabilná a u mnohých vreckatých húb môže navyše obsahovať aj niektoré ďalšie *MAT* gény (obrázok 1) (Debuchy & Turgeon, 2006; Palmer et al., 2014). U iných oddelení húb, ako aj u najbazálnejšieho pododdelenia askomycétov – Taprinomycotina, môžu však *MAT* gény kódovať aj mierne odlišné typy regulátorov expresie (Martin et al., 2010).

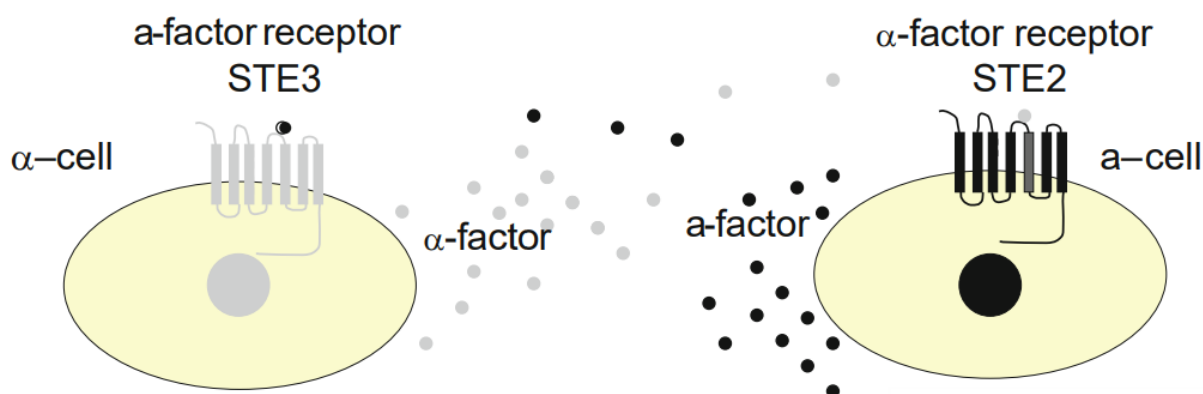


**Obrázok 1:** Usporiadanie *MAT* lokusu u vybraných homothallických a heterothallických zástupcov pododdelenia Pezizomycotina. Prevzaté z (Palmer et al. (2014).

## 2.2 Pohlavné systémy

U pohlavne sa rozmnožujúcich húb rozlišujeme dva základné pohlavné systémy, homothalizmus a heterothalizmus. Zjednodušene platí, že kým druhy homothalické sú schopné oplodniť samé seba, heterothalické druhy vyžadujú k pohlavnému rozmnožovaniu druhého partnera s opačným párovacím typom (Coppin et al., 1997). Jednotlivé *MAT* idiomorfy pritom určujú práve príslušnosť ku konkrétnemu párovaciemu typu a regulujú okrem iného rozpoznávanie partnerov pomocou systému feromónov a receptorov (obrázok 2) (Herskowitz, 1989; Pöggeler, 2011; Stanton et al., 2010).





**Obrázok 2:** Signalizácia medzi bunkami opačných párovacích typov u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Nomenklatúra je u tohto druhu mierne odlišná a párovacie typy sa nazývajú  $\alpha$  a  $a$  miesto štandardného označenia *MAT1-1* a *MAT1-2*. Prevzaté z (Pöggeler, 2011).

### 2.2.1 Heterothalizmus

Heterothalizmus a existencia párovacích typov boli u húb popísané už na začiatku 20. storočia (Blakeslee, 1904). U ascomycétov bol tento pohlavný systém prvý krát zistený u niektorých zástupcov rodov *Ascobolus* a *Neurospora* (B. O. Dodge, 1920; B O Dodge, 1927). Vzhľadom na to, že sú u tejto skupiny pohlavné typy kódované jedným lokusom s dvoma idiomorfami, hovoríme o bipolárnom heterothalizme (Whitehouse, 1949). Heterothalické druhy sa pritom na rozdiel od väčšiny homothalických druhov vyznačujú prítomnosťou len jedného z dvojice esenciálnych párovacích génov a ich *MAT* lokus tak obsahuje buď *MAT1-1-1* alebo *MAT1-2-1* (obrázok 1) (Shiu & Glass, 2000). K pohlavnému rozmnožovaniu preto u húb s týmto pohlavným systémom dochádza len v prípade, že spolu interagujú jedinci s odlišnými *MAT* idiomorfami. Príslušníci jednotlivých párovacích typov sa však nelíšia v pohlavných orgánoch a obvykle tvoria oba typy gamiet (Gwynne-Vaughan & Williamson, 1932; Whitehouse, 1949).

### 2.2.2 Homothalizmus

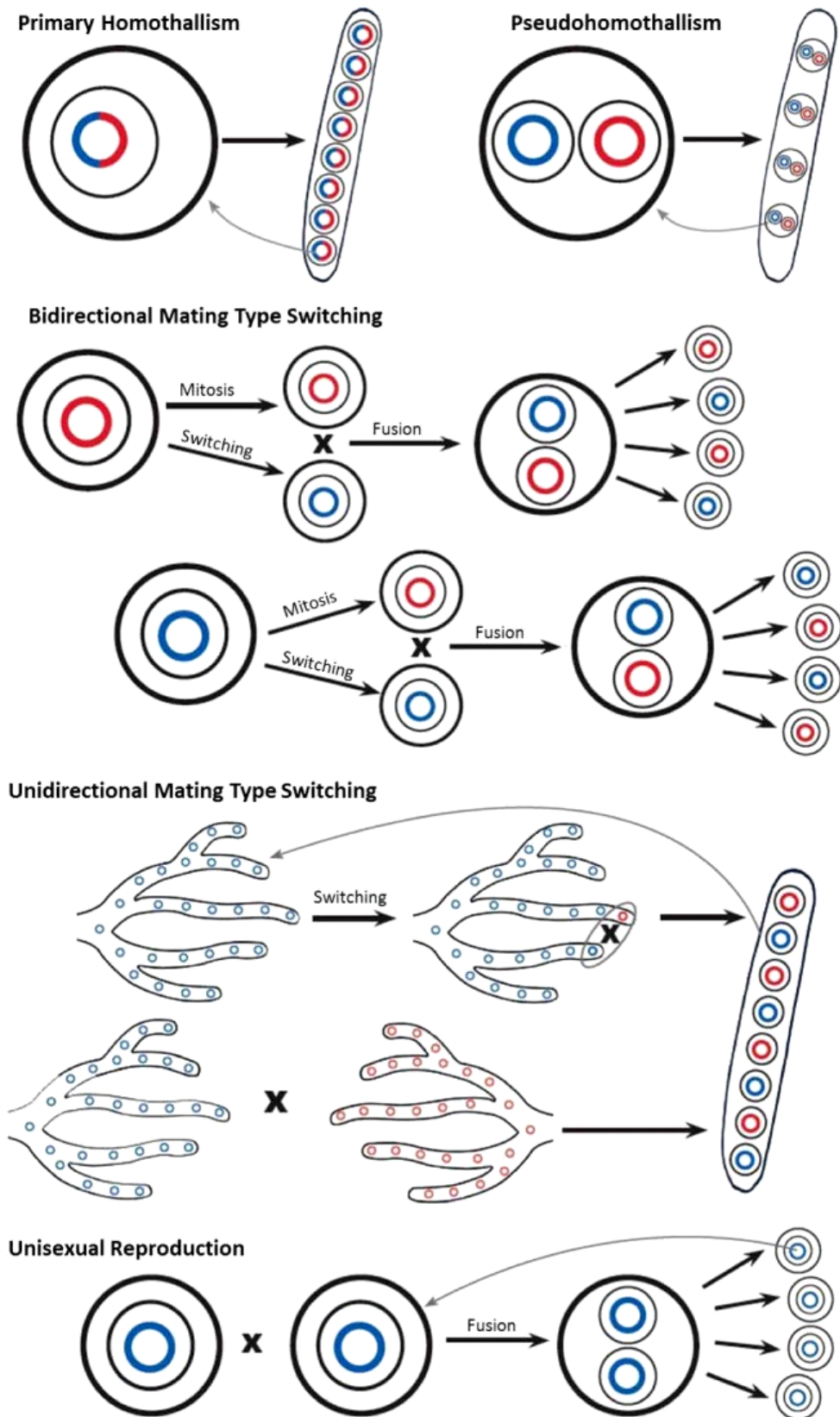
Historický pohľad na homothalizmus bol značne zjednodušený a v súčasnosti je jasné, že tento pohlavný systém zahŕňa niekoľko odlišných mechanizmov umožňujúcich samooplodnenie (obrázok 3) (A. M. Wilson et al., 2015). Najrozšírenejším je primárny homothalizmus, u ktorého sa v rámci jedného jadra vyskytujú aj exprimujú oba základné *MAT* gény (A. M. Wilson et al., 2015). Tie sú pritom obvykle

lokalizované spoločne v *MAT* lokuse, hoci u niektorých druhov sa môžu nachádzať aj oddelene na rôznych miestach v genóme (P. S. Dyer et al., 2003; S. H. Yun et al., 1999).

Ďalším známym systémom je pseudohomothalizmus. Podobne ako je tomu u typických heterothalických druhov, aj tu *MAT* lokus obsahuje spravidla buď gén *MAT1-1-1* alebo *MAT1-2-1*. V tomto prípade však vegetatívne bunky a aj výtrusy obsahujú súčasne dve opačne pohlavne ladené jadrá (Coppin et al., 1997; B O Dodge, 1927). Pseudohomothalické huby majú najčastejšie vrecká so štyrmi veľkými výtrusmi. V nízkej frekvencii sa však u nich vyskytujú aj vrecká s viacerými výtrusmi, u ktorých je potom ale časť askospór menšia a jednojadrová (Grognet & Silar, 2015). Vreckaté huby s týmto typom pohlavného systému nájdeme napríklad v rodoch *Neurospora*, *Podospora* a *Gelasinospora*, hoci aj medzi nimi sa mechanizmy udržiavajúce askospóry v heterokaryotickom stave mierne odlišujú (Grognet & Silar, 2015; Raju & Perkins, 1994).

Niektoré druhy vreckatých húb sú zasa schopné prepínať medzi jednotlivými párovacími typmi (mating type switching). Najlepšie je tento systém preskúmaný u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá dokáže prostredníctvom génovej konverzie *MAT* génov z neaktívnych lokusov ľubovoľne prepínať medzi párovacími typmi v oboch smeroch (bidirectional mating type switching) (Haber, 1998; Nasmyth & Tatchell, 1980). Mierne odlišný systém nájdeme napríklad aj u druhu *Hypocrea spinulosa*. Jedinci jedného párovacieho typu si dokážu zmeniť pohlavné ladenie časti svojich jadier, avšak príslušníci druhého párovacieho typu vyžadujú k pohlavnému rozmnožovaniu vždy aj opačne ladeného partnera a medzi párovacími typmi prepínať nedokážu (unidirectional mating type switching) (S.-H. Yun et al., 2017).

U viacerých skupín bolo dokonca popísané pohlavné rozmnožovanie aj medzi jedincami patriacimi k rovnakému párovaciemu typu (unisexual reproduction) (Alby et al., 2009; Lin et al., 2005; Schaefer et al., 2007). Tieto huby tak zjavne nevyžadujú expresiu oboch základných *MAT* génov, ktorá je u väčšiny ostatných druhov esenciálna (Roach et al., 2014).

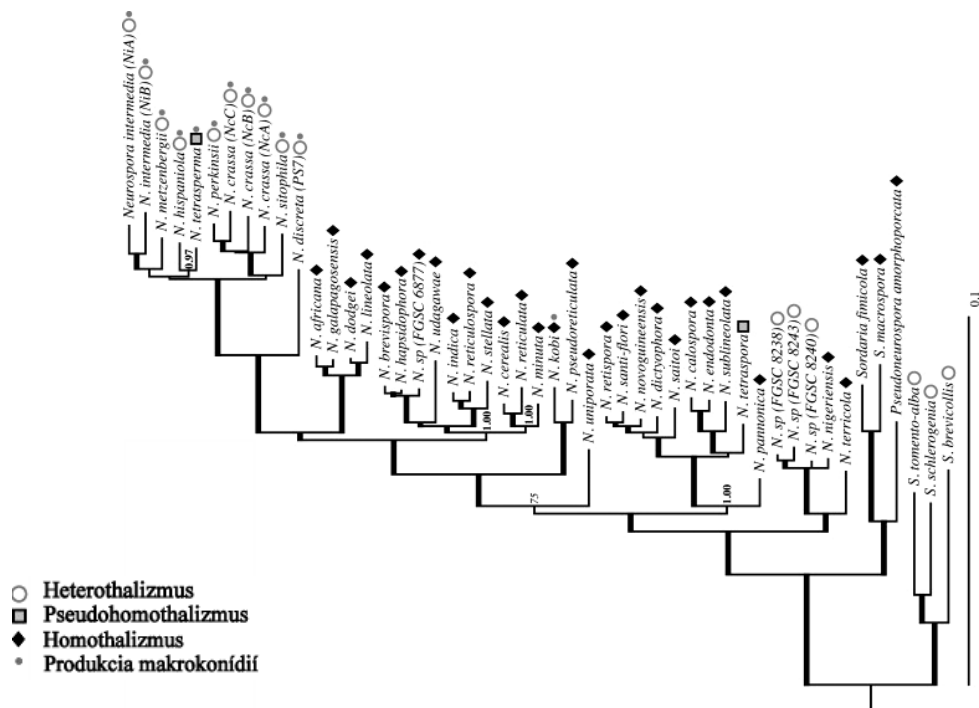


**Obrázok 3:** Rozdielne mechanizmy prejavujúce sa ako homothalizmus u vreckatých húb. Príslušnosť jadier k jednotlivým párovacím typom je farebne rozlíšená. Prevzaté z (A. M. Wilson et al., 2015).

### 2.2.3 Evolúcia pohlavných systémov

Zmeny medzi jednotlivými pohlavnými systémami sú u väčšiny skupín húb relatívne časté a aj v rámci jedného rodu či dokonca druhu môžeme nájsť heterotalických aj homotalických zástupcov (obrázok 4) (Chilvers et al. 2014; Inderbitzin et al. 2006; Kostriken et al. 1983; Nygren et al. 2011). To či homotalizmus vznikol z heterotalizmu a akým smerom k prechodom medzi týmito stratégiami môže dochádzať, bolo ale dlhú dobu predmetom diskusií (Lin & Heitman, 2007; Nauta & Hoekstra, 1992; Nygren et al., 2011). V súčasnosti sa ako pravdepodobnejšia pritom javí možnosť, že homotalizmus predstavuje slepú uličku a opakovane sekundárne vzniká z heterotalizmu (Gioti et al., 2012, 2013; Inderbitzin et al., 2005). V rode *Aspergillus* poznáme prípady, kedy zrejme došlo u pôvodne primárne homotalického druhu k strate jedného zo základných párovacích génov. Ich *MAT* lokus už tak pripomína skôr heterotalické askomycéty (resp. jednu z *MAT* idiomorf), avšak zatiaľ u týchto húb nebol pozorovaný pohlavný proces a je tak otáznе či sú vôbec schopné sa sexuálne rozmnožovať (Galagan et al., 2005). Špecifickým prípadom sú aj homotalické huby u ktorých sa vyskytuje mating type switching, ako napríklad kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá sa pri poruche tohto mechanizmu môžu správať ako heterotalická (Kostriken et al., 1983).

Zásadnú úlohu pri prechode na primárny homotalizmus majú pritom pravdepodobne predovšetkým nevyvážený crossing-over a translokácia DNA pomocou transpozónov (Gioti et al., 2012), ktoré zabezpečia, že sa v jadre vyskytujú spolu *MAT1-1-1* aj *MAT1-2-1*. Niekedy by však túto zmenu mohol sprostredkovať aj horizontálny génový prenos, k čomu zrejme došlo napríklad u rodu *Stemphylium* (Inderbitzin et al., 2005).



Obrázok 4: Pohlavný systém u zástupcov rodu *Neurospora*. Upravené z (Nygren et al., 2011).

### 3 Metódy používané na určenie pohlavného systému

#### 3.1 Kultivačné experimenty

Medzi klasické metódy používané pri štúdiu pohlavných systémov patrili už od počiatku minulého storočia kultivačné experimenty (Blakeslee, 1904; B. O. Dodge, 1920). Typicky pritom vychádzajú z faktu, že homothalické druhy sú schopné vďaka samooplodneniu pohlavne rozmnožovať a obvykle tiež tvoriť plodnice aj v prípade že mycélium pochádza z jedinej spóry (monospórická kultúra). Naproti tomu u heterothalických druhov prebehne pohlavný proces iba v prípade, že kultúra pochádza z väčšieho množstva výtrusov (polyspórická kultúra) alebo sa im umožní interakcia medzi aspoň dvoma monospórickými kultúrami s opačným pohlavným ladením (Blakeslee, 1904; Coppin et al., 1997). Sledovanie mycélií a tvorby plodníc dopestovaných z jednotlivých výtrusov odseparovaných napríklad mikromanipulátorom tak umožňuje vcelku jednoducho rozlíšiť dva základné pohlavné systémy. Je však potrebné brať do úvahy skutočnosť, že niektoré heterothalické môžu tvoriť sterilné plodnice aj za prítomnosti iba jedného párovacieho typu (Du et al., 2017) (pozri aj obrázok 9 v kapitole 4.1).

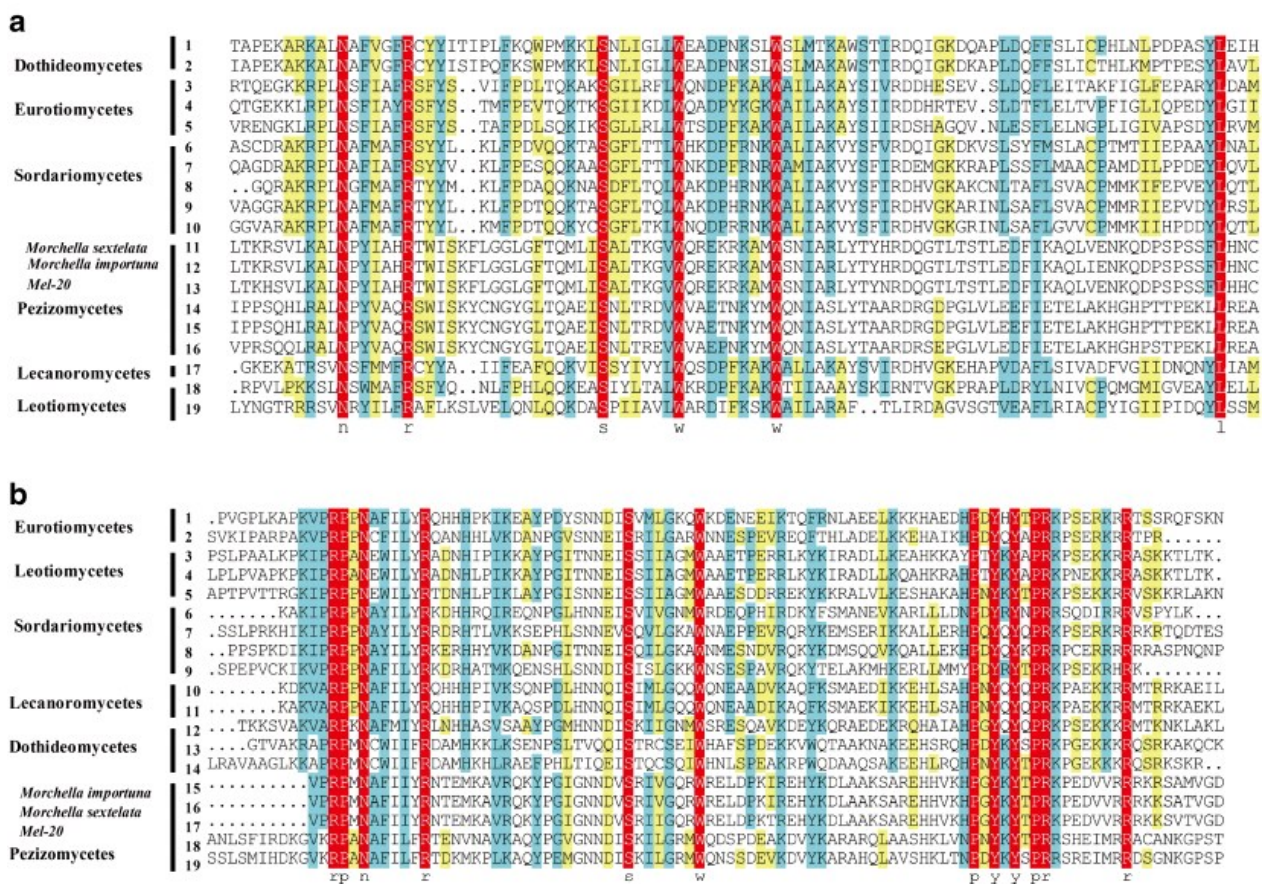
Táto základná metodika je bez pochyb veľmi užitočná a z technického hľadiska nenáročná, avšak neumožňuje už bez ďalších detailnejších experimentov rozpoznať jednotlivé typy homotalizmu (A. M. Wilson et al., 2015), čo si všimli už aj Dodge & Seaver (1946). Aspoň pseudohomotalizmus sa dá pri bližšom štúdiu rozlíšiť na základe sledovania pohlavného procesu u kultúr pochádzajúcich z rôznych typov výtrusov. Malé jednojadrové výtrusy dávajú vzniknúť mycéliu, ktoré sa správa ako heterothalické, kdežto mycélium pochádzajúce z početnejších, väčších a najčastejšie dvojjadrových výtrusov, sa správa ako homothalické. Indikátorom že sa u danej huby vyskytuje pseudohomotalizmus môže byť pritom aj polovičný počet výtrusov vo vrecku v porovnaní s príbuznými druhmi (Coppin et al., 1997; B O Dodge, 1927).

Mnohé druhy vreckatých húb však ešte aj v dnešnej dobe nie je možné kultivovať a veľká časť druhov rastúcich na umelom médiu už v kultúre nie je schopná tvoriť plodnice (McLaughlin & Spatafora, 2014). Spektrum druhov, u ktorých kultivačné experimenty umožňujú určiť pohlavný systém, je preto relatívne obmedzené.

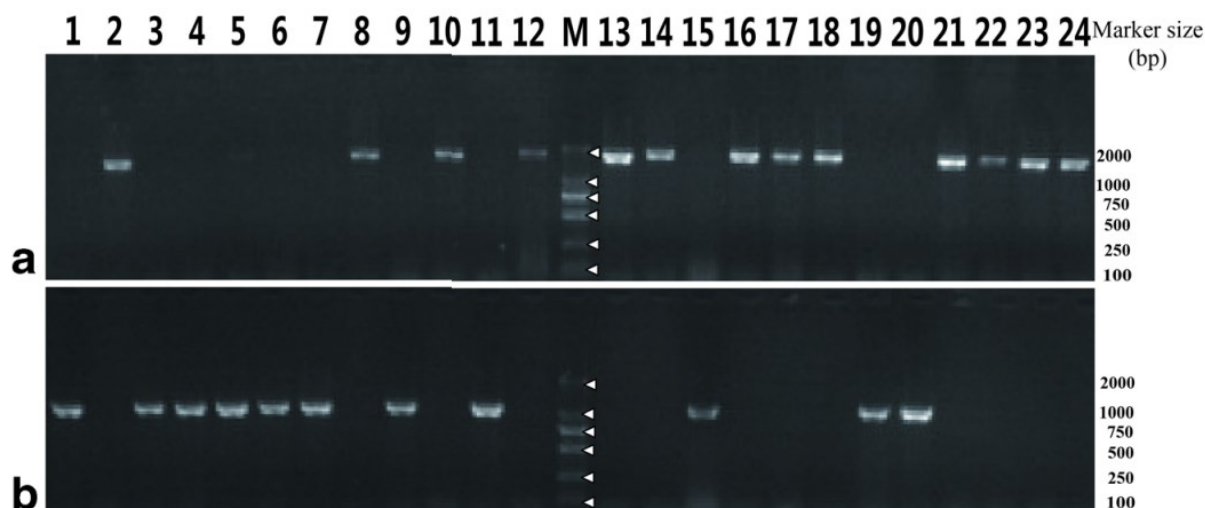
#### 3.2 Analýza *MAT* génov

Homothalické a heterothalické druhy sa odlišujú v prítomnosti jednotlivých párovacích génov. Na určenie pohlavného systému sa preto dá použiť práve ich analýza. Presné sekvencie *MAT* génov a ich okolia sú však veľmi dynamické a medzi jednotlivými líniami húb len pomerne slabo konzervované (obrázok 6) (Chai et al., 2017). To má preto za následok, že pre tieto gény nie je možné navrhnúť univerzálne primery, ktoré by fungovali naprieč všetkými skupinami. U väčšiny

predstaviteľov pododdelenia Pezizomycotina je ale na návrh PCR primerov možné využiť relatívne konzervované gény *APN2* a *SLA2*, susediace obvykle z oboch strán *MAT* lokusu (Butler, 1987). S ich pomocou je potom možné amplifikovať a následne aj osekvenovať tento lokus a na základe jeho organizácie určiť pohlavný systém. Vzhľadom na dĺžku *MAT* lokusu a bežné počítačové problémy s jeho amplifikáciou sa pritom využívajú aj metódy ako primer walking či inverzná PCR. Následne sa už zo sekvencie *MAT* lokusu dajú pre zástupcov daného druhu či rodu navrhnúť aj primery pre špecifickú amplifikáciu génov *MATI-1-1* a *MATI-2-1*. Pokiaľ je skúmaná huba homothalická, tak by aj u jej monospórickej kultúry malo byť možné pomocou PCR amplifikovať oba gény. U heterothalických druhov by mal naopak u jednotlivých kmeňov vždy vzniknúť produkt len v jednom prípade (obrázok 7).



**Obrázok 6:** Alignment aminokyselinových sekvencií génov *MATI-1-1* (a) a *MATI-2-1* (b) naprieč zástupcami rôznych skupín vreckatých húb, konzervované pozície sú farebne označené. Prevzaté z (Chai et al., 2017).



**Obrázok 7:** Gélková elektroforéza PCR produktov u 24 monospórických kmeňov heterothalického smrčku (*Morchella importuna*). U vzoriek nanesených na horný gél (a) boli použité primery pre amplifikáciu génu *MATI-1-1* a u vzoriek na dolnom géle (b) primery pre *MATI-2-1*. Prevzaté z (Chai et al., 2017).

V súčasnosti sa dajú študovať aj druhy, u ktorých vopred vôbec nie je známa sekvencia *MAT* génov ani iných génov v ich blízkom okolí. Vďaka technologickému rozvoju sekvenčných metód je totiž možné získať sekvenciu celého genómu vrátane *MAT* lokusu. To následne umožňuje analýzu génov v tomto lokuse, ako aj design primerov slúžiacich k rýchlejšiemu spracovaniu väčšieho množstva príbuzných kmeňov či druhov pomocou PCR (Chai et al., 2017; Du et al., 2017; Andrea Rubini et al., 2011). V kombinácii s analýzou transkripcie pritom táto metóda poskytuje komplexné informácie o štruktúre *MAT* lokusu a expresii jednotlivých párovacích génov (Ferreira et al., 1996; Andrea Rubini et al., 2011; Traeger et al., 2013).

Veľkou výhodou pritom je, že sa dá využiť aj u druhov, ktoré v kultúre vôbec netvorí plodnice. Štúdium húb, ktoré nie sú schopné v umelých podmienkach ani rásť, ale môže byť relatívne problematické aj v tomto prípade. Podiel jednotlivých párovacích typov na tvorbe plodnice a jej sterilných častí sa totiž môže výrazne líšiť aj u blízko príbuzných druhov (Du et al., 2017) a určenie presného pohlavného systému môže byť u takýchto húb pomerne komplikované.

### 3.3 Populačne-genetické analýzy

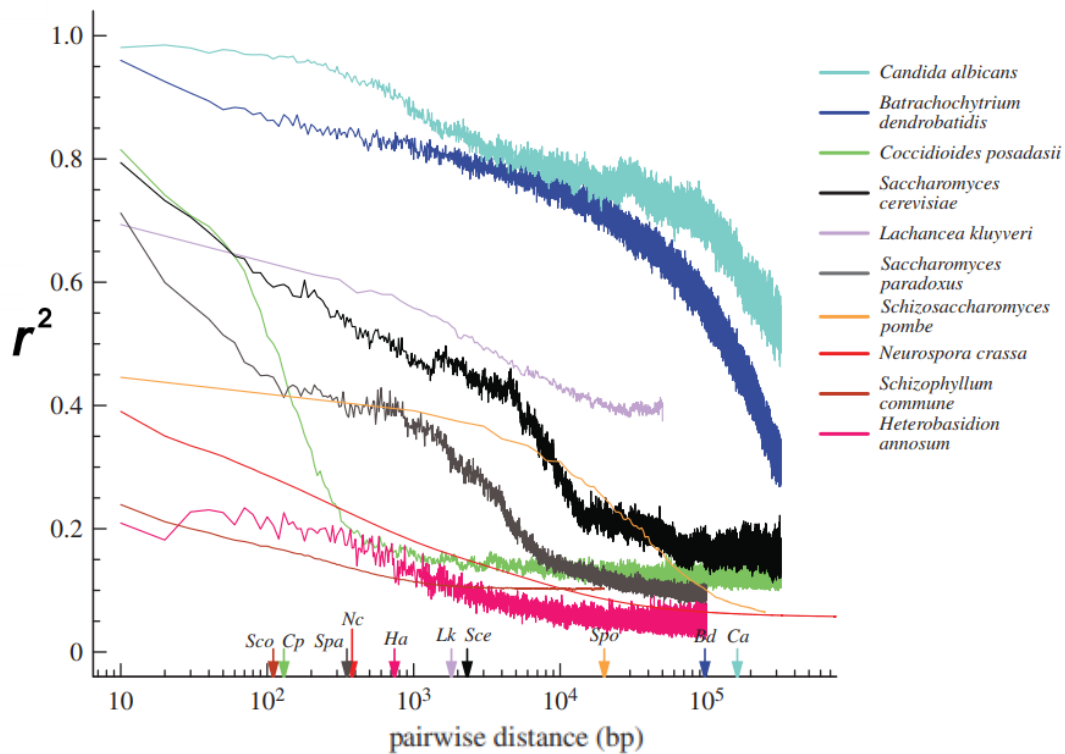
Ďalšou skupinou metód používaných na určenie pohlavného systému sú analýzy populačnej štruktúry. Jedná sa o zmes rôznych metód, v rámci ktorej sa síce jednotlivé prístupy líšia v množstve, citlivosti a type dát ktoré poskytujú, avšak obecné umožňujú sledovať podobné populačné charakteristiky (Rafalski, 2002). Tie by sa pritom mali u heterothalických a homothalických druhov relatívne výrazne líšiť a ich analýza tak môže napovedať aký pohlavný systém sa u sledovaných húb vyskytuje (Glass &

Kuldau, 1992). V minulosti sa najčastejšie používali izozýmová analýza, RFLP (polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov), AFLP (polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov) či RAPD (náhodná amplifikácia polymorfnej DNA). V dnešnej dobe sa už ale uprednostňujú skôr SNP (jednonukleotidový polymorfizmus) a analýza mikrosatelitov (Rafalski, 2002).

Samooplodnenie je dominantné u mnohých homothalických húb (Glass & Kuldau, 1992; Zeyl, 2009) a podobne ako nepohlavné rozmnožovanie by preto u nich malo viesť aj k produkcii geneticky uniformného potomstva. Nízka genetická variabilita sa zvykla preto považovať aj za indikátor homothalizmu (Bertault et al., 1998; Cinto et al., 2007), aj štúdia u rodu *Ceratocystis* napríklad pomocou izozýmovej analýzy ukázala, že homothalické druhy vykazujú menšiu variabilitu než príbuzný heterothalický druh (Harrington et al., 1996). Využitie genetickej variability na určenie pohlavného systému a spôsobu rozmnožovania viedlo ale v minulosti občas k chybnému výsledku (Bertault et al., 1998; Frizzi et al., 2001). Až neskôr sa totiž ukázalo, že aj v prípade niektorých heterothalických húb môže byť hladina polymorfizmu v dôsledku špecifickej evolučnej histórie či ekológie veľmi nízka (Diana A Dokmetzian et al., 2005; García-Cunchillos et al., 2014; Riccioni et al., 2008) a pri štúdiu pohlavných systémov je ju tak potrebné brať s rezervou.

Zásadný význam pri štúdiu rozmnožovania húb má väzbová nerovnováha (linkage disequilibrium), ktorá je ukazovateľom frekvencie rekombinácie (Nieuwenhuis & James, 2016). Analýza tejto charakteristiky pritom umožňuje tiež určiť, do akej miery u sledovaného druhu dochádza k outcrossingu (rozmnožovaniu medzi nepríbuznými jedincami) (obrázok 5) a mohla by indikovať aj aký pohlavný systém sa u sledovanej huby vyskytuje. Heterothalické druhy a obecné druhy s intenzívnym outcrossingom, by mali totiž vykazovať v dôsledku častej rekombinácie medzi chromozómami od rôznych jedincov výrazne nižšiu mieru väzbovej nerovnováhy (Anderson & Kohn, 1998; Nieuwenhuis & James, 2016; Thomson, 1977). Homothalické druhy by mali mať pritom naopak za predpokladu dominantného samooplodnenia podobne ako asexuálne druhy výrazne väčší podiel génov vo väzbe. U viacerých húb však nemusí homothalizmus vždy nutne viesť k obligátnemu samooplodneniu a niektoré štúdie ukázali, že aj u týchto druhov môže dochádzať k intenzívnemu outcrossingu (Attanayake et al., 2014; Billiard et al., 2012). Rozmnožovanie medzi nepríbuznými jedincami pritom môže byť občas dokonca preferované, keďže v prípade oplodnenia geneticky identickými bunkami huba prichádza o veľkú časť výhod plynúcich z pohlavného rozmnožovania (Billiard et al., 2012). Prípadný outcrossing by sa preto u homothalických druhov prejavil aj na znížení väzbovej nerovnováhy a rozdiel medzi pohlavnými systémami tak nemusí byť vždy tak markantný (Attanayake et al., 2014).





**Obrázok 5:** Funkcia väzbovej nerovnováhy ( $r^2$ ) na vzdialenosti nukleotidov u desiatich rôznych druhov húb. Šípky na ose x označuje vzdialenosť, kedy nadobúda väzbová nerovnová polovičnú hodnotu z absolútneho maxima pre daný druh, a mala by byť dobrým indikátorom frekvencie pohlavného rozmnožovania a rekombinácie. Najvyššie hodnoty dosahuje u druhov s dominantným asexuálnym rozmnožovaním, naopak najnižšie hodnoty majú huby s prevažujúcim outcrossingom. Prevzaté z (Nieuwenhuis & James, 2016).

Výhodou populačných metód je, že umožňujú analyzovať aj nekultivovateľné druhy. Využívajú však skôr nepriame indície sledujúce predovšetkým frekvenciu rekombinácie a outcrossingu a nie sú tak schopné bez ďalších dát s istotou rozlíšiť medzi jednotlivými procesmi, ktoré ich môžu ovplyvňovať podobným spôsobom (Nieuwenhuis & James, 2016). Napriek tomu však populačne-genetické analýzy predstavujú veľmi hodnotný zdroj informácií o rozmnožovaní sledovaných organizmov.

Ako optimálny prístup štúdia pohlavných systémov sa javí pritom kombinácia všetkých typov metód, ktorá potom poskytuje detailné informácie o genetickom pozadí pohlavného rozmnožovania daného druhu, jeho populačnej štruktúre a umožňuje aj experimentálne sledovať interakcie medzi kmeňmi, a prípadné pohlavné rozmnožovanie a tvorbu plodníc.

#### 4 Čiaškotvaré (Pezizales)

Rad čiaškotvaré (Pezizales) patrí do pododdelenia Pezizomycotina, ktoré predstavuje druhovo najbohatšiu skupinu vrekatých húb (Ascomycota). Jedná sa o jeden z troch podkmeňov, na ktoré sa Ascomycota delia, pričom viaceré molekulárne štúdie ukázali, že sa jedná o monofyletickú líniu sesterskú pravým kvasinkám (Saccharomycotina) (Fitzpatrick et al. 2006; Hibbett et al. 2007; James et al. 2006; Wang et al. 2009). Pezizales spoločne s radom Orbiliales predstavujú bazálne línie v rámci pododdelenia Pezizomycotina, pričom v jednotlivých fylogenetických štúdiách sa tieto dva rady striedajú na poste najbazálnejšej skupiny (Gernandt et al., 2001; Schoch et al., 2009; Spatafora et al., 2006).

Vrecká zástupcov radu Pezizales sú obvykle zakončené viečkom (lat. *operculum*), ktoré po otvorení umožní vystrelenie výtrusov. Na základe tejto špecifickej apomorfie sa zástupcovia celého radu označujú aj ako operkulátne askomycéty. Ich plodnice sú síce tvarovo veľmi rozmanité, no u všetkých zástupcov sa jedná o apotécium (miskovitý typ plodnice) alebo niektorú jeho modifikáciu (Pfister, 2015). Ich veľkosť sa pohybuje od niekoľko desiatín milimetra napríklad u rodu *Ascodesmis*, až po takmer dvadsať centimetrov u niektorých predstaviteľov rodu *Morchella*. U ektomykorhíznych skupín sú pritom obzvlášť časté prechody k tvorbe uzavretých podzemných hľuzovitých plodníc, k čomu došlo u operkulátnych askomycétov mnoho krát nezávisle na sebe (Læssøe & Hansen, 2007). Tieto druhy už potom z pochopiteľných dôvodov strácajú schopnosť aktívne vystreľovať výtrusy, ich vrecká už obvykle ani nemajú diferencované viečko a askospóry sa uvoľňujú rozpadom steny vrecka.

Z ekologického hľadiska rad Pezizales zahŕňa druhy jednak saprotrofické, ale aj parazitické a mykorhízne (Pfister, 2015). Množstvo saprotrofov je pritom viazaných na trus či spáleniská, hoci určenie presnej trofickej stratégie je u niektorých zástupcov problematické (Hobbie et al., 2001) a napríklad aj medzi hubami fruktifikujúcimi na spáleniskách nájdeme ektomykorhízne druhy (Sánchez et al., 2014).

Zástupcovia tohto radu boli od počiatku 20. storočia vďaka relatívne veľkým chromozómom či dobrej kultivovateľnosti aj pomerne obľúbenými modelovými organizmami. Štúdie na bryofilnom druhu *Neottiella rutilans* boli významné z hľadiska výskumu meiózy u mitózy počas tvorby výtrusov (Fraser, 1908; Rossen & Westergaard, 1966), zástupcovia rodov *Pyronema* a *Ascobolus* boli zase využívaní pri výskume pohlavného procesu a tvorby plodníc (G. Bistis, 1956a; Harper, 1900; Reeves, 1967; Welsford, 1907).



**Obrázok 8:** Morfológická diverzita plodníc vybraných zástupcov radu Pezizales: kvapka machová (*Octospora leucoloma*) (A), vreckovec ružový (*Iodophanus carneus*) (B), smrčok hybridný (*Mitrophora semilibera*) (C), *Cookeina tricholoma* (D), hľuzovka letná (*Tuber aestivum*) (E), čiaška krátkohlúbiková (*Peziza micropus*) (F) a komôrkovka podvojná (*Hydnotrya bailii*) (G). Foto: Autor

#### 4.1 Pohlavný systém zástupcov radu Pezizales

V nasledujúcej časti sú zhrnuté literárne údaje o pohlavnom systéme zástupcov jednotlivých čeľadí tohto radu. Vzhľadom na veľkú dynamiku v názvosloví mnohých skupín používam aktuálne platné názvy podľa databázy MycoBank (Robert et al., 2005). Príslušnosť rodov k jednotlivým čeľadím vychádza z Wijayawardene et al. (2018). Všetky druhy, u ktorých bol bez väčších pochyb určený pohlavný systém, sú následne sumarizované v tabuľke 1. Okrem taxonomickej príslušnosti a pohlavného systému pritom vždy uvádzam aj dominantný substrát, použitú metodiku a prácu, v ktorej bol pohlavný systém určený.

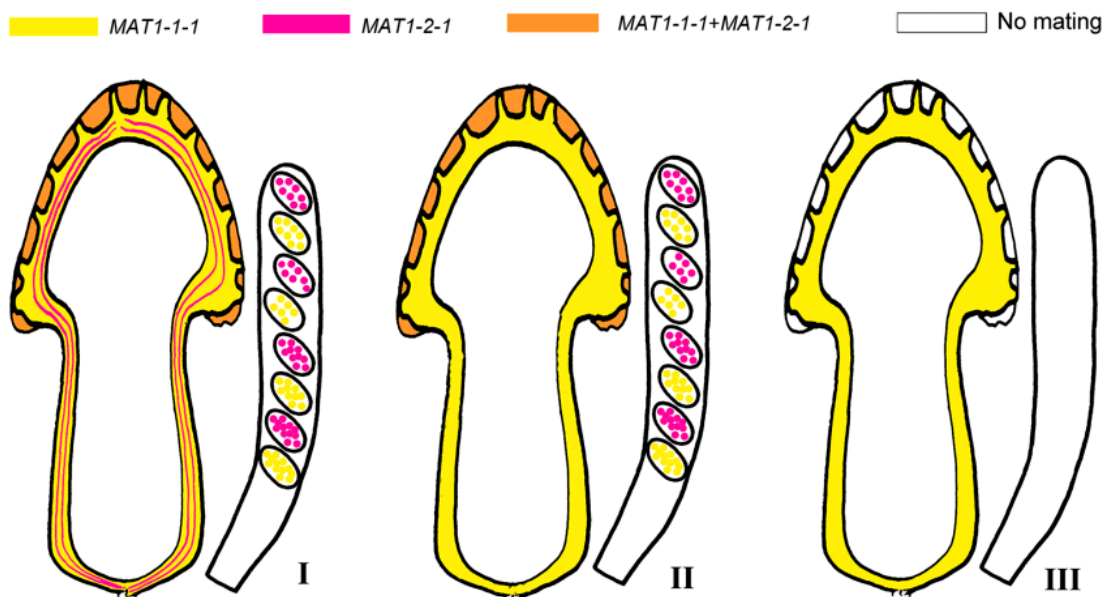
V rámci celého radu Pezizales sa v priebehu 20. storočia pri výskume heterothalizmu a homothalizmu najväčšia pozornosť venovala rodu *Ascobolus* z čeľade *Ascobolaceae*. Príčinou je pravdepodobne hlavne krátka generačná doba jeho zástupcov, ich ľahká kultivovateľnosť, ochotná tvorba plodníc a veľké výtrusy, s ktorými sa tak dá jednoducho manipulovať. Huby z tejto čeľade sú pritom obvykle

viazané na exkrementy a v súčasnosti tu radíme štyri rôzne rody. *Ascobolus scatigenus* predstavuje historicky prvý druh vreckatej huby, u ktorého bol heterothalizmus popísaný (B. O. Dodge, 1920). Viaceré neskoršie práce založené na monospórických kultúrach a krížiacich experimentoch pritom ukázali, že tento pohlavný systém je v rode *Ascobolus* dominantný (Betts & Meyer 1939; Bistis 1956b; Dokmetzian 1999; Dokmetzian et al. 2004; Dowding 1931; Rizet 1939), hoci v sekciách *Ascobolus* a *Dasybolus* nájdeme okrem heterothalických zástupcov aj druhy homothalické (Bernard O Dodge & Seaver, 1946; Dowding, 1931; Schweizer, 1931; Yu, 1954). To naznačuje, že k zmene medzi týmito stratégiami došlo v rámci rodu *Ascobolus* viackrát nezávisle na sebe. Konkrétne úvahy o počte prechodov k homothalizmu by však vzhľadom na absenciu recentnej taxonomickej revízie tejto diverzifikovanej skupiny boli skôr špekuláciou. U druhu *A. michaudii* nebolo možné rozhodnúť o príslušnosti k pohlavnému systému, vzhľadom na protichodné výsledky kultivačných experimentov rôznych autorov (Diana Ana Dokmetzian, 1999; Paden & Stanlake, 1973). U zástupcov iných rodov z tejto čeľade bol homothalizmus preukázaný iba u druhu *Saccobolus saccoboloides* (Bernard O Dodge & Seaver, 1946). Conway (1975a) uvádza, že *Thecotheus pelletieri* a *T. cinereus* by mohli byť heterothalické, avšak tento predpoklad je založený len na neschopnosti kultúr pochádzajúcich z jedného výtrusu vytvoriť plodnice a za dôkaz heterothalizmu sa považovať nedá.

Väčšina zástupcov čeľade *Ascodesmidaceae* je viazaná na exkrementy, hoci niektoré druhy môžu osídľovať aj povrch pôdy (Pfister, 2015). V súčasnosti sa tu pritom radí 11 menších rodov s nenápadnými a často redukovanými plodnicami (Wijayawardene et al., 2018). Brummelen (1981) uvádza, že všetky skúmané druhy rodu *Ascodesmis* sa javia ako homothalické. Pohlavný systém bol určený u troch konkrétnych druhov (Obrist 1961; O'Donnell et al. 1976; Swingle 1934), ich identita ale vzhľadom na často chybné určenia skúmaných druhov tohto rodu v starších prácach nemusí byť presná (Brummelen, 1981; Obrist, 1961). V rode *Coprotus* bol homothalizmus pomocou monospórických kultúr potvrdený u štyroch zástupcov (Gwynne-Vaughan & Williamson, 1934; Kish, 1974; Suárez et al., 2006). Bezerra & Kimbrough (1975) v monografii rodu *Lasiobolus* uvádzajú, že všetci zástupcovia sú homothalický a v kultúre tvoria plodnice, avšak s určitosťou bol zatiaľ pohlavný systém určený iba u druhu *L. ciliatus* (Conway, 1975b). U všetkých skúmaných zástupcov tejto čeľade bol teda zatiaľ preukázaný iba homothalizmus. Dáta od ostatných rodov síce chýbajú, avšak väčšinou sa jedná iba o druhovo chudobné a relatívne zriedkavé skupiny a je možné, že tento pohlavný systém bude v čeľadi *Ascodesmidacea* dominantný.

Čeľaď *Morchellaceae* zahŕňa osem rodov tvoriacich veľké nadzemné, ale aj podzemné plodnice (Pfister, 2015; Wijayawardene et al., 2018). Väčšina druhov patrí medzi mykorhíznych partnerov drevín, hoci niektorí predstavitelia rastú ako saprotrofy na rozkladajúcich sa drevných zvyškoch (Dahlstrom et al., 2000; Hobbie et al., 2016; Tedersoo et al., 2010). Najznámejším a kulinársky veľmi významným rodom je smrčok (*Morchella*). Nie je preto prekvapivé, že kultiváciou smrčkov a ich pohlavným systémom sa zaoberalo viacero štúdií aj v priebehu 20. storočia (Ower, 1982; Schmidt, 1983;

Volk & Leonard, 1990). Už Hervey et al. (1978) prítom na základe sledovania interakcií medzi rôznymi monospórickými kultúrami navrhli, že *M. esculenta* je zrejme heterotalický druh. O prítomnosti tohto pohlavného systému u spomínaného druhu, ale aj u druhu *M. deliciosa* a *M. elata*, napovedajú navyše aj výsledky populačných štúdií (Gessner et al., 1987; Pagliaccia et al., 2011). Nepochybniteľný dôkaz o heterotalizme smrčkov priniesli recentné práce (Chai et al., 2017; Du et al., 2017; Payen, 2015), ktoré na základe analýzy genómových sekvencií a následnou amplifikáciou a sekvenáciou *MAT* génov potvrdili heterotalizmus u desiatich rôznych druhov rodu *Morchella* a aj smrčka hybridného (*Mitrophora semilibera*). Zároveň prítom zistili, že u väčšiny smrčkov sa na tvorbe sterilných častí plodníc podieľa len jeden z párovacích typov a obe *MAT* idiomorfy sú rovnomerne zastúpené iba v hyméniu. Ojedinele sú smrčky dokonca schopné tvoriť sterilné plodnice bez vyvinutých vreciek a výtrusov aj za prítomnosti iba jedného z rodičov (obrázok 9) (Du et al., 2017). Taxonómia a nomenklatúra je však u tejto skupiny húb ešte stále nevyjasnená a autori mnohé názvy dodnes nesprávne používajú na pomenovanie rozdielnych druhov (Richard et al., 2015). Obzvlášť u komplikovaného druhu *M. conica* je tak údaj o heterotalizme potrebné brať s rezervou (Payen, 2015).



**Obrázok 9:** Schematické znázornenia troch typov rozmiestnenia párovacích génov v plodniciach a výtrusoch smrčkov (*Morchella spp.*). Plodná časť (hyménium) je vo všeobecnosti tvorená rovnomerne mycéliami s oboma *MAT* idiomorfami. Sterilná časť plodnice je tvorená len mycéliom s jednou idiomorfou (obvykle *MAT1-1*). Výnimkou je prvý typ (I), u ktorého sa v menšej miere na tvorbe sterilnej stopky podieľa aj mycélium s druhou idiomorfou. Plodnice tretieho typu (III) sú celé tvorené len mycéliom jedného párovacieho typu, sú sterilné a ich vrecká neobsahujú žiadne výtrusy. V prírode je dominantný druhý typ (II). Prevzaté z (Du et al., 2017).

Do čeľade **Otidea** sa radí osem rodov s prevažne ektomykorhíznymi zástupcami. Jediným druhom, u ktorého je známy pohlavný systém je *Warcupia terrestris*. Tento pozoruhodný homothalický predstaviteľ monotypického rodu *Warcupia* býva ojedinele izolovaný zo vzoriek pôdy a plodné uzavreté plodnice (kleistotécia) je schopný tvoriť aj v monospórickej kultúre (Paden & Cameron, 1972).

**Pezizaceae** predstavuje diverzifikovanú čeľad' s 33 rodmi zahŕňajúcimi saprotrofov osídľujúcich rozmanité substráty, rovnako ako aj mykorhízne druhy (Pfister, 2015; Wijayawardene et al., 2018). Údaje o pohlavnom systéme zástupcov tejto čeľade sú ale iba relatívne vzácne. Homothalizmus bol zistený u druhov *Iodophanus carneus* a *I. granulipolaris* potvrdili na základe tvorby plodníc monospórickými kultúrami (Cinto & Dokmetzian, 2006; Cinto et al., 2007). V neskoršej práci potom síce Cinto et al. (2009) uvádzajú tento pohlavný systém už pre celý rod *Iodophanus*, avšak dané tvrdenie nepodporili žiadnym konkrétnym experimentom ani literárnym dokladom. Za homothalický sa dá považovať aj *Lepidotia hispida*, zriedkavý druh špecializovaný na rašelinu. Pohlavný systém bol aj u neho určený kultivačnou metodikou (O'Donnell & Beneke, 1973).

V rámci celého radu Pezizales je čeľad' **Pyronemataceae** druhovo najbohatšia a v súčasnosti zahŕňa okolo 660 druhov a 47 rodov s rozmanitými trofickými stratégiami (Kirk et al., 2008; Wijayawardene et al., 2018). Určením a štúdiom pohlavného systému jej zástupcov sa síce v priebehu 20. storočia zaoberalo viacero štúdií, no spravidla sa venovali iba niekoľkým ľahko kultivovateľným saprotrofom rastúcim na exkrementoch a spáleniskách. *Pyronema omphalodes* bola využívaná aj pri štúdiu ontogenézy plodníc a pohlavných orgánov askomycétov (I. M. Wilson, 1952). Kultivačné experimenty (Gwynne-Vaughan & Williamson, 1931) a neskôr aj analýza sekvencie jej genómu pritom preukázali, že sa jedná o primárne homothalický druh, ktorý má súčasne v jednom jadre párovacie gény *MAT1-1-1* aj *MAT1-2-1* (Traeger et al., 2013). Homothalizmus bol potvrdený aj u ďalšieho zástupcu tohto rodu *P. domesticum* (Moore, 1963), ale tiež *Scutellinia scutellata* (Gwynne-Vaughan & Williamson, 1933), *Sphaerospora brunnea* (Sánchez et al., 2014) a *Trichophaea abundans* (B. O. Dodge, 1922). Heterothalizmus bol naopak preukázaný u *Coprobia granulata* (Gwynne-Vaughan & Williamson, 1930) a *Anthracobia melaloma* (Gwynne-Vaughan, 1937). U rodu *Anthracobia* sú pritom známe aj ďalšie druhy s týmto pohlavným systémom, rovnako ako aj druhy homothalické, avšak ich presná identifikácia je problematická a aj morfológicky takmer zhodné zbery z rôznych častí sveta sa môžu líšiť v pohlavnom systéme (Larsen, 1975). Zbery radené k druhu *A. tristis* z Austrálie sú tak napríklad heterothalické, kdežto zbery pochádzajúce z USA sú homothalické. Mykorhízny druh *Wilcoxia mikolae* je zjavne taktiež heterothalický, síce tvoril plodnice aj v monospórickej kultúre, avšak na rozdiel od polyspórických kultúr boli sterilné a bez výtrusov (Yang & Korf, 1985).

Čeľad' **Rhiziniaceae** zahŕňa tri rody s parazitickými a saprotrofnými zástupcami (Pfister, 2015; Wijayawardene et al., 2018). *Rhizina undulata* je patogén koreňov ihličnanov, pričom Vasiliaskus pre tento druh uvádza ako pohlavný systém homothalizmus. Toto tvrdenie je však založené predovšetkým

na jeho schopnosti tvoriť plodnice v monospórickej kultúre. Plodnice ktoré získali však boli sterilné a iný doklad homothalizmu či detailnejšie kultivačné experimenty chýbajú. Nedá sa tak vylúčiť ani možnosť, že sa v skutočnosti jedná iba o ďalší prípad tvorby sterilných haploidných plodníc jedným párovacím typom heterothalického druhu, ako je tomu u viacerých smrčkov (*Morchella spp.*) (Du et al., 2017) a zrejme aj u druhu *Wilcoxia mikolae* (Yang & Korf, 1985).

V čeľadi **Tuberaceae** nájdeme sedem výlučne mykorhíznych rodov (Pfister, 2015). Väčšina prác o pohlavnom systéme sa podobne ako v čeľadi Morchellaceae zameriava na kulinársky a ekonomicky významných zástupcov, v tomto prípade rody hľuzovka (*Tuber*) a bielohľuzovka (*Choiromyces*). Bertault et al. (1998) na základe nízkeho polymorfizmu mikrosatelitov, vzorov RAPD a absencie heterozygotov navrhli, že *Tuber melanosporum* by mohol byť homothalický druh s dominantným samooplodnením. K podobnému záveru neskôr u *T. magnatum* dospeli aj Frizzi et al. (2001). Novšie práce však na základe štúdia väzbovej nerovnováhy odhalili, že u týchto hľuzoviek dochádza k rekombinácii a outcrossingu (Paolocci et al., 2006; Riccioni et al., 2008; A. Rubini et al., 2005). Pohlavný systém sa pritom u oboch spomínaných druhov a aj u *T. aestivum* a *Choiromyces venosus* podarilo určiť na základe analýz *MAT* génov v sekvenciách ich genómov (Payen, 2015; Andrea Rubini et al., 2011), ktoré jednoznačne preukázali, že sú heterothalické. Primery navrhnuté na základe získaných sekvencií boli následne použité aj na potvrdenie heterothalizmu u štyroch ďalších druhov rodu *Tuber* (Belfiori et al. 2013; Belfiori et al. 2016; Kinoshita et al. 2018). Znížená genetická variabilita v časti areálu niektorých hľuzoviek, ktorá v minulosti viedla k domnienke, že sú homothalické, je pritom zrejme iba následok genetického driftu a následnej expanzie z refúgií po poslednej dobe ľadovej (García-Cunchillos et al., 2014; Riccioni et al., 2008). Nízka hladina heterozygotnosti sa navyše dá tiež jednoducho vysvetliť, keďže plodnice hľuzoviek sú okrem vreciek s výtrusmi z väčšiny tvorené iba mycéliom jedného párovacieho typu (Paolocci et al., 2006; Riccioni et al., 2008).

Zo zástupcov radu Pezizales u ktorých nepoznáme bližšiu taxonomickú príslušnosť (*incertae sedis*) je pohlavný systém známy akurát u druhu *Mycoarctium ciliatum*. Tento koprofilný askomycét je niekedy radený aj do radu Thelebolales a kvôli absencii molekulárnych dát a výrazne redukovaným plodniciam ho zatiaľ nie je možné presnejšie zaradiť. Na základe štúdia monospórických kultúr je ale zrejme, že sa jedná o homothalický druh (Jain & Morgan-Jones 1973).

Bližšie informácie o pohlavnom systéme zástupcov zvyšných ôsmich čeľádí radu Pezizales, (menovito *Caloscyphaceae*, *Chorioactidaceae*, *Discinaceae*, *Glaziellaceae*, *Helvellaceae*, *Karstenellaceae*, *Sarcoscyphaceae* a *Sarcosomataceae*) chýbajú. To však nie je nijak prekvapivé, vzhľadom na to že viaceré z týchto skupín sú druhovo relatívne málopočetné, v kultúre rastú len neochotne a nie sú obzvlášť ekonomicky významné (Kirk et al., 2008; Pfister, 2015).

**Tabuľka 1:** Zhrnutie informácií o pohlavnom systéme a ďalších vybraných údajov o zástupcoch radu Pezizales, homothalické druhy sú sivo podfarbené a jednotlivé čeľade sú oddelené čiarou.

Druh	Čeľaď	Pohlavný systém	Metóda	Substrát	Citácia
<i>Ascobolus amoenus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus bahiensis</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus biguttulatus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus bisfisii</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus bonaerensis</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian et al. (2004)
<i>Ascobolus campanensis</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian et al. (2004)
<i>Ascobolus carbonarius</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	spáleniská	Betts (1926)
<i>Ascobolus crenulatus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Yu (1954)
<i>Ascobolus ferrugineus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus furfuraceus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Bistis (2004)
<i>Ascobolus gamundiae</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus geophilus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	pôda	Betts & Meyer (1939)
<i>Ascobolus immersus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Rizet (1939)
<i>Ascobolus mancus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus scatigenus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dodge (1920)
<i>Ascobolus stercorarius</i>	<i>Ascobolaceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dowding (1931)
<i>Ascobolus stictoides</i>	<i>Ascobolaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dokmetzian (1999)
<i>Ascobolus strobolinus</i>	<i>Ascobolaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Schweizer (1931)
<i>Ascobolus winteri</i>	<i>Ascobolaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Yu (1954)
<i>Saccobolus saccoboloides</i>	<i>Ascobolaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Dodge & Seaver (1946)
<i>Ascodesmis macrospora</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Obrist (1961)
<i>Ascodesmis nigricans</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	O'Donnell et al. (1976)
<i>Ascodesmis sphaerospora</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Swingle (1934)
<i>Coprotus aurora</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Gwynne-Vaughan & Williamson (1934)
<i>Coprotus lacteus</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Kish (1974)
<i>Coprotus niveus</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Suárez et al. (2006)
<i>Coprotus sexdecimsporus</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Suárez et al. (2006)
<i>Lasiobolus ciliatus</i>	<i>Ascodesmidaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Conway (1975b)
<i>Mitrophora semilibera</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Morchella dunalii</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Morchella eohespera</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)



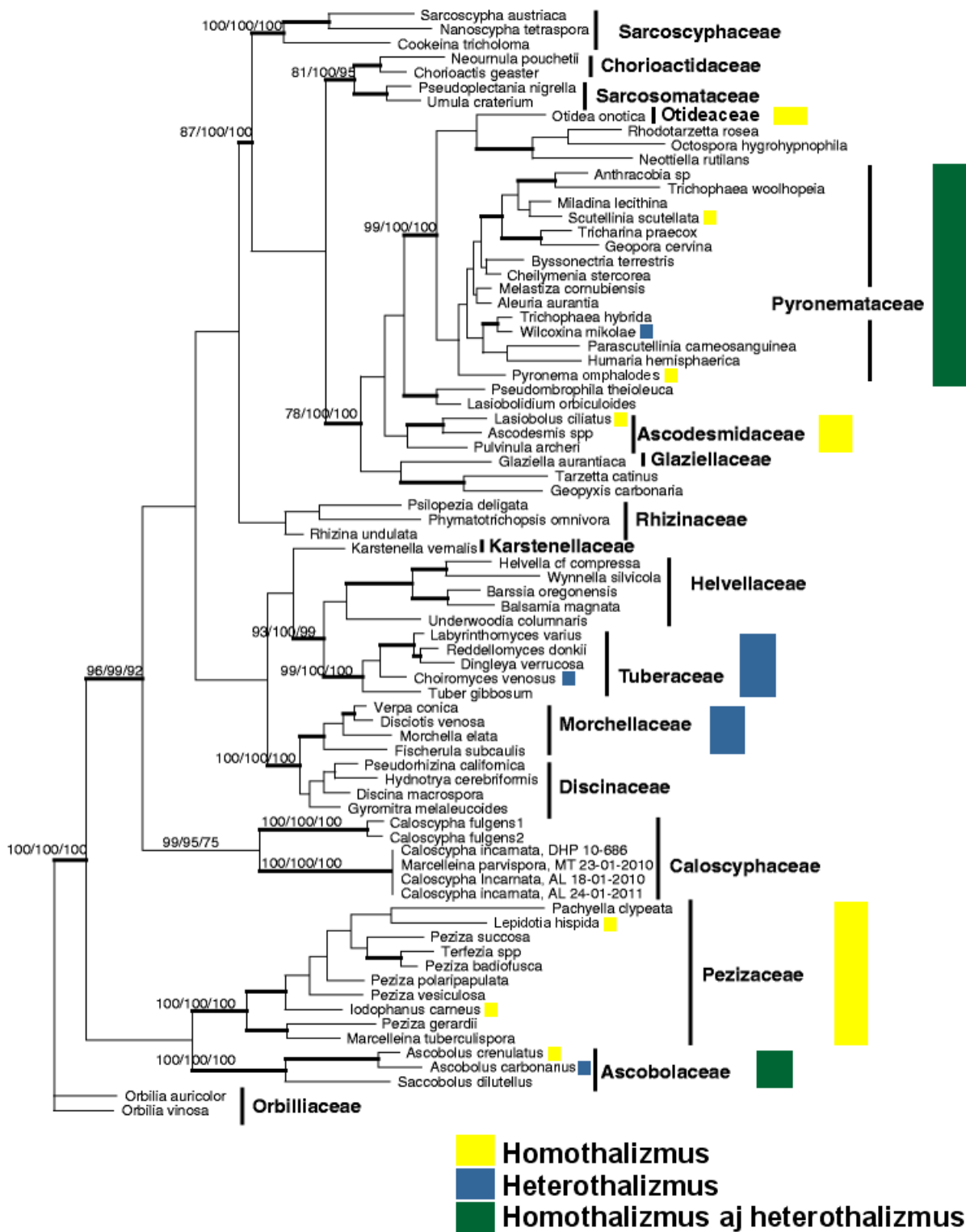
Druh	Čeľad'	Pohlavný systém	Metóda	Substrát	Citácia
<i>Morchella eximia</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda so zbytkami dreva	Du et al. (2017)
<i>Morchella eximoides</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Morchella exuberans</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda so zbytkami dreva	Du et al. (2017)
<i>Morchella importuna</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda so zbytkami dreva	Chai et al. (2017)
<i>Morchella pulchella</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Morchella purpurascens</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Morchella sextelata</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda so zbytkami dreva	Du et al. (2017)
<i>Morchella tridentina</i>	<i>Morchellaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Du et al. (2017)
<i>Warcupia terrestris</i>	<i>Otideaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	pôda	Paden & Cameron (1972)
<i>Iodophanus carneus</i>	<i>Pezizaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Cinto et al. (2007)
<i>Iodophanus granulipolaris</i>	<i>Pezizaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Cinto & Dokmetzian (2006)
<i>Lepidotia hispida</i>	<i>Pezizaceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	rašelina	O'Donnell & Beneke (1973)
<i>Anthracobia melaloma</i>	<i>Pyronemataceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Gwynne-Vaughan (1937)
<i>Coprobia granulata</i>	<i>Pyronemataceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Gwynne-Vaughan & Williamson (1930)
<i>Pyronema domesticum</i>	<i>Pyronemataceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	spáleniská	Moore (1963)
<i>Pyronema omphalodes</i>	<i>Pyronemataceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty a analýza sekvencie genómu	spáleniská	Gwynne-Vaughan & Williamson (1931)
<i>Scutellinia scutellata</i>	<i>Pyronemataceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	drevo	Traeger et al. (2013)
<i>Sphaerosporella brunnea</i>	<i>Pyronemataceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	spáleniská	Gwynne-Vaughan & Williamson (1933)
<i>Trichophaea abundans</i>	<i>Pyronemataceae</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	spáleniská	Sánchez et al. (2014)
<i>Wilcoxina mikolae</i>	<i>Pyronemataceae</i>	heterothalizmus	kultivačné experimenty	pôda	Dodge (1922)
<i>Choiromyces venosus</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda	Yang & Korf (1985)
<i>Tuber aestivum</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda	Payen (2015)
<i>Tuber borchii</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Payen (2015)
<i>Tuber himalayense</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Belfiori et al. (2016)
<i>Tuber indicum</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Kinoshita et al. (2018)
<i>Tuber longispinosum</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	sekvenácia <i>MAT</i> génov	pôda	Belfiori et al. (2013)
<i>Tuber magnatum</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda	Kinoshita et al. (2018)
<i>Tuber melanosporum</i>	<i>Tuberaceae</i>	heterothalizmus	analýza sekvencie genómu	pôda	Payen (2015)
<i>Mycorctium ciliatum</i>	<i>Incertae sedis</i>	homothalizmus	kultivačné experimenty	exkrementy	Rubini et al. (2011)
					Jain & Morgan-Jones (1973)

## 4.2 Konzervovanosť pohlavného systému

Pohlavný systém u zástupcov radu Pezizales je teda zatiaľ známy u minimálne 60 druhov patriacich do 19 rôznych rodov (tabuľka 1). To však predstavuje len malý zlomok známej diverzity tohto radu, kam patrí minimálne 1700 druhov a 199 rodov (Kirk et al., 2008). Niektoré z historických zdrojov je tiež potrebné brať s rezervou, keďže v nich občas chýba detailný popis kultivačných experimentov a ich výsledky mohli byť ovplyvnené aj kontamináciou, na čo už poukázali aj Dodge & Seaver (1946) a Dowding (1931). Viaceré z húb sledovaných v starších prácach navyše patria do taxonomicky komplikovaných skupín, čo občas viedlo aj k nesprávnemu určeniu a ich presná druhová príslušnosť nemusí byť vždy úplne jasná (Brummelen, 1981; Larsen, 1975).

U rodov *Coprotus*, *Iodophanus*, *Lasiobolus* a *Saccobolus* autori v niektorých prácach zovšeobecňujú informácie o pohlavnom systéme pre celé rody (Bezerra & Kimbrough, 1975; Cinto et al., 2009, 2007; Suárez et al., 2006). Dané tvrdenie už ale konkrétnymi dôkazmi nepodkladajú a zrejme vychádzajú iba zo známych údajov od niekoľkých druhoch. Tie však predstavujú len malý zlomok známej diverzity týchto húb a podobná generalizácia by preto mohla byť unáhľená. Viaceré štúdie na zástupcoch iných skupín totiž ukázali, že k zmenám pohlavného systému môže u vreckatých húb dochádzať pomerne rýchlo a často aj u veľmi blízko príbuzných druhov (Gioti et al., 2012; Inderbitzin et al., 2005)

U väčšiny čeladi z radu Pezizales bol zatiaľ zistený len jeden pohlavný systém. V rámci tej istej čelade sa síce heterothalizmus aj homothalizmus súčasne vyskytujú len u *Ascobolaceae* a *Pyronemataceae*, to však vzhľadom na nízky počet študovaných druhov a rodov nie je nijak prekvapivé. Navyše aj v rámci tohto radu poznáme rody ako *Ascobolus* či *Anthracobia*, kam patria súčasne heterothalické aj homothalické druhy (Bernard O Dodge & Seaver, 1946; Diana Ana Dokmetzian, 1999; Larsen, 1975). Na základe príbuzenských vzťahov a rozmiestnenia jednotlivých pohlavných systémov u húb z tejto skupiny (obrázok 10) je tiež zrejme, že k prechodu na homothalizmus došlo v rade Pezizales opakovane niekoľko krát nezávisle na sebe. V niektorých skupinách s relatívne väčším množstvom skúmaných druhov, ako je napríklad *Ascodesmidaceae* či línia zahŕňajúca *Tuberaceae* a *Morchellaceae*, by síce zdá sa mohol byť dominantný jeden konkrétny pohlavný systém, avšak aj tu väčšina dát pochádza len od predstaviteľov pár vybraných rodov. Interpretáciu pritom sťažuje aj fakt, že u homothalických druhov poznáme presný typ pohlavného systému len u *Pyronema omphalodes* (Traeger et al., 2013). U ostatných zástupcov boli totiž použité zatiaľ iba základné kultivačné experimenty s monospórickými kultúrami, ktoré ale jednotlivé podtypy homothalizmu bez detailnejšieho výskumu nie sú schopné jednoducho rozlíšiť (Bernard O Dodge & Seaver, 1946; A. M. Wilson et al., 2015).



**Obrázok 10:** Rekonštrukcia fylogenie vybraných zástupcov radu Pezizales na základe sekvencií ribozomálnej DNA. Pri jednotlivých čeľadiach som dodatočne farebne vyznačil aký pohlavný systém bol doteraz zistený u ich zástupcov. Pokiaľ je pohlavný systém známy aj u konkrétnych druhov použitých v tejto analýze, tak sú rovnako farebne označené. Pojatie čeľade *Pyronemataceae* je upravené podľa (Wijayawardene et al., 2018). Niektoré názvy som pre prehľadnosť nahradil platnými názvami podľa databázy MycoBank (Robert et al., 2005). Topológia stromu prevzatá z (Pfister et al., 2013)

### 4.3 Vzťah pohlavného systému a ekológie

Ekológia hrá zásadnú rolu v živote húb a rozdiely v trofickej stratégii a substráte, ktorý príslušné druhy osídľujú môžu mať preto výrazný vplyv aj na evolúciu rozmnožovania a pohlavných systémov (Ono, 2002; Rayner, 1994). Veľké množstvo primárne homothalických či pseudohomothalických druhov nájdeme pritom medzi vreckatými hubami rastúcimi na exkrementoch (Ames, 1930; Wicklow, 1981). Tento substrát predstavuje veľmi špecifický mikrohabitat s nepravidelným, ostrovčekovitým rozmiestnením v krajine a len krátkou životnosťou. Niektorí autori preto predpokladajú, že homothalizmus by mohol byť adaptáciou na koprofilný spôsob života (Bayman & Collins, 1989; Suárez et al., 2006; Wicklow, 1981). Druhy s týmto pohlavným systémom sú sa totiž schopné obvykle na rozdiel od heterothalických zástupcov pohlavne rozmnožovať, aj pokiaľ sa na exkrement dostane len jediný výtrus, čo by im tak malo umožňovať efektívnejšiu kolonizáciu nových mikrolokalít.

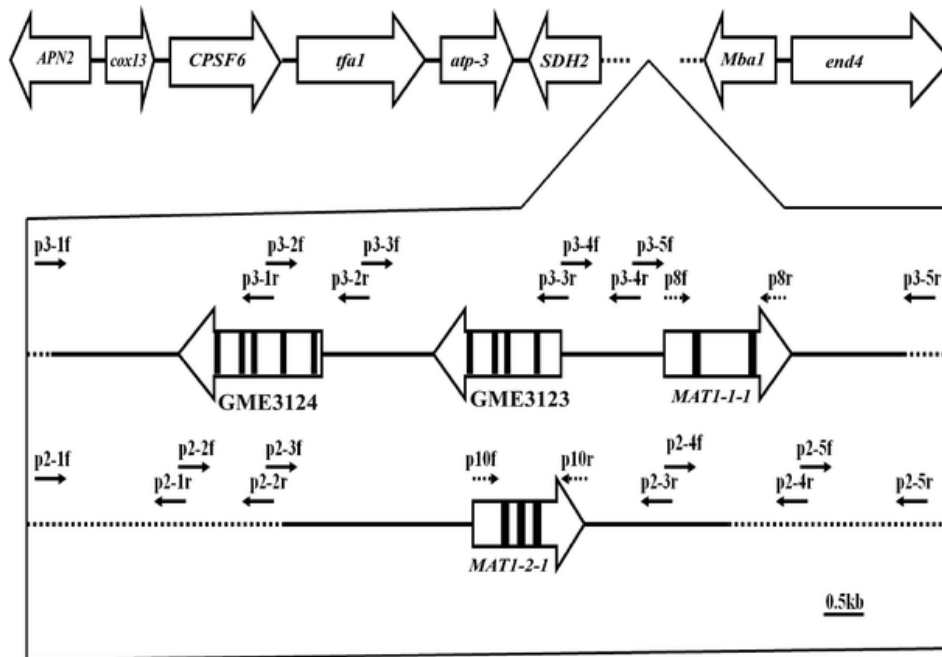
Medzi koprofilnými zástupcami radu Pezizales, u ktorých poznáme pohlavný systém je homothalizmus dominantný a vyskytuje sa u všetkých druhov s výnimkou *Coprobia granulata* a časti predstaviteľov rodu *Ascobolus* (tabuľka 1). V prípade tohto rodu je pritom ale dobre známa ochotná tvorba veľkého množstva asexuálnych spór, ktoré môžu jednoducho zabezpečiť šírenie oboch párovacích typov aj medzi relatívne izolovanými mikrolokalitami (Dowding, 1931). Je navyše zaujímavé, že väčšina zvyšných homothalických zástupcov tohto radu je viazaná na spáleniská, ktoré predstavujú podobne efemérny a často izolovaný typ substrátu ako exkrementy.

Bližší vzťah medzi pohlavným systémom a väzbou na exkrementy bol ale zatiaľ u húb detailnejšie študovaný len ojedinele. Korelácie medzi homothalizmom a koprofiliou bola medzi predstaviteľmi oddelenia Basidiomycota pozorovaná u rodu *Coprinus* (Bayman & Collins, 1989). U zástupcov radu Mucorales z oddelenia Mucoromycota, už však tento vzťah medzi substrátom a pohlavným systémom nie je tak očividný a u mnohých koprofilných druhov bol zistený heterothalizmus (Blakeslee, 1904). Je ale pravdepodobné, že v prípade tejto skupiny húb nebude selekčný tlak na prechod k homothalizmu v dôsledku koprofilie príliš silný. Pohlavné rozmnožovanie nie je totiž pri šírení väčšiny jej zástupcov bezpodmienečne nutné a dominantnú úlohu tu zastávajú skôr asexuálne spóry (Hoffmann et al., 2013), ktorých produkcia už ale nevyžaduje interakciu opačne pohlavne ladených jedincov ani u heterothalických druhov.

### 4.4 Štruktúra *MAT* lokusu

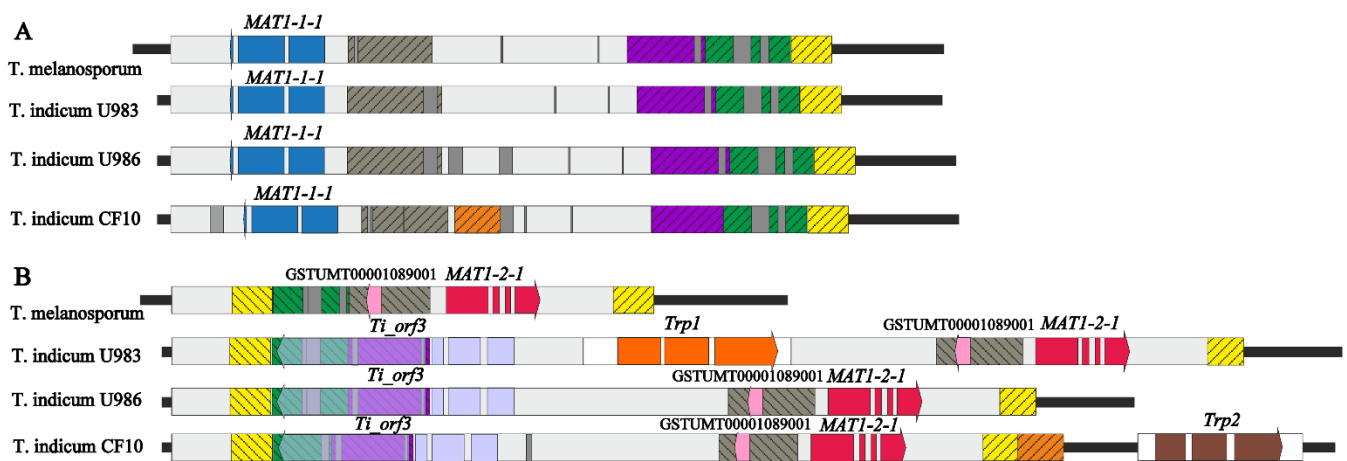
U väčšiny vreckatých húb z pododdelenia Pezizomycotina je štruktúra *MAT* lokusu relatívne konzervovaná. *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* sú ohraničené génmi *APN2* a *SLA2* a u niektorých skupín sú občas sprevádzané ešte ďalšími *MAT* génmi (obrázok 1), prípadne niektorými z génov *APC5*, *ATG3*, *cox13* a *CWF24* (Debuchy & Turgeon, 2006; Lu et al., 2016; Xu et al., 2016).

V prípade predstaviteľov radu Pezizales bola štruktúra *MAT* lokusu sledovaná len u niekoľkých druhov. U smrčku (*Morchella importuna*) tento lokus obsahuje u oboch idiomorf okrem konzervovanejších oblastí tvorených základnými *MAT* génmi, homológmi *APN2* a *SLA2* (*end4*) a *cox13*, ešte päť odlišných génov. V prípade idiomorfy *MATI-1* kóduje navyše ešte ďalšie dva gény, ktoré sa sekvenčne výrazne líšia od iných doteraz známych *MAT* génov (obrázok 12) (Chai et al., 2017).



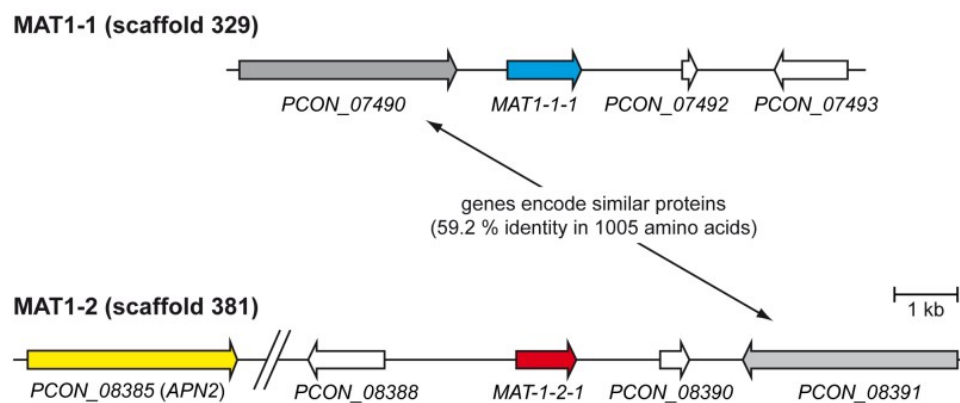
**Obrázok 12:** Usporiadanie génov v *MAT* lokuse a jeho okolí u smrčku (*Morchella importuna*). Odlišnosti medzi jednotlivými idiomorfami sú zobrazené v dolnom boxe. Prevzaté z (Chai et al., 2017).

Zložitú štruktúru vykazuje *MAT* lokus aj u heterotalických hľuzoviek (*Tuber spp.*). U týchto húb obsahuje idiomorfa *MATI-2* niekoľko unikátnych génov a transpozónov, ktorých prítomnosť a usporiadanie sa ale líši aj u blízko príbuzných druhov (obrázok 13) (Belfiori et al., 2013). Ich *MAT* lokus pritom na rozdiel od väčšiny vreckatých húb nie je ohraničený génmi *APN2* a *SLA2*, ale výrazne odlišnými génmi *GSTUMT00001088001* a *GSTUMT00001092001* (Rubini et al., 2011).



**Obrázok 13:** Usporiadanie génov v *MAT* lokuse u *Tuber melanosporum* a izolátov patriacich zrejme k rôznym kryptickým druhom z okruhu *Tuber indicum*. Časť A znázorňuje idiomorfu *MAT1-1* a časť B *MAT1-2*. Šípky predstavujú jednotlivé gény, homologické oblasti sú farebne rozlíšené, sekvenčne podobné oblasti u oboch idiomorf sú vyšrafované, biele obdĺžniky predstavujú transpozóny. Prevzaté z (Belfiori et al., 2013).

U homothalického druhu *Pyronema omphalodes* sa gény *MAT1-1-1* a *MAT1-2-1* vyskytujú samostatne na dvoch rôznych lokusoch v rámci jedného jadra. Aj v tomto prípade sú pritom *MAT* gény ohraničené netypickými a unikátnymi génmi (obrázok 14). Genóm tejto huby síce kóduje aj homologý *ANP2* a *SLA2*, oba sa však nachádzajú na odlišných miestach relatívne ďaleko od seba a aj jednotlivých párovacích génov. Gény susediace s *MAT* génmi u tohto druhu sa pritom výrazne líšia aj od tých popísaných u hľuzoviek (Traeger et al., 2013).



**Obrázok 14:** Usporiadanie *MAT* génov a ich okolia u homothalického druhu *Pyronema omphalodes*. Časť okolia génu *MAT1-2-1* je vynechaná, skutočná vzdialenosť od *APN2* je približne 10 kb. Prevzaté z (Traeger et al., 2013).

Zástupcovia radu Pezizales tak vykazujú veľkú variabilitu a v porovnaní s inými skupinami Pezizomycotina aj viaceré odlišnosti v usporiadaní génov v *MAT* lokuse. U druhu *Ascobolus immersus* dokonca zatiaľ v sekvencii genómu nebolo možné identifikovať ani homologý *MAT* génov (Payen, 2015). Zostáva však otázkou, či sú tieto rozdiely spôsobené bazálnym postavením radu v rámci celého pododdelenia, alebo iba rýchlejšou mutačnou rýchlosťou a akumuláciou transpozónov.

## 5 Záver

Evolúcia rozmnožovanie je u húb veľmi dynamická, pričom ani u predstaviteľov radu Pezizales tomu nie je inak. Väčšina známych druhov tejto skupiny sa rozmnožuje najmä pohlavne a spomedzi známych pohlavných systémov boli u nich zatiaľ dokázané primárny homothalizmus a heterothalizmus. Celkovo sa mi pritom podarilo dohľadať preukazné informácie o pohlavnom systéme pre 60 druhov. Na základe fylogenetickú pozíciu príslušníkov jednotlivých systémov je navyše zrejmé, že k prechodu na homothalizmus došlo v tomto rade niekoľko krát nezávisle na sebe. Vzhľadom na známu dynamiku pohlavných systémov a len relatívne malý počet bližšie sledovaných druhov však širšie zovšeobecnenie pohlavných systémov pre celé rody či čeľade nie je možné.

Je veľmi pravdepodobné, že vďaka rozvoju sekvenčných metód dôjde v blízkej budúcnosti k výraznému urýchleniu výskumu pohlavných systémov. Pribudnú tak zrejme aj informácie od druhov, ktoré netvorí plodnice v laboratórnych podmienkach a pomocou kultivačných experimentov tak u nich doteraz nebolo možné určiť pohlavný systém. Svedčia o tom pritom už aj nedávne štúdie zaoberajúce sa ekonomicky významnými hľuzovkami (*Tuber spp.*) a smrčkami (*Morchella spp.*) (Chai et al., 2017; Du et al., 2017; Andrea Rubini et al., 2011). Využitie molekulárnych metód navyše umožňuje sledovať aj genetické pozadie pohlavného rozmnožovania. Štruktúra *MAT* lokusu viacerých skúmaných zástupcov radu Pezizales je pritom zdá sa unikátna a výrazne odlišná od relatívne konzervovanej schémy známej u ostatných skupín z pododdelenia Pezizomycotina.

Ako potenciálne zaujímavý modelový systém sa javí diverzifikovaný rod *Octospora*, viazaný na rozličné machorasty. Viacerí jeho zástupcovia tvoria variety s vreckami so štyrmi výtrusmi (Benkert, 1998), ktoré sa navyše od štandardných predstaviteľov s vreckami s ôsmymi výtrusmi líšia aj prítomnosťou dvoch jadier v jednotlivých askospórach (Weber, 1992). Tieto charakteristiky tak presne zodpovedajú známym pseudohomothalickým druhom a je možné, že predstavujú prvý prípad pseudohomothalizmu v rade Pezizales. Práve výskumom tejto skupiny húb a ich pohlavného systému by som sa chcel venovať aj v priebehu svojej diplomovej práce.

## 6 Literatúra

- Alby, K., Schaefer, D., & Bennett, R. J. (2009). Homothallic and heterothallic mating in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Nature*, *460*(7257), 890–893.
- Ames, L. M. (1930). A Study of Some Homothallic and Heterothallic Ascomycetes. *Mycologia*, *22*(6), 318.
- Anderson, J. B., & Kohn, L. M. (1998). Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *Trends in Ecology & Evolution*, *13*(11), 444–449.
- Attanayake, R. N., Tennekoon, V., Johnson, D. A., Porter, L. D., del Río-Mendoza, L., Jiang, D., & Chen, W. (2014). Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. *Heredity*, *113*(4), 353–363.
- Bayman, P., & Collins, O. R. (1989). Homothallism in *Coprinus patouillardii*: distribution and variation. *Mycologia*, *81*(5), 728–734.
- Belfiori, B., Riccioni, C., Paolocci, F., & Rubini, A. (2013). Mating type locus of Chinese black truffles reveals heterothallism and the presence of cryptic species within the *T. indicum* species complex. *PLOS ONE*, *8*(12), e82353.
- Belfiori, B., Riccioni, C., Paolocci, F., & Rubini, A. (2016). Characterization of the reproductive mode and life cycle of the whitish truffle *T. borchii*. *Mycorrhiza*, *26*(6), 515–527.
- Benkert, D. (1998). Beiträge zur Kenntnis bryophiler Pezizales-Arten. 8. Viersporige Taxa der Gattung Octospora. *Österreichische Zeitschrift Für Pilzkunde*, *7*, 39–63.
- Bertault, G., Raymond, M., Berthomieu, A., Callot, G., & Fernandez, D. (1998). Trifling variation in truffles. *Nature*, *394*(6695), 734–734.
- Betts, E. M. (1926). Heterothallism in *Ascobolus carbonarius*. *American Journal of Botany*, *13*(7), 427–432.
- Betts, E. M., & Meyer, S. L. (1939). Heterothallism and segregation of sexes in *Ascobolus geophilus*. *American Journal of Botany*, *26*(8), 617–619.
- Bezerra, J. L., & Kimbrough, J. W. (1975). The genus *Lasiobolus* (Pezizales, Ascomycetes). *Canadian Journal of Botany*, *53*(12), 1206–1229.
- Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M. E., & Giraud, T. (2012). Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology*, *25*(6), 1020–1038.
- Bistis, G. (1956a). Sexuality in *Ascobolus stercorarius*. I. morphology of the ascogonium; plasmogamy; evidence for a sexual hormonal mechanism. *American Journal of Botany*, *43*(6), 389–394.
- Bistis, G. (1956b). Studies on the genetics of *Ascobolus stercorarius* (Bull.) Schrot. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *83*(1), 35–61.
- Bistis, G. N. (2004). Reproductive isolation: evidence that *Ascobolus stercorarius* and *Ascobolus furfuraceus* are two species, not one. *Fungal Genetics Reports*, *51*(1), 23–25.
- Blakeslee, A. F. (1904). Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, *40*(4), 205.
- Brummelen, J. van. (1981). The genus *Ascodesmis* (Pezizales, Ascomycetes). *Persoonia*, *11*(3), 333–358.
- Butler, G. (2007). The evolution of MAT: the ascomycetes. In *Sex in Fungi* (3–18). American Society



of Microbiology.

- Chai, H., Chen, L., Chen, W., Zhao, Q., Zhang, X., Su, K., & Zhao, Y. (2017). Characterization of mating-type idiomorphs suggests that *Morchella importuna*, Mel-20 and *M. sextelata* are heterothallic. *Mycological Progress*, 16(7), 743–752.
- Chilvers, M. I., Jones, S., Meleca, J., Peever, T. L., Pethybridge, S. J., & Hay, F. S. (2014). Characterization of mating type genes supports the hypothesis that *Stagonosporopsis chrysanthemi* is homothallic and provides evidence that *Stagonosporopsis tanacetii* is heterothallic. *Current Genetics*, 60, 295–302.
- Cinto, I. E., & Dokmetzian, D. A. (2006). *Iodophanus granulipolaris* (Ascomycota-Pezizales): primera cita para la Argentina. Un estudio morfológico y fisiológico. *Hickenia (Argentina) Boletín Del Darwinion*, 3(62), 277–284.
- Cinto, I. E., Dokmetzian, D. A., & Ranalli, M. E. (2007). *Iodophanus carneus* and *I. testaceus* (Ascomycota-Pezizales): Independent taxonomic identity or synonymy? A study of their morphology and isozymes. *Bulletin of the Botanical Society of Argentina*, 42(3–4), 181–187.
- Cinto, I. E., Gottlieb, A. M., Gally, M., Ranalli, M. E., Ramos, A. M., & Ar, I. F. U. (2009). AFLP characterization in pathogenic and coprophilous fungi. *Mycotaxon*, 110(1), 81–87.
- Conway, K. E. (1975a). Ascocarp ontogeny and imperfect state of *Thecotheus* (Pezizales, Ascomycetes). *Mycologia*, 67(2), 241–252.
- Conway, K. E. (1975b). The ontogeny of *Lasiobolus ciliatus* (Pezizales, Ascomycetes). *Mycologia*, 67(2), 253–263.
- Coppin, E., Debuchy, R., & Arnaise, S. (1997). Mating types and sexual development in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 411–428.
- Dahlstrom, J. L., Smith, J. E., & Weber, N. S. (2000). Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the *Pinaceae* in pure culture synthesis. *Mycorrhiza*, 9, 279–285.
- Debuchy, R., & Turgeon, B. G. (2006). Mating-type structure, evolution, and function in euascomycetes. In *Growth, Differentiation and Sexuality* (293–323). Springer.
- Dodge, B. O. (1920). The life history of *Ascobolus magnificus*: origin of the ascocarp from two strains. *Mycologia*, 12(3), 115–134.
- Dodge, B. O. (1922). A *Lachnea* with a *Botryose* conidial stage. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 49(10), 301–305.
- Dodge, B. O. (1927). Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. *Journal of Agricultural Research*, 35(4), 289–305.
- Dodge, B. O., & Seaver, F. J. (1946). Species of *Ascobolus* for genetic study. *Mycologia*, 38(6), 639–651.
- Dokmetzian, D. A. (1999). *Estudios quimiotaconómicos en especies del género Ascobolus (Ascobolaceae-Pezizales)*. Ph.D. thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Dokmetzian, D., Gimenez, M. C., Cinto, I. E., & Ranalli, M. E. (2004). Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de Argentina XIX. Dos nuevas especies de *Ascobolus* (Ascomycota). *Hickenia (Argentina) Boletín Del Darwinion*, 3(50), 205–211.
- Dokmetzian, D. A., Ranalli, M. E., & Saidman, B. O. (2005). Isozyme analysis of twelve species of the genus *Ascobolus*. *Mycotaxon*, 92, 295–309.
- Dowding, E. S. (1931). The sexuality of *Ascobolus stercorarius* and the transportation of the oidia by mites and flies. *Annals of Botany*, 45(180), 621–637.

- Du, X.-H., Zhao, Q., Xia, E.-H., Gao, L.-Z., Richard, F., & Yang, Z. L. (2017). Mixed-reproductive strategies, competitive mating-type distribution and life cycle of fourteen black morel species. *Scientific Reports*, 7(1), e1493.
- Dyer, P. S., Paoletti, M., & Archer, D. B. (2003). Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology*, 149(9), 2301–2303.
- Dyer, P. S. (2008). Evolutionary biology: genomic clues to original sex in Fungi. *Current Biology*, 18(5), 207–209.
- Ferreira, A. V. B., Saupe, S., & Glass, N. L. (1996). Transcriptional analysis of the mtA idiomorph of *Neurospora crassa* identifies two genes in addition to mtA-1. *MGG Molecular & General Genetics*, 250(6), 767–774.
- Fitzpatrick, D. A., Logue, M. E., Stajich, J. E., & Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), e99.
- Fraser, H. C. I. (1908). Contributions to the cytology of *Humaria rutilans*, Fries. *Annals of Botany*, 22(1), 35–55.
- Frizzi, G., Lalli, G., Miranda, M., & Pacioni, G. (2001). Intraspecific isozyme variability in Italian populations of the white truffle *Tuber magnatum*. *Mycological Research*, 105(3), 365–369.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., ... Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105–1115.
- García-Cunchillos, I., Sánchez, S., Barriuso, J. J., & Pérez-Collazos, E. (2014). Population genetics of the westernmost distribution of the glaciations-surviving black truffle *Tuber melanosporum*. *Mycorrhiza*, 24(1), 89–100.
- Gernandt, D. S., Platt, J. L., Stone, J. K., Spatafora, J. W., Holst-Jensen, A., Hamelin, R. C., & Kohn, L. M. (2001). Phylogenetics of Helotiales and Rhytismatales based on partial small subunit nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 93(5), 915–933.
- Gessner, R. V., Romano, M. A., & Schultz, R. W. (1987). Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia*, 79(5), 683–687.
- Gioti, A., Mushegian, A. A., Strandberg, R., Stajich, J. E., & Johannesson, H. (2012). Unidirectional evolutionary transitions in fungal mating systems and the role of transposable elements. *Molecular Biology and Evolution*, 29(10), 3215–3226.
- Gioti, A., Stajich, J. E., & Johannesson, H. (2013). *Neurospora* and the dead-end hypothesis: genomic consequences of selfing in the model genus. *Evolution*, 67(12), 3600–3616.
- Glass, N. L., & Kuldau, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30(1), 201–224.
- Grognet, P., & Silar, P. (2015). Maintaining heterokaryosis in pseudo-homothallic fungi. *Communicative & Integrative Biology*, 8(4), e994382.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I., & Williamson, H. S. (1930). Contributions to the study of *Humaria granulata*, Quel. *Annals of Botany*, 44(1), 127–145.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I., & Williamson, H. S. (1931). Contributions to the study of *Pyronema confluens*. *Annals of Botany*, 45(178), 355–371.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I., & Williamson, H. S. (1932). The cytology and development of *Ascobolus magnificus*. *Annals of Botany*, 46(183), 653–670.

- Gwynne-Vaughan, H. C. I., & Williamson, H. S. (1933). The Asci of *Lachnea scutellata*. *Annals of Botany*, 47(186), 375–383.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I., & Williamson, H. S. (1934). The cytology and development of *Ascophanus aurora*. *Annals of Botany*, 48(189), 261–272.
- Gwynne-Vaughan, H. C. I. (1937). Contributions to the study of *Lachnea melaloma*. *Annals of Botany*, 1(1), 99–105.
- Haber, J. E. (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 32(1), 561–599.
- Harper, R. A. (1900). Sexual reproduction in *Pyronema confluens* and the morphology of the ascocarp. *Annals of Botany*, 14(55), 321–400.
- Harrington, T. C., Steimel, J. P., Wingfield, M. J., & Kile, G. A. (1996). Isozyme variation and species delimitation in the *Ceratocystis coerulescens* complex. *Mycologia*, 88(1), 104–113.
- Herskowitz, I. (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature*, 342(6251), 749–757.
- Hervey, A., Bistis, G., & Leong, I. (1978). Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia*, 70(6), 1269–1274.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509–547.
- Hiscock, S. J., & Kües, U. (1999). Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. *International Review of Cytology*, 193, 165–295.
- Hobbie, E. A., Weber, N. S., & Trappe, J. M. (2001). Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist*, 150(3), 601–610.
- Hobbie, E. A., Rice, S. F., Weber, N. S., & Smith, J. E. (2016). Isotopic evidence indicates saprotrophy in post-fire *Morchella* in Oregon and Alaska. *Mycologia*, 108(4), 638–645.
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., de Hoog, G. S., Benny, G. L., ... Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57–76.
- Inderbitzin, P., Harkness, J., Turgeon, B. G., & Berbee, M. L. (2005). Lateral transfer of mating system in *Stemphylium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), 11390–11395.
- Inderbitzin, P., Shoemaker, R. A., Neill, N. R. O. ', Turgeon, B. G., Berbee, M. L., Inderbitzin, P., ... Shoemaker, R. A. (2006). Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: the heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic species with a *Brachycladium papaveris* asexual state. *Canadian Journal of Botany*, 84, 1304–1326.
- Jacobsen, S., Wittig, M., & Pöggeler, S. (2002). Interaction between mating-type proteins from the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Current Genetics*, 41(3), 150–158.
- Jain, K., & Morgan-Jones, J. F. (1973a). Ascocarp development in *Mycoarctium ciliatum*. *Canadian Journal of Botany*, 51(1), 127–130.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., ... Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818–822.

- Kinoshita, A., Nara, K., Sasaki, H., Feng, B., Obase, K., Yang, Z. L., & Yamanaka, T. (2018a). Using mating-type loci to improve taxonomy of the *Tuber indicum* complex, and discovery of a new species, *T. longispinosum*. *PLOS ONE*, *13*(3), e0193745.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi* (10th ed.). CAB International.
- Kish, L. P. (1974). Culture and cytological development of *Coprotus lacteus* (Pezizales). *Mycologia*, *66*(3), 422–435.
- Kostriken, R., Strathern, J. N., Klar, A. J. S., Hicks, J. B., & Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, *35*(1), 167–174.
- Kronstad, J. W., & Staben, C. (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*, *31*(1), 245–276.
- Læssøe, T., & Hansen, K. (2007). Truffle trouble: what happened to the Tuberales? *Mycological Research*, *111*(9), 1075–1099.
- Larsen, H. J. (1975, August 14). *The genus Anthracobia Boudier (Pezizales, Ascomycetes)*. Ph.D. thesis, Oregon State University.
- Lin, X., Hull, C. M., & Heitman, J. (2005). Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*. *Nature*, *434*(7036), 1017–1021.
- Lin, X., & Heitman, J. (2007). Mechanisms of homothallism in fungi and transitions between heterothallism and homothallism. In *Sex in Fungi* (35–57). ASM Press.
- Lu, Y., Xia, Y., Luo, F., Dong, C., & Wang, C. (2016). Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*. *Fungal Genetics and Biology*, *88*, 35–43.
- Martin, T., Lu, S.-W., van Tilbeurgh, H., Ripoll, D. R., Dixelius, C., Turgeon, B. G., & Debuchy, R. (2010). Tracing the origin of the fungal  $\alpha 1$  domain places its ancestor in the HMG-Box superfamily: implication for fungal mating-type evolution. *PLOS ONE*, *5*(12), e15199.
- McLaughlin, D. J., & Spatafora, J. W. (2014). *The Mycota 7, Systematics and evolution Part A*. Springer.
- Metzenberg, R. L., & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays*, *12*(2), 53–59.
- Moore, E. J. (1963). The ontogeny of the apothecia of *Pyronema domesticum*. *American Journal of Botany*, *50*(1), 37–44.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *1*(1), 2–9.
- Nasmyth, K. A., & Tatchell, K. (1980). The structure of transposable yeast mating type loci. *Cell*, *19*(3), 753–764.
- Nauta, M. J., & Hoekstra, R. F. (1992). Evolution of reproductive systems in filamentous ascomycetes. I. Evolution of mating types. *Heredity*, *68*, 405–410.
- Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., & Heitman, J. (2011). Sex in fungi. *Annual Review of Genetics*, *45*(1), 405–430.
- Nieuwenhuis, B. P. S., & James, T. Y. (2016). The frequency of sex in fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *371*(1706), e20150540.
- Nygren, K., Strandberg, R., Wallberg, A., Nabholz, B., Gustafsson, T., García, D., ... Johannesson, H.

- (2011). A comprehensive phylogeny of *Neurospora* reveals a link between reproductive mode and molecular evolution in fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(3), 649–663.
- O'Donnell, K. L., & Beneke, E. S. (1973). Apothecial Formation by *Peziza quelepidotia* in Pure Culture. *Mycologia*, 65(4), 913–915.
- O'Donnell, K. L., Hooper, G. R., & Fields, W. G. (1976). Scanning ultrastructural ontogeny of eugymnohymenial apothecia in the operculate Discomycetes *Ascodesmis nigricans* and *A. sphaerospora*. *Canadian Journal of Botany*, 54(7), 572–577.
- Obrist, W. (1961). The genus *Ascodesmis*. *Canadian Journal of Botany*, 39, 943–953.
- Ono, Y. (2002). The diversity of nuclear cycle in microcyclic rust fungi (Uredinales) and its ecological and evolutionary implications. *Mycoscience*, 43, 421–439.
- Orr, H. A., & Otto, S. P. (1994). Does diploidy increase the rate of adaptation? *Genetics*, 136(4), 1475–1480.
- Ower, R. (1982). Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia*, 74(1), 142–144.
- Paden, J. W., & Cameron, J. V. (1972). Morphology of *Warcupia terrestris*, a new ascomycete genus and species from soil. *Canadian Journal of Botany*, 50(5), 999–1001.
- Paden, J. W., & Stanlake, E. A. (1973). Ascocarp development in *Ascobolus michaudii*. *Canadian Journal of Botany*, 51(7), 1271–1273.
- Pagliaccia, D., Douhan, G. W., Douhan, L., Peever, T. L., Carris, L. M., & Kerrigan, J. L. (2011). Development of molecular markers and preliminary investigation of the population structure and mating system in one lineage of black morel (*Morchella elata*) in the Pacific Northwestern USA. *Mycologia*, 103(5), 969–982.
- Palmer, J. M., Kubatova, A., Novakova, A., Minnis, A. M., Kolarik, M., & Lindner, D. L. (2014). Molecular characterization of a heterothallic mating system in *Pseudogymnoascus destructans*, the Fungus causing white-nose syndrome of bats. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(9), 1755–1763.
- Paolocci, F., Rubini, A., Riccioni, C., & Arcioni, S. (2006). Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2390–2393.
- Payen, T. (2015). *Contribution à l'étude de l'évolution des génomes de champignons ectomycorrhiziens du genre Tuber (Péizomycètes) par génomique comparative*. Ph.D. thesis, Université de Lorraine.
- Perkins, D. D., & Turner, B. C. (1988). *Neurospora* from natural populations: toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental Mycology*, 12, 91–131.
- Pfister, D. H., Agnello, C., Lantieri, A., & LoBuglio, K. F. (2013). The *Caloscyphaceae* (Pezizomycetes, Ascomycota), with a new genus. *Mycological Progress*, 12(4), 667–674.
- Pfister, D. H. (2015). Pezizomycotina: Pezizomycetes, Orbiliomycetes. In *The Mycota 7, Systematics and evolution Part B* (35–55). Springer.
- Piit, J. I., & Christian, J. H. B. (1970). Heat resistance of xerophilic fungi based on microscopical assessment of spore survival. *Applied Microbiology*, 20(5), 682–686.
- Pöggeler, S. (2011). Function and evolution of pheromones and pheromone receptors in filamentous ascomycetes. *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms*, 73–96. Springer.
- Pontecorvo, G. (1956). The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 10(1), 393–400.

- Rafalski, J. A. (2002). Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Science*, 162(3), 329–333.
- Raju, N. B., & Perkins, D. D. (1994). Diverse programs of ascus development in pseudohomothallic species of *Neurospora*, *Gelasinospora*, and *Podospora*. *Developmental Genetics*, 15(1), 104–118.
- Rayner, A. D. M. (1994). Evolutionary processes affecting adaptation to saprotrophic life styles in ascomycete populations. In *Ascomycete Systematics* (261–271). Springer.
- Reeves, F. (1967). The fine structure of ascospore formation in *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 59(6), 1018–1033.
- Riccioni, C., Belfiori, B., Rubini, A., Passeri, V., Arcioni, S., & Paolocci, F. (2008). *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist*, 180(2), 466–478.
- Richard, F., Bellanger, J.-M., Clowez, P., Hansen, K., O'Donnell, K., Urban, A., ... Moreau, P.-A. (2015). True morels (*Morchella*, Pezizales) of Europe and North America: evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy. *Mycologia*, 107(2), 359–382.
- Rizet, G. (1939). Sur les spores dimorphes et l'hérédité de leurs caractères chez un nouvel *Ascobolus* hétérothallique. *CR Acad. Sci.*, 208, 1669–1671.
- Roach, K., Feretzaki, M., Sun, S., & Heitman, J. (2014). Unisexual reproduction. In *Advances in Genetics* (255–305). Academic Press.
- Robert, V., Stegehuis, G., & Stalpers, J. (2005). The MycoBank engine and related databases. [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)
- Rossen, J. M., & Westergaard, M. (1966). Studies on the mechanism of crossing over. II. Meiosis and the time of meiotic chromosome replication in the ascomycete *Neottiella rutilans* (Fr.) Dennis. *Comptes-Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg*, 35(9), 233–260.
- Rubini, A., Paolocci, F., Riccioni, C., Vendramin, G. G., & Arcioni, S. (2005). Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6584–6589.
- Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C., Tisserant, E., Arcioni, S., Martin, F., & Paolocci, F. (2011). Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, 189(3), 710–722.
- Sánchez, S., Gómez, E., Martín, M., De Miguel, A. M., Urban, A., & Barriuso, J. (2014). Experiments on the life cycle and factors affecting reproduction of *Sphaerosporella brunnea* provide evidence for rapid asexual propagation by conidiospores and for homothallism in an ectomycorrhizal competitor of cultivated truffle species. *Fungal Ecology*, 8, 59–65.
- Schaefer, D., Côte, P., Whiteway, M., & Bennett, R. J. (2007). Barrier activity in *Candida albicans* mediates pheromone degradation and promotes mating. *Eukaryotic Cell*, 6(6), 907–918.
- Schmidt, E. L. (1983). Spore germination of and carbohydrate colonization by *Morchella esculenta* at different soil temperatures. *Mycologia*, 75(5), 870–875.
- Schoch, C. L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., ... Spatafora, J. W. (2009). The ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224–239.
- Schoustra, S. E., Debets, A. J. M., Slakhorst, M., & Hoekstra, R. F. (2007). Mitotic Recombination Accelerates Adaptation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genetics*, 3(4), e68.

- Schweizer, G. (1931). Zur Entwicklungsgeschichte von *Ascobolus strobolinus* nov. spec. *Planta*, 12(4), 588–602.
- Shiu, P. K., & Glass, N. L. (2000). Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 183–188.
- Spatafora, J. W., Sung, G.-H., Johnson, D., Hesse, C., O'Rourke, B., Serdani, M., ... Schoch, C. L. (2006). A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. *Mycologia*, 98(6), 1018–1028.
- Stanton, B. C., Giles, S. S., Staudt, M. W., Kruzel, E. K., & Hull, C. M. (2010). Allelic exchange of pheromones and their receptors reprograms sexual identity in *Cryptococcus neoformans*. *PLOS Genetics*, 6(2), e1000860.
- Suárez, M. E., Ranalli, M. E., Dokmetzian, D. A., & Ramos, A. M. (2006). Characterization of three species of the genus *Coprotus* (Ascomycota) by isozyme analysis. *Mycotaxon*, 97, 257–273.
- Swingle, D. B. (1934). Fertilization in *Ascodesmis nigricans* Van Tiegh. *American Journal of Botany*, 21(9), 519–545.
- Tedersoo, L., May, T. W., & Smith, M. E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217–263.
- Thomson, G. (1977). The effect of a selected locus on linked neutral loci. *Genetics*, 85(4), 753–788.
- Traeger, S., Altegoer, F., Freitag, M., Gabaldon, T., Kempken, F., Kumar, A., ... Nowrousian, M. (2013). The genome and development-dependent transcriptomes of *Pyronema confluens*: a window into fungal evolution. *PLOS Genetics*, 9(9), e1003820.
- Turgeon, B. G., & Yoder, O. C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 1–5.
- Volk, T. J., & Leonard, T. J. (1990). Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research*, 94(3), 399–406.
- Wang, H., Xu, Z., Gao, L., & Hao, B. (2009). A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), e195.
- Weber, E. (1992). *Untersuchungen zu Fortpflanzung und Ploidie verschiedener Ascomyceten*. Bibliotheca Mycologica.
- Welsford, E. J. (1907). Fertilization in *Ascobolus furfuraceus*, Pers. *New Phytologist*, 6(7), 156–161.
- Whitehouse, H. L. K. (1949). Heterothallism and sex in the fungi. *Biological Reviews*, 24(4), 411–447.
- Wicklow, D. T. (1981). Biogeography and conidial Fungi. *Biology of Conidial Fungi*, (1), 417–447.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Lumbsch, H. T., Liu, J. K., Maharachchikumbura, S. S. N., Ekanayaka, A. H., ... Phookamsak, R. (2018). Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity*, 88(1), 167–263.
- Wilson, A. M., Wilken, P. M., van der Nest, M. A., Steenkamp, E. T., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2015). Homothallism: an umbrella term for describing diverse sexual behaviours. *IMA Fungus*, 6(1), 207–214.
- Wilson, I. M. (1952). The ascogenous hyphae of *Pyronema confluens*. *Annals of Botany*, 16(3), 321–339.
- Xu, L., Jardini, T. M., & Chen, W. (2016). Direct repeat-mediated DNA deletion of the mating type MAT1-2 genes results in unidirectional mating type switching in *Sclerotinia trifoliorum*. *Scientific Reports*, 6(1), e27083.
- Yang, C. S., & Korf, R. P. (1985). A monograph of the genus *Tricharina* and of a new, segregate

- genus, *Wilcoxina* (Pezizales). *Mycotaxon*, 24(1), 467–531.
- Yu, C. C. (1954). The culture and spore germination of *Ascobolus* with emphasis on *A. magnificus*. *American Journal of Botany*, 41(1), 21–30.
- Yun, S. H., Kim, H. K., Lee, T., & Turgeon, B. G. (2017). Self-fertility in *Chromocrea spinulosa* is a consequence of direct repeat-mediated loss of MAT1-2, subsequent imbalance of nuclei differing in mating type, and recognition between unlike nuclei in a common cytoplasm. *PLOS Genetics*, 13(9), e1006981.
- Yun, S. H., Berbee, M. L., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5592–5597.
- Zeyl, C. (2009). The role of sex in fungal evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 12(6), 592–598.