

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Výzkum chorošů se zaměřením na
populační strukturu vybraných druhů**

Jiří Kout

Doktorská disertační práce

školitel: **Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.**

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta a Biologické centrum AV ČR, v. v. i.,
Ústav molekulární biologie rostlin

České Budějovice 2009

Kout, J., 2009: Výzkum chorošů se zaměřením na populační strukturu vybraných druhů.
[Research of polypores focused at the population structure of selected species. Ph.D. Thesis,
in Czech.] – 79 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice,
Czech Republic.

Anotace / Annotation:

Modern methods of genetic and molecular characterization of fungi were used to study the ecology and taxonomy of polypores. The main focuses of the research were populations of two polypore species: *Trametes gibbosa*, as an example of abundant, invasive polypore and *Fomitopsis rosea*, a rare and rapidly disappearing species. In the course of study, several other remarkable, little known or endangered species were collected and investigated in terms of their ecology and taxonomy.

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, dne 30. 6. 2009.

Mgr. Jiří Kout

Vyjádření školitele o podílu na uvedených publikacích

Jako školitel této práce potvrzuji, že Jiří Kout má následující podíly na vzniku publikací, na nichž je založena tato doktorská práce.

60% - Kout J, Vlasák J. 2007. *Trametes gibbosa* (Basidiomycetes, Polyporales) in the USA and Canada. *Can. J. Bot.* 85: 342–346.

50% - Kout J, Vlasák J. 2009. *Antrodia serialiformis* from the eastern USA, a new and abundant polypore similar to *Antrodia serialis*. *Mycotaxon* 108: 329–335.

30% - Vlasák J, Kout J, Dvořák D. 2009. Taxonomical position of polypore *Dichomitus albidofuscus*: *Donkioporia albidofusca* comb. nov. – *Mycol. Prog.* (submitted).

100% - Kout J. 2008. *Sistotrema dennisii* (Basidiomycetes, Sistotremataceae) – a new species for the Czech Republic. *Czech Mycol.* 60: 105–111.

80% - Kout J, Vlasák J. 2009. Vzácné choroše z České republiky, zejména z jižních Čech. *Mykol. Listy* no. 108 (accepted).

80% - Kout J, Vlasák J. 2009. Notes on two species of *Diplomitoporus* (Basidiomycota, Polyporaceae) of Central America. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (accepted).

40% - Kout J, Vlasák J, Dvořák D. 2009. New collections and ecology of rare polypore *Dichomitus albidofuscus*. *Czech Mycol.* (submitted)

V Českých Budějovicích, dne 30. 6. 2009

Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.

PODĚKOVÁNÍ

Je mi potěšením vyjádřit zde poděkování svému školiteli Doc. Dr. J. Vlasákovi za výborné vedení této doktorské práce, která jen díky jemu mohla být zdárně dovedena do konce.

Snad ještě více děkuji za předané znalosti a zkušenosti s choroši. Zde má můj vděk také zakladatel mykologie, veliký Elias Magnus Fries, který učil, že skutečné poznání hub znamená stovky pěších kilometrů, sběr spousty položek a pilnou práci, a přitom přináší potěšení, které v jiné práci sotva najdete.



Elias Magnus Fries

(1794 – 1878)

1. ÚVOD.....	1
1.1 Choroše	1
1.2 Populační biologie hub	3
1.2.1. Genetická charakterizace populací	4
1.2.2. Párovací lokusy	5
1.2.3. Molekulární metody - stanovení DNA polymorfismů	6
1.3 Diverzita, mykogeografie a ekologie chorošů	8
2. CÍLE PRÁCE	9
3. LITERATURA.....	10
4. POPULAČNÍ STUDIE	14
4.1 Kout J, Vlasák J. 2007. <i>Trametes gibbosa</i> (Basidiomycetes, Polyporales) in the USA and Canada. Can. J. Bot. 85: 342–346.....	14
4.2 Kout J, Vlasák J. Microsatellite DNA markers in the polypore <i>Fomitopsis rosea</i> and their use for characterization of its relict populations in Vltava River Valley, Czech Republic (manuscript).....	14
5. TAXONOMIE CHOROŠŮ	32
5.1 Kout J, Vlasák J. 2009. <i>Antrodia serialiformis</i> from the eastern USA, a new and abundant polypore similar to <i>Antrodia serialis</i> . Mycotaxon 108: 329–335.....	32
5.2 Vlasák J, Kout J, Dvořák D. 2009. Taxonomical position of polypore <i>Dichomitius albidofuscus</i> : <i>Donkioporia albidofusca</i> comb. nov. Mycol. Prog. (submitted).....	32
6. EKOLOGIE A MYKOGEOGRAFIE.....	49
6.1 Kout J. 2008. <i>Sistotrema dennisii</i> (Basidiomycetes, Sistotremataceae) – a new species for the Czech Republic. Czech Mycol. 60: 105–111.....	49
6.2 Kout J, Vlasák J. 2009. Vzácné choroše z České republiky, zejména z jižních Čech. Mykol. Listy 108 (accepted).	49
6.3 Kout J, Vlasák J. 2009. Notes on two species of <i>Diplomitoporus</i> (Basidiomycota, Polyporaceae) of Central America. Revista Mexicana de Biodiversidad (accepted).	49
6.4 Kout J, Vlasák J, Dvořák D. 2009. New collections and ecology of rare polypore <i>Dichomitius albidofuscus</i> . Czech Mycol. (submitted).....	49
7. ZÁVĚR.....	77

1. Úvod

1.1 Choroše

Jako choroše se obecně označuje skupina dřevních, převážně saprotrofních hub, vytvářejících jednoleté nebo vytrvalé plodnice s poroidním uspořádáním hymenoforu (Ryvarden et Gilbertson 1993). Jen při zběžném pohledu se zdá podobný rourkovitý hymenofor hřibovitých hub (Boletales), ale stavba a růst plodnic, i životní strategie, obě morfologicky podobné skupiny dobře odlišuje.

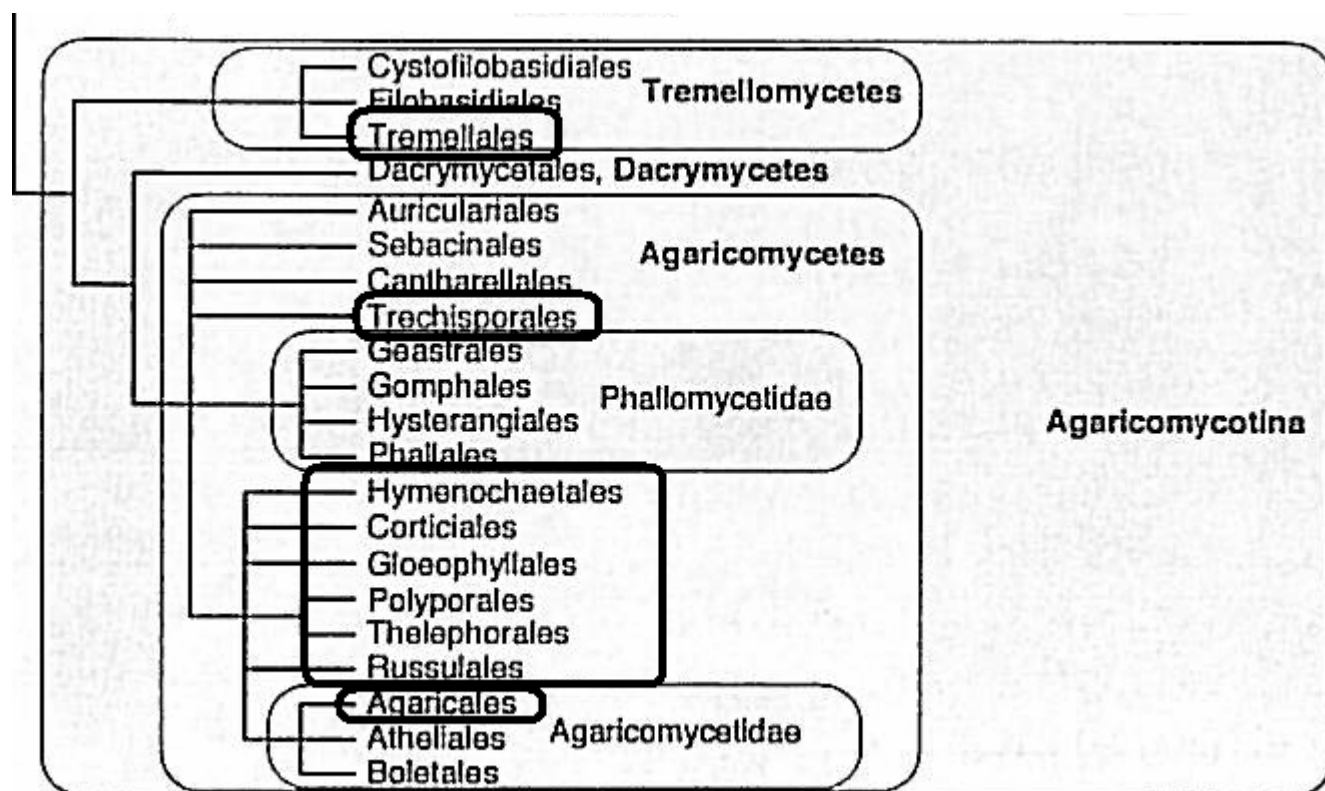
V současnosti jsou chorošovité houby považovány za vysoce polyfyletické (Binder et Hibbett 2002). Možná právě proto mezi nimi existuje řada přechodných typů jak ve stavbě plodnice (morfologii) tak i ve způsobu života (ekologii). Krásnopórky (*Albatrellus*) mají sice poroidní hymenofor chorošů, ale rostou na zemi a jsou mykorrhizní. Póry bývají u některých druhů protaženy v lamelly (*Daedaleopsis*) nebo dokonce roztrhány až téměř v ostny (*Irpex*). Někdy je uspořádání hymenoforu jediným znakem k rozlišení nejen druhů ale dokonce i rodů (*Junghuhnia* a *Steccherinum*; o oprávněnosti tohoto dělení se vedou spory). Za pravé choroše se považují druhy s plodným hymeniem (bazídiemi) na stěně rourek a s jejich sterilní bází; ty co mají plodnou pouze spodní (horizontální) část rourek (např. *Grammothele*) se řadí ke kornatcovitým houbám (Ryvarden et Gilbertson 1993, Ryvarden et Johansen 1980).

Choroše vytvářejí plodnice buď zcela rozlité po substrátu (resupinátní), kdy rourky vyrůstají z tenké vrstvy houbové tkáně na povrchu substrátu, tzv. subikula, nebo kloboukaté, kdy rourky rostou směrem dolů naspodu více nebo méně tlustého klobouku. Mnoho druhů vytváří plodnice, které jsou přechodem mezi oběma typy (polorozlité, effused-reflexed). Známe i několik typů plodnic podle délky života. Nápadné jsou víceleté druhy, s mnoha vrstvami rourek, které vytrvávají na stanovišti po několik let, ale existují i choroše s efemérními plodnicemi, které se objevují jen na několik málo příhodných dnů v roce (Kout et al. 2009). Celkový vzhled plodnice může být velmi variabilní svým tvarem i barvou a proto jsou mikroskopické znaky často nezbytné pro správné určení.

Plodnici tvoří dva typy hyf. Základní, generativní hyfy jsou přítomny vždy. Přehrádky je rozdělují na jednotlivé buňky a nad přehrádkami bývají většinou přezky, i když jsou i druhy nebo celé rody bez přezek (*Oxyporus*). Vegetativní hyfy nemají přehrádky a vyrůstají jako slepé, často tlustostěnné hyfovité konce z generativních hyf. Většinou způsobují tvrdost plodnic. Máme-li více typů hyf, mluvíme o dimitické nebo i trimitické stavbě plodnic.

V případě, že choroš nemá vegetativní hyfy, pak jeho hyfový systém označujeme jako monomitický. V hymeniu se mohou nalézat různé sterilní elementy jako cystidy, cystidioly apod. Basidie jsou většinou tetrasterigmatické a vznikají na nich haploidní spory různých tvarů, z nichž vyrůstá po dopadu na vhodný substrát monokaryotické mycelium. To může u několika málo druhů vytvořit dikaryotní plodnice (homothalismus), ale většinou se musí napřed zkřížit s kompatibilním myceliem (heterothalismus). Heterothalismus je buď bipolárního (hlavně choroše s hnědou hnilobou) nebo tetrapolárního typu (více kap. 1.2). Mnoho druhů vytváří také spousty nepohlavních spor (chlamydospory, konidie, oidie apod.) většinou v myceliu ve dřevě, ale někdy třeba i v tkáni klobouku, ale jejich význam pro rozmnožování hub je sporný. Naproti tomu, celé plodnice nepohlavního stádia (anamorfy) tvoří pravidelně jen několik málo druhů (*Oligoporus ptychogaster*) (Ryvarden 1991).

Klasifikace chorošů do přirozeného systému je velmi obtížná díky konvergenci biochemických i morfologických znaků. Moderní taxonomie je proto založena na molekulárních metodách (Ko 2000). Chorošovitě druhy najdeme v několika nepříbuzných skupinách v rámci stopkovýtrusných hub (Basidiomycota) (Hibbet et al. 2007, obr. 1.).



Obr. 1. Distribuce chorošů ve skupině Agaricomycotina. Řády, kde se choroše nacházejí jsou ohraničeny silnou černou čarou (upraveno podle Hibbet et al. 2007).

Převážná většina druhů žije saprotrofním způsobem, menšina je parazitická a ojediněle se vyskytuje i mykorhizní strategie. Vegetativní mycelium roste skrytě v substrátu a jen za vhodných podmínek vytvoří plodnice. Dřevokazné houby, choroše nevyjímaje, způsobují rozklad (hnilobu) dřeva dvěma základními způsoby. Pokud enzymatický aparát depolymerizuje jen celulóзовou složku, pak takové druhy vykazují hnědou hnilobu (dřevo se zbarvuje do hněda nerozloženým ligninem). Jestliže choroše mají ligninolytické enzymy, dochází k rozkladu všech složek buněčné stěny a jde o bílou hnilobu dřeva (Rypáček 1957). Výbava enzymatickým aparátem značně určuje dopředu typ dřeva, které bude druh rozkládat (druhy s hnědou hnilobou upřednostňují substrát z jehličnanů).

Některé druhy škodí svojí hnilobnou činností, zvláště v monokulturních lesích (*Heterobasidion*). Na druhou stranu, až 30% objemu půdy v lesích tvoří zbytky po hnědé hnilobě dřeva, které zvyšují zádrž vody, odstraňují z oběhu jedovaté ionty a udržují příznivé pH půdy (McFee et Stone 1966). I část naší zemědělské půdy vznikla díky chorošům.

Většina dřevních hub trpí intenzivním lesním hospodářstvím. Odlesňování vede ke fragmentaci krajiny a porušení souvislých biokoridorů, těžba dřeva zamezuje přirozenému odumírání stromů a jejich rozkladu. V monokulturním lese, kde chybí variabilita různých fází dekompozice dřevního odpadu a velké kmeny, chybí také druhy specializované na tyto podmínky (Renvall 1995). Vlivem lesnictví se tak snižuje početnost lignikolních druhů a klesá jejich genetická variabilita (Lindgren 2001, Stenlid et Gustafsson 2001). Basidiospory, hlavní zdroj variability, se mohou sice snadno šířit větrem na dlouhé vzdálenosti, ale zřejmě s malou účinností pro vznik nové populace (Malloch et Blackwell 1992, Ryvarden et Gilbertson 1993).

1.2 Populační biologie hub

Populační biologie hub obecně přináší řadu úskalí oproti ostatním organismům, protože houby nevyhovují obecným modelům populační genetiky. K tomu přispívá mnoho faktorů: způsoby šíření závislé na dostupnosti vhodného substrátu a schopnosti uchycení, překrývající se generace, sexuální a asexuální rozmnožování v nepravidelných cyklech, problematická germinace spor a jejich proměnlivý počet s rychlým nárůstem při shodě několika faktorů v optimu, apod. (Anderson et al. 1998).

„Třetí říše“ se také odlišuje od rostlin a živočichů obtížnější definicí jedince. Zdaleka neplatí: jedna plodnice, jeden jedinec. Geneta se rozrůstá po okolí myceliovými vlákny skrytě v substrátu a za příhodných podmínek tvoří plodnice za účelem tvorby spor. Výsledné ramety jsou pak od původního místa i 20 m vzdáleny (mykorhizní houby), u dřevokazných druhů

jedinec často prorůstá hyfami celý kmen. U václavek (*Armillaria*) je doloženo, že jeden jedinec může prorůstat značně rozlehlou část lesa, až několika set metrů (Legrand et al. 1996). Nelze proto také sumarizovat biomasu houbových organismů; vidíme pouze plodnice, hyfový systém zůstává ukryt pod povrchem. Nové metody pro přesnou definici jedince jsou zde nezbytné.

Houby také mají neobyčejně složitou a unikátní sexualitu, jejímž následkem je komplikovaný přenos vloh do další generace. U vyšších hub, jako jsou choroše, neexistují pohlaví ani pohlavní orgány; zřejmě každá buňka monokaryotického mycelia může „kopulovat“ s každou buňkou jiného mycelia stejného druhu a teprve po vzájemné výměně jader rozhodne o produktivitě spojení složitý systém párovacích faktorů, jenž může být považován za bizarní obdobu sexuality (Moore et Novak Frazer 2002).

1.2.1. Genetická charakterizace populací

Populační struktura je považována za hlavní projev genetické variability. Proto také základní populační charakteristikou je vyhodnocení stavu genetické variability uvnitř populací a mezipopulační genetická variabilita (Slatkin 1985). Obecně se měří pomocí alelické variability a stupně heterozygotnosti.

Charakterizace populací co do velikosti, rozšíření a vzájemné příbuznosti jedinců je významnou součástí taxonomické a ekologické definice druhu. Ze získaných kvantitativních dat můžeme pomocí sofistikovaných výpočtů dostat významné a až neuvěřitelně hluboké informace o minulosti, přítomnosti a perspektivách dané populace nebo celého druhu. Současná genetika oplývá příklady takových studií. Mnohokrát byl prokázán negativní vliv malé genetické variability na přežívání druhu v měnících se podmínkách (Charlesworth et Charlesworth 1987, Ellstrand et Elam 1993). Výpočty ukazují, že snížení variability může být způsobeno zmenšením populace pod určitou hranici jen z pravděpodobnostních důvodů (tzv. "genetický drift"). Při posuzování velikosti populace je třeba brát v úvahu především počet jedinců, kteří se rozmnožují a nikoli počet všech jedinců (tzv. efektivní velikost populace). Negativní jevy na genetickou kvalitu se zvyšují s klesající efektivní velikostí populace (Kalinowski et Waples 2002). Úvahy o minimální populační velikosti, důležité pro přežití, se zakládají na různých metodických přístupech. Z pohledu genetického jde nejméně o 50 jedinců k zabránění inbreedingu, ale pro úspěšnou adaptaci na změny prostředí je nutno až 500 jedinců.

Náhlé snížení početnosti populace (epidemie, změna podmínek) neboli "bottleneck", výrazně omezuje aktivně se množící část komunity. I když i velmi malý počet jedinců může

po nastolení rovnováhy znovu obnovit populaci na standardní velikost, zvyšuje omezení genetické variability možnost inbrední deprese, genetický drift a tzv. efekt zakladatele ("founder effect", Hedrick et al. 2001). Malý počet jedinců přispívá do populační struktury omezeným genetickým materiálem a rozrůstající se populace pak vstupuje do dalšího vývoje s nižší variabilitou, než byla v původní skupině. V současnosti jsou tyto jevy aktuální u vzácných druhů, kde snadno může dojít k vyhynutí následkem snižování variability. Zvláště ohroženy jsou druhy vyskytující se na omezeném území ve specifických biotopech (ostrovy, zbytky přirozených porostů). Podobně postižené druhy by mohla zachránit výměna genetické informace mezi populacemi – gene flow. Bohužel, u vzácných druhů není odkud brát variabilitu. Snad alespoň v některých případech pomůže populační genetika se svými metodami na odhalení historie a principů výše zmíněných genetických změn, při zavedení vhodného mechanismu ochrany vzácných druhů.

Díky specifické biologii hub nelze uplatnit běžné metody studia populací s počítáním jedinců apod. V mykologii existují dva základní metodické přístupy ke studiu populací:

- Populační struktura u hub může být definována na základě párovacích faktorů, zjištěním jejich počtu, frekvence a distribuce v populaci sledovaného druhu (Hanson et Wells 1991, Kout et Vlasák 2007). Obsah párovacích alel se zjišťuje křížením monokaryotických mycelií na agarových plotnách (Holmer et al. 1994).
- Druhou možností jsou biochemické a molekulárně biologické techniky, snažící se podchytit polymorfismus allozymů nebo nukleových kyselin mezi jednotlivými jedinci sledované populace (Egger 1992)

1.2.2. Párovací lokusy

Produktivní splynutí monokaryotických mycelií u hub kontroluje tzv. sexuální kompatibilita, která umožňuje rozpoznání vlastního mycelia od cizího, nepříbuzného. Geny určující kompatibilitu dělí populaci do párovacích typů a jen odlišné párovací typy mohou po splynutí dokončit sexuální reprodukci. Tyto geny (mating-type geny – MAT) jsou umístěny na jednom nebo dvou místech (mating type loci) a jejich produkty regulují různé fáze párovacího procesu (Casselton 2002).

Podstata sexuální kompatibility u stopkovýtrusných hub (*Basidiomycetes*) je daleko složitější než u vřeckovýtrusných hub (*Ascomycetes*) a systém může mít i několik set až tisíc párovacích typů (z různých kombinací alel jejich genů). Geneticky byla kompatibilita prozkumána jen na několika málo modelových houbách (*Coprinus cinereus*, *Schizophyllum*

commune a *Ustilago maydis*) s překvapivým zjištěním, že u každé z těchto hub je kódování organizováno jiným způsobem (Casselton et Olesnický 1998).

Studium kompatibility není náplní práce, a proto se omezím na konstatování, že bez ohledu na její podstatu a jen podle genetických projevů můžeme Basidiomycetes rozdělit do dvou skupin (Moore et Novak Frazer 2002). U druhů s unifaktoriální inkompatibilitou (35% heterothalických druhů) řídí párování mezi mycelii jeden párovací lokus. Tento typ párovacího systému se nazývá bipolární heterothalismus a významně koreluje s hnědou hnilobou (Nobles 1958). U druhů s bifaktoriální inkompatibilitou (65% heterothalických druhů) regulují sexuální reprodukci dva párovací lokusy MAT na různých chromozomech. Jedno z MAT míst značené jako A kóduje transkripční faktory a kontroluje dělení jader a tvorbu přezek. MAT místo B kontroluje rozpouštění buněčné stěny a tedy vzájemnou výměnu jader, migraci jádra v hyfě a propojení přezek s druhou buňkou. Obsahuje geny pro párovací feromony a receptory. Pro produktivní párování je nutná odlišnost všech alel ($A_1B_1 \times A_2B_2$ nebo $A_1B_2 \times A_2B_1$), tedy pouze heterodimery transkripčních faktorů z místa A a kombinace cizorodých receptorů a feromonů z místa B, zajistí reakce vedoucí k úspěšné dikaryotizaci a sexuální plodnosti. Druhy s tetrapolárním typem párování (tetrapolární heterothalismus) často vykazují bílou hnilobu (Nobles 1958).

Celý systém má především zabránit dikaryotizaci uvnitř jednoho mycelia (100% účinnost) nebo mezi mycelii z výtrusů stejného rodiče (75% účinnost). Mycelia z výtrusů různých jedinců jsou téměř vždy kompatibilní, protože existuje až sto různých alel v lokusech A i B, což dává tisíce kompatibilních typů (Webster et Weber 2007) a přirozená selekce podporuje různost alel různých jedinců a tedy plodnost při náhodných spojeních. Populace výrazně redukované v nedávné době nebo naopak expandující z jednoho zakladatele projevují při křížení mycelií z různých jedinců neobvyklou inkompatibilitu a také zvláštní distribuci inkompatibility, jejíž analýza může poskytnout informace o procesech v populaci probíhajících.

1.2.3. Molekulární metody - stanovení DNA polymorfismů

Klasické metody studia populací, založené na studiu ekologických, morfologických, případně i biochemických znaků (isoenzymové markery) sotva mohou přesně popsat vzájemnou příbuznost jednotlivých členů populace (Tanksley 1983). Proto jsou výsledky klasických populačních studií jen velmi hrubým a málo spolehlivým popisem stavu populace, který neumožňuje odhalit minulost populací a předpovídat budoucnost ani u často studovaných populací živočichů a rostlin.

Převrat v metodách stanovení příbuznosti nastal asi před 30ti lety, kdy se sekvenováním rozsáhlejších částí genomů poprvé zjistilo, že i mezi dvěma jedinci stejné populace je na každých 1000 párů basí asi jedna odchylka (Southern 1995) a že tedy na celý genom vychází několik milionů rozdílů v sekvenci, tzv. "polymorfismů". Navzájem příbuzné organismy mají méně odchylek než vzdálenější, ale vždy se nějaké najdou. Různé metody molekulární biologie umožňují stanovit tyto polymorfismy s vysokou přesností a tím i nově definovat charakteristiky jedince, jeho příbuzných, populace, druhu, i vyšších taxonů. Není ale snadné vybrat metodu, která zjišťuje rozdíly pro naše účely relevantní, a přitom je dostatečně rychlá, reprodukovatelná a nenákladná.

K analýze DNA polymorfismů jsou nutné 3 postupné kroky. Nejprve je nutné vybrat krátký úseku genomu, ve kterém chceme polymorfismus stanovit. Zde se bez výjimky využívá hybridizace s komplementární sondou (primerem). Následuje krok zviditelnění tohoto úseku. V současné době se nejvíce používají amplifikační metody zviditelnění, kdy se úsek vybere pomocí dvou krátkých primerů, komplementárních k jeho koncům, aniž se nějak odděluje od zbytku genomu, a pak se namnoží DNA polymerázou při tzv. "polymerázové řetězové reakci" (PCR). Z nepatrného, „neviditelného“ množství genomové DNA se nasyntetizuje spousta krátkých fragmentů DNA z vybraného úseku, které jsou vidět na elektroforéze. Konečným krokem je vlastní stanovení DNA polymorfismu vybraného a zviditelněného úseku. Zjištění celé sekvence vybraného úseku (sekvenování) je nejpřesnější, ale nákladné. Ve většině případů se vystačí s pouhým stanovením velikosti vybraných fragmentů jednoduchou elektroforézou. Stanoví se tedy jen ty sekvenční rozdíly, které se projeví změnou velikosti vybraného fragmentu.

Metodu stanovení DNA polymorfismu vhodnou pro daný účel je třeba pečlivě zvolit, aby byla co nejjednodušší a přitom reprodukovatelná a informativní. "Velká fylogeneze" na úrovni řádů, tříd a vyšších taxonů se provádí obvykle sekvenováním super - konservovaných sekvencí, např. genů pro ribosomální RNA, což umožňuje eliminovat vnitřní variabilitu populace. Naopak, k odlišení malých populací a jedinců jsou nejvhodnější mikrosatelity, jejichž délku je možno stanovit velmi reprodukovatelně a přesně. Pro vývoj mikrosatelitové metody je ovšem nutná rozsáhlá analýza genomu sledovaného druhu.

Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících motivů o délce 1 - 6 nukleotidů (např. $(GA)_n$, $(GATA)_n$, Tautz 1989). Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu (Weising et al. 1995). Tyto vysoce polymorfní markery se vyskytují ve všech

eukaryotních genomech a v některých genomech prokaryot. Staly se dobrým nástrojem pro konstrukci genových map a v posledních letech se hojně využívají i v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce (Refseth 1997).

Vznik mikrosatelitů není stále zcela objasněn. To, že mikrosatelitový motiv bývá hojně zastoupen v různém počtu opakování, je nejspíš způsobeno klouzáním DNA polymerázy po templátu během replikace; na jejich vzniku se ale může podílet i transpozice a rekombinace (Weising et al. 1995). Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací; v kratších časových úsecích je ale délka lokusu v dané rodině stálá.

Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní. Dají se tedy navrhnout primery, které mohou daný mikrosatelitový marker vyhledávat. Díky malé velikosti a délkovému polymorfismu jednotlivých lokusů se stanovení MS provádí jednoduše amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou. Je to metoda časově nenáročná a dají se tak hodnotit různé lokusy a velký počet vzorků najednou. Mikrosatelity jsou markery kodominantní, takže od každého jedince získáme dva amplifikáty, z jednoho i druhého chromosomu resp. od jednoho i druhého rodiče; z toho vyplývá jejich vysoká informativnost.

Na druhé straně, předcházet musí náročná izolace mikrosatelitových lokusů z genomu, abychom získali unikátní okolní sekvence. Přitom zdaleka ne všechny MS jsou informativní a snadno identifikovatelné PCR. Informativnost jednotlivých mikrosatelitů silně závisí především na počtu opakování (Refseth et al. 1997). Použitelnost MS jako genetických markerů je také limitována jejich specifitou pro jednotlivé druhy. Mikrosatelity hub patří k obtížně izolovatelným, navíc vykazují nízký polymorfismus oproti ostatním organismům a jsou méně časté (Dutech et al. 2007, Tóth et al. 2000).

V malých populacích, analýza dvou až tří mikrosatelitových lokusů umožní identifikovat v podstatě každého jedince (i když je na lokalitě zastoupen několika plodnicemi) a určit jeho možné rodiče, bratry, a další příbuzenské vazby, stejně jako způsob propagace a celkovou heterozygotnost populace. Tato data by měla stačit pro její komplexní charakterizaci.

1.3 Diverzita, mykogeografie a ekologie chorošů

Choroše nejsou dostatečně známy po stránce ekologické ani taxonomické. Stále se objevují nové druhy a mění se systém spolu s postavením jednotlivých druhů. Revoluci do morfologického uspořádání přinesla molekulární biologie a její nové metody odhalující

skutečnou příbuznost resp. konvergentnost jednotlivých taxonů (e.g. Boidin et al. 1998, Vlasák et al. 2009). Morfologicky založená skupina Aphyllophorales, kam se řadila většina chorošů, vzala za své, a v současnosti jsou tyto houby rozptýleny porůznu v systému hub.

Choroše a jiné dřevní houby rostou kosmopolitně, všude kde se vyskytne vhodný substrát. Celkově jich bylo popsáno okolo 1500 druhů. Značného pokroku v jejich celkovém poznání bylo dosaženo zejména v Evropě, naproti tomu tropické oblasti zůstávají značně pozadu. Zde se nabízejí zvláště široké možnosti pro nové studie. V současnosti jsou především popisovány nové druhy, sestavují se „check-listy“ zkoumaných oblastí a doplňují se údaje o rozšíření chorošů (Kout et Vlasák 2009); práce směřující k podrobnějšímu poznání biologie a ekologie se objevují jen velmi zřídka.

V Evropě je to jiné. Pracovalo zde mnoho výborných polyporologů, mykologů specializovaných na chorošovitě houby. Právě bývalé Československo bylo významnou baštou polyporologie už od 30 let minulého století (A. Pilát, Z. Pouzar, F. Kotlaba) a je jednou z nejméně prozkoumaných zemí z hlediska chorošové mykoflory. Je zde známo přes 200 druhů chorošů (Kotlaba 1984). I přesto, že podrobné bádání pokračuje tolik let, stále máme možnost objevovat novinky v mykogeografii České republiky (Kout 2008), díky podrobnému průzkumu dříve zanedbávaných oblastí, i pro rychlé mizení některých druhů nebo naopak rozšiřování nových, invazivních. Dostatečně podrobná a přesná ekologická pozorování mají podle mého názoru daleko větší význam pro poznání hub, než taxonomické hnidopišství a těžko se smírují se s tím, že většina mykologů je uchválena rozdílem 1 mikrometr v průměrné délce výtrusů (a snadno to opublikuje), ale nikoho nezajímá, že dříve běžná houba prakticky zmizela z krajiny. Jsem také přesvědčen, že kvalitní ekologická data brzy ovlivní samotnou systematiku víc než podrobné studium anatomie hub. Zdokumentujeme-li spolehlivě dvě populace, anatomicky stejné, ale s výrazně odlišnou ekologií, mělo by to být podnětem pro pracné porovnání molekulárních znaků, které definitivně rozhodne, zda jde o stejné nebo různé taxony.

2. Cíle práce

Cílem práce bylo zvládnout moderní genetické a molekulární metody charakterizace hub a použít je při řešení konkrétních problémů v ekologii a systematice chorošů. Původním objektem studia měly být populace chorošů *Trametes gibbosa*, který je příkladem hojného, invazivního druhu a *Fomitopsis rosea*, který je naopak druhem rychle mizejícím. V průběhu

studia se na základě vesměs náhodných nálezů málo známých nebo ohrožených druhů objevily další objekty, kterým jsem se věnoval po stránce systematické i ekologické.

3. Literatura

- Anderson JB, Kohn LM. 1998. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *Trends Ecol. Evol.* 13: 444–448.
- Bendiksen E, Høiland K, Brandrud TE, Jordal JB. 1998. Red list of threatened fungi in Norway. Oslo.
- Binder M., Hibbett DS. 2002. Higher-level phylogenetic relationships of *homobasidiomycetes* (mushroom-forming fungi) inferred from four rDNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22: 76–90.
- Boidin J, Mugnier J, Canales R. 1998. Taxonomie moléculaire des *Aphyllophorales*. *Mycotaxon* 66: 445–491.
- Carranzamorse J, Gilbertson RL. 1986. Taxonomy of the *Fomitopsis rosea* complex (*Aphyllophorales*, *Polyporaceae*). *Mycotaxon* 25: 469–486.
- Casselton LA. 2002. Mate recognition in fungi. *Heredity* 88: 142–147.
- Casselton LA, Olesnicky NS. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 62: 55–70.
- Charlesworth D, Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237–268.
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barres B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 44: 933–949.
- Edman M. 2003. Dispersal Ecology of Wood-decaying Fungi – Implications for Conservation. PhD Thesis, Umeå University, Umeå.
- Edman M, Gustafsson M, Stenlid J, Jonsson BG, Ericson L. 2004. Spore deposition of wood-decaying fungi: importance of landscape composition. *Ecography* 27: 103–111.
- Egger KN. 1992. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. - In: Carrol G.C. and Wicklow D.T. (eds.) 1992. *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. New York.
- Ellstrand NC, Elam DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for Plant Conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217–242.

- Fridman J, Walheim M. 2000. Amount, structure and dynamics of dead wood on manager forestlands in Sweden. *Forest Ecol. Manag.* 131: 23–36.
- Gärdenfors U. (ed.) 2000. The 2000 Red List of Swedish Species. Uppsala.
- Gyosheva MM, Denchev CM, Dimitrova EG, Assyov B, Petrova RD, Stoichev GT. 2006. Red list of fungi in Bulgaria. *Mycologia Balcanica* 3: 81–87.
- Hanson LC, Wells K. 1991. Compatibility and population studies of three species of *Tremella*. *Mycologia* 83: 273–287.
- Hedrick PW, Gutierrez-Espeleta GA, Lee RN. 2001. Founder effect in an island population of bighorn Sheep. *Mol. Ecol.* 10: 851–857.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Canon PF, Ericsson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Limbich T, 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, Bosáka K, Humber RA, Hyde K, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miądlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüßler 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. *Mycol. Res.* 111: 509–547.
- Högberg N, Holdenrieder O, Stenlid J. 1999. Population structure of the wood decay fungus *Fomitopsis pinicola*. *Heredity* 83: 354–360.
- Högberg N, Stenlid J. 1999. Population genetics of *Fomitopsis rosea* – a wood–decay fungus of the old-growth European taiga. *Mol. Ecol.* 8: 703–710.
- Högberg N, Stenlid J, Karlsson JO. 1995. Genetic differentiation in *Fomitopsis pinicola* (Schwartz: Fr.) Karst studied by means of arbitrary primed – PCR. *Molecular Ecology* 4: 675–680.
- Holmer L, Nitare L, Stenlid J. 1994. Population structure and decay pattern of *Phellinus tremulae* in *Populus tremula* as determined somatic incompatibility. *Can. J. Bot.* 72: 1391–1396.
- Kalinowski ST, Waples RS. 2002. Relationship of effective to census size in fluctuation populations. *Conserv. Biol.* 16: 129–139.
- Kauserud H, Schumacher T. 2002. Population structure of the endangered wood decay fungus *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Can. J. Bot.* 80: 597–606.
- Kauserud H, Schumacher T. 2003a. Genetic structure of fennoscandian populations of the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea* (Basidiomycota). *Mycol. Res.* 107: 155–163.

- Ko KS. 2000. Phylogenetic study of polypores based on molecular sequences. Seoul National University.
- Kotlaba F. 1984. Zeměpisné rozšíření a ekologie chorošů (*Polyporales s.l.*) v Československu. Praha.
- Kotlaba F, Pouzar Z, Vampola P. 2006. *Fomitopsis rosea* (Alb. & Schw.:Fr.) P. Karst. – In: Holec J. and Beran M., eds., Červený seznam hub (macromycetů) České republiky. Příroda 24: 208–209.
- Kout J. 2008. *Sistotrema dennisii* (*Basidiomycetes, Sistotremataceae*) – a new species for the Czech Republic. Czech Mycol. 60: 105–111.
- Kout J, Vlasák J. 2007. *Trametes gibbosa* (*Basidiomycetes, Polyporales*) in the USA and Canada. Can. J. Bot. 85: 342–346.
- Kout J, Vlasák J. 2009. Notes on two species of *Diplomitoporus* (*Basidiomycota, Polyporaceae*) of Central America. Revista Mexicana de Biodiversidad (accepted).
- Kout J, Vlasák J, Dvořák D. 2009. New collections and ecology of rare polypore *Dichomitus albidofuscus*. Czech Mycol. (submitted).
- Legrand P, Ghahari S, Guillaumin JJ. 1996. Occurrence of genets of *Armillaria* spp. in four mountain forests in central France: the colonization strategy of *Armillaria ostoyae*. New Phytol. 133: 321–332.
- Lindgren M. 2001. Polypore (*Basidiomycetes*) species richness and community structure in natural boreal forests of NW Russian Karelia and adjacent areas in Finland. Acta Bot. Fennica 170: 1–41.
- Malloch D, Blackwell M. 1992. Dispersal of fungal diaspores. – In: Carrol G.C. and Wicklow D.T. (eds.) 1992. The fungal community: its organization and role in the ecosystem. New York.
- McFee WW, Stone EL. 1966. The persistence of decaying wood in the humus layers of northern forests. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30: 513–516.
- Moore D, Novak Frazer LN. 2002. Essential fungal genetics. New York.
- Nobles KM. 1958. Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the *Polyporaceae*. Can. J. Bot. 36: 883–926.
- Rassi P, Alanen A, Kanerva T, Mannerkoski I. (eds.). 2001. The Red List of Finnish Species. Ministry of the Environment & Finnish Environment Institute. Helsinki.
- Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. J. Hered. 86: 248–249.
- Refseth UH, Fangan BM, Jacobsen KS. 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. Electrophoresis 18: 1519–1523.

- Renvall P. 1995. Community structure and dynamics of wood rotting *Basidiomycetes* on decomposing conifer trunks in northern Finland. *Karstenia* 35: 1–51.
- Rolstad J, Sætersdal M, Gjerde I, Storaunet KO. 2004. Wood-decaying fungi in boreal forest: are species richness and abundances influenced by small-scale spatiotemporal distribution of dead wood? *Biol. Conserv.* 117: 539–555.
- Rypáček V. 1957. *Biologie dřevokazných hub.* – 209 p. Praha.
- Ryvarden L. 1976. The *Polyporaceae* of North Europe 1, *Albatrellus-Incrustoporia*. Oslo, Fungiflora.
- Ryvarden L. 1991. Genera of Polypores. Nomenclature and Taxonomy. Oslo, Fungiflora.
- Ryvarden L, Gilbertson RL. 1993. European Polypores 1, *Abortiporus-Lindtneria*. Oslo, Fungiflora.
- Ryvarden L, Johansen I. 1980. A preliminary polypore flora of east Africa. Oslo, Fungiflora.
- Slatkin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393–430.
- Southern EM. 1995. DNA fingerprinting by hybridization to oligonucleotide arrays. *Electrophoresis* 16: 1539–1542.
- Stenlid J, Gustafsson M. 2001. Are rare wood decay fungi threatened by inability to spread? *Ecol. Bull.* 49: 85–91.
- Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 3–8.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463–6471.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.* 10: 967–981.
- Vlasák J, Kout J, Dvořák D. 2009. Taxonomical position of polypore *Dichomitus albidofuscus*: *Donkioporia albidofusca* comb. nov. *Mycol. Prog.* (submitted).
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Bornea M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- Webster J, Weber RWS. 2007. *Introduction to fungi.* New York.
- Weising K, Nylom H, Wolff K, Meyer W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi.* CRC Press, Florida.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–6535.

4. Populační studie

4.1 Kout J, Vlasák J. 2007. *Trametes gibbosa* (Basidiomycetes, Polyporales) in the USA and Canada. *Can. J. Bot.* 85: 342–346.

V článku dokazujeme, že běžný evropský choroš *Trametes gibbosa* se vyskytuje také v USA a Kanadě, ač to seznamy druhů a příručky k určování popírají. Nálezy tohoto druhu byly dosud určovány jako tropický *Lenzites* (*Trametes*) *elegans*. Důkaz je proveden nejen anatomickým zkoumáním, ale především produktivním křížením monosporických mycelií z evropských a amerických resp. kanadských sběrů. Přitom byl u amerických a kanadských jedinců zjištěn pozoruhodně malý počet párovacích faktorů, který svědčí pro nedávnou kolonizaci z velmi malého počtu zakladatelů.

The polypore *Trametes gibbosa* (Pers.) Fries, common in Europe and Asia, is reported from eastern North America for the first time. Single basidiospore cultures from Pennsylvania, United States, and Quebec, Canada, were paired with each other and with cultures from the Czech Republic. The North American intercollection crosses were 60% compatible and 100% compatible with the Czech cultures. All the crosses among the Czech cultures were 100% compatible. The recent introduction of *T. gibbosa* to North America is suggested as a possible explanation for the limited number of mating-type alleles and subsequent incompatibility among the North American cultures.

4.2 Kout J, Vlasák J. Microsatellite DNA markers in the polypore *Fomitopsis rosea* and their use for characterization of its relict populations in Vltava River Valley, Czech Republic (manuscript).

Fomitopsis rosea je vzácný choroš specializovaný na zchovalý biotop pralesních rezervací. Z genomové DNA bylo vyisolováno asi 30 mikrosatelitových lokusů, ale jen dva se hodily pro populační analýzu - jsou to první mikrosatelity použité v populační genetice chorošů. Ze známých i nově zjištěných populací na území České republiky byla izolována genomová DNA ze všech jedinců a stanoven polymorfismus v těchto dvou lokusech, a výsledky byly srovnány s velkými populacemi z Karpat a USA. Interpretace výsledků je obtížná pro velmi komplikovaný charakter obou izolovaných mikrosatelitů, a proto se dosud nepodařilo tuto práci opublikovat ve vědeckém časopise (pouze jako poster na mezinárodní konferenci).

Fomitopsis rosea is a rare polypore specialized at preserved habitat of virgin forest reservations. From the genomic DNA was isolated about 30 microsatellites loci, but only two of them are suitable for population analysis – these are the first microsatellites used in population genetics of polypores. It has been isolated genomic DNA from the known and newly discovered populations in the Czech Republic from all individuals and determined polymorphism in these two loci, and the results were compared with large populations from the Carpathians and the U.S. Interpretation of results is difficult due to the very complicated character of both isolated microsatellites and therefore this work was not published yet in the scientific journal (only as a poster at an international conference).

5. Taxonomie chorošů

5.1 Kout J, Vlasák J. 2009. *Antrodia serialiformis* from the eastern USA, a new and abundant polypore similar to *Antrodia serialis*. *Mycotaxon* 108: 329–335.

Velmi hojný choroš z východního pobřeží USA popisujeme jako nový druh s tím, že byl dosud mylně pokládán za běžnou *Antrodia serialis* rostoucí v USA anomálně na dubech. Našli jsme rozdíly ekologické, anatomické, nekompatibilitu při křížení monosporických mycelií s evropskými *A. serialis*, a nově jsme provedli i sekvenování ribosomální DNA, jako konečný důkaz.

A new and common polypore *Antrodia serialiformis* from eastern USA is described. The species is very similar to *Antrodia serialis* and both species were probably confused previously, but *A. serialiformis* seems to be living exclusively on oaks. We present evidence that the new species differs from *A. serialis* on account of its much smaller spores, mating incompatibility, rDNA sequence and ecology.

5.2 Vlasák J, Kout J, Dvořák D. 2009. Taxonomical position of polypore *Dichomitus albidofuscus*: *Donkioporia albidofusca* comb. nov. Mycol. Prog. (submitted).

Především na základě sekvenování ribosomální DNA docházíme k závěru, že extrémně vzácný choroš *Dichomitus albidofuscus* patří do rodu *Donkioporia* a popisujeme také novou kombinaci. Tento základní důkaz podporujeme pečlivou anatomickou inspekcí, kde dokazujeme, že udávané anatomické rozdíly mezi typem rodu *D. expansa* a novým druhem jsou nevelké, a je třeba jen nepodstatná emendace rodu *Donkioporia*, aby zahrnul i *D. albidofusca*.

We concluded that an extremely rare polypore *Dichomitus albidofuscus* belongs to the genus *Donkioporia* and also describe a new combination. It is based on the basis of ribosomal DNA sequencing especially. This basic anatomical evidence is supporting by a careful inspection in morphology, which demonstrates that the reported anatomical differences between the type of *D. expansa* genus and new species are small, and it is just unsubstantial emendation of the genus *Donkioporia* to include *D. albidofusca*.

6. Ekologie a mykogeografie

6.1 Kout J. 2008. *Sistotrema dennisii* (Basidiomycetes, Sistotremataceae) – a new species for the Czech Republic. Czech Mycol. 60: 105–111.

Krátká zpráva o prvním nálezu chorošovitě houby rodu *Sistotrema* v ČR. Resupinátní rozděrká *Sistotrema dennisii* Malençon (Basidiomycetes, *Sistotremataceae*) byla poprvé objevena v České republice. Nalezená houba patří k nenápadným, pavučinovitě poroidním resupinátním druhům a mohla být dosud v terénu přehlížena. Jsou uvedeny typické znaky, porovnání s podobnými druhy, popis lokality a poznámky k rozšíření druhu.

Sistotrema dennisii Malençon (Basidiomycetes, *Sistotremataceae*) was discovered in the Czech Republic for the first time. It is an inconspicuous, resupinate species with arachnoid pores that could have been neglected in the field. Characteristic features of this and similar species are presented, together with a description of the locality and notes on its distribution.

6.2 Kout J, Vlasák J. 2009. Vzácné choroše z České republiky, zejména z jižních Čech. Mykol. Listy 108 (accepted).

Komentovaný seznam nálezů vzácných chorošů, které jsem náhodně učinil při průzkumu výskytu *Fomitopsis rosea* v jižních Čechách. Významné je především pozorování mohutné invaze teplomilného druhu *Trametes trogii*, která před několika lety nebyla v Čechách známa, a teď je hojná všude, i přímo zde, v českobudějovických parcích.

Numerous new finds are reported of the rare polyporaceous fungi from the South Bohemia and other places in the Czech Republic. Some species have been found only scarcely before not only in CZ but wherever in Europe. A short description of the new locations in the Czech Republic is given for each species. The remarkable observing of the invasion of *Trametes trogii* is reported

6.3 Kout J, Vlasák J. 2009. Notes on two species of *Diplomitoporus* (*Basidiomycota, Polyporaceae*) of Central America. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (accepted).

Zpráva o nálezu dvou nedávno popsaných a proto málo sbíraných druhů ze Střední Ameriky. *Diplomitoporus dilutabilis* Log.-Leite & J.E. Wright je poprvé zaznamenán v Guatemale a *Diplomitoporus hondurensis* (Murrill) Ryvarden byl sbírán v Belize. Obecný komentář k rodu *Diplomitoporus*, k jeho zastoupení v Jižní a Střední Americe a pozici v systému.

Two species of *Diplomitoporus* are studied from Central America and notes about their distribution are presented. Noteworthy, *Diplomitoporus dilutabilis* Log.-Leite & J.E. Wright is reported for the first time to Guatemala and *Diplomitoporus hondurensis* (Murrill) Ryvarden is found in a new locality from Belize. A list of *Diplomitoporus* species cited from America is presented.

6.4 Kout J, Vlasák J, Dvořák D. 2009. New collections and ecology of rare polypore *Dichomitus albidofuscus*. Czech Mycol. (submitted).

Ekologie a distribuce extrémně vzácného choroše *Dichomitus albidofuscus* byla zkoumána v České republice. Všechny lokality z České republiky se vykazují stejný charakter střední nadmořské výšky, starých lesů s bukem, lípou, dubem, se substrátem pomalu umírajících stromů - smrků a jedlí. Sběry ze zahraničí však ukazují, na mnohem širší ekologickou amplitudu. Hlavní sledovaná lokalita *D. albidofuscus* je velmi vytrvalá, choroš zde infikuje všechny vhodné stromy, které se vyskytují ve velmi krátké vzdálenosti.

Ecology and distribution of extremely rare polypore *Dichomitus albidofuscus* was explored in the Czech Republic. All localities from the Czech Republic seem to have the same character of medium altitude, old forest with beech, linden, oak, with substrate trees of slowly dying spruce and fir intermixed. Collections from abroad, however, suggest much broader environmental optimum. Once established on the locality, *D. albidofuscus* is very persistent here, infecting efficiently all perspective trees but only those occurring in very short distance.

7. Závěr

Chorošovitě houby patří k nejvíce prozkoumaným houbám. Vždy budily zájem milovníků přírody i přírodozpytců, protože jsou nápadnou okrasou lesů a navíc se poměrně dobře uchovávají ve sbírkách. Jsou také důležitým faktorem lesních ekosystémů, kde zajišťují rozklad dřevní hmoty. V dnešní době intenzivní exploatace lesních komplexů se mnohé druhy přiblížily k hranici kritického ohrožení, protože jejich přirozené prostředí mizí velmi rychlým tempem. Z hlediska ochrany jsou houby oproti ostatním organismům značně opomíjeny a jedním z důvodů je i to, že se obtížně prokazuje jejich úbytek a ještě obtížněji ztráta genetické variability. Moderní techniky molekulární biologie však přinášejí zásadní pokrok ve studiu hub, a nabízejí možnost přesně zdokumentovat diverzitu taxonů a snad i navrhnout vhodné způsoby ochrany.

V rámci této doktorské práce bylo zkoumáno několik druhů chorošů především pomocí molekulárních a genetických metod uplatněných v bionomii a taxonomii vybraných druhů.

1) Populační studie

- Evropský choroš outkovka hrbatá (*Trametes gibbosa*) byl poprvé potvrzen na americkém kontinentě pomocí párovacích testů monokaryotických mycelií. Kompatibilita mezi evropskými a americkými vzorky byla 100%, stejně jako mezi evropskými vzorky navzájem. Nejzajímavějším výsledkem ale bylo, že mycelia z výtrusů různých amerických jedinců byla navzájem často nekompatibilní, což je jev u vyšších hub velmi vzácný. Dva vzorky z Kanady, sbírané na lokalitách vzdálených 40 km, měly stejné tři ze čtyř párovacích faktorů a jeden z nich sdílel dva resp. tři faktory se vzorky z několik set km vzdálené Pensylvánie. Úzký sortiment párovacích faktorů jsme interpretovali jako invazi evropského druhu do Severní Ameriky z několika málo zakladatelů, a nepochybně jsme měli pravdu. Práce byla inspirovaná vzácnými nálezy v Pensylvánii v roce 2001, vycházela ze vzorků sbíraných v roce 2006, kdy už zde byla hojná, a v současné době je *Trametes gibbosa* v Pensylvánii vůbec nejčastějším chorošem v každém lese. Mrzí nás, že na tuto práci z roku 2007 není dosud žádný ohlas. Ještě více nás mrzí, že jsme nebyli schopni studovat tuto invazi ve větším rozsahu a podchytit tak její dynamiku a hlavní směr.

Tady je třeba zdůraznit, že párovací pokusy jsou sice standardní metodikou při rozhodování, zda dvě populace hub patří do jednoho druhu či nikoli, ale jsou také metodikou velmi pracnou, protože se musí napřed vyizolovat 10-12 monosporických mycelií z každého jedince, všechna vzájemně zkřížit a určit tak 4 různé párovací typy od každého, pak všechny čtveřice z Evropy i z Ameriky vzájemně zkřížit, aby se prokázala vzájemná kompatibilita kontinentálních vzorků a pak ještě všechny evropské zkřížit se všemi americkými. I v našem skrovně koncipovaném pokusu se dvěma vzorky z Kanady, dvěma z Pensylvánie (USA) a třemi z České republiky bylo třeba použít asi 1000 ploten, všechny sterilně zaočkovat, kultivovat, zhodnotit baráže, vyfotografovat, a opakovaně sterilně odebírat mycelia a mikroskopovat. Na práci s více vzorky, která by dala přesnější informace, je tato metoda téměř nerealizovatelná, a místo ní je třeba použít molekulární metody, které sice vypadají složitě, ale v konkrétním provedení jsou daleko jednodušší.

- Nádherně vybarvený druh *Fomitopsis rosea* je přesně opačným případem vzácného choroše specializovaného na zachovalý biotop pralesních rezervací v Evropě. Jeho striktně vyhraněné požadavky na substrát starých smrků, které nebyly před odumřením zničeny kůrovcem a stály suché po několik let, ho řadí na seznam ohroženým druhů. Práce byla inspirována tím, že jsem se svým školitelem objevil 12 nových, velmi malých, reliktních populací v údolí Vltavy a tím jsme jejich počet v ČR rozšířili na trojnásobek. Chtěli jsme zjistit, zda se tyto malé, nížinné populace nějak liší od velkých v pralesích na Boubíně a Žofíně a od ještě větších v Karpatech a v severovýchodních USA.

Na tomto objektu jsem udělal nejvíc práce: extrahoval a přečistil DNA ze všech jedinců malých populací a ze zástupců velkých, osekvenoval ribosomální DNA u všech vzorků, vyisoloval jsem z genomu komplikovanou metodou asi 30 mikrosatelitových lokusů a jediné dva, které se hodily pro populační analýzu, jsem amplifikoval ze všech asi 100 vzorků, stanovil na PAGE elfo a nakonec ještě osekvenoval. Výsledky s mikrosatelitem Fro2 ukazují podivným směrem: co do alelické diversity jsou malé Vltavské populace více variabilní než velké z českých pralesů a ty zase více než velmi velké zahraniční. Fro16 dává unikátní alely u většiny jedinců, ale většinou homozygotní. Interpretace získaných dat je velmi obtížná a proto se mi nepodařilo výsledky opublikovat před koncem doktorského studia.

2) Taxonomie chorošů

Během studia populací jsem narazil na několik taxonomických problémů, které jsme se školitelem vyřesili s použitím našich genetických a molekulárních technik. Že tyto práce počtem i dosaženým impakt faktorem převyšují populační studie je jen důkazem toho, že taxonomické věci se publikují snáze a rychleji. Kombinací morfologie, sekvenace ribosomální DNA a křížení mycelií (jen v případě *A. serialiformis*) byly zpracovány dvě studie.

- Popis nového druhu z území USA - *Antrodia serialiformis*, rostoucího hojně na dubech. Jde o kryptický druh, který byl považován za makroskopicky velmi podobnou outkovku řadovou (*Antrodia serialis*).
- Pozoruhodný choroš *Dichomitus albidofuscus* byl před několika málo lety znám jen ze dvou lokalit na světě. Přiřazení do pochybného rodu *Dichomitus* nebylo správné a tento taxonomický problém řeší další publikace. Vnější morfologie je téměř totožná s rodem *Donkioporia*, a tento úsudek byl potvrzen nejen podrobným studiem mikromorfologie, ale i ITS úseky. Byla proto navržena nová kombinace *Donkioporia albidofusca*.

3) Ekologie a mykogeografie

Několik doplňujících prací se zabývá ekologií a rozšířením vzácných druhů, náhodně nalezených při průzkumu *Fomitopsis rosea* nebo v zahraničí.

- je uveden jeden nový druh pro Českou republiku – *Sistotrema dennisii*
- několik vzácných druhů chorošů bylo zaznamenáno na území jižních Čech
- objev donedávna endemického druhu *Diplomitoporus dilutabilis*

z Brazílie v Guatemale

- upřesnění rozšíření a ekologie *Dichomitus albidofuscus* v ČR

Předkládaná doktorská práce přináší důkazy, že genetické a zvláště molekulární metody jsou mocným nástrojem při studiu variability hub. Věřím, že při jejich širším používání získáme poznatky umožňující porozumět jejich biologii v dosud nebyvalé míře. Pokud jde o choroše, snad jsem vzbudil zájem budoucích studentů i jiných čtenářů o tuto velmi zajímavou a vědecky perspektivní skupinu hub.