

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Genetika hub, evoluce genomu a využití průtokového
cytometru při studiu DNA**

Fungal genetics, genome evolution, and use of flow cytometry in study of
DNA

Tereza Würtherlová

2010

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

OBSAH

Obsah.....	1
Abstrakt	3
1. Úvod	4
2. Genetika hub.....	5
2.1. Stavba genomu hub.....	5
2.1.1. Jaderná DNA	5
2.1.2. Pohled na životní cyklus hub.....	6
2.2. Evoluce genomu: změna velikosti/struktury genomu	6
2.2.1. Chromosomová reorganizace a variabilita v počtu chromosomů	7
2.2.2. Rekombinace bez pohlavního rozmnožování.....	8
2.2.2.1. Vegetativní inkompatibilita	8
2.2.2.2. Parasexuální cyklus	9
2.2.2.3. Parameiotický cyklus.....	10
2.2.3. Genová duplikace a celogenomová duplikace	11
2.2.4. Mezidruhová hybridizace vedoucí k allopolyloidizaci.....	13
2.2.5. Repetitivní elementy (RE).....	13
2.2.5.1. Minisatelity a mikrosatelity	14
2.2.5.2. Transposabilní elementy.....	14
2.2.5.3. Obrana proti transposonům	15
2.2.5.3.1. PTGS	15
2.2.5.3.2. RIP	15
2.3. <i>C-value paradox/enigma</i>	16
2.3.1. Korelace s <i>C-value</i>	16
2.3.2. Teorie vysvětlující korelace mezi <i>C-value</i> a velikostí buňky	17
2.3.2.1. Teorie mutačního tlaku: teorie <i>Junk DNA</i> a <i>Selfish DNA</i>	18
2.3.2.2. Teorie optimální DNA: Nukleoskeletální a Nukleotypová teorie	18
3. Průtokový cytometr	19
3.1. Obecný princip a technická část.....	19
3.1.1. Fluidika.....	20
3.1.2. Světelný zdroj.....	20
3.1.3. Optický systém	21
3.1.4. Zpracování signálu	21

3.1.5.	Analýza dat v počítači: grafické znázornění a <i>gating</i>	22
3.2.	Fluorescenční barviva	23
3.3.	Standardizace	24
3.4.	Metodika FCM v mykologických pracích	25
3.4.1.	Měření na solitérních buňkách	26
3.4.2.	Měření na izolovaných jádrech	26
3.4.2.1.	Mechanická izolace jader	27
3.4.2.2.	Enzymatická izolace jader	27
3.5.	Poměr GC/AT bází.....	28
3.6.	Omezení měření	28
Závěr.....		29
Poděkování		29
Literatura		29
Příloha.....		37

ABSTRAKT

Genom hub je dynamicky se měnící struktura. Jeho přestavbou může organismus reagovat na změny v prostředí a neustále se vyvíjet. Zajímavý jev je časté zvětšení genomu doprovázející přechod houby k parazitickému nebo mutualistickému způsobu života. Může se jednat o zmnožení některých chromosomů (aneuploidizace), duplikaci celého genomu (polyploidizace) nebo o šíření repetitivních sekvencí. Vliv velikosti genomu na ekologii a životní strategii organismu je v posledních letech stále více studován. V mykologii však prozatím uniká větší pozornosti. Průtokový cytometr (FCM) je moderní a progresivně se vyvíjející metoda umožňující zjistit velikost genomu, případně i odhadnout procentuální zastoupení GC/AT bází. Kombinace FCM se znalostmi ekologie hub a mechanismů utvářejících genom umožňuje odhalit obecné tendence evolučních procesů.

Má práce shrnuje poznatky o mechanismech vedoucích ke změně velikosti/struktury houbového genomu, o korelacích s velikostí genomu a představuje princip průtokového cytometru a jeho uplatnění v mykologii.

Klíčová slova: houby, evoluce genomu, korelace s *C-value*, průtokový cytometr (FCM), metodiky FCM v mykologii

ABSTRACT

The fungal genome is a dynamically changing structure. By its remodelling, the organism can respond to the environmental changes and develop itself. The genome expansion is often accompanied by transition to parasitic or mutualistic way of life. The genome expansion can be caused by the multiplication of some chromosomes (aneuploidisation), the whole genome duplication (polyploidisation) or the spreading of repetitive sequences. The impact of genome size to the ecology and life strategy of the organisms is more and more studied in recent years. In mycology, nevertheless, it escapes sufficient attention. The flow cytometry (FCM) is a modern and progressively developing method that enables to determine the genome size and estimate CG/AT base ratio. The combination of FCM with knowledge of the fungal ecology and forces that form the genome enable to discover a general trends of the evolutionary processes.

My study summarises knowledge about the processes leading to changes in the size/structure of the fungal genome, the correlations with genome size and presents the principle of flow cytometry and its application in mycology.

Key words: fungi, genome evolution, correlations with C-value, flow cytometry (FCM), application FCM in mycology

1. ÚVOD

Z botanických a zoologických prací vyplývá, že velikost genomu koreluje s fenotypovými a fyziologickými vlastnostmi organismů a mohla by tedy podléhat selekci. V mykologii zatím nebyl tento fenomén dostatečně studován. Selekcí posilovaná změna *C-value* (haploidní velikosti genomu) a s ní spjatých vlastností by mohla vysvětlit konvergentní evoluci fenotypu i vznik nových druhů.

Průtokový cytometr (FCM) je dnes jednou z nejrozšířenějších metod stanovení velikosti genomu. Na rozdíl od ostatních přístupů umožňuje analýzu tisíců buněk za sekundu s vysokou rozlišovací schopností.

Cílem mé bakalářské práce je:

1. Charakterizovat evoluční procesy utvářející genom, především mechanismy vedoucí ke změně velikosti genomu
2. Uvést známé korelace mezi *C-value* a fenotypovými a fyziologickými vlastnostmi hub
3. Představit průtokový cytometr jakožto metodu pro analýzu jaderného genomu
4. Popsat a shrnout metodiky FCM používané v mykologii

Z důvodů neustálené nebo málo používané terminologie českých výrazů, používám v textu anglické výrazy psané kurzívou.

2. GENETIKA HUB

2.1. Stavba genomu hub

Genetická informace hub je, podobně jako u ostatních eukaryotických organismů, uložena v jádře. Jádro však není jediným místem nesoucím genetickou informaci. V cytoplazmě se dále nacházejí mitochondrie, plazmidy¹ či viry. Všechny tyto složky se souhrnně nazývají extrachromosomální dědičnost (nebo také cytoplazmatická či mimojaderná) a mohou významně ovlivňovat fenotyp houby (např. McBride et al. 2008; shrnuto v Aguilera 2009). Ve své práci se zaměřuji pouze na jadernou DNA a na mechanismy vedoucí ke změně velikosti/struktury genomu.

2.1.1. Jaderná DNA

V jádře je genetická informace uložena v podobě deoxyribonukleonové kyseliny (DNA). DNA je polymerem nukleotidů (nukleonové báze, deoxyribóza, fosfátový zbytek) vytvářejících pravotočivou dvoušroubovici. Nukleonové báze rozlišujeme na pyrimidinové: cytosin (C), thymin (T) a purinové: adenin (A) a guanin (G). Molekula DNA v komplexu s proteiny (jedná se především o histony) vytváří chromatin. Kondenzací chromatinu vzniká během buněčného cyklu dobře viditelný chromosom. Na rozdíl od živočichů se u hub během jaderného dělení nerozpadá jaderná membrána (uzavřená mitóza).

Počet chromosomů nabývá u hub hodnot od tří (*Schizosaccharomyces pombe*) až ke dvaceti (*Ustilago hordei*, *Batrachomyces dendrobatidis*). Oproti rostlinám a živočichům mají houby relativně malý genom s vysokou genovou denzitou (37-61 genů na 100 kb, Aguilera 2009). Průměrná velikost genomu je 37 Mb a medián 28 Mb. Nejmenší genom byl naměřen 6,5 Mb u *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* a největší 795 Mb u *Scutellospora castanea* (Gregory et al. 2006). Pokud do souhrnu zahrneme i microsporidie, nejmenší houbový genom bude 2,5 Mb u *Encephalitozoon cuniculi* (Cornell et al. 2007).

Struktura genomu je u hub velmi různorodá, a to i mezi příbuznými druhy. Genová syntenie² u druhů v rámci rodu *Aspergillus* je pouze 68 %. K porušení syntenie může dojít mnoha způsoby: 1) chromosomovou reorganizací, 2) genovou duplikací, 3) horizontálním genovým transferem (HGT)³, 4) genomovou duplikací a následnou rozdílnou ztrátou jednotlivých genů (Aguilera 2009).

¹ Plazmidy se nacházejí v cytoplazmě, jsou autonomní a replikují se nezávisle na chromosomech. Mohou být nositeli významné genetické informace, např. genů pro toxiny.

² Syntenie je přítomnost ortologních lokusů u dvou druhů na stejném chromosomu, vyjadřuje podobnost mezi genomy.

³ HGT je stabilní přenos genetického materiálu mezi jedinci, který není přičítán vertikálnímu přenosu přes rodiče na potomky.

2.1.2. Pohled na životní cyklus hub

Houby jsou haploidní organismy. Během vegetativní fáze se mohou rozmnožovat nepohlavně skrze tvorbu haploidních propagulí. Diploidní fáze je spojena se sexuální částí životního cyklu. U askomycetů a basidiomycetů se nejprve vytvoří dikaryotické mycelium. K tvorbě diploidního jádra dochází pouze na krátký čas. Diploidizace je následována meiózou, u askomycetů většinou doplněnou o další mitotické dělení. Houby, u kterých není známa sexuální fáze, se nazývají deuteromycety.

U některých hub však došlo ke změně ploidie. Většinou se jednalo o patogeny, což může být způsobeno intenzivním studiem této skupiny hub. U patogenu cirziny *Ascochyta rabiei* byl nalezen diploidní kmen ArXXI (Bruns & Barz 2001). Patogenní kvasinky nebo houby s kvasinkovitou fází růstu parazitující na teplokrevných organismech se vyznačují převážně diploidním, případně polyploidním, stavem genomu a pouze mitotickým dělením. Příkladem víceploidní ($1n^4-4n$) kvasinky je např. *Candida albicans* (Olaiya & Sogin, 1979; Suzuki et al. 1982), diploidním dimorfním⁵ patogenem *Sporothrix schenckii*. *S. schenckii* střídá typ růstu podle teploty prostředí. Při teplotě 25 °C roste vláknitým způsobem, při teplotě 37 °C kvasinkovitým (Torres-Guerrero 1999). Změna ploidie v závislosti na teplotě a způsobu růstu byla pozorována u patogenu *Cryptococcus neoformans* (Sia 2000). Při 37 °C splynou dvě haploidní kvasinkovité buňky, které se liší párovacím typem, a vytvoří 2n buňky s větším jádrem. Při 24 °C diploidní buňky vytvářejí vlákna a sporují za vzniku 1n rekombinantů. Dimorfismus a změna ploidie je tedy u této houby regulována teplotou. U dalších hub, např. *Histoplasma capsulatum* (Carr & Shearer 1998) byl nalezen přechod mezi 1n a 2n (aneuploidie⁶).

2.2. Evoluce genomu: změna velikosti/struktury genomu

O vnitrodruhové velikosti genomu se předpokládá, že je spíše konzervativní. U hub je pozorována tendence k návratu k původní velikosti genomu. Tento jev je patrný během parasexuálního cyklu (viz kapitola 2.2.2.2.). Byl prokázán i experimentálně u *Saccharomyces cerevisiae* (Gerstein et al. 2006). 4n a 1n kmeny hub odvozené od 2n předka mají tendenci se po 200 generacích vrátit k 2n stavu jádra. Pokud se při kultivaci použije stresující médium, prodlouží se délka setrvání 4n stavu. Nakonec však dojde k diploidizaci genomu. Diploidizace genomu je u 4n kmenů zřejmě způsobena nevyvážeností v rozmístění pólů dělicích vřetének (Storchová et al. 2006). Tím by se daly vysvětlit ztráty celých chromosomů během redukce genomu (ze stavu 4n přes 3n k 2n). Zároveň polyploidní kmeny odvozené z již aneuploidních kmenů vykazují rychlejší ztrátu přebytečných kopií preferenčně právě u původně aneuploidního chromosomu. To vede k předpokladu, že ztráta jednotlivých

⁴ 1n, haploidní velikost genomu, číslo značí násobky.

⁵ Dimorfismus je schopnost vytvářet dvě morfologické formy.

⁶ Aneuploidie je stav způsobený nabytím nebo ztrátou chromosomů, tzn. v buňkách není přítomen celočíselný násobek kompletní sady chromosomů.

chromosomů podléhá selekci a je vysoce kontrolovaná (Gerstein et al. 2008). Při studiu v přírodě se vyskytujících 4n kvasinek byla nalezena 3,6krát větší pravděpodobnost výskytu monopolárního rozložení pólů dělicího vřeténka (Storchová et al. 2006). Pokud nedojde k opravě uspořádání, chromosomy se během mitotického dělení nerozejdou a vzniknou tetraploidi.

Adaptivní funkce aneuploidie byla pozorována u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* (Rancati et al. 2008). Práce studovala evoluční potenciál u kvasinek s delecí pro gen *MYO1* (myozin II⁷). U *myo1Δ* kmenů se vytvořily tři hlavní způsoby obnovení buněčného dělení (rozděleny do morfotypů podle tvorby primárního septa). Každý morfotyp byl spjat s aneuploidizací určitých chromosomů a pozměněním exprese vybraných genů. Adaptací vzniklý karyotyp byl v morfologické skupině stabilní. Aneuploidizace se projevila na změně genové exprese přímo i nepřímo. Přímý vliv zahrnoval geny na aneuploidním chromosomu (zvýšení počtu kopií daného genu bylo přímo úměrné jeho expresi). Nepřímý vliv byl způsoben změnou regulace exprese genů na euploidním chromosomu.

2.2.1. Chromosomová reorganizace a variabilita v počtu chromosomů

Chromosomy hub jsou dostatečně malé na to, aby se daly studovat pomocí pulzní gelové elektroforézy (např. Kuldau et al. 1999). Takové studium umožňuje určit počet a velikost jednotlivých chromosomů v rámci jádra a následně i odhad celkové velikosti genomu. U hub často dochází k chromosomové reorganizaci. Stává se tak duplikacemi úseků chromosomů či prostřednictvím jejich rozpadů, fúzí, translokací nebo rekombinací nehomologních úseků chromosomů během meiózy a mitózy. Reorganizace způsobuje polymorfismus v délce chromosomů (CLP, *chromosome-length polymorphism*) (shrnuto v Zolan 1995). Chromosomová reorganizace může mít i adaptivní důsledky. Jejím prostřednictvím dojde k záměně genetického pozadí a k následné změně genové exprese. Adaptivní reorganizace genomu je známá u *S. cerevisiae*, která tak reaguje na stresující podmínky v prostředí (Adams et al. 1992).

Variabilita v počtu (CNP, *chromosome number polymorphism*) i struktuře chromosomů byla nalezena u patogenu *Mycosphaerella graminicola*. Jednalo se o postradatelné (*dispensable*) chromosomy (nemají vliv na životaschopnost organismu) s velkým množstvím repetitivních sekvencí a s geny, které se pravděpodobně uplatňují při kolonizaci hostitele. Jednalo se o 8 chromosomů z celkového počtu 21, což je největší detekované množství „nadbytečných“ chromosomů u hub. CNP je způsoben chybnou segregací chromosomů během meiózy (Goodwin & Kema 2009). Genom *Fusarium oxysporum* má o 4 chromosomy více než jeho blízké příbuzné druhy *F. graminearum* a *F. verticillioides*. Tyto chromosomy, nazývané liniově specifická (LS) genomová oblast (*lineage-*

⁷ Myozin II je esenciální při cytokinezi, kdy společně s aktinem umožní zaškrvení mezi mateřskou a dceřinou buňkou. V pozdní cytokinezi se na myozin II váže enzym chitin synthasa, která katalyzuje tvorbu primárního septa mezi dvojicí buněk.

specific (LS) genome region), zabírají ¼ jeho genomu. Jsou bohaté na repetitivní sekvence a geny potřebné pro interakci s hostitelem (Ma et al. 2010). Postradatelné (*dispensable*) chromosomy u *M. graminicola* a LS genomová oblast u *F. oxysporum* jsou zřejmě zodpovědné za vysokou genovou diverzitu mezi izoláty a rychlou adaptační schopnost těchto hub v koevoluci s hostitelem.

2.2.2. Rekombinace bez pohlavního rozmnožování

Asexuální druhy hub jsou schopny pouze nepohlavního rozmnožování, množí se tedy pouze mitotickým dělením. Přesto je u nich pozorovaná genetická variabilita. Jednou z možností jejího vzniku je splynutí dvou haploidních geneticky odlišných jader kmenů téhož druhu, čímž se vytváří diploidní jádro. Následuje rekombinace genetické informace a návrat k haploidnímu stavu jádra. Tento proces se nazývá parasexuální cyklus a jeho podrobným popisem se věnuje kapitola 2.2.2.2. Samotná fúze dvou mycelií mezi jedinci téhož druhu je však geneticky omezena. Toto omezení bylo popsáno jako vegetativní inkompatibilita a jejím popisem se bude věnovat následující kapitola.

2.2.2.1. Vegetativní inkompatibilita

Vegetativní inkompatibilita (či heterokaryonová inkompatibilita) (Esser & Kuenen 1967) byla pozorována jak u sexuálních homothalických⁸ (např. *Aspergillus nidulans*, *A. glaucus*), sexuálních heterothalických⁹ (např. *Neurospora crassa*, *A. heterothallicus*), tak i asexuálních (např. *A. niger*, *A. versicolor*, *A. terreus*) druhů hub. Jedná se o geneticky řízenou reakci dvou kmenů stejného druhu při vzájemném kontaktu. Chování kmenů určují geny ovlivňující tvorbu anastamóz (fúze hyf) a geny pro tvorbu heterokaryonu (hyfa s geneticky odlišnými jádry). U vláknitých hub se alely řídící průběh parasexuálního cyklu nazývají *het* (alely pro heterokaryonovou inkompatibilitu), alternativně *vic* (alely pro vegetativní inkompatibilitu.) Počet *het* lokusů se mezi druhy hub liší. *Het* alely jsou volně kombinovatelné, čímž v čase nárůstá variabilita v jejich rozložení. Pokud jsou kmeny nositeli stejných *het* alel, dojde k tvorbě anastamóz a následné fúzi mycelií. V opačném případě mohou nastat dva stavy 1) dojde k transferu protoplastu a následné denaturaci cytoplazmy hyfálního sektoru. Ostatní sektory hyf se brání tím, že uzavřou pór v buněčné stěně nebo vytvoří novou cytoplazmatickou membránu. Tím se zabrání destrukci celého mycelia. 2) vytvoří se často i makroskopicky pozorovatelná *barrage* (hráz). Může se jednat o masivní větvení hyf vzdušného mycelia nebo naopak o vytvoření mezery mezi oběma kmeny.

Podle schopnosti kmenů vytvářet anastamózy můžeme rozlišovat různé vegetativně kompatibilní skupiny (VCGs, *vegetative compatibility groups*). U druhů, kde se mimo asexuální fázi

⁸ Homothalické houby nemají rozlišené párovací typy. Ke karyogamii může dojít mezi jakýmkoliv jedinci téhož druhu i v rámci jednoho jedince.

⁹ U heterothalických hub dochází ke karyogamii pouze mezi genotypově odlišnými jedinci, dáno párovacími typy.

setkáváme i se sexuálním rozmnožováním (např. *N. crassa*), jsou vegetativně inkompatibilní kmeny zároveň kompatibilní při sexuální fázi a naopak. V práci Caten (1971) je navržena možnost ustanovení koncepce druhu u asexuálních hub právě na základě VCGs. V téže práci je však současně uvedena námitka, že takto navržený koncept druhu by u zároveň sexuálně se rozmnožujících druhů hub (např. *A. nidulans*) vedl k zavedení chaosu do stávajícího systému.

Ze způsobu regulace fúze hyf (*het* alely) vyplývá, že 1) ke genetické výměně dojde s nízkou frekvencí, 2) genetická výměna mezi geneticky velmi podobnými kmeny snižuje genetický význam tohoto procesu. U druhů *Aspergillus versicolor* a *A. terreus* dokonce bylo možné kmeny obou druhů nejprve rozlišit morfologicky do jednotlivých skupin. Uvnitř takto vymezených skupin byl mnohem častěji úspěšně vytvořen heterokaryon než mezi těmito skupinami (Caten 1971). Jiný závěr vyplynul z porovnání genetické diverzity v rámci populace *A. niger* napadající semena *Welwitschia mirabilis*, která se blížila popisu pohlavně se rozmnožujících organismů (Pekarek et al. 2006). Svě výsledky autoři připisovali právě parasexuálnímu cyklu.

Hlavní, adaptivní funkcí vegetativní inkompatibility je obrana kmene houby proti transferu cizorodé cytoplazmatické DNA. Může se jednat o mutované mitochondrie, viry a plazmidy. Caten (1972) pozoroval, že přenos cytoplazmaticky způsobené smrti mycelia je znemožněn mezi VCGs *Aspergillus amstelodami* lišícími se více jak dvěma *het* lokusy. Pokud se kmeny lišily pouze jedním *het* lokusem, byl cytoplazmatický transfer z části umožněn. U 15 % takových kmenů došlo ke snížení růstové rychlosti mycelia a schopnosti tvorby konidií. Uvnitř VCGs se smrt mycelia projevila ve 100 % případech. Kumulativní efekt v rozdílnostech v *het* lokusech (a párovacím typu) nebyl potvrzen u *Neurospora crassa* (Debets et al. 1994). *N. crassa* může být postižena plazmidy se schopností začlenit se do mitochondriálního genomu. Následkem inserce je senescence a smrt kolonie. Na obranyschopnost kmene neměl vliv počet rozdílných *het* alel. Významný však byl typ alely, kterým se kmeny lišily. Kmeny, které se od nositele plazmidu odlišovaly alelou *het-c*, měly vyšší obranyschopnost než kmeny s odlišnými alelami *het-d*, *het-e* nebo párovacím typem.

2.2.2.2. Parasexuální cyklus

K parasexuálnímu cyklu dochází mezi kmeny téhož druhu, které jsou vzájemně kompatibilní (viz předchozí kapitola). Parasexuální cyklus poprvé popsal Pontecorvo roku 1953 u druhu *Aspergillus nidulans*. Následně byl objeven u dalších druhů hub, např. *Ascochyta imperfecta* (Sanderson & Srb 1965), *Histoplasma capsulatum* (Carr & Shearer 1998), *Candida albicans* (Forche et al. 2008) a *Cryphonectrica parasitica* (Milgroom et al. 2009).

Během parasexuálního cyklu nejprve dochází ke kontaktu dvou kmenů téhož druhu. Pokud se tyto kmeny neliší v *het* alelách (jsou vegetativně kompatibilní), dochází k tvorbě anastomóz a následně fúzi mycelií. Hyfy se tím stávají vícejaderné. Jelikož se tato jádra geneticky odlišují, nazývají se heterokaryonem. Tvorba heterokaryonu se vyskytuje i během pohlavního rozmnožování. I při něm

dochází k fúzi dvou mycelií za tvorby heterokaryonu. Na rozdíl od sexuálního procesu však během parasexuálního cyklu nedochází k tvorbě specifických orgánů (plodnice) a k meióze. Po ustanovení heterokaryonu obě jádra splynou za vzniku $2n$ jádra. Diploidní jádro je nestabilní. Během následných mitotických dělení dochází k poruchám v rozchodu chromatid homologních chromosomů vedoucích k aneuploidii. Aneuploidi se vyznačují tím, že mají o jednu chromatidu homologního chromosomu více nebo méně oproti diploidnímu stavu jádra, značí se např. $2n+1$, $2n-1$. K poruchám v rozchodu chromosomů dochází i v následujících mitotických děleních, takže nakonec dojde k haploidizaci jader, tzn. k návratu do původního $1n$ stavu genomu.

Jelikož segregace chromosomů do dceřiných jader je náhodná, dochází k rekombinaci genetické informace mezi oběma původními kmeny. Pokud si chromosom označíme více genetickými markery, budou segregovat společně (geny na jednom chromosomu vytvoří jednu vazebnou skupinu). Během parasexuálního cyklu může dále dojít i k mitotickému crossing-overu mezi nesesterskými chromatidami homologních chromosomů (s pravděpodobností přibližně 1:500 dělení) (Bos & Swart 1995). Tento crossing-over může být i nerovnoměrný, což vede k duplikacím/delecím určitých částí genomu.

K haploidizaci genomu dochází postupně. Během procesu může dojít k asexuálnímu rozmnožování skrze tvorbu konidií za vzniku aneuploidních jedinců. Velké rozpětí v počtu chromosomů (6-11) i ve velikosti genomu (14,0-28,7 Mb) bylo nalezeno u *Pleurotus ostreatus* a *P. pulmonarius* (17,9-44,1 Mb) (Kullman 2000; Kullman & Greve 2007). Plodnice *P. ostreatus* dokonce vytvářela dvě subpopulace spor lišícími se velikostí i množstvím DNA. Vysoká variabilita ve velikosti genomu by mohla vypovídat o nedávném polyploidním vzniku těchto druhů následovaným ztrátou chromosomů, i když autorka nevyklučuje ani CLP.

Frekvence výskytu parasexuálního cyklu je omezena tvorbou heterozygotního $2n$ jádra, které se u *A. nidulans* vytváří s frekvencí 10^{-6} - 10^{-5} jader (Bos & Swart 1995). Parasexuální cyklus byl často úspěšně navozen v laboratorních podmínkách, kde může být využit pro mapování chromosomů. Jeho významnost pro generování genetické variability v přírodních populacích je nejistá. Nejistota je způsobena výskytem velkého množství VCGs. U sexuálně se rozmnožujících hub je dále těžké odlišit variabilitu způsobenou sexuálním cyklem, mutacemi a parasexuálním cyklem (Milgroom et al. 2009).

2.2.2.3. Parameiotický cyklus

Obdobou parasexuálního cyklu je parameiotický cyklus. Na rozdíl od parasexuálního cyklu je diploidní jádro vzniklé stejnou cestou přes heterokaryon velmi nestabilní a k haploidizaci dochází již v samotné hyfě heterokaryonu, tedy před tvorbou konidií. Svým průběhem se parameiotický cyklus nejvíce blíží podobě pohlavního rozmnožování. Tento typ výměny genetické informace byl pozorován např. u druhů *Beauveria bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo 1991) nebo *Metarhizium anisopliae* (Bagagli et al. 1991). Parameióza byla dále navozena i u druhu *A. nidulans* (Baptista et al. 2003), u kterého byl dříve popsán pouze parasexuální cyklus. V citované práci byly pro tvorbu heterokaryonu

vybrány mutantní kmeny vzniklé UV zářením. Mutantní kmeny prošly mnohem častěji parameiotickým cyklem než kříženci bez indukovaných mutací. V návaznosti na tento článek vyšla studie zabývající se účinkem *uvsH* mutace (Souza-Júnior et al. 2007). Výsledkem publikace bylo zjištění, že UV zářením vyvolaná mutace *uvsH* zvyšuje spontánní chromosomovou nestabilitu i mitotickou rekombinaci. Nabízí se tedy možnost použití *uvsH* mutantů ke tvorbě cílených kříženců.

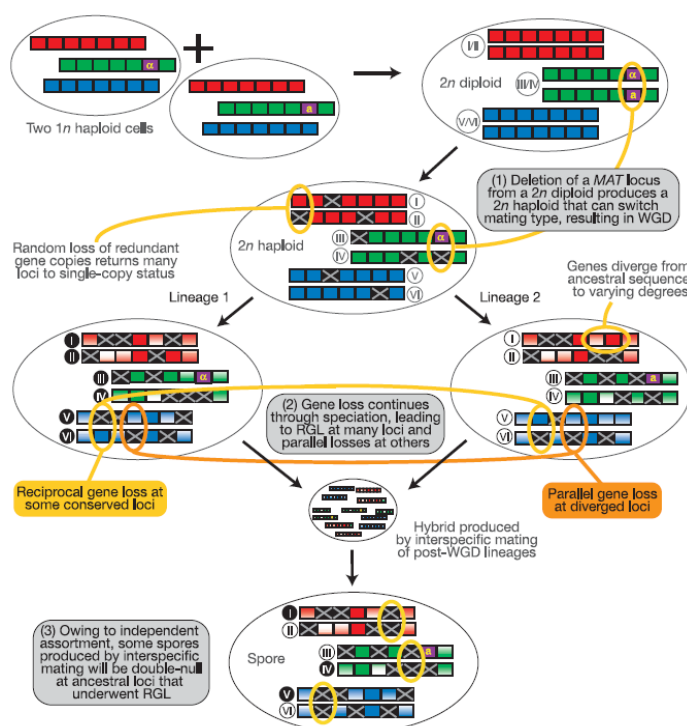
Další způsob rekombinace byl navržen u druhu *Trichoderma pseudokoningii* (Barcellos & Pizzirani-Kleiner 2003). I zde se vytváří heterokaryon. Jedno z rodičovských jader je však degradováno a některé jeho úseky se z něj včlení do druhého rodičovského jádra. Do jaké míry ale lze tento způsob odlišit od parameiotického cyklu není jasné.

2.2.3. Genová duplikace a celogenomová duplikace

O genové duplikaci se předpokládá, že je hlavním motorem evoluce. Pozměněním funkce vytvořené kopie genu mohou vzniknout nové, adaptivní vlastnosti. Duplikované a následně diverzifikované geny se nazývají paralogy. Komparativní genomikou napříč říší Fungi byla nalezena korelace mezi velikostí genomu a počtem genových duplikací (Cornell et al. 2007). Rozšíření specifických genových rodin bývá spjata se symbiotickým (parazitickým i mutualistickým) životem houby. Příkladem je genom mykorrhizní houby *Laccaria bicolor*, který je bohatý na geny kódující proteiny s WD40 doménou (důležité při meziproteinové interakci) a proteiny se signalizační funkcí. Významnou část genomu dále tvořily geny kódující malé sekreční proteiny (SSP, *small secreted proteins*), které se uplatňují během kolonizace rostliny (Martin et al 2008).

Extrémním případem je duplikace celého genomu (WGD, *whole genome duplication*). Zatímco u rostlin se předpokládá, že genomy fylogeneticky odvozenějších druhů vznikly několika násobnou duplikací genomu ancestrálních linií (např. Soltis et al. 2009), u hub byla dlouho taková možnost zamítána. Komparativní genomikou druhů *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* (fylogeneticky bližší *S. cerevisiae* než *C. albicans*), *Saccharomyces castellii*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* a *Yarrowia lipolytica* (vzdáleně příbuzná ostatním kvasinkám) byla zjištěna WGD u předka větve vedoucí ke *S. castellii*, *C. glabrata* a *S. cerevisiae* (před 100-200 mil. let) (Goffeau 2004; Dujon et al. 2004). U těchto hub se vyskytuje mnoho duplikovaných genů, které se v genomech ostatních kvasinek nacházejí vždy jen v jedné kopii. *C. glabrata* těchto kopií vlastní na rozdíl od *S. cerevisiae* (56) pouze 20. 18 z těchto 20-ti kopií jsou však zároveň v genomu *S. cerevisiae*. Takto vysoká shoda je velmi nepravděpodobná. Z toho lze vyvodit, že u předka *S. cerevisiae*, *C. glabrata* a *S. castellii* došlo k duplikaci celého genomu a následně k postupné ztrátě redundantních genů. U každého druhu k tomu ale došlo s jinou rychlostí. Pravděpodobnost ztráty určité kopie duplikovaného genu závisí na jeho efektu na zdatnost (*fitness*) organismu. Schéma převzaté z práce Scannell et al. (2006) (obr. 1) ukazuje průběh ztrát jednotlivých kopií genů podle jejich konzervativnosti a zároveň představuje model obnovení sexuality u odvozených linií. Konzervativní geny vydrží delší dobu v duplikovaném stavu.

Následná ztráta kopie je náhodná, tzn. v genomu se nacházejí jako paralogy. Nekonzervativní sekvence jsou nalézány v jedné, ortologní kopii u všech kvasinek, které prošly celogenomovou duplikací. Je zachována pouze kopie, která byla plně funkční. Náhodná ztráta konzervativního genu způsobila speciální událost. Kdyby totiž došlo ke zkřížení dvou kvasinek, které se liší zachovanými paralogy pro více konzervativních genů, segregací by vznikly s 25% pravděpodobností dceřiné buňky bez ani jedné kopie konzervativního genu. Taková událost by byla letální. Dalším důvodem ke speciaci jsou vzniklé negativní epistatické interakce¹⁰, které snižují *fitness* hybrida. K obnovení sexuální fáze došlo delecí alely *MAT* lokusu. Buňka se tím stala haploidní pro párovací typ. Po křížení s dceřinou buňkou (změna v jejím párovacím typu, u kvasinky běžné) došlo k navrácení sexuálního rozmnožování. Linie už ale nebyla schopná křížení s jinými liniemi.



Obr. 1. Model genových ztrát a ustanovení reprodukčních bariér mezi liniemi.

Ovály reprezentují jednotlivé buňky. Geny jsou označeny jako barevné boxy (fialový je párovací typ, *MAT* lokus). Křížek indikuje delecí daného genu, RGL je zkratkou reciproční genové ztráty (Scannell et al. 2006). Bližší vysvětlení v textu.

zvýšenou schopností fermentovat xylosu ve stresujících podmínkách oproti typovým druhům. Korelaci autoři vysvětlují zvýšením genové dózi pro enzym fermentující pentózy na ethanol nebo zvýšenou rezistencí vůči recesivním mutacím.

Studium genomové diverzity *Saccharomyces cerevisiae* z „evolučního kařonu“ v Izraeli potvrdilo výskyt různého stupně ploidie (2n, 3n a 4n) u přírodních izolátů. Tetraploidní kvasinky byly schopny produkce 2n jedinců, ne však 1n. To může být způsobeno vzniklými epistatickými interakcemi mezi geny tetraploidního genomu. Přechod do haploidního stavu genomu by byl letální. Další vysvětlení předpokládá vznik fertálního tetraploidního jedince allopolyploidizací a neschopností vzniklých diploidů projít dalším redukčním dělením (Ezov et al. 2006).

Polyploidizace byla uměle navozena kultivací *Candida shehatei* a *Pichia stipitis* ve stresujících podmínkách (Talbot & Wayman 1989). Genomová duplikace byla doprovázena

¹⁰ Epistatické interakce jsou interakce genů mezi různými lokusy.

2.2.4. Mezidruhová hybridizace vedoucí k allopolyploidizaci

Mezidruhová hybridizace s následnou allopolyploidizací byla objevena u *Botrytis aclada* (Nielsen & Yohalem 2001). *B. aclada* byla po dlouhou dobu rozdělována na základě velikosti spor do dvou podskupin AI a AII. Později se zjistilo, že podskupina AI má 16 chromosomů, zatímco AII 32. Molekulárními metodami došli autoři k závěru, že genom *Botrytis aclada* AII vznikl hybridizací mezi *B. aclada* AI a *B. byssoidea*.

Mnohonásobný vznik nových druhů allopolyploidizací mezi druhy rodu *Epichloë* je zachycen v pracích Kuldau et al. (1999) a Moon et al. (2002). Kuldau et al. (1999) zjistil, že kříženci mají přibližně dvojnásobnou velikost genomu oproti jejich haploidním předkům a že jejich spory dosahují signifikantně větších rozměrů (velikost spor: střední hodnoty 5,5 μm \times 2,4 μm oproti 3,8 μm \times 1,8 μm). U druhu vzniklého hybridizací *N. lolii* \times *E. typhina* zároveň počet chromosomů odpovídal součtu chromosomů haploidních předků. Podobně velké spory měli i hybridy popisované v Moon et al. (2002). Jednalo se o druhy *N. australiense* (*E. festucae* \times *E. typhina*), rozměry konidií 5-7 μm \times 3-4 μm a *N. melicicola* (*N. aotearoae* \times *E. festucae*), rozměry konidií 5-8 μm \times 3,5-5 μm . Vnitrodruhová hybridizace je u rodu *Epichloë* umožněna absencí vegetativní inkompatibility.

Další mezidruhová hybridizace byla nalezena v druhovém komplexu *Heterobasidion annosum* v Kalifornii (Garbelotto et al. 2004). V Kalifornii se nacházejí dva taxony komplexu dobře identifikovatelné morfologicky i molekulárně. Taxony jsou označeny jako S (parazituje na smrku, angl. *spruce*) a P (parazit borovice, angl. *pine*). V laboratorních podmínkách lze S hybridizovat s P. Potomci hybridu SP ale nejsou stabilní a dochází k rozpadu na dva původní druhy. Přírodní hybrid SP se ukázal jako stabilní. Všechny jeho hyfy nesly marker pro taxon S i P. Se 70% úspěšností vytvářel jednojaderné konidie, které klíčily za vzniku heterokaryotického mycelia s tvorbou přezek. Konidie byly tedy považovány za diploidní nebo víceploidní. Hybrid nebyl schopen fúze s homokaryotickým (1n) izolátem S či P.

2.2.5. Repetitivní elementy (RE)

Mezi repetitivní elementy patří mikrosatelity, minisatelity a transposabilní elementy. Genom asko- a basidiomycetů obsahuje většinou pouze malé množství RE, podle Wöstemeyer & Kreibich (2002) do 5 % či podle Aguilera et al. (2009) méně než 20 %. To je dáno efektivními rozpoznávacími mechanismy zmnožených sekvencí (viz kapitola 2.2.5.3.). Velké množství RE (70 % genomu) bylo nalezeno u patogenní houby *Blumeria graminis*. Je to zřejmě způsobeno absencí genů pro RIP (viz kapitola 2.2.5.3.) (Spanu et al. 2010). Expanze RE je či by mohla být příčinou velkého genomu jiných symbiotických hub jako je např. *Fusarium oxysporum* (LS genomová oblast) (Ma et al. 2010), *Mycosphaerella fijiensis* (dvojnásobná velikost genomu oproti příbuzným druhům se zachováním stejného počtu kódujících genů) (Goodwin & Kema 2009), *Laccaria bicolor* (21 % genomu RE)

(Martin et al. 2008), Glomeromycota (zahrnující *Scutellospora castanea* s největším houbovým genomem) a rzi. Naopak zmenšení genomu oproti saprotrofním druhům téhož rodu bylo zjištěno u patogenu *Penicillium marneffe* (Yuen et al. 2003).

2.2.5.1. Minisatelity a mikrosatelity

Minisatelity jsou motivy dlouhé 10-60 bp, po amplifikaci dosahují délky 0,1-30 kb. Nacházejí se převážně v oblasti telomer. Motivy *Podospora anserina* jsou bohaté převážně na GT báze, zatímco *Botrytis cinerea* na AT (Wöstemeyer & Kreibich 2002).

Mikrosatelity (SSRs, *simple sequence repeats*) jsou tandemově se opakující repetice 1-6-ti párů bází. Počet po sobě jdoucích repeticí je v důsledku chyb při replikaci DNA velmi variabilní. Z toho důvodu se využívají jako molekulární markery pro identifikaci jedinců. V práci Karaoglu et al. (2005) byl porovnáván výskyt jednotlivých typů repetic (mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové repetice) u devíti celogenomově sekvenovaných druhů hub. SSRs tvořily u studovaných hub 0,08-0,67 % celkové DNA (u člověka 3 %). Tak malé množství SSRs v genomu hub by mohlo být podle autorů způsobeno malým množstvím nekódujících sekvencí v genomu hub. SSRs se totiž vyskytují převážně v těchto sekvencích. Většina sekvencí byla bohatá na A/T báze (především mono- a dinukleotidové repetice). Počet repeticí klesal s délkou repetitivní sekvence. Nejdelší SSRs se nalézaly v největších genomech, množství SSRs však s velikostí genomu nekorelovalo.

2.2.5.2. Transposabilní elementy

Transposabilní elementy, transposony, jsou části genetické informace schopné autonomní replikace a včlenění se do genomu. Jsou známy dva hlavní způsoby jejich strategie. Prvním z nich je „kopírovat-vložit“, který je typický pro retrotransposony I třídy. Do RNA transkribovaný element se zpětně přepíše do DNA a vloží se kamkoliv do genomu. Druhým způsobem množení (transposony II. třídy) je strategie „stříhnout-vložit“. Element je odstraněn během genomové replikace z jednoho z dceřiných vláken a je vložen dopředu replikační vidličky. Transposony II. třídy jsou méně časté (Aguileta 2009).

Transposony mohou způsobit tvorbu chiasmat mezi nehomologními místy chromosomů a způsobit tak ektopickou rekombinaci. Ta se projeví delecí/duplikací části DNA. Další vliv spočívá ve schopnosti vmezeřit se mezi kódující geny či tyto geny separovat od jejich promotoru. Alternativně mohou sloužit jako „dopravní prostředek“ pro exony či promotory v jejich blízkosti, které vloží do jiného genu. Počet kopií jednotlivých rodin transposonů je mnohem větší ve velkých genomech než v malých. Z toho lze usuzovat na jejich důležitost při řešení *C-value enigma* (viz kapitola 2.3.). Největší příspěvek transponů k velikosti genomu, 70 %, byl nalezen u *Blumeria graminis* (Spanu et al. 2010).

2.2.5.3. Obrana proti transposonům

Existují tři známé obrany proti transposabilním elementům (obr. 2). Všechny tři byly nejvíce studovány u *Neurospora crassa*. Dvě z nich jsou založeny na post-transkripčním utišení genu (PTGS, *post-transcriptional gene silencing*), třetí na indukovaných mutacích a methylaci.

2.2.5.3.1. PTGS

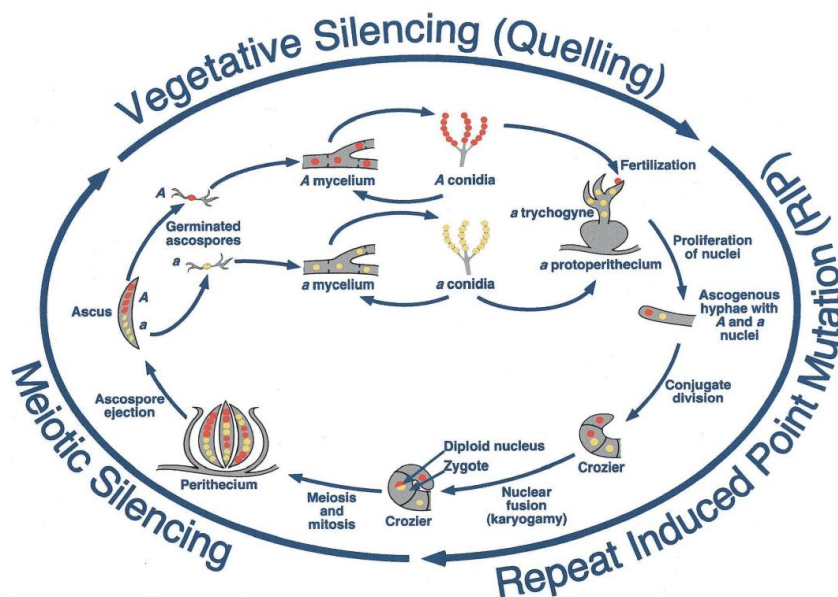
Quelling (potlačení) se uplatňuje během vegetativní fáze. Byl objeven u *N. crassa*. Přidání kopie genu *albino-1* (*al-1*), nutného pro biosyntézu karotenoidu (způsobuje oranžové zbarvení), navodilo u 36-ti % kolonií bílý fenotyp (Romano & Macino 1992). *Quelling* spočívá v tvorbě 22-25 nukleotidů dlouhých molekul RNA (siRNA), které dokážou cíleně degradovat specifickou mRNA. Transkribovaná mRNA duplikované sekvence je enzymem RNA-dependentní RNA polymerasou přeměněna na dvouvláknovou molekulu (dsRNA). Ta je následně enzymem Dicer naštípána na krátké úseky (siRNA). Jedno z vláken siRNA (*guide strand*) se začlení do RISC (*RNA-induced silencing complex*). *Guide strand* se komplementárně naváže na endogenní transkript. V poslední fázi dochází k naštípání endogenního transkriptu enzymem z proteinové rodiny Argonaute. Účinnost *quelling* není absolutní a stoupá s počtem kopií sekvence. Účinnost je zřejmě ovlivněna počtem dsRNA. Geny zajišťující *quelling* sdílejí homologii s geny s obdobnou funkcí u rostlin a živočichů. Proces se u rostlin nazývá *co-suppression* a u živočichů *RNA interference* (RNAi) (Fulci & Macino 2007).

Druhá ze strategií PTGS, meiotické utišení nepárové DNA (MSUD, *meiotic silencing of unpaired DNA*) neboli meiotické utišení, se uplatňuje po karyogamii během sexuální fáze. Během MSUD dochází k rozpoznání hemizygotnosti regionu DNA a k utišení všech genů, které se nacházejí ve smyčce (*loop*) nepárové DNA (Borkovich et al. 2004; Aguilera 2009).

2.2.5.3.2. RIP

Třetí způsob obrany je opakovaně-indukovaná bodová mutace (RIP, *repeat-induced point mutation*). Opakovanými mutacemi dojde k znefunkčnění transposonu, např. vytvořením *non-sense* nebo *stop* kodonu. Tento způsob je známý pouze u hub. Během sexuálního cyklu dochází k rozpoznání duplikovaných sekvencí větších než 400 bp (nebo 1 kb pokud tyto sekvence neleží přímo za sebou). Jako duplikáty jsou rozpoznány sekvence, které jsou si podobné z více jak 80-ti %. Následuje indukovaná mutace z GC na AT, a to v obou kopiích. Zbylé cytosinové báze jsou methylovány. U *Neurospora* je methylováno 1,5 % bází cytosinu. Methylace je běžně se vyskytující způsob epigenetického utišení genu (nachází se u rostlin i savců). RIP a methylace se nevyskytuje v genech kódujících proteiny a v minimálním množství v tandemově se opakující rDNA (Borkovich et al. 2004). Tandemově se opakující sekvence rDNA je umístěna v části chromosomu, která se nazývá organizátor jadérka. Jakákoliv sekvence rDNA umístěná mimo tento region na sobě nese znaky působení RIP. Z toho lze usuzovat, že se jedná o „lokální ochranu“ rDNA před RIP danou její polohou. Jelikož RIP

rozpoznává jakékoliv duplikované sekvence větší než 400 bp, neslouží jen jako obrana před transposony, ale zároveň je „brzdou“ evoluce. Brání vzniku nového genu přes genovou duplikaci s následnou diverzifikací ve funkci jedné z kopií (Galagan & Selker 2004).



Obr. 2. Působení typů obrany proti repetitivním sekvencím během životního cyklu *N. crassa*.

RIP se uplatňuje během sexuální fáze v dikaryotickém myceliu. Po karyogamii nastupuje MSUD, meiotické utišení. Ve vegetativní fázi působí *quelling*. Blíže vysvětleno v textu. Schéma převzato z Borkovich et al. (2004).

2.3. *C-value paradox/enigma*

C-value označuje velikost haploidního genomu u daného organismu, kde „C“ je zkratkou *class* či *constancy*. Termín *C-value* poprvé použil Swift (1950). Haploidní velikost genomu se u eukaryot liší 200 000krát (Gregory 2001). O komplexitě organismů to však nijak nevyovídá. Tento jev se nazývá *C-value paradox* (alternativně, podle Gregory (2001), *C-value enigma*, tzn. záhada). Nachází se napříč všemi říšemi organismů. Nárůst velikosti genomu je většinou způsoben zvýšením počtu intronů, pseudogenů nebo repetitivních sekvencí, které nenesou žádnou funkční informaci. Jinou událostí může být allo/autopolyploidizace (shrnuto v Gregory & Hebert 1999).

2.3.1. Korelace s *C-value*

Zanedlouho byly objeveny zajímavé jevy korelované s *C-value* (popřípadě s $2C$ -value u $2n$ organismů). S rostoucí *C-value* roste objem jádra, velikost buňky a snižuje se rychlost mitotického/meiotického dělení. Velikost buňky byla dále korelována s ekologií organismů a jejich životní strategií (*life strategy*) (např. Knight 2002; Barow 2006).

Korelace mezi velikostí genomu a jádra byla u hub zjištěna např. u *Benjaminiella poitrasii* (Ghormade et al. 2005). Korelace velikosti buňky s objemem jádra byla potvrzena u *Schizosaccharomyces pombe* (Neumann & Nurse 2007) a *Saccharomyces cerevisiae* (Jorgensen et al. 2007). V obou pracích však bylo zároveň zjištěno, že obsah DNA nemá přímý vliv na objem jádra. Mezi

velikostí buňky a jádra byl nalezen příčinný vztah. Snížení poměru velikostí jádra/buňky vedlo k růstu jádra. Pokud došlo ke zvýšení poměru, jádro přestalo růst a zvětšovala se buňka. Zmenšení buňky bylo docíleno zkrácením doby G1 fáze (*S. cerevisiae*) nebo meiózy (*S. pombe*), tedy cytokinezí před dosažením optimální velikosti buňky. U *S. pombe*, na rozdíl od *S. cerevisiae*, se velikost jádra zvětšila zablokováním exportu ribosomů a proteinů z jádra do cytoplazmy, což autoři vysvětlují delším působením inhibitoru proteinů. U *S. cerevisiae* bylo zjištěno, že velikost jádra se zvětšuje i během G1 fáze buněčného cyklu. Toto zjištění bylo v kontradikci s teorií vysvětlující regulaci buněčného růstu během buněčného cyklu. Teorie předpokládá, že buňka roste tak dlouho, dokud se v jádře neustanoví určitá koncentrace cyklinu. V práci Neumann & Nurse (2007) bylo dále zjištěno, že velikost jádra je pozitivně korelována s množstvím cytoplazmy, které ho obklopuje. Pozitivní korelace mezi velikostí genomu (1n, 2n, 4n) a buňky byla nalezena u *Candida albicans* (Suzuki et al. 1982).

Vliv velikostí genomu/buňky na ekologii organismu byl větší měrou studován u rostlin (např. Knight 2002; Barow 2006). Setkala jsem se pouze s jedinou mykologickou prací (Kauserud et al. 2008), kde se studovaly korelace mezi velikostí spor, tvarem spor a životními strategiemi u chorošovitých hub. Autoři zjistili, že větší spory jsou sférickější než menší a jsou produkovány většími plodnicemi. Paraziti a druhy rostoucí na koniferách produkovaly větší spory než saprotrofové a druhy rostoucí na listnácích. Souvislost mezi velikostí spory a basidiokarpu autoři vysvětlují jako důsledek selekce na produkci stejného množství spor. Jelikož větší spory zaberou na hymeniu více místa než malé, je nutné zvětšit celkovou plochu hymenia, tím pádem i celou plodnici. Otázkou však je, jestli u hub s většími sporami nedochází ke zvětšení všech buněk. V tomto případě by totiž větší plodnice neposkytovaly větší plochu pro tvorbu spor. Větší velikost spor u biotrofních parazitů oproti saprotrofům podle autorů spočívá v nutnosti přemoci obranyschopnost stromu. Větší spory by mohly obsahovat více živin, které může houba zužitkovat. Zajímavé je, že podobný vztah lze naleznout i u hub přenášených hmyzem. Houby izolované z ambrosiových brouků¹¹ podléhají konvergentní evoluci vyúsťující v tvorbu velkých a kulatých spor (Batra 1967). I zde by se mohlo jednat o akumulaci živin ambrosiovými houbami v důsledku koevoluce s broukem.

2.3.2. Teorie vysvětlující korelace mezi *C-value* a velikostí buňky

Teorie rozdělují podle použitého schématu v souhrnné práci Gregory (2001). Teorie lze rozdělit na dva hlavní proudy. Prvním z nich jsou teorie mutačního tlaku. Do druhé skupiny patří teorie optimální DNA. Teorie mutačního tlaku na rozdíl od teorií optimální DNA odmítají jakýkoliv vliv nekódujících sekvencí na velikost buňky/organismu a *fitness* organismu.

¹¹ Ambrosioví brouci jsou potravně závislí na houbě.

2.3.2.1. Teorie mutačního tlaku: teorie *Junk DNA* a *Selfish DNA*

Teorie *Junk DNA* (DNA odpad) (Ohno 1972) připisuje nárůst genomu nefunkčním genům (pseudogenům), které se během evoluce v genomu hromadí působením genetického driftu. Teorie *Selfish DNA* (Doolittle & Sapienza 1980 sec. Gregory 2001) pracuje se sobeckou DNA, která se umí sama množit v rámci genomu (plazmidy, retroviry, repetitivní sekvence). Celkový počet jednotlivých kopií je určen intragenomovou selekcí mezi sobeckými sekvencemi. Obě teorie se shodují v tom, že buňka není schopná se proti nárůstu těchto sekvencí bránit a že větší buňky mají vyšší toleranci pro větší akumulaci DNA. Teprve když dojde ke kritickému nárůstu genomu, začnou působit selekční síly, které zamezí dalšímu množení nefunkčních sekvencí. Tyto teorie však nedokážou vysvětlit zachování korelace velikosti jádra/buňky při polyploidizaci nebo současné zmenšení jádra i buňky. V rozporu s teoriemi je dále existence mechanismů, které působí jako obrana proti repetitivním sekvencím (např. RIP) nebo spontánní návrat k původní velikosti genomu po umělé polyploidizaci (viz *Saccharomyces cerevisiae*).

2.3.2.2. Teorie optimální DNA: Nukleoskeletální a Nukleotypová teorie

Nukleoskeletální teorie (Cavalier-Smith & Beaton 1999) předpokládá, že pokud existuje selekční tlak podporující větší buňky, bude zároveň koevolucí docházet ke zvětšení jádra, aby byl zachován vyrovnaný růst buňky. Optimálního množství DNA pro daný typ buňky je pak dán kompromisem mezi rychlým buněčným dělením a efektivním metabolismem. Jádro může změnit svou velikost rozdílnou mírou svinutí DNA. K tomu slouží především nekódující sekvence tvořící skelet. Větší buňky dále potřebují mít pro dostatečný růst větší syntézu proteinů než menší buňky. Toho je dosaženo zvýšením počtu genů rRNA a tRNA v jádře. Objem jádra se dále musí zvětšit, aby bylo vytvořeno dostatečné místo pro transkribovanou RNA a pro procesy, které se uplatňují během jejích modifikací. Aby platil tento model, muselo by být zvětšení buňky doprovázeno zvýšenou syntézou proteinů. Taková korelace ale není v souladu s pozorováním. Gregory (2001) zde jako příklad uvádí syntézu cyklinu u *Saccharomyces cerevisiae*, která se snižuje se stoupajícím stupněm ploidie. Jestliže však abundance cyklinu v jádře signalizuje dosažení určité velikosti buňky během buněčného cyklu, je otázkou, zda snížení exprese cyklinu po polyploidizaci, není funkční odpovědí pro prodloužení buněčného cyklu (více času pro růst buňky).

Nukleotypová teorie (Bennett 1971 sec. Gregory 2001) předpokládá přímý vliv velikosti jádra na velikost buňky. Nukleotypem označuje celkovou velikost jádra nezávisle na funkčnosti sekvencí (odlišení od genotypu). Nukleotyp určuje minimální velikost buňky. Její skutečnou velikost pak doladují geny (za geny ovlivňující velikost buňky byl určen např. cyklin, dále S6 kináza u *Drosophila melanogaster*). U *Arabidopsis thaliana* byla endopolyploidizace doprovázena zvýšenou expresí inhibitoru CDK (cyklin dependentní kináza) (Barow 2006). Na rozdíl od ostatních teorií je schopná

vysvětlit okamžité současné zmenšení buňky a jádra a vysvětlit, proč jsou erythrocyty bezjaderné (snaha maximálně zmenšit buňku, a tím docílit co největšího poměru povrch/objem). Zároveň je v souladu s pozorováním, že triploidní buňky se velikostně nacházejí mezi diploidními a tetraploidními v rámci jednoho druhu. Teorii dále podporují pokusy s vnášením plazmidů do stávajícího genomu organismu, které je následováno zvětšením objemu buňky (Gregory 2001).

3. PRŮTOKOVÝ CYTOMETR

Průtokový cytometr (FCM, *flow cytometry*) je v dnešní době oblíbeným přístrojem pro analýzu různých parametrů buněk či pro třídění buněčných kultur k jejich dalšímu zpracování. Jeho hlavní kvalitou je rychlost měření (tisíce buněk za sekundu), vysoká rozlišovací schopnost a možnost detekce i malých subpopulací. Původní využití FCM ve 30. letech 20. stol. bylo v zjištění procentuálního zastoupení jednotlivých typů krevních buněk v krvi. Kvůli výše uvedeným výhodám a zároveň relativně rychlé, jednoduché a neinvazivní přípravě vzorků, našel FCM brzy uplatnění i v mnoha jiných biologických oborech. Nejčastěji se používá k měření relativní či absolutní velikosti jaderného genomu a k zjištění imunofenotypu.

3.1. Obecný princip a technická část

Princip FCM spočívá v měření intenzity světla, které je po ozáření laserem nebo jiným zdrojem světla rozptýleno částicemi. Intenzita rozptýleného světla je úměrná velikosti částice a její vnitřní komplexitě. Pokud použijeme fluorescenční barviva, která se vážou na specifické organely či buněčné komponenty (např. proteiny), můžeme analogicky změřit jejich relativní velikost/množství. Čím větší/více organel/komponentů se v buňce nachází, tím vyšší intenzitu světla naměříme.

Základním předpokladem pro analýzu DNA je získat roztok obsahující izolované částice. Je důležité, aby byly částice diskrétní, tzn., aby pouze jedna částice byla ozářena v daný čas. V opačném případě by totiž mohlo dojít ke splynutí signálů z více částic. Při analýze DNA se většinou pracuje s izolovanými jádry. U živočichů se k měření často používají krevní buňky (např. Vinogradov 1994, 1998), které v hypotonickém prostředí prasknou za uvolnění jader. U rostlin se jádra většinou izolují mechanicky podle metodiky vyvinutou Galbraith et al. (1983).

Multispectral imaging flow cytometry (MIFC) je na rozdíl od „tradiční“ FCM schopen snímat obrazy analyzovaných částic. Je vybaven pěti excitačními lasery a automatickou analýzou obrazu (více na [www4](#)). MIFC byl použit pro analýzu buněčného cyklu u *Saccharomyces cerevisiae* (Calvert et al. 2008). Buňky byly rozděleny podle tvaru a množství DNA do tří skupin (G1, S a G2 fáze). Na rozdíl od FCM u MIFC nedocházelo k nadhodnocení G2 fáze oproti G1 fázi u FCM způsobené neschopností rozlišit spojený signál ze dvou právě vzniklých dceřiných buněk a z jedné buňky v G2 fázi.

FCM se skládá z pěti hlavních komponentů: fluidika, světelný zdroj, optika, systém na zpracování signálů a počítač. Analýza dat probíhá v počítači, kde jsou data uložena ve formátu FCS (*flow cytometry standard format*).

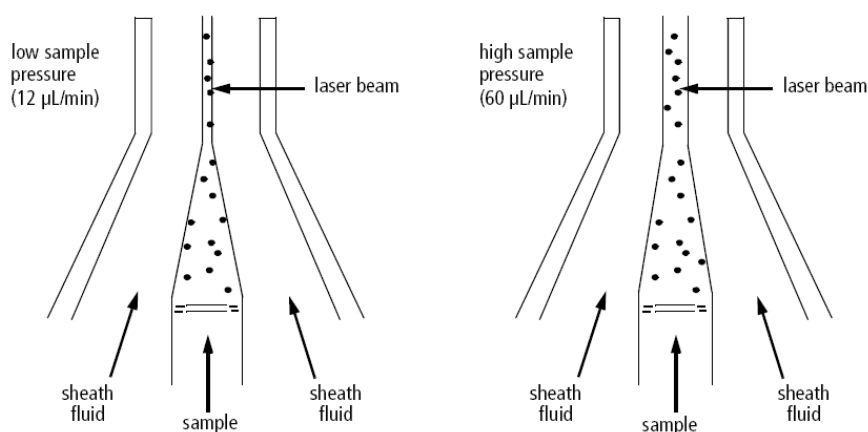
3.1.1. Fluidika

Fluidika zabezpečuje rovnoměrné nasávání vzorku do průtokové komůrky (*flow chamber*). Šíře průtoku media se vzorkem (*sample fluid*) je regulována rozdílným tlakem nasávání mezi *sample fluid* a unášecí tekutinou (*sheath fluid*). Čím větší je tlak nasávání *sample fluid*, tím širší je jeho průtok. (obr. 3). Působením *sheath fluid* dochází k urychlení částic vzorku a jejich usměrnění do centra tzv. hydrodynamickým zaostřením (kónický tvar *flow chamber* způsobuje laminární tok *sheath fluid*). Ideálně dochází k tomu, že jsou jednotlivé částice vzorku seřazeny jedna za druhou.

3.1.2. Světelný zdroj

Světelným zdrojem mohou být buď lasery, nebo rtuťové výbojky. Lasery vysílají monochromatické, koherentní záření o určité vlnové délce, zatímco rtuťové výbojky polychromatické světlo. Z tohoto důvodu se dnes používají převážně lasery. Světlo laseru prochází skrze čočku, která zaostřuje jeho paprsek a zároveň mu udává eliptický tvar. Pokud použijeme fluorescenční barviva, dojde po ozáření částice zdrojem světla k excitaci elektronů v barvivo. Excitované elektrony jsou nestabilní a vracejí se do základního energetického stavu. Dochází k emisi energie ve formě záření o větší vlnové délce (nižší energii) než mělo světlo absorbované.

Figure A-1 Hydrodynamic focusing of the sample core through the flow cell



Obr. 3. Hydrodynamická fokusace a regulace průtoku *sample fluid*.

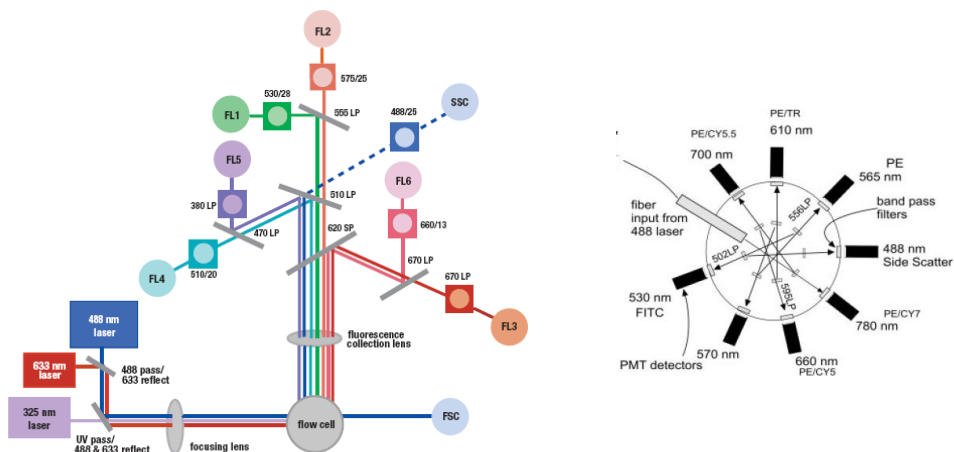
Hydrodynamickým zaostřením dochází k seřazení částic *sample fluid*. Schéma zobrazuje závislost šíře toku *sample fluid* na tlaku, pod kterým je nasáván do *flow chamber*. Nižší tlak (vlevo) způsobuje jeho užší tok na rozdíl od vysokého tlaku (vpravo) (Anonymus 2007).

3.1.3. Optický systém

Světlo vzniklé rozptylem je dále zachycováno optickým systémem (obr. 4). Světlo pokračující ve směru přímém od zdroje světla se nazývá FSC (*forward-scattered light*). Intenzita FSC závisí na velikosti částice (větší částice má vyšší intenzitu). Pro měření je podstatnější světlo s bočním rozptylem v úhlu 90° (SSC, *side-scattered light*). V tomto úhlu se měří intenzita generovaná rozptylem světla od vnitřních struktur buňky (vnitřní komplexita) a fluorescencí. Rozptýlené světlo může být dichroickými zrcadly tříděno podle vlnových délek (některé propouští, jiné reflektuje) a usměřováno k optickým filtrům, které jsou v blízkosti detektoru. Optické filtry rozdělujeme na několik typů. *Bandpass* (BP) propouštějí světlo o vlnové délce v úzkém okruhu od dané vlnové délky, *shortpass* filtry (SP) propouštějí světlo o vlnové délce stejné nebo kratší než zadaná vlnová délka, zatímco *longpass* filtry (LP) pracují na opačném principu. Místo zrcadel lze emitované světlo usměrnit do *pinhole* (otvoru) a optickým kabelem přivést do oktagonu nebo trigonu. Ten se skládá z osmi či tří fotodetektorů, ke kterým světlo prochází přes LP a BP filtry (obr. 4).

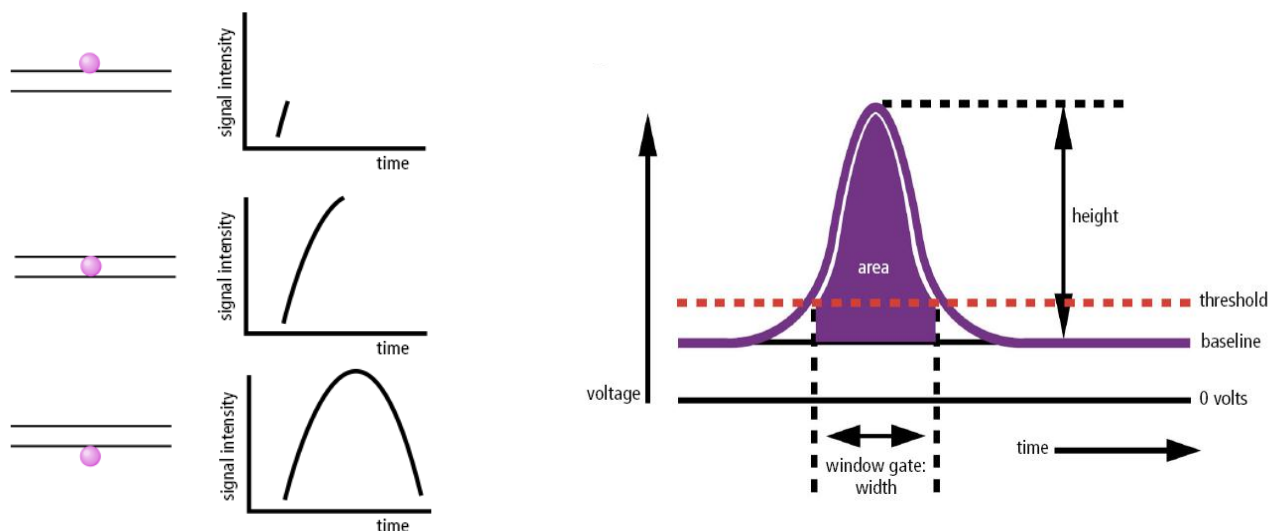
3.1.4. Zpracování signálu

Detekce signálu probíhá na fotodetektorech, které konvertují světelný signál na elektronický. Ve FCM nalezneme dva typy fotodetektorů. Fotodiody se používají k detekci silnějšího FSC signálu. Fotonásobiče (PMTs, *photomultipliers*) slouží k detekci slabších signálů ze SSC a z fluorescence. Světelný signál narazí na PMT nebo na fotodiodu a přemění se na úměrné množství elektronů. Nejsilnější intenzitu světla generuje částice, když se nachází v centru laserového paprsku (obr. 5). Na PMTs je elektrický signál amplifikován. Zesílení signálu může být logaritmické nebo lineární podle nastaveného napětí na dynodě. Pomocí elektronického prahu (*threshold*) (obr. 5) můžeme limitovat počet událostí, které budou zaznamenány. Pouze signály se stejnou nebo větší intenzitou než je hodnota *threshold* jsou odeslány k dalšímu zpracování do počítače. Nakonec je analogový signál převeden do digitálního a data jsou uložena do počítače. Nejčastěji bývají cytometry vybaveny osmi a 10-ti, méně často 16-ti bitovými detektory. Je možné tedy rozlišit 255, 1023 nebo 65 535 kanálů.



Obr. 4. Schéma optického systému a detektorů FCM.

Optický systém s použitím dichroických zrcadel (vlevo) (Anonymus 2007) a oktagonu (vpravo) (Robinson & Grégory 2007). Šipky představují trajektorii odražených paprsků světla od LP filtrů.



Obr. 5. Charakter pulzu.

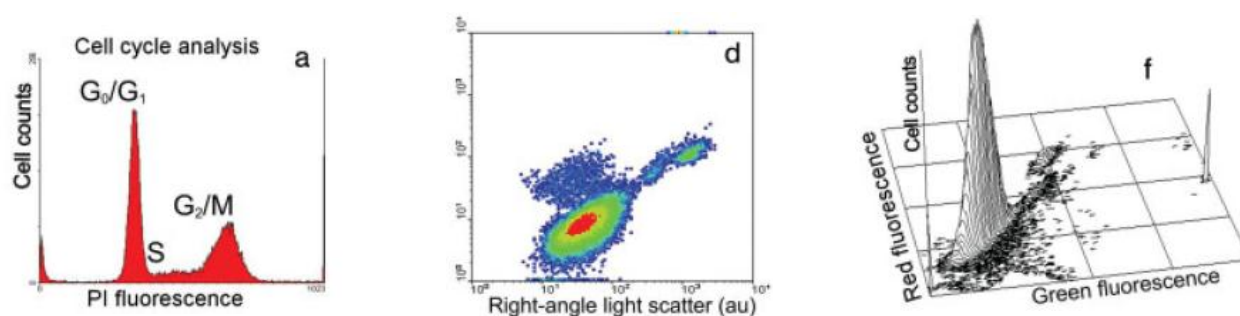
Závislost detektorem měřené intenzity světla na průchodu částice paprskem laseru. Maximální intenzita je dosažena, když se částice nachází v centru paprsku. Intenzita se zvyšuje při vchodu do paprsku a snižuje se, když ho částice opouští (vlevo). Na pulzu rozlišujeme jeho výšku (*height*), šířku (*width*) a plochu (*area*). Další charakteristikou je délka trvání pulzu (*time*) a prahová hodnota (*threshold*) určující, od jaké hodnoty intenzity bude pulz zaznamenán (vpravo) (Anonymus 2007).

3.1.5. Analýza dat v počítači: grafické znázornění a gating

Nejpoužívanějším grafickým znázorněním distribuce (obr. 6) jsou histogramy. Uvádějí počet událostí přiřazených k určitému kanálu (odpovídá určité intenzitě signálu). Míra přesnosti měření se obvykle uvádí variačním koeficientem (C.V.)¹². Dvoupřametrová měření se zobrazují bodovým grafem

¹² Směrodatná odchylka dělená nejčastější hodnotou měření (vrchol, *peak*, histogramu) $\times 100$ [%]

(každé události přísluší jeden bod), kde každé ose náleží jeden parametr. Bodové grafy s „třetím rozměrem“ jsou denzitní (určité denzité buněk náleží určitá barva) a obrysové (propojení bodů se stejným počtem událostí). Pro odlišení signálů generovaných jednou, či dvěma spojenými částicemi můžeme použít graf zobrazující plochu signálu oproti jeho výšce. Pokud má signál velkou plochu, ale malou výšku, jedná se o signál ze dvou spojených částic. Pokud má velkou plochu a zároveň i výšku, jedná se o velkou částici. Alternativně lze použít více než dvouparametrové grafy. Taková znázornění jsou už ale těžko prostorově představitelná, takže se většinou setkáváme s maximálně trojrozměrným rozložením.



Obr. 6. Grafické znázornění distribuce.

Histogram (vlevo), denzitní bodový graf (uprostřed), trojrozměrný graf (vpravo) (Robinson & Grégory 2007).

Pokud nás z naměřených dat zajímá pouze podmnožina, která splňuje určitá kritéria, můžeme tato data buď numericky nebo graficky definovat, tzn. provést *gating*, a následně analyzovat vybrané podmnožiny. *Gating* lze provádět během měření nebo až po uložení dat do FCS. U neznámých vzorků je lepší provést *gating* až po uložení dat, abychom zachytili celou variabilitu vzorku. *Gating* se může využít nejen k analýze uložených dat, ale i ke třídění (*sorting*) (více např. v Robinson & Grégory 2007).

3.2. Fluorescenční barviva

Fluorescenční barviva vhodná pro analýzu DNA lze rozdělit podle jejich preference k nukleotidům (selektivní a neselektivní) a podle schopnosti vazby na DNA v živých buňkách (tab. 1). Selektivně se vážající barviva nejsou vhodná pro zjišťování celkového obsahu DNA v buňce, kvůli odlišnému zastoupení GC a AT nukleotidů mezi organismy (Doležel et al. 1992). Můžeme jimi ale zjistit procentuální zastoupení purinových a pyrimidinových bází (viz kapitola 3.5.). Pro relativní porovnání velikosti genomu u blízce příbuzných organismů nebo pro detekci autopolyploidizace se ale využít dají. Zvláště fluorescenční barvivo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) se v botanických pracích těší veliké oblibě pro svou schopnost proniknout do živých buněk. Barviva Hoechst se na rozdíl od DAPI rychle rozkládají (nutnost měřit ten samý den po přípravě) (Shapiro & Perlmutter 2001). Neselektivní barviva jsou vhodná pro měření velikosti genomu. Příprava vyžaduje fixaci buněk, protože

nejsou schopná vazby na DNA v živých buňkách. Ethidium bromide (EB) a Propidium iodide (PI) se vážou zároveň k dvouvláknové RNA, proto je nutné před nebo zároveň s přidáním barviva dodat RNAsu. PI je preferován před EB kvůli vyšší emisní vlnové délce a známé frekvence vazby na DNA (4.-5. báze). Použití fluorochromů Syber Green a SYTOX Green není tak časté. SYTOX Green po navázání na DNA zvýší svou fluorescenci více než 500×, PI (20-30×), což způsobuje jasnější detekci fluorescence a tedy vyšší ostrost měření.

Barvivo	Vazba	Vitální ⁱ	Excitace	Emise
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	AT	Ano	361	458
Hoechst 33258	AT	Ano/Ne	352	461
Hoechst 33342	AT (5) ⁱⁱ	Ano	350	461
Hoechst 34580	AT	Ano	392	440
Mithramycin (M)	GC (2-3) ⁱⁱ	Ne	440	523
Propidium iodide (PI)	Stechiometricky	Ne	535	617
Ethidium bromide (EB)	Stechiometricky	Ne	530	600
Syber Green	Stechiometricky	Ne	497	520
SYTOX Green	Stechiometricky	Ne	504	523

Tab. 1. Přehled fluorochromů se specifickou vazbou k DNA.

Vlastnosti fluorochromů převzaty z Invitrogen/Molecular probes a Sigma-Aldrich. ⁱSchopnost vazby na DNA v živých buňkách, ⁱⁱ v závorce je uvedeno množství po sobě jdoucích bází nutné pro vazbu molekuly barviva podle Godelle et al. (1993).

3.3. Standardizace

Pro zjišťování absolutní hodnoty velikosti genomu je nutné použít standard o známé velikosti genomu. V mykologických pracích se nejčastěji používají kuřecí erytrocyty s velikostí genomu 2,33 pg. Jejich velikost mnohokrát převyšuje hodnotu nalézanou u hub (průměrná hodnota 0,0378 pg). Velký rozdíl mezi velikostmi genomu standardu a vzorku je nevhodný při kritických analýzách (Doležel et al. 1992). Pokud se jejich velikost liší 100krát, je nutné použít hrubou (často logaritmickou) škálu grafického zobrazení. To znemožňuje detekci aneuploidů v populaci. Alternativně lze změřit velikost genomu u jednoho ze vzorků a ten poté použít jako standard u následujících měření (Doležel et al. 1992; Hosny et al. 1998). Případným standardem může být jakýkoliv celogenomově sekvenovaný houbový druh (např. často používaný kmen *Saccharomyces cerevisiae* S288C, 12,06 Mb). Při zjišťování aneuploidie se mohou použít i dva standardy s velikostí genomu blízce obklopující měřený vzorek.

V dřívějších pracích se používala především externí standardizace, tzn. standard byl od vzorku připravován separovaně. Dnes je však vyžadována interní standardizace, tzn. vzorek je již na začátku přípravy smíchán se standardem. Tento postup zajišťuje zachování stejných podmínek přípravy u standardu a vzorku, což je důležité zvláště u složitějších postupů. Pro kvalitní přepočty velikosti

genomu je dále nutno zajistit, aby byl ve směsi přibližně stejný poměr studovaných buněk a standardu. Při studiu většího souboru vzorků je intenzita fluorescence standardu vynášena na grafu vždy ve stejném kanálu a také počet naměřených buněk by měl být zachovávan (5 000-20 000). Výpočet velikosti neznámého genomu vychází z rovnice:

$$C_{sam} = \frac{F_{sam}}{F_{std}} \times C_{std}$$

C_{sam}, C_{std} ... velikost genomu vzorku, standardu
 F_{sam}, F_{std} ... intenzita fluorescence vzorku, standardu

3.4. Metodika FCM v mykologických pracích

V mykologii není využití FCM ke zjištění velikosti genomu tak časté jako v botanických pracích. Na rozdíl od situace v botanice (např. Doležel et al. 1992, 2007; Doležel & Bartoš 2005; Loureiro et al. 2006), chybí v mykologii větší množství souhrnných prací a srovnávacích studií odlišných postupů. Důvodem může být přednostní využití FCM při studiu patogenních hub, kde se jedná spíše o odhad velikosti genomu (při podezření vyššího stupně ploidie). Takové studie bývají dále kombinovány s dalšími metodami zjišťování stupně ploidie, např. jedno- a dvoustupňová mutagenese (Torres-Guerrero 1999) či molekulární metody přes počty kopií *single copy* genů (Carr & Shearer 1998) a reasociační kinetika (Carr & Shearer 1998; Hijri & Sanders 2004). Přehled metodik FCM v mykologii je uveden v tab. 2 (v příloze).

Rozsáhlejší srovnání metodik pro FCM u hub publikovala Kullman (2000). Pro anotaci velikostí houbových genomů (nejen metodou FCM) založila internetové stránky (www2), kde se možno u každého odkazu dohledat, jakou metodou byla hodnota zjištěna i úplnou citací původní práce. Kullman porovnávala pět různých procedur měření. První čtyři se navzájem lišily způsobem fixace a koncentracemi RNAsy a PI. Dvě z nich zahrnovaly i izolaci jader enzymem zymolyázou. V páté analýze se jednalo o dvouparametrové měření DNA a proteinů fluorochromy DAPI a SR101¹³ s použitím pepsinu (pro snížení autofluorescence hub). Přesnost měření nezávisela na použité metodice. C.V. se pohyboval mezi 7-19 %. Pouze při fixaci 95% ethanol + ledová kyselina octová (v poměru 3:1) se fluorescence měřená na buňkách lišila od fluorescence izolovaných jader 1,4×, což autorka připsala nečistotám v cytoplazmě. Jako nejlepší postup byla zvolena postupná fixace (Carnoy A, absolutní ethanol) s následným ředěním vodou při neustálém míchání. Vortex po proběhlé enzymatické lyzi buněčné stěny způsoboval nepředvídatelné poničení spor i jader a zvýšení C.V. (až 22 %). Za nej přesnější metodu měření houbového genomu autorka určila kombinaci barviv DAPI a SR101. Tento postup nevyžaduje fixaci ani RNAsu. Pro selektivní vazbu barvy ale není DAPI vhodné pro zjištění absolutního množství DNA.

¹³ SR101 (sulforhodamine 101) je fluorochrom vhodný pro značení proteinů.

Haase & Reed (2002) srovnávali vlastnosti PI a SYTOX Green při analýze buněčného cyklu *S. cerevisiae*. Výsledky s použitím SYTOX Green měly nižší C.V. a větší linearitu mezi obsahem DNA a naměřenou fluorescencí. Výsledky dále nebyly závislé na použité koncentraci barviva a na koncentraci buněk v roztoku. Almeida et al. (2006) zjistila, že přidání RNAsy (0,75 mg/ml) a Proteinasy K (1 mg/ml) způsobuje při použití Syber Green snížení C.V. z 25 % na 4,5.

3.4.1. Měření na solitérních buňkách

V mykologii nejčastěji měření probíhá na solitérních buňkách. To je umožněno u hub s kvasinkovou fází růstu nebo u hub produkujících solitérní spory. Před vlastním měřením je potřeba zjistit pomocí fluorescenčního mikroskopu, zda jsou buňky jednojaderné. Pro tyto účely se jádro většinou barví barvivem DAPI. Pro měření FCM se ustanovuje koncentrace buněk mezi 10^6 - 10^8 /ml. Shlukování buněk je redukováno detergenty, sonikací nebo vortexem. Většina pufrů vychází z Tris (*tris*-(hydroxymethyl)-aminomethan). Alternativním pufrům je citronan sodný nebo fosfátový pufr (PBS, *phosphate buffered saline*). Ke stabilizaci chromatinu se často používá $MgCl_2$, k vazbě dvoumocných iontů¹⁴ kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Při barvení PI (nejvíce používaný typ fluorochromu) je nutné buňky fixovat. K fixaci se nejčastěji používá ledový 70% ethanol, méně často Carnoyův fixační roztok (*Carnoy fixative*, obsahuje ethanol, chloroform a kys. octovou). Tento fixační roztok může srážet proteiny buněčné stěny, což způsobuje pevné slepení buněk k sobě (Dvorak et al. 1987). Následuje promytí buněk od ethanolu pufrům a inkubace s RNAsou a PI. V metodikách se vyskytuje veliké časové rozpětí mezi přidáním PI a měřením FCM. Limitující je především minimální časové prodloužení, jelikož barvení PI je stabilní a měření může proběhnout i příští den. S nejkratším časovým úsekem jsem se setkala v pracích Hosny et al. (1998) a Hutter & Eipel (1979), kde probíhalo pouze 20 minut. Prodloužením inkubace s PI však může dojít ke zvýšení šumu kvůli nespecifickému barvení (Doležel & Bartoš 2005). Na druhou stranu při nevykonné fixaci vzorku trvá barvení fluorescenčními barvivy a štěpení RNAsou delší dobu. V takovém případě teprve po 34 hodinách došlo k získání optimálních výsledků (Kullman 2000). Je tedy třeba délku inkubace vzorku s PI a RNAsou vždy optimalizovat podle jeho vlastností a spoléhat se spíše na osvědčené metody fixace (70% ledový ethanol přes noc při teplotě 4 °C). Při používání fluorescenčních barviv Hoechst 33342 a DAPI odpadá nutnost fixace vzorku a krok s RNAsou.

3.4.2. Měření na izolovaných jádrech

Izolace jader může probíhat mechanicky nebo enzymaticky. Mechanická izolace je metodicky jednodušší, způsobuje ale více nečistot a tedy potenciálně zvyšuje fluorescenci pozadí. Enzymatická digesce buněčné stěny je metodicky náročná, ale šetrná. Při práci s izolovanými jádry je vyžadována práce při nízkých teplotách (4 °C) pro zajištění inhibice DNAs. Ve všech pracích byla izolace jader prováděna na fixovaném materiálu.

¹⁴ aktivují DNAsy

3.4.2.1. Mechanická izolace jader

Mechanická izolace jader byla použita u rodu *Armillaria* (Kim et al. 2000b). Mycelium bylo po fixaci nasekáno skalpelem. Filtrací přes 30-ti μm nylonový filtr došlo k odstranění velkých nečistot. U druhů oddělení Glomeromycota se vícejaderné spory a mycelium po fixaci drtily v mikrohmoždíři. Směs s uvolněnými jádry se filtrovala přes 30-ti a následně 5-ti μm nylonovou membránu pro eliminaci zbytků buněčných stěn (Hijri & Sanders 2004). Hosny et al. (1998) použil k separaci jader od nečistot kombinaci filtrace přes 25-ti μm síto se sacharosovou gradientovou centrifugací.

3.4.2.2. Enzymatická izolace jader

Buněčná stěna hub se skládá především z β -1,3 glukánů, dále z chitinu a proteinů. Metodika enzymatické izolace je často druhově specifická (příklady viz tab. 3). Záleží především na:

1. Skladbě a poměru enzymů
2. Typu osmotického stabilizátoru (některé soli, např. KCl, mohou zároveň zvyšovat aktivitu enzymů)
3. Stáří kultury – nejspíše nejnepříhodnější bývají klíčící hyfy, později je stěna příliš rigidní

Houba	Enzymy (názvy v angličtině)	Pufr	Stáří	Citace
<i>Aspergillus fumigatus</i>	LE ⁱ z <i>Trichoderma harzianum</i> (2 mg/ml)	1,2 M MgSO ₄ (pH 5,6)	21 hod	www3
<i>A. nidulans</i>	β -D-glucanase (8 mg/ml) + Driselase (5 mg/ml) + lyticase (81, 25 U/ml)	0,55 M KCl + 0,05 M citronan sodný (pH 5.8)	Spora před klíčením	Jung et al. 2000
<i>Ozonium</i> sp.	Lywallzyme (1,5%) + snailase (0,5%) + cellulase (1,5%) + lysozyme (1,0 (0,5) %)	0,6 M KCl	24 hod	Zhou et al. 2008
<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	Lywallzyme (1,5%)	0,6 M mannitol	7-8 dní	Yan et al. 2004
<i>Lentinus lepideus</i>	Novozym (10 mg/ml)	0,6 M MgSO ₄ či 0,6 M sacharosa	10 dní	Kim et al. 2000a
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Novozym (1 mg/ml) + Zymolyase 20T (0,3 mg/ml)	0,6 M KCl		Carlson et al. 1997
<i>Penicillium griseoroseum</i> , <i>P. expansum</i>	LE ⁱ z <i>Trichoderma harzianum</i> (5 mg/ml)	0,6 M KCl v 10 mM sodném a draselném fosfátovém pufru (pH 5,8)	18 hod	Varavallo et al. 2007

Tab. 3. Přehled metodik pro enzymatickou degradaci buněčné stěny.

ⁱLE, lysing enzyme

3.5. Poměr GC/AT bází

Poměr GC/AT bází lze na FCM zjistit prostřednictvím selektivně se vážajících barviv. Vinogradov (1994, 1998) k detekci použil Hoechst 33258 (AT báze) a Olivomycin (GC báze). Poměr jejich fluorescencí byl považován na poměr výskytů AT/GC bází v genomu. Výsledky FCM byly ve shodě s biochemicky zjištěnými procenty bází i s měřením FCM pomocí PI, i když PI lehce nadhodnocoval celkovou velikost genomu kvůli lehké preferenci ke GC bázím. Jiný výpočet vychází ze vzorce navrženého Godelle et al. (1993):

$$AT\%_{sam} = \left(\frac{R_{Hoechst}}{R_{EB}} \right)^{1/5} \times AT\%_{std}; \quad R_{Hoechst} = \frac{F_{Hoechst\ sam}}{F_{Hoechst\ std}}; \quad R_{EB} = \frac{F_{EB\ sam}}{F_{EB\ std}}$$

Pro tento výpočet je tedy nutné použít standard o známé velikosti genomu i procentuálním zastoupení AT bází. Výpočet předpokládá náhodnou distribuci AT bází v genomu. Výhodou tohoto postupu je použití pouze jedné fluorescenční barvy a korekce na schopnost vazby barviva k bázím (pro Hoechst 5 bází). Tento vzorec byl v mykologii použit pro zjištění zastoupení AT/GC bází u druhů oddělení Glomeromycota (Hosny et al. 1998).

3.6. Omezení měření

Téměř všechny práce měřící genom hub jsou prováděny na buňkách. Taková analýza může vést k vysoké nepřesnosti měření či dokonce k chybným výsledkům. U některých hub je obtížné či nemožné získat dostatečné množství jednobuněčných spor. Další nesnáze mohou vzniknout pokud mají buňky nepravidelný tvar nebo nesou přívěsky. Práce s buňkami vyžaduje fixaci. Ta může snížit schopnost vazby fluorochromů k DNA (Rousselle et al. 1998). Při nedostatečné fixaci nedojde k optimálnímu odstranění RNA a obarvení jádra (Kullman 2000). Nadhodnocení velikosti jaderného genomu může vzniknout obarvením mitochondriálního genomu (Dvorak et al. 1987; Carlson et al. 1997). Nejpodstatnější omezení spočívá v nedostatečné znalosti komponentů, které se nacházejí v cytoplazmě. V buňce hub se mohou nacházet komponenty s vlastní fluorescencí (autofluorescence), např. antrachinony (Stodůlková et al. 2009), které mohou narušovat detekci fluorescenčního signálu. Interference barviva a sekundárních metabolitů byla nalezena u slunečnice roční (*Helianthus annuus*), kde byla příčinou 60% variance v obsahu DNA mezi rostlinami (Price et al. 2000). Variance byla dříve přikládána změně velikosti genomu v závislosti na podmínkách růstu (Price et al. 1998). Z těchto důvodů se domnívám, že by bylo vhodné v mykologii pro analýzu používat izolovaná jádra. Pro metodickou i finanční náročnost enzymatické digesce buněčné stěny by mohla být mechanická izolace lepším řešením.

ZÁVĚR

Plasticita houbového genomu se projevuje v závislosti na životní strategii organismu. Tendence ke zvětšení genomu jsou patrné u některých hub s parazitickým nebo naopak mutualistickým způsobem života. Do první skupiny by patřily např. *Blumeria graminis*, *Fusarium oxysporum* a rzi, do druhé např. mykorrhizní houby arbuskulární (Glomeromycota) i ektomykorrhizní (např. *Laccaria bicolor*). Zvětšení genomu může být dosaženo expanzí genových rodin, duplikací větších částí DNA (chromosomy) či celogenomovou duplikací nebo allopolyploidizací. Jiným mechanismem je opakovaná duplikace repetitivních sekvencí, především transposonů. Zvláště u asexuálních hub nebo u hub s málo častým sexuálním cyklem je šíření repetitivních sekvencí podporováno absencí či sníženou efektivitou obranných mechanismů (RIP a MSUD). Změna velikosti genomu je spjatá s dalšími vlastnostmi organismu a mohla by tedy podléhat selekci. V mykologii zatím chybí studie, které by sledovaly závislost velikosti genomu na ekologických parametrech prostředí. Průtokový cytometr je elegantní metoda umožňující kvantifikovat velikost genomu. Většina postupů FCM v mykologických pracích probíhá na solitérních buňkách. Je to způsobeno přednostní analýzou genomu patogenních hub s kvasinkovitou fází růstu. Takový postup s sebou přináší omezení spočívající v neznalosti komponentů v cytoplazmě a v problémech s optimální fixací a následně průchodem fluorochromu do buňky. U některých hub je dále nemožné nebo pracné získat solitérní jednojaderné buňky. Z těchto důvodů si myslím, že by bylo vhodné zavést metodiku pracující s izolovanými jádry. Pro metodickou i finanční náročnost enzymatické izolace bych preferovala mechanickou izolaci.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli M. Kolaříkovi za všestrannou podporu a M. Kostovčíkovi za všestrannou kritiku. M. Hujslové a Z. Suchánkové pak za hezká čtvrtední odpoledne strávená v polopracovním rozpoložení.

Dále bych chtěla poděkovat lidem, kteří mne po celou dobu mého studia podporují, zvláště své rodině.

LITERATURA

- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. & Wilke, C. M. (1992):** Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Current Genetics* 22: 13-19
- Aguileta, G., Hood, M. E., Refrégier, G. & Giraud, T. (2009):** Genome evolution in plant pathogenic and symbiotic fungi. – *Advances in Botanical Research* 49: 158-199
- Almeida, A. J., Martins, M., Carmona, J. A., Cano, L. E., Restrepo, A., Leão, C. & Rodrigues, F. (2006):** New insights into the cell cycle profile of *Paracoccidioides brasiliensis*. – *Fungal Genetics and Biology* 43: 401-409

- Anonymus (2007):** BD LSR II User's Guide. Part No. 642221 Rev A. Becton, Dickinson & Company (<http://facstaff.stanford.edu/sff/doc/BDLSRIIUserGuide.pdf>), pp. 164
- Bagagli, E., Valadares, M. C. C. & Azevedo, J. L. (1991):** Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsh.) Sorokin. – Brazilian Journal of Genetics 14: 261-271
- Baptista, F., Machado, M. F. P. S. & Castro-Prado, M. A. A. (2003):** Alternative reproduction pathway in *Aspergillus nidulans*. – Folia Microbiologica 48: 597–604
- Barcellos, F. G. & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2003):** Genetic characterization of somatic recombination in *Trichoderma pseudokoningii*. – Brazilian Journal of Microbiology 34: 152-156
- Barow, M. (2006):** Endopolyploidy in seed plants. – BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 28: 271-281
- Batra, L. R. (1967):** Ambrosia fungi: a taxonomic revision and nutritional studies of some species. – Mycologia 59: 976-1017
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, R., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W. & Pratt, R. (2004):** Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. – Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 1-108
- Bos, C. J. & Swart, K. (1995):** Genetics of *Aspergillus*. – In: Kück, U. (ed.). The Mycota II – Genetics and Biotechnology. Springer-Verlag, pp. 19-33
- Bruns, R. & Barz, W. (2001):** Studies on cell number and nuclei in spores and on ploidy level in *Ascochyta rabiei* isolates. – Journal of Phytopathology 149: 253-258
- Calvert, M. E. K., Lannigan, J. A. & Pemberton, L. F. (2008):** Optimization of yeast cell cycle analysis and morphological characterization by multispectral imaging flow cytometry. – Cytometry Part A 73: 825-833
- Carlson, C. R., Grallert, B., Bernander, R., Stokke, T. & Boye, E. (1997):** Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry. – Yeast 13: 1329-1335
- Carr, J. & Shearer, G. (1998):** Genome size, complexity, and ploidy of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. – Journal of Bacteriology 180: 6697-6703
- Caten, C. E. (1971):** Heterokaryon incompatibility in imperfect species of *Aspergillus*. – Heredity 26: 299-312
- Caten, C.E. (1972):** Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. – Journal of General Microbiology 72: 221-229
- Cavalier-Smith, T. & Beaton, M. J. (1999):** The skeletal function of non-genic nuclear DNA: new evidence from ancient cell chimaeras. – Genetica 106: 3-13

- Cornell, M. J., Alam, I., Soanes, D. M., Wong, H. M., Hedeler, C., Paton, N. W., Rattray, M., Hubbard, S. J., Talbot, N. J. & Oliver S. G. (2007):** Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the Fungi. – *Genome Research* 17: 1809-1822
- De Lucas, J. R., Domínguez, A. I., Mendoza, A. & Laborda, F. (1998):** Use of flow-cytometry to distinguish between haploid and diploid strains of *Aspergillus fumigatus*. – *Fungal Genetics Newsletter* 45: 7-9
- Debets, F., Yang, X. & Griffiths, A. J. F. (1994):** Vegetative incompatibility in *Neurospora*: its effect on horizontal transfer of mitochondrial plasmids and senescence in natural populations. – *Current Genetics* 26: 113-119
- Doležel, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S. (1992):** Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. – *Physiologia Plantarum* 85: 625-631
- Doležel, J. & Bartoš, J. (2005):** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. – *Annals of Botany* 95: 99-110
- Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. (2007):** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nature Protocols* 2: 2233-2244
- Dujon, B., Sherman, D., Fisher, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hatraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G., Straub, M., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeninou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J. (2004):** Genome evolution in yeasts. – *Nature* 430: 35-44
- Dvorak, J. A., Whelan, W. L., McDaniel, J. P., Gibson, C. C. & Kwon-Chung, K. J. (1987):** Flow cytometric analysis of the DNA synthetic cycle of *Candida* species. – *Infection and Immunity* 55: 1490-1497
- Esser, K. & Kuenen, R. (1967):** Reproduction. – In: *Genetics of Fungi*. Springer-Verlag, pp. 40-126
- Ezov, T. K., Boger-Nadjar, E., Frenkel, Z., Katsperovski, I., Kemeny, S., Nevo, E., Korol, A. & Kashi, Y. (2006):** Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from „Evolution Canyon“: microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status. – *Genetics* 174: 1455-1468
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A. D., Berman, J., & Bennett, R. J. (2008):** The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. – *PLoS Biology* 6: 1084-1097

- Fulci, V. & Macino, G. (2007):** Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. – *Current Opinion in Microbiology* 10: 199-203
- Galagan, J. E. & Selker, E. U. (2004):** RIP: the evolutionary cost of genome defense. – *Trends in Genetics* 20: 417-423
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. & Firoozabady, E. (1983):** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. – *Science* 220: 1049-1051
- Garbelotto, M., Gonthier, P., Linzer, R., Nicolotti, G. & Otrrosina, W. (2004):** A shift in nuclear state as the result of natural interspecific hybridization between two North American taxa of the basidiomycete complex *Heterobasidion*. – *Fungal Genetics and Biology* 41: 1046–1051
- Gerstein, A. C., Chun, H. E., Grant, A. & Otto, S. P. (2006):** Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. – *PloS Genetics* 2: 1396-1401
- Gerstein, A. C., McBride, R. M. & Otto, S. P. (2008):** Ploidy reduction in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Biology Letters* 4: 91-94
- Ghormade, V., Shastry, P., Chiplunkar, J. & Deshpande, M. V. (2005):** Determination of ploidy of a dimorphic zygomycete *Benjaminiella poitrasii* and the occurrence of meiotic division during zygospore germination. – *Journal of Agricultural Technology* 1: 97-112
- Godelle, B., Cartier, D., Marie, D., Brown, S. C. & Siljak-Yakovlev, S. (1993):** Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. – *Cytometry Part A* 14: 618-626
- Goffeau, A. (2004):** Seeing double. – *Nature* 430: 25-26
- Goodwin, S. & Kema, G. (2009):** Genome plasticity in the genus *Mycosphaerella*. – *Phytopathology* 99: S166 (Abstract)
- Gourmet, C., Gray, L. E. & Rayburn, A. L. (1997):** Flow cytometric analysis of conidia of fungi isolated from soybean vascular tissue. – *Journal of Phytopathology* 145: 405-408
- Gregory, T. R. & Hebert, P. D. N. (1999):** The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. – *Genome Research* 9: 317-324
- Gregory, T. R. (2001):** Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. – *Biological Reviews* 76: 65-101
- Gregory, T. R., Nicol, J. A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I. J., Murray, B. G., Kapraun, D. F., Greilhuber, J. & Bennett, M. D. (2006):** Eukaryotic genome size databases. – *Nucleic Acids Research* 35: D332-D338
- Haase, S. B. & Reed, S. I. (2002):** Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. – *Cell Cycle* 1: 132-136
- Hijri, M. & Sanders, I. R. (2004):** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. – *Fungal Genetics and Biology* 41: 253-261

- Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V. & Dulieu, H. (1998):** Nuclear DNA content of 11 fungal species in Glomales. – *Genome* 41: 422-428
- Hutter, K. & Eipel, H. E. (1979):** Simultaneous measurements of DNA and protein content of microorganisms by flow cytometry. – *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 6: 223-231
- Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupeš, I., Tyers, M. & Futcher, B. (2007):** The size of the nucleus increases as yeast cells grow. – *Molecular Biology of the Cell* 18: 3523-3532
- Jung, M. K., Ovechkina, Y., Prigozhina, N., Oakley, C. E. & Oakley, B. R. (2000):** The use of beta-D-glucanase as a substitute for Novozym 234 in immunofluorescence and protoplasting. – *Fungal Genetics Reports* 47: 65-66
- Karaoglu, H., Lee, C. M. Y. & Meyer, W. (2005):** Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. – *Molecular Biology and Evolution* 22: 639-649
- Kauserud, H., Colman, J. E. & Ryvarde, L. (2008):** Relationship between basidiospore size, shape and life history characteristics: a comparison of polypores. – *Fungal Ecology* 1: 19-23
- Kim, B. K., Kang, J. H., Jin, M., Kim, H. W., Shim, M. J. & Choi, E. C. (2000a):** Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. – *Life Sciences* 66: 1359-1367
- Kim, M., Klopfenstein, N., McDonald, G. I., Arumuganathan, K. & Vidaver, A. M. (2000b):** Characterization of North American *Armillaria* species by nuclear DNA content and RFLP analysis. – *Mycologia* 92: 874-883
- Knight, C. A. & Ackerly, D. D. (2002):** Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. – *Ecology Letters* 5: 66-76
- Kuldau, G. A., Tsai, H. & Schardl, C. L. (1999):** Genome sizes of *Epichloë* species and anamorphic hybrids. – *Mycologia* 91: 776-782
- Kullman, B. (2000):** Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi. – *Folia Cryptogamica Estonica* 36: 31-46
- Kullman, B. & Greve, B. (2007):** Diversity of DNA and protein contents of spores of the closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. ostreatus* as studied by flow cytometry. – *Folia Cryptogamica Estonica* 43: 17-21
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Doležal, J. & Santos, C. (2006):** Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. – *Annals of Botany* 98: 679-689
- Ma, L. & Fusarium comparative genomics working group (2010):** Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium oxysporum*. – In: Meeting Abstracts. 10th European Conference on Fungal Genetics. 29. March – 1. April 2010. Leeuwenhorst, the Netherlands. (Abstract PR2.21)
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E. G. J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., Salamov, A., Shapiro, H. J., Wuyts, J., Blaudez, D., Buée, M., Brokstein, P., Canbäck, B., Cohen, D., Courty, P. E., Coutinho, P. M., Delaruelle, C., Detter, J. C.,**

- Deveau, A., DiFazio, S., Duplessis, S., Fraissinet-Tachet, L., Lucic, E., Frey-Klett, P., Fourrey, C., Feussner, I., Gay, G., Grimwood, J., Hoegger, P. J., Jain, P., Kilaru, S., Labbé, J., Lin, Y. C., Legué, V., Le Tacon, F., Marmeisse, R., Melayah, D., Montanini, B., Muratet, M., Nehls, U., Niculita-Hirzel, H., Oudot-Le Secq, M. P., Peter, M., Quesneville, H., Rajashekar, B., Reich, M., Rouhier, N., Schmutz, J., Yin, T., Chalot, M., Henrissat, B., Kües, U., Lucas, S., Van de Peer, Y., Podila, G. K., Polle, A., Pukkila, P. J., Richardson, P. M., Rouzé, P., Sanders, I. R., Stajich, J. E., Tunlid, A., Tuskan, G. & Grigoriev, I. V. (2008):** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. – *Nature* 452: 88-93
- McBride, R., Greig, D. & Travisano, M. (2008):** Fungal viral mutualism moderated by ploidy. – *Evolution* 62: 2372-2380
- Milgroom, M. G., Sotirovski, K., Risteski, M. & Brewer, M. T. (2009):** Heterokaryons and parasexual recombinants of *Cryphonectria parasitica* in two clonal populations in southeastern Europe. – *Fungal Genetics and Biology* 46: 849-854
- Moon, C. D., Miles, C. O., Järlfors, U. & Schardl, C. L. (2002):** The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the southern hemisphere. – *Mycologia* 94: 694-711
- Neumann, F. R. & Nurse, P. (2007):** Nuclear size control in fission yeast. – *The Journal of Cell Biology* 179: 593-600
- Nielsen, K. & Yohalem, D. S. (2001):** Origin of a polyploid *Botrytis* pathogen through interspecific hybridization between *Botrytis aclada* and *B. byssoidea*. – *Mycologia* 93: 1064-1071
- Ohno, S. (1972):** So much 'junk' DNA in our genome. – In: Smith, H. H. (ed). *Evolution of Genetic Systems*. Gordon & Breach, pp. 366-370
- Olaiya, A. F. & Sogin, S. J. (1979):** Ploidy determination of *Candida albicans*. – *Journal of Bacteriology* 140: 1043-1049
- Paccola-Meirelles, L. D. & Azevedo, J. L. (1991):** Parasexuality in *Beauveria bassiana*. – *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 172-176
- Pekarek, E., Jacobson, K. & Donovan, A. (2006):** High levels of genetic variation exist in *Aspergillus niger* populations infecting *Welwitschia mirabilis* Hook. – *Journal of Heredity* 97: 270-278
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D. & Bufton, A. W. (1953):** The genetics of *Aspergillus nidulans*. – *Advances in Genetics* 5: 141-238
- Price, H. J., Morgan, P. W. & Johnston, J. S. (1998):** Environmentally correlated variation in 2C nuclear DNA content measurements in *Helianthus annuus* L.. – *Annals of Botany* 82 (Suppl. A): 95-98
- Price, H. J., Hodnett, G. & Johnston, J. S. (2000):** Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. – *Annals of Botany* 86: 929-934
- Rancati, G., Pavelka, N., Fleharty, B., Noll, A., Trimble, R., Walton, K., Perera, A., Staehling-Hampton, K., Seidel, C. W. & Li, R. (2008):** Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. – *Cell* 135: 879-893

- Robinson, J. P. & Grégory, G. (2007):** Principles of flow cytometry. – In: Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. (eds.). *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. Wiley-VCH, pp. 19-40
- Romano, N. & Macino, G. (1992):** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. – *Molecular Microbiology* 6: 3343-3353
- Rousselle, C., Robert-Nicoud, M. & Ronot, X. (1998):** Flow cytometric analysis of DNA content of living and fixed cells: a comparative study using various fixatives. – *The Histochemical Journal* 30: 773-781
- Sanderson, K. E. & Srb, A. M. (1965):** Heterokaryosis and parasexuality in the fungus *Ascochyta imperfecta*. – *American Journal of Botany* 52: 72-81
- Scannell, D. R., Byrne, K. P., Gordon, J. L., Wong, S. & Wolfe, K. H. (2006):** Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploid yeasts. – *Nature* 440: 341-345
- Shapiro, H. M. & Perlmutter, N. G. (2001):** Violet laser diodes as light sources for cytometry. – *Cytometry* 44: 133-136
- Sia, R. A., Lengeler, K. B. & Heitman, J. (2000):** Diploid strains of the pathogenic basidiomycete *Cryptococcus neoformans* are thermally dimorphic. – *Fungal Genetics and Biology* 29: 153-163
- Solieri, L., Cassanelli, S., Croce, M. A. & Giudici, P. (2008):** Genome size and ploidy level: new insights for elucidating relationships in *Zygosaccharomyces* species. – *Fungal Genetics and Biology* 45: 1582-1590
- Soltis, D. E., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Bell, C. D., Paterson, A. H., Zheng, C., Sankoff, D., dePamphilis, C. W., Wall, P. K. & Soltis, P. S. (2009):** Polyploidy and angiosperm diversification. – *American Journal of Botany* 96: 336-348
- Souza-Júnior, S. A., Becker, T. C. A. & Castro-Prado, M. A. A. (2007):** Asexual recombination in a *uvrH* mutant of *Aspergillus nidulans*. – *Biological Research* 40: 65-71
- Spanu P. D. & the Blumeria Genome sequencing Consortium (2010):** Genome expansion in powdery mildews is caused by loss of immunity against genomic parasites. – In: Meeting Abstracts. 10th European Conference on Fungal Genetics. 29. March – 1. April 2010. Leeuwenhorst, the Netherlands. (Abstract PR2.29)
- Stodůlková, E., Kolařík, M., Křesinová, Z., Kuzma, M., Šulc, M., Man, P., Novák, P., Maršík, P., Landa, P., Olšovská, J., Chudíčková, M., Pažoutová, S., Černý, J., Bella J. & Flieger, M. (2009):** Hydroxylated anthraquinones produced by *Geosmithia* species. – *Folia Microbiologica* 54: 179-187
- Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O'Toole, E. & Pellman, D. (2006):** Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. – *Nature* 443: 541-547
- Suzuki, T., Nishibayashi, S., Kuroiwa, T., Kanbe, T. & Tanaka, K. (1982):** Variance of ploidy in *Candida albicans*. – *Journal of Bacteriology* 152: 893-896
- Swift, H. (1950):** The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 36: 643-654

- Talbot, N. J. & Wayman, M. (1989):** Increase in ploidy in yeasts as a response to stressing media. – *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 167-169
- Torres-Guerrero, H. (1999):** Ploidy study in *Sporothrix schenckii*. – *Fungal Genetics and Biology* 27: 49-54
- Varavallo, M. A., de Queiroz, M. V., Lana, T. G., de Brito, A. T. R., Gonçalves, D. B. & de Araújo, E. F. (2007):** Isolation of recombinant strains with enhanced pectinase production by protoplast fusion between *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. – *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 52-57
- Vinogradov, A. E. (1994):** Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. – *Cytometry Part A* 16: 34-40
- Vinogradov, A. E. (1998):** Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. – *Cytometry Part A* 31: 100-109
- Wöstemeyer, J. & Kreibich, A. (2002):** Repetitive DNA elements in fungi (Mycota): impact on genomic architecture and evolution. – *Current Genetics* 41: 189-198
- Yan, P., Jiang, J. & Cui, W. (2004):** Characterization of protoplasts prepared from the edible fungus, *Stropharia rugoso-annulata*. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 173-177
- Yuen, K., Pascal, G., Wong, S. S. Y., Glaser, P., Woo, P. C. Y., Kunst, F., Cai, J. J., Cheung, E. Y. L., Medigue, C. & Danchin, A. (2003):** Exploring the *Penicillium marneffe* genome. – *Archives of Microbiology* 179: 339-353
- Zhou, X., Wei, Y., Zhu, H., Wang, Z., Lin, J., Liu, L. & Tang, K. (2008):** Protoplast formation, regeneration and transformation from the taxol-producing fungus *Ozonium* sp.. – *African Journal of Biotechnology* 7: 2017-2024
- Zolan, M. E. (1995):** Chromosome-length polymorphism in fungi. – *Microbiological Reviews* 59: 686-698
- www1:** <http://labs.fhcr.org/gottschling/Yeast%20Protocols/facs.html>
- www2:** <http://www.zbi.ee/fungal-genomesize/index.php?id=>
- www3:** http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?secure/laboratory_protocols/birch.php~main
- www4:** <https://www.amnis.com/>

P ÍLOHA

Houba	Typ ástice	Pufr	Regulace shlukování	Fluorochrom		Fixace			Citace
				Typ	as (hod)	Koncentrace (%), typ	as (hod)	Teplota (°C)	
<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>	Bu ka	PBS, pH 7,4	Triton X-100	M	Ô ⁱ	Carnoy fixative	15	4	Dvorak et al. 1987
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Bu ka	Tris, pH 8,0	Sonikace	PI	2-16	70, ethanol	P es noc	4	Sia et al. 2000
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida utilis</i>	Bu ka	Tris, pH 7,5		PI	1/3	70, ethanol	1	4	Hutter & Eipel 1979
				FITC ^v	1/2				
<i>S. cerevisiae</i>	Bu ka	Tris, pH 7,5	Sonikace	SYTOX Green		70, ethanol	1	25	Hasse et al. 2002
							P es noc	4	
<i>S. cerevisiae</i>	Bu ka	Citronan sodný, pH 7,0		SYTOX Green	> 3, P es noc	70, ethanol	1	25	Gerstein et al. 2006
							Ô	4	
<i>S. cerevisiae</i>	Bu ka	Citronan sodný, pH 7,0	Sonikace	PI	1/2	70, ethanol	1	25	www1
							Ô	4	
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Bu ka	Citronan sodný, pH 8,0	Sonikace, Triton X-100	PI	1	70, ethanol	1-2	25	Carr & Shearer 1998
<i>Benjaminiella poitrasii</i>	Bu ka	PBS, pH 7,2	Tween 80	PI	NA	70, ethanol	P es noc	4	Ghormade et al. 2005

<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Bu ka	Citronan sodný, pH 7,5	Sonikace, Triton X-100	SYBR Green	P es noc	70, ethanol	P es noc	4	Almeida et al. 2006
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Bu ka	Citronan sodný, pH 7,0	Sonikace	PI	P es noc	70, ethanol	P es noc	4	Solieri et al. 2008
<i>Phialophora gregata</i> , <i>Acremonium</i> sp.	Bu ka	Tris, pH 8,0	Triton X-100	PI	4/3	70, ethanol	1	NA ⁱⁱ	Gourmet et al. 1997
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bu ka			DAPI SR101	1/3				Kullman 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bu ka	Tris, pH 8,0	Tween 80	PI	1/2	70, ethanol	1/3	4	De Lucas et al.1998
<i>Glomales</i> spp.	Jádro mech ⁱⁱⁱ	PBS Tris, pH 7,0	Triton X-100	PI DAPI	1/3	4, formaldehyd	2	led	Hosny et al. 1998
<i>Armillaria</i> spp.	Jádro mech	Tris, pH 7,4	Triton X-100	PI	1/3	4, formaldehyd	1/4	NA	Kim et al. 2000b
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Jádro enz ^{iv}	Tris, pH 7,4 nebo 8,0	Triton X-100	Hoechst 33258 M + EB	NA	70, ethanol	NA	NA	Carlson et al. 1997

Tab.2 Metodiky FCM v mykologii.

ⁱdlouhodob , ⁱⁱ nedostupná informace (not available), ⁱⁱⁱ mechanická izolace, ^{iv}enzymatická izolace, ^vFITC, fluorescein isothiocyanate (zna ení protein). Zkratky fluorochrom vysv tleny v kapitole 3.2. (tab. 1), zkratky pufr v kapitole 3.4.1.