

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská diplomová práce
(rešerše)

**Analýza druhové diverzity mikromycet ve fyloplánu dubu letního
Quercus robur infikovaného padlí dubovým *Erysiphe alphitoides*
pomocí klasických a molekulárních metod**

Vypracoval: Jan Michálek

Vedoucí práce: Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.

2009

Michálek, J., 2009: Analýza druhové diverzity mikromycet ve fyloplánu dubu letního *Quercus robur* infikovaného padlí dubovým *Erysiphe alphitoides* pomocí klasických a molekulárních metod. [Diversity analysis of microfungi in phylloplane of pedunculate oak *Quercus robur* infected by oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides*: classical versus molecular methods. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This bibliographical search review includes an overview of present results of research on phylloplane fungi, their biology, ecology and impact on environment particularly the possible effect on the occurrence and parasitism of oak powdery mildew (*Erysiphe alphitoides*) on the leaves of *Quercus robur*. The special focus is aimed at the methods of isolation and identification of phylloplane fungi in environmental samples by using classical and modern molecular methods.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s využitím literatury a zdrojů uvedených v seznamu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě - 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

Jan Michálek

.....

Na tomto místě děkuji mnohokrát především své školitelce Ing. Miloslavě Kavkové PhD. za vedení práce, cenné rady a čas, který mi s trpělivostí věnovala. Dále bych rád poděkoval Doc. Ing. Miroslavu Oborníkovi PhD. a členům jeho laboratoře za poskytnutí zázemí a podnětných nápadů. Velký dík patří také kolegům Mgr. Zoltánovi Füßymu za četné odborné diskuze a RNDr. Aleši Tomčalovi za všestrannou podporu.

1.	ÚVOD.....	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST	
2.1.	<u>Mikrobiální ekologie fyloplánu</u>	2
2.1.1.	Využívání substrátu – exploatace	3
2.1.2.	Interference	3
2.1.3.	Saprofytické a epifytické mikroorganismy	4
2.1.4.	Vláknité houby	4
2.1.5.	Kvasinky	6
2.1.6.	Parazité	7
2.1.6.1.	<u><i>Erysiphe alphitoides</i></u>	7
3.	METODICKÁ ČÁST	
3.1.	<u>Sběr vzorků</u>	12
3.2.	<u>Komunitní vzorky</u>	12
3.3.	<u>Metody Identifikace</u>	13
3.3.1.	Klasické metody	13
3.3.1.1.	<u>Kultivace</u>	13
3.3.1.1.1.	Selektivní média	14
3.3.1.1.2.	Tuhá média	15
3.3.1.2.	<u>Mikroskopie</u>	16
3.3.1.2.1.	Fixace a barvení vzorků pro mikroskopii	17
3.3.2.	Analýza společenstev molekulárními metodami	18
3.3.2.1.	<u>Izolace DNA</u>	19
3.3.2.1.1	DNA z kultur	19
3.3.2.1.2	DNA z celého listu	19
3.3.2.2.	<u>PCR (polymerase chain reaction)</u>	20
3.3.2.2.1	Cílová oblast, design primerů	22
3.3.2.3.	<u>Sekvence DNA</u>	26

3.3.2.4.	<u>Separáční metody</u>	26
3.3.2.3.1.	Gelov elektroforéza	26
3.3.2.3.2.	Denaturační gradientov gelov elektroforéza (DGGE)	27
3.3.2.5.	<u>Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)</u>	30
3.3.2.6.	Klonov knihovna	31
3.3.2.7.	<u>Oligonukleotidov fingerprinting rRNA genů (OFRG)</u>	32
4.	ZÁVĚR	33
5.	POUŽIT LITERATURA	35

1. Úvod

Houby hrají v ekosystému zásadní roli hlavního reducenta organického materiálu, nezbytného mykorhizního symbionta rostlin a významného patogenu rostlin i živočichů. Význam hub v zemském ekosystému je nezastupitelný. Jako hlavní úlohy hub můžeme zmínit redukci organického materiálu, mykorhizní symbiózu, tvorbu a přeměnu organické biomasy, ale také konkurenční, antibiotické a patogenní vlastnosti vůči jiným organismům a sobě navzájem (Valinsky 2002). Přes všechny jmenované funkce hub je známo jen velmi málo o jejich diversitě. Odhaduje se, že existuje okolo 1,5 milionů druhů hub a z nich bylo popsáno 5-10%.

Erysiphe alphitoides (padlí dubové, syn. *Microsphaera alphitoides*) je invazní parazitická houba řádu Erysiphales, třídy *Eucomycetes*, oddělení *Ascomycota*, která se od osmdesátých let 20. století rozšířila po celé Evropě (Gibbs 1999). Na nadzemních částech rostliny vytváří souvislý bílý myceliální povlak a v epidermálních buňkách listů formuje parazitické útvary, haustoria (Callan & Carris 2004). V našich podmínkách napadá *Erysiphe alphitoides* převážně dub letní a dub zimní a způsobuje na nich značné škody. Projevuje se souvislým myceliálním povlakem na povrchu listů, košatým keřovitým habitem postiženého stromu, vytáhlými větvemi, hypertrofií listů a celkovým zpomalením růstu. Houba představuje značný problém, hlavně pak pro semenáčky dubů v lesních školkách. Dnes je již téměř nemožné najít neinfikovaný strom, přesto se v téměř totálně napadeném porostu občas vyskytne zcela zdravý jedinec, nebo alespoň s odlišnou intenzitou symptomů infekce. Pak vyvstává otázka, jde-li o jedince s různou úrovní rezistence v kombinaci s různou mírou patogenity padlí dubového, nebo je zde další faktor, který infekci zabránil? Řada rostlinných patologů předpokládá, že vývoj infekce způsobené padlím dubovým souvisí s fenologií dubu v kombinaci s podmínkami prostředí (Gibbs & Grieg 1997). Jedná se tedy o multitrofický systém, list, fyloplán stromu, padlí dubové a období vegetační sezóny, kdy se snažíme daný problém analyzovat.

Tato práce by měla shrnout dosavadní poznatky a metody studia společenstev mikroorganismů na povrchu rostlin se zaměřením na mikromycety. Dále zhodnotit přínos osvědčených moderních metod molekulární ekologie a vybrat metody vhodné pro charakteristiku a sledování sezónních změn společenstva mikroskopických hub na povrchu listů dubu letního *Quercus robur*. Porovnat stromy infikované padlím dubovým *Erysiphe*

alphitoides oproti společenstvu na povrchu listů neinfikovaných dubů (resp. méně infikovaných) a popsat vliv patogenu na celkové složení společenstva fyloplánu dubu.

2. Teoretická část

2.1. Mikrobiální ekologie fyloplánu

Fyloplán, celková plocha listů rostliny, představuje jeden z největších mikrobiálních ekosystémů na zemi, jeho plocha je odhadována na plochu o přibližně $2 - 6,4 \times 10^8 \text{ km}^2$ (Lindow & Brandl 2003) a je považován za jedno z typických vysoce nestabilních a stresových prostředí (Widden 1997). Pojem fylosféra zahrnuje i vnitřní prostředí listů.

Diversita hub ve fyloplánu je výsledkem souhry vzájemných mezidruhových interakcí mezi mikroorganismy a mnoha abiotickými a biotickými faktory. Houby a kvasinky (houby, které nevytvářejí mycelium) na povrchu listu jsou závislé na tenkém filmu živin. Ty se usazují z ovzduší, jsou vylučovány listem, nebo vytvářeny hmyzem a jinými organismy.

Komunity hub a mikroorganismů přežívají značný stres a odolávají častým disturbancím, především pak silným výkyvům vlhkosti a dostupnosti výživy. Silně stresové prostředí vedlo k vývoji různých strategií zajišťujících organismům přežití. Fyloplán proto představuje velice zajímavý suchozemský ekosystém poskytující živnou půdu velkému množství organismů. Listy rostlin jsou kolonizovány širokým spektrem druhů hub, které mají různý vztah k rostlině i sobě navzájem. Míra úspěšnosti v kompetičním či konkurenčním vztahu závisí nejen na vlastnostech mikroorganismu samotného, ale také na faktorech jako jsou množství živin, vlhkost, stáří a typu listu, přítomnost růst inhibujících látek, množství propagulí imigrujících (příchozích životaschopných) a emigrujících (odcházejících z fyloplánu) a také na hustotě produkovaných propagulí (Nix-Stohr *et al.* 2008). Houbové organismy, jako nedílná součást fyloplánu, jsou ve fyloplánu zastoupené buď aktivní růstovou vláknitou fází – hyfou, rostoucím a sporulujícím myceliem, nebo se vyskytují jako spóra s různě definovanou dormancí. Tato spóra aktivně vyklíčí a poroste podle aktuálních podmínek ve fyloplánu. Jedná-li se o fytopatogenní druh, hraje při klíčení roli také genetická kompatibilita mezi daným druhem houbového organismu a hostitelskou rostlinou (Vogel & Somerville 2002). Spóra jako reprodukční jednotka se do fyloplánu dostává pasivně - deštěm,

mlhou, prouděním vzduchu, antropogenními faktory, hmyzem aj. a nebo jsou aktivně a cíleně vyvrstěny z matečné plodnice jako například v případě padlí bukového (*Phyllactinia guttata*).

Systém mikroorganismů ve fyloplánu je dynamický a v průběhu roku se mění. Na základě Chessonova (1994) modelu kompetice lze předpokládat, že v takto proměnlivém prostředí, jakým je plocha listu, bude koexistovat více kompetujících druhů než v prostředí stabilním, jakým je například tlející dřevo, nebo kořenový systém rostliny (Widden 1997).

2.2.1. Využívání substrátu – exploatace

V prostředí natolik nestabilním, jako je povrch listu, bývají nejúspěšnější především saprofytní a epifytní druhy, které rychle rostou a také druhy produkující velké množství spór. Příkladem mohou být zygomycety z třídy *Mucorales*. Houby žijící tímto způsobem, využívají především jednoduché cukry a bývají prvními kolonizátory při rozkladu substrátu. Druhou stranu představují houby, jakými je například *Penicillium* nebo *Trichoderma*, všestranně enzymaticky vybavené, schopné štěpit složitější uhlovodíky, jako škroby, celulózu a lignin (Widden 1997).

2.2.2. Interference

Dalším podstatným faktorem je kompetice prostřednictvím produkce antibiotických a růst inhibujících látek (*Penicillium*, *Trichoderma* atp.). Strategie se často liší mezi jednotlivými druhy v rámci jednoho rodu. Interakce mezi houbami mohou mít podobu od naprostého vzájemného propojení až po opačný extrém v podobě tvorby inhibičních růstových zón, založených na chemických růstových inhibitech. Mycelia mohou v místě vzájemného styku interagovat fyzikálními bariérami v podobě různých modifikací růstu (zhuštění, tvorba smyček) nebo se mohou vzájemně přerůstat. Tyto interakce lze dobře pozorovat v kulturách, jako takzvané inhibiční zóny a na tlejícím dřevě v podobě barevných zón (Widden 1997).

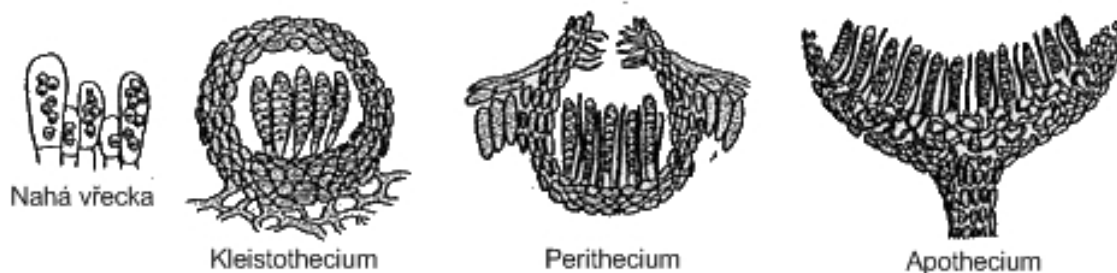
2.2.3. Saprofytické a epifytické mikroorganismy

Tenká vrstva živin na povrchu listů je specifickou nikou pro široké spektrum saprotrofních mikroorganismů. Jako výživa jim slouží mrtvé buňky rostliny, celé nekrotické části pletiv. Za epifyty označujeme organismy, které využívají látky usazené na povrchu listu (rostlinné exudáty, exkrementy živočichů). Chovají-li se některé saprotrofní druhy příležitostně jako parazité, tedy napadají rostlinné pletivo živé, mluvíme o parazitismu fakultativním. Přednostně tyto druhy napadají oslabená nebo poraněná pletiva, která hubí a nebo se živí jejich zbytky. O epifytních houbách hovoříme v případě, že žijí na povrchu listu, nezasahují do pletiv rostliny a živí se látkami na povrchu listu. Většinou se ale neseťkáváme se striktní specializací. Houby obvykle žijí na rozhraní různých strategií a v průběhu sezóny je podle aktuálních podmínek mohou měnit. Striktní specializace je vlastní spíše pravým parazitům.

2.2.4. Vlákňité houby

Růstu vláknitých hub na povrchu listu nejlépe svědčí vysoká relativní vzdušná vlhkost a mírné (*moderate*) teploty. Tyto mikroorganismy lze nalézt na všech druzích rostlin v mírném pásu i v tropech. Celkově největší část druhů vláknitých hub tvoří zástupci umělé třídy imperfektních hub Deuteromycetes, povětšinou anamorfy askomycet. Každý druh se může ve fyloplánu vyskytovat jako pohlavní teleomorfní, nebo anamorfní nepohlavní stádium a být tak identifikována jako dva různé druhy. Mezi nejobvyklejší rody, identifikované na povrchu listů, patří například *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum* a *Stemphylium*. Občas lze také nalézt kolonie basidiomycet nebo zygomycet (Inácio *et al.* 2002). Vlákňité houby jsou považovány za přechodné obyvatele fyloplánu vyskytující se zde především ve formě spór. Většina těchto hub je saprotfytní nebo slabě parazitická, jako například *Alternaria*, *Ascochyta*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Corynespora*, *Phyllostica*, *Pestalotia* a *Pestaliopsis*, které způsobují léze a jiné známky infekce na různých částech rostliny (Cook 1975, 1978; Holliday 1980 in Callan & Carris 2004). Onemocnění listů způsobená těmito houbami se projevují různě rozsáhlou nekrózou pletiv a výskytem reprodukčních útvarů, jakými jsou nepohlavní acervuli a pyknidy, nebo pohlavní perithecia (resp. kleistothecia) nebo apothecia (Obr. 1). Zimu přečkávají v podobě saprotrofních mycelií

nebo askomat na odumřelých rostlinných orgánech. Převážná většina z nich se rozvíjí až na starších listech, hlavně v dolní části fyloféry na spodní straně listů, kde jsou průduchy a menší radiační stres.



Obr. 1. Základní typy askomat. (<http://www.plantpath.wisc.edu/pp300-UW/images/image001.jpg>)

Rozsáhlá mycelia na zdravých listech jsou poměrně vzácným jevem vlastním spíše pravým rostlinným patogenům (Fonseca & Inácio 2006). Kvůli ochraně před UV zářením má většina mikromycet na povrchu listů pigmentovaná mycelia i sporangia (Callan & Carris 2004). Vzhledem k nestabilním podmínkám (především vlhkosti) se na povrchu listů objevují především druhy vyznačující se rychlým růstem nebo druhy dimorfní, tedy schopné existovat ve formě mycelia nebo kvasinkové formě v závislosti na podmínkách, jako například *Aureobasidium pullulans*. Leventin a Dorsey (2006) izolovali z povrchu listů *Ulmus americana* a *Quercus palustris* 23 rodů mikromycet, mezi nimiž byla nejhojnější právě *A. pullulans* společně s rodem *Phoma*. Mezi ostatní nejhojnější mikromycety na obou typech listů patřily *Cladosporium* a *Alternaria*. Rody *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Curvularia*, *Pithomyces*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium* a *Aspergillus* byly v této studii identifikovány ve vzorku povrchu obou typů listu i ve vzorku spór zachycených do speciálních pastí ze vzduchu. Vzhledem k tomu, že 15 rodů bylo identifikováno při prvním sběru vzorků z neúplně rozvinutých listů, vyvodili Leventin a Dorsey, že spóry ve vzduchu představují zdroj mikromycet, které mohou eventuálně kolonizovat povrch listů. Také byla prokázána souvislost mezi výskytem rodu *Phoma* na listech a přítomností askospor rodů *Leptosphaeria*, *Didymella*, *Mycosphaerella*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria* a *Diaporthe*, anamorfami rodu *Phoma*, ve vzduchu. To vysvětlují buď tím, že *Phoma* na listech vytvářela pohlavní stádium a uvolňovala do vzduchu askospory, nebo že *Phoma* vyrostla v kulturách z usazených askospor zmíněných rodů.

2.2.5. Kvasinky

Kvasinkové, čili jednobuněčné formy hub, vyznačující se schopností množit se „pučením“, jsou, podobně jako houby vláknité, přítomny v mírném i tropickém klimatickém pásu. Jejich abundance může být velmi vysoká a to v poměru k ostatním mikroorganismům až 50:1. Kvasinky se rozšiřují především prostřednictvím dešťových kapek, ale například spóry dimorfické bazidiomycety *Aureobasidium pulutans* jsou ve velkém množství identifikovány ve vzduchu (Taylor *et al.* 2004). Ekologická úspěšnost kvasinek není zcela vysvětlena, nicméně za hlavní faktory jsou považovány schopnost využívat kutikulu, morfologické adaptace do extrémních prostředí, tolerance ke znečištění a antimikrobiálním látkám, jakými jsou například fytoalexiny. U samotných kvasinek byla prokázána tvorba antibiotických a antimykotických látek, značně zvyšujících jejich konkurenceschopnost, což je mezi houbami jev poměrně obvyklý (McCormack *et al.* 1994). Rozvoj kvasinek je limitován především zdroji uhlíku v podobě cukrů a zdroji dusíku. Specifické kvasinky jsou schopné využívat látky jako jsou například pentózy, polyoly, organické kyseliny, aromatické sloučeniny a aminokyseliny, což jsou obvykle produkty rostlinného metabolismu nebo produkty modifikované hmyzem či mikroorganismy.

Vzdušné povrchy rostlin osídlují především kvasinky z oddělení basidiomycetes. Nejčastější rody kvasinek izolované z povrchu listů rostlin mírného pásu bývají *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* a *Cryptococcus* (McCormack *et al.* 1994). Na prostředí listových ploch jsou zvláště adaptované rody *Bullera*, *Sporobolomyces* a *Tilletiopsis*, které vytvářejí aktivně vystřelované balistokonidie (Inácio & Pereira 2002). Další hojný rod je oranžové až červené kolonie tvořící *Dioszegia* anamorfa rodu *Tremella* (Wang *et al.* 2008). Velmi obvyklá, až všudypřítomná je dimorfní euaskomyceta *Aureobasidium pullutans*, která má silné antagonistické účinky vůči mnoha plísním a je používána k biologické ochraně sklizených plodů (Scheda *et al.* 2002). Kvasinky ve fyloplánu se neshodují s druhy v kořenovém systému a tudíž jsou fyloplánu specifické (Fonseca & Inácio 2006).

2.2.6. Parazité

Biotrofní parazité rostlin, jsou závislí na živém hostiteli a vyznačují se různě širokou specifitou. Mnohé druhy jsou schopny parazitovat více různých, většinou blízce příbuzných hostitelů, nicméně intenzita infekce a úspěšnost parazita se zvyšuje se specificitou interakce parazit - hostitel. Specificita je houbovým parazitem rozeznávána prostřednictvím specifických receptorů na povrchu hostitelských listů, povrchových exudátů vlastních hostitelské rostlině a fyzikálními rozdíly v topografii povrchu parazitického a hostitelského organismu. Tyto faktory jsou rozhodující pro klíčení spóry. Úspěšnost vyklíčení spóry, vytvoření apresoria a penetrace hyf do pletiva je podpořena lepkavými látkami na povrchu spóry. Většinou se jedná o hygroskopické látky udržující vlhkost a hydrofobní adherenty na bázi glykoproteinů a polysacharidů. V této směsi bývají přítomny i látky schopné ochránit spóru před obranou hostitele v podobě jedovatých látek a také enzymy narušující povrch hostitele. (Epstein & Nicholson 1997) Obvykle také patogen proniká do pletiv na místech se slabší obranou (mezery mezi buňkami, průduchy, poranění atp.), je schopen usměrnit růst mycelia k těmto vstupům (thigmotropismus) a morfologicky se přizpůsobovat (thigmodiferenciace). Samotná schopnost adheze ovlivňuje míru patogenity. Houbové fytopatogeny aktivně vnikají do pletiv fyzikální a chemickou cestou většinou pomocí apresoria na klíčícím vlákně, popřípadě „infekčním polštářkem“ (*infection cushion*) na růstové špičce mycelia.

2.2.6.1. *Erysiphe alphitoides*

Skupina parazitických askomycet, označovaných jako padlí (*Erysiphales* – moučnatky), představuje okolo dvaceti rodů a přibližně 400 druhů, z nichž většina náleží rodu *Erysiphe*. Jejich hostitelé tvoří přibližně 4,5% cévnatých rostlin (Hirata 1986 in Callan & Carris 2004). Odhadovaný počet potenciálních hostitelů je 9838 druhů krytosemenných rostlin (u nahosemenných nejsou hostitelé známi), z čehož přibližně 4/5 představují byliny. Míra specializace na hostitele kolísá u různých druhů od široké specializace až po velmi úzkou (Callan & Carris 2004). Skupina *Erysiphe alphitoides sensu lato* zahrnuje pouze biotrofní parazity.

První známky infekce *E. alphitoides* se projevují zjara (březen – duben) bílými moučnými povlaky mycelia na svrchní pokožce listů *Quercus robur* (Obr. 2).

E. alphitoides napadá především jedince s nižší fitness, především semenáčky a zastíněné mladší stromy, ale i větve vzrostlých stromů. Na mladých listech klíčí z askospor větvené septované hyalinní tenkostěnné mycelium o tloušťce 3-7 μ m s lalokovitými apresorií o průměru 6-10 μ m. Mycelium proniká haustorii (Obr. 3) do epidermálních buněk listu.

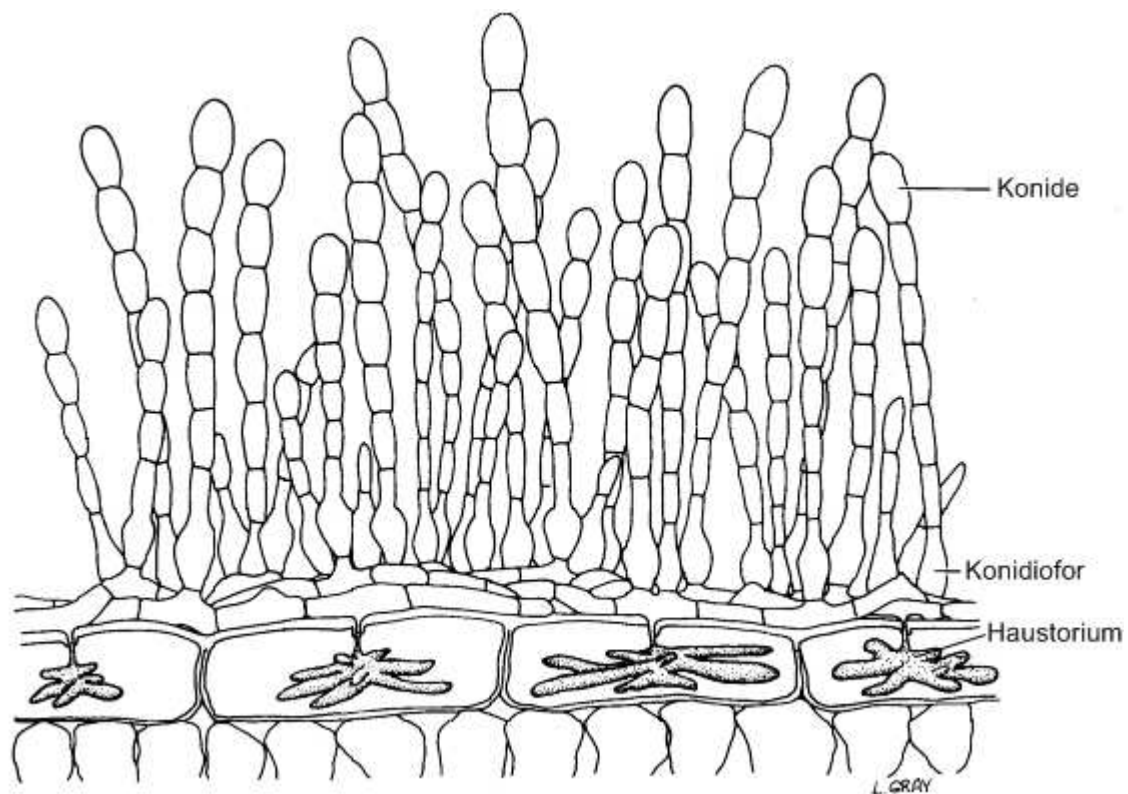


Obr. 2. Myceliální povlak *E. alphitoides* na listech vzrostlého dubu letního. (foto Michálek 2008)

Anamorfa (nepohlavní stádium, obr. 4) *Oidium quercinum* řazená do oddělení Deuteromycotina (*fungi imperfecti*) vyrůstá jako cylindrické přehrádkované konidiofory. Nepohlavní spóry konidie jsou terminální, solitérní, vejčité elipsovité s oblým vrcholem, naspodu seříznuté, 25-40(-45) x 13-25 μ m velké (Takamatsu *et al.* 2007).

Rychlé šíření anamorfních propagulí větrem vede k sekundární infekci. Její intenzita je dána mnoha faktory, hlavně pak nízkou vzdušnou vlhkostí. Padlí obecně páchá největší škody především v oblastech, které se vyznačují horkými léty s malým srážkovým úhrnem, jako například Kalifornský poloostrov nebo Izrael (Yarwood 1973 in Callan & Carris 2004).

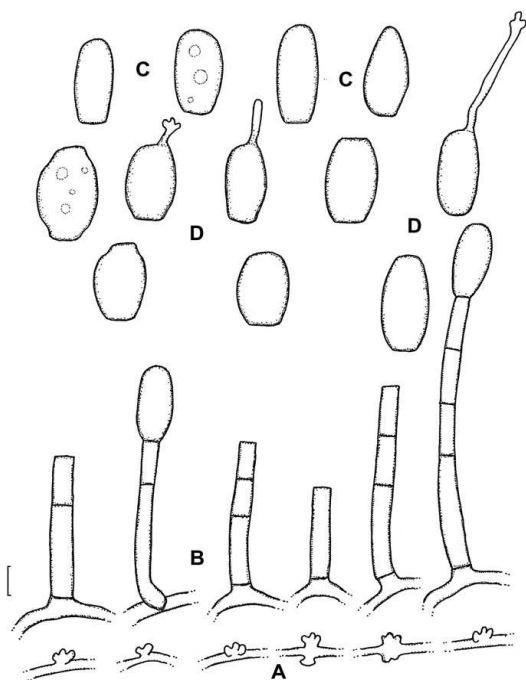
V průběhu sezóny porůstá mycelium u slabších jedinců většinu listové plochy, čímž negativně narušuje světelný režim rostliny a působí listovou hypertrofií a protahování mladých výhonů, tedy košatý růst koruny. Na podzim se hlavně na svrchní části listu vytvářejí teleomorfní (pohlavní) kulaté askomata. Kleistothečia (Obr. 5) o velikosti 75-140 μ m jsou rozeseta na povrchu mycelia. Zbarvení kleistothecií přechází od žlutohnědého až k černému u zralých. Peridiové buňky jsou nepravidelně geometrické. Postupně kleistotheciím více či méně ekvatoriálně dorůstají přívěsky – appendixy.



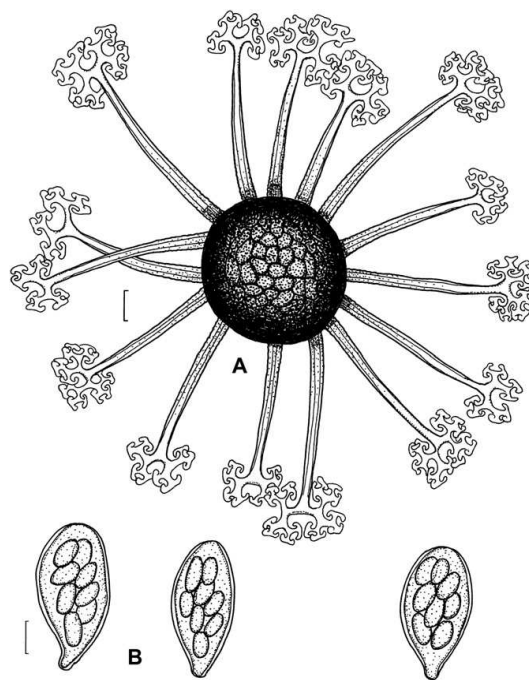
Obr. 3. Nákres padlí *Erysiphe graminis*. Houba žije na povrchu listů, jen vyživující orgány (haustoria), pronikají do epidermálních buněk listu.
(autor kresby Lenore Gray, <http://www.ipm.uiuc.edu/diseases/series400/rpd406/406-2.gif>)

Appendixy jsou rovné tlustostěnné s žádnou či jednou přepážkou, někdy mírně pigmentované na bázi, terminálně větvené. Význam appendixů zatím nebyl odhalen, nicméně tvar jejich větvení je společně s počtem věceček v kleistotheciu důležitým rodově specifickým taxonomickým znakem (Obr. 6). Při určování hraje roli také druh hostitelské rostliny, protože většina padlí má specifického hostitele (Callan & Carris 2004). Kleistothecium obsahuje váčkovitá široce vejčité elipsovité věcečka (4-15) přisedlá až na krátké stopce, 40-80 x 30-55 μ m, 10-18 μ m v průměru. Každé věcečko má 6-8 pohlavních široce vejčité elipsovitých bezbarvých askospor, 13-26 x 7-15 μ m velkých. Kleistothechia přečkávají zimní období. Pro

skupinu *E. alphitoides s. lato* je charakteristickým hostitelem rod *Quercus*. Konkrétně *Quercus dentata*, *Q. crispula*, *Q. petraea*, *Q. robur*, *Q. serrata* (houba je schopna infikovat i některé druhy čeledi *Hippocastanaceae*).



Obr. 4.
Erysiphe alphitoides, anamorfa. (A) Appressoria. (B) Konidiofory. (C) Primární konidie. (D) Sekundární konidie (s částečně vyklíčeným myceliem). Měřítka [10 mm. U. Braun del.

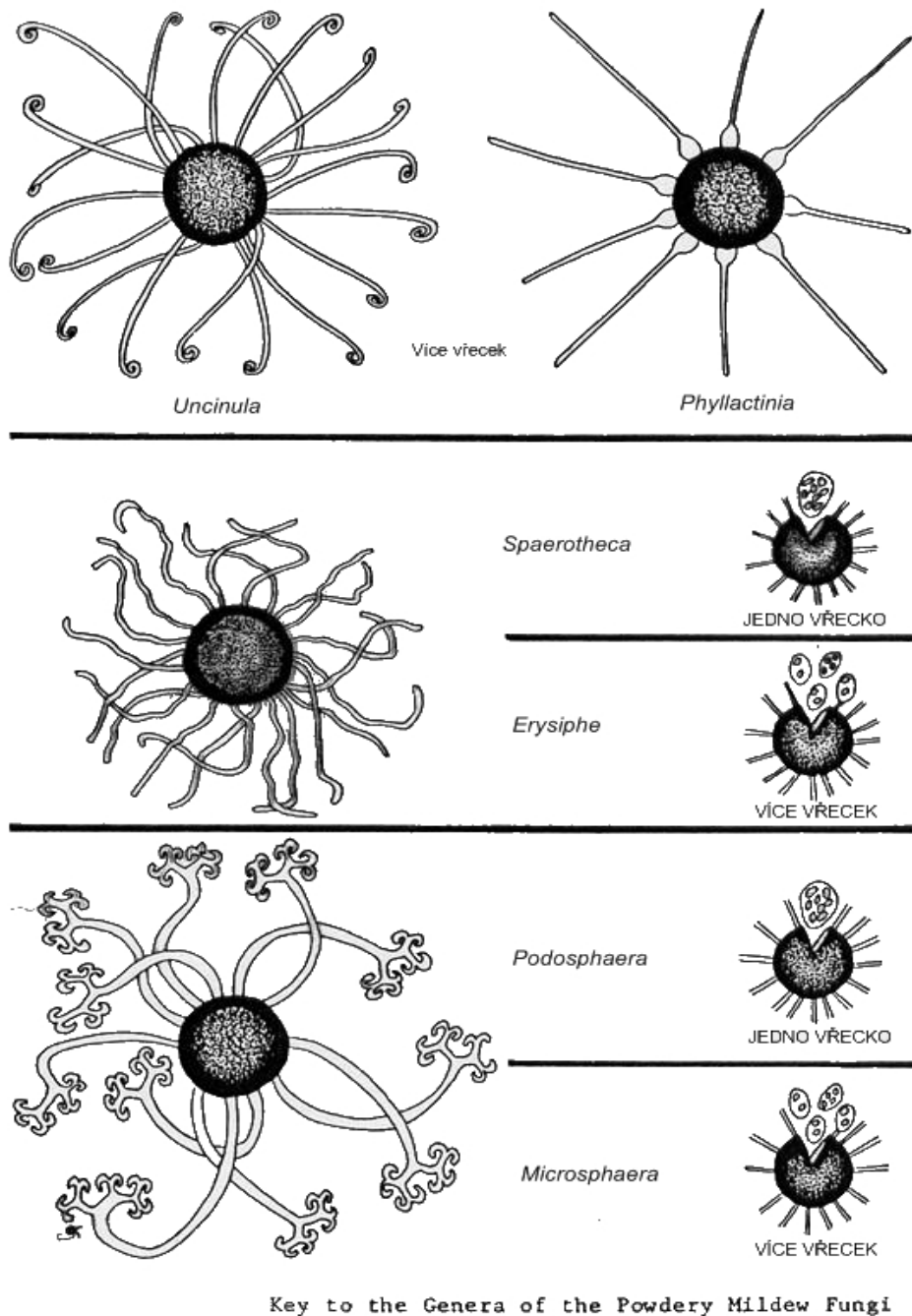


Obr. 5.
Erysiphe alphitoides, teleomorfa (velmi podobná a sotva rozeznatelná od *E. hypophylla*). (A) Kleistothecium. (B) Vřečka. Měřítka [25 mm (kleistothecium), 10mm (vřečka). U. Braun del. (Takamatsu *et al.* 2007)

Pro *E. alphitoides s. str.* je charakteristickým hostitelem *Q. crispula*, *Q. robur* a *Q. serrata* (Takamatsu *et al.* 2007).

Vzhledem k tomu že padlí intenzivně zasahuje do metabolismu listu resp. celé rostliny (Magyarosy *et al.* 1976, Gordon & Duniway 1982) lze předpokládat, že i celkové složení komunity fytoplánu bude nějak ovlivněno. V první řadě lze očekávat hyperparazity samotného padlí *Ampelomyces quisqualis*, již využívanou k biologické ochraně a s ní často zaměňovaný druh *Phoma glomerata*. U *P. glomerata* a *A. quisqualis* byla prokázána inhibice růstu a tvorby konidií padlí (Sullivan & White 1999). Druhově nespecifiční hyperparazit z rodu *Ampelomyces*, schopní infikovat přinejmenším 65 druhů *Erysiphaceae* v devíti rodech, pronikají do hyf padlí, kde pokračují v růstu. Na povrchu hyf, konidioforu, počínajících konidií, případně na mladých nezralých kleistotheciích hostitele lze potom nalézt lahvicovitá

konidiomata – pyknidy rozmnožovací orgány *Ampelomyces*. Kiss a Nakasone (1998) prokázali že *Ampelomyces* je schopná inhibovat pohlavní i nepohlavní sporulaci, nebo mohou dokonce usmrtit celé kolonie padlí. Anamorfní rod *Phoma* představuje přibližně 223 druhů saprofytů a parazitů, kteří se podobně jako *Ampelomyces* vyznačují tvorbou pyknid.(Levetin & Dorsey 2006).



Obr. 6. Příklady rodově specifických znaků na kleistotheciích různých padlí. (<http://www.plantpath.wisc.edu/pp300-UW/images/image004.jpg>)

3. METODICKÁ ČÁST

3.1. Sběr vzorků

Vzorky listů pro analýzu je vhodné sbírat vícekrát v průběhu sezóny, což pro dub letní znamená dobu přibližně od začátku května, kdy se v otevírají pupeny a rozvíjejí se mladé listy, až do konce října, kdy listy postupně odumírají. Padlí sleduje ontogenetický vývoj listů. Hned jak se mladé listy začínají rozvíjet, je možné makroskopicky pozorovat četné bílé tečky postupně se rozrůstající do jednolitého povlaku. Koncem sezóny na listech dozrávají kleistothecia. Utržené listy je nutné asepticky uzavřít do nádoby s dostatkem vzduchu tak, aby se nezapařily a vzájemně nedotýkaly. Vzorky je třeba neprodleně laboratorně zpracovat, aby nedošlo ke zkreslení vlivem rychlého rozvoje saprofytických mikromycet a rozkladu původního společenstva.

3.2. Komunitní vzorky

Získat vzorek totální povrchové mikroflóry listu je možné několika způsoby, například mechanicky oškrabat povrch listu, strhnout kompletní kutikulu nebo list omýt.

První je sice jednoduchá, ale vede také k získání endofytů a velkého množství balastu v podobě listové pokožky a dužniny.

Další možnost, kterou použili Heuser a Zimmer (2002), nabízí získání samotné povrchové kutikuly a všeho, co se na ní vyskytuje. List se přitlačí na kapku glycerolu nanesenou na kovový nosič (bloček, plech, špachtle) a ten je následně částečně ponořen do kapalného dusíku. Po následném přimrznutí a stržení listu zůstane kompletní kutikula přimrazena ke glycerolu. Místo glycerolu lze případně použít vodu. Ledová plocha s kutikulou se oškrábe, led se nechá roztát a získanou suspenzi lze použít k izolaci DNA. Tato technika umožňuje získání kompletní kutikuly spodní a svrchní strany listu zvlášť a získaný vzorek je použitelný ke kvantitativní analýze komunity.

Třetí možná metoda spočívá v důkladném omytí povrchu pomocí ultrazvuku v pufové lázni (0.1M roztok K_3PO_4 , pH 7). Suspenze je následně zcentrifugována při 30 000 G po dobu 15 minut, usazenina resuspendována v požadovaném množství fosfátového pufru. Získaná suspenze poslouží především k izolaci celkové DNA komunity a také jako inokulum pro

získání počtu CFU (*colony forming units*, viz kultivace). Tato metoda se jeví jako nejvhodnější, neboť byla již v praxi ověřena přímo za účelem získání celkové DNA z povrchu listu, navíc její produkt poslouží ke statistice CFU a dostačuje k analýze druhové diversity (Yang *et al.* 2000). Za nevýhodu poslední zmíněné techniky by bylo možné považovat to, že neoddělí svrchní a spodní stranu. Při studii spór na povrchu listů jilmu a dubu sice Leventin a Dorsey (2006) izolovali ze svrchní strany větší množství kolonií, ale rozdíl oproti spodní straně nebyl signifikantní.

3.3. Metody Identifikace

3.3.1. Klasické metody

Na rozdíl od metod molekulárních jsou klasické metody především levnější a vyžadují méně speciálního vybavení, nicméně jsou výrazně pracnější, komplikovanější a zdaleka ne všechny druhy hub přítomné na povrchu listu lze úspěšně nakultivovat *in vitro*. Kultivace je poměrně nákladná a správné mikroskopické určení je otázkou zkušeností a praxe.

3.3.1.1. Kultivace

Základním postupem pro laboratorní studium mikromycet izolovaných ze vzorku je *in vitro* kultivace na definovaných živných médiích. Izolace a kultivace čistých kultur hub zahrnuje přípravu sterilního média. Většina médií obsahuje hlavně vodu, jednoduché nebo složitější zdroje uhlíku jakými jsou cukry, lipidy, peptidy, organické kyseliny nebo aminokyseliny a zdroje dusíku v podobě peptidů, aminokyselin, amonných sloučenin nebo dusičnanů. Média mohou být dále obohacena o vitamíny, esenciální aminokyseliny, zdroje fosforu, síry a stopových prvků. Pokud má být složení média reprodukovatelné a přesně definované, používají se látky v čisté formě. Obvykle se však používají komplexní extrakty rostlinné nebo živočišné tkáně, jako například sladový extrakt, peptony nebo krevní extrakt. Poměry jednotlivých složek lze měnit, podle toho, jak je potřeba ovlivnit růst kultury. Média s nízkou koncentrací zdroje polysacharidů obvykle podporují sporulaci. Na druhou stranu široké spektrum monosacharidů a disacharidů o vysoké koncentraci svědčí spíše

vegetativnímu růstu. Extrémně vysoká koncentrace uhlohydrátů a solí zase znepřístupňuje vodu a úplně inhibuje růst. Někdy je nutné upravit pH prostřednictvím kontrolovaného přidávání kyseliny nebo zásady. Samotné houby mají různé nároky na pH substrátu, navíc agar netuhne v kyselém prostředí, tudíž je po přidání kyselé složky, jako jsou třeba některé ovocné šťávy, do tuhého média nutné pH zvýšit. Pokud je potřeba tuhé médium přidává se do směsi práškový agar (15-20g/l).

Samotná sterilizace se většinou provádí v autoklávech, tlakových parních vařičích, kde jsou nádoby s médiem vystaveny 121°C po dobu 15-20 minut. Některé komponenty médií, jako třeba vitamíny nebo antibiotika, jsou teplotně nestabilní. V takovém případě je třeba médium sterilizovat filtrací přes speciální membránu s póry o velikosti 0,2µm, které nepropustí buňky hub ani bakterie. Druhá možnost je tyto látky přidat do média po ochlazení. Pokud se jedná o tuhé agarové médium, je limitující teplota 45-50°C, kdy agar začíná tuhnout rozlévá se na sterilní Petriho misky (Bills & Foster 2004).

3.3.1.1.1. Selektivní média

Pro potlačení růstu bakterií při izolaci hub se do médií přidávají antimikrobiální antibiotika. Především se používá streptomycin sulfát, gentamycin a tetracyklin v koncentraci 50 mg/l nebo chloramfenikol o koncentraci 100 mg/l. Roztoky antibiotik jsou sterilizovány filtrací a do médií se přidávají po zchladnutí na 45-50 °C, pouze chloramfenikol je termostabilní a je možné ho přidat do média před klávkováním. U některých antimikrobiálních antibiotik byla pozorována selektivní toxicita vůči různým houbám, především z oddělení oomycet a basidiomycet (Tuite 1969; Singleton 1992 in Bills & Foster 2004). Je možné použít i kombinaci různých antibiotik. Například kombinace chlortetracyklinu a streptomycin sulfátu po 50 mg/l se používá při mapování půdních vláknitých hub. Tato antibiotika specificky interferují s funkcí bakteriálního ribosomu a nikdy nebylo pozorováno, že by jakkoli nepříznivě ovlivňovala růst askomycet a basidiomycet.

Druhou skupinu tvoří antibiotika fungicidní, která bývají do médií přidávána za účelem specifické eliminace určitých skupin hub. Také mohou posloužit jako zpomalovače růstu při dlouhodobé kultivaci. Jedná se poměrně dost toxické látky jako například cykloheximid, cyklosporin A, pentachlornitrobenzen (PCNB) a pimarin (natamycin).

Poslední typ antibiotik je cílený proti roztočům. Jejich vajíčka mohou být zanesena s inokulem do kultur, které mohou zcela zničit. Pro zamezení jejich růstu se používají akaricidní látky dieldrin a lindan, které jsou silně toxické pro živočichy, ale na houby mají nepatrný vliv (Bills & Foster 2004).

3.3.1.1.2. Tuhá média

Většinu mikromycet lze poměrně dobře kultivovat na tuhých – agarových živných médiích. Pro základní izolaci druhů se používají média s obsahem základních cukrů (glukóza, sacharóza, dextróza, maltóza), popřípadě se zdroji dusíku (peptony). Vzorek examinovaného organismu je nanesen (otisknut, nalit, otřen atd.) na agarovou plotnu. Pokud se jedná o směs spór a fragmentů mycelií, jakou je povrchová mikroflóra listů, objeví se na takové plotně za 24–48 hodin kultivace v termoboxu při teplotě 20–25 °C drobná mycelia různých vláknitých hub nebo kolonie různých kvasinek. Kolonie jsou sečteny a jejich množství se udává v jednotkách schopných vytvořit kolonii - „CFU“ (*colony forming units*) vztažených na jednotku plochy listu (Leventin & Dorsey 2006). Při příliš vysoké koncentraci spór se kolonie přerůstají a je nutné inokulum naředit. To je možné provést důkladným setřením povrchu listu vatovým, nebo pěnovým tamponem, který je důkladně „vyprán“ ve slabém roztoku smáčedla (cca 0,04%), které zajistí homogenitu suspenze (hydrofobní spóry by jinak zůstaly v povrchové blance) (Hodges *et al.* 2006), ta je pak v různých koncentracích nanesená na plotny s médiem a důkladně rozetřena sterilní mikrobiologickou „hocejkou“. Ze získaných CFU hodnot se vypočte průměr. Odlišná mycelia resp. kolonie je třeba v této době od sebe oddělit do samostatných kultur. Při stejné kultivační teplotě se sleduje rychlost růstu, tvar kolonií, ohraničení, tvar a způsob větvení vláken a schopnost prorůst do substrátu (vztah ke kyslíku). Barva kolonie, zbarvování média a barevné změny kolonie jsou velmi podstatnými znaky, které mohou rozhodovat při identifikaci a mnohdy se projeví v pozdější fázi vývoje, po spuštění sekundárního metabolismu či po přidání určitých látek do média.

Také pro spuštění sporulace je nezbytné použít speciální média. Řada druhů mikromycet tvoří velice křehké konidiofory, které nelze bez poškození nebo úplného zničení přenést na podložní sklíčko, proto se často přenášejí do tzv. „sklíčkových kultur,“ kdy se mikromycety kultivují na tenkém filmu média naneseném na podložní sklíčko umístěné v „mlžné komůrce,“ tedy uměle vytvořeném mikroklimatu o vysoké vzdušné vlhkosti původně

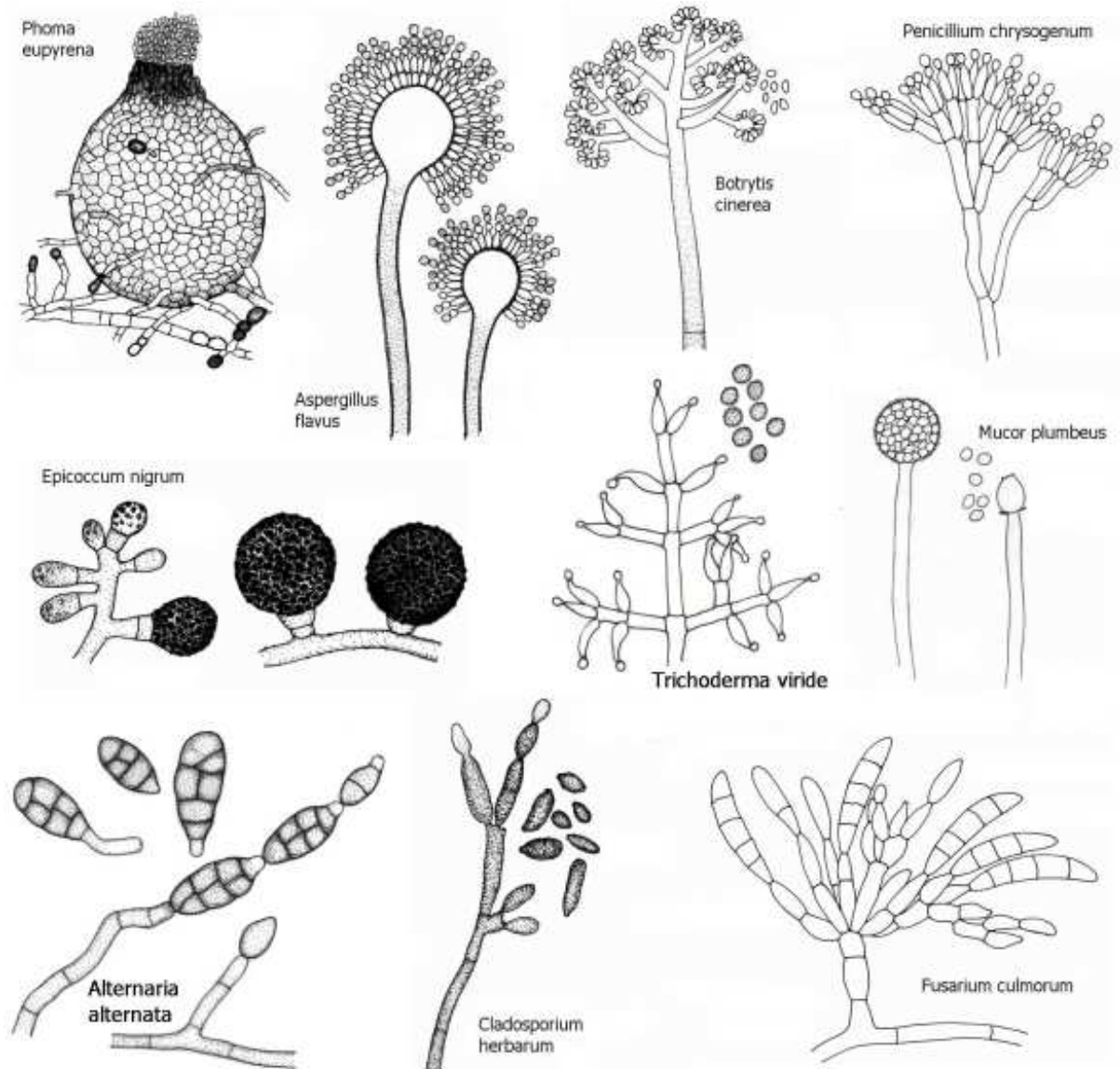
sloužící k vyvolání sporulace mikromycet v daném substrátu (Schmit & Lodge 2005). Obligátní parazity a hyperparazity nelze pro závislost na živém hostiteli kultivovat pomocí živných médií. Pro izolaci biotrofních parazitů je potřeba sterilně kultivovat hostitelskou rostlinu, nebo její orgán na agarovém médiu při umělém osvětlení. Orgán nebo rostlina se infikuje jednou spórou nebo spórami z jedné kolonie. Tak je možné získat čistou kulturu parazita. Podobně je možné kultivaci udržet při životě části již infikovaných rostlin získaných v terénu a dokonce vyvolat sporulaci houbových parazitů nebo epifytů. Kulturu je možné získat i ze spór dlouhodobě uskladněných za sucha a nízké teploty (Nicot *et al.* 2002).

3.3.1.2. Mikroskopie

Základním nástrojem pro identifikaci mikromycet je mikroskop. Mikroskopické examinaci je možné podrobit přímo nalezený vzorek, nebo vzorek čisté kultury izolované ze substrátu. Houby se určují podle základních charakteristických znaků, viditelných při dostatečném zvětšení (400x – 1000x), protože velikost spór se pohybuje okolo 10 μ m.

Základním znakem je přehrádkování. Basidiomycety a askomycety mají mycelium přehrádkované, ostatní houbové organismy z oddělení zygomycetes, chytridiomycetes a oomycetes (*Stramneopila*) mají mycelium „coenocytické,“ čili bez přehrádek. Dále je významný typ větvení mycelia a konidioforů.

Rody je možné určit na základě rozmnožovacích struktur. Nepohlavní vývojové fáze hub nazývané anamorfy vytvářejí v různém stupni rozvoje mycelia „konidiofory“, modifikované větve mycelia, na jejichž konci se vytvářejí nepohlavní spóry konidie. Jeden znak je typ konidioforu, tedy specifický souhrn vlastností jakými je typ větvení, přehrádkování, způsob uložení spór, popřípadě tvorba „konidiomat,“ neboli nepohlavních plodnic (Obr. 7). Samotné spóry resp. jejich velikost, tvar, povrch, barva, většinou rozhodují při druhové identifikaci. Pro identifikaci mikromycet je k dispozici velké množství určovacích klíčů, například *The Deuteromycetes* (Kiffer nad Morelet 1999), *Microfungi on Land Plants* (Elis & Elis, 1995), *Dematiaceous hyphomycetes* (Elis, 2001) *A revision of Chrysosporium and allied genera* (C.A.N. van Oorschot), *The Ascomycete genus Eupenicillium and related Penicillium anamorphs*, (Amelia C. Stolk and Robert A. Samson) atd.



Obr. 7. Ilustrační příklady rozmanitosti tvarů konidioforů některých nejběžnějších deuteromycet. (<http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/images/plisne/perokresby>)

3.3.1.2.1. Fixace a barvení vzorků pro mikroskopii

Neobarvené vzorky je možné pozorovat ve světlém poli, fázovém kontrastu nebo fázovém rozhraní. Samotné mikroskopování může zahrnovat barvení vzorků, nebo chemické reakce mycelia resp. spór s nějakou látkou.

Barvením zesiluje kontrast a viditelnost určitých částí houby. Specifická schopnost absorbovat barviva odlišuje houbové tkáně od hostitelské a vizualizuje buněčné organely. Schopnost přijímat barvivo různými částmi stélky, či různé barevné reakce, jsou důležitými identifikačními znaky. Obecně se jedná o více či méně jedovaté a karcinogenní

látky. Vzduchem roznášené spóry bývají hydrofobní a k jejich pozorování je dobré použít slabý roztok smáčedla (Tween, kuchyňský saponát, atp.).

Fixace vzorku se používá k usmrcení buněk, zvýšení citlivosti k barvení nebo zamezení degradace buněčných struktur v mrtvých buňkách při dlouhodobém uchovávání. Základní fixační roztok je ethanol ve směsi s ledovou kyselinou octovou. Dále se používá rozličných směsí látek jako hexadecyltrimethylamonium bromid, ethylendiamintetraacetát sodný (EDTA), formalín a glycerol.

K barvení vzorků se používají směsi fenolu, kyseliny mléčné, sloučenin jódu a mnoha různých barviv na bázi anilinu apod. Rozsáhlý seznam návodů pro výrobu těchto směsí lze najít v literatuře, například v příloze knihy *Biodiversity of Fungi* (2004, str. 613-618).

3.3.2. Analýza společenstev molekulárními metodami

„Klasické“ metody studia komunity mikroorganismů resp. mikromycet s sebou nesou mnohá úskalí. Identifikaci na základě symptomů choroby (u parazitů), morfologie mikroznaků nebo biochemických testů vyžaduje zkušené odborníky s mnohaletou praxí. Také není možná kultivace všech hub, navíc je časově náročná a citlivá na kontaminaci.

Podobně odhady druhové rozmanitosti založené na přímém mikroskopování vzorků závisí na „ochotě“ jednotlivých druhů sporulovat a neodhalí druhy vyskytující se v komunitě v rané fázi jako sterilní mycelium. Navíc kultivované mikroorganismy nemusí zdaleka být významné pro dané prostředí (Yang *et al.* 2001).

Molekulární metody umožňují testovat vzorky přímo, bez kultivace, takže odhalí i nekultivovatelné organismy (parazity, hyperparazity), které hrají v komunitě nezanedbatelnou roli (Atkins & Clark 2004). V celkové DNA izolované ze společenstva, je také možné odhalit mikromycety, které byly přítomné ve vzorku pouze jako sterilní mycelium či nepatrné kolonie, a tudíž je nebylo možné odhalit a identifikovat mikroskopicky. Nezanedbatelným přínosem, díky širokému spektru citlivých způsobů izolace DNA, je možnost aplikovat molekulární metody přímo na vzorky, které obsahují velmi malé množství DNA, jakými je například povrchová mikroflóra listů (Yang *et al.* 2001) nebo starých obrazů (Möhlenhoff *et al.* 2001).

Molekulární metody charakterizují nukleové kyseliny, přítomné ve všech stádiích životního cyklu hub a tedy obcházejí problémy spojené s metodami mikroskopickými.

V bakteriální ekologii se ukázaly užitečné především dvě metody schopné analyzovat směsný vzorek DNA: T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism*, viz kap. 3.3.2.5.) a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, viz. kap. 3.3.2.4.2.) (Nikolcheva *et al.* 2003). Obě metody zpracovávají produkty polymerázové řetězové reakce „PCR“ (*Polymerase Chain Reaction*, viz. kap. 3.3.2.2.).

3.3.2.1. Izolace DNA

3.3.2.1.1. DNA z kultur

Výsledky molekulární analýzy celkové komunitní DNA je vhodné porovnat s mikromycetami získanými v čisté kultuře otisknutím listu nebo vysetím získané suspenze na agarovou plotnu. Malý kousek (cca 3 mm x 3mm) kultivovaného mycelia poskytne optimální množství materiálu pro izolaci DNA (Nikolcheva & Bärlocher 2004).

3.3.2.1.2. DNA z celého listu

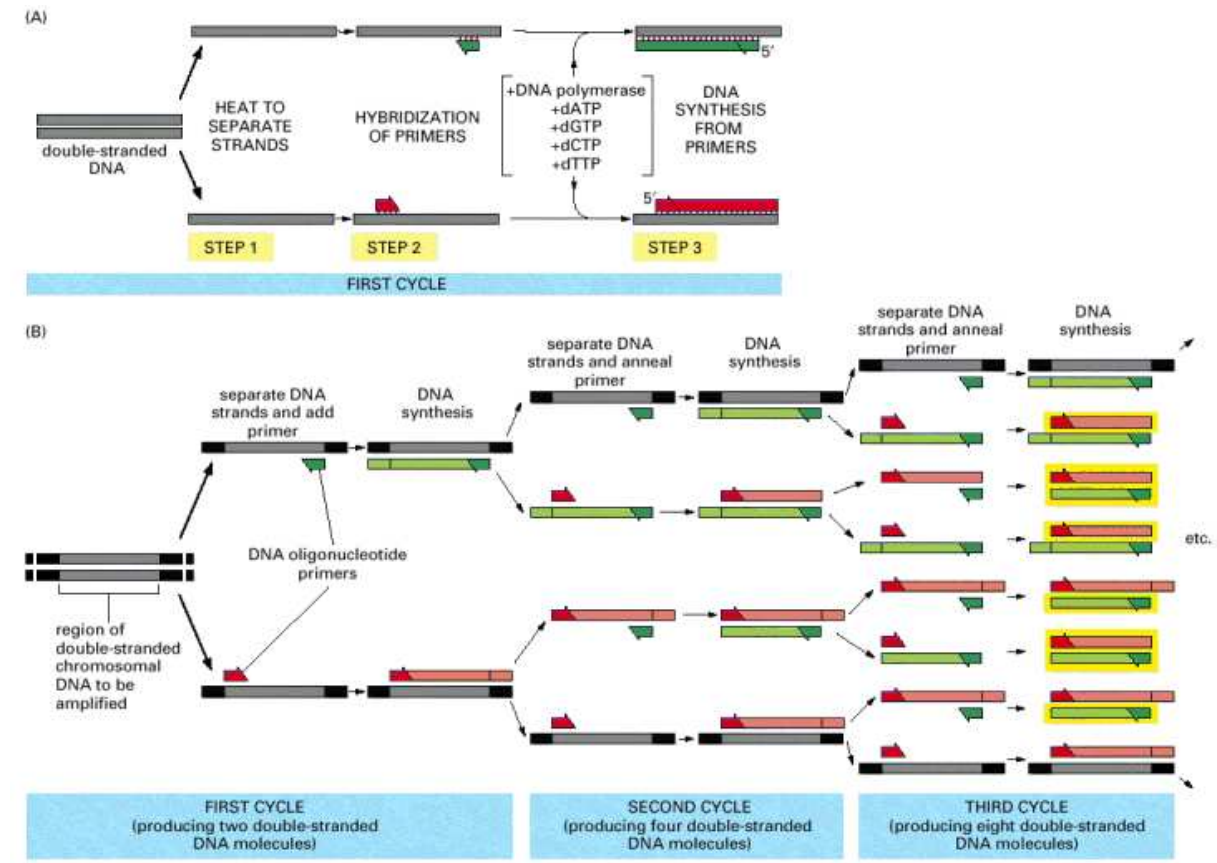
V první řadě je třeba vzít v potaz, že mnohé houby vytvářejí na listu jen nepatrné množství biomasy. Důležité je také brát v potaz možnou přítomnost látek, které by mohly inhibovat některé metody (PCR, DGGE). Samotná buněčná stěna hub je komplexem polysacharidů, chitinu, proteinů a pigmentů. Některé druhy hub vytvářejí velmi tlusté buněčné stěny s vysokým obsahem melaninových derivátů s fenolickými skupinami, jenž mohou inhibovat PCR (Möhlenhoff *et al.* 2001). Proto je důležité buňky nejprve důkladně mechanicky rozbít, například třením vysušeného vzorku se sterilním pískem, se skelnou vatou nebo pomocí speciálního zařízení „*bead beater*“ (Yang *et al.* 2001), popřípadě drcením vzorku zmrazeného kapalným dusíkem. Buněčný homogenát bývá poté většinou ošetřen enzymy (proteázy, celulózy, chitinázy) a detergenty (SDS – *sodium dodecylsulphate*), které rozloží zbytky buněčných stěn. Lyzát se také ošetřuje RNázou, pro eliminaci RNA ze vzorku a poté je s enzymy inkubován při teplotě okolo 60 °C. Čištění lyzátu fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu v dalším kroku odstraňuje buněčné komponenty a enzymy degradující

DNA. Například Heuser & Zimmer (2002) použili fenol/chloroform/isoamyl alkohol v poměru 25:24:1. DNA se vysráží isopropanolem, zachytí na membráně a je zbavena solí prostřednictvím promývání ethanolem a následného sušení. Chemickou fází extrakce genomové DNA lze také provést pomocí kitů, komerčně vyráběných souprav (DynaL's DNA direct, Mo Bio Laboratories, Inc. Soil DNA isolation kit, Qiagen DNeasy atp.), specificky určených pro určitý typ vzorku. Tento způsob je rychlý, ale nemusí být dostatečně citlivý pro izolaci DNA z celé komunity. Zcela však postačí pro vzorky čistých kultur, které poskytují dostatek biomasy daného druhu (Atkins & Clark 2004). Je vhodné vyzkoušet různé metody izolace DNA a vybrat tu, jejímž výsledkem bude izolát o maximální možné čistotě a koncentraci. Případné inhibitory PCR přítomné ve vzorku DNA lze potlačit přidáním BSA (*bovine serum albumin* – albumin z hovězího séra, cca 2mg ml⁻¹) do reakční směsi PCR. BSA váže široké spektrum látek (včetně fenolických skupin melaninů přítomných v buněčných stěnách hub), čímž zamezuje jejich kontaktu s *Taq* polymerázou a její inhibici (Möhlenhoff *et al.* 2001).

3.3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda využívající prvky replikace DNA, schopná požadovaný úsek DNA namnožit až 10⁹ a efektivně oddělit od zbytku genomu. V první řadě je třeba navrhnout sekvenci dvou primerů, oligonukleotidů o velikosti kolem 20 bazí. Ty jsou na objednávku nasyntetizovány specializovanými výrobci (Generi Biotech apod.). Primery vymezují úsek DNA určený k amplifikaci tak, že jsou sekvence těchto nukleotidů komplementární se sekvencemi DNA, které oblast ohraničují. Sekvence primerů se navrhuje na základě již známých sekvencí, stažených z některé z internetových databází (GenBank, EMBL). Při reakci PCR na tato místa přihibridizují a slouží jako počátek replikace pro DNA polymerázu. Pár primerů sestává z „*forward*“ primeru pro jedno vlákno DNA a „*reverse*“ primeru pro druhé reverzně komplementární vlákno. Nově syntetizovaná DNA je produkována *in vitro* při reakci katalyzované DNA polymerázou. Každý další cyklus využívá nově nasyntetizovaných fragmentů jako templátu (předlohy – původní DNA) a tím pádem se každým cyklem počet nasyntetizovaných molekul dvojnásobí (Obr. 8) (Alberts *et al.* 2002).

Úspěšnost reakce se kontroluje pomocí gelové elektroforézy (viz. kap. 3.3.2.3.1.), která zároveň separuje jednotlivé složky reakční směsi od produktu. Produkt reakce je většinou určen k dalšímu zpracování separačními, klonovacími nebo sekvenačními technikami.



Obr. 8. Amplifikace DNA použitím techniky PCR. Znalost schopnosti DNA být amplifikována je využita k navržení dvou DNA oligonukleotidů, každý komplementární k sekvenci na jednom z řetězců DNA dvouvlákná DNA na opačných koncích oblasti určené k amplifikaci. Tyto oligonukleotidy slouží jako primery pro *in vitro* DNA syntézu, zprostředkovanou DNA polymerázou, a vymezují oddíl DNA, která bude amplifikována. (A) PCR začíná dvouvláknovou DNA a každý cyklus reakce začíná krátkým tepelným ošetřením pro oddělení (denaturaci) dvouvlákná (step 1). Po oddělení vláken se ochlazením reakční směsi umožní molekulám obou primerů, přítomným v nadbytku, přihybnizovat ke komplementárním sekvencím na vláknech DNA (step 2). Tato směs je poté inkubována s DNA polymerázou a čtyřmi deoxyribonukleosid trifosfáty tak, že je nová DNA syntetizována s počátkem ve dvou primerech (step 3). Celý cyklus je potom znovu započat denaturací oddělující nově syntetizovaná dvouvlákná DNA. (B) Jak je postup opakován znovu a znovu, nově syntetizované fragmenty slouží jako templáty v dalším kolea během několika kol je převládající DNA shodná se sekvencí vymezenou oběma primery (včetně) na původním templátu. Z původní DNA je amplifikována jen sekvence vymezená primery, protože zde nejsou přítomny jiné primery. (Alberts *et al.* 2002, str.1319)

3.3.2.2.1. Cílová oblast, design primerů

Specifické informace z databází umožňují vybrat cílovou část DNA a navrhnout primery napříč konzervovanými variabilními oblastmi. Hlavní oblastí pro vývoj molekulární diagnostiky hub jsou ribosomální geny. Tyto geny jsou vhodné pro citlivou detekci při PCR, protože je lze nalézt ve všech organismech v mnoha kopiích. Jaderná ribosomální DNA (rDNA) hub sestává ze tří genů. Genů pro velkou podjednotku (25S), malou podjednotku ribosomu (18S) a gen 5.8S, oddělených „spacerovými“ úseky ITS (*internal transcribed spacer*) (Atkins & Clark 2004). Mnohé sady primerů běžně používané při studiu komunity houbových organismů projevily nedostatečnou specifitu a tendenci ke společné amplifikaci genů jiných eukaryotů, například bezobratlých. Především se jednalo o primery navržené pro amplifikaci oblasti 18S rDNA. Některé universální „houbové“ primery jsou dokonce podezřelé z toho, že by mohly přednostně amplifikovat sekvence určitých taxonomických skupin. I když jsou amplifikované geny houbového původu, může nedostatečná mezidruhová variabilita 18S rDNA snížit taxonomické rozlišení na úroveň rodu i vyšší. Oblast ITS prokazuje vyšší sekvenční variabilitu a profily vytvořené prostřednictvím ITS primerů vykazují vyšší diversitu než ty amplifikované s 18S rDNA primery (Kennedy & Clipson, 2003). ITS oblast sice není vhodná pro studium vnitrodruhové variability, nicméně pro svou vysokou konzervovanost a mezidruhovou variabilitu je ideální k vývoji celé řady specifických primerů pro identifikaci druhů hub (Martin & Rygiewicz 2005).

Oblast ITS se například při studiu společenstva dřevokazných tvrdohub (*Pyrenomycetes*) ukázala jako citlivější a vhodnější pro použití s DGGE než 18S rDNA. Výsledky DGGE analýzy oblasti ITS byly prokazatelně konzistentní s výsledky fylogenetické sekvenční analýzy (Green *et al.* 2004). Mimo oblast ITS se jako vhodné ukazují ještě β -tubulinový gen a „mating type“ geny (Atkins & Clark 2004).

Další možnost nabízí současný trend „DNA barcodingu“. Původním ideálem bylo používat k rychlé a jednotné identifikaci všech organismů jeden universální molekulární marker, podobně jako čárový kód – „bar code“. Pro živočišnou říši byl stanoven jako nejvhodnější úsek gen *Cox1* kódující mitochondriální enzym cytochrom oxidázu. Většina mykologů ale používá k identifikaci úsek ITS, nebo výjimečně D1/D2 oblast genu pro velkou podjednotku ribosomu (LSU či 28S). Tu používají především specialisté na kvasinky. Mezi houbami nebyl nalezen dostatečně konzervovaný úsek genu *Cox1*, na který by bylo možné navrhnout univerzální primery pro barcoding hub (Seifert 2008). Například Seifert *et al.*

(2007) navrhnul primer na oblast *Cox1*, pomocí jehož se podařilo úspěšně rozlišit 360 druhů a poddruhů askomycet z čeledi *Trichocomaceae*. Na druhou stranu ve studii zabývající se komplexem *Aspergillus niger* (Geiser *et al.* 2007) se variabilita genu *Cox1* ukázala jako nedostačující k identifikaci druhů (Seifert 2008). Na schůzi pod záštitou organizace CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) podpořilo 27 mykologů z 12 zemí návrh, aby byla oblast ITS používána jako mykologický „bar code“. Tento návrh ještě nebyl oficiálně schválen.

Nikolcheva a Bärlocher (2004) již navrhli a úspěšně ověřili sadu universálních částečně degenerovaných primerů pro studium společenstev mikromycet v opadu tlejícím na dně potoka a jeho změn v průběhu sezóny. Primery vymezují oblast mezi 28S rDNA a 18S rDNA specificky pro Askomycety, Bazidiomycety, Zygomycety, Chytridiomycety (*Fungi*) a Oomycety (*Stramenopila*) (Tab. 1.). Série primerů ITS 4 byla navržena podle známých sekvencí genu pro velkou podjednotku (28S) zástupců každé cílové skupiny hub, které byly staženy z internetové databáze GenBank (Tab. 2.).

Primer	Teplota annealingu
• ITS4Asco (Ascomycota): 5' GTTACTRRGGCAATCCCTGTTG3'	55°C
• ITS4Basidio (Basidiomycota): 5' GCRCGGAARACGCTTCTC3'	58°C
• ITS4Chytrid (Chytridiomycota): 5' TTTTCCCGTTTCATTCGCCA 3'	53°C
• ITS4Oo (Oomycota): 5' ATAGACTACAATTCGCC 3'	49°C
• ITS4Zygo (Zygomycota): 5' AAAACGTWTCTTCAAA 3'	45°C
• ITS5: 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	

Tab. 1. Sekvence skupinově specifických primerů ITS4 pro *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota*, *Zygomycota* s uvedenými optimálními teplotami annealingu v kombinaci s „forward“ primerem ITS5 (Nikolcheva & Bärlocher 2004)

Tab. 2. Sekvence použité pro design primerů. V databázi GenBank je *Saagaromyces* chybně zapsána jako *Sagaaromyces*. V GenBank lze *Apiotrichum porosum* lze také najít jako *Trichosporon porosum* (pod stejným číslem). (Nikolcheva & Bärlocher 2004)

Oddělení	Rod/Druh	GenBank č.	Oddělení	Rod/Druh	GenBank č.
Ascomycota			Basidiomycota		
	<i>Acremonium strictum</i>	AY138482		<i>Phellinus bicuspidatus</i>	AY059022
	<i>Acremonium strictum</i>	AY138485		<i>Phellinus contiguus</i>	AF311029
	<i>Aureobasidium</i> sp.	AY167611		<i>Phellodon melaleucus</i>	AY228355
	<i>Bartalinia laurina</i>	AF382369		<i>Phlebia radiata</i>	AY089740
	<i>Beauveria bassiana</i>	AF280637		<i>Phlebia serialis</i>	AF141629
	<i>Botryosphaeria ribis</i>	AY004336		<i>Phlebopus portentosus</i>	AF336260
	<i>Candida</i> sp.	AF389527		<i>Ramaria pinicola</i>	AF213112
	<i>Ceratocystis moniliformis</i>	AF275499		<i>Ramaria stricta</i>	AF287887
	<i>Chaetosphaeria fusiformis</i>	AF178554		<i>Rhizopogon pumilionus</i>	AY177252
	<i>Clavispora intechensis</i>	AF538871		<i>Rhodotorula sonckii</i>	AY213009
	<i>Cordyceps subsessilis</i>	AF373285		<i>Russula aurantiaca</i>	AF506427
	<i>Corollospora filiformis</i>	AF491256		<i>Scleroderma</i> sp.	AF336271
	<i>Curvularia cymbopogonis</i>	AF163996		<i>Serpula incrassata</i>	AF098401
	<i>Curvularia oryzae</i>	AF163991		<i>Sistotrema brinkmannii</i>	AF506473
	<i>Discula destructiva</i>	AF277136		<i>Trechispora</i> sp.	AF347088
	<i>Fusarium falciforme</i>	AY097326		<i>Trichosporon pullulans</i>	AJ507665
	<i>Fusarium lichenicola</i>	AY097321		<i>Tubulicium vermiculare</i>	AJ406424
	<i>Fusarium solani</i>	AY097316		<i>Vararia insolita</i>	AF518665
	<i>Geotrichum</i> sp.	AY225313		<i>Vararia investiens</i>	AF506484
	<i>Glomerella cingulata</i>	AF543786		<i>Veligaster columnaris</i>	AF336273
	<i>Hypocrea jecorina</i>	AF510497		<i>Vuilleminia comedens</i>	AF518666
	<i>Hypoxyton fragiforme</i>	AY083829		<i>Xerocomus rubellus</i>	AF514829
	<i>Lignicola tropica</i>	AF539474	Chytridiomycota		
	<i>Lignincola longirostris</i>	AF534473		<i>Blastocladiella emersonii</i>	X90411
	<i>Mycosphaerella cryptica</i>	AF309585	Oomycota		
	<i>Nectria ventricosa</i>	AF228361		<i>Achlya ambisexualis</i>	AF218026
	<i>Ophiostoma montium</i>	AY194948		<i>Achlya bisexualis</i>	AF218203
	<i>Penicillium boreae</i>	AF481122		<i>Albugo blitii</i>	AY035543
	<i>Penicillium crustosum</i>	AF484409		<i>Albugo candida</i>	AY035540
	<i>Peziza</i> sp.	AF335171		<i>Albugo tragopogonis</i>	AY035542
	<i>Phialocephala compacta</i>	AF326083		<i>Aphanomyces laevis</i>	AF218198
	<i>Phoma herbarum</i>	AY293790		<i>Apodachlya brachynema</i>	AF218199
	<i>Pichia farinosa</i>	AF335974		<i>Basidiophora entospora</i>	AY035513
	<i>Pichia sydowiorum</i>	AJ508573		<i>Bremia lactucae</i>	AY035507
	<i>Polycephalomyces ramosus</i>	AY259503		<i>Bremia lactucae</i>	AY035512
	<i>Pseudallescheria boydii</i>	AY228123		<i>Bremiella megasperma</i>	AY035516
	<i>Pseudocyphellaria coriacea</i>	AF351149		<i>Dictyucus sterilis</i>	AF218193
	<i>Saagaromyces abonnisi</i>	AF539469		<i>Paraperonospora leptosperma</i>	AY035515
	<i>Terfezia claveryi</i>	AF435823		<i>Peronophytophthora litchii</i>	AY035531
	<i>Trichoderma viride</i>	AY291123		<i>Peronospora alta</i>	AY035493
	<i>Truncatella angustata</i>	AF382383		<i>Peronospora cameliniae</i>	AY035506
	<i>Tuber californicum</i>	AF127120		<i>Peronospora dentariae</i>	AY035505
	<i>Verticillium</i> sp.	AY089746		<i>Phytophthora cambivora</i>	AY035533
Basidiomycota				<i>Phytophthora capsici</i>	AY035532
	<i>Amylostereum chailletii</i>	AF518599		<i>Plasmopara densa</i>	AY035525
	<i>Apiotrichum porosum</i>	AF189833		<i>Plasmopara geranii</i>	AY035520
	<i>Boletus satanas</i>	AF336242		<i>Plasmopara halstedii</i>	AY035523
	<i>Bullera coprosmaensis</i>	AF363660		<i>Plasmopara obducens</i>	AY035522
	<i>Clavulina cinerea</i>	AF335456		<i>Plasmopara viticola</i>	AY035524
	<i>Corticium roseum</i>	U80647		<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	AY035496
	<i>Duportella tristicula</i>	U80649		<i>Pseudoperonospora urticae</i>	AY035495
	<i>Fellomyces distylii</i>	AF363652		<i>Pythiopsis cymosa</i>	AF218172
	<i>Gloeocystidiellum porosum</i>	AF310095		<i>Pythium aquatile</i>	AF218200
	<i>Gloeocystidiellum porosum</i>	AF310091		<i>Pythium</i> sp.	AY035537
	<i>Gymnopaxillus nudus</i>	AY177266		<i>Sclerospora graminicola</i>	AY035514
	<i>Gyroporus castaneus</i>	AF336253		<i>Sclerospora graminicola</i>	AY035513
	<i>Hydnellum aurantiacum</i>	AF347113		<i>Thraustotheca clavata</i>	AF218181
	<i>Hydnellum gracilipes</i>	AY012676	Zygomycota		
	<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	AF352816		<i>Glomus caledonium</i>	AF396794
	<i>Hysterangium stoloniferum</i>	AF336259		<i>Glomus coronatum</i>	AF141739
	<i>Lactarius vellereus</i>	AF325294		<i>Glomus fragilistratum</i>	AF145747
	<i>Lentinellus auricula</i>	AF506415		<i>Glomus geosporum</i>	AF145745
	<i>Peniophora cinerea</i>	AF506424		<i>Glomus geosporum</i>	AJ510241
	<i>Peniophora proxima</i>	U80660		<i>Glomus mosseae</i>	AF396798
				<i>Glomus mosseae</i>	Y07565
				<i>Scutellospora calospora</i>	AJ510231
				<i>Scutellospora pellucida</i>	AF396784

Vazebné místo „reverse“ primeru ITS4 bylo umístěno na seřazené (*aligned*) známé sekvence 28S rDNA různých zástupců jednotlivých skupin hub směrem 3' (*downstream*) od ITS4 na gen pro 28S (obr. 9) v maximálně konzervovaném úseku.



Obr. 9. Diagram vazebných míst primerů ITS4Asco, ITS4Basidio, ITS4Chytridio, ITS4Oo, ITS4Zygo na genu 28S rRNA. Znáznorněny jsou i ITS3GC and ITS5 (White *et al.* 1990). ITS oblast není nakreslena v přesném měřítku (Nikolcheva & Bärlocher 2004).

Pro negativní kontrolu bylo použito sekvencí jaderné rDNA bakterií, cévnatých rostlin, řas (včetně rozsivek) a živočichů. Jako „forward“ primer posloužil ITS5, který byl stejný pro všechny skupiny. Annealingové teploty pro každý pár primerů byly optimalizovány podle výsledků série amplifikačních reakcí uskutečněných s postupným nárůstem teploty vždy o 1 °C od 10 °C pod až 5 °C nad vypočtenou annealingovou teplotou. Reakce poskytnou směs fragmentů ITS různých přítomných druhů hub z každé skupiny o velikosti přibližně 400 párů bazí (bp).

Každá kombinace ITS4 s ITS5 byla otestována s templáty izolovanými z řas a cévnatých rostlin, přičemž v této negativní kontrole nebyl přítomen žádný produkt. Směsi ITS jednotlivých skupin hub byly dále zpracovány metodami T-RFLP a DGGE, které slouží k vytvoření specifického profilu (*fingerprint*) komunity. Oblast ITS se při studiu společenstva dřevokazných tvrdohub (*Pyrenomyces*) ukázala jako citlivější a vhodnější při použití s DGGE než 18S rDNA. Výsledky DGGE analýzy oblasti ITS byly prokazatelně konzistentní s výsledky fylogenetické sekvenční analýzy (Green *et al.* 2004).

Velmi zajímavých výsledků při studiu společenstva hub na kořenovém systému běžné trávy ovsíku vyvýšeného *Arrhenatherum elatius* dosáhl Vandenkoornhuyse *et al.* (2002) použitím universálních primerů označených AU2 (TTTCGATGGTAGGATAGDGG) a AU4 (RTCTCACTAAGCCATTC), které vymezují oblast malé ribosomální podjednotky (SSU rRNA). Ze směsi amplikonů (produktů PCR) byla vytvořena klonová knihovna (viz. klonová knihovna, viz kap. 3.3.2.6.) a 200 náhodně vybraných klonů bylo osekvenováno. Výsledkem bylo 49 různých sekvencí, z čehož pouze 7 se shodovalo (>99% shoda) se známými sekvencemi. Fylogenetická analýza se zbylými 1208 známými sekvencemi hub přiřadila

ostatní sekvence do všech oddělení hub (*Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota*). Neznámé sekvence přitom nejsou považovány za chimérické, protože byly nezávisle nalezeny ve více vzorcích. Také studium společenstva hub tlejícího opadu na dně vodního toku pomocí páru primerů AU2 a AU4 v kombinaci s metodou klonové knihovny (Seena *et al.* 2008) odhalilo mnohem větší diversitu, než jaká byla odhadována podle identifikace spór.

3.3.2.3. Sekvenace DNA

Sekvenace je procedura, při níž je zjišťována sekvence, čili pořadí nukleotidů DNA. Provádí se prostřednictvím modifikované PCR, takzvané sekvenační reakce. Ta se liší od běžné PCR tím, že ve směsi deoxyribonukleosid trifosfátů jsou přítomny dideoxynukleosidy, které náhodně ukončují elongaci řetězce. Každý typ dideoxyribonukleosidu je označen jinou fluorescenční barvou. Výsledkem reakce je směs ampliconů různých délek náhodně ukončených na všech pozicích v daném úseku. Tyto amplicony jsou poté chromatograficky detekovány laserovým paprskem v „sekvenátoru“ a výsledkem je chromatogram (Alberts *et al.* 2002). Zjištěná sekvence bývá obvykle zpracována pomocí softwaru a může posloužit k fylogenetické analýze, nebo může být srovnána se známými sekvencemi v databázích apod.

3.3.2.4. Separační metody

3.3.2.4.1. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je obecná/v principu elektrochemická metoda sloužící k separaci biologických makromolekul (DNA, RNA, proteinů) na základě jejich velikosti (resp. hmotnosti) a náboje. Směsi molekul jsou nanášeny do jamek v gelu (nejčastěji 1-2% agarózovém, případně akrylamidovém) jehož trojrozměrnou síť putují v elektrickém poli (70-120V) různě rychle v závislosti na své hmotnosti. Gelová elektroforéza se používá také k rozdělení produktů PCR a pro kontrolu její úspěšnosti. PCR reakci lze posléze purifikovat od komponent reakční směsi (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). Jednotlivé proužky DNA lze z gelu také jednoduchou procedurou extrahovat (QIAquick Spin Gel Extraction Kit,

Qiagen). Negativně nabitá DNA se pohybuje směrem k anodě (kladná elektroda). Pro vizuální kontrolu pohybu vzorku v gelu a jeho sednutí na dno jamky se přidává takzvaný „loading buffer“ s obsahem barviv (bromfenolová modř, xylencyanolová modř apod.) ve směsi s glycerolem. DNA se v gelu vizualizuje na gelu fluorescenčním interkalačním barvivem (ethidium bromid, SYBR-green) na transiluminátoru při vlnové délce okolo 300nm. Fragmenty o různé velikosti se pod UV lampou projeví jako zářící proužky („bandy“). Ke vzorkům se na gel nanáší žebřík „ladder“ - genomová fágová DNA restrikcí štěpená na fragmenty o známé velikosti, která slouží jako měřítko. Laddery o různých délkách je možné vlastnoručně vyrobit, nebo koupit od komerčních výrobců.

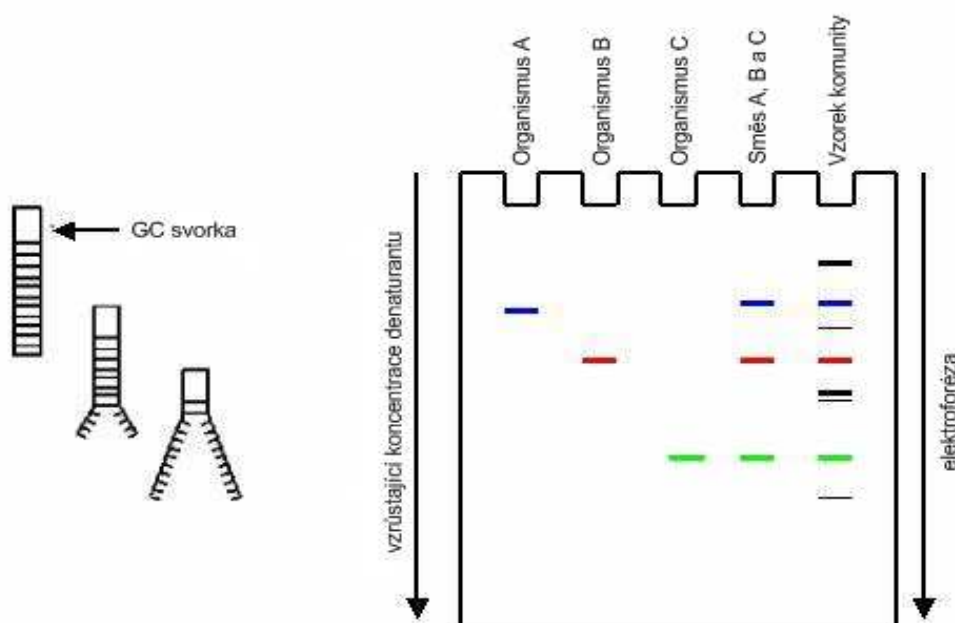
3.3.2.4.2. DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je metoda kombinující přednosti klonování, sekvenování a T-RFLP (viz. kap. 3.3.2.5.). Požadovaný gen přítomný v genomu všech členů komunity je zaměřen vhodnými primery a amplifikován prostřednictvím PCR. Pokud se geny u různých druhů podstatně liší velikostí, lze je oddělit obyčejnou elektroforézou. Rozdíly mezi druhy nebo kmeny mohou ale spočívat jen v bodových mutacích. Dvouvláknové sekvence DNA, které se neliší délkou ale složením bazí nelze běžnou elektroforézou oddělit. DGGE využívá odlišnou schopnost takových fragmentů denaturovat (rozdělit dvouvláknovou DNA na jednovláknovou) k separaci na polyakrylamidovém gelu obsahujícím vzrůstající gradient chemického denaturačního činidla. Sekvence odlišující se bazovým složením denaturují na různých pozicích v gelu. Počet proužků na gelu (ribotypů) vypovídá o diversitě genů v původním vzorku (Obr. 11 a 12). Praktická výhoda oproti T-RFLP je možnost vyizolovat a osekvenovat DNA z každého proužku a tudíž identifikovat všechny geny ve vzorku porovnáním sekvencí se sekvencemi zveřejněnými v databázi GenBank (Nikolcheva & Bärlocher 2005). Produkt PCR musí být pro DGGE upraven modifikovaným primerem. V konkrétním případě se jedná o primer ITS3GC, který je modifikován 40-50ti bazovým převisem (GC tail) guanosinu a cytosinu. Použitím produktu první PCR jako templátu pro PCR s páry primerů ITS3GC a ITS4 („nested“ primery a „nested“ PCR) získáme kratší fragment uvnitř produktu první PCR (Obr. 3). Tento fragment bude prostřednictvím ITS3GC opatřen koncovou „GC svorkou“ (GC clamp), která má při DGGE zabránit úplné denaturaci vláken a je nezbytná pro optimální

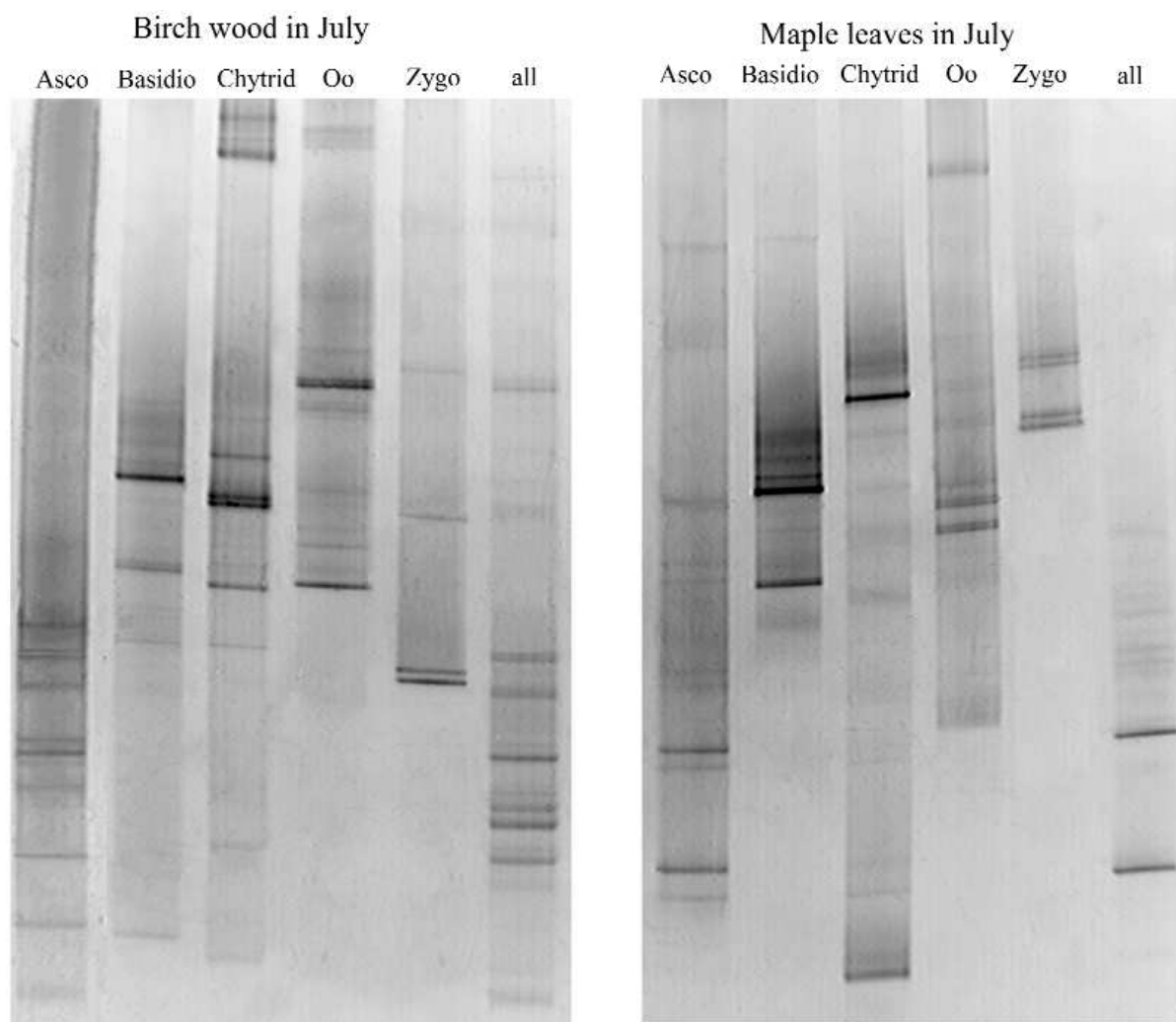
rozlišení fragmentů v denaturačním gradientu. Vzorec „bandů“ na gelu poskytuje profil populace, ve kterém relativní intenzita každého „bandu“ a jeho pozice na gelu představuje relativní hojnost určitého druhu v populaci (Muyzer *et al.* 1993). Z čistých kultur hub, které byly současně kultivovány na živných médiích, lze připravit srovnávací „ladder“ pro DGGE (Obr. 10). Pomocí takového „ladderu“ je možné identifikovat velkou část hub ze vzorku podle pozic bandů, což ušetří mnoho času a financí potřebných k jejich sekvenaci. Další identifikace by byla nutná jen u druhů detekovaných DGGE, jež neodhalila kultivační technika. Zpracováním fotografie gelu speciálním softwarem (NIH image), lze získat představu o relativním zastoupení druhů ve vzorku. Intenzita bandů v každém pruhu vypovídá o poměru jednotlivých druhů vzhledem k celkové intenzitě pruhu (Nikolcheva & Bärlocher 2004). Analýza pomocí DGGE je úspěšně používána ke studiu diversity společenstev mikroorganismů a hub. Kritický bod rozhodující o dostatečném taxonomickém rozlišení je především vhodný výběr oblasti DNA pro amplifikaci resp. navrzení vhodných primerů (Green *et al.* 2004). Přímá amplifikace vzorku DNA s GC- modifikovanými primery se neukázala jako dostatečně účinná. Nested PCR značně zvyšuje citlivost detekce druhů v prostředí (Oros-Sichler *et al.* 2006).

Analogická procedura je TGGE (temperature gradient gel electrophoresis), při níž je gradient chemického denaturantu nahrazen gradientem teplotním.

Další metoda analogická DGGE je „Single strand conformational polymorphism“ (SSCP). Rozdílná rychlost pohybu v elektrickém poli je přitom dána odlišnou trojrozměrnou strukturou, kterou utvoří jednotlivé řetězce DNA, jsou-li od sebe odděleny.



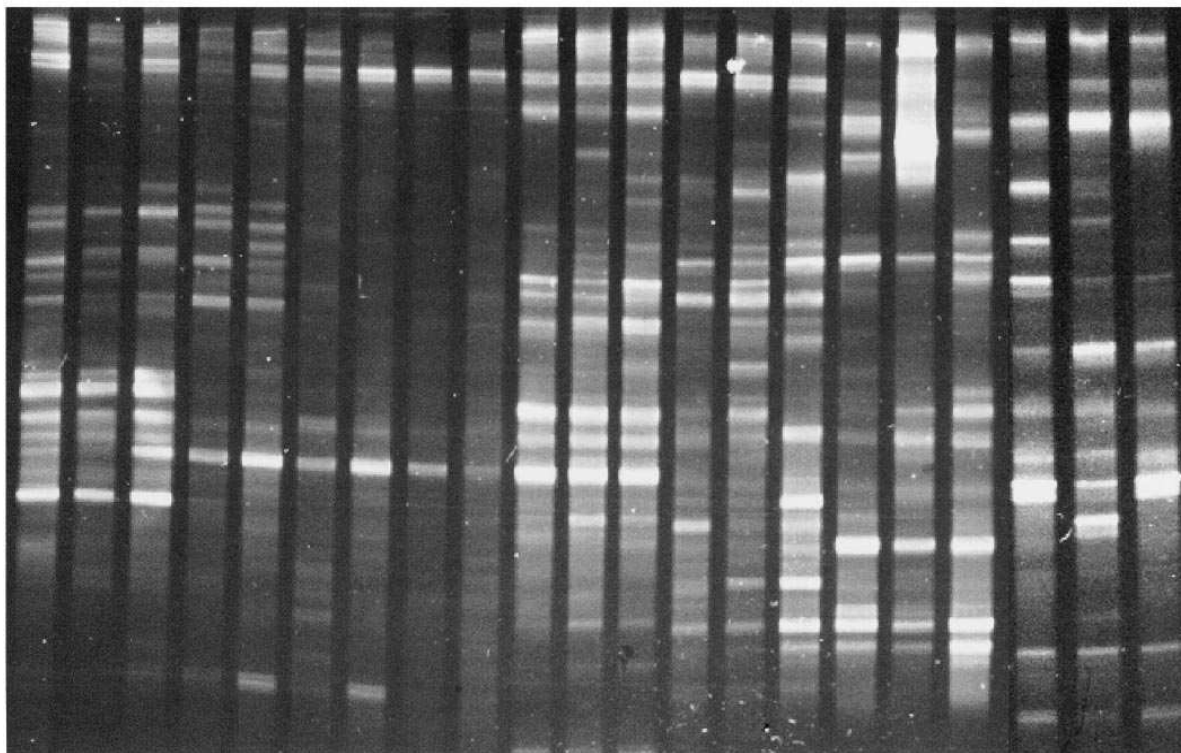
Obr.10. Princip DGGE a vytvoření srovnávacího „ladderu“. (<http://www.microbe.com/picts/GC-gel.jpg>)



Obr. 11. DGGE z DNA izolované z březového dřeva a javorových listů ponořených do potoka v průběhu července a amplifikované pomocí skupinově specifických primerů. Pruh označený “all” představuje amplifikaci stejného templátu pomocí ITS4 a ITS5. (Nikolcheva & Bärlocher 2004)

Pomocí DGGE je možné provádět i širší analýzy daného ekosystému. *Das et al.* (2007) odhalil při takové studii, která na tlejících listech mimo hub detekovala i ostatní mikroorganismy, celkem 33 druhů hub, 30 bakterií a 18 aktinomycet. Na listech javoru a dubu přitom byly pozorovány jisté rozdíly v zastoupení jednotlivých druhů. Tužší dubové s vyšším obsahem ligninu listy zřejmě potřebují rozmanitější složení společenstva dekompozitorů. Na základě toho je dobré poukázat na fakt, že pro pochopení role mikromycet v ekosystému je důležité analyzovat vztahy s ostatními mikroorganismy.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21



Obr. 12. PCR-DGGE profily 16S rDNA komunity mikroorganismů z fylosféry devíti různých plodin. Pruhy: 1-3, OroBlanco; 4-6, pomerančovník Valencia ; 7-9, pomerančovník Navel; 10-12, bavlník; 13-15, kukuřice; 16-18, cukrová řepa; 19-21, fazol obecný. (Yang *et al.* 2001)

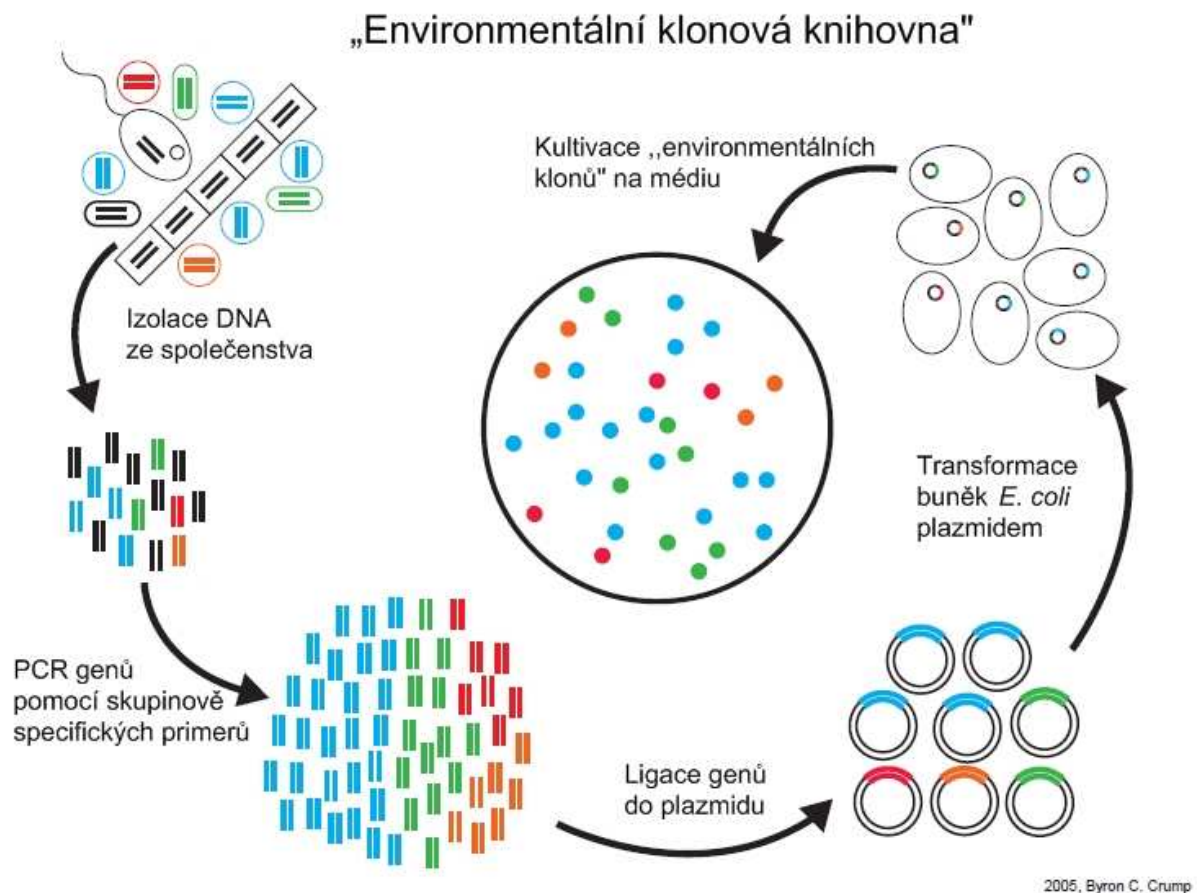
3.3.2.5. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP)

T-RFLP je velmi výkonná technika vyvinutá bakteriální ekologií. Při T-RFLP je izolovaná DNA amplifikována s jedním či oběma primery fluorescenčně označenými na 5' konci. Produkt PCR je následně zpracován restrikčním enzymem a označené koncové fragmenty jsou separovány a detekovány DNA sekvenátorem. Počet fragmentů různé velikosti poskytuje představu o minimálním počtu druhů přítomných v analyzovaném společenstvu. Vzorec fragmentů získaných při T-RFLP může být porovnán s délkou fragmentů získaných stejnou procedurou z čistých kultur.

Tato metoda nemůže být použita k identifikaci rodů či druhů hub, nicméně je schopna poskytnout dobrou představu o druhové rozmanitosti hub v substrátu (Nikolcheva & Bärlocher 2005).

3.3.2.6. Klonová knihovna

Části DNA společenstva naamplifikované PCR pomocí skupinově specifických je možné použít v vytvoření takzvané „genové knihovny“. Princip této metody spočívá v zaklonování, čili vnesení úseku DNA do bakterií prostřednictvím plasmidové transformace. Bakterie, nejčastěji laboratorní kmen *E. coli*, nesoucí tyto geny se kultivují na živných médiích, čímž jsou produkty PCR namnoženy (Obr. 13).



Obr. 13. Vytvoření „environmentální“ klonové knihovny.
(<http://hpl.umces.edu/faculty/bcrump/CloneLibrary.pdf>)

Výsledkem kultivace transformovaných bakterií je komunita bakterií se stejnou diversitou zkoumaného genu, jakou mělo původní společenstvo ve vzorku substrátu. Tato procedura navíc znásobí množství všech ribotypů, tedy i takových, které by bylo v původním vzorku obtížné detekovat. Představu o frekvenci výskytu konkrétních skupin hub ve společenstvu, která je založená na jejich poměrném zastoupení v celkovém „DNA pool“ kultury, získáme fylogenetickou analýzou náhodně vybíraných zaklonovaných sekvencí,

příčemž všechny sekvence, které se vzájemně liší o 1% a méně, jsou považovány za stejný druh (OTU – Operational Taxonomic Unit). Teoreticky by měl tento přístup poskytnout mnohem větší rozlišení a jednoznačné druhové zařazení. Při DGGE i T-RFLP se mohou různé sekvence, jejichž homogenitu je možné odhalit pouze další analýzou, projevit jako tentýž signál. Analýza klonové knihovny může poskytnout bližší představu o zastoupení jednotlivých druhů a poddruhů a o tom, jak jednotlivé druhy ovlivňují druhovou diversitu (Seena *et al.* 2008).

3.3.2.7. Oligonukleotidový fingerprinting rRNA genů (OFRG)

OFRG (Oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes) je metoda založená na principu hybridizace produktů PCR k sérii oligonukleotidových sond, které jsou sekvenčně homologní k hledané cílové sekvenci DNA. DNA sondy mohou být krátké oligonukleotidy, nebo fragmenty dlouhé až několik set párů bazí a jsou označeny radioizotopem nebo fluorescenčním barvivem. Sondy mohou být použity k detekci specifických sekvencí ve vzorcích DNA i RNA (cDNA). V případě OFRG se používá technika „array“, při které z produktu PCR (směs amplikonů SSU rDNA) vytvoří klonová knihovna. Naklonované fragmenty (obvykle 1504 klonů) se navážou na nylonovou membránu působením tepla nebo UV záření. Vytvoří se sondy, které nesou navázané fluorescenční barvivo. Jejich sekvence se navrhuje podle druhově specifických úseků známých sekvencí dříve určených hub. Roztoky s obsahem jednotlivých sond se nanáší na membránu. Pokud je ve vzorku přítomna sekvence komplementární sondě, sonda se k ní pevně naváže. Poté se roztok se vypláchne a pokud sonda zůstane při hybridizaci ke specifické sekvenci, projeví se s různou intenzitou jako pozitivní, negativní nebo neurčitý signál. Sondy lze ze vzorku zpět uvolnit a sérií takovýchto hybridizačních pokusů lze získat představu o přítomnosti jednotlivých druhů ve vzorku. Výsledkem je specifický „fingerprint“ například společenstva půdních hub (Valinsky *et al.* 2002).

OFRG analýza například odhalila mimo řady bakterií také nečekaně velkou diversitu hub ve střevech myší. Téměř 300 klonů odpovídalo Askomycetám z rodů *Acremonium*, *Alternaria*, *Monilinia* a *Fusarium*. Bazidiomycetám rodu *Filobasidium*, *Cryptococcus* a *Scleroderma* odpovídalo 69 klonů. 216 klonů bylo nejbližší Chytridiomycetám a Zygomycetám (Scupham *et al.* 2006). Hlavní výhody této techniky spočívají ve vysoké

citlivosti, možnosti rychlého zpracování velkého počtu vzorků a v tom, že lze vypustit četné sekvenace.

4. Závěr

Pomocí uvedených metod, konkrétně PCR - DGGE s použitím skupinově specifických primerů lze dosáhnout zajímavých výsledků při analýze různých prostředí. Velký potenciál nabízí metoda klonové knihovny, obzvláště pak v kombinaci s citlivou detekcí prostřednictvím arraye.

Za přínosné bych považoval porovnat nejen výsledky metod klasických s metodami molekulárními, ale také výsledky různých molekulárních metod vzájemně. Nikolcheva a Bärlocher (2004) například odhalili nečekaně velkou diversitu hub v opadu na dně toku použitím sady primerů ITS4. Seena, Wynberg a Bärlocher (2008) odhalili v tomtéž prostředí ještě mnohem více organismů, když použili primery AU2 a AU4 v kombinaci s klonovou knihovnou. Osobně bych vzájemně porovnal například výslednou diversitu zjištěnou pomocí primerů ITS4 a primerů AU2 a AU4 ve stejném vzorku. Také různé metody sběru vzorků a izolace DNA by mohly přinést odlišné výsledky. Ze statistického hlediska by například bylo dobré odebírat současně listy z různých částí fylosféry.

Fyloplán rostlin zasažených patogenní houbou představuje velice zajímavý ekosystém, jenž lze tradičními mykologickými metodami. Tyto metody jsou sice léty ověřené, nicméně mají určité hranice, které touto klasickou cestou nelze překonat. Nové techniky molekulární biologie, vyvinuté při studiu diversity bakterií v přirozeném prostředí a modifikované pro eukaryotní organismy, poskytují jedinečnou možnost nahlédnout do složitého ekosystému mikroskopických hub z jiného úhlu. Kombinace molekulárních dat získaných z několika gramů substrátu s terénními daty získanými z mnohem větší oblasti je hlavním cílem studia ekologie hub (Schmit & Lodge 2005). Molekulární data doplňují data získaná tradičně, naproti tomu molekulární diagnostika nemůže bez správně určených vzorků fungovat. Za ideální cestu lze tedy považovat vzájemnou synchronizaci tradičního a molekulárního přístupu.

Pokud by důkladná analýza mikromycet ve fyloplánu napadeného stromu odhalila odlišnosti v druhové skladbě, mohli bychom na základě nich získat zajímavou představu o úloze konkrétních mikromycet v tomto ekosystému, o vzájemných vztazích mezi patogenem,

roślinou a povrchovou mykoflorou listů. Srovnáváním podobných studií různých ekosystémů bychom pak získali lepší představu o úloze hub v biosféře.

5. Použitá literatura

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th ed.: 1275-1320

Atkins S. D., Clark I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.* 45(1): 3-15

Bills G. F., Foster M. S. (2004) *Formulae for Selected Materials Used to Isolate and Study Fungi and Fungal Allies. Biodiversity of Fungi. Elsevier. Part III - Appendix II.: 595-618*

Calan B. E., Carris L. M. (2004) *Fungi on Living Plant Substrata Including Fruits. Biodiversity of Fungi. Kap. 7: 105-126. Elsevier.*

Chesson P. (1994) Multispecies Competition in Variable Environments. *Theoretical Population Biology* 45(3): 227-276

Das M., Royer T. V., Leffl L. G. (2007) Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3): 756–767

Epstein L., Nicholson R. L. (1997) Adhesion of Spores to Plant Surfaces. *The Mycota V. - A* : 11-25. Springer

Fonseca Á., Inacio J. (2006) Phylloplane Yeasts. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook.: 263-301. Springer Berlin Heidelberg*

Geiser D. M., Klich M. A., Frisvad J. C., Peterson S. W., Varga J., Samson R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1–10

Gibbs J. (1999) Dieback of Pedunculate Oak. Forestry Commission Information Note 22: 1-6 Forestry Commission, Edinburgh

Gibbs J., Grieg B. J. W. (1997) Biotic and abiotic factors affecting the dying-back of pedunculate oak *Quercus robur* L. *Forestry* 70: 399-406

Gordon T. R., Duniway J. M. (1982) Effects of Powdery Mildew Infection on the Efficiency of CO₂ Fixation and Light Utilization by Sugar Beet Leaves. *Plant Physiol.* 69: 139-142

Green S. J., Freeman S., Hadar Y., Minz D. (2004) Molecular tools for isolate and community studies of Pyrenomycete fungi. *Mycologia.* 96(3): 439-451. The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897

Heuser T., Zimmer W. (2002) Quantitative analysis of ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters* 209: 295-299

Hodges L. R., Rose L. J., Peterson A., Noble-Wang J., Arduino M. J. (2006). Evaluation of a Macrofoam Swab Protocol for the Recovery of *Bacillus anthracis* Spores from a Steel surface. *Applied and Environmental Microbiology* 72(6): 4429–4430

- Inácio J., Pereira P., de Carvalho M., Fonseca Á., Amaral-Collac M. T., Spencer-Martins I.** (2002) Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44: 344-353
- Kennedy N., Clipson N.** (2003). Fingerprinting the fungal community. *Mycologist* 17(4): 158-164
- Kiss L., Nakasone K.** (1998) Ribosomal internal transcribed spacer sequence do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. *Current Genetics* 33: 362-367. Springer-Verlag 1998
- Leventin E., Dorsey K.** (2006) Contribution of leaf surface to the air spora. *Aerobiologia* 22: 3-12
- Lindow S. E., Brandl M. T.** (2003) Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 1875-1883
- Magyarosy A. C., Schurmann P., Buchanan B. B.** (1976) Effect of Powdery Mildew Infection on Photosynthesis by Leaves and Chloroplasts of Sugar Beets. *Plant Physiol.* 57: 486-489
- Martin K. J., Rygiewicz P. T.** (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5:28
- McCormack P. J., Wildman H. G., Jeffries P.** (1994). Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane - Inhabiting Yeasts and Yeastlike Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 927-931
- Möhlenhoff P., Müller L., Gorbushina A. A., Petersen K.** (2001) Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters* 195: 169-173
- Mueler G. M., Bills G. F., Foster M. S.** (2004). Biodiversity of Fungi – Inventory and Monitoring Methods. Elsevier
- Muyzer G., De Waal E. C., Uitierlinden A. G.** (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 659-700
- Nicot P. C., Bardim M., Dik A. J.** (2002) Basic Methods for Epidemiological Studies of Powdery Mildews: Culture and Preservation of Isolates, Production and Delivery of Inoculum, and Disease Assesment. *The Powdery Mildews – A Comprehensive Treatise*: 83-99. The American Phytopathological Society, St Paul. Minnesota

- Nikolcheva L.G., Bärlocher F.** (2004). Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycological Progress* 3(1): 41-49
- Nikolcheva L.G., Bärlocher F.** (2005). Molecular Approaches to Estimate Fungal Diversity. I. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, 169 – 176. M.A.S. Graça, F. Bärlocher & M.O. Gessner (eds.). Springer
- Nikolcheva L.G., Bärlocher F.** (2005). Molecular Approaches to Estimate Fungal Diversity. II. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, 177 – 184. M.A.S. Graça, F. Bärlocher & M.O. Gessner (eds.). Springer
- Nikolcheva L.G., Cockshutt A.M., Bärlocher F.** (2003). Determining Diversity of Freshwater Fungi on Decaying Leaves: Comparison of Traditional and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 69(5): 2548–2554
- Nix-Stohr S., Moshe R., Dighton J.** (2008) Effects of Propagule Density and Survival Strategies on Establishment and Growth: Further Investigations in the Phylloplane Fungal Model System. *Microbial Ecology* 55: 38–44
- Oros-Sichler M., Gomes N.C.M., Neuber G., Smalla K.** (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* 65: 63–75
- Schena L., Finetti Sialer M., Gallitelli D.** (2002). Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Dis.* 86: 54-60.
- Schmit J.P., Lodge D.J.** (2005) Classical Methods and Modern Analysis for Studying Fungal Diversity. Dighton J. et. al. *The Fungal Community: Its Organisation and Role in the Ecosystem* 3rd ed. Kapitola 10: 193-214
- Scupham A. J., Presley L. L., Wei B., Bent E., Griffith N., McPherson M., Zhu F., Oluwadara O., Rao N., Braun J., Borneman J.** (2006) Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1): 793–801
- Seena S., Wynberg N., Bärlocher F.** (2008) Fungal diversity during leaf decomposition in a stream assessed through clone libraries. *Fungal Diversity* 30: 1-14
- Seifert K.A.** (2008) Integrating DNA barcoding into the mycological sciences. *Inoculum* 59 (6): 2–6.
- Sullivan R. F., White J. F., JR.** (2000). *Phoma glomerata* as a Mycoparasite of Powdery Mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1): 425–427
- Takamatsu S., Braun U., Limkaisang S., Kom-Un S., Sato Y., Cunnington J. H.** (2007) Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides sensu lato*. *Mycological Research*. 111: 809 – 826

Taylor P. E., Glovsky M. M., Esch R., Flagan R. C. (2004). Identification of high concentrations of an allergenic yeast in the Pasadena aerosol. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(2-Supplement 1): S232-S233

Valinsky L., Vedova G. D., Jiang T., Borneman J. (2002) Oligonucleotide Fingerprinting of rRNA Genes for Analysis of Fungal Community Composition *Appl Environ Microbiol.* 68(12): 5999–6004.

Vandenkoornhuyse P., Baldauf S. L., Leyval C., Straczek J., Young J. P. W. (2002). Extensive Fungal Diversity in Plant Roots. *Science* 295: 2051

Vogel J., Somerville S. (2002). Powdery mildew of Arabidopsis: A model for Host-Parasite Interactions. *The Powdery Mildews – A Comprehensive Treatise*: 83-99. The American Phytopathological Society, St Paul. Minnesota

Wang Q.-M., Jia J.-H., Bai F.-Y. (2008). Diversity of basidiomycetous phylloplane yeasts belonging to the genus *Dioszegia* (Tremellales) and description of *Dioszegia athyri* sp. nov., *Dioszegia butyracea* sp. nov. and *Dioszegia xingshanensis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 391-399.

Widden P. (1997) Competition and the Fungal Community. *The Mycota IV.*: 135-147. Springer

Yang C.-H., Crowley D. E., Borneman J., Keen N. T. (2001) Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *PNAS* 98(7): 3889-3894