

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie a geografie se zaměřením na vzdělávání



Barbora Matoušková

Vliv teploty na životní cyklus zygomycetů
Effect of temperature on life cycle of zygomycetes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Alena Kubátová, CSc.
Konzultant: doc. Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha, 2018

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

V Praze, datum

Podpis:

Poděkování: Chtěla bych velice poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za odborné vedení, za pomoc, trpělivost a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi doc. Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. za vstřícný přístup a přínosné informace.

Abstrakt:

Tato práce pojednává o významu zygomycetů, jejich aktuálním postavení v systému hub a především o jejich ekologických nárocích. Práce shrnuje vliv teploty na životní cyklus, tj. především na růst, rozmnožování a produkci metabolitů. Zaměřuje se především na psychrofilní a termofilní druhy a popisuje mechanismy adaptace na nepříznivé podmínky. Pro výzkum vlivu teploty jsou zygomycety mimořádně vhodnými modelovými organismy, např. v řádu Mucorales nacházíme příbuzné zástupce rostoucí v diametrálně odlišných prostředích. Mezi mechanismy adaptace k extrémním teplotám u zygomycetů převládá produkce trehalózy, dále změna stupně nasycenosti membránových fosfolipidů a produkce látek stabilizujících membránu – sterolů, glykolipidů a cukerných alkoholů.

Klíčová slova: teplota, růst, rozmnožování, životní cyklus, stanoviště, extrémofilové, Mucoromycotina, Mortierellomycotina

Abstract:

This thesis is aiming on zygomycetes, their importance, their current position in the Fungi kingdom and above all their ecological demands. The paper summarizes the influence of temperature on their life cycle (i.e. primarily on the growth, reproduction and production of metabolites). It focuses mainly on psychrophilic and thermophilic species and describes the mechanisms of adaptation to unfavorable living conditions. To investigate the influence of temperature, zygomycetes are exceptionally suitable model organisms, e.g. in the Mucorales order we can find relatives growing in diametrically different environments. Among the mechanisms of extreme temperature adaptation for zygomycetes are in particular trehalose production, a change in the degree of saturation of membrane phospholipids and the production of membrane stabilizing agents - sterols, glycolipids and sugar alcohols.

Key words: temperature, growth, reproduction, life cycle, habitat, extremophiles, Mucoromycotina, Mortierellomycotina

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Obecná charakteristika zygomycetů.....	2
3.	Postavení zygomycetů v systému hub.....	4
4.	Výskyt v přírodě.....	6
5.	Význam zygomycetů pro člověka.....	8
6.	Vliv teploty na růst zygomycetů.....	10
6.1	Vymezení psychrofilů a termofilů.....	10
6.2	Chladnomilné houby.....	10
6.3	Teplomilné houby.....	12
6.4	Vliv teploty na růst.....	13
7.	Vliv teploty na rozmnožování zygomycetů.....	16
8.	Vliv teploty na produkci mastných kyselin.....	19
9.	Mechanismy adaptace na extrémní teploty.....	20
9.1	Ochranné mechanismy membrány.....	23
9.2	Trehalóza a její vliv v organismu.....	24
9.4	Mechanismy adaptace – shrnutí.....	25
10.	Závěr.....	26
11.	Seznam použité literatury.....	28

Použité zkratky:

PUFA	polyunsaturated fatty acid	polynenasycená mastná kyselina
GLA	γ -linolenic acid	gama-linolenová kyselina
DHA	docosahexaenoic acid	dokosahexenová kyselina
EPA	eicosapentaenic acid	eikosapentenová kyselina
ALA	α -linolenic acid	α -linolenová kyselina
HS	heat shock	tepelný šok
MEA	malt extract agar	agar se sladovým extraktem
GAE	glucose-asparagine medium	glukózo-asparaginové médium
SL4	wort beer agar	sladinový agar (4° cukernatost)
SDA	Sabouraud dextrose agar	Sabouraudův agar
PYG	peptone yeast agar	
EYSA	Emerson yeast starch agar	Emersonův agar

1. Úvod

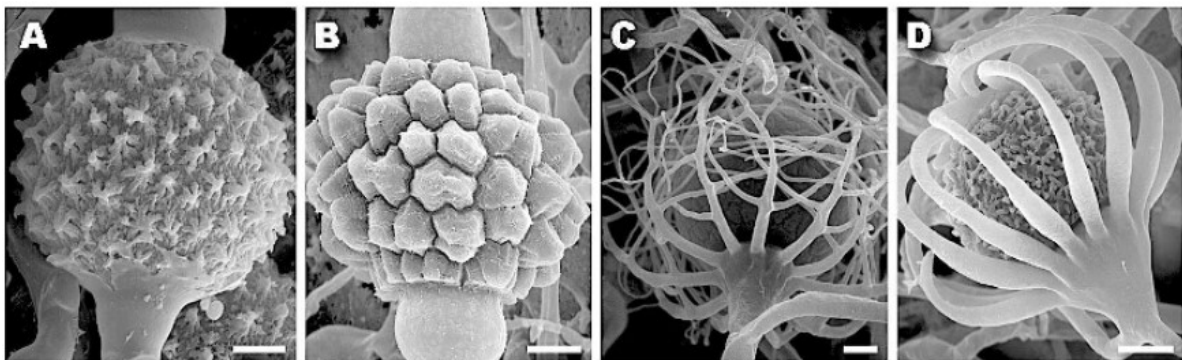
Zygomycety jsou mikroskopické vláknité houby vyznačující se rozmanitým trofismem a osidlující širokou škálu stanovišť, včetně prostředí člověka. Zygomycety jsou především saprotrofové a dekompozitoři, některé skupiny ale zahrnují striktně či fakultativně parazitické druhy, nebo vytváří symbiózy s cévnatými rostlinami. Dřívější vymezení skupiny Zygomycota bylo založeno na morfologických znacích, především pak na způsobu tvorby pohlavních spor (zygospor) konjugací – tedy spájením. Dalšími výraznými znaky je nepřehrádkované (coenocytické) mycelium, absence vícebuněčných sporokarpů a častý výskyt nepohlavního rozmnožování (tvorba sporangií). Současné fylogenetické studie však prokázaly, že přes všechny vnější společné znaky jsou zygomycety polyfyletickou skupinou. Nejnovější představy o fylogenezi zygomycetů budou prezentovány níže.

Teplota je jeden z klíčových faktorů prostředí působících na životní cykly organismů. Vzhledem k širokému rozšíření zygomycetů, tyto organismy vyvinuly různé mechanismy adaptace k „extrémním“ teplotním podmínkám, přizpůsobily se jak chladným podmínkám arktických oblastí, tak i vyšším teplotám až do 60 °C. Přestože jde o tak významný faktor, je problematika vymezení termínů psychrofil, psychrotrof a termofil u hub poněkud neujasněná.

Hlavním cílem práce je popsat a shrnout současné poznatky o vlivu teploty na životní cyklus zygomycetů, tj. na růst, pohlavní i nepohlavní rozmnožování, včetně působení na sporulaci či tvorbu sekundárních metabolitů, a ujasnit mechanismy přizpůsobení vysokým i nízkým teplotám.

2. Obecná charakteristika zygomycetů

Zygomycety jsou skupinou, která vždy přitahovala pozornost mykologů. Tradičním základem pro studium těchto organismů jsou práce Zychy (1969), Pidoplička (1971), Schipper (1969, 1975), O'Donnella (1979) či Benjamin (1979). V současné době jsou zygomycety považovány za polyfyletickou skupinu, která je jako celek charakterizována především spájením, tedy specifickým způsobem pohlavního rozmnožování. Jedná se o splývání protoplastů mnohojaderných gametangií, tento proces se nazývá gametangiogamie. Vzácněji dochází také ke splývání vegetativních somatických hyf, které se označuje jako somatogamie. Výsledkem gametangiogamie i somatogamie je tvorba zygosporangia s jedinou zygosporou. Gametangia jsou často nesena suspensori (podpůrnými buňkami), jak je vidět na obr. 1 (A, B). Okolo zygosporangia se může vytvářet hyfový obal vyrůstající se suspensorů, příkladem může být hyfový obal druhu *Absidia spinosa* var. *biappendiculata* (obr. 1, D). Pohlavní rozmnožování může proběhnout mezi dvěma jedinci odlišných párovacích typů (mating types (+) a (-)). Takové rozmnožování označujeme jako heterotalické. Homotalické pak nazýváme druhy, které jsou schopny vytvořit zygosporu na témže jedinci; tím dochází k samooplození stejným párovacím typem.



Obr. 1 Typy zygospor vybraných druhů zygomycetů, převzato White et al., 2006, Mycologia. SEM fotografie zygomycetů představující morfoložickou diverzitu sexuálních reprodukčních orgánů; zygospory druhů A. *Cokeromyces recurvatus*, B. *Cunninghamella homothallica*, C. *Radiomyces spectabilis*, D. *Absidia spinosa*

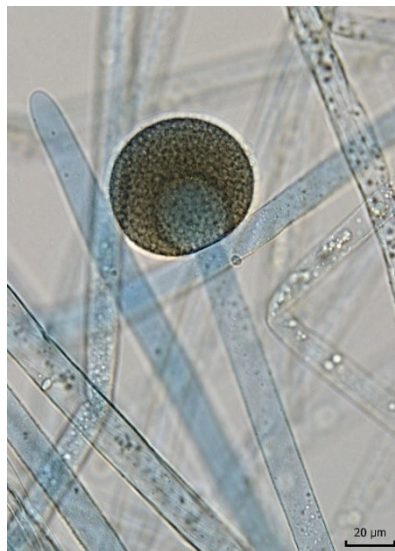
Zygospory bývají typicky ornamentované, ale často mohou mít i hladký povrch (Benny et al. 2001). Mají charakter trvalé spory a jsou diploidní. K meiotickému redukčnímu dělení dochází až při zrání nebo klíčení zygospory. I přes oddělení plasmogamie a karyogamie v zygospoře neznáme u zygomycetů skutečnou dikaryofázi, jako je u askomycetů a bazidiomycetů. Někdy se mohou tvořit tzv. azygospory (nepohlavně vzniklé spory), které vznikají partenogeneticky pouze z jednoho gametangia; morfoložicky jsou podobné zygosporám (Benny et al. 2001). Byly pozorovány u řádů produkujících zygospory

(Benjamin 1979). U některých taxonů není pohlavní rozmnožování známo a v životním cyklu se uplatňuje pouze nepohlavní rozmnožování.

Nepohlavní rozmnožování probíhá obvykle formou tvorby sporangioforů nebo sporoforů nesoucích sporangia, ve kterých se endogenně tvoří sporangiospory. Sporangia mohou být mnohosporová (*Mucor*, *Rhizopus*), nebo několikasperová, nazývající se sporangioly (*Thamnidium elegans*, *Blakeslea trispora*) nebo merosporangia (*Piptocephalis*, obr. 4), či se tvoří pouze jednosporové sporangioly, které vznikají na povrchu sporogenního měchýřku (*Cunninghamella*). Redukce počtu sporangiospor ve sporangii je zřejmým evolučním trendem zygomycetů. Na myceliu se vytváří specializované hyfy – sporangiofory, nesoucí sporangia nebo sporokladia. Koncová část sporangioforu se nazývá kolumela (střední sloupek) a bývá často vyklenutá dovnitř sporangia. Hyfa může v místě pod sporangiem zduřet a vytvořit tak apofýzu, která je velmi výrazná například u rodu *Absidia*. Po prasknutí stěny sporangia někdy pod kolumelou zůstává zbytek stěny a tvoří tak tzv. límeček (obr. 2).



Obr. 2 *Mucor* sp. AK 237-13, 1000 x zvětšeno; kolumela s límečkem



Obr. 3 *Mucor circinelloides* 640 x zvětšeno; kulovité sporangium, uvnitř kolumela



Obr. 4 *Piptocephalis* sp., 1000 x zvětšeno, zralá merosporangia, převzato: Atlas zygomycetů, Kubátová, Váňová (2009)

Kulovitá nebo hruškovitá sporangia s kolumelou jsou typická pro zástupce mukorů (obr. 3). Na sporangioforu se u některých druhů tvoří fertilní sporokladium, na kterém v řadách vyrůstají sporogenní buňky – pseudofialidy, které dávají vzniknout jedinému jednosporovému merosporangiu (např. u rodu *Coemansia*). Merosporangia některých zygomycetů vyrůstají na sporogenní hlavici a obsahují více spor (*Syncephalastrum*, *Piptocephalis*). Počet spor v merosporangiu obvykle není větší než 10–15 (Benjamin 1966). Kromě výše uvedených

struktur tvoří někteří zástupci tlustostěnné chlamydospory (*Mucor dimorphosporus*), tenkostěnné artrospory (*Mucor rouxii* (Barrera 1983)), případně blastokonidie.

Hyfy jsou typicky coenocytické a mnohojaderné, často bohatě větvené; přehrádky se tvoří pouze pro oddělení rozmnožovacích struktur nebo u starých mycelií. Tento znak však nemusí být absolutně platný, některé taxony zygomycetů přehrádky vytváří (např. *Mycotypha*). Přehrádky mohou být celistvé, s mikropóry (*Phycomyces*) nebo s primitivním dolipórem (*Kickxellomycotina*). Buněčná stěna obsahuje především chitin a chitosan (*Mucorales*).

Způsob výživy zygomycetů je heterotrofní – jde o saprotrofy nebo parazity. Parazitují na živočiších, rostlinách nebo jiných houbách; některé druhy mohou být oportunními patogeny člověka i jiných živočichů (Benny et al. 2001).

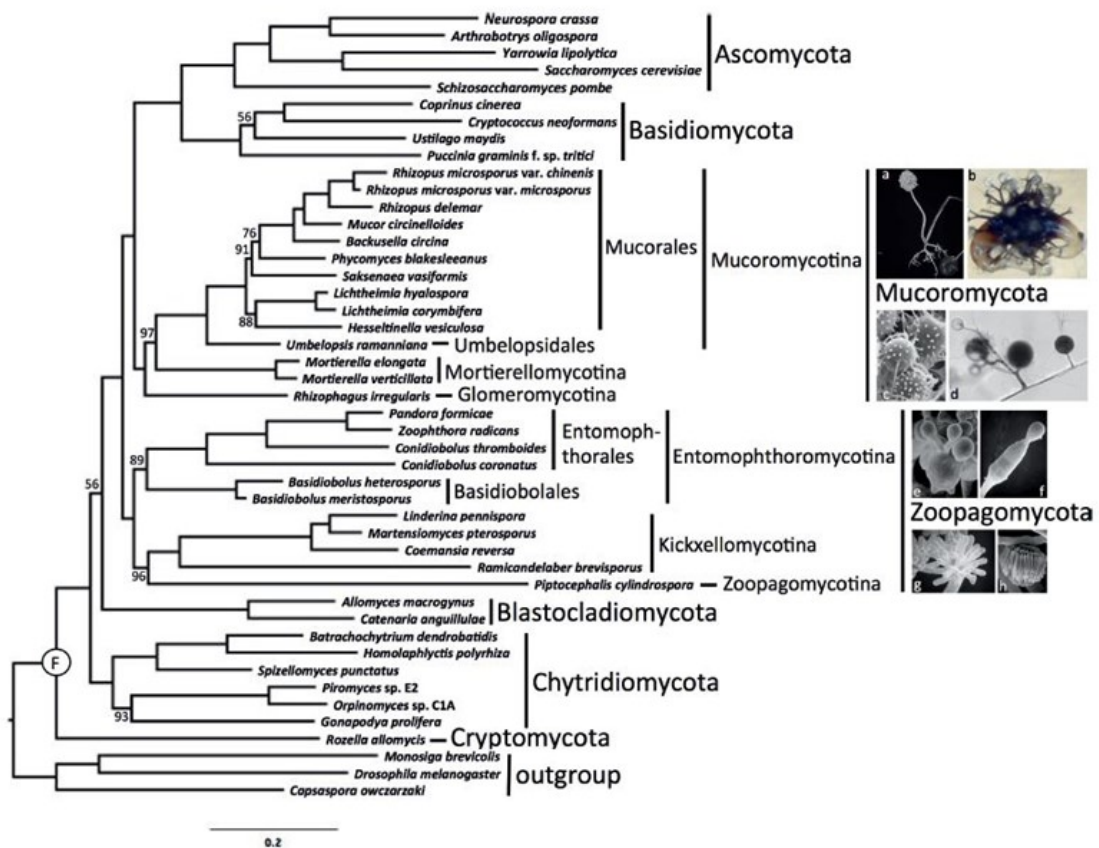
3. Postavení zygomycetů v systému hub

Zygomycety byly dříve klasifikované jako jediné oddělení s názvem Zygomycota (White et al. 2006) založený na tvorbě zygospor jako formy sexuálního rozmnožování, dále na hojném asexuálním rozmnožování pomocí sporangií, absencí vícebuněčných sporokarpů a tvorbě coenocytického mycelia (Spatafora et al. 2016). Zpočátku se Zygomycota jevila být na ose vývoje k vyšším houbám. Whittaker se domníval, že jsou odvozeny od Chytrididomycota ztrátou bičíku a změnou organizace mycelia; vyšší houby pak měly být odvozeny od Zygomycota (Whittaker 1969). Dřívější autoři řadili houby do říší Protista, Monera nebo Plantae, což Whittaker odmítal, a pro houby vyčlenil samostatnou říši Fungi založenou na morfologii a typu výživy. Klasifikace řádů kmene Zygomycota byla zpočátku založená na podobnosti fenotypů; na vzhledu asexuálních a sexuálních reprodukčních struktur, ultrastruktury hyf včetně přítomnosti sept a pórů, a na výživovém režimu (saprotrofie, parazitismus, endokomezalismus) (Tanabe et al. 2005). Ještě nedávno byl kmen Zygomycota rozdělen na dvě třídy Zygomycetes a Trichomycetes (White et al. 2006). Klasifikace z roku 2007 (Hibbett et al.) formálně opustila používání kmenu Zygomycota a kmen byl rozdělen na čtyři podkmeny incertae sedis – Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina a Mucoromycotina, zvláště byl vyčleněn kmen Glomeromycota (Hibbett et al. 2007).

Nejnovější molekulární analýzy ukazují pravděpodobnou existenci dvou kmenů, čtyř tříd a 16 řádů. Multigenová analýza na 192 orthologních proteinech byla provedena v roce 2016 (Spatafora et al. 2016). Použity byly datasey pro 46 taxonů (z toho 25 zygomycetů). Na základě těchto výsledků byly vymezeny skupiny Mucoromycota a Zoopagomycota a stanoveno jejich

rozčlenění do pododdělení a řádů. Mucoromycota tak dnes obsahují Mucoromycotina, Mortierellomycotina a Glomeromycotina. Zoopagomycota jsou členěny na Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina a Zoopagomycotina. Tyto skupiny jsou poměrně dobře vymezené jak fylogeneticky, tak i morfologicky a ekologicky. Z fylogenetického stromu (obr. 5) je zřetelné, že zygomycety (Mucoromycota a Zoopagomycota) jsou řazeny jako sesterské k Dikarya s velmi vysokou bootstrapovou podporou. To by mohlo znamenat, že dřívější práce zygomycety mylně řadily k bazálním skupinám hub a zygomycety jsou pravděpodobně vývojově dále, než se dříve mínilo. Jak je zřejmé z předchozího textu, systém zygomycetů je neustále v pohybu a poměrně dynamicky se mění. Fylogenetické analýzy nabízejí nové pohledy na polohu taxonů zygomycetů v systému hub.

Ve své práci se budu věnovat především dvěma pododdělením – Mucoromycotina a Mortierellomycotina (dříve označované jako zygomycetes I), v rozsahu, v jakém je vymezuje článek Spatafora et al. (2016). Tyto skupiny jsem si vybrala z toho důvodu, že zahrnují houby snadno kultivovatelné, rychle rostoucí a s ubiquitním výskytem. Zároveň mají široký rozsah obývaných nik, a tím jsou zajímavé z hlediska adaptací na velmi rozdílné teplotní podmínky.



Obr. 5 Fylogenetický strom zygomycetů, převzato ze Spatafora et al. 2016, Mycologia.

4. Výskyt v přírodě

Zygomycety zahrnují více či méně kosmopolitně rozšířené druhy. Kosmopolitní rozšíření je dáno především tím, že jsou schopné využívat velmi široké spektrum substrátů. Nejběžnějším substrátem mnoha zygomycetů jsou exkrementy různých živočichů a půda. Zástupci řádu *Mucorales* patří k nejčastějším mikroorganismům v půdě, či na organických zbytcích. Jejich spory se snadno šíří vzduchem. Patří mezi nejrychleji rostoucí houby a jsou nejranějšími kolonizátory „nových“ substrátů (tzv. pionýrské druhy). Z hlediska životních strategií by často patřily mezi tzv. R-stratégy (Cooke & Rayner 1984). V přírodě tyto druhy rychle vyčerpávají živiny ze substrátu; přežívají díky tvorbě klidových stadií – spor.

Z půdy byly například izolovány druhy *Cunninghamella elegans*, *C. echinulata*, *Coemansia*, *Mucor hiemalis* apod. Některé rody byly izolovány pouze z půdy, např. *Hesseltinella* nebo *Zygorhynchus* (dnes *Mucor*) (Benny et al. 2001).

Parazitické druhy jsou svým výskytem vázané na výskyt hostitelů. Některé zygomycety parazitují na jiných houbách; příkladem může být rod *Piptocephalis*. *Piptocephalis* je obligátní haustoriální mykoparazit a parazituje především na družících řádu *Mucorales*. Dalším příkladem mykoparazitů mohou být druhy rodů *Dicranophora*, *Spinellus* či *Syzygites* (Benny et al. 2001). Druhy řádu *Entomophthorales* ze skupiny *Zoopagomycota* jsou převážně patogeni velmi širokého hostitelského spektra hmyzu a některých fytofágních roztočů, nejčastěji ale napadají mšice (*Aphida*) nebo různé druhy motýlů (především můry) a dospělce much (Benny et al. 2001). Některé druhy napadají půdní bezobratlé, jako jsou hlístice (*Nematoda*) nebo želvušky (*Tardigrada*).

Zygomycety se vyskytují v přírodě na mnoha stanovištích a jsou hojné i v prostředí člověka. Všudypřítomný je například kropidlovec černavý (*Rhizopus stolonifer*), se kterým se můžeme setkat například na zvlhlém chlebu nebo na marmeládě. Houby řádu *Mucorales* jsou také významnými kontaminanty sklizeného ovoce nebo chladírenského masa. Plísně řádu *Mucorales*, které se často vyskytují na sladkých substrátech, jsou anglicky označovány jako „sugar fungi“.

Zygomycety se dají nalézt i v prostředích s extrémními podmínkami. V polárních oblastech byly houby zjištěny jak v hlubokých mořích, tak v ledovcích i ve vysokých horách. Zajímavým prostředím, které je v polárních oblastech vhodné pro život mikroorganismů, jsou cryoconitové jámy. Cryoconit je tvořen navátým prachem a částicemi hornin a sazí, také může také obsahovat organické složky, například půdní částice nebo mikroby. Tmavá vrstva cryoconitu umožňuje absorpci viditelného světla a UV záření. Působením záření se mohou

postupným roztáváním vytvořit jamky, ve kterých jsou podmínky k životu příznivější než na povrchu ledovce. Zatím ale byly v cryoconitu nalezeny spíše bazidiomycety a především askomycety; ze zygomycetů pak *Circinella* (Gerdel & Drouet 1960). Distribuce hub v polárních oblastech pak nejvíce souvisí s rozložením mikroprostředí, ve kterých mohou přežít. V antarktickém prostředí jsou jedním z nejbohatších mikrostanovišť mechy (Tosi et al. 2002). Z výsledků studie vyplývá, že houbové komunity z antarktických mechů jsou tvořeny převážně původními druhy, což je podpořeno faktem, že většina izolovaných druhů je psychrofilní. Ze zygomycetů byla v Antarktidě často izolována *Mortierella antarctica* (Tosi et al. 2002).

Nacházeny jsou též tzv. „snow molds“ – coenocytické plísně rostoucí pod sněhovou pokrývkou. Společenstva chladnomilných hub pokrývající půdu a opad v alpínských a subpolárních oblastech (Schmidt et al. 2008). Tyto druhy se vyskytují především pod pozdní sněhovou pokrývkou; tato společenstva jsou efemerní a po roztání sněhové pokrývky rychle mizí (Schmidt et al. 2008). Mikroklíma nacházející se pod sněhem je pro růst mikroorganismů ideální díky dlouhému období stabilních teplot a poměrně vysoké vlhkosti (Schmidt et al. 2008). V těchto prostředích byli nalezeni byli zástupci řádů Mucorales a Mortierellales (Schmidt et al. 2008).

Naopak v teplých oblastech zygomycety nacházíme hojněji. Nejčastějšími substráty s vyšší teplotou jsou antropogenně vytvořené hromady hnoje, kompostu anebo siláže. Vyskytují se zde často druhy rodu *Mucor* nebo *Rhizopus*. Je jen málo přírodních stanovišť s podobnou teplotou, které by splňovaly další podmínky pro růst zygomycetů.



Obr. 6 a 7 nahoře *Mucor circinelloides* CCF 2631, 640 x zvětšeno. Růst 5 dní na mediu SL4 při 15 °C. Příklad chladnomilného druhu.



Obr. 8 vpravo *Rhizomucor pusillus* CCF 2892, 400 x zvětšeno. Růst na mediu PCA při 40 °C. Příklad teplomilného druhu.

5. Význam zygomycetů pro člověka

Význam zygomycetů je pro člověka nezanedbatelný z mnoha úhlů pohledu. Zygomycety jsou důležitými prostředky ve výrobě a průmyslu, zejména v průmyslu potravinářském a farmaceutickém, a také v nově zaváděných biotechnologiích. Ve výrobě potravin jsou zygomycety často používány především v Orientu, kde má jejich používání pro fermentaci dlouhodobou tradici. Například druhy rodu *Actinomucor* (*A. elegans* a *A. taiwanensis*) se v Číně používají pro výrobu sufu a furu, což jsou fermentované formy tofu. Tofu je potravina ze sóji, která se vyrábí vysrážením sójového mléka a následným lisováním (Dijksterhuis & Samson 2007). K fermentaci se také využívají druhy *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus microsporus*, *R. oligosporus*, *R. oryzae*, jejichž funkcí je enzymatická transformace a dodání textury a obsahu vitamínů potravinám. S jejich pomocí se vyrábí několik dalších druhů orientálních potravin s různými národními názvy – koji (Japonsko), nuruk (Korea), chu (Čína), anebo marcha a tempeh. Pro stejné účely se používá i *Mucor*, např. *M. circinelloides* nebo *M. indicus* (Dijksterhuis & Samson 2007).

Zygomycety jsou také významné produkcí enzymů, vitamínů a nenasycených mastných kyselin (anglicky polyunsaturated fatty acids; v této práci budou dále uváděny pod zkratkou PUFA), které lze biotechnologicky využít. Nenasycené mastné kyseliny mají ve svém řetězci alespoň jednu dvojnou vazbu; ty které mají dvojnou vazbu dále než na devátém uhlíku, jsou pro živočichy esenciálními a velmi podstatnými sloučeninami. Mají důležité účinky na strukturu a fyzikální vlastnosti lokalizovaných membránových domén, podílejí na produkci eikosanoidů, signální transdukcii a aktivaci nukleárních transkripčních faktorů (Spector 1999). Hlavním prekurzorem eikosanoidů je kyselina arachidonová; cesty, které vedou k eikosanoidům, jsou známy společně jako „arachidonátová kaskáda“ (Smith & Murphy 2002). Důležitými eikosanoidy savců jsou například prostaglandiny, leukotrieny nebo hydroxymastné kyseliny (Certik & Shimizu 1999). Z polynenasycených mastných kyselin jsou zygomycety schopné produkovat například kyselinu gama-linolenovou (GLA), kyselinu arachidonovou i kyselinu eikosapentenovou (EPA).

Mezi nejlepší producenty nenasycených mastných kyselin patří zástupci řádů Mucorales a Mortierellales; zástupci Mucorales syntetizují PUFA s maximální délkou řetězce 18 atomů uhlíku, zatímco zástupci Mortierellales jsou schopni syntetizovat řetězce o délce 20 C (Klempova et al. 2013). Někteří zástupci těchto řádů mají schopnost zároveň tvořit i karotenoidní pigmenty, zejména β -karoten, podobně jako některé kvasinky, řasy a houby jiných skupin; syntetizovat zároveň karotenoidy i PUFA však dokážou jen zygomycety

(Klempova et al. 2013). Dalšími biotechnologicky využitelnými sloučeninami zygomycetů mohou být proteázy či lipázy. Například β -glukosidáza, která je součástí enzymového aparátu degradujícího celulózu, může sloužit k výrobě palivového ethanolu. Pro biotechnologickou aplikaci těchto enzymů je velmi významná termotolerance nebo resistance k vysokým teplotám (Krisch et al. 2010). Tuto podmínku dobře splňují druhy *Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae* a *R. miehei*. Získávána je také glukoamyláza, a to zejména z druhů *M. hiemalis*, *M. indicus* a *R. oryzae* (Behnam et al. 2016). Glukoamyláza dokáže degradovat amyulózu a amylopektin a vytváří glukózu, ze které je následně vyráběn glukózový nebo fruktózový sirup a další výrobky.

Široké využití mají i další houbové enzymy. Vysoké množství glukózooxidázy produkuje například *Rhizopus stolonifer*. Druh *Mucor rouxii* pak vykazoval velmi dobré výsledky v produkci fosfatáz (Guimarães et al. 2006). Pozoruhodným se ve studii ukázal druh *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*, který byl schopný produkovat velké množství amylázy, alkalických i kyselých fosfatáz a pektinázy (Guimarães et al. 2006). Potenciál využití těchto enzymů v průmyslu je velice široký. Již v roce 1983 bylo běžně komerčně využíváno asi 30 různých typů enzymů, z nichž byla asi polovina houbového původu (Bennett 1998).

Zygomycety však člověku nepřinášejí jen užitek. Záznamy o tom, že mohou způsobovat lidské choroby, jsou uváděny již od roku 1800. První popsanou nemocí tohoto typu byla systémová mykóza způsobená pravděpodobně druhem *Absidia corymbifera* u onkologického pacienta. Popsána byla Plataufem v článku Mycosis Mucorina v roce 1885 (podle Ribes et al. 2000). V minulosti byla většina hlášených případů připisována rodu *Mucor*, obvykle ale tyto výsledky nebyly podpořeny kultivací. V dnešní době je však známo, že převládajícími druhy zygomycetů způsobujícími onemocnění jsou druhy rodu *Rhizopus*. Dalšími běžnými druhy jsou především druhy rodů *Mucor*, *Rhizomucor* a *Lichtheimia* (dříve uváděná jako *Absidia*). Druhů rodu *Mucor* je známo více než padesát, předpokládá se ale, že pouze pět z nich může způsobovat onemocnění (Iwen et al. 2007). Nemoci ale mohou způsobit i jiné houby – *Apophysomyces elegans*, *Saksenaea vasiformis*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Cokeromyces recurvatus*, *Syncephalastrum racemosum* a také druhy rodu *Conidiobolus*. Nemoci jimi způsobované se často označují jako zygomykózy nebo mukormykózy. Zygomycety se v tomto případě chovají jako oportunní patogeni, využívají své schopnosti růst při teplotě lidského těla a zároveň snížené obranyschopnosti pacienta. Byly popsány rizikové faktory pro vznik choroby – jedná se především o rakovinu, diabetes, transplantace a imunosupresivní terapie po transplantaci, užívání antibiotik nebo prednisonu, a také deferoxaminové a desferrioxaminové

terapie (Ribes et al. 2000). Infekce mívají často agresivní průběh a neléčené vedou k rychlé smrti pacienta.

6. Vliv teploty na růst zygomycetů

Růst hub a mikroorganismů obecně bývá rozdělen do několika fází. První fází je lag fáze, perioda přizpůsobování se prostředí, klíčení a počátku růstu. Obvykle jsou pozorovány pouze počátky růstu. Následuje exponenciální fáze, někdy také nazývána log (logaritmická) fáze, při které organismus plně využívá živiny ze substrátu a jeho růst není ničím inhibovaný. V této fázi je sledován největší nárůst biomasy. Postupně se s vyčerpáním živin růst zpomaluje. Po dosažení bodu konstantního růstu nastává stacionární fáze, kdy růst stagnuje. Z důvodu kontaminace substrátu odpadními látkami, spolu s vyčerpáním živin kolonie v poslední fázi ztrácí vodu, vysychá a odumírá (Hammonds 1984).

Parametry růstu se měří nejčastěji v exponenciální fázi jako specifická rychlost růstu. Nejčastěji se k charakterizaci rychlosti růstu využívá měření průměru kolonie nebo suchá váha vytvořené biomasy. Tyto parametry a charakteristiky růstu umožňují stanovit teplotní nároky mikroorganismů.

6.1 Vymezení psychrofilů a termofilů

Teplota je jedním ze základních faktorů prostředí ovlivňujících život organismů. Při hodnocení teplotních preferencí hub sledují mykologové především optimální růst, ale i nejnižší či nejvyšší teplotu, při které je houba schopna růst. Terminologie používaná při hodnocení růstových požadavků hub je však stále poněkud nejednotná. Používány jsou tyto termíny psychrofilní (chladnomilné), psychrotrofní, psychrotolerantní, mezofilní, termotolerantní a termofilní (teplomilné) organismy. Především termíny psychrotrof a psychrotolerant se částečně překrývají a jsou autory využívány různě. Převážná většina organismů je ve svých teplotních požadavcích mezofilní, dokáží růst v rozmezí teplot od 4–35 °C, s růstovým optimem mezi 20–30 °C. Hammonds (1984) definuje teplotní optimum mezofilů mezi 20–30 °C; pod 5 °C a nad 40 °C pak není pozorovaný růst.

6.2 Chladnomilné houby

Psychrofilní, psychrotrofní a psychrotolerantní organismy jsou vymezeny jednotlivými autory různě (viz tab. 1 a 2). Např. termín psychrofil v definici, jak je aplikován na prokaryotní organismy, je sice analogický, ale ne identický k termínu psychrofil, který je vymežován pro

houby a houbám podobné organismy (Watson et al. 1978). Mnozí vědci souhlasí s vymezením podle Morita (1975), že psychrofilové vyžadují optimální teplotu růstu okolo 15 °C a níže. Dobře rostou i v teplotách okolo 0 °C, nad 20 °C je pak růst inhibovaný. Morita ale vymezuje teplotní rozmezí pouze pro bakterie, které mají jiné teplotní nároky než eukaryotní organismy, a jeho dělení tak neodpovídá teplotním škálám pozorovaným u hub. Psychrotolerantní organismy také dokáží růst v nízkých teplotách okolo 0 °C a méně, jejich teplotní optimum je 15 °C a více. Jejich teplotní maxima se pak vyskytují i nad 20 °C. Mezi psychrotolerantní patří například druhy rodu *Thamnidium* nebo *Mucor*, které mohou kontaminovat špatně uskladněné chladírenské maso. Panasenko (1967) psychrotolerantní houby charakterizuje jako ty, které se nevyvíjejí pod 0 °C; jako příklad uvádí druh *Mucor pusillus* (dnes *Rhizomucor pusillus*). Tato houba je příkladem druhu, který je termofilní (viz níže), ale zároveň psychrotolerantní – toleruje nízké teploty až do 0 °C, má tedy celkově značně široké rozpětí pro růst.

Kromě pojmů psychrofil a psychrotolerant bývá definován i termín psychrotrof. Psychrotrofní organismy jsou schopné růstu pod 5 °C, přestože jejich teplotní optimum může být mnohem vyšší (Eddy 1960). Psychrofilové jsou častěji izolováni z trvale chladných stanovišť; naopak psychrotrofové převládají spíše v oblastech s tepelnými výkyvy (Eddy 1960).

Hoshino a Matsumoto (2012) navrhli termín „kryofilní“ houby pro houby přizpůsobené kryosféře. Definují tak houby vyskytující se v kryosféře, kde rostou a dokončují své životní cykly při teplotách, při kterých zůstává voda v pevném skupenství. Autoři termínu nesouhlasí s konceptem psychrofilů podle Mority (1975), který je vymezen pro bakterie. Podle nich se houby zcela liší od bakterií svým složitějším životním cyklem přizpůsobeným stavu kryosféry.

Robinson (2001) uvádí, že většina izolátů z polárních oblastí testovaná na růst a aktivní životaschopnost byla psychrotrofní. Robinson ve své práci vymezuje psychrofilu a psychrotoleranty podle Mority (1975). Převaha psychrotrofie nad psychrofilii je vysvětlována tím, že zatímco růstová minima jsou pro obě skupiny hub okolo 0 °C, teplota substrátu může být v letních obdobích mnohem vyšší než teplota chladného vzduchu, čímž je umožněn růst spíše psychrotrofům. Podle dvou studií z chladných oblastí byl poměr izolovaných psychrofilů velmi nízký, 10–20 % houbových druhů a kmenů izolovaných z aljašské tundry (Flanagan & Scarborough 1974) a 10 % izolovaných ze dvou lokalit na ostrově King George v Antarktidě (Möller & Dreyfuss 1996). Nízký podíl psychrofilních izolátů *sensu stricto* může být způsoben prováděním izolací pouze v příznivějších měsících; nebo neprovedením izolací ze substrátů, které mají pouze nízkou teplotu (Robinson 2001). I jiné studie uvádí, že při izolaci při 0 °C byly

izolovány spíše psychrotrofní druhy; z psychrofilních pak byly izolovány především druhy rodů *Mucor* a *Mortierella*. Tosi et al. (2001) ve své studii uvádějí, že většina druhů izolovaných na Antarktidě má maximální rychlost růstu v rozmezí 15–24 °C. Toto teplotní rozmezí však odpovídá spíše mezofilním druhům.

6.3 Teplomilné houby

Teplomilné houby, termotoleranti a termofilové, jsou extrémofilní organismy osidlující především antropogenně vytvořené substráty se zvýšenou teplotou. Některé druhy jsou schopné žít v teplotních podmínkách, které jsou pro psychrofilní a mezofilní druhy letální. Crisan (1973) vymezuje termofilní organismy jako ty, které rostou při teplotách vyšších, než jsou teploty limitní pro většinu ostatních forem života. Pro eukaryotické organismy ale nelze využít tradiční vymezení používané pro prokaryotní organismy schopné přežít teploty přes 115 °C. Eukarya jsou k vysokým teplotám citlivější, k nenapravitelnému poškození jejich membrán dochází již při teplotě 65 °C (Magan 2007).

Podle Magan (2007) jsou termofilní houby definovány jako ty, které vykazují minimální růst při 20 °C nebo vyšší. Maximální růst potom vykazují při teplotě 50 nebo více stupňů Celsia. Jejich růstové optimum leží mezi 40 a 50 °C (Magan 2007). Watson et al. (1978) ve svém článku vymezili hranici pro termofilní kvasinky, která ale neodpovídá hranici růstu všech hub. Hranice teploty růstu pro kvasinky byla stanovena na 46 °C, nad tuto teplotu již růst nebyl pozorován. Jiné taxony hub a zygomycety obzvlášť, však dokážou žít v teplotách blízkým 60 °C. Mykology široce akceptována je definice podle Cooney & Emerson (1964), že termofilní houby mají maximální teplotu pro růst 50 °C a vyšší, zatímco růstové minimum je 20 °C. Příkladem termofilního druhu může být *Rhizomucor pusillus*, dobře rostoucí v rozmezí těchto teplot. Termotolerantní druhy mají růstové optimum okolo 20 °C, ale dokáží růst i při vyšších teplotách (35–40 °C). Rostou i v teplotách nižších než 20 °C (Cooney & Emerson 1964). Výše uvedené poznatky jsou shrnuty v tab. 1 a 2.

Hlavním faktorem ovlivňujícím odolnost organismu vůči vysoké teplotě je jeho genetická konstituce (Crisan 1973). Existuje důkaz, že schopnost růstu při vysokých teplotách může být přenášena z termofilních na mezofilní bakterie prostřednictvím genetické transformace. Crisan (1973) navrhuje čtyři hlavní hypotézy termotolerance: solubilizace lipidů či rychlá resyntéza základních metabolitů; ale především molekulární a ultrastrukturní termostabilita. Hypotéza makromolekulární stability předpokládá, že termofilové produkují

základní makromolekuly, jako například proteiny a enzymy, vykazující vysokou termostabilitu. Termostabilní jsou i jejich ultrastruktury, například plazmatická membrána nebo organely.

Tab. 1 – Pojetí jednotlivých kategorií hub podle teplotních preferencí u různých autorů

teplota (°C)	psychrofilní			psychrotolerantní			termotolerantní			termofilní		
	min	opt	max	min	opt	max	min	opt	max	min	opt	max
Morita (1975)	0 °	≤ 15 °	20 °	0 °	≥ 15 °	≥ 20 °	-	-	-	-	-	-
Cooney & Emerson (1964)	-	-	-	-	-	-	< 20 °	20 °	35-40 °	20 °	-	≥ 50 °
Margesin (2006)	-12 °	≤ 15 °	20 °	-	> 20 °	> 20 °	-	-	-	-	-	-
Magan (2007)	-	-	-	5 °	-	-	-	-	-	20 °	40-50 °	≥ 50 °

Tab. 2 – Nejčastější pojetí teplotních skupin, dle různých autorů

(Morita 1975, Cooney & Emerson 1964, Margesin 2006, Magan 2007)

	psychrofilní	psychrotrofní	psychrotolerantní	termotolerantní	termofilní
růstové minimum	~ 0 °C	~ 0 °C	~ 0 °C	< 20 °C	20 °C
růst. optimum	15 °C	20 °C	20 °C	20 °C	± 40 °C
růst. maximum	20 °C	>20 °C	>20 °C	35–40 °C	> 50 °C

6.4 Vliv teploty na růst

Růstová minima, optima a maxima se mohou výrazně lišit i u druhů blízké příbuzných. Hammonds (1984) ve své práci zkoumal druhy rodu *Mucor*. Petriho misky byly inkubovány v rozmezí teplot 5-60 °C na mediích MEA a GAE. *Mucor pusillus* (dnes *Rhizomucor pusillus*) rostl na obou médiích nejrychleji při 40 °C. Vykazoval největší růstovou rychlost z porovnávaných druhů, a to 49 mm/den na MEA. Teplotní rozmezí růstu bylo mezi 25-50 °C. Temperátní i antarktický kmen druhu *M. hiemalis* vykazovaly stejné růstové charakteristiky. Rostly v rozmezí teplot 5-30 °C, s teplotním optimem 20-25°C. Rychlost růstu byla pro oba kmene přibližně 24-25 mm/den. *M. psychrophilus* ve srovnání s oběma předchozími druhy rostl velice pomalu, pouze 3 mm/den. Optimum měl tento druh mezi 10-15 °C, s minimem 5 °C a maximem 20 °C. Nejrychlejší růst vykazovaly všechny druhy na MEA mediu.

V mlékárenském průmyslu jsou využívány a ceněny druhy rodu *Mucor*, přesto některé z nich patří k významným kontaminantům širokého spektra potravin. Přes jejich pozitivní i negativní dopady nebyly růstové charakteristiky rodu *Mucor* dosud dobře zdokumentovány (Morin-Sardin et al. 2016). Morin-Sardin et al. (2016) proto zkoumali vliv abiotických faktorů na rychlost růstu několika kmenů druhu *Mucor* využívaných v mlékárenství. U těchto kmenů bylo pozorováno rozmezí teplot aktivního růstu mezi 0-37 °C. V teplotě nižší než 0 °C dokázaly růst druhy *M. racemosus*, *M. lanceolatus*, *M. circinelloides*, ve 37 °C potom rostly *M. circinelloides* and *Mucor endophyticus* (Morin-Sardin et al. 2016). Byla počítána kinetika růstu a rychlost průběhu lag fáze v závislosti na kultivačních podmínkách. Za optimálních podmínek byla lag fáze poměrně krátká, následovaná fází konstantního radiálního růstu. Při suboptimálních podmínkách se lag fáze prodloužila a snížilo se i tempo růstu.

Ukazuje se, že u některých druhů zygomycetů způsobuje změna kultivační teploty dimorfismus. Tyto dimorfní druhy pak mění při změnách teploty svoji morfologii z vláknitého mycelia na jednobuněčná kvasinková stadia. Přítomnost kvasinkové formy byla pozorována u rodů *Mucor* (Benny et al., 2014, Kosa et al. 2018), *Benjaminiella* a *Mycotypha* (Benny et al., 2014); také u nově popsaného druhu *Bifiguratus adelaidae* (Torres-Cruz et al. 2017, obr. 10). Na obrázku 9 vidíme příklad dimorfismu na zástupcích rodu *Mucor* a *Rhizopus*. Obrázek 11 ukazuje změnu morfologie mycelia u *B. adelaidae* při kultivaci v odlišných teplotách a na různých médiích. Na každém mediu byl sledován u všech izolátů konzistentní růst.

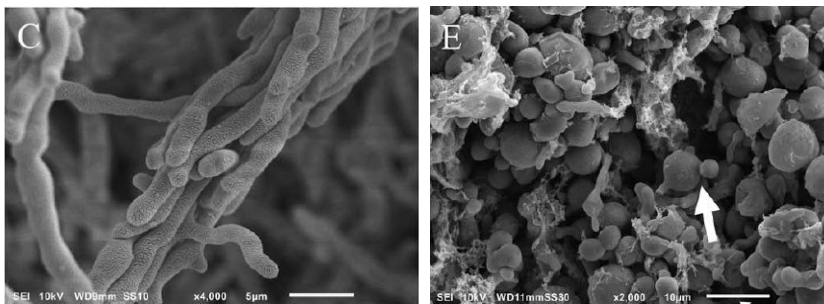
Z některých výzkumů vyplývá, že polynenasycené mastné kyseliny mají v organismu dvě funkce. Jak již bylo zmíněno, PUFA fungují jako prekurzory mnoha biologicky aktivních látek. V mikroorganismech mají vliv na regulaci dynamiky, fázového přechodu a propustnosti membrán, a také na chování membránově vázaných proteinů, například receptorů, ATPáz, transportních kanálů či iontových kanálů (Certik & Schimizu 1999). Tento vliv může být v zygomycetech spojen s účinkem na myceliální membrány.

Podle výzkumu Bellou et al. (2012) může biosyntéza PUFA skrze působení na membránu umožňovat růst mycelií. Kultivováno bylo několik druhů zygomycetů, u kterých byly studovány proporcionální změny hlavních lipidových frakcí podílejících se na biosyntéze PUFA a také účinek teploty. Sledován byl pokles koncentrace PUFA ve všech lipidových frakcích u druhu *Mortierella ramanniana* (dnes *Umbelopsis ramanniana*) během růstu, přestože mycelia byla inkubována při nízké teplotě, tedy za podmínek, které u jiných druhů syntézu PUFA podporují. Při působení nízkých teplot obvykle dochází k aktivaci desaturáz a zvýšení koncentrace PUFA. Tento výsledek inkubace naznačuje, že biosyntéza PUFA

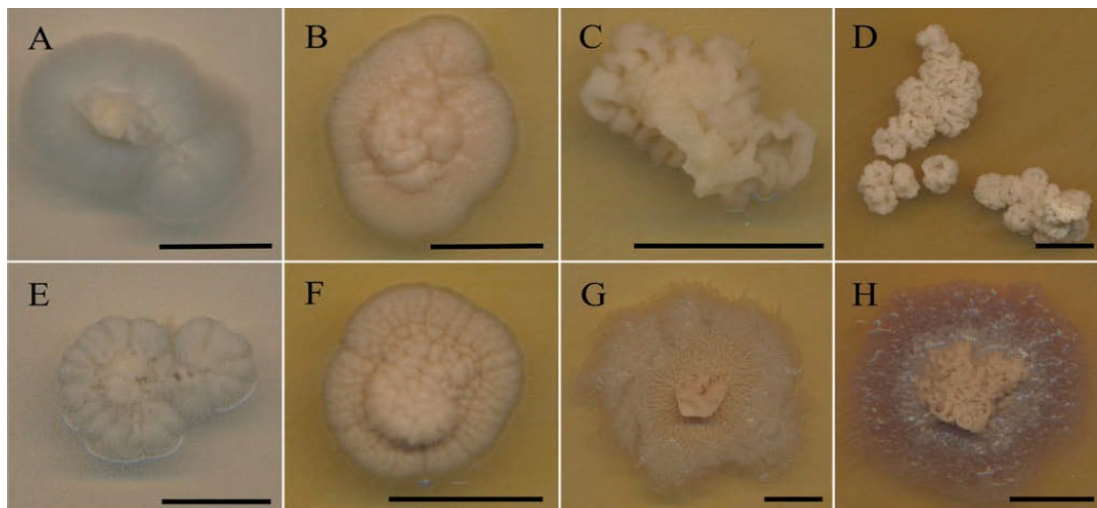
v organismu *M. ramanniana* je spojena s primárním metabolismem. Naproti tomu u druhu *Cunninghamella echinulata* se koncentrace linoleové a γ -linolenové kyseliny v čase zvyšovala. To, že biosyntéza PUFA přetrvává i po ukončení růstu mycelia naznačuje, že u tohoto druhu není produkce polynenasycených mastných kyselin přísně růstovým procesem.



Obr. 9 Morfologie mycelia hub ze skupiny Mucotomycota. Převzato z Kosa et al. 2018, Biotechnology for biofuels. a) *Mucor racemosus*, b) *Mucor circinelloides* (jednobuněčná kvasinková forma), d) *Rhizopus oryzae* (vláknitá forma)



Obr. 10 SEM fotografie *Bifiguratus adelaidae*, převzato z Torres-Cruz et al. 2017, Mycologia. c) vláknité hyfální stadium e) pučící kvasinkové stadium



Obr. 11 Morfologie kolonií *Bifiguratus adelaidae* kultivovaných v rozdílných teplotách a na různých mediích. Media byla ošetřena antibiotiky (tetracyklin (50 mg/l) a streptomycin (50 mg/l)). Velikost měřítka je 10 mm. Převzato z Torres-Cruz et al. 2017, Mycologia.

a) MEA+, 25 °C, b) SDA+ 25 °C, c) EYSA+ 25 °C, d) PYG+ 25 °C
e) MEA+ 35 °C, f) SDA+ 35 °C, g) EYSA+ 35 °C, h) PYG+ 35 °C

7. Vliv teploty na rozmnožování zygomycetů

Teplota má významný vliv na proces rozmnožování – tvorbu sexuálních i asexuálních spor a proces klíčení. Tyto procesy mohou být vyvolány nízkými i vysokými teplotami. Hammonds (1984) zkoumal kromě vlivu teploty na růst i vliv na sporulaci a germinaci u druhů řádu Mucorales. Teplotní rozmezí, ve kterém se sporangiospory tvořily, bylo vždy užší než teplotní rozmezí růstu. Přesto byly teploty optimálního růstu identické s optimální teplotou pro klíčení spor. U termofilního druhu *Rhizomucor pusillus* nebyla pozorována sporulace při maximální růstové teplotě 50 °C. Podobně u psychrofilního druhu *M. psychrophilus* se spory skoro netvořily maximální růstové teplotě 20 °C. Sporangiospory se tvořily při teplotách 5-0 °C, nejvyšší procento spor se pak vytvořilo při 15 °C. Germinace měla teplotní optimum při 10 °C.

Druhy rodu *Mucor* jsou ve většině případů heterotalické. Pro úspěšný průběh pohlavního rozmnožování se musí spářit jedinci odlišných párovacích typů (+) a (-). Od konce 60. let byly prováděny významné rozsáhlé párovací pokusy na heterotalických zástupcích rodu *Mucor*. V mezidruhových kříženích může sexuální kompatibilita partnerů vyvolat produkci zygospor (Schipper 1969). Pokud se zygospory vytvářely v hojném množství, zpravidla nedosahovaly maximální velikosti (Schipper 1969).

Mucorales mají sexuální diferenciaci indukovanou syntézou β -karotenu. Degradními produkty jsou kyseliny trisporové (Austin et al. 1969) a jejich četné deriváty. Již rozpoznání mezi párovacími partnery, časná morfogeneze rozmnožovacích útvarů a vývoj jsou regulovány pomocí rodiny signálních sloučenin odvozených od β -karotenu a trisporoidů (Schimek & Wöstemeyer 2009). Uznána byla úloha kyseliny trisporové jako feromonu indukujícího sexuální diferenciaci u řádu Mucorales (Van den Ende & Stegwee 1971). Kyselina trisporová a některé její prekurzory přímo ovlivňují transkripci genů podílejících se na pohlavním vývoji. To bylo dokázáno na genu TSP3, kódujícím karotenovou oxygenázu, která dokáže štěpit β -karoten v sexuálně indukovaném procesu (Schimek & Wöstemeyer 2009).

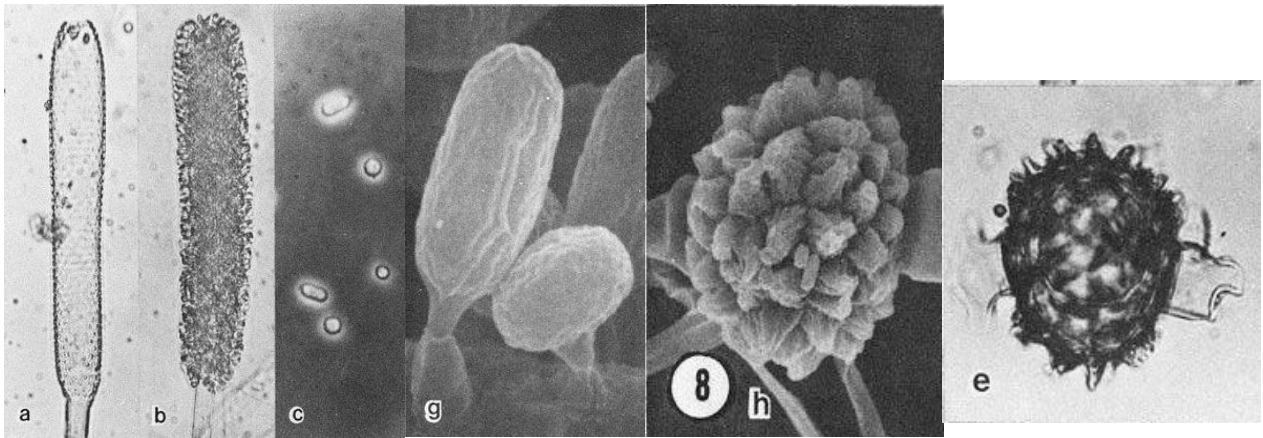
Mathur a Sarbhoy (1999) pozorovali přímou korelaci mezi obsahem karotenu a produkcí zygospor. Ve své práci citují článek „Dark-Period Induction of Zygosporos in *Mucor*“ (Hesseltine & Rogers 1987), ve kterém je zdůrazňována důležitost tmavé periody a vhodné vzdálenosti mezi inokulovanými bloky pro tvorbu zygospor. Mathur a Sarbhoy (1999) důležitost tmavé periody potvrdili; inkubace v konstantní tmě vedla k tvorbě zygospor. Navzdory jiným studiím se nepotvrdil vliv teploty. V křížícím experimentu mezi různými kmeny *M. circinelloides* se po čtyřech dnech objevily četné zygospory. Zygospory se tvořily

bez ohledu na kultivační medium i teplotu, pouze za podmínky tmavé periody. Jelikož byla pozorována všechna vývojová stadia, předpokládá se, že se nejednalo o azygospory. Produkce zygospor byla pozorována u kmenů produkujících β -karoten v množství větším než 50 $\mu\text{g/g}$ sušiny mycelia.

Lasure a Ingle (1976) se ve své práci věnovali studiu produkce zygospor v kapalně (submerzní) kultuře. Srovnávali účinek různých inkubačních časů při působení teplot 35 °C a 45 °C. Zkoumaným objektem byl termofilní druh *Rhizomucor miehei*. *R. miehei* je homothalický druh schopný produkovat zygospory. Při inkubaci 51 hod při teplotě 35 °C byly produkovány zygospory. Po 54 hodinách se v médiu objevil hnědý pigment. Když byly baňky přeneseny z 35 do 45 °C, vedla inkubace ve vyšší teplotě k desetihodinovému zpoždění v nástupu vývoje spor. Pokud ale kultury rostly 36 hodin a méně při 35 °C, tak se po přenesení do 45 °C zygospory netvořily. Při inkubaci v teplotách nad 37 °C nebyla pozorována tvorba zygospor. Baňky, které se inkubovaly 46 hodin a déle při 45 °C nevykazovaly žádnou tvorbu zygospor ani po následné kultivaci ve 35 °C. Ovšem naopak, po 46 hod kultivace v nižší teplotě se spory diferencovaly i po následném přenesení do vyšší teploty. V některých případech se pigment netvořil vůbec. Výskyt pigmentu v roztoku byl spojen s výskytem sexuálního rozmnožování a tvorbou zygospor. Absence pigmentu při kultivaci ve 45 °C je vysvětlována neschopností organismu produkovat hormony při takto vysoké teplotě; případně přítomností funkčního hormonu ale inaktivitou či nepřítomností receptorových míst. Autoři prokázali, že u termofilního druhu *R. miehei* je vývoj zygospor citlivý na vysokou teplotu.

U organismu *Mycotypha africana* byl poměr sexuální reprodukce k asexuální reprodukci zvýšen spolu se snížením inkubační teploty, nepřítomností světla a použitím minimálního množství inokula (Edelman & Klomparens 1995). S expozicí světlu, či naopak s absencí světla docházelo často ke konverzi mezi sexuálním a asexuálním rozmnožováním. Asexuální reprodukční struktury mají u *M. africana* vzhled dlouhých sporoforů s koncovými protáhlými měchýřky nesoucí dva odlišné typy jednosporových sporangií (obr. 12). *Mycotypha africana* pravděpodobně tvoří homothalické zygospory. Kultury pěstované ve tmě při nízké teplotě v rozmezí 14–18 °C měly zvýšenou produkci zygospor zahrnující až 25 % z celkové kolonie. Zbarvení kolonie zůstalo bez ohledu na stáří světlé nebo světle šedé. Přítomná byla pravděpodobně i asexuální reprodukce, ovšem sporogenní hlavy nevyprodukovaly tmavší pigment, který je běžně pozorovatelný při kultivaci na světle. Po přenosu na světlo se pigment ve sporangiích začal tvořit normálně. Při pozorování se ukázalo, že i světle zbarvená sporangia jsou životaschopná.

Autoři studie zjistili, že opakované subkultivace kultur tvořících zygosporu vedou ke ztrátě jejich zygosporní kompetence. Tato ztráta je však reverzibilní a obnoví se po 2-3 měsících kultivace ve tmě a při nízké teplotě (Edelman & Klomparens 1995).



Obr. 12 *Mycotypha africana*, převzato a upraveno z Benny, Kirk & Samson, 1985); a. fertlní vezikul po opadu sporangií, b. fertlní vezikul před opadáním sporangií, c. dimorfní sporangioly, g. dimorfní sporangioly na vezikulu, h. + e. ornamentované zygosporangium se suspenzory

Studován byl také druh *Choanephora cucurbitarum*, patogen rostlin, který stejně jako *M. africana* tvoří na myceliu různé formy asexuálních rozmnožovacích struktur. Spory tvoří jak na sporoforech (sporangia s kolumelou), tak ve sporangiolách bez kolumely; pozorovány byly i monosporangiální sporangioly („konidie“) (Poitras 1955). Barnett & Lilly (1955) zkoumali vliv vlhkosti, teploty a oxidu uhličitého na sporulaci *C. cucurbitarum*. Teplota i relativní vlhkost byly hlavními faktory působícími na tvorbu sporoforů i sporangiol. Převaha sporoforů a sporangiol byla dána především relativní vlhkostí. Účinek působení vlhkosti byl zvýšený při teplotách nad 25 °C. Již zvýšení teploty na 28 °C mělo podstatný vliv na počet rozmnožovacích struktur. Při teplotě 30 °C byl pokles počtu rozmnožovacích struktur velmi výrazný. Vyšší relativní vlhkost potom přispívala ke zvýšení poměru sporangií vůči sporoforům, zatímco nízká vlhkost působila spíše na tvorbu sporoforů (Barnett & Lilly 1955). Barnett & Lilly (1956) vyzdvihují vliv kontinuální inkubace ve tmě pro tvorbu zygospor. Tvorba sexuálních spor převažovala také při kultivaci při kontinuálním světle, s výjimkou v nejnižších růstových teplotách, kdy byla tvorba zygospor inhibována. Dále měla vliv kultivace v hraničních teplotách růstu a kultivace v tekutém médiu. Všechny tyto podmínky napomáhaly tvorbě sexuálních spor a zabraňovaly tvorbě asexuálních spor, nebo ji silně snižovaly. Tato i předchozí studie potvrdily výrazné ovlivnění sporulace teplotou, relativní vlhkostí a množstvím oxidu uhličitého v atmosféře; dále pak expozicí světlu a temnotě a nutričními faktory.

Mucor piriformis a *Gilbertella persicaria* jsou patogeny napadající sklizené ovoce a způsobující tak hospodářské škody. Proto byly zkoumány a porovnávány faktory působící na

zygosporogenezi těchto druhů. *M. piriformis* může růst a produkovat sporangiospory i při teplotách 0–1 °C; pro tvorbu zygospor pak vyžaduje teplotu nižší než 15 °C, střední pH (3,5-8), temnotu a bohaté médium (sacharidy). Pro druh *G. persicaria* byly podmínky tvorby zygospor následující: bohaté médium, teplota 20 °C, kultivace v temnotě a střední pH 4-6 (Michailides et al. 1997).

Všechny zmíněné studie potvrdily přímý vliv teploty na produkci sexuálních i asexuálních spor. Obecně zygosporogeneze probíhá spíše při nižších teplotách (*Mucor*, *Choanephora*, *Mycotypha*). Výjimkou jsou termofilní druhy, například *Rhizomucor miehei*, který pro produkci zygospor vyžaduje teplotu 35 °C. Pokud byl ale delší dobu inkubován při vyšších teplotách, i u něj následovala ztráta zygosporní kompetence. Podmínky skladování i kultivace zygomycetů mohou negativně ovlivnit jejich schopnost tvořit sexuální i asexuální rozmnožovací struktury. Některé druhy (např. *M. mucedo*, *M. racemosus*) vykazovaly lepší výsledky páření při skladování při teplotě 15 °C, než při skladování ve 20 °C (Schipper 1973).

8. Vliv teploty na produkci mastných kyselin

Stejně jako u většiny ostatních organismů je známo, že teplota ovlivňuje tvorbu a složení mastných kyselin u hub (Stahl et al. 1996). Stahl et al. (1996) pozorovali významné rozdíly ve složení mastných kyselin u hub kultivovaných v rozdílných podmínkách. Bylo zjištěno, že se snížením kultivační teploty se zvyšuje stupeň nenasycení mastných kyselin. Změna složení mastných kyselin byla minimální, pokud byly houby kultivovány při pokojové teplotě (24 až 26 °C). Složení mastných kyselin jednotlivých druhů zygomycetů se při změně teploty nelišila, lišila se ale jejich relativní množství (Stahl et al. 1996). Všechny zkoumané zygomycety produkovaly větší množství mastných kyselin než houby ze skupiny Dikarya (askomycety a bazidiomycety). Žádný z askomycetů ani bazidiomycetů nebyl schopen produkovat γ -linolenovou kyselinu.

Dyal et al. (2005) optimalizovali podmínky produkce γ -linolenové kyseliny u druhu *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* (dnes *Umbelopsis ramanniana* var. *ramanniana*). Zkoumány byly vlivy pH média, růstové teploty, zdroje uhlíku a dusíku, iontů kovů a olejových substitucí. Trendy výtěžnosti biomasy i extrahovaných lipidů zjištěné v této studii ukazují na silné interakce mezi teplotou a typem média. Studie dále poukazuje na existenci optimálního rozmezí teplotních podmínek a pH, za kterých enzymy nejefektivněji využívají substráty. V celém sledovaném rozmezí pH (pH 3, 6 a 9) byly nejvyšší výtěžky GLA při 20 °C; nejnižší výtěžky pak byly zaznamenány při 30 °C. Při 0 °C a 40 °C nebyl pozorovaný žádný růst.

Za optimálních podmínek činila výtěžnost celkových lipidů 54,2 % z biomasy, z toho 84,3 % tvořily nenasycené mastné kyseliny. Na gram biomasy představovala GLA 13,3 % z celkového obsahu lipidů. Velký vliv na produkci GLA u zástupců řádu Mucorales má kromě teploty kultivačního médium; velmi dobře je využitelná glukóza; kromě toho druh *M. mucedo* dokázal dobře využít glycerol (Sajbidor et al. 1985).

U termofilních a termotolerantních druhů působilo snížení růstové teploty ze 48 °C na 25 °C na zvýšení syntézy nenasycených mastných kyselin (Sumner & Morgan 1969). Bylo zjištěno, že i lipidy ve sporách byly ovlivněny inkubační teplotou stejným způsobem jako lipidy v myceliu. Typy i podíly mastných kyselin ve sporách mezofilů, termofilů a termotolerantů byly v podstatě stejné jako v jejich myceliích. Ve srovnání s lipidy termotolerantů a termofilů obsahovaly lipidy mezofilů větší podíly polynenasycených mastných kyselin (kyseliny linolové a kyseliny linolenové) (Sumner & Morgan 1969).

Je známo, působení nízkých teplot stimuluje expresi ω 3 desaturázových enzymů. Zvýšená hladina desaturáz způsobuje v organismu zvýšenou produkci omega-3 mastných kyselin, například kyseliny eikosapentenové nebo dokosahexenové. Tento jev byl pozorován u rodu *Mortierella*, kde byl sledováno zvýšení obsahu EPA při snížení kultivační teploty z 28 °C na 15 °C (Kosa et al. 2018). Také u psychrotrofního druhu *Mortierella elongata* byly sledovány významné změny v množstvích mastných kyselin v důsledku snížení kultivační teploty z 15 °C na 5 °C (Weinstein et al. 2000).

9. Mechanismy adaptace na extrémní teploty

Mechanismy adaptace organismu na podmínky prostředí se velice liší v závislosti na stupni vývoje organismu, jeho tělní organizaci a velikosti. V závislosti na dosaženém stupni vývoje je adaptace také založena na chování organismu a schopnosti učit se. I biochemické strategie adaptace jsou podmíněny organizační úrovní organismu; to se projevuje obzvláště, pokud je stres způsoben změnou teploty. Eukaryoti volí různé strategie ochrany před nízkými teplotami. Savci často volí strategii vyhnutí se a obývají ekologické niky, které nehrozí nízkými teplotami. Dalším obranným mechanismem může být syntéza „nemrznoucích“ látek („antifreeze“ proteiny), které zabraňují mrznutí tělních tekutin. Tuto možnost využívají především ryby a členovci. Dále se předpokládá, že produkují cukry a cukerné alkoholy nahrazující vodu v buňkách, čímž stabilizují lipidovou dvojvrstvu. Tento účinek je doprovázen stabilizací buněčných membránových proteinů, čímž se zvyšuje rezistence k nízkým teplotám (Feofilova et al. 2000).

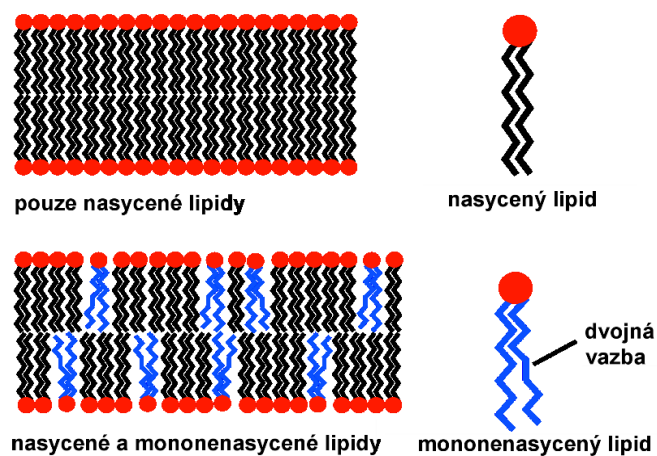
Poslední a poněkud odlišnou strategií odpovědi na tepelný stres je stabilizace biomembrán pomocí modifikace složení lipidové dvojvrstvy (Feofilova et al. 2000), nebo změny ve složení cytosolu po vystavení tepelnému šoku. Feofilova et al. (2000) se zaměřili na mechanismy adaptace hub, především na objasnění změn v sacharidovém a lipidovém složení cytosolu hub. Autoři studie došli k závěru, že strategie ochrany pomocí syntézy sacharidů se liší v závislosti na postavení druhu v systému. Kolektiv autorů se domnívá, že jediným mechanismem pozorovaným u zygomycetů je konverze glukózy do disacharidu trehalózy. Obsah trehalózy je potom regulován v závislosti na tepelných podmínkách (Feofilova et al. 2000). Zkoumanými zygomycety byly druhy *Cunninghamella japonica*, *Absidia coerulea* a *Blakeslea trispora*. U většiny zkoumaných zástupců byl sledován nárůst obsahu trehalózy po kultivaci ve zvýšených teplotách; u zygomycetů byl nárůst podílu trehalózy velmi vysoký, zvýšení bylo více než čtyřnásobné. Po snížení kultivační teploty u všech sledovaných zástupců kleslo množství trehalózy. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že při nižších teplotách lze trehalózu rychle přeměnit na glycerol, což vede k poklesu trehalózy.

Celkové množství disacharidu bylo ale oproti ostatním sledovaným zástupcům nízké, při kultivační teplotě 33 °C tvořila trehalóza 10,6 % cytosolových sacharidů; extrémním byl potom obsah trehalózy u *Myceliophthora thermophila* (Ascomycota), kde podíl trehalózy tvořil 57,6 %. U druhů *C. japonica* a *A. coerulea* trehalóza fungovala jako stabilizátor membránových fosfolipidů a jako rezerva glukózy. Relativní obsah trehalózy se významně zvýšil pouze za podmínek HS. U druhu *Blakeslea trispora* byl do regulace zapojen i inositol (cyklický alkohol s šesti hydroxylovými skupinami).

Jak již bylo zmíněno, molekulární i ultrastrukturní stabilita je velice významná pro život organismu. Při vyšších teplotách nastává smrt organismu v důsledku ztráty integrity cytoplazmatické membrány z důvodu rozpouštění membránových lipidů (Crisan 1973). K narušení membrány také dochází při poškození chladem nebo zmrznutím. Při poškození mrazem se led začíná tvořit okolo kondenzačních jader. Led se formuje pouze z vody, čímž koncentrace rozpuštěných látek v buňce roste a ztěžuje tak zmrznutí. Významným protektivním faktorem je formování extracelulárního ledu. Led se vždy formuje nejprve v mezibuněčných prostorech a „vyčerpává“ tak vodu z buněk, čímž zamezuje formaci ledových krystalků v buňkách. Největší pravděpodobnost poškození je při náhlé změně teploty, kdy se může tvořit i vnitrobuněčný led a narušit membránu. K poškození buněk mrazem nebo dehydratací nastává též při přechodu membránových lipidů z kapalné krystalické do gelové fáze při nízké teplotě (Crowe et al. 1987).

Organismy žijící v extrémních, nebo měnících se podmínkách využívají regulačních vlastností membrány ke svému přežití. Mechanismy regulace stability cytoplazmatické membrány budou popsány dále.

Plazmatická membrána plní v buňce významné funkce: udržuje integritu buňky, funguje jako selektivní bariéra, zadržuje ionty a udržuje vodní režim buňky (Hammonds 1984). Buněčné membrány jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou, především pak glycerofosfolipidy a sfingolipidy. Membrány nejsou rigidní strukturou, mají dynamické vlastnosti dané jejich složením. Představy o struktuře membrány vychází ze Singerova a Nicolsonova modelu tekuté mozaiky z roku 1972. Molekuly tvořící membránu mohou rotovat okolo vlastní osy kolmé na membránu a laterálně v rámci membrány difundovat. Tekutost (fluidita) je pro život buňky důležitá z mnoha důvodů – umožňuje například fúzi membrán, interakci membránových proteinů a udržuje míru propustnosti. Pro správnou funkci musí být udržovaný určitý stupeň tekutosti membrány, na čemž se podílí proměnlivé složení fosfolipidů a charakter uhlovodíkových řetězců v membráně. Vlastnosti uhlovodíků jsou nejvíce ovlivněny jejich délkou a nasyceností, tedy počtem dvojných vazeb. Kratší řetězce mají menší snahu spolu interagovat svými uhlovodíkovými konci, a proto tekutost membrány zvyšují. Stupeň



Obr. 13 Vliv nenasycených lipidů na fluiditu membrány; nenasycené lipidy narušují soudržnost molekul lipidové dvojvrstvy a vedou k otevřenější tekutinové struktuře; převzato a upraveno z Wikipedie, volné dílo

nasycenosti lipidů také ovlivňuje fluiditu membrány; dvojně vazby vytváří nehomogenity, což snižuje velikost interakcí mezi jednotlivými řetězci (viz obrázek 13).

Změnou nasycenosti membránových lipidů je umožněna regulace fluidity membrány u extrémofilních organismů. Prokázalo se u řady organismů, že se zvyšováním teploty se zvyšuje nasycenost lipidů v membránách. Lipidová dvojvrstva obsahuje nasycené mastné kyseliny, které vykazují vyšší teploty tání, což umožňuje termofilům udržet integritu jejich membrán.

Bylo postulováno, že fluiditu membrán mohou zachovávat i pigmenty, konkrétně polární karotenoidy (Chattopadhyay & Jagannadham 2001).

9.1 Ochranné mechanismy membrány

Mechanismy biochemické adaptace mohou být u hub různé. Mají však obvykle alespoň některé společné rysy. Odpověď na tepelnou expozici je nejčastěji studována u mezofilních hub, pro které byly navrženy tři hypotézy obranných mechanismů membrány: homeoviskózní adaptační hypotéza (Sinensky 1974), která navrhuje zachování viskozity membrány pomocí změny stupně nenasycení fosfolipidových acylových řetězců. Hypotéza o homeofázické adaptaci pak zdůrazňuje rovnováhu mezi membránovými lipidy kuželového tvaru a „válcového“ tvaru (Hazel 1995). Tyto hypotézy ale nezohledňují vliv tepelných účinků v rámci toleranční zóny a na hladině tepelného šoku (heat shock), který se projeví zastavením růstu (Yanutsevich et al. 2014). Yanutsevich et al. proto na základě srovnání biochemických změn v těchto typech tepelné expozice navrhl třetí stabilizační hypotézu, podle níž je integrita membrány za podmínek HS udržována pomocí sloučenin stabilizujících lipidovou dvojvrstvu. Jedná se především o trehalózu, steroly a glykolipidy. V této studii bylo zjištěno, že termofilové syntetizují více nenasycených lipidů než mezofilní a psychofilní organismy.

Tereshina et al. (2010) také odhalili zásadní rozdíly v reakci houbových buněk na stres způsobený dvěma typy vlivu tepla, a to v toleranční zóně a na hladině tepelného šoku. Tepelné vlivy působící na organismus mohou být optimální, supraoptimální nebo letální. V optimálních podmínkách organismus vykazuje maximální růst, suboptimální podmínky v rámci toleranční zóny vedou ke snížení rychlosti růstu, tepelný šok růst inhibuje a letální teplotní šok způsobuje smrt organismu (Tereshina et al. 2010). Suboptimální teplota organismy může ohrožovat, ale obvykle existuje široké rozpětí teplot, při kterých nedochází k fyziologickým změnám a ve kterém jsou následky reverzibilní. Vysoké teploty jsou pro organismus nebezpečné již několik stupňů za metabolickým optimem. To je způsobeno metabolickou aktivitou enzymů, které se vysokými teplotami rychle inhibují anebo přímo denaturují. Také se zastavuje syntéza „household“ proteinů (Tereshina et al. 2010), což výrazně narušuje život buňky. Další riziko vystavení vysoké či nízké teplotě je dehydratace organismu.

Proteiny asociované s „heat shock“ odpovědí mohou zvyšovat odolnost organismů proti letálnímu teplotnímu šoku. Jedním důležitým aspektem této reakce je vývoj indukované nebo také "získané" termotolerance, která se projevuje jako zvýšená schopnost přežít při následném vystavení vyšším, potenciálně smrtelným teplotám (Piper 1993). Bylo pozorováno, že vliv tepla v rámci toleranční zóny nevedl k toleranci proti letálnímu šoku ani po 6 hodinách působení;

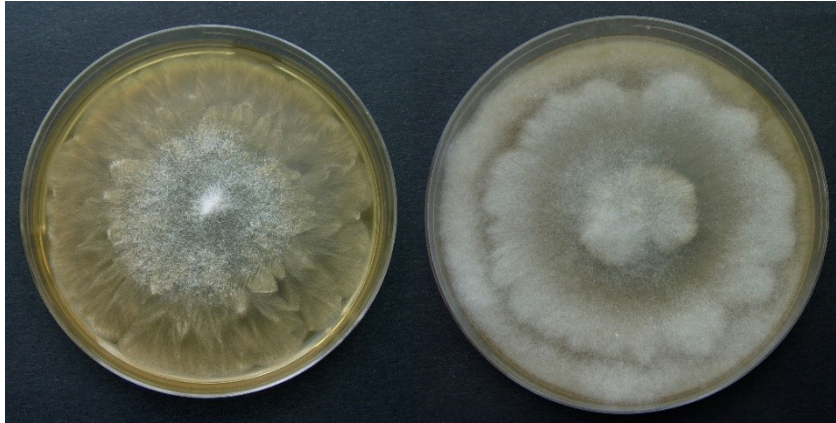
zatímco po expozici tepelnému šoku po dobu jedné hodiny, byla pozorována odolnost vůči letálnímu HS (Tereshina et al. 2010). V rámci „heat shock response“ funguje ochranný systém, který vede k odolnosti proti letálnímu HS. Ochranný systém zahrnuje syntézu HSP proteinů tepelného šoku, akumulaci trehalózy a změnu vodního stavu v buňkách. Obecně se u všech zkoumaných hub obsah trehalózy za podmínek HS zvýšil, v rámci toleranční zóny zůstal nezměněn.

HS response byla studována u termofilního druhu *Rhizomucor miehei* a mezofilní kontroly. Ukázalo se, že fenomén získané tepelné odolnosti se u *R. miehei* neprojevil. Za optimálních podmínek termofilní i mezofilní druh syntetizoval srovnatelné množství trehalózy. V submerzní kultuře při optimu (41-43°C) byl přítomný vysoký obsah trehalózy, mezi 8-11 %. Syntéza ale probíhala pouze po působení teploty HS po dobu 3 hodin (Yanutsevich et al. 2014). Termofilní druh však tvořil méně trehalózy než mezofilní, což vedlo autory k závěru, že mezi termofilii a obsahem trehalózy neexistuje žádný vztah.

9.2 Trehalóza a její vliv v organismu

Trehalóza je neredukující disacharid glukózy složený ze dvou molekul glukózy, které jsou mezi sebou spojené 1,1–vazbou. V organismu funguje podobně jako další sacharidy, plní roli zásobárny uhlíku a energie, ale dokáže i stabilizovat buněčnou membránu či sloužit jako signální molekula. Některým organismům pak umožňuje opakované přežití extrémních podmínek (např. anhydrobióza želvušek). Trehalóza bývá často přítomná ve vysokých koncentracích v anhydrobiotických organismech. Bylo opakovaně pozorováno, že má osmoprotektivní účinky a chrání tak membrány a proteiny před vlivem osmotického stresu (Crowe 1984). Dehydratace membrány má v organismu obvykle za následek nevratné poškození v podobě narušení strukturální i funkční integrity membrány (Crowe 1984).

Sacharidy (cukry a cukerné alkoholy) mohou nahradit vodu při vysychání membrány, a tak lipidovou dvojvrstvu stabilizovat (Feofilova et al. 2000). Působí zejména proti poškození způsobenému rozdíly v rychlosti změny lipidové fáze membrány, čímž se udržuje její celistvost a funkce (Crowe et al. 1986). Pro správnou ochranu membrány je také důležitý transport trehalózy, protože tento cukr musí být přítomný na obou stranách dvojvrstvy (Nery et al. 2008). Například u druhu *Mortierella elongata* může být produkce trehalózy klíčovou adaptací na nízké teploty (Weinstein et al. 2000). Typicky koncentrický růst zástupců rodu *Mortierella* můžeme vidět na obrázku 14.



Obr. 14 Zástupci rodu *Mortierella* izolované z půdy, štola lomu Velká Amerika; kultivováno na mediu SL4 při 25 °C

9.4 Mechanismy adaptace – shrnutí

Adaptace organismů k vysokým i nízkým teplotám jsou v zásadě velice podobné. Převládají změny fluidity biomembrán – změny nasycenosti lipidů, či jejich konformace; produkce trehalózy či dalších cukerných alkoholů nebo produkce "antifreeze" proteinů. Autoři zde uvedených studií se částečně neshodují v mechanismech, které působí u zygomycetů. Nejčastěji je u zygomycetů popisována produkce trehalózy, změna stupně nasycenosti membránových fosfolipidů a produkce látek stabilizujících membránu – steroly, glykolipidy a cukerné alkoholy. Odpověď organismu na tepelný stres byla většinou ovlivněna výškou teploty a také dobou, po kterou teplota působila. Pokud bylo působeno teplotou v rámci toleranční zóny, organismy reagovaly velmi pomalu. Naopak při působení vyšších teplot na hladině tepelného šoku po delší dobu, bylo pozorováno spuštění ochranného systému proti letálnímu tepelnému šoku.

10. Závěr

Teplota, jako jeden z nejvýznamnějších abiotických faktorů prostředí, má vliv na růst a vývoj všech organismů včetně zygomycetů. Některé údaje o vlivu teploty jsou známé již dlouho. Nejstarší citovanou prací o vlivu teploty na zygomycety je článek „The effects of humidity, temperature and carbon dioxide on sporulation of *Choanephora cucurbitarum*“ (Barnett & Lilly 1955). Mnohé studie potvrdily přímý vliv teploty na životní cyklus – na klíčení, růst, rozmnožování i tvorbu sekundárních metabolitů. Dnes jsou studovány vlivy teploty na funkci konkrétních genů či vliv na expresi a následnou tvorbu PUFA či signálních látek (β -karoten).

Teplotní požadavky jednotlivých druhů jsou velmi rozmanité, proto je dělíme do několika skupin podle jejich teplotních nároků. Vymezuje organizmy psychrofilní (chladnomilné), psychrotolerantní, psychrotrofní, mezofilní, termotolerantní a termofilní (teplomilné). Především termíny psychrotrof a psychrotolerant se svým významem překrývají a autoři je využívají pro popis druhů nekonzistentně. Rychlost růstu je nejvyšší v rámci teplotního optima. Pokud jsou růstové podmínky suboptimální, může se růst výrazně zpomalit. U některých druhů zygomycetů může změna teploty způsobit dimorfismus stélky.

Rozmnožování, stejně jako růst, probíhá nejrychleji v teplotním optimu. Optimum pro sporulaci i tvorbu zygospor bývá užší než optimum růstové. Se zvyšující se teplotou se zvyšuje poměr asexuální reprodukce k sexuální reprodukci. Pro tvorbu zygospor se jeví nejvhodnější kultivace v chladu a temnotě. Někteří autoři však vliv teploty na zygosporogenezi nepotvrdili a vyzdvihují pouze vliv absence světla. Asexuální rozmnožování je teplotou také ovlivněno. V hraničních teplotách růstu vidíme výrazný pokles počtu rozmnožovacích struktur.

Podobně produkce biotechnologicky významných polynenasycených mastných kyselin se zvyšuje se sníženou teplotou. Nízké teploty indukují expresi desaturázových enzymů snižujících nasycení mastných kyselin. Příkladem mohou být ω 3 desaturázové enzymy (Δ 15 desaturáza) které vedou k tvorbě omega-3 mastných kyselin, jako je EPA a DHA. Snížení teploty indukuje obvykle tvorbu PUFA u termofilních i psychrofilních organismů.

Zygomycety jsou pro výzkum vlivu teploty mimořádně vhodnými modelovými organismy. Například v řádu Mucorales nalezneme mezofilní zástupce, i zástupce rostoucí v extrémních prostředích, což umožňuje provádět srovnávací studie u příbuzných druhů, které nám mohou poskytnout další zajímavé informace. Je zřejmé, že úzce příbuzné druhy se mohou v odpovědi na změny podmínek prostředí značně lišit. Spíše než fylogenetickou příbuznost tyto reakce odráží adaptace na rozdílné životní prostředí. Dalšími výhodami zygomycetů, a zástupců

řádu Mucorales především, je jejich rychlý růst, snadná kultivace i izolace z prostředí. V neposlední řadě jsou mnohé z nich produkčně významné druhy. V současnosti je stále kladen důraz na zvýšení produkce, jehož lze dosáhnout různými strategiemi (biotransformace či genetické inženýrství). Výtěžek lze ale zvýšit i optimalizací kultivačních podmínek, na které je zaměřeno čím dál tím více studií. Osobně vidím v tomto směru výzkumu zygomycetů velký potenciál, studie by se ale měly komplexně zaměřit i na ostatní vlivy přímo působící na růst a produkci metabolitů. Teplota by ve studiích neměla být oddělována od ostatních ekologických faktorů, protože účinky teploty se projevují v kontextu ostatních faktorů, které mohou mít rozhodující vliv na sledovaný jev. Velmi důležitý je vliv media a substrátu, pH, relativní vlhkosti, temnoty, případně světla při kultivaci.

Stále ještě nejsou detailně prozkoumány polární oblasti, vysoké hory i oceány, kde pravděpodobně žije mnoho neobjevených druhů mikroorganismů včetně zygomycetů. Tyto organismy, osidlující extrémní habitaty nám mohou poskytnout důležité informace nejen o fyziologii přežívání nepříznivých podmínek. Myslím si, že výsledky výzkumů zaměřených na extrémofilní mikroorganismy a jejich mechanismy adaptace, mohou mít rozsáhlé využití i v jiných oborech. Jak již bylo zmíněno, zygomycety vynikají širokým spektrem využitelných metabolitů v mnoha odvětvích průmyslu. Zároveň jsou schopné růstu na jednoduchých a dostupných substrátech – i „odpadních“ látkách z průmyslu. Po optimalizaci kultivačních podmínek bude možné produkovat enzymy i mastné kyseliny více ekonomicky i ekologicky. V tomto směru mají zygomycety do budoucna obrovský potenciál. Nalézání nových rodů, druhů či kmenů v extrémních oblastech a jejich výzkum, tak může být velkým přínosem do budoucna.

11. Seznam použité literatury

1. Austin, D. G., Bu'Lock, J. D., & Winstanley, D. J. (1969): Trisporic acid biosynthesis and carotenogenesis in *Blakesleea trispora*. *Biochemical Journal*, 113 (3), 34.
2. Barnett, H. L., & Lilly, V. G. (1956): Factors affecting the production of zygospores by *Choanephora cucurbitarum*. *Mycologia*, 48 (5), 617-627.
3. Barnett, H. L., & Lilly, V. G. (1955): The effects of humidity, temperature and carbon dioxide on sporulation of *Choanephora cucurbitarum*. *Mycologia*, 47(1), 26-29.
4. Barrera, C. R. (1983): Formation and ultrastructure of *Mucor rouxii* arthrospores. *Journal of Bacteriology*, 155 (2), 886-895.
5. Behnam, S., Karimi, K. et al. (2016): Optimization of xylanase production by *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*, and *Rhizopus oryzae* through solid state fermentation. *Biological Journal of Microorganism*, 41 (4), 250-256.
6. Bellou, S., Moustogianni, A. et al. (2012): Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by *Zygomycetes* grown on glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (1), 146-158.
7. Benjamin, R. K. (1966): The merosporangium. *Mycologia*, 58 (1), 1-42.
8. Benjamin, R. K. (1979): *Zygomycetes* and their spores. Whole fungus; the sexual-asexual synthesis.
9. Bennett, J. W. (1998): Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66 (2-3), 101-107.
10. Benny, G. L., Humber, R. A., & Morton, J. B. (2001): *Zygomycota: zygomycetes*. In *Systematics and Evolution* (pp. 113-146). Springer, Berlin, Heidelberg.
11. Benny, G. L., Kirk, P. M., & Samson, R. A. (1985): Observations on *Thamnidiaceae* (*Mucorales*). *Mycotyphaceae* fam. nov. and a re-evaluation of *Mycotypha* sensu Benny and Benjamin illustrated by two new species. *Mycotaxon*.
12. Certik, M., & Shimizu, S. (1999): Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 (1), 1-14.
13. Cooke, R. C., & Rayner, A. D. M. (1984): *Ecology of saprophytic fungi*. London and New York: Longman.
14. Cooney, D. G., & Emerson, R. (1964). *Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification*. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities, and classification.
15. Crisan, E. V. (1973): Current concepts of thermophilism and the thermophilic fungi. *Mycologia*, 65 (5), 1171-1198.
16. Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter et al. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242 (1), 1-10.
17. Crowe, J. H., Crowe, L. M., & Chapman, D. (1984): Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223 (4637), 701-703.
18. Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (Eds.) (2007): *Food mycology: A multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press.
19. Dyal, S. D., Bouzidi, L., & Narine, S. S. (2005): Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Research International*, 38 (7), 815-829.
20. Eddy, B. P. (1960): The use and meaning of the term 'psychrophilic'. *Journal of Applied Microbiology*, 23 (2), 189-190.

21. Edelmann, R. E., & Klomparens, K. L. (1995): Low temperature scanning electron microscopy of the ultrastructural development of zygospores and sporangiospores in *Mycotypha africana*, and the effects of cultural conditions on sexual versus asexual reproduction. *Mycological Research*, 99 (5), 539-548.
22. Feofilova, E. P., Tereshina, V. M. et al. (2000): Different mechanisms of the biochemical adaptation of mycelial fungi to temperature stress: changes in the cytosol carbohydrate composition. *Microbiology*, 69 (5), 504-508.
23. Flanagan, P. W., & Scarborough, A. M. (1974): Physiological groups of decomposer fungi on tundra plant remains. *Soil organisms and decomposition in tundra*. Tundra Biome Steering Committee, Stockholm, 159-181.
24. Gerdel, R. W., & Drouet, F. (1960): The cryoconite of the Thule area, Greenland. *Transactions of the American Microscopical Society*, 79 (3), 256-272.
25. Guimarães, L. H. S., Peixoto-Nogueira, S. C., Michelin, M. et al. (2006): Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (4), 474-480.
26. Hammonds, P. (1984): Effects of environmental temperature on members of the Mucorales (Doctoral dissertation, University of Aston in Birmingham).
27. Hazel, J. R. (1995): Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology*, 57 (1), 19-42.
28. Hesseltine, C. W., & Rogers, R. (1987): Dark-period induction of zygospores in *Mucor*. *Mycologia*, 79 (2), 289-297.
29. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F. et al. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111 (5), 509-547.
30. Hoshino, T., & Matsumoto, N. (2012): Cryophilic fungi to denote fungi in the cryosphere. *Fungal Biology Reviews*, 26 (2-3), 102-105.
31. Chattopadhyay, M., & Jagannadham, M. (2001): Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria. *Polar Biology*, 24 (5), 386-388.
32. Iwen, P. C., Sigler, L. et al. (2007): *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2), 636-640.
33. Klempova, T., Basil, E. et al. (2013): Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta-carotene by *Zygomycetes* fungi. *Biotechnology Journal*, 8 (7), 794-800.
34. Kosa, G., Zimmermann, B., Kohler, A. et al. (2018): High-throughput screening of *Mucoromycota* fungi for production of low-and high-value lipids. *Biotechnology for Biofuels*, 11 (1), 66.
35. Krisch, J., Takó, M. et al. (2010): Characteristics and potential use of β -glucosidases from *Zygomycetes*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 891-896.
36. Kubátová A. & Váňová M. (2009): Atlas zygomycetů. dostupné online: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-zygomycetu>
37. Lasure, L. L., & Ingle, M. B. (1976): Some effects of temperature on zygospore formation in *Mucor miehei*. *Mycologia*, 68 (6), 1145-1151.
38. Magan, N. (2007). Fungi in extreme environments. *The Mycota*, 4, 85-103.
39. Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. B. (2007): Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94 (2), 77-99.
40. Mathur, N., & Sarbhoy, A. K. (1999): Correlation between β -carotene content, several physical factors and the formation of zygospores in *Mucor* spp. *Microbiological Research*, 154 (2), 137-143.

41. Michailides, T. J., Guo, L. Y., & Morgan, D. P. (1997): Factors affecting zygosporogenesis in *Mucor piriformis* and *Gilbertella persicaria*. *Mycologia*, 89 (4), 603-609.
42. Möller, C., & Dreyfuss, M. M. (1996): Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. *Mycologia*, 88 (6), 922-933.
43. Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L. et al. (2016): Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, 56, 69-79.
44. Morita, R. Y. (1975): Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39 (2), 144.
45. Nery, D. D. C. M., da Silva, C. G., Mariani, D. et al. (2008): The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1780 (12), 1408-1411.
46. O'Donnell, K. L. (1979): *Zygomycetes in culture*. University of Georgia.
47. Panasenko, V. T. (1967): Ecology of microfungi. *The Botanical Review*, 33 (3), 189-215.
48. Pidopličko, M. N., & Miljko, A. A. (1971): Atlas mukoraljnih gribov. *Naukova dumka*, Kijev.
49. Piper, P. W. (1993): Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Reviews*, 11 (4), 339-355.
50. Poitras, A. W. (1955): Observations on asexual and sexual reproductive structures of the Choanephoraceae. *Mycologia*, 47 (5), 702-713.
51. Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., & Baker, D. J. (2000): Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (2), 236-301.
52. Robinson, C. H. (2001): Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*, 151 (2), 341-353.
53. Sajbidor, J., Certik, M., & Dobroňová, S. (1988): Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to Mucorales. *Biotechnology Letters*, 10 (5), 347-350.
54. Schimek, C., & Wöstemeyer, J. (2009): Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochemistry*, 70 (15-16), 1867-1875.
55. Schipper, M. A. (1969): Zygosporic stages in heterothallic *Mucor*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 35 (1), 189-208.
56. Schipper, M. A. A. (1973). A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. *Studies in Mycology*, 4, 40.
57. Schmidt, S. K., Wilson, K. L., Meyer et al. (2008): Phylogeny and ecophysiology of opportunistic “snow molds” from a subalpine forest ecosystem. *Microbial Ecology*, 56 (4), 681-687.
58. Sinensky, M. (1974): Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71 (2), 522-525.
59. Smith, W. L., & Murphy, R. C. (2002): The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. In *New Comprehensive Biochemistry*, 36, 341-371.
60. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L. et al. (2016): A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108 (5), 1028-1046.
61. Spector, A. A. (1999): Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34.
62. Stahl, P. D., & Klug, M. J. (1996): Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (11), 4136-4146.

63. Sumner, J. L., & Morgan, E. D. (1969): The fatty acid composition of sporangiospores and vegetative mycelium of temperature-adapted fungi in the order Mucorales. *Microbiology*, 59 (2), 215-221.
64. Tanabe, Y., Watanabe, M. M., & Sugiyama, J. (2005): Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51 (5), 267-276.
65. Tereshina, V. M., Memorskaya, A. S., & Kotlova, E. R. (2011): The effect of different heat influences on composition of membrane lipids and cytosol carbohydrates in mycelial fungi. *Microbiology*, 80 (4), 455.
66. Torres-Cruz, T. J., Billingsley Tobias, T. L., Almatruk, M. et al. (2017): *Bifiguratus adelaidae*, gen. et sp. nov., a new member of Mucoromycotina in endophytic and soil-dwelling habitats. *Mycologia*, 109 (3), 363-378.
67. Tosi, S., Casado, B. et al. (2002): Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*, 25 (4), 262-268.
68. Van den Ende, H., & Stegwee, D. (1971): Physiology of sex in Mucorales. *The Botanical Review*, 37 (1), 22-36.
69. Watson, K., Arthur, H., & Morton, H. (1978): Thermal adaptation in yeast: obligate psychrophiles are obligate aerobes, and obligate thermophiles are facultative anaerobes. *Journal of Bacteriology*, 136 (2), 815-817.
70. Weinstein, R. N., Montiel, P. O., & Johnstone, K. (2000): Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. *Mycologia*, 92 (2), 222-229.
71. White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K. et al. (2006): Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98 (6), 872-884.
72. Whittaker, R. H. (1969): New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163 (3863), 150-160.
73. Yanutsevich, E. A., Memorskaya, A. S., Groza, N. V. et al. (2014): Heat shock response in the thermophilic fungus *Rhizomucor miehei*. *Microbiology*, 83 (5), 498-504.
74. Zycha, H., Siepmann, R., & Linnemann, G. (1969): Mucorales. *Mucorales*, 355.

Pozn. Citace převzatých obrázků a fotografií jsou vždy zahrnuty v popisku obrázku. Necitované obrázky pořídila autorka práce ve spolupráci s vedoucí práce RNDr. Alenou Kubátovou, CSc.