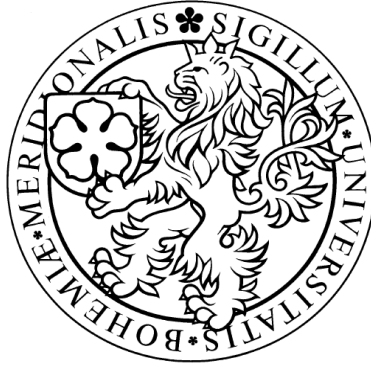


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Využití DGGE k popisu interakce mezi padlí dubovým  
*Erysiphe alphitoides* a společenstvem mikromycet ve  
fytoplánu dubů letních.**

Diplomová práce

**Bc. Jan Michálek**

Školitelka: Ing. Miloslava Kavková, PhD.

České Budějovice 2012

Michálek, J., 2012: Využití DGGE k popisu interakce mezi padlí dubovým *Erysiphe alphitoides* a společenstvem mikromycet ve fyloplánu dubů letních. [Employment of DGGE to describe an interaction between the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* and a community of micromycetes in phylloplane of pedunculate oaks. Mgr. Thesis, in Czech.] – 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

*Erysiphe alphitoides* is a worldwide distributed causal agent of the oak powdery mildew. This work deals with using molecular methods to study the community of micromycetes on the leaves of pedunculate oaks invaded with parasitic fungus.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25. 4. 2012

Jan Michálek

## Poděkování

V první řadě bych rád velice poděkoval svojí školitelce Miloslavě Kavkové, která se úlohy mojí školitelky zhostila s lidskostí a bezbřehou trpělivostí. Velký dík patří Doc. Oborníkovi za poskytnutí zázemí a finanční podpory, členům Laboratoře molekulární taxonomie (Parazitologický ústav AVČR) za příjemné a podnětné prostředí, paní doktorce Chroňákové a členům Laboratoře půdní mikrobiologie (Ústav půdní biologie AVČR) za ochotnou pomoc s DGGE. Děkuji své rodině, přítelkyni a kamarádům za všestrannou podporu a inspiraci.

# Obsah

---

1. Úvod	1
2. Teorie	2
<b>2.1. <i>Erysiphe alphitoides</i></b>	2
2.1.1. Patogeneze	3
<b>2.2. Mikrobiální ekologie fyloplánu</b>	5
2.2.1. Životní strategie mikromycet	6
2.2.2. <i>Erysiphe alphitoides</i> a složení společenstva	7
<b>2.3. Metodický přístup ke studiu společenstev</b>	7
2.3.1. Klasické metody	7
2.3.2. Molekulární metody	8
2.3.2.1. Izolace DNA	8
2.3.2.2. Molekulární markery	10
2.3.2.3. DGGE	11
3. Cíle práce	13
4. Metodika	14
<b>4.1. Vzorky</b>	14
<b>4.2. CFU</b>	16
<b>4.3. Kultivace</b>	16
<b>4.4. Molekulární zpracování vzorků</b>	19
4.4.1. Izolace DNA	19
4.4.2. Primery	20
4.4.3. PCR	21
4.4.4. DGGE	22
4.4.4.1. Příprava DGGE	22
4.4.4.2. Standard	24
4.4.4.3. Optimalizace DGGE	25
4.4.4.4. Zpracování a vyhodnocení gelu	27
4.4.4.5. Reamplifikace a sekvenace	27
4.4.4.6. Softwarová analýza programem GelCompar II <sup>®</sup>	27



5. Výsledky	30
<b>5.1. CFU</b>	30
<b>5.2. Kultivace</b>	30
<b>5.3. Sekvence kultur</b>	30
<b>5.4. DGGE</b>	31
5.4.1. Reamplifikace a sekvenace	34
5.4.2. Softwarová analýza	34
6. Diskuze	38
7. Shrnutí	41
8. Literatura	42
9. Příloha	

# 1. Úvod

---

Padlí dubové *Erysiphe alphitoides* je v současnosti světově nejrozšířenějším parazitem dubů (Takamatsu *et al.* 2007). Parazitická houba napadá především semenáčky a menší stromky a silně narušuje jejich životaschopnost. Invazní charakter rozšíření *E. alphitoides* v Evropě má na svědomí značné škody v oblasti lesního hospodářství, kde se v případě dubů letních začalo mluvit dokonce o vymírání (Gibbs 1999). Doposud však nebyly popsány příčiny natolik velké úspěšnosti tohoto patogenu. Některé práce se zabývají biotickými i abiotickými faktory, které se na infekci podílejí (Gibbs a Grieg 1997, Marçais *et al.* 2010) včetně vlivu hyperparazitů (Sullivan a White 2000, Kiss *et al.* 2004). Řada studií shrnuje poznatky o fylogenetické a populační struktuře druhového komplexu *E. alphitoides s. lato.* (Takamatsu *et al.* 2007, Mougou *et al.* 2008, Mougou-Hamdane *et al.* 2010, Desprez-Loustau *et al.* 2011). Neexistuje však studie, jenž by popisovala vztah mezi patogenem a společenstvem mikromycet (mikroskopických hub) specifickým pro fyloplán (celková plocha povrchu listů) dubu letního. Účelem této práce bylo nahlédnout prostřednictvím nástrojů molekulární ekologie do komplexního vztahu mezi infekcí a složením společenstva na povrchu napadených, respektive zdravých listů, a zvážit ho jako další biotický faktor.

## 2. Teorie

---

### 2.1. *Erysiphe alphitoides*

*Erysiphe alphitoides* čili padlí dubové patří k čeledi *Erysiphaceae* (moučnatkovité, *Erysiphales*, *Leotiomyces*, *Ascomycota*), která sdružuje 22 rodů (400 druhů, 9838 krytosemenných hostitelů) obligátně biotrofních ektoparazitických mikromycet. Většina z nich představuje závažné fytopatogeny kulturních rostlin, jakými je například *Blumeria graminis* (padlí travové – obilniny), *Uncinula necator* (padlí révové – réva vinná) nebo rod *Podosphaera* (růžovité). V posledních několika desítkách let také selhává ochrana plodin před touto skupinou patogenů. Je popsána jejich rezistence vůči fungicidům z řady analogů strobilurinů (QoI - *Quinone outside inhibitors*, inhibitory cytochrom c – oxidoreduktázy) založená na několika specifických i nespecifických mutacích cytochromu b (Lesemann *et al.* 2006, FRAC 2007, Fernández-Ortuño *et al.* 2008).

Rod *Erysiphales* je dále charakterizován tvorbou vrstvy mycelia na povrchu listů a plodů hostitelských rostlin. Mycelium získává živiny prostřednictvím parazitických haustorií zanořených do epidermálních buněk rostlin. Pro *Erysiphales* je také typická rozmnožovací strategie založená na silné produkci nepohlavních spór (konidií) v průběhu celé vegetační sezóny a ke konci sezóny tvorbou kulovitých útvarů (chasmothecií, kleistothecií) nesoucích vřevka (aska) s přezimujícími pohlavními spórami.

*Erysiphe alphitoides sensu lato* představuje rozsáhlý komplex druhů napadajících stromy čeledi *Fagaceae* (bukovité) s různě širokou specificitou. Úroveň specificity k hostiteli se mezi druhy značně liší (Callan a Carris 2004). *Erysiphe alphitoides s. stricto* napadá přednostně dub letní *Quercus robur*. Podíl *E. alphitoides* (dříve *Microsphaera alphitoides*, *Microsphaera quercina*) na vymírání dubů letních byl poprvé popsán koncem dvacátých let dvacátého století (Day 1927). Recentní fylogenetické práce odhalují blízkou příbuznost *E. alphitoides s. lato* s tropickými druhy padlí, konkrétně *Oidium mangiferae* (Limkaisang *et al.* 2006). Rod *Oidium* je označením pro nepohlavní stádium – anamorfu rodu *Erysiphe*.

Rod *Quercus* zahrnuje zhruba 600 druhů a mezi některými druhy, jako například mezi *Q. robur* a *Q. petraea*, vzniká celé spektrum mezidruhových hybridů. Mezi druhy *Q. hypoleucoides*, *Q. scytophylla* a *Q. sideroxyla* v Mexiku byla dokonce popsána trojitá hybridní zóna (Peñaloza-Ramírez *et al.* 2010).

Fenologie dubu v kombinaci s faktory prostředí pravděpodobně hraje značnou roli v patogenezi padlí dubového, protože *Q. petraea* bývá málokdy napaden a to i v těsné blízkosti silně napadeného *Q. robur* (Gibbs & Grieg 1997, Gibbs 1999, vlastní pozorování). Značný podíl na životaschopnosti dubů nese také složení velice komplexního společenstva mykorhizních hub v kořenovém systému (Trocha *et al.* 2010). Kromě toho existuje podezření, že na roznášení infekce se částečně podílí obaleč dubový *Tortrix viridana* (Gibbs 1999).

### 2.1.1. Patogeneze

První známky infekce *E. alphitoides* se objevují časně z jara, krátce po vyrašení listů. Houba se projevuje jako moučnaté bílé terčky mycelia, které se postupně rozrůstají v souvislý myceliální povlak hlavně na horním povrchu listů (obr 1.). Přezimující askospory klíčí na jaře v podobě septovaného větveného hyalinního tenkostěnného mycelia. Hyfy o šířce 3-7  $\mu\text{m}$  jsou k epidermis listu přichyceny lalokovitými apresorii o průměru 6-10  $\mu\text{m}$ , ze kterých do epidermálních buněk vyrůstají váčkovitá haustoria.

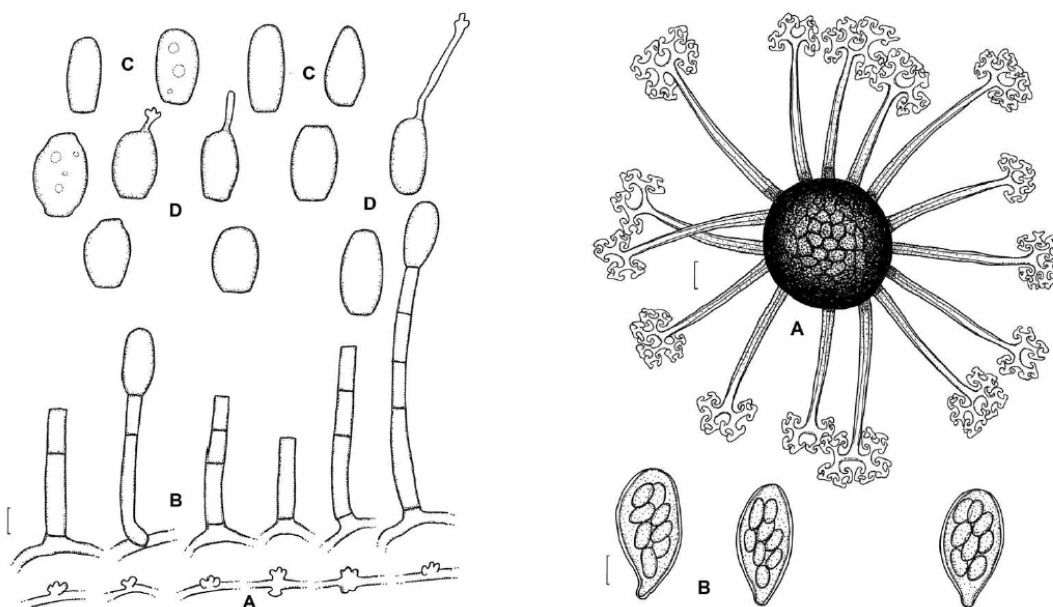


---

**Obr. 1.** Detail mladého dubu letního *Quercus robur* silně napadeného padlí dubovým *Erysiphe alphitoides*. (Vlastní fotografie 2010).

Většinu vegetační doby tráví houba v podobě anamorfy (nepohlavního stádie) dříve zařazené pod jménem *Oidium quercinum* do umělé skupiny imperfektních hub *Deuteromycotina*. Již v počátcích infekce vyrůstají z mycelia vertikální cylindrické konidiofory (nepohlavní plodnice), z nichž se terminálně odlamují vejčité elipsovité konidie s oblým vrcholem o velikosti kolem 25-45 x 13-25  $\mu\text{m}$  (obr. 2.). Silná produkce konidií a jejich šíření větrem přispívá v počátku sezóny k rychlé kolonizaci všech dostupných hostitelských stromů. Mycelium zpočátku roste na svrchní straně listu aby později pokrylo většinu jeho plochy. Zpravidla nejsilněji bývají zasaženy semenáčky a menší zastíněné nebo jinak oslabené stromky. Houbám obecně svědčí vysoká vlhkost, ale patrně díky haustoriím na ni *E. alphitoides* není vázána, a největší škody působí v oblastech s horkými léty a nízkým srážkovým úhrnem (Yarwood 1973 in Callan a Carris 2004).

Na podzim se na myceliu formují kulatá, zprvu žlutohnědá, později černá teleomorfní (pohlavní) askomata označovaná jako kleistothecia nebo chasmothecia. Z kleistothecií ekvatoriálně vyrůstají větvené appendixy (přívěsky). Morfologie appendixů je druhově specifická a představuje důležitý taxonomický znak. Kleistothecia jsou značně variabilní ve velikosti (75-140  $\mu\text{m}$ ) a obvykle nesou 4-15 váčkovitých vřecek.



**Obr. 2.** Vlevo: anamorfa (nepohlavní fáze) *E. alphitoides* čili *Oidium quercinum*. Na obrázku je možné vidět aporesoria (A), konidiofory(B), primární konidie(C) a klíčící sekundární konidie (D). Meřítko – 10  $\mu\text{m}$ . Vpravo: teleomorfní (pohlavní fáze) plodnička kleistothecium (chasmothecium) (A), vřečka obsahující askospory (B). Meřítko – 25  $\mu\text{m}$  (kleistothecium), 10  $\mu\text{m}$  (vřečka). Autor: U. Braun. (Takamatsu *et al.* 2007).

Vřečka (aska) o velikosti 40-80 x 30-55  $\mu\text{m}$  obsahují vždy 6-8 široce vejčité elipsovité bezbarvé askospor. Uvedené znaky teleomorfních struktur vykazují určitou plasticitu v závislosti na vnějších faktorech prostředí (Marçais *et al.* 2010). Způsob, jakým askospory nebo kleistothecia přečkávají zimu, nebyl zatím objasněn.

Padlí intenzivně narušuje transpiraci a fotosyntézu (Magyarosy *et al.* 1979, Gordon a Duniway 1982), což vede k hypertrofii a deformaci listů. Charakteristické je také zpomalení růstu stromů a důsledkem toho keřovitý habitus.

## 2.2. Mikrobiální ekologie fyloplánu

Pojmem fyloplán míníme celkový úhrn plochy listů rostliny. Fylosféra je definována prostorem, ve kterém se vyskytují listy a tím je v případě stromů jejich koruna. Povrch listů rostlin představuje podle Lindowa a Brandlové (2003) jeden z největších ekosystémů na zemi o celkové ploše okolo  $6,4 \times 10^8 \text{ km}^2$ . Pro mikroorganismy představuje povrch listu nehostinné, vysoce stresové a nestabilní prostředí. Společenstvo mikromycet a ostatních mikroorganismů musí na povrchu listů odolávat především prudkým změnám teploty, vlhkosti a dostupnosti výživy (Widden 1997). Úspěšnost v kompetičním nebo konkurenčním vztahu je zde dána nejen vlastnostmi samotného organismu, ale také faktory, jakými jsou přítomnost živin, vlhkost, druh a stáří rostliny, přítomnost látek inhibujících růst nebo poměr mezi přichozími, produkovanými a odchozími propagulemi (Nix-Stohr *et al.* 2008). Jako v každém prostředí i zde lze pozorovat pestrou škálu adaptací a životních strategií umožňujících přežití v extrémních podmínkách (viz kap. 2.2.1.).

Mikromycety mohou být na listech přítomny ve formě spór, metabolicky aktivního mycelia produkujícího spóry nebo častěji v podobě sterilního (nevytvářející spóry) mycelia nebo také jako kvasinky (metabolicky aktivní jednobuněčné houby). Spóry velkého množství druhů jsou hojně přítomné ve vzduchu a tudíž se nanzedbatelně podílejí na druhové rozmanitosti hub ve fyloplánu, i když nemusí s přítomným společenstvem vůbec interagovat. Na druhou stranu bylo pozorováno, že řada druhů (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Curvularia*, *Pithomyces*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Aspergillus*) přítomných na listech se značně podílí na koncentraci spór ve vzduchu (Leventin a Dorsey 2006). Epifytické druhy přítomné na listech v podobě mycelia i dormantních spór také mnohdy hrají podstatnou roli při rozkladných procesech v listovém opadu (Sadaka 2003), a tudíž je lze izolovat i z půdy.

### 2.2.1. Životní strategie mikromycet

Jedním z hlavních limitujících faktorů na listech je dostupnost živin. Jelikož jsou houby chemoorganotrofní heterotrofové, stává se v tomto prostředí pravděpodobně nejúspěšnější strategií právě parazitismus, který není v přísunu nutrientů omezen vnějšími vlivy tolik, jako epifyté. Pro úzce specializované obligátní parazity, jakým je padlí, jsou rozhodujícími faktory například přítomnost povrchových exudátů charakteristických pro hostitelskou rostlinu, fyzikální rozdíly v topografii povrchu hostitelského, respektive parazitického organismu, a v neposlední řadě genetická kompatibilita s hostitelskou rostlinou (Vogel a Somerville 2002).

Větší množství živin nebývá na listech pravidlem a je spíše náhodné a dočasné. Náhlý přísun rostlinných exudátů, živočišných exkrementů nebo pylu bývá příležitostí k rozvoji pro imigrující spóry rychle rostoucích hub. K nim patří hlavně zygomycety, například řád *Mucorales*.

Stabilně nejúspěšnějšími jsou ale houby schopné střídat strategie. Mezi nejrozšířenějšími mikromycetami („plísně“) nacházíme všestranně enzymaticky vybavené oportunistické dekompozitory a fakultativní poloparazity. K těmto univerzálně vybaveným a všudypřítomným druhům patří například *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, nebo *Trichoderma* (Widden 1997). Epifytické mikromycety většinou využívají jen tenký film živin na povrchu listu, prach, nekrotická pletiva, ale některé mohou příležitostně napadnout oslabené živé rostlinné pletivo. Nejhojnější druhy izolované z povrchu listů opadavých stromů bývají askomycety z rodů *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum* a *Stemphylium* (viz. Bailey *et al.* 2006). Téměř vždy je na listech rostlin přítomná dimorfní askomyceta *Aureobasidium pullulans*, která inhibuje růst mnoha mikroorganismů a byla úspěšně testována jako biologická ochrana kulturních plodin (Wilson *et al.* 1989, Leibinger *et al.* 1997). Právě produkce pestré škály fungicidních a antibiotických látek je dalším zásadním nástrojem kompetice mezi houbami ve fyloplánu (McCormack *et al.* 1994).

Zástupce basidiomycet a zygomycet nacházíme na listech spíše výjimečně (Inácio *et al.* 2002).

### 2.2.2. *Erysiphe alphitoides* a složení společenstva

Společenstvo na povrchu listů má charakteristickou dynamiku danou vegetační dobou hostitelských rostlin. Jelikož vliv na jeho skladbu má i *fitness* hostitele, můžeme předpokládat, že přítomnost agresivního patogenu, jakým je *E. alphitoides*, se bude na sezónní dynamice projevovat. Mimo jiné lze očekávat zvýšený výskyt přidružených poloparazitů, saprotrofů. Podobně je možné očekávat výskyt významných hyperparazitů padlí *Ampelomyces quisqualis* a velmi podobný druh *Phoma glomerata*. Bylo pozorováno, že *A. quisqualis* i *P. glomerata* prokazatelně inhibují růst a tvorbu konidií *E. alphitoides* (Sullivan a White 1999). Hlavní otázkou ovšem zůstává, jak se infekce projeví na celkové diverzitě a také zda patogen ovlivňuje složení společenstva nebo naopak.

## 2.3. Metodický přístup ke studiu společenstev

### 2.3.1. Klasické metody

Klasickými metodami studia mikromycet myslíme kultivaci a mikroskopii. Environmentální vzorky je možné mikroskopovat přímo, nicméně většina druhů bývá v prostředí přítomná jako sterilní mycelium, které lze jen těžko určit. V takovém případě se přistupuje k jejich izolaci a kultivaci.

Protože naprostá většina hub vyniká nutričním minimalismem a ohromnou schopností regenerace můžeme prostřednictvím kultivace z environmentálních vzorků izolovat značnou část zastoupených druhů. Kultura může vzniknout z jediné spóry nebo drobného fragmentu mycelia. Klíčení spóry nebo regenerace mycelia mohou být u některých druhů značně limitovány chemickými a fyzikálními vlastnostmi média. Mezi nejdůležitější faktory patří především vlhkost, přítomnost základních cukrů, pH a zdroj dusíku. K mykologickým účelům se média velmi často obohacují komplexními výtažky, například sladovým, sójovým či kvasnicovým. Používají se také média selektivní, která mají prostřednictvím různých antibiotik zamezit růstu bakterií. O médiích používaných v mykologii zevrubně pojednávají Bills a Foster (2004).

Při určování mikromycet jsou rozhodující i znaky makroskopické, jako třeba tvar, barva a rychlost růstu mycelia, přítomnost exudátů, nebo vztah ke kyslíku. Přesná klasifikace však závisí na znacích mikroskopických. Hlavní oddělení hub je například možné rozeznat podle přehrádkování charakteristického pro Ascomycota a Basidiomycota, zatímco Zygomycota, Chytridiomycota a Oomycota (říše Chromalveolata) mají mycelium nepřehrádkované (coenocytické).



Zdaleka nejdůležitější taxonomické znaky mikromycet nesou rozmnožovací struktury, bez kterých nelze většinu mikromycet určit. Velikost spór se pohybuje v řádu desítek mikrometrů a k pozorování znaků bývá dostačující zvětšení 400-1000x. Zpravidla rozhoduje právě velikost, tvar, barva, povrchová struktura, nebo uložení spór a orgánů ze kterých vyrůstají – pohlavních plodnic či nepohlavních konidioforů a konidiomat. Znakem bývá také specifická barvitelnost některých skrytých nebo nevýrazných znaků. Pohlavní (teleomorfní) a nepohlavní (anamorfní) stádia některých hub se natolik liší svou morfologií i životní strategií, že byla taxonomicky zařazena do zcela jiných oddělení. K mnoha druhům doposud nejsou známa nebo přiřazena pohlavní stádia. Anamorfy těchto organismů sdružuje umělá taxonomická skupina *Deuteromycotina* (nedokonalé houby).

### 2.3.2. Molekulární metody

Využití molekulárních znaků umožňuje postihnout nezanedbatelnou část mikromycet, které nelze kultivovat, nebo je v kultuře „donutit“ k tvorbě struktur, na nichž závisí jejich identifikace. Mikromycety, jež nelze přímo nebo vůbec kultivovat, představují zejména obligátní parazité. Pro kultivaci parazitů je nezbytné získat čistou kulturu hostitele a tu potom infikovat jedinou spórou. Na druhou stranu organismy, jež na médiu kultivovat lze, nemusejí v prostředí fytoplánu sehrávat žádnou podstatnou roli (Yang *et al.* 2001).

Molekulární metody pracují s DNA extrahovanou ze společenstva, takže zachytí aktuální složení společenstva *in situ*, včetně všech přítomných vývojových stádií. Díky polymerázové řetězové reakci (PCR) je možné pracovat i s tak malým množstvím DNA mikromycet, jaké lze získat například z povrchu listů dubu (Heuser a Zimmer 2002), nebo dokonce z rámců starých obrazů (Möhlenhoff *et al.* 2001).

#### 2.3.2.1. Izolace DNA

V případě prostředí, jakým je povrch listů vzrostlého stromu, je třeba brát v potaz celou řadu faktorů. Zatímco většina bylinného patra má poměrně stabilní mikroklima, ve výškách jsou listy vystaveny prudkým výkyvům teplot a vlhkosti. Mikromycety žijící stabilně na povrchu listů stromů jsou proto vybaveny obzvláště silnou buněčnou stěnou, která zajišťuje ochranu před vysycháním a také pigmenty (především melanin), chránícími mycelium před slunečním zářením.

Hlavním úskalím při extrakci DNA z hub je velice odolná buněčná stěna. Buněčná stěna hub obvykle sestává především ze spletné sítě vláknitých polymerů a v ní ukotvené amorfní polymerové matrice. Stavebními látkami bývají polysacharidy a glykoproteiny (Tab. 1.).

Taxonomické zařazení	Fibrilární polymery	Polymery amorf. matrice
Oomycetes	$\beta(1,3)$ , $\beta(1,6)$ -glukan; celulóza	Glukan
Chytridiomycetes	Chitin; glukan	Glukan
Zygomycetes	Chitin; chitosan	Polyglukuronová kyselina; glukomannoproteiny
Basidiomycetes	Chitin; $\beta(1,3)$ , $\beta(1,6)$ -glukany	$\alpha(1,3)$ -glukan; xylomannoproteiny
Ascomycetes/ deuteromycetes	Chitin; $\beta(1,3)$ , $\beta(1,6)$ -glukany	$\alpha(1,3)$ -glukan; galaktomannoproteiny

**Tab. 1.** Tabulka základních materiálů buněčné stěny hub. (Kavanagh 2005, upraveno).

Neexistuje žádný univerzální postup pro extrakci nukleových kyselin dostatečně účinný pro všechny skupiny a druhy mikromycet. Struktura a odolnost buněčné stěny se liší nejen mezi druhy, ale i v rámci jednoho druhu vystaveného různým podmínkám. Karakousis *et al.* (2006) předkládají srovnání různých metod izolace DNA z hub, přičemž se jako nejpodstatnější krok jeví důkladné mechanické narušení buněčné stěny před samotnou lyzační fází extrakce (Tab. 2.).

Treatment	<i>A. fumigatus</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>P. chrysogenum</i>	<i>B. australiensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>
Proteinase K	0–10	25–50	75–90	50–75	75–90	50–75
Lyticase	0–10	0–10	75–90	50–75	75–90	50–75
Conc HCl	0–10	0–10	90–100	0–10	90–100	0–10
5 M NaOH	0–10	0–10	75–90	0–10	75–90	0–10
Sonication	50–75	50–75	75–90	75–90	25–50	75–90
Mortar and pestle	90–100	90–100	90–100	90–100	90–100	90–100

**Tab. 2.** Srovnání účinností lyze buněčných stěn šesti různých druhů mikromycet prostřednictvím fyzikálních, chemických a enzymatických prostředků. Úroveň lyze byla hodnocena mikroskopicky a je vyjádřena jako procenta ve srovnání s kulturou. (Karakousis *et al.* 2006).

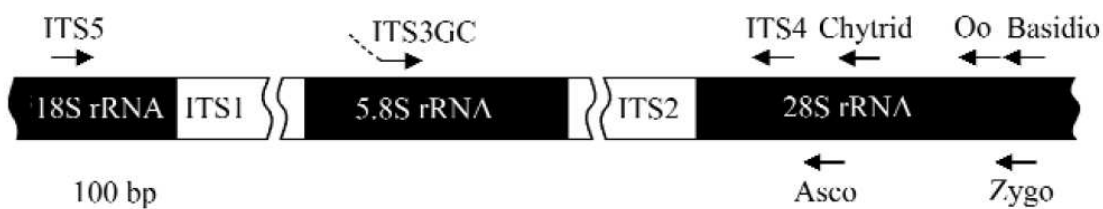
Druhým důležitým bodem je přečišťování lyzátu, kdy dochází k odstranění komponent (proteiny, pigmenty), které by mohly inhibovat další molekulární techniky (PCR, DGGE, sekvenace).

Ve vědeckých publikacích lze většinou narazit na různé modifikace dvou základních principů, které jsou využívány při purifikaci lyzátu hub. Buď je vodný lyzát vytřepáván s fenolem, který jej zbaví většiny lipidů, proteinů a pigmentů, nebo je denaturovaná DNA vázána na křemíkovou membránu v plastové kolonce a následně promývána puftrem. Fenolová metoda dává zpravidla větší výtěžky, ale často i větší kontaminaci inhibitory PCR. Kolonková metoda, kterou využívá celá řada speciálních komerčních kitů většinou poskytuje nižší výslednou koncentraci nukleových kyselin o podstatně vyšší čistotě.

### 2.3.2.2. Molekulární markery

V současné mykologii je nejpoužívanějším molekulárním markerem oblast jaderného genu pro ribosomální podjednotky, především jeho spacerové sekvence, zkráceně ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Geny pro ribosomální podjednotky 18S, 5.8S a 28S jsou polycistronicky organizovány v mnoha tandemových opakováních, oddělených nekódujícími sekvencemi ITS1 a ITS2 (obr. 3.). Zatímco sekvenční motiv ribosomálních podjednotek je napříč říší hub velmi konzervativní, variabilita mezerníků ITS (hlavně ITS2) velice věrně sleduje její druhovou diverzitu (White *et al.* 1990).

O mitochondriálních genech kódující cytochrom oxidázu 1 (*COI*), které se všeobecně používají jako *barcode* zvířat, se u hub ví jen velmi málo. V rámci rodu *Penicillium* se sice jeho sekvenční diverzita ukázala jako velmi vhodná k identifikaci druhů, nicméně databáze sekvencí stále obsahují nejvíce záznamů o ITS oblasti většiny známých druhů hub (Seifert *et al.* 2007). Z toho důvodu je v současnosti sekvence ITS1-5.8-ITS2 všeobecně používána jako univerzální molekulární marker (*barcode*) hub (Seifert 2008).



**Obr. 3.** Diagram vazebných míst primerů specifických pro oblast ITS jednotlivých oddělení houbových organismů. V naší studii jsme pro DGGE použili kombinaci ITS3GC – ITS4. (Nikolcheva *et al.* 2005).

Další molekulární markery, které se nejvíce využívají v mykologii, jsou hlavně geny pro  $\beta$ -tubulin A ( $\beta$ -*tubA*), elongační faktor 1- $\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ), případně geny pro aktin (*actA*), glukosa-6-fosfát izomerázu (*gpiA*), hydrofobin A (*hydA*), a malý GTPázový protein (*rabA*). Tyto kódující sekvence vykazují podstatně vyšší polymorfismus než ITS a ukázaly se jako užitečné při studiu vnitrodruhové variability, odhalování kryptických druhů a fylogeografickému mapování (Le Quéré *et al.* 2006, Rajashekar *et al.* 2007, Hedh *et al.* 2008).

Sekvence celé řady primerů pro houby, navržených na oblast ITS i ostatní uvedené geny, jsou uveřejněny na internetových stránkách projektu AFTOL - *The Assembling the Fungal Tree of Life*, nebo na stránkách Laboratoře Françoise Lutzoniho.

### 2.3.2.3. DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je procedura schopná rozdělit směs ampliconů o stejné velikosti na základě jejich sekvenčních rozdílů. Princip spočívá v různé rychlosti denaturace odlišných fragmentů DNA (povolují vodíkové můstky a řetězce se oddělují) v přítomnosti denaturačního činidla. Míra denaturace se za daných podmínek liší mezi různými nukleotidovými sekvencemi, což je dáno slabší vazbou mezi adeninem a thyminem (A-T) a silnější mezi cytosinem a guaninem (C-G). Za účelem oddělení těchto odlišných sekvencí se vytvoří gradient denurantu v polyakrylamidovém gelu. Denurant může být fyzikální podstaty (teplota – TGGE), nebo jako v případě této práce, podstaty chemické. Takto připravený gel se potom použije k elektroforéze, při níž se fragmenty postupně zpomalují až zastavují v pohybu gradientem v závislosti na svém obsahu nukleotidů.

Pokud pracujeme s environmentálním vzorkem postupuje se následovně: z extrahované směsné DNA se amplifikuje marker, který je univerzální pro skupinu organismů, jenž nás zajímá (houby). Získaný produkt se podrobí DGGE a na gelu vzniká charakteristický vzorec proužků (*fingerprint*), přičemž každý proužek reprezentuje jeden druh. Vzniklé proužky (*bandy*) je možné z gelu vyříznout, obsažené fragmenty extrahovat a zpracovat dalšími technikami (reamplifikace, klonování, sekvenace). Pro vyhodnocování DGGE je také k dispozici celá řada stále dokonalejších softwarových nástrojů, které umožňují přímo analyzovat fotografie gelů a na základě *fingerprints* porovnávat a statisticky vyhodnocovat celá společenstva.

DGGE je metoda hojně využívaná k pozorování ekologických zákonitostí v mikrobiálních společenstvech. Mapováním diverzity mikromycet a její dynamiky prostřednictvím DGGE ve svých pracech velice dobře popisují Nikolcheva a Bärlocher (Nikolcheva *et al.* 2003, 2005, Nikolcheva a Bärlocher 2004, 2005). Jejich práce se zabývají modelovým příkladem společenstva hub zapojeného v dekompozici listového opadu ve vodních tocích a nabízejí několik velice účinných metodických systémů.

Existují i práce, které k analýze společenstev využívají postup, při kterém je z environmentálního vzorku amplifikován široce specifický marker, z produktu je vytvořena klonová knihovna. Následným sekvenováním určitého počtu (stovek) náhodně vybraných kolonií se identifikují majoritní taxony (Seena *et al.* 2008, Leigh *et al.* 2010). Tento přístup umožňuje identifikaci druhů, nicméně je při něm omezen komplexní pohled na společenstvo z hlediska kvantitativních údajů.

V poslední době je na vzestupu analýza společenstev s využitím pyrosekvenování. Konvenční pyrosekvenátor umožňuje několik tisíc paralelních čtení fragmentů o délce kolem 500 párů bazí. Například sekvenováním markeru 18S rDNA se podařilo v určitých půdních společenstvech odhalit 182 druhů askomycet (ze 2708 čtení) a 172 basidiomycet (ze 6837 čtení) (Lim *et al.* 2010). Údaj o míře zastoupení taxonů je v tomto případě založen na tom, kolikrát se každá sekvence, zastupující jeden druh, opakuje v jednom běhu. Díky čtecím chybám je tento způsob kvantifikace zatížen značným zkreslením, zvláště pokud porovnáváme abundanci většího množství druhů (Amend *et al.* 2010). Nespornou výhodou této metody je však možnost analyzovat diverzitu a současně sekvenovat přítomné fragmenty.

### 3. Cíle práce

---

- Optimalizovat metodický systém používaný ke studiu společenstev hub.
- Charakterizovat interakci mezi *E. alphitoides* a společenstvem mikromycet ve fyloplánu dubů.
- Popsat sezónní dynamiku společenstva ve vztahu k patogenu.

## 4. Metodika

---

### 4.1. Vzorky

V parku Stromovka v Českých Budějovicích byly vybrány čtyři přibližně stejně vzrostlé duby letní a rozděleny do dvojic. Obě dvojice tvořil jeden silně napadený strom a jeden, který nejevil známky infekce. První dvojici představovaly stromy A (napadený) a B (zdravý), které byly od sebe vzdáleny 244 m. Druhou dvojici tvořily stromy C (zdravý) a D (napadený), které byly v těsné blízkosti a vzájemně se dotýkaly korunami. Vzdálenost mezi oběma dvojicemi byla celkem 607 metrů (obr. 4.).



**Obr. 4.** Mapa rozmístění sledovaných dubů. Jihozápadní okraj Českých Budějovic, městský park Stromovka. Stromy A a C byly silně infikované, stromy B a D nejevil žádné známky infekce. Stromy C a D (napadený a zdravý) byly od sebe vzdáleny přibližně 2 metry a jejich koruny se dotýkaly. (zdroj: Google earth 2012, upraveno).

Každých 40 dní (s tolerancí 1-3 dny s ohledem na počasí) počínaje 26. květnem 2011 bylo do čistých mikrotenových sáčků z každého stromu odebráno 6-10 listů. Listy byly sbírány na různých místech koruny ve výšce přibližně 2 metry. Smíchání většího počtu listů mělo zajistit, aby byl ve vzorcích zachycen co největší rozsah přítomných druhů mikromycet, a tím by se měly vyloučit možné odchylky v jejich distribuci ve fyloplánu. Sebrané listy byly neprodleně přepraveny do laboratoře a zpracovány.

Precizní metoda, kterou použili Heuser a Zimmer (2002) k izolaci mikromycet z povrchu dubových listů, měla umožnit oddělení svrchní a spodní strany listů. Procedura spočívala v tom, že se list položil na hladinu sterilní vody v kovové misce, voda se zmrazila kapalným dusíkem a přimražený list se odtrhnul. Na povrchu ledu potom zůstala kutikula listu se všemi organismy na jejím povrchu. Tuto metodu se nám podařilo reprodukovat, nicméně vzhledem k její nezanedbatelné pracnosti, nebyla shledána vhodnou při zamýšleném počtu vzorků (minimálně 4 odběry ze 4 stromů, 5-7 listů z každého stromu, celkem 80-112 listů).

Oddělení svrchní a spodní strany listu není v kontextu celého fyloplánu stěžejní otázkou, proto jsme přistoupili k proceduře založené na omývání listů. Pro každý strom byl připraveno 20 ml 0.02% roztoku Tweenu-80 (polyoxyethylensorbitanmonooleát) v destilované vodě. Tween (disperzní činidlo) měl zajistit smáčivost mycelia a spór. Do roztoku se namáčely vatové tyčinky, kterými se omýval povrch 6-7 přibližně stejných listů z každého stromu. Tento postup byl modifikován z původní podoby podle Hodgese *et al.* (2006). Získané suspenze byly přelity do 50ml plastových zkumavek a centrifugovány při 6 000 otáčkách po dobu 20 minut.

Většina supernatantu byla vylita a sediment resuspendován ve zbývajícím roztoku (přibližně 5 ml). Zahuštěná suspenze byla rozdělena do 2ml mikrozkušavek a podrobena další centrifugaci. Po odlití supernatantu se nechal sediment 2 hodiny vysoušet ve vakuové odpařovačce (DyNA Vap, Labnet) a tím byly vzorky připraveny k extrakci DNA. Vysušené vzorky byly uskladněny při -20°C.



## 4.2. CFU

Za účelem základní kvantifikace životaschopných buněk v suspenzi (CFU – *colony forming units*) bylo z každé suspenze před centrifugací rozetřeno 3x100 µl (tři opakování) v desetinásobném zředění (100 µl v 900 µl) na tři Petriho misky s tuhým médiem PDA (*potato dextrose agar*, HIMEDIA M096). Po dvou dnech inkubace při 25°C byly misky vyhodnoceny. Misky s menším počtem nepřekrývajících se kolonií byly sečteny ručně. Při velkém množství menších kolonií ve shlucích byl naskenován obraz misek (HP scanjet 3670, rozlišení 300 dpi) a kolonie ručně (prostřednictvím počítačové myši) sečteny nástrojem *cell counter* v programu ImageJ (verze 1.45s, National Institute of Health, freeware). *Cell counter* umožňuje obraz zvětšit a lépe rozlišit kolonie ve shlucích. V programu ImageJ je také možné převést obraz do binární podoby, odfiltrovat šum a automaticky sečíst částice o definované velikosti funkcí *analyze particles*. Automatizované počítání je ale vhodnější v těch případech, kdy se kolonie nepřekrývají a velikostně se příliš neliší.

Výsledné hodnoty v jednotkách CFU/ml byly získány vypočtením průměrných počtů kolonií z každých tří opakování.

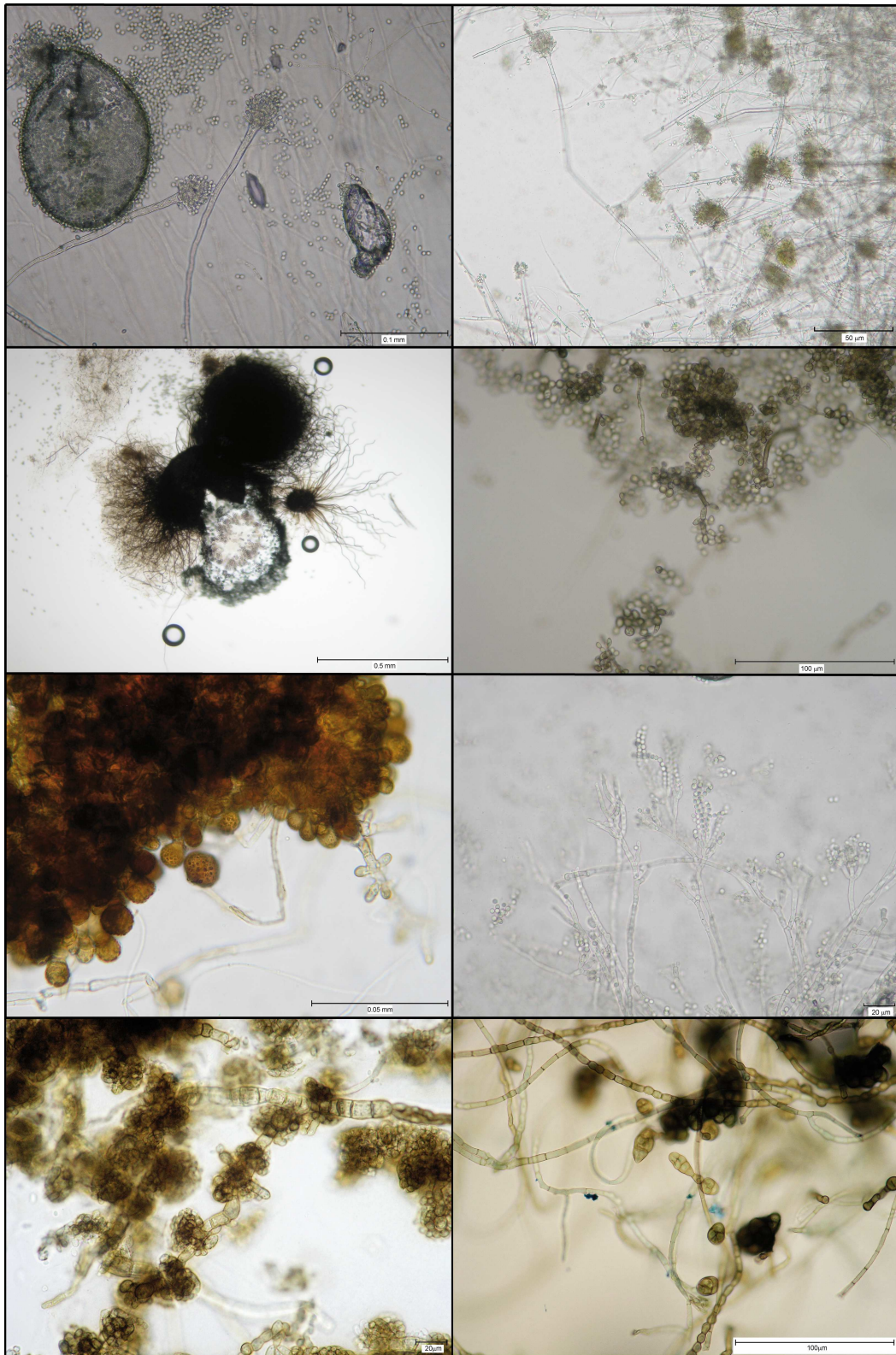
## 4.3. Kultivace

Při každém sběru listů byl vždy jeden list z každého stromu otisknut na Petriho misku s tuhým agarovým médiem za účelem získání čistých kultur nejhojnějších kultivovatelných mikromycet, které se na listu vyskytují.

List byl vždy otisknut zvlášť vrchní a spodní stranou na velké (10cm) Petriho misky s médiem PDA, obecně používaným k základní izolaci hub z prostředí. Po 3 dnech inkubace při 25°C se otisky kontrolovaly. Kolonie byly téměř vždy v hustých shlucích a zygomycety, pokud byly přítomné, často přerůstaly více než polovinu plochy média. Cílem bylo vybrat kolonie, které se odlišují, lze je přeočkovat a získat tak sbírku čistých kultur mikromycet na vytvoření standardu pro DGGE.

Po přeočkování na sladové médium MEA (*malt extract agar* – 30 g sladového extraktu, 5 g mykologického peptonu a 15 g agaru na 1 litr vody) byly čisté kultury inkubovány většinou týden až dva, v závislosti na rychlosti jejich růstu (zygomycety 3 dny) při 25°C. Většina hub za tuto dobu vytvořila rozmnožovací struktury, většinou nepohlavní. Některé houby vyžadovaly mnohem delší dobu kultivace (měsíc a déle), popřípadě zdroj světla, nutného k vytvoření struktur, podle nichž bylo možné provést identifikaci (obr. 5., str 18).

S využitím světelného mikroskopu, určovacích klíčů (Elis a Elis 1995, Elis 1971, Kiffer *et al.* 1999, Watanabe 2002) a internetových sbírek fotografií (např. <http://www.mycology.adelaide.edu.au>) se podařilo v kulturách určit řadu organismů na úrovni druhu nebo alespoň rodu. Z vybraných kultur byly vyříznuty kousky mycelia o velikosti přibližně 5 x 5 mm. Po vysušení vakuovou odpařovačkou (DyNA Vap, Labnet) byla z těchto kousků extrahována DNA. Prostřednictvím primerů ITS1 a ITS4 byla amplifikována a následně osekvenována oblast ITS1 – 5.8S – ITS2 (viz. kapitola 3.3.). Získané sekvence byly porovnány s databází GenBank<sup>®</sup> (NCBI) nástrojem BLAST<sup>®</sup> (*Basic Local Alignment Search Tool*). To umožnilo nejen bližší určení druhů, ale také ověření čistoty kultur a tedy i jejich použitelnost při DGGE. Výsledkem se stala sbírka různých mikromycet, přesněji sbírka jejich DNA. Roztoky nukleových kyselin byly uskladněny při -20°C a později použity k vytvoření standardu pro DGGE (viz. kap. 4.4.4.2.).



**Obr. 5.** Rozmnožovací struktury některých nejběžnějších mikromycet izolovaných z listů dubů. Postupně zleva doprava po řádcích shora dolů: *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus versicolor*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium* sp., *Epicoccum nigrum*, *Penicillium griseofulvum*, *Aureobasidium pullulans* a *Alternaria* sp. (Vlastní fotografie 2010-2011).

## 4.4. Molekulární zpracování vzorků

### 4.4.1. Izolace DNA

Ke každému vysušenému vzorku bylo přidáno přibližně 30-50 sterilních keramických kuliček (0,5mm zirconia/silica beads, BioSpec Products, Inc.). Pro rozbití buněčných stěn byl vzorek zmražen v kapalném dusíku a homogenizován po dobu 30 sekund při 4600 rpm v disruptoru (*Mini-Beadbeater*, BioSpec Products, Inc.).

Jako první byl k extrakci nukleových kyselin vyzkoušen Dneasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit (QIAGEN, podle instrukcí výrobce), založený na principu srážení nukleových kyselin prostřednictvím guanidiniových solí a purifikaci na křemíkových membránách. Koncentrace výtěžku se ale pohybovala většinou v rozmezí 0,1-8 ng/  $\mu$ l (NanoDrop<sup>®</sup> 1000 (Thermo SCIENTIFIC) v celkovém objemu 50  $\mu$ l. Pro neuspokojivé výsledky bylo přikročeno k radikálnější metodě vytřepávání s fenolem.

Lyzé byla prováděna přes noc při 65°C v termobloku (MAJOR SCIENCE) v 700  $\mu$ l lyzačního pufru (0,2M Tris-Cl, pH 7,5; 0,5M NaCl; 0,01M EDTA) za přítomnosti 1 % SDS (w/v) a 7  $\mu$ l roztoku RNázy A (100 mg/ml, QIAGEN). Lyzát byl 5 minut vytřepáván s pufrovaným fenolem (1:1; pH 7,9  $\pm$  0,2) a následně centrifugován při 14000 otáčkách po dobu 15 minut. Vodný supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky pro další kroky. Vytřepávání se opakovalo ještě ve směsi s fenolem, chloroformem a izoamylalkoholem (25:24:1) a v posledním kroku jen s chloroformem (1:1). V případech, kdy zůstal vodný supernatant zabarvený, následovalo naředění supernatantu stejným objemem pufru a další promývání fenolem. Pro srážení nukleové kyseliny bylo ke zbytku supernatantu přidáno 2,5x objemu ethanolu (99%) a 0,1x objem 3M roztoku octanu sodného (pH 5,2). Srážení probíhalo půl hodiny při -20°C. Sraženina byla oddělena centrifugací při 4°C, 14000 otáčkách po dobu 15 minut. Sediment byl resuspendován v 70% ethanolu a znovu centrifugován. Výsledný sediment byl vysušen od zbytků ethanolu v termobloku při 50°C a resuspendován v 50  $\mu$ l pufru EB (Elution Buffer, QIAGEN). Koncentrace výtěžků se pohybovala v rozmezí 10-50 ng/ $\mu$ l. Stejný postup byl použit i v případě vysušených sedimentů. Postup byl modifikován podle Sambrooka *et al.* (1989).

#### 4.4.2. Primery

Pro amplifikaci zvoleného markeru jsme vybrali dvě varianty primerových párů. První varianta sestávala z pěti kombinací, které pro studium společenstev mikromycet vyvinuli Nikolcheva a Bärlocher (2004).

Každý pár vždy obsahoval primer ITS5 (White *et al.* 1990) a jeden z primerů ITS4Asco, ITS4Basidio, ITS4Chytrid, ITS4Oo nebo ITS4Zygo specificky pro každé oddělení houbových organismů. Produkty těchto reakcí byly určeny k následné reamplifikaci, při níž byl primer ITS5 zaměněn za ITS3GC (*nested PCR*).

Primer ITS3GC je modifikovaný přidáním 40-ti bazovým polyGC 5'-koncem (GC-clamp, May *et al.* 2001), který při DGGE zamezuje úplnému rozdělení vláken dvoušroubovice v denaturačním činidle. Hlavními výhodami této kombinace primerů je rozdělení organismů do skupin, zesílení signálu prostřednictvím *nested PCR* a tím i větší citlivost při detekci všech přítomných druhů. Na druhou stranu tento přístup zvyšuje pravděpodobnost zkreslení *fingerprintu* společenstva především po kvantitativní stránce. Touto cestou byla analýza také podstatně náročnější na optimalizaci PCR (celkem 10 různých reakcí, pro každý vzorek trochu jiné podmínky) a tedy i časově a materiálně náročnější.

Varianta druhá spočívá ve využití primeru ITS3GC v kombinaci s ITS4 (White *et al.* 1990), který je specifický pro všechny houbové organismy včetně oomycet. Tato kombinace zaměřující 370 bazí velkou oblast ITS2 (mezi 5.8S a 28S rDNA) byla již dříve úspěšně použita na screening společenstva mikromycet (Nicolcheva *et al.* 2005). Jelikož lze předpokládat, že většinu druhů na povrchu listů budou představovat *Ascomycota* (Inácio *et al.* 2002), je tato kombinace optimální pro prostředí povrchu listů a zachytí i případný výskyt taxonů náležejících k ostatním skupinám houbových organismů (*Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota*, *Zygomycota*).

Vzorky kultur byly amplifikovány s primery ITS1 a ITS4, které zaměřují oblast ITS1, 5.8S rDNA a ITS2. Celková velikost amplifikovaného fragmentu se pohybuje okolo 600 párů bazí, což nám umožnilo relativně přesné určení druhu na základě homologie se sekvencemi v databázi.

Sekvence použitých primerů jsou v tabulce 3. Všechny použité primery byly na objednávku syntetizované firmou GENERI-BIOTECH.

Primer	Sekvence 5' - 3'
ITS3GC	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCC GGCCCGCCGCCCCCGCCCC GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G

**Tab. 3.** Použité primery ITS1 a ITS4 podle White *et al.* (1990), ITS3GC podle May *et al.* (2001).

#### 4.4.3. PCR

První krok představoval optimalizaci polymerázové řetězové reakce (PCR) pro DNA extrahovanou ze sbírky mikromycet kultivovaných z otisků listů. Některé roztoky DNA byly mnohdy silně kontaminovány metabolity hub a zůstávaly i po opakovaném vytřepávání s fenolem mírně žlutavě zabarvené přítomnými pigmenty. Většina vzorků začala amplifikovat až po pěti až desetinásobném ředění.

Pro vzorky kultur s párem primerů ITS1 – ITS4 bylo použito následující reakční schéma: počáteční denaturace 95°C/ 2 min., 36 cyklů denaturace 95°C/ 20 sek., annealing 55°C/ 15 sek. a elongace 72°C/ 1 min. Konečná elongace 72°C/ 5 min. a 14°C na konec programu. Produkty byly purifikovány prostřednictvím QIAquick® PCR Purification Kitu (QIAGEN). Koncentrace purifikovaných produktů byla změřena spektrofotometrem NanoDrop® 1000 (Thermo SCIENTIFIC). Přibližně 15-30 ng produktu PCR s 2,5 pmol primerů ITS1 a ITS4 ve vodě o celkovém objemu 7,5 µl jsme nechali sekvenovat po obou řetězcích v Laboratoři genomiky (Biologické centrum AVČR).

V případě vzorků společenstev jsou dvě možnosti jak definovat množství templátu. Jednou z možností je dávkovat standardní množství DNA, například 50 ng do každé reakce. V případě této studie bylo přidáváno standardní objemové množství izolátu (2 µl o koncentraci 10-80 ng DNA), aby zůstala zachována relativní kvantitativní informace o celkovém množství houbové biomasy v každém vzorku. Do každé reakce PCR byly přidány vždy 2 µl templátu o koncentraci 10-80 ng DNA.

Pro vzorky společenstva obsahovala reakce primery ITS3GC a ITS4. Optimální teplota annealingu primerů odpovídala 55°C uváděným Nikolchevou (2005), parametry cyklů byly upraveny – reakce začínala denaturací při 94°C po dobu 4 minut, byla následována 36-ti cykly: denaturace 94°C/ 1 min., annealingu 55°C/ 20 sek. a elongace 72°C/ 1 min. s finální elongací 72°C/ 5 min. a konečnými 14°C. Reakční cykly byly prováděny na přístroji MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad). Produkty byly dále analyzovány metodou DGGE (viz. kapitola 4.4.4.)

Produkty všech reakcí byly pro kontrolu nanесeny po 1 µl na 1,5% agaróзовý gel s příměsí interkalační barvy GelRed™ 10.000x (0,3 µl/ 30 ml gelu, vodný roztok, Biotinum) a podrobeny elektroforéze při 90 V po dobu 20 minut. Gel byl na UV transiluminátoru (VILBER-LOURMAT) zdokumentován systémem Kodak Digital Science.

#### 4.4.4. DGGE

##### 4.4.4.1. Příprava DGGE

DGGE jsme uskutečňovali na přístroji, který umožňuje běh jednoho či dvou gelů zároveň. Prvním krokem je důkladné očištění a odmaštění jednotlivých součástí zařízení. Zařízení sestává ze dvou hlavních částí. Základní částí je vana vybavená čerpadlem, topným tělesem a termostatem pro zajištění cirkulaci pufru a udržování jeho požadované teploty. Nádrž na pufr je vyrobena z průhledného plastu, aby bylo možné běh DGGE kontrolovat. Při DGGE se jako elektrolyt používá 17 litrů 1x TAE pufru, z něhož se před každým během zhruba 4 litry vymění (v systému INGENYphorU). Druhou částí je kazeta z tvrdého průhledného plastu uzpůsobená pro cirkulaci pufru. Kazeta nese elektrody a jednu nebo dvě skleněné formy na gel. Forma na gel se pokaždé znovu sestavuje jako *sandwich* ze dvou skleněných desek proložených rámem z houževnatého plastu tzv. *spacerem*, který vytváří mezi deskami prostor pro gel. *Sandwich* se zasune do drážek v kazetě a přitlačí se sedmi plastovými šrouby k těsnění. Do drážek z druhé strany se podobně vsune druhá forma, nebo zaslepovací skleněná deska. Mezi desky se zatlačí hřeben (32 zubů) pro vytvoření jamek a kazeta je připravena pro vytvoření gelu.

Gradientový gel se míchá ze dvou roztoků o dvou koncentracích denaturačního činidla. Zásobní roztoky obsahovaly 0% a 80% močoviny/formamid, 100% roztoku odpovídalo 40% formamidu a 7M močovně. Jiných koncentrací bylo dosahováno vzájemným ředěním roztoků. Základ každého roztoku sestával z 2 ml 10x TAE a 20 ml 40% akrylamid/bisakrylamidu doplněn do 100 ml destilovanou vodou.

V případě 80% denaturantu se do stejného objemu přidalo 33,6 g močoviny a 32 ml formamidu. Močovinu bylo třeba rozpustit na magnetickém míchadle při mírném zahřátí (cca 50°C). Roztoky byly uchovány v temnu při pokojové teplotě. Před každým během elektroforézy byly připravovány potřebné koncentrace (30% a 60% nebo 80%) do celkového objemu 27 ml pro každý gel. Pro zahájení polymerace bylo do 27 ml roztoku přidáno 13,5 µl TEMEDu (tetramethylethyldiamin) a 75 µl 20% APS (amonium persulfát). Oba roztoky byly bezprostředně po přidání TEMEDu nality do míchací nádoby. Míchací nádoba sestává ze dvou válcových komor propojených uzavíracím kohoutem. Do komory s vyšší koncentrací denaturantu (blíže k pumpě) se umístí magnetické míchátko, otevře se kohout a zapne peristaltická pumpa. Pumpa postupně nasává roztok o vyšší koncentraci, který je konstantně zředován slabším roztokem. Roztok je pak prostřednictvím gumových hadiček a injekční jehly přibližně 15 minut pumpován do formy. Část roztoku se odlije stranou do mikrozumavky pro kontrolu polymerace, která trvá přibližně hodinu. Výsledkem je 1 mm silný gel o rozměrech 28 x 18 cm. Kazeta s připraveným gelem se ponoří do vany s pufrem, předehřátým na požadovanou teplotu, připojí se k ní čerpadlo a napustí se vrchní rezervoár, který spojuje katodu s horním okrajem gelu. Tím se zároveň naplní a vypláchnou jamky v gelu. Zatlačením *spaceru* se otevře spodní část formy a zaplaví se pufrem, což zajistí propojení elektrického obvodu skrz gel. V této fázi je velmi důležité pečlivě odstranit bubliny ze spodní části formy, kde by mohly narušovat el. obvod, což se ve výsledku projevuje deformací proužků.

Před nanesením do jamek byly vzorky smíchány s 1x nanášecí barvou v poměru přibližně 4:1 až 3:1 (2x *loading dye* obsahovala 0.05% (w/v) bromphenol blue, 0.05% (w/v) xylen cyanolu, 70% a (v/v) glycerolu ve sterilní deionizované vodě). Barva umožnila vizualizaci vzorků, ale především omezovala jejich vzlínání z jamek. Několik prvních a posledních (3-4) jamek je vhodné nepoužívat, protože v nich dochází k deformaci vzorce proužků následkem nerovnoměrné rychlosti sloupců na okrajích gelu (*smiling effect*, viz. gel 3. na obr. 8.). Optimální množství vzorků nanášené na gel představovalo 12 µl produktu PCR ze společenstva i standardu.

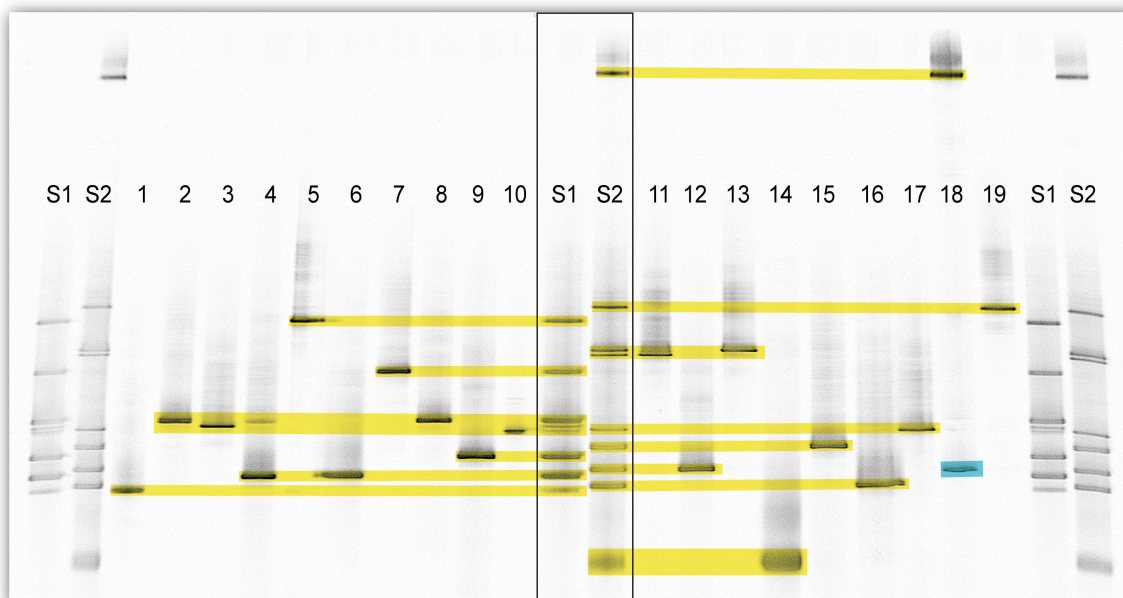
Na kazetu se připojí vodiče a propojí se se zdrojem (v tomto případě APELEX-minipacII, PS 304) a nádrž se uzavře víkem. Aby se zamezilo vypláchnutí vzorků, nechají se nejprve při požadovaném napětí 10 minut „zatáhnout“ do gelu a potom se pustí čerpadlo zabezpečující cirkulaci pufru. Intenzita elektrického proudu se ustálí sama v závislosti na podmínkách a většinou se pohybuje v desítkách mA.



#### 4.4.4.2. Standard

DGGE je velice citlivá metoda a každý běh lze jen těžko reprodukovat. Pokud chceme porovnávat více běhů, je na místě přidávat ke každému běhu standard obsahující uměle sestavenou směs dobře známých a popsanych fragmentů (*artificial community*).

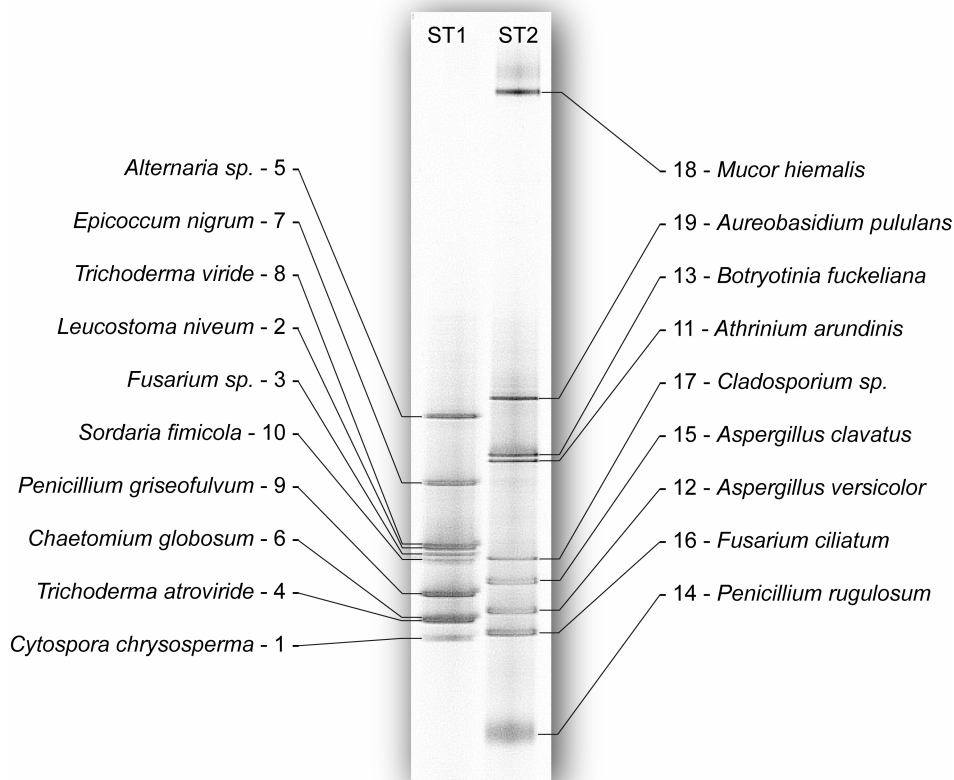
V tomto případě k tomu posloužila sbírka DNA kultur získaných kultivací z listů. Všechny vzorky kultur byly podrobeny PCR za stejných podmínek a se stejnými primery jako vzorky environmentální (ITS3GC, ITS4). Většina ampliconů (18 z 19) ukazovala stejně silný signál na elektroforéze. Sada reakčních směsí byla rozdělena na dvě části aby se snížila pravděpodobnost překryvu pozic sousedních proužků a vytvořeny dvě směsi o 4  $\mu$ l (6  $\mu$ l vzorku 10 – slabší produkt) z každé reakce. První jamka polyakrylamidového gelu obsahovala 12  $\mu$ l první směsi, následujících deset jamek po 6-ti  $\mu$ l (8  $\mu$ l vzorku 10) jednotlivých vzorků obsažených ve směsi a následovala opět jamka se směsí. Stejně schéma se opakovalo pro sérii zbývajících 9 vzorků a druhou směs, která z nich byla vytvořena. Tento postup umožnil asociovat pozice jednotlivých druhů s pozicemi proužků ve standardu a (viz. obr. 6. a 7.) optimalizovat podmínky, jako například množství nanášeného vzorku, napětí a gradient (dále v následující kapitole).



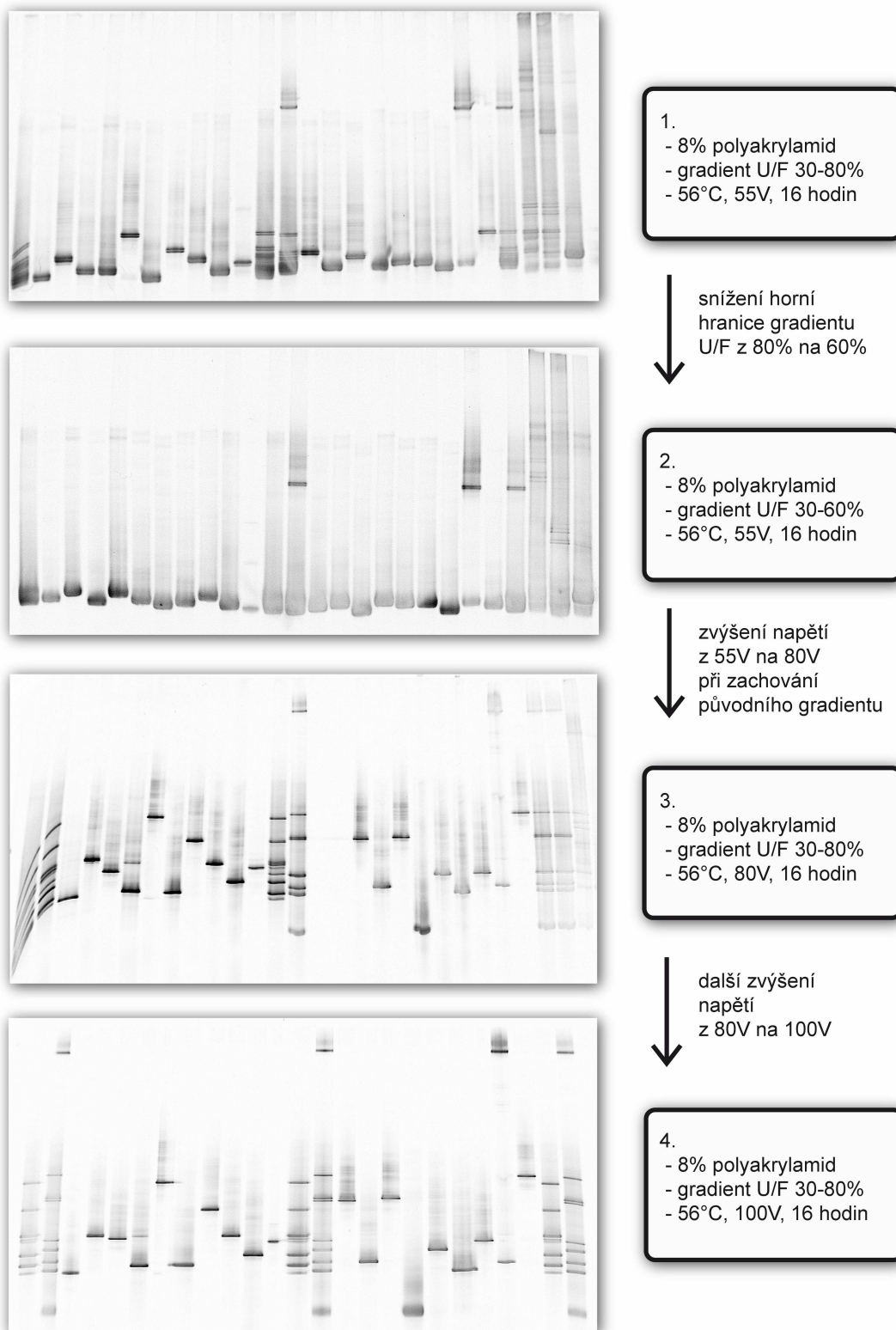
**Obr. 6.** Postup vytváření standardu. Pruhy (*lanes*) 1-10 a 11-19 jsou jednotlivé 370 bazí dlouhé fragmenty oblasti ITS2 amplifikované z čistých kultur. Standard S1 byl vytvořen smícháním fragmentů 1-10 a S2 smícháním fragmentů 11-19. To umožnilo identifikovat pozice jednotlivých druhů z kultur ve standardech. Každý druh, mimo 4 a 18, je reprezentován jedním proužkem (*band*). V případech vzorků 4 a 18 byly za platné považovány silnější proužky.

#### 4.4.4.3. Optimalizace DGGE

První běhy DGGE představovaly vytvoření standardu a optimalizaci podmínek. Nastavení podmínek běhu popsané Nikolchevou *et al.* (2005) odpovídaly 8% (w/v) AA gelu, gradientu 30%-80% močoviny/formamidu (U/F), 55V, 56°C po dobu 16-ti hodin. V této podobě bylo nastavení použito na první pokus o vytvoření standardu. Proužky ve výsledném gelu nebyly dostatečně rozlišené. Proto následovalo snížení horní hranice gradientu na 60% U/F. Následkem toho došlo pouze ke snížení rozlišení fragmentů. Další pokus probíhal s původními 80% U/F za zvýšení el. napětí na 80 V. Zvýšení napětí způsobilo lepší rozdělení fragmentů. Optimálních podmínek bylo dosaženo dalším zvýšením až na 100 V při stejných ostatních parametrech. V průběhu optimalizace bylo ke standardu přidáváno i několik zkušebních vzorků společenstev. Celý postup je zachycen na obrázku 8. na další stránce.



**Obr. 7.** Pozice fragmentů ve standardu. Proužky reprezentují mikromycety z kultur.



**Obr. 8.** Optimalizace podmínek DGGE při vytváření standardu. Na gel 1. a 2. byly přidány do posledních tří jamek vzorky společenstva. Na gelu 3. je vlevo patrný tzv. *smiling effect*, který vzniká, pokud se vzorky nanesou i do okrajových jamek. Na gelu 4. už je standard vytvořený za optimálních podmínek. Ve výsledku bylo optimalizováno jen napětí.

#### 4.4.4.4. Zpracování a vyhodnocení gelu

Po 16-ti hodinách bylo zařízení vypnuto a vytažená kazeta se nechala vychladnout. Skleněné desky byly šetrně odděleny, gel navlhčen destilovanou vodou, zbaven okrajů (horní okraj s jamkami, prázdné sloupce na bocích a cca 5 cm spodního okraje) a uzavřen do prostřížené dokumentové fólie. Mezi fólii a gel se rovnoměrně nalilo 15 ml 1x TAE pufru s 5 µl interkalační barvy Sybr<sup>®</sup> Green I (LONZA). Gel se nechal ležet 1 hodinu v temnu při pokojové teplotě. Obarvený gel byl přenesen na navlhčený UV transiluminátor a zdokumentován systémem Doc-Print II (VILBER LOURMAT). Výrazné proužky, které neodpovídaly pozicím ve standardu (většina), byly vyříznuty skalpelem a uchovány v 1,5 ml mikrozkumavkách při -30°C pro identifikaci taxonů (dále v kap. 4.4.4.5.). Pořízené digitální fotografie ve formátu TIFF byly dále vyhodnocovány specializovaným softwarem (dále v kap. 4.4.4.6.).

#### 4.4.4.5. Reamplifikace a sekvenace

Vyříznuté kousky polyakrylamidového gelu byly rozdrčeny plastovým homogenizátorem ve 30-ti µl elučního pufru (*elution buffer*, QUIAGEN) a inkubovány přes noc při 4°C. Centrifugací při 14 000 otáčkách po dobu 5 minut byly odděleny zbytky gelu a 1 µl supernatantu posloužil jako templát pro reamplifikaci s primery ITS3GC a ITS4. Opakování amplifikace mělo zvýšit koncentraci fragmentu pro sekvenaci. Produkty PCR byly znovu po 4 µl zpracovány prostřednictvím DGGE za stejných podmínek. PCR produkty, které vykazovaly přítomnost jediného fragmentu, byly purifikovány QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kitem (QIAGEN). Koncentrace purifikovaných produktů byla změřena spektrofotometrem NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC). Přibližně 15-30 ng produktu PCR s 2,5 pmol primeru ITS4 ve vodě o celkovém objemu 7,5 µl jsme nechali sekvenovat v Laboratoři genomiky (Biologické centrum AVČR). Amplikony, které poskytly použitelnou sekvenci, byly následně sekvenovány i na druhém řetězci s primerem ITS3GC.

#### 4.4.4.6. Softwarová analýza programem GelCompar II<sup>®</sup>

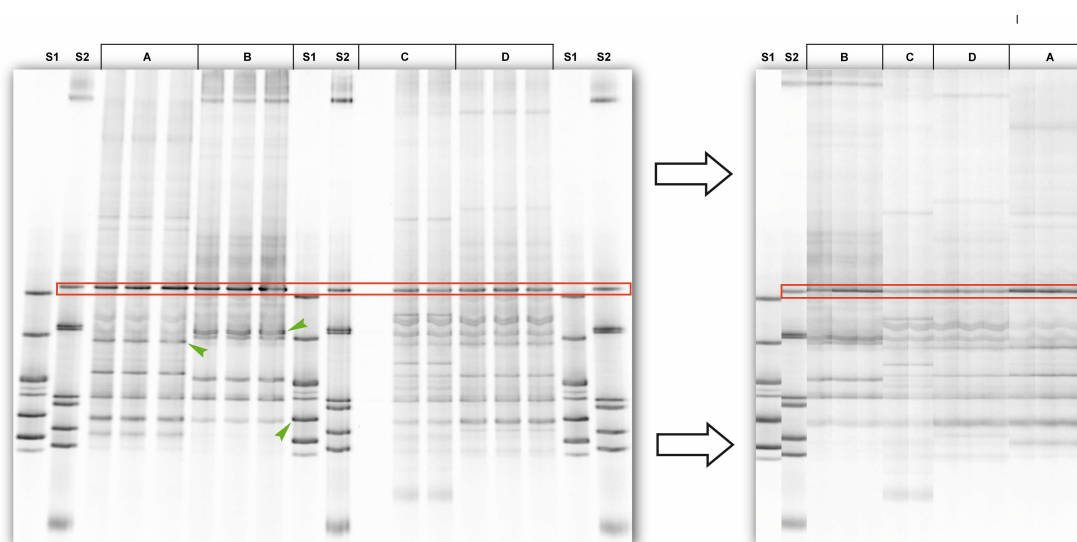
GelCompar II<sup>®</sup> (V.5.10) je komerční software od společnosti Applied Maths (viz. <http://www.applied-maths.com>), který umožňuje porovnávat vzorce *fingerprints* a na jejich základě provádět přímou fylogenetickou analýzu.

Pro srovnávací analýzu získaných DGGE *fingerprints* společenstev byly použity negativy digitálních snímků gelů ve formátu TIFF (černobílý, 8-bitů).

V první části analýzy byla sestavena databáze snímků vytvořených během pokusu a byl definován jejich charakter, v tomto případě „*fingerprint type*“. To slouží ke snadnému výběru a kombinování snímků ve srovnávací analýze.

Další krok umožňuje úpravu snímků (doostření, ladění kontrastu, otáčení, ořezání apod.), definování testované oblasti a definování analyzované oblasti jednotlivých sloupců (*lanes*). Tato úprava je důležitá především kvůli časté nerovnosti gelů a ořezu okrajů proužků, které jsou téměř vždy výraznější (artefakt způsobený vzlínáním vzorků v jamkách). Pro minimální zkreslení informace obsažené ve snímku nebylo v této fázi provedeno doostřování ani ladění kontrastu. Vybrané oblasti byly podrobeny spektrální analýze (*spectral analysis*), která váží poměr signálu a šumu (*signal/noise ratio*) a doporučuje hodnoty (*Wiener cutoff scale*, *background scale*) pro odstranění šumu v dalším kroku. Označené a upravené sloupce je možné prostřednictvím databáze snadno zařadit nebo vyřadit ze srovnávací analýzy.

Takto upravený snímek byl v dalším kroku „normalizován“. Tento krok slouží k vyrovnání nerovností gelu. Jednotlivé proužky ve standardu jsou označeny a odpovídající proužky v každém opakování standardu jsou přiřazeny jako referenční pozice. Na základě těchto kotevních bodů je možné snímek gelu „normalizovat“, čili vyrovnat podle známých pozic ve standardech (obr. 9).



**Obr. 9.** „Normalizace“ gelu v programu GelCompar II®. A, B, C a D jsou trojice opakování pro každý vzorek společnosti. S1 a S2 je standard. Vlevo je fotografie jednoho z gelů. Vpravo je normalizovaný gel. Jednotlivé sloupce (*lanes*) jsou softwarovým ořezem zbaveny okrajových částí, které jsou výraznější. Tento artefakt je vyznačen zelenými šipkami. Pruhy jsou vyrovnány podle referenčních pozic ve standardu a sousední analogické proužky (*bandy*) se vyrovnávají, to je patrné na proužku reprezentující *A. pullulans*, který je přítomný ve všech vzorcích (červeně vyznačený). Ve výsledném *alignmentu* pruhů je jen jedna dvojice standardů.

V každém sloupci byla zhodnocena přítomnost či nepřítomnost proužků a kvantifikována jejich intenzita na základě výšky vrcholů denzitometrické křivky v daných pozicích proužků na gelu. Proužky, které byly podloženy viditelnými vrcholy na denzitometrické křivce, byly označeny jako platné pozice. V tomto kroku se tedy rozhoduje co bude považováno za fragmenty a co za artefakty nebo pozadí. Poslední úpravou byl takzvaný *band matching*, který slouží k vyrovnávání drobných odchylek v rychlosti putování identických fragmentů mezi sousedícími sloupci. Zde je třeba definovat toleranci s jakou budou podobné proužky v různých sloupcích považovány za identické. Doporučené hodnoty pro nastavení této poziční tolerance pro každé srovnávání gelů byly získány volbou automatické optimalizace.

Pro získání představ o vzájemné podobnosti ve složení společenstev byla provedena shluková analýza (*Cluster analysis*). Data byla nejprve zpracována do podobnostní matice (*similarity matrix*) prostřednictvím Pearsonovy korelace založené na údajích o přítomnosti či nepřítomnosti proužků, jejich pozici na gelu a relativní intenzitě zjištěné z denzitometrické křivky. Na základě výsledné matice program sestavoval dendrogramy algoritmem UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Získané dendrogramy byly s měřítkem procentuální míry podobnosti (*similarity value*), hodnotami platnosti uzlů (*cophenetic correlation*), graficky znázorněnými směrodatnými odchylkami (*error flags*) a příslušnou fotografií normalizovaného gelu exportovány jako formát PDF pro další úpravy v grafickém programu Adobe Illustrator CS3 (13.0.0)

## 5. Výsledky

---

### 5.1. CFU

Koncentrace životaschopných jednotek (CFU) obsažených v suspenzích získaných omýváním listů je zaznamenána v grafu 1 (kap. 5.4.2., str. 36) Hodnoty byly vypočteny jako průměr ze tří opakování. Z grafu je patrný pozvolný nárůst koncentrace zpočátku sezóny a mírný pokles na konci sezóny. Graf 2 (kap. 5.4.2., str. 37) představuje průměrné hodnoty CFU z obou zdravých, respektive infikovaných stromů. Na něm je vidět, že ve vzorcích z infikovaných stromů byla v průběhu sezóny stabilně vyšší koncentrace životaschopných partikulí. Zjištěné trendy zachycují koncentraci CFU v suspenzích a nelze je vztahovat na celé společenstvo, protože vzorky nebyly odebírány ze standardně velké listové plochy. Lze je ale korelovat s počty proužků (fragmentů) zjištěných při DGGE.

### 5.2. Kultivace

Z povrchu listů se podařilo izolovat čisté kultury mikromycet. Velká část druhů, jako například *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium culmorum* či *Trichoderma viride*, se v izolátech velmi často opakovala. Druhové složení z větší části odpovídalo houbám běžně izolovaným z fyloplánu a ze vzduchu (Inácio *et al.* 2002, Sadaka a Ponge 2003, Fonseca a Inácio 2006). Většinou se jednalo o široce specializované deuteromycety. Některé z identifikovaných druhů se vyznačují fungicidními vlastnostmi, které mohou ovlivňovat společenstvo.

Výskyt zbývajících druhů byl spíše náhodný a nelze je považovat za charakteristické pro listy dubů, nebo dokonce dubů infikovaných padlí. Například *Cytospora chrysosperma* parazituje v kůře listnatých stromů, takže nálet jejích spór bude běžnou součástí každého arboreta. Podobně *Sordaria fimicola* je běžně přítomná ve výkalech herbivorů a její spóry budou rovněž hojné ve vzduchu. Specializace a taxonomická klasifikace jednotlivých druhů z kultur jsou uvedeny v tabulce 4. (viz. Příloha).

### 5.3. Sekvenace kultur

Amplifikace a následná oboustranná sekvenace markeru ITS1-5.8S-ITS2 prostřednictvím primerů ITS1 a ITS4 poskytla fragmenty o délce 500-600 párů bazí.



Část kultur, která podle sekvenční informace vykazovala kontaminaci (překrývající se vrcholy spektrometrické křivky), byla vyřazena.

Sekvence obou řetězců byly porovnány v programu BioEdit 7.0.5.3. (Hall 1999), vzájemně opraveny do tzv. *contig* sekvencí, které byly porovnány s databází GenBank<sup>®</sup> nástrojem BLAST<sup>®</sup>. Porovnání s databází potvrdilo rodovou příslušnost kultur a umožnilo blíže určit většinu druhů. Výsledkem byla sbírka obsahující 18 askomycet a 1 zygomycetu. Seznam druhů, jejich specializace, taxonomická příslušnost, velikost ITS fragmentů a numerická specifikace shody se záznamy v databázi jsou uvedeny v tabulce 4. (viz. Příloha). V případě rodů *Cladosporium* a *Fusarium* nepomohlo sekvenování molekulárního markeru k jejich bližšímu určení. Sekvence rodu *Alternaria* měla stejnou shodu s druhy *A. alternata* a *A. tenuissima*, podobně měl stejnou shodu rod *Sclerotinia* s druhy *S. fuckeliana* a *S. sclerotinium*. V obrázcích jsou tyto nerozlišené druhy označeny jako *Alternaria sp.* a *Sclerotinia sp.*

#### 5.4. DGGE

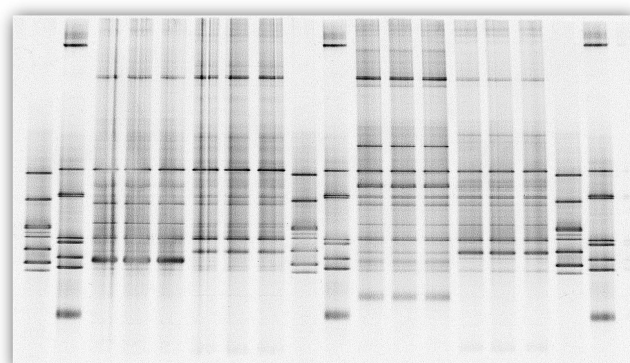
Podařilo se optimalizovat běh denaturační elektroforézy pro zvolený typ vzorků, sestavit standard z čistých kultur a vytvořit 4 gely s *fingerprinty* společenstev.

Všechny druhy obsažené ve sbírce vyjma dvou tvořily na gelu jeden specifický proužek. Kultury 4 (*Trichoderma atroviride*) a 18 (*Mucor hiemalis*) se vyznačovaly přítomností dvou fragmentů. Za platný byl považován vždy ten silnější proužek. Většina proužků ve standardu charakterizujících jednotlivé druhy ve sbírce zůstala dobře rozlišitelná.

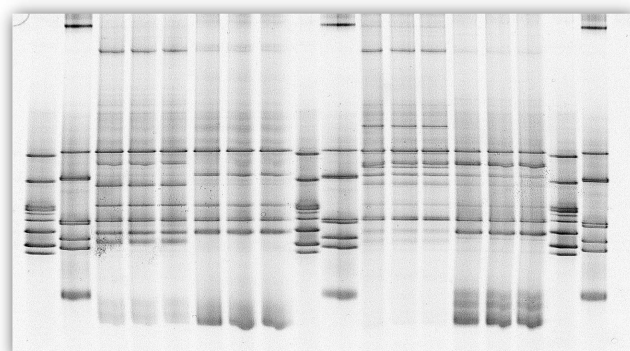
Optimalizace probíhala při vytváření standardu. K nastavení optimálních podmínek bylo potřeba 4 běhů DGGE. Ukázalo se, že parametrem, který bylo potřeba upravovat, bylo elektrické napětí. Rozdíl v potřebném napětím byl patrně způsoben odlišnou velikostí použitých gelů. Nikolcheva *et al.* (2005) použili zařízení DCode mutation detection system (Bio-Rad), které používá gel o velikosti 16 x 20 cm, kdežto námi použité zařízení (INGENYphorU) nese gely o rozměrech 28 x 18 centimetrů.

Každý ze čtyř gelů (obr. 10., další strana) reprezentuje jeden sběr vzorků, čili složení společenstva ve fytoplánu sledovaných stromů ve stejné době. Všechny *fingerprinty* z části nesou určitý základní společný vzorec a z části jsou variabilní. Proužky, které odpovídají standardu jsou znázorněny na obrázku 11 (str. 33).

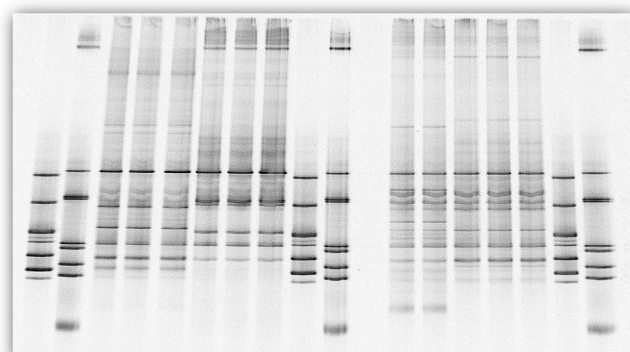




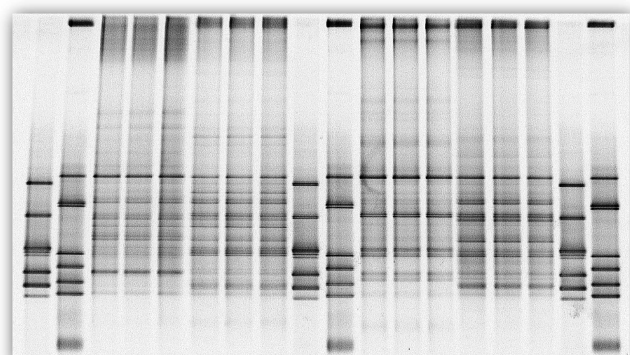
Gel 1.  
26. květen



Gel 2.  
18. červenec



Gel 3.  
25. srpen



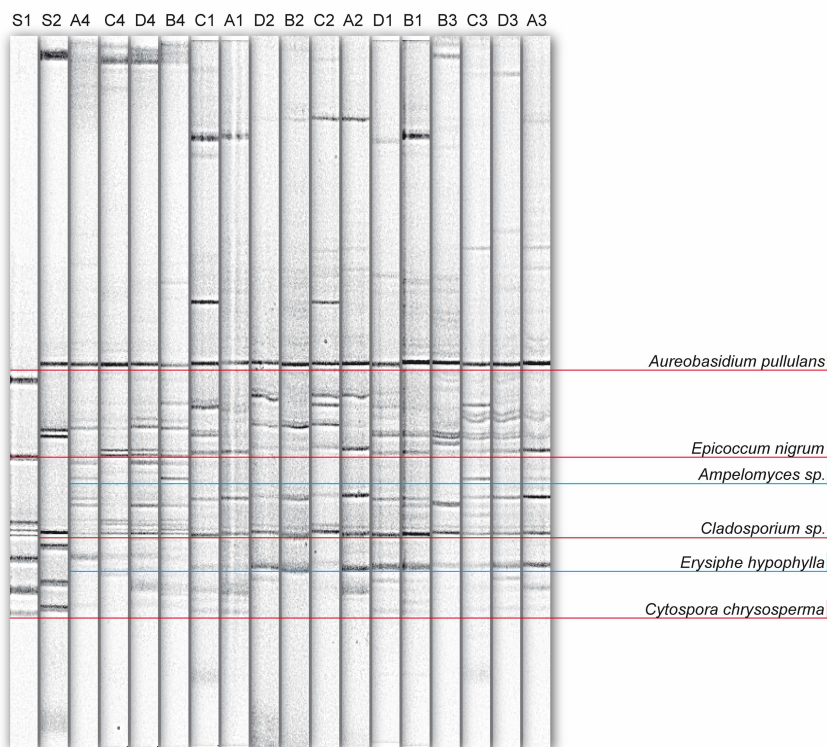
Gel 4.  
3. říjen

**Obr. 10.** DGGE gely s *fingerprinty* společenstev. Každý gel reprezentuje jeden sběr vzorků. Pořadí vzorků (sloupců) je vždy: 1. a 2 standard, 3x vzorek A(3 opakování PCR), 3x B, 1. a 2. std., 3x C, 3x D a opět 1. a 2. standard. První sloupec vzorku C ve třetím gelu schází (chyba při nanášení).

Na první pohled je patrné, že ve všech vzorcích je přítomen výrazný proužek odpovídající *A. pullulans* ve standardu. *A. pullulans* je velice hojná dimorfní askomyceta obecně charakteristická pro fytoplán rostlin.

Další nalezená pozice se nachází v části gelu, kde se proužek reprezentující *Cladosporium sp.* těsně překrývá s proužky pro druhy *Sordaria fimicola*, *Fusarium sp.*, *Leucostoma niveum* a *Trichoderma viride* ve druhém standardu. Celá tato oblast gelu obsahuje v průběhu sezóny podobný vzorec u všech stromů. Výskyt těchto hub na listech je, mimo *S. fimicola*, přibližně stejně pravděpodobný a proto je těžké posoudit o které se jedná.

Ve třech vzorcích z konce sezóny (B6, C6 a D6) je velmi dobře rozlišitelný proužek odpovídající standardu pro *Epicoccum nigrum*. Tato houba většinou napadá mrtvá a odumírající rostlinná pletiva, což vysvětluje její výskyt na listech v této době a je možné jí považovat za významnou součást společenstva. Ostatní proužky v gelech buď neodpovídají standardu, nebo je lze jen těžko rozlišit.



**Obr. 11.** Identifikace taxonů ve společenstvu podle přítomnosti proužků na gelu. Korelace všech čtyř gelů. Velké písmeno znamená strom a přiřazená číslice sběr (např.: A1 = strom A, první sběr). S1 a S2 jsou standardy. Červeně označené pozice na gelu odpovídají standardu. Modré se podařilo identifikovat prostřednictvím reamplifikace a sekvenace fragmentu. V oblast označená jako *Cladosporium sp.* dochází k překryvu obou standardů a také ve vzorcích společenstev je přítomno více fragmentů. Podle standardu může být zaměněn s druhy *Sordaria fimicola*, *Fusarium sp.*, *Leucostoma niveum*, nebo případně *Trichoderma viride* (třetí proužek odshora v prvním sloupci). Fotografii byl dodatečně upraven kontrast pro lepší znázornění proužků.

#### 5.4.1. Reamplifikace a sekvenace

Většina reamplifikací extrahovaných fragmentů byla úspěšná, zbytek (přibližně 20%) poskytl velmi slabý produkt nebo neamplifikoval vůbec. Silné produkty byly znovu podrobeny DGGE a v naprosté většině případů obsahoval jeden vyřiznutý reamplifikovaný proužek více různých fragmentů.

Amplikony, které podle výsledků DGGE obsahovaly samostatný fragment, byly sekvenovány. Ze 16-ti prvních sekvenací vzešlo pouze 6 použitelných sekvencí, ostatní byly kontaminované. Porovnáním s databází nástrojem BLAST<sup>®</sup> se podle sekvencí podařilo identifikovat rod *Ampelomyces*, *Erysiphe hypophylla* a potvrdit platnost pozice pro *Aureobasidium pullulans* obsažené ve standardu (viz. Příloha).

Rod *Ampelomyces* představuje zajímavou skupinu hyperparazitů široce specializovaných na padlí (*Erysiphaceae*). Jeho výskyt byl zaznamenán na různých vývojových stádiích 65-ti druhů padlí, takže jeho výskyt není nikterak překvapující (Kiss 1998, Kiss *et al.* 2004). Fylogenetická analýza oblasti ITS vnesla do taxonomie rodu *Ampelomyces* řadu nejasností (Kiss a Nakasone 1998). To je možná způsobeno tím, že je rod *Ampelomyces* často zaměňován s druhem *Phoma glomerata*, který rovněž parazituje padlí (Sullivan a White 2000). Výskyt *Ampelomyces* jsme zaznamenali ve vzorcích ze druhé poloviny sezóny, nicméně v žádném vztahu k závažnosti infekce padlí (vzorky A4, C4, A6 a B6 na obr. 11.).

*Erysiphe hypophylla* je součástí monofyletické větve označované jako *Erysiphe alphitoides sensu lato*, která obsahuje morfologicky téměř identické druhy *E. epigena*, *E. hypogena*, *E. hypophylla*, *E. quercicola* a *E. alphitoides s. str.* (Takamatsu *et al.* 2007). *E. hypophylla* se objevila různou měrou téměř ve všech ve vzorcích, mimo posledního sběru.

#### 5.4.2. Softwarová analýza

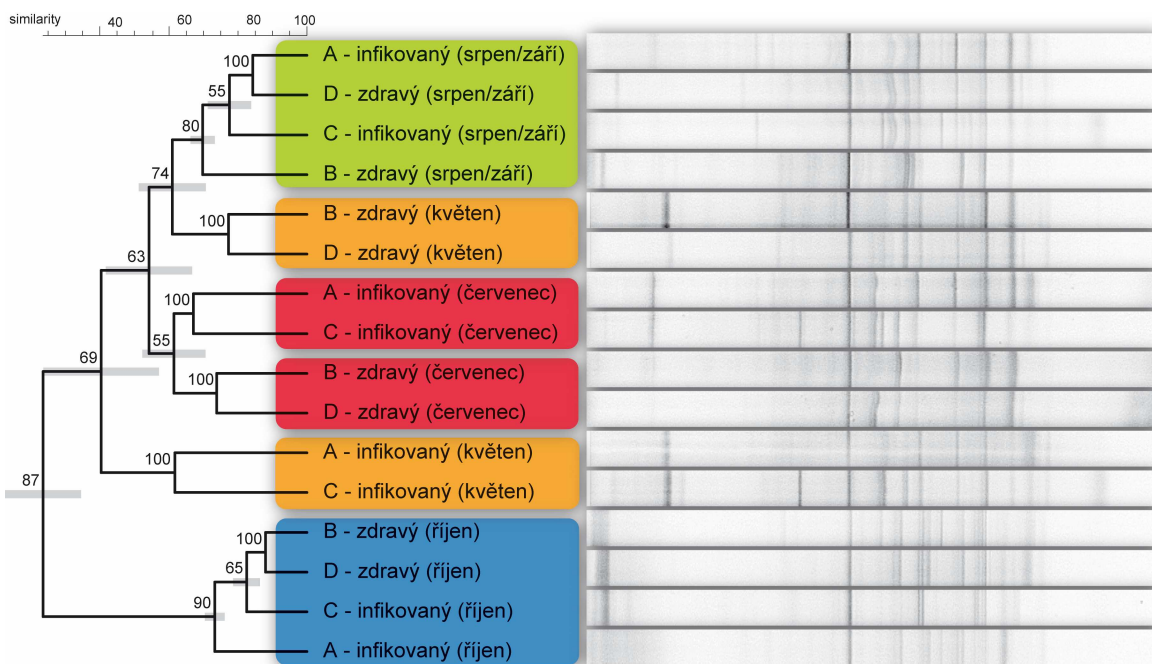
Program GelCompar II<sup>®</sup> umožnil citlivé srovnání *fingerprintů* na základě pořízených fotografií. Výstupem je statisticky vyhodnocený dendrogram znázorňující míru podobnosti ve složení společenstev a její vývoj v průběhu celé sezóny (obr. 12).

*Fingerprinty* prvních vzorků z konce května tvoří v dendrogramu dvě vzdálené větve, přičemž zdravé, respektive napadené vzorky se sdružují („klastují“). Lze tedy vyvozovat, že na počátku sezóny, kdy se začínají objevovat první myceliální kolonie na povrchu listů, se společenstvo na infikovaných listech značně odlišuje od společenstva na listech zdravých.

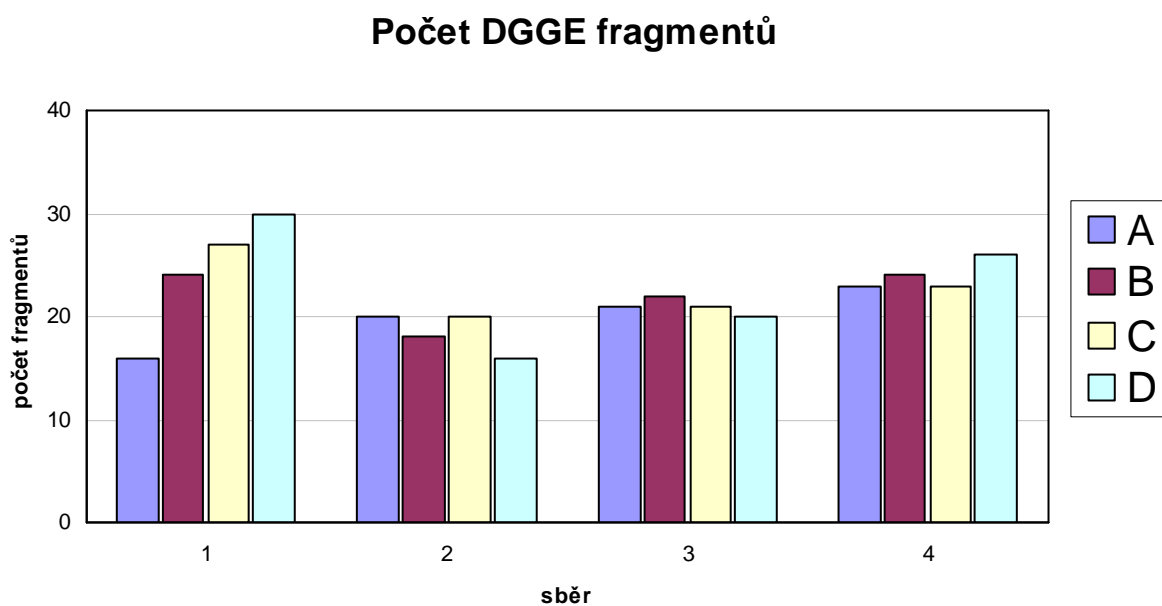
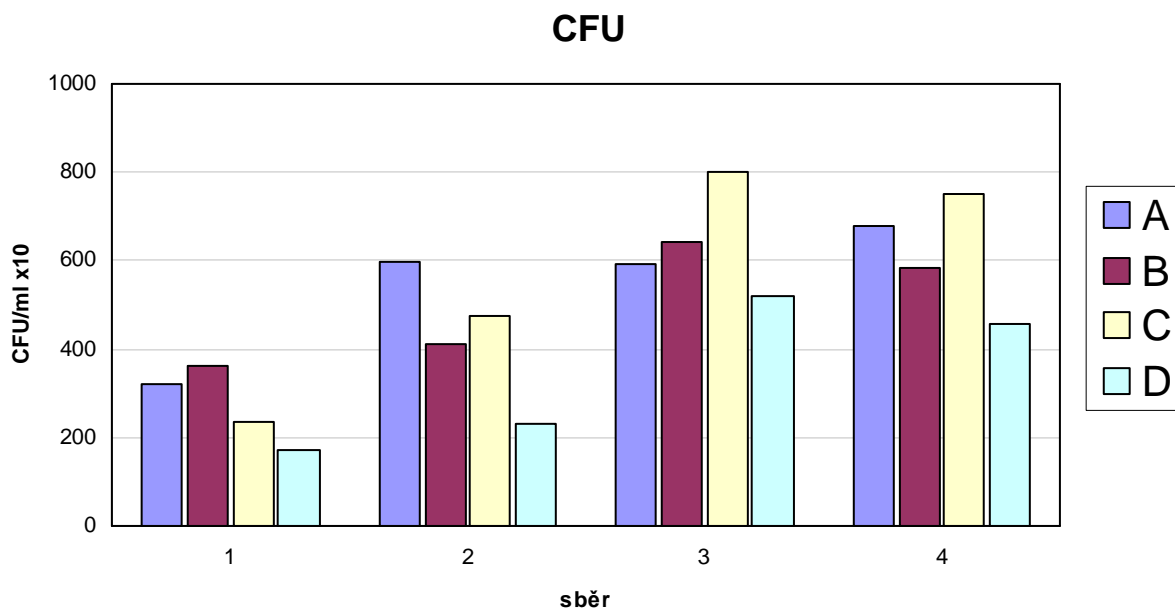
Dva vzdálené infikované stromy ukazují vzájemně podobnější vzorec *fingerintu*, než dva stromy rostoucí v těsné blízkosti. Věrnost těchto podobností je podpořena hodnotami kofenetické korelace.

Odběry z poloviny července už jsou sdruženy na společné větvi, nicméně infikované, respektive zdravé stromy, stále klastrují spolu. Věrnost větví je rovněž silně podpořena. Koncem léta (srpen/září) již nejsou rozdíly mezi silně infikovanými a zdravými stromy tak patrné. Na konci vegetační sezóny, v říjnu, dochází k výrazné proměně společenstva.

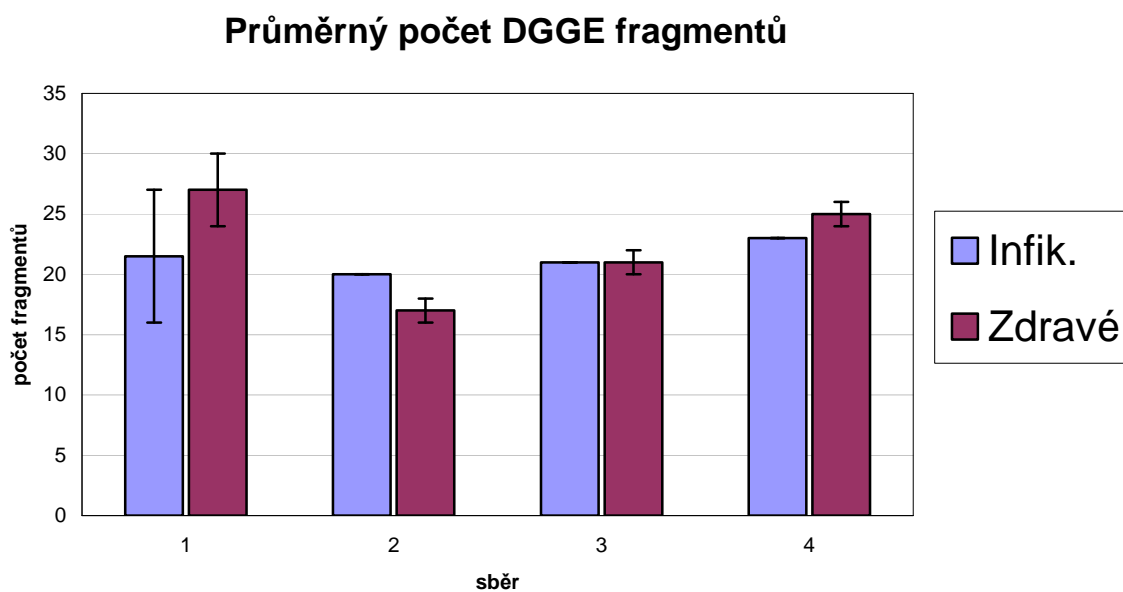
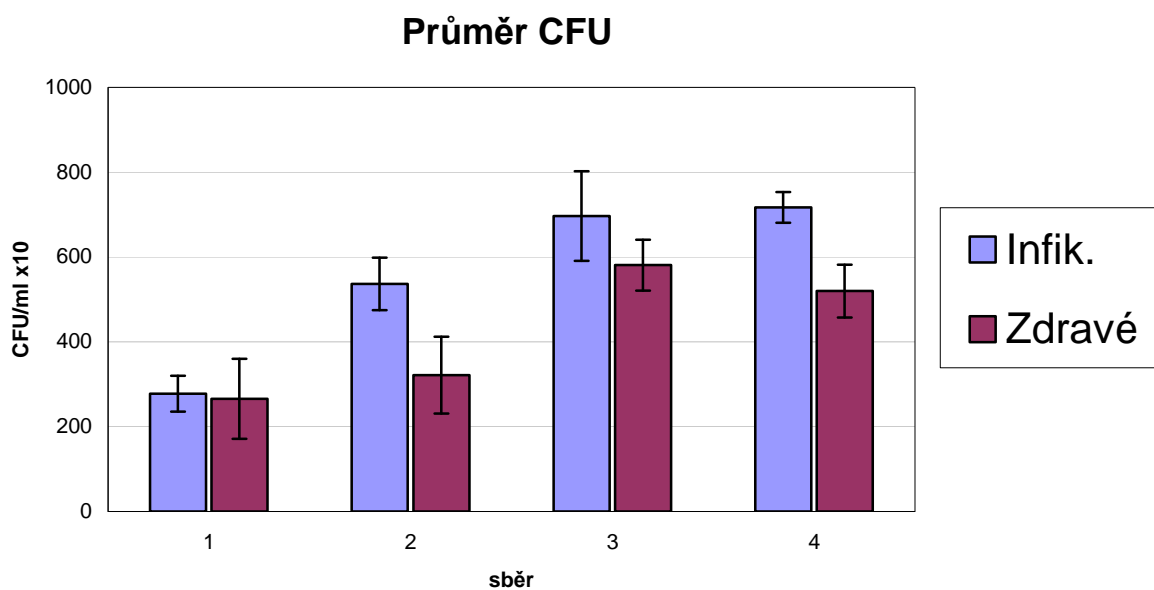
Počty druhů (fragmentů ve *fingerintu*) ve vzorcích společenstva v průběhu sezóny jsou zachyceny v grafu 3. (str. 36) Je v něm patrné, že počet druhů je zpočátku sezóny vyšší, v létě prochází poklesem a ve druhé polovině sezóny mírně stoupá. Ve srovnání s počty CFU v grafu 1. vychází, že druhová diverzita je v tomto případě nepřímo úměrná počtu životaschopných partikulí přítomných na listu. Grafy 2. a 4. (str. 37) porovnávají průměrné počty druhů a průměrné CFU mezi napadenými a zdravými stromy.



**Obr. 12.** Dendrogram vytvořený algoritmem UPGMA, založený na Pearsonově korelaci *fingerintů* společenstev v průběhu celé sezóny. Barevně jsou vyznačeny jednotlivé sběry vzorků. Měřítko je vyjádřením procentuální podobnosti větví. Čísla v uzlech jsou hodnotami kofenetické korelace vyjadřující věrohodnost uzlů. Šedé pruhy v uzlech (*error flags*) znázorňují směrodatné odchylky. Vytvořeno v programu GelCompar<sup>®</sup> II, upraveno v programu Adobe Illustrator CS3.



**Grafy 1. a 3.** Srovnání počtu CFU/ml a počtu fragmentů přítomných v suspenzích (stromy A, B, C a D). Na počtu životaschopných partikulí (CFU) v suspenzi omyté z listů je vidět nárůst hodnot v průběhu sezóny a mírný pokles na jejím konci. Hlavně na začátku sezóny je vidět nepřímý úměrný vztah mezi CFU a počtu fragmentů (taxonů) nalezených pomocí DGGE v téže suspenzi.



**Grafy 2. a 4.** Nahoře CFU/ml v 10x zředěné suspenzi opláchnuté z listů (5-7 ks) stromů infikovaných (A a C) a zdravých (B a D) v průběhu vegetační sezóny. Dole počty fragmentů přítomných v suspenzích. Na prvním grafu je dobře patrný postupný nárůst CFU v průběhu sezóny a mírný pokles na jejím konci. Suspenze získané omýváním listů z infikovaných stromů obsahovaly v průměru více životaschopných partikulí než ze stromů zdravých. Na začátku a konci sezóny je četnost životaschopných partikulí nepřímě úměrná počtu přítomných taxonů (spodní graf). Celkové trendy grafů jsou přibližně opačné. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.

## 6. Diskuze

---

Z uvedených výsledků lze vyčíst, že existuje vztah mezi infekcí *E. alphitoides* a strukturou společenstva na povrchu listů.

V dendrogramu na obrázku 12. (str. 35) je vidět, že se všechny odběry, mimo prvního, sdružují na společných větvích. Vzorky z počátku sezóny, kdy se objevují první známky infekce, vytvářejí dvě vzdálené větve, které odpovídají míře infikovanosti stromů. Společenstva na listech infikovaných, resp. zdravých stromů jsou si zpočátku více podobné, než společenstva na stromech, které jsou tak blízko sebe, že se dotýkají korunami. Postupem času tato podobnost klesá. Z toho je možné vyvozovat, že společenstvo je pro stromy charakteristické ještě než se objeví infekce a tudíž, že složení společenstva má vliv na nástup infekce. Složení tohoto společenstva bude patrně ovlivněno vlastnostmi samotného stromu. Z toho důvodu by bylo vhodné porovnávat infikovanost a složení společenstva na listech se společenstvem mykorhizních hub v kořenovém systému a zvážit ho jako další faktor ovlivňující patogenezí padlí. Podobně by bylo vhodné na základě vhodně zvoleného markeru charakterizovat genetické pozadí stromů ve vztahu k infekci.

Existuje zde také určitá sezónní dynamika koncentrace kultivovatelných organismů (CFU) na povrchu listu. Sezónní proměny CFU v suspenzích, z nichž byla extrahována DNA, jsou nepřímo úměrné změnám v druhové diverzitě zjištěné molekulární cestou. Infikované stromy se tedy vyznačují nižší druhovou diverzitou, ale na druhou stranu vyšší koncentrací CFU oproti stromům zdravým. Vyšší diverzita pravděpodobně přispívá ke stabilnějšímu ekosystému na povrchu listů a tím omezuje vliv agresivního parazita. Tento mechanismus odpovídá obecným závěrům o tom, že vyšší diverzita má kladný vliv na stabilitu prostředí (Ives a Carpenter 2007).

Vyšší koncentrace CFU na infikovaných listech může být také způsobena tím, že mycelium padlí zvětšuje povrch listu a proto se na něm zachytává větší množství vzdušných spór. Je také pravděpodobné, že se bude na infikovaných listech zachytávat více prachu. Prach potom může sloužit jako výživa pro určité spektrum mikromycet, které ve společenstvu převládnu. Je tedy možné, že nižší diverzita společenstva na začátku sezóny přispěje k invazi padlí, které sekundárně pozmění podmínky na povrchu listu a tím i celé společenstvo. Je ovšem nutné poznamenat, že údaj o koncentraci CFU je v případě hub velmi přibližná hodnota zatížená řadou chyb. Vysoká denzita kolonií na některých miskách sčítání CFU značně komplikovala, navíc se může rozpad mycelií projevit, na počtu kolonií.



Kultivací se podařilo z fyloplánu izolovat celou řadu mikromycet, jejichž spóry jsou běžnou součástí ovzduší. Většinu z nich je možné nalézt i v jiných prostředích, třeba v půdě. Jen 4 z 19-ti těchto hub se objevilo ve *fingerprintech* společenstva. Tento značný rozdíl by bylo možné vysvětlit odlišnou úspěšností při extrakci DNA, ale DNA ze vzorků kultur byla extrahována za stejných podmínek, jako u vzorků společenstev. Zdá se, že houby, jež se podařilo izolovat kultivací a nebyly potvrzeny ve *fingerprintech*, nejsou charakteristickou složkou společenstva. Patrně se jedná o dormantní spóry hub, které jsou přítomné prakticky všude a pouze „vyčkávají na příležitost“, kterou může být v prostředí fyloplánu například sekundární infekce nekrotizujících pletiv, nebo rozklad opadaných listů. Příležitostí pro tyto houby je bohužel také médium, použité k jejich izolaci a to je zásadním zdrojem zkreslení při využití kultivace k popisu složení společenstva mikroorganismů.

Zajímavým jevem je stabilní a vysoký výskyt dimorfní kvasinky *Aureobasidium pullulans*. Obrovská fenotypová plasticita umožňuje *A. pullulans* obývat širokou škálu prostředí (Slepecky a Starmer 2009). Je považována za jednoho z hlavních epifytních kolonizátorů fyloplánu. Vzhledem k tomu, že produkuje antibiotika a fungicidní látky, byla také úspěšně testována jako biologická ochrana (Schena *et al.* 2002).. V případě parazitovaných dubů je *A. pullulans* přítomno ve všech vzorcích přibližně stejnou měrou a neprojevuje žádný vztah infekci.

Výskyt hyperparazita padlí *Ampelomyces sp.* byl hlavně ve vzorcích z napadených stromů ve druhé polovině sezóny. Je vidět, že *Ampelomyces* sleduje s mírným zpožděním rozvoj a rozšíření svého hostitele (padlí), což je obecně charakteristické pro všechny parazity.

Nález *Erysiphe hypophylla* ve většině našich vzorků vnáší do problematiky *E. alphitoides s. lato.* další nejasnosti. O *E. hypophylla* je známo, že je podle morfologických znaků sotva rozlišitelná a status druhu byl mnohokrát zpochybňován. Takamatsu *et al.* (2007) sice potvrdili že *E. hypophylla* je samostatným druhem, nicméně jediným podstatným morfologickým znakem, odlišujícím *E. hypophylla* od *E. alphitoides s. stricto*, je mírně rozdílný tvar konidií (anamorfních spór), přičemž je výskyt její anamorfy považován za vzácný. Výskyt fragmentu identifikovaného jako *E. hypophylla* není mezi vzorky nikterak vázán s intenzitou infekce *E. alphitoides*. Zároveň se ve *fingerprintech* nepodařilo identifikovat proužek reprezentující *E. alphitoides*, proto nelze potvrdit ani vyvrátit, že by *E. hypophylla* byla samotným infekčním agens padlí na těchto stromech. Je také možné považovat tento výskyt za směšnou infekci oběma druhy.



Metodický přístup ke studiu společenstva hub prostřednictvím DGGE přinesl zcela nový pohled na problematiku *E. alphitoides s. lato* ve vztahu k prostředí fyloplánu hostitelských stromů. DGGE v kombinaci s moderními softwarovými nástroji umožňuje velice dobře porovnávat diverzitu společenstev cílové skupiny organismů, její dynamiku a vliv významných faktorů. Jedním z hlavních nedostatků metody je obtížná izolace fragmentů z gelu. Při manipulaci s gelem patrně dochází ke značné kontaminaci, protože v průběhu konečného zpracování je opakovaně navlhčován destilovanou vodou, takže se přítomná DNA snadno roznese po celém povrchu gelu. Identifikaci taxonů ve *fingerpruntech* by bylo vhodné doplnit klonovacími technikami. Přínosné by rovněž bylo vytvořit z izolovaných fragmentů klonovou knihovnu a tu použít k vytvoření standardu. Takový standard by umožnil identifikovat nekultivované organismy ve společenstvu s větší přesností.

Je vysoce pravděpodobné, že při izolaci DNA ze společenstva dochází k velkému zkreslení právě díky odlišným vlastnostem buněčných stěn různých mikromycet. Optimální postup by měl nejspíš zahrnovat několik různých metod extrakce DNA pro každý vzorek společenstva, popřípadě několik různých ředění templátu pro PCR.

Vybraný marker byl ideálním kompromisem mezi délkou a specificitou. Narazili jsme ale na to, že rozsáhlé záznamy ITS oblasti hub v databázi GenBank nejsou vždy věrohodné a přesné, na což ostatně poukazuje Seifert (2008). Tyto nedostatky má nejspíš částečně na svědomí značný chaos v taxonomii imperfektních hub (umělá taxonomická skupina *Deuteromycota*) a existence kryptických druhů. Rovněž je třeba mít na mysli, že klasifikace mikromycet vyžaduje značné zkušenosti a proto nemusí být všechny sekvence v databázích přiřazeny ke správným druhům.

Studium prostředí podmíněné mnoha faktory zjevně vyžaduje adekvátní počet metodických přístupů. Vhodným doplněním mohla být také kvantifikace patogenu využitím specifického markeru v kombinaci s Real-Time PCR, nebo kvantifikace celkové biomasy hub prostřednictvím chromatografického měření obsahu ergosterolu.

Z hlediska statistické prokazatelnosti toho, co nazačují naše výsledky, by bylo na místě pokus zopakovat v další sezóně a případně rozšířit počet sledovaných stromů, nebo vytvořit analogickou skupinu stromů v dostatečně vzdálené lokalitě. Rozšíření počtu sledovaných stromů by umožnilo ještě blíže charakterizovat společenstvo specifické pro fyloplán dubů a odfiltrovat nesespecifické změny způsobené disturbancemi.

## 7. Shrnutí

---

Prostřednictvím DGGE v kombinaci s univerzálním molekulárním markerem byly úspěšně popsány rozdíly ve složení společenstev na povrchu listů dubu letního *Q. robur* v závislosti na přítomnosti padlí dubového *E. alphitoides*.

Využití molekulárních metod v kombinaci s klasickým přístupem ke studiu specifického společenstva mikromycet nám umožnilo nahlédnout do ekologických zákonitostí natolik extrémního mikrohabitatu, jakým je povrch listů vzrostlých stromů. Bylo odhaleno, že jen nepatrná část organismů, jež lze izolovat ze společenstva kultivací, se aktivně podílí na jeho druhové diverzitě. Většinu takto izolovaných mikromycet pravděpodobně představuje nálet spor kosmopolitních druhů.

Vzájemným porovnáním *fingerprintů* společenstev jsme získali představu o podobnosti v jejich složení a proměnách v čase. Bylo zjištěno, že spektrum druhů je charakteristické podle závažnosti infekce patogenem *E. alphitoides*, že se tato specificita v průběhu sezóny snižuje. Výsledky také naznačují nepřímou závislost mezi druhovou diverzitou společenstva a následnou invazí patogenu. Podařilo se identifikovat několik základních houbových organismů, které jsou na listech přítomné po celou sezónu.

## 7. Použitá literatura

---

**Amend A. S., Seifert K. A., Bruns T. D.** (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19(24): 5555-65.

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

**Bailey M. J., Lilley A. K., Timms-Wilson T. M., Spencer-Phillips P. T. N.** (2006) *Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces* (1<sup>st</sup> ed.). CABI. ISBN-10: 1845930614.

**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*. Elsevier. Kap. 7: 105-126.

**Day W. R.** (1927) The oak mildew *Microsphaera quercina* (Sch. W.) Burrill and *Armillaria mellea* (Bahl) Qél in relation to the dieback of oak. *Forestry* 1: 108-112.

**Desprez-Loustau M.-L., Feau N., Mougou-Hamdane A., Dutech C.** (2011) Interspecific and intraspecific diversity in oak powdery mildews in Europe: coevolution history and adaptation to their hosts. *Mycoscience* 52: 165-173.

**Ellis M. B., Ellis J. P.** (1995) *Microfungi on Land Plants: An Identification Handbook*. Slough: The Richmond Publishing, 10868 s. ISBN 0-85546-246-9.

**Ellis M. B.** (1971) *Dematiaceous hyphomycetes*. CABI Publishing. ISBN-10: 0851986188.

**Fernández-Ortuño D., Torés J. A., de Vicente A., Pérez-García A.** (2008). Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int. Microbiol.* 11: 1-9.

**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

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

**Gordon T. R., Duniway J. M.** (1982) Effects of Powdery Mildew Infection on the Efficiency of CO<sub>2</sub> Fixation and Light Utilization by Sugar Beet Leaves. *Plant Physiol.* 69: 139-142.

**Hall T.A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

**Hedh J., Samson P., Erland S., Tunlid A.** (2008) Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycological Research* 112: 965-975.

**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.

**Ives A. R., Carpenter S. R.** (2007) Stability and Diversity of Ecosystems (Review). Science 6 (317): 58-62.

**Kavanagh K.** (2005) Fungi Biology and Applications. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England. ISBN 0-470-86701-9.

**Karakousis A., Tan L., Ellis D., Alexiou H., Wormald P. J.** (2006) An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. Journal of Microbiological Methods Volume 65 (1): 38-48.

**Kiffer E., Morelet M., Morelet Michel.** (1999) The *Deuteromycetes*: Mitosporic Fungi Classification and Generic Keys. Science Pub Inc.

**Kiss L.** (1998) Natural occurrence of *Ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. New Phytologist 140: 709-714.

**Kiss L., Nakasone K. K.** (1998) Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. Current Genetics (1998) 33: 362-367.

**Kiss L., Russell J. C., Szentiványi O., XU. X., Jeffries P.** (2004) Biology and Biocontrol Potential of *Ampelomyces* Mycoparasites, Natural Antagonists of Powdery Mildew Fungi. Biocontrol Science and 14 (7): 635-651.

**Le Quéré A., Astrup E. K., Rajashekar B., Schützendübel A., Canbäck B., Johansson T., Tunlid A.** (2006) Screening for rapidly evolving genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* using cDNA microarrays. Molecular Ecology 15: 535-550.

**Leibinger W., Breuker B., Hahn M., Mendgen K.** (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. Phytopathology 87: 1103-1110.

**Leigh M. B., Neufeld J., Taylor D. L.** (2010) Clone libraries of ribosomal RNA gene sequences for characterization of bacterial and fungal communities. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Timmis K.N., McGenity T., Meer J. R., Lorenzo V., eds. Springer, Berlin Heidelberg. pp 3969-3993.

**Leventin E., Dorsey K.** (2006) Contribution of leaf surface to the air spora. Aerobiologia 22: 3-12.

- Lesemann S. S., Schimpke S., Dunemann F., Deising H. B.** (2006) Mitochondrial heterolasmia for the cytochrome *b* gene controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell.& Ev.) Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113 (6): 259-266.
- Lim Y. W., Kim B. K., Kim C., Jung H. S., Kim B. S., Lee J. H., Chun J.** (2010) Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. *Journal of Microbiology* 48(3): 284-9.
- Limkaisang S., Cunnington J. H., Wui L. K., Salleh B., Sato Y., Rangsi Divarangkoon R., Fangfuk W., To-anun C., Takamatsu S.** (2006) Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience* 47 (6): 327-335.
- 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.
- May L. A., Smiley B., Schmidt M. G.** (2001) Comparative denaturing gradient gel electrophoresis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 829-841.
- 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.
- Mougou A., Dutech C., and Desprez-Loustau M.-L.** (2008) New insight into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *For.Pathol.* 38: 257-287.
- Mougou-Hamdane A., Girese X., Dutech C., Desprez-Loustau M.-L.** (2010) Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann.For.Sci.* 67 (212): 1-9.
- Marçais B., Kavkova M., Desprez-Loustau M.-L.** (2009) Phenotypic variation in the phenology of ascospore production between European populations of oak powdery mildew. *Ann.For.Sci.* 66 (814) 1-8.
- 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.
- 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.

**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. 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., Bourque T., Bärlocher F.** (2005) Fungal diversity during initial stages of leaf decomposition in a stream. *Mycol. Res.* 109 (2): 246-253.

**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.

**Peñaloza-Ramírez J. M., González-Rodríguez A., Mendoza-Cuenca L., Caron H., Kremer K., Oyama K.** (2010) Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of Botany* 105 (3): 389-399.

**Rajashekar B., Samson P., Johansson T., Tunlid A.** (2007) Evolution of nucleotide sequences and expression patterns of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 174: 399-411.

**Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning 1: A laboratory manual*. 2nd. edit. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,. ISBN 0-87969309-6.

**Sadaka N., Ponge J.-F.** (2003) Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rotundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Morocco). *Biology and Fertility of Soils* 39 (1): 30-36.

**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.

**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.

**Seifert K.A., Samson R. A., Jeremy R.** (2007) Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *PNAS* 104 (10): 3901-3906.

**Slepecky R. A., Starmer W. T.** (2009) Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101 (6): 823-832.

**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.

**Trocha L. K., Mucha J., Eissenstat D. M., Reich P. B., Oleksyn J.** (2010) Ectomycorrhizal identity determines respiration and concentrations of nitrogen and non-structural carbohydrates in root tips: a test using *Pinus sylvestris* and *Quercus robur* saplings. Tree Physiology 30: 648-654.

**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.

**Watanabe T.** (2002) Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species – 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida 33431.

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

**White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: a guide to methods and applications 315-322. Academic Press, New York.

**Wilson C. L., Chalutz E.** (1989) Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonist yeasts and bacteria. Scientia Horticulturae 40: 105-112.

**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.

## Internet

<http://www.applied-maths.com>

<http://www.frac.info/frac/index.htm>

<http://www.lutzonilab.net/primers/index.htm>

<http://www.mycology.adelaide.edu.au>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://wasabi.lutzonilab.net/pub/primers/viewPrimers>

## 9. Příloha

	Druh	Velikost frag. (bp)	Total score	Query coverage	E value	Max. identity	Taxonomické zařazení	Specializace
1	<i>Alternaria alternata /tenuissima</i>	549	1014	100%	0.0	100%	Ascomycota, Pleosporales	ubikvitní saprofyt, častý fakult.parazit rostlin
2	<i>Arthrinium arundinis</i>	561	1037	100%	0.0	100%	Ascomycota, Sordariales	saprofyt, fakult. parazit rostlin i živočichů, fungicidní látky
3	<i>Aspergillus clavatus</i>	575	1035	99%	0.0	99%	Ascomycota, Eurotiales	ubikvitní saprofyt, výjimečně fakult. parazit
4	<i>Aspergillus versicolor</i>	558	1013	99%	0.0	99%	Ascomycota, Eurotiales	saprofyt, výjimečně fakult. parazit
5	<i>Aureobasidium pullulans</i>	580	1038	100%	0.0	99%	Ascomycota, Dothideales	ubikvitní dimorfní epifyt a endofyt
6	<i>Chaetomium globosum</i>	601	1086	97%	0.0	100%	Ascomycota, Sordariales	saprofyt, výjimečně parazit rostlin, výjimečně živočichů
7	<i>Cladosporium sp.</i>	529	976	99%	0.0	100%	Ascomycota, Capnodiales	ubikvitní saprofyt, fakult. parazit rostlin, výjimečně živočichů
8	<i>Cytospora chrysosperma</i>	641	1136	96%	0.0	99%	Ascomycota, Diaporthales	parazit v kůře list. stromů, původce rakoviny stromů
9	<i>Epicoccum nigrum</i>	576	1029	96%	0.0	100%	Ascomycota, Incertae sedis	parazit rostlin, fungicidní látky
10	<i>Fusarium sp.</i>	548	1009	100%	0.0	99%	Ascomycota, Hypocreales	ubikvitní saprofyt, fakult. parazit rostlin
11	<i>Fusarium ciliatum</i>	538	994	100%	0.0	100%	Ascomycota, Hypocreales	saprofyt, fakult. parazit rostlin
12	<i>Leucostoma niveum</i>	562	959	95%	0.0	99%	Ascomycota, Diaporthales	parazit v kůře list. stromů
13	<i>Mucor hiemalis</i>	622	1138	99%	0.0	100%	Zygomycota, Mucorales	ubikvitní saprofyt, mykoparazit, parazit rostlin
14	<i>Penicillium griseofulvum</i>	615	1136	100%	0.0	100%	Ascomycota, Eurotiales	ubikvitní saprofyt, fungicidní látky (griseofulvin)
15	<i>Penicillium rugulosum</i>	575	1038	99%	0.0	99%	Ascomycota, Eurotiales	ubikvitní saprofyt
16	<i>Sclerotinia fuckeliana/sclerotinium</i>	519	952	99%	0.0	99%	Ascomycota, Helotiales	rostlinný patogen, anamorfa <i>Botrytis</i>
17	<i>Sordaria fimicola</i>	615	1090	96%	0.0	99%	Ascomycota, Sordariales	koprofilní saprotrof
18	<i>Trichoderma atroviride</i>	570	1053	100%	0.0	100%	Ascomycota, Hypocreales	parazit rostlin, mykoparazit, fungicidní vlastnosti
19	<i>Trichoderma viride</i>	600	1099	99%	0.0	99%	Ascomycota, Hypocreales	parazit rostlin, mykoparazit, fungicidní vlastnosti
20	<i>Ampelomyces sp.</i>	337	616	100%	2,00E-174	99%	Ascomycota, Pleosporales	hyperparazit na padlí
21	<i>Aureobasidium pullulans</i>	327	604	100%	5,00E-171	100%	Ascomycota, Dothideales	ubikvitní dimorfní epifyt a endofyt
22	<i>Erysiphe hypophylla</i>	353	651	99%	0.0	100%	Ascomycota, Erysiphales	obligátní parazit dubů

**Tab. 4.** Seznam druhů mikromycet izolovaných z listů kultivací (1-19) a druhů identifikovaných prostřednictvím sekvenace fragmentů vzniklých při DGGE (20-22). V tabulce jsou uvedeny délky sekvencí, hodnoty popisující míru homologie k sekvencím v databázi GenBank® (*total score*, *query coverage*, *E value* a *max identity*, porovnáno nástrojem BLAST®), taxonomická příslušnost (oddělení, řád) a substrátová specializace hub.