

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Využití MALDI biotypingu pro identifikaci plísňových škůdců
rostlinné zemědělské produkce**

Diplomová práce

Bc. Karolína Novotná

Kvalita a zpracování zemědělských produktů (AMK)

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

Ing. Matěj Božik, MSc, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Využití MALDI biotypingu pro identifikaci plísňových škůdců rostlinné zemědělské produkce“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. dubna 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Mgr. Petrovi Maršíkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při konečných úpravách a konzultace týkající se struktury a obsahu práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Matějovi Božikovi, MSc, Ph.D., který byl kdykoli ochoten poradit se zpracováním práce, ukázal a vysvětlil mi práci v laboratoři. Co se týče výzkumu, pak děkuji Ing. Martině Šaškové za asistenci a společnost při přípravě vzorků. Také děkuji zaměstnancům VÚKOZu, kteří mi poskytli biologický materiál, informace a užitečné rady z oblasti fytopatologie zkoumaných organismů. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině, mému příteli a také kamarádkám za psychickou podporu při psaní práce.

Využití MALDI biotypingu pro identifikaci plísňových škůdců rostlinné zemědělské produkce

Souhrn

MALDI-TOF MS je poměrně mladá metoda, která se v laboratorní praxi neustále rozvíjí. Na rozdíl od identifikace bakterií a kvasinek je její využití pro identifikaci vláknitých oomycet poněkud náročnější. Jedná se především o fázi přípravy vzorků, kultivaci v tekutém živném médiu, které za neustálého třepání trvá zhruba podle druhu 3–5 dní a následné zpracování (extrakce etanolem, nanesení na destičku a měření hmotnostním spektrometrem) několik hodin. Přesto je tato metoda identifikace těchto organismů mnohem rychlejší a méně nákladná než ostatní postupy zmíněné v přehledu literatury. Přes nesporné výhody MALDI-TOF MS mohou nastat situace, kdy bývá identifikace neúspěšná. Nelze tedy opomenout důležitost kroků před samotnou identifikací, zvláště při tvorbě referenční databáze, kdy je nezbytná maximální přesnost. Prvním z nich je izolace vzorku ve správném období. U rodu *Phytophthora* se jedná o teplejší měsíce v roce, konkrétně od května do listopadu. Odběr vzorků je možný z kořenů nebo z nadzemních částí rostliny. Během kultivace kmene v tekutém médiu je velmi důležité dodržovat podmínky optimální pro předpokládanou skupinu vláknitých oomycet a zároveň je třeba udržovat kulturu v neustálém pohybu. Nedefinovaný nárůst kmene v živném médiu snižuje kvalitu výsledného spektra, a tudíž i kvalitu výsledné identifikace. Příprava vzorku před vlastním zpracováním je další velmi důležitou fází, proto je zásadním faktorem správný výběr extrakční metody. Dále pak mohou vzniknout chyby při nanášení vzorku na spot, které jsou většinou způsobené nanesením nehomogenní vrstvy spojené s tvorbou velkých krystalů. Pro získání spolehlivých výsledků je dalším nezbytným krokem test přesnosti a správnosti metody. K tomu bylo v této práci použito několik způsobů, a to měření slepého vzorku, porovnání hmotnostních spekter rodu *Phytophthora* se spektry uloženými ve specifické databázi a zjištění rozdílu mezi spektry v rámci rodu a mezi jednotlivými druhy i kmeny.

Klíčová slova: biotyping, MALDI, houby, škůdci, klasifikace

Application of MALDI biotyping for identification of agricultural crop production mold pathogens

Summary

MALDI-TOF MS is a relatively young method that is constantly developing in laboratory practice. Unlike the identification of bacteria and yeasts, the use of this method for fibrous oomycetes is a bit more demanding. This is mainly the stage of preparation of samples, cultivation in liquid nutrient medium, which takes about 3 to 5 days depending on the type of shaking and subsequent processing (ethanol extraction, plate application and mass spectrometry) for several hours. However, this method of identification of fungal organisms is much faster than the other methods mentioned in the literature review. Despite the unquestionable advantages of MALDI-TOF MS, there may be situations where identification is unsuccessful. Therefore, we must not forget the importance of the steps before identifying itself, especially when creating a reference database where maximal accuracy is ensured. The first is to isolate the sample at the right time. The *Phytophthora* need warmer months in the year, specifically from May to November. Sampling is possible from the roots or directly from the plant tissue. During the cultivation of the strain in the liquid medium, it is very important to adhere to the conditions optimal for the supposed group of fibrous oomycetes, and it is also necessary to keep the pattern in constant movement. Undefined strain growth in the nutrient medium reduces the quality of the resulting spectrum and hence the quality of the resulting identification. Preparing a sample before processing it is another crucial point of the identification, thus the correct selection of the extraction method can not be passed. Additionally, mistakes resulting from the application of a sample to the target, which are mostly caused by the application of a non-homogeneous layer connected with the formation of large crystals. For success, the next step is to test the accuracy and precision of the method. For the evaluation, the following methods have been used: measuring a blank sample, comparing *Phytophthora* mass spectra with specimens saved in a specific database and finding the differences between spectra within the genus and between species and strains.

Keywords: biotyping, MALDI, fungi, pests, classific

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Patogeny rostlin	10
3.2	Plísňové patogeny	10
3.2.1	Morfologie	11
3.2.2	Význam v potravinářství	11
3.3	Rod <i>Phytophthora</i>	12
3.3.1	Příznaky napadení patogeny rodu <i>Phytophthora</i>	14
3.4	Identifikace fytopatogenů	15
3.4.1	Morfologické metody	15
3.4.2	Molekulárně biologické metody	15
3.4.3	Hmotnostní spektrometrie	16
3.4.4	MALDI biotyping	17
3.5	Princip ochrany před patogeny	17
3.6	MALDI – TOF MS	18
3.6.1	Princip	18
3.6.2	Matrice	19
3.6.3	Zdroj ionizace	19
3.6.4	TOF analyzátor	20
3.6.5	Detektor	20
3.6.6	Současně dostupné komerční platformy k MALDI-TOF MS identifikaci...	21
3.7	Biotyper	22
3.8	Analýza fungálních fytopatogenů pomocí MALDI – TOF MS	23
3.9	Přehled metod přípravy extraktů	25
4	Metodika	28
4.1	Materiál	28
4.1.1	Použitý biologický materiál	28
4.1.2	Chemikálie pro izolaci a kultivaci	30
4.1.3	Izolace a kultivace	30
4.2	MALDI-TOF analýza	31
4.2.1	Chemikálie pro kalibraci a přípravu vzorku	31
4.2.2	Přístrojové a další vybavení	31
4.2.3	Kalibrace	31
4.2.4	Příprava vzorku	32
4.3	Vyhodnocení	33
5	Výsledky	34
5.1	Validace a verifikace metody	34

5.2	Ověření databáze	36
5.3	Porovnání v rámci rodu	37
5.4	Porovnání v rámci druhu	39
6	Diskuze.....	44
7	Závěr	48
8	Seznam literatury	49
9	Seznam obrázků	54
10	Seznam tabulek	54
11	Seznam zkratk	55
12	Seznam příloh.....	55

1 Úvod

Předmětem této práce bude výzkum spolehlivosti identifikace patogenů rostlin, a to konkrétně vláknitých oomycet rodu *Phytophthora*. Tyto fytopatogeny se šíří velmi rychle a napadají celé lesy a sady. Příznaky jimi způsobeného onemocnění se projevují až několik měsíců po napadení rostliny. Jedná se tedy o významné narušitele zemědělské produkce. Kvůli napadení těmito vodou se šířícími patogeny dochází ke ztrátám v řádech milionů korun ročně. Vývoj včasné a rychlé metody identifikace by měl této situaci předcházet. V současné době jsou k identifikaci druhů rodu *Phytophthora* využívány klasické mikroskopické a molekulárně biologické metody. Ty jsou však zdoluhavé a nemusí být u nich vždy znatelné morfologické rozdíly. MALDI-TOF MS se stala spolehlivým nástrojem pro rychlou identifikaci a klasifikaci mikroorganismů. V tomto ohledu představuje silnou konkurenci pro metody výše uvedené. V současné době jsou komerční systémy přístupné pro biologické výzkumné práce i pro diagnostické aplikace v klinické medicíně, biotechnologii a průmyslu. MALDI-TOF MS je používána zejména pro biotypování bakterií, ale bylo také provedeno mnoho experimentálních studií pro analýzu hub. V rámci této práce bude testována aplikovatelnost MALDI Biotypingu na vláknité oomycety. Pro využitelnost metody je důležitá nejen dostupnost přístrojového vybavení, ale i vhodný výběr standardizované metody extrakce proteinů z kultivovaného materiálu, která je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících spolehlivost identifikace.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce je vyvinout a otestovat metodu identifikace významných plísňových škůdců rostlinné zemědělské produkce (např. Phytophthora) pomocí screeningové metody MALDI biotypingu. Dílčími cíli bude vypracování standardizované metodiky přípravy vzorku pro vzorky vláknitých hub a plísní, jejich případná klasifikace v rámci rodů.

Hypotéza: plísňové patogeny lze klasifikovat na základě jejich iontového profilu pomocí MALDI biotypingu. Dílčí hypotéza: na základě typických iontových markerů příslušných patogenních druhů.

3 Literární rešerše

3.1 Patogeny rostlin

Rostliny, kultivované nebo divoké, rostou a plodí dobře, pokud jim půda poskytuje dostatečné živiny a vlhkost, přijímají dostatek slunečního záření a teplota zůstává v optimálním rozmezí. Jejich stav se však může velmi rychle zhoršit. Nemocné rostliny hůř rostou a plodí, vykazují různé typy příznaků onemocnění a jejich části nebo celí jedinci odumírají. Důvody, které způsobují onemocnění rostlin, jsou stejné nebo velmi podobné těm, které způsobují onemocnění lidí a zvířat. Zahrnují infekci patogenními mikroorganismy jako jsou viry, bakterie, houby či prvoci, napadení různými druhy živočišných škůdců (např. hmyz, hlístice), nepříznivé podmínky prostředí, jako je nedostatek či nadbytek živin, vlhkosti nebo světla a přítomnost toxických chemických látek ve vzduchu nebo půdě (Agrios 2005).

Rostliny jsou tudíž vystaveny interakci s mnoha organismy, životním prostředím a podléhají stresovým podmínkám. Fytopatogeny narušují rostlinný metabolismus, což má za následek onemocnění, které se projevuje charakteristickými příznaky. Velká část ekonomicky významných chorob rostlin je způsobena mykózami, tj. onemocněními vyvolanými houbami a organismy, které jsou houbám podobné (Bennett & Klich 2003).

3.2 Plísňové patogeny

Vláknité houby se (podobně jako jiné skupiny organismů, které sdílí podobné vlastnosti) řadí do říše hub (Fungi). V rámci ní existuje v současné době několik systémů členění, která se však shodují v klasifikaci hub pravých do čtyř skupin: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* (Malíř & Ostrý 2003). Samotná říše hub se dělí podle velikosti na dvě základní skupiny. První jsou houby makroskopické velikosti, jinak také makromycety a druhé mikroskopické velikosti neboli mikromycety. Vlákňité mikromycety se všeobecně nazývají „plísňe“ (Klaban 2001).

Na rozdíl od pravých hub je *Phytophthora* rod rostlinných patogenních vláknitých oomycet (oddělení: *Oomycota*), které jsou však vláknitým houbám z říše Fungi morfologicky velmi podobné (Meszka & Michalecka 2016).

3.2.1 Morfologie

Vegetativním vláknitým útvarem je u těchto mikromycet a podobných organismů stélka, jejíž stavební jednotkou je duté vlákno neboli hyfa. Pokud je opatřena přehrádkou, pak se jedná o houby přehrádkované, což jsou již zmiňovaná *Ascomycota* a mitosporické houby. Pokud však přehrádku nemají, jedná se typicky o houby spájivé, *Zygomycota*. Typ přehrádek je pro jednotlivá oddělení různý (Malíř & Ostrý 2003). Dle Klabana (Klaban 2001) se soubor více hyf nazývá mycelium, kde se hyfy navzájem proplétají. Podle umístění mycelií v substrátu se rozdělují na extramatrikální a intramatrikální. Z názvu vyplývá, že extramatrikální je mycelium vyskytující se na povrchu hostitele či na povrchu jeho orgánu. Oproti tomu mycelium intramatrikální se vyskytuje přímo uvnitř pletiv napadené rostliny. Část, která vrůstá do substrátu, je označována jako bazální mycelium, jedná se o vegetativní orgán. Druhá část, která zůstává nad povrchem, se nazývá myceliem vzdušným (Meszka & Michalecka 2016).

3.2.2 Význam v potravinářství

Rostliny tvoří přímo nebo nepřímo všechny potraviny, na kterých závisí člověk a ostatní živočichové. Jsou to jediné vyšší organismy, které dokáží přeměnit energii slunečního světla na uloženou využitelnou chemickou energii v podobě sacharidů, bílkovin a tuků. Život všech živočišných druhů, včetně lidí, závisí na existenci rostlin a jejich produktech (Agrios 2005).

Mikroskopické houby jsou nedílnou složkou životního prostředí člověka. Lidé se je postupem času naučili využívat nejen pro produkci nejrůznějších potravin a pochutin, jako jsou např. mléčné výrobky a alkoholické nápoje, ale i k výrobě organických sloučenin jako jsou organické kyseliny, vitaminy, antibiotika a enzymy (Malíř & Ostrý 2003). Přesto však choroby zapříčiněné mikromycetami způsobují velké poklesy úrody a nelze opomenout jejich význam jakožto původců zdraví nebezpečných mykotoxinů, jejich sekundárních metabolitů (Bennett & Klich 2003). V současnosti je známo přes 300 druhů mykotoxinů. V bezprostředním okolí lidí se nyní vyskytuje 20 nejčastějších. Jejich produkce je vysvětlována jako obranný mechanismus plísní v boji o přežití a potravu, nejedná se ovšem o látky nezbytně nutné pro zásadní životní funkce (Malíř & Ostrý 2003). Jako příklad hospodářsky významných patogenů lze uvést skupinu vláknitých hub z rodu *Monilinia*, které způsobují velké ztráty při produkci ovocných plodů (Horká et al. 2012).

Co se týká rodu *Phytophthora*, pak je u nás nejhojnějším parazitem *Phytophthora infestans*, českým názvem plíseň bramborová. Už samotné jméno vypovídá o hostitelských rostlinách, kterými jsou v současné době rostliny kulturní (užitkové i okrasné), plevelné i volně rostoucí druhy z čeledi *Solanaceae* – lilkovitých, mezi něž se řadí například lilek, rajče, paprika, blín, durman, rulík, mochně a hojně napadané brambory (Juroch 2011).

3.3 Rod *Phytophthora*

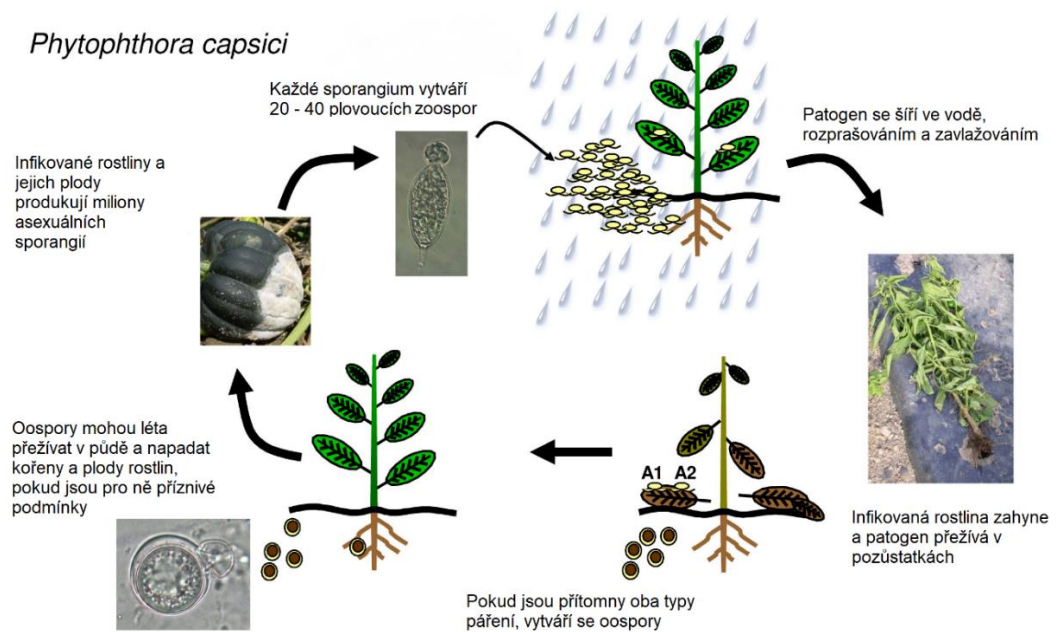
Phytophthora je rod spadající do oddělení *Oomycota* a je zodpovědný za některé z nejzávažnějších a ekonomicky významných chorob rostlin. *Oomycota* včetně rodu *Phytophthora* jsou apoplastickou větví sifonálních řas a náležejí do říše *Chromista*. Od hub se liší celou řadou znaků, jako například tím, že mají na rozdíl od hub ve svém životním cyklu bičíkaté stádium, mají jinou zásobní látku než glykogen, a to mykolaminaran, jejich buněčná stěna je tvořena především glukánem a celulózou. Významnou charakteristikou těchto patogenů je jejich vazba na vodní prostředí. Jejich nepohlavní rozmnožování probíhá takřka bezvýhradně ve vodním prostředí, jako jsou například půdní kapiláry, jelikož se bičíkaté stádium (zoospora) může pohybovat pouze ve vodě. Zoospory mohou migrovat do vzdálenosti několika desítek centimetrů, a tak aktivně vyhledávat kořeny hostitele (viz obrázek 1). Díky velké reprodukční kapacitě dochází za vhodných podmínek k velmi rychlému rozvoji onemocnění. Mezi hlavní faktory, které mají vliv na rozvoj infekce, patří především teplota, kdy vrchol aktivity patogenů spadá do teplých měsíců. Dále závisí na zasolení substrátu, infekci jiným patogenem, hnojení dusíkem a dalších faktorech (Mrázková et al. 2011).

Znalosti o rozmanitosti a významnosti druhů vyskytujících se v lesních ekosystémech se v posledních letech výrazně zvýšily (Judelson & Blanco 2005). Některé druhy z nich poškozují celé přírodní ekosystémy tím, že mění složení flóry. Například ve východní Austrálii zavlečený patogen *P. cinnamomi* zničil rozsáhlou oblast eukalyptového lesa světového dědictví „Jarrah“ a jeho jedinečnou flóru (Shearer et al. 2004). Podobně nedávno objevený druh *P. ramorum* zničil velkou plochu kalifornského původního dubového lesa, kde napadal původní druhy dubů a další stromy z příbuzných rodů. V Evropě se tento druh pak často vyskytuje na rododendronech a dalších okrasných keřích ve školkách a v poslední době je izolován z mnoha jiných stromů.

Mezi další z nejrozšířenějších a nejčastěji izolovaných druhů rodu *Phytophthora* v Evropě patří *P. quercina*, což je druh, který napadá jemné kořeny dubů a způsobuje tak rychlý pokles početního stavu dubů rostoucích na kyselých, dobře odvodněných půdách (Scheda & Cooke 2006). Dalším široce rozšířeným patogenním druhem je *Phytophthora plurivora*, původem půdní patogen infikující širokou škálu dřevin jako jsou *Quercus* spp., *Acer* spp., *Alnus* spp., *Vaccinium* spp., *Rhododendron* spp. a *Fagus* spp.. Je hlavní příčinou rozsáhlého poklesu počtu evropských buků (*Fagus sylvatica*) a několika druhů dubu (*Quercus* spp.). Mezi časté příznaky onemocnění *P. plurivora* patří rozsáhlé poškození jemných kořenů a napadení koruny mladých stromů (Vetukuri et al. 2018). Výsledky studií patogenity ukázaly, že vláknité parazitní organismy *Phytophthora* spp. (třída Oomycetes) vyskytující se v půdě mohou být patogenní i pro jahody a maliny (Meszka & Michalecka 2016). Tito autoři na základě morfologie a DNA sekvenční analýzy uvádějí, že druh *P. cactorum* je nejčastější příčinou infekce jahod v Polsku. Za příznivých povětrnostních podmínek pro vývoj a šíření patogenu (vysoká vlhkost a teploty nad 20 °C) způsobuje tento druh výrazné ztráty výnosu jahod a často i odumření celých rostlin.

Jednotlivé stromy i celé lesní porosty jsou vážně ohroženy rostoucím počtem druhů *Phytophthora*. Řada druhů těchto mikroorganismů je schopna napadnout více než 100 různých druhů hostitelů a má schopnost infikovat dřevité tkáně, což je potencionální příčinou destrukce plantáží i přirozených lesních ekosystémů po celém světě. Včasné odhalení a sledování onemocnění jsou důležitými aspekty ochrany pro předcházení takovým zkázám, avšak zpravidla tomu brání nedostatek genomických zdrojů (Feau et al. 2016).

V České republice donedávna existovalo málo spolehlivých dokladů o výskytu oomycet a chorobách, které způsobují. Základní neznalost byla a stále je hlavní příčinou zanedbání objevení prvních charakteristických projevů těchto chorob. Vede to pak buď k pozdní aplikaci příslušných opatření, anebo k mylnému určení a použití chybných postupů. V důsledku takového zanedbání došlo a dále dochází ke značným ekonomickým ztrátám, které se v jednotlivých zemědělských provozech pohybují okolo stovek tisíc korun. V celosvětovém měřítku způsobují patogeny rodu *Phytophthora* ztráty dosahující mnoha bilionů dolarů (Mrázková et al. 2011).



Obr. 1. Příklad životního cyklu hub rodu *Phytophthora*. Upraveno dle:
<http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html>

3.3.1 Příznaky napadení patogeny rodu *Phytophthora*

Projevy prvních na pohled znatelných příznaků napadení druhu rodu *Phytophthora*, kterými může být vadnutí nebo odlistění, mohou nastat i po několika měsících od nákazy. Tyto symptomy mohou být snadno zaměněny s napadením jinými patogeny nebo s abiotickými poruchami. Obecné projevy napadení jsou společné pro více různých druhů a nejčastěji se projevují poškozením nadzemních částí, kdy dochází ke žloutnutí, vadnutí, zmenšování listů, chřadnutí a následnému odumírání napadených rostlin, které bývá zapříčiněno hnilobou kořenů a kořenových krčků. Mění se barva kořenů na rezavou až hnědou a redukuje se jejich rozvětvení (Mrázková et al. 2011). Některé druhy napadají pouze kořeny rostlin a způsobují jejich těžkou hnilobu, přičemž se na nadzemních částech projevují sekundární příznaky, kterými může být chloróza listů či degradace koruny u stromů. Nicméně například u druhu *P. palmivora*, dochází přímo k napadení listů či plodů (Ali et al. 2017). Napadení listů by na rostlinu nemělo mít závažný dopad, pokud se příliš nerozšíří, neboť rostlina má schopnost listy regenerovat. Viditelné zbarvení infikovaných buněk je důsledek difuze polyfenolů buněk parenchymu, což slouží jako obranná reakce hostitele, stejně jako uvolňování tmavé tekutiny z porušené kůry. To je další z viditelných příznaků infekce tímto patogenem a nazývá se krvácení (Portz et al. 2011).

3.4 Identifikace fytopatogenů

Spolehlivá, jednoduchá a včasná identifikace fytopatogenů je rozhodujícím faktorem pro efektivní léčbu chorob. Včasné rozpoznání původce choroby může pomoci minimalizovat riziko nákazy a také její rozšíření. Diagnostika za využití klasických technik mnohdy bývá časově náročná a komplikovaná, zvláště při analýze komplexních biologických vzorků. Mezi hlavní požadavky vztahující se na moderní metody tedy spadá jejich robustnost, snadná manipulace se vzorky, nízké náklady, rychlost a také výkonnost (Demirev & Fenselau 2008).

3.4.1 Morfologické metody

Nejběžnější metodou, která umožňuje detekci fytopatogenů, je jejich izolace z napadené rostliny a následná kultivace na vhodných selekčních mediích. Mnohé druhy je možné identifikovat na základě taxonomického klíče, nicméně tuto metodu nelze spolehlivě použít pro všechny doposud známé druhy, protože morfologické rozdíly mezi druhy nemusí být vždy viditelné (Miles et al. 2017).

3.4.2 Molekulárně biologické metody

Současně diagnostika patogenů rostlin pomocí molekulárně biologických metod zahrnuje například imunologické metody, technologii DNA/RNA sondy, PCR („polymerase chain reaction“). Tyto metody mají ve srovnání s konvenčními diagnostickými metodami řadu výhod, jako je například vyšší přesnost, rychlost, a také to, že nevyžadují zkušenost fytopatologa.

Imunologické metody jsou založené na rozeznání specifických antigenů na povrchu patogenů pomocí protilátek. Tyto metody ovšem fungují pouze na úrovni rodů a je u nich obtížné a také cenově nákladné vytvořit specifické protilátky. Velkou výhodou technik využívajících DNA/RNA sondy nebo PCR je jejich vysoká specifičnost. Mohou rozlišit velmi odlišné druhy houbových organismů, ale i druhy příbuzné. Mimo jiné se využívají k určení specifických genetických vlastností, například, zda je fytopatogen citlivý či resistantní k určitému fungicidu (McCartney et al. 2003).

3.4.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) splňuje většinu z výše uvedených požadavků pro efektivní identifikační metodu. Je to analytický nástroj založený na měření poměrů hmotnosti a náboje iontů (m/z) za účelem stanovení jejich molekulové hmotnosti. Tento proces zahrnuje tři kroky: přeměnu molekul na ionty plynné fáze ionizačním zdrojem, rozdělení iontů v analyzátoru pomocí elektromagnetického pole na základě m/z a následné detekci separovaných iontů. V některých konfiguracích je možné provádět i tandemové MS analýzy (MS/MS nebo MS^2). V režimu MS/MS přístroj využívá první hmotnostní analyzátor pro výběr iontů pouze v určitém rozsahu m/z , které jsou následně poslány do kolizní cely, kde dochází ke kolizím s molekulami inertního plynu (např. dusík, argon), což způsobí jejich fragmentaci. Fragmentované ionty jsou pak analyzovány v hmotnostním analyzátoru druhého stupně, který tak může poskytnout informace o strukturních vlastnostech původního iontu (Girolamo et al. 2013). Tato analytická metoda může poskytnout klíčové informace o chemických látkách včetně jejich struktury, čistoty a složení, tudíž je rutinně používána v průmyslu i ve výzkumu pro různé účely. Dnes je zcela nenahraditelnou metodou při zjišťování kvality produktů potravinářství, farmacie nebo v zemědělství či vodárenství. Vedle stanovení přesných molekulových hmotností, určení sekvence nebo struktury látek, je využitelná i pro identifikaci mikroorganismů (Feng et al. 2008). Vzhledem k tomu, že MS analýzy jsou zřídka prováděny na homogenních vzorcích, vyžaduje studium komplexních směsí předchozí purifikační kroky. Proto jsou hmotnostní spektrometry spojeny s různými separačními zařízeními jako je kapilární elektroforéza (CE), plynový (GC) nebo kapalinový chromatograf (LC) (např. CE-MS, GC-MS a LC-MS) (Girolamo et al. 2013).

Doposud nejrozšířenější ionizační technikou využívanou pro analýzu intaktních mikroorganismů je MALDI („matrix assisted laser desorption ionization“). Ve spojení s průletovými analyzátorů doby letu (TOF, „Time of flight“), se dá na tomto přístroji dosáhnout širokého rozmezí hodnot m/z (Demirev & Fenselau 2008). Vzhledem k velmi dobrým výsledkům a získaným zkušenostem při identifikaci bakterií byla MALDI-TOF MS použita také pro identifikaci mikroskopických hub a podobných organismů. Avšak buňky bakterií se od houbových organismů liší velikostí a vyšší pevností buněčné stěny. Ta obsahuje v případě hub převážně glukany a chitin nebo glukany a celulosu u oomycet či mannoproteiny v případě kvasinek (Carlile et al. 2001).

3.4.4 MALDI biotyping

Biotypizace prostřednictvím laserové desorpční ionizace pomocí matrice (MALDI) je založena na jedinečných ribosomálních proteinových profilech odpovídajících referenční databázi a následné identifikaci příslušných organismů. Výsledný fingerprinting těchto universálně rozšířených a bohatě zastoupených proteinů je vysoce reprodukovatelný a většinou nezávislý na kultivačním médiu, teplotě inkubace a stavu růstu. MALDI biotypizace získala v posledních letech velkou popularitu pro svou rychlost, jednoduchou manipulaci a efektivitu nákladů. Konvenční metody, které hodnotí fenotypové rysy založené na biochemických reakcích, reakci antigen-protilátka, barvení Gramem, morfologii kolonií nebo nárůst vzorku jsou často časově náročné a drahé. V současné době je míra identifikace pomocí metody klinických izolátů na úrovni druhů 79,9 % až 93,6 % a rodu 94,5 % až 97,2 % (Gekenidis et al. 2014).

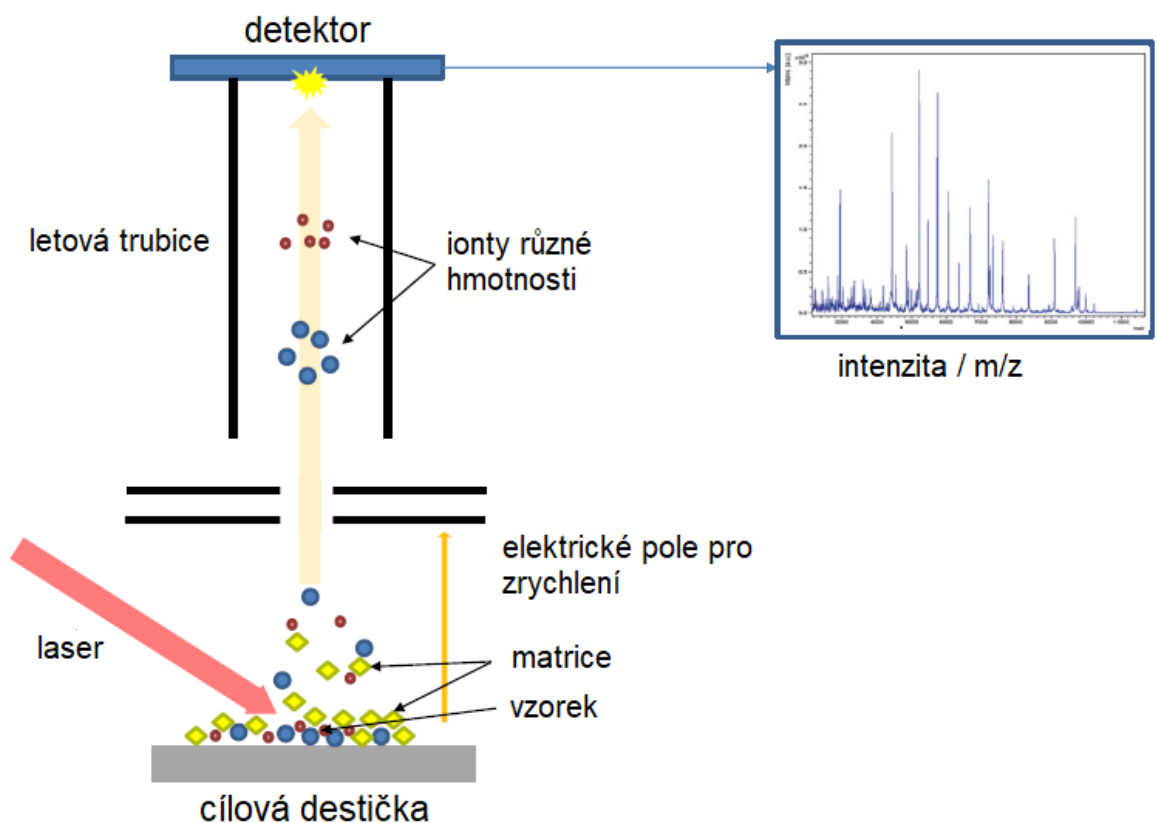
3.5 Princip ochrany před patogeny

Ochrana před patogeny rodu *Phytophthora* je velmi složitá a liší se v závislosti na druhu patogenu, hostitele, a také na typu porostů a výsadeb. Proto nelze využít jednoho univerzálního postupu ochrany, nicméně některé obecné principy je možné v praxi uplatnit. Vzhledem k závažnosti a nebezpečnosti chorob je zásadní dbát na prevenci. Mezi základní preventivní opatření patří karanténní doba pro nově dovezené rostliny před umístěním do vlastních kultur, používání zdravého materiálu, propařených či jinak sterilizovaných substrátů, filtrované závlahové vody, dodržování hygieny práce, odpovídající pěstební technologie a další, jako například pravidelné prohlídky pěstebních ploch. Napadené rostliny je třeba ihned zlikvidovat, aby se nákaza nešířila. Jakmile již k rozšíření choroby dojde, je nutná včasná a přesná identifikace patogenu, způsobu jeho zavlečení, šíření a v závislosti na zjištěných faktech pak výběr a aplikace dalších opatření. Mezi ty patří například výměna substrátu nebo fumigace, výměna, či sterilizace rohoží, desinfekce pomůcek, změna pěstebních podmínek, sortimentu a jeho případná rotace. Lze použít přípravky na bázi metalaxylu, fosatylu-A1, propamokarbu nebo dimetomorfu. U nás se využívá především přípravků kombinovaných, které jsou na bázi propamokarbu a metalaxylu. V případě nejistoty ohledně identifikace je vhodné použití právě těch kombinovaných. Z důvodu vytváření odolnosti patogenů vůči účinným látkám se doporučuje střídání přípravků (Mrázková et al. 2011).

3.6 MALDI – TOF MS

3.6.1 Princip

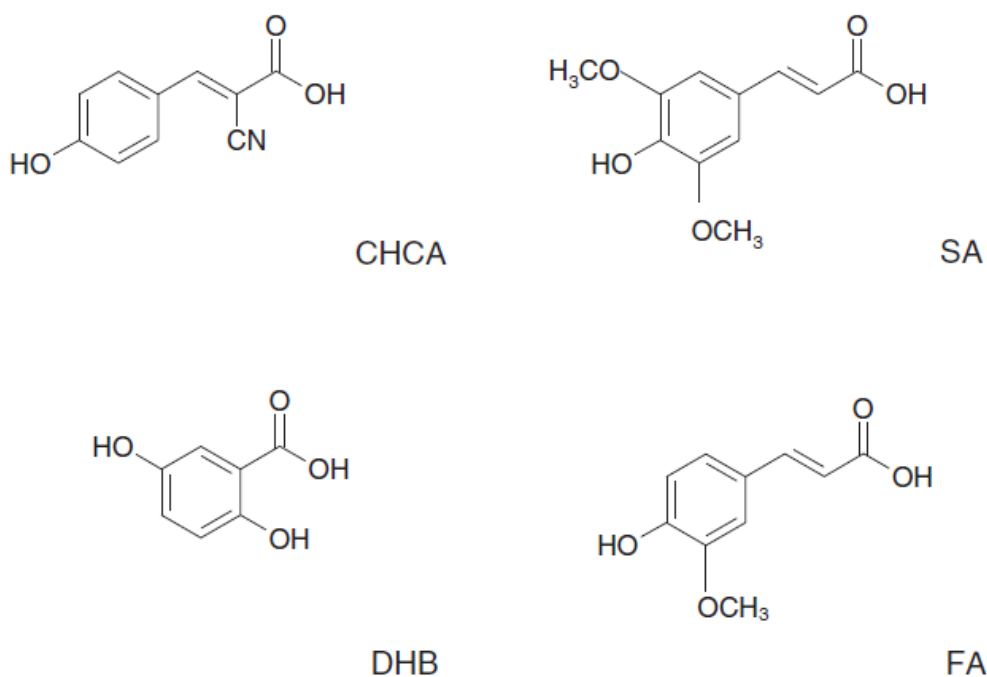
Obecný princip (viz Obr. 2) analýzy ionizovaných mikrobiologických izolátů a klinického materiálu se sestává z několika důležitých kroků. Jakmile se vhodně zpracované vzorky nanesou na kovovou destičku, překryjí matricí a vysuší, je vzorek ozařován laserovými pulsy. Toto ostřelování vede k sublimaci a ionizaci matrice a následně i vzorku. Generované ionty jsou rozděleny na základě poměru hmotnosti k náboji v letové trubici a spektrální zobrazení těchto iontů je generováno a analyzováno softwarem, který zobrazí hmotnostní profil (Clark et al. 2013).



Obr. 2. Zjednodušené schéma MALDI-TOF. Upraveno dle (Wieser & Schubert 2016)

3.6.2 Matrice

Výběr správné matrice je klíčovým faktorem pro analýzy založené na MALDI. Pro UV lasery jsou vhodnou matricí především aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové, rozpuštěné ve vodném roztoku acetonitrilu, etanolu nebo metanolu. Roztok je často ještě okyselován kyselinou trifluoroctovou. Nejpoužívanějšími matricemi jsou kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Jednotlivé matrice se liší krystalizací a ionizací různých typů analytů. Jako univerzální matrice první volby se používá DHB, která je vhodná pro stanovení vysokomolekulárních látek, dobře ionizuje sacharidy, nukleové kyseliny, peptidy, proteiny i lipidy (van den Boom et al. 2013).



Obr. 3. Chemické vzorce nejpoužívanějších matric. Upraveno dle (Chalupová et al. 2012)

3.6.3 Zdroj ionizace

Krystalická směs vzorku a matrice, která je na povrchu kovové destičky, je ozařována pomocí laserového paprsku. K ozařování dochází krátce, aby se zabránilo poškození nebo degradaci přehřátím vzorku zachyceného v matrici.

První krok ionizačního mechanismu zahrnuje multifotonovou ionizaci molekuly matrice za vzniku radikálového kationtu (Clark et al. 2013). Stručně řečeno, fotony vyzářené laserem působí na analyzovanou směs matrice a vzorku, a tím se vystřelí elektron z molekuly matricového materiálu, čímž se vytvoří její radikálový kationt. Pro tuto reakci jsou zapotřebí dva fotony, aby došlo k absorpci v požadovaném čase. Laserový paprsek je zaostřen na malé místo na krystalickém povrchu matricového vzorku (typický průměr 0,05 až 0,2 mm). V laserové optice je používán zeslabovač paprsku pro nastavení ozáření (definovaný jako intenzita na jednotku povrchu). Tento útlum laseru může být individuálně nastaven pro každé měření v závislosti na typu vzorku. Obvykle je však standardizován výrobcem pro rutinní aplikace. Interakce mezi fotony a molekulami matrice způsobené absorpcí energie z paprsku spouští sublimaci matrice do plynné fáze, po které následuje ionizace. V experimentech MALDI se používají vlnové délky laseru v rozsahu od UV do infračerveného záření. Nejčastěji se používají UV lasery, které zahrnují lasery dusíkaté (337 nm), excimerové lasery a Nd: YAG, kde je materiálem izotropní krystal yttrito-hlinitého granátu dopovaný ionty neodymu (355 nm). Novějšími a poněkud dražšími jsou infračervené lasery, jako jsou erbiem dopované lasery z yttrito-hlinitého granátu (Er: YAG) (2,94 μm) a transverzálně excitované atmosférické (TEA- CO_2) lasery (10,6 μm) (Clark et al. 2013).

3.6.4 TOF analyzátor

Základní princip TOF analyzátoru spočívá, jak již bylo řečeno, v extrakci iontů a měření doby jejich letu. Ionty se za pomoci vložení napětí na extrakční mřížku urychlí neboli extrahují elektrickým polem a získají tak rychlost v závislosti na jejich hmotnosti (m) a velikosti náboje (z) – m/z . Kinetická energie, kterou takto získaly, je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je tedy rozdíl v rychlosti iontů s různým poměrem m/z , které dopadnou na detektor v rozdílném čase za předpokladu, že urazí stejnou vzdálenost (DeMarco & Ford 2013, van den Boom et al. 2013).

3.6.5 Detektor

Funkcí detektoru je záznam počtu dopadajících iontů, převod této informace na elektrický signál a jeho zesílení. Mezi základní typy detektorů patří elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova klec (van den Boom et al. 2013). Pro hmotnostní spektrometry založené na analyzátoru TOF se nejčastěji využívá mikrokanálový detektor (MCP), který

obsahuje několik stovek elektronových násobičů orientovaných paralelně, které jsou pokryté polovodičem, přičemž každý kanálek působí jako samostatný násobič elektrického proudu (Jagutzki et al. 2002). Dalším typem elektronového detektoru je systém diskretních dynod, kdy iont dopadá na povrch dynody, následně vyrazí elektrony, které jsou pak dalšími kolizemi zesíleny až 10^8 krát. Princip fotonásobiče také spočívá v dopadu iontu na dynodu a následném uvolnění elektronů, které však dále dopadají na fosforovou destičku. Tam jejich dopad způsobí emisi fotonů a následné zesílení signálu probíhá obdobně jako u elektronového násobiče (Koppelaar et al. 2005). Pro MALDI-TOF lze využít i iontový detektor na bázi křemíkové nanomembránové technologie. Princip nanomembránového detektoru je založen na asistované emisi pole z křemíkových nanomembrán, ve které dopadající elektronové shluky excitují do vyšších energetických stavů (Park & Blick 2013).

3.6.6 Současně dostupné komerční platformy k MALDI-TOF MS identifikaci

Patel (2013) uvádí, že pro MALDI-TOF MS identifikaci bakterií a kvasinek je k dispozici několik platforem od řady dobře zavedených komerčních výrobců. Spektrální databáze jsou často uváděny na trh jako součást proprietárního systému, na rozdíl od veřejně přístupné otevřené platformy jsou konstruovány a udržovány jejich reprezentativními výrobci. Většina těchto databází může být rozšířena tak, aby vyhovovala spektrálním položkám, které nejsou zahrnuty v obchodních verzích. Schopnost přidávat spektra a vytvářet vlastní databáze je důležitá pro další diskriminační analýzu pomocí MALDI-TOF MS, včetně typování kmene a epidemiologických vyšetření. Protože každý proprietární systém používá vlastní algoritmy, databáze, software a interpretační kritéria pro mikrobiální identifikaci, nejsou číselné údaje (tj. spektrální skóre) z různých komerčních systémů přímo srovnatelné.

Mezi současně nejvíce využívané platformy patří Andromas. Software rozděluje záznamy do tří samostatných databází určených pro identifikaci tří kategorií mikroorganismů: bakterií, mykobakterií, kvasinek spolu s *Aspergillus* spp. Při konstrukci byla tato databáze tvořena spektry generovanými pouze ionizací, tedy přímým nanesením mikroorganismu na MALDI destičku bez předchozí extrakce (Patel 2013). Lacroix et al. (2014) také uvádí, že jmenovitě systémy Andromas a Bruker Biotyper používají odlišné protokoly pro přípravu vzorků, a to pro kvasinky. Počáteční extrakční krok pro tyto mikroorganismy, který je časově náročnější, je pro protokol Biotyper nezbytný. Při použití systému Andromas TM se lýza kvasinkových buněk provádí přímo na ocelové desce.

Tento rozdíl v extrakčních krocích obou systémů by mohl zjevně ovlivnit rychlost identifikace v rutinní laboratorní praxi. Recentní studie však uvádějí, že spektra získaná lýzou přímo na MALDI destičce systémem Bruker mohou být pro identifikaci kvasinek vhodnější (Lacroix et al. 2014).

Dalšími systémy pro identifikaci mikroorganismů jsou SARAMIS a z něj vycházející VITEK MS. BioMérieux VITEK MS spolu s Bruker Biotyper MALDI-TOF MS jsou komerčně dostupné pro identifikaci mikroorganismů v klinické mikrobiologické laboratoři. Několik studií hodnotilo současně výkon více systémů MALDI-TOF MS a uvedlo, že jsou srovnatelné pro identifikaci různých aerobních a anaerobních bakterií, stejně tak kvasinek. Závěry studie TeKippe & Burnham (2014) ukazují, že Bruker Biotyper a VITEK MS pracují srovnatelně pro identifikaci neobvyklých anebo obtížně identifikovatelných bakteriálních izolátů. Jedná se o první studii porovnávající schopnost dvou komerčně dostupných systémů MALDI-TOF MS identifikovat nejobtížněji rozlišitelné organismy, které se vyskytují v klinické mikrobiologické praxi. V rámci uvedené studie však nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtu identifikovaných, neidentifikovaných nebo chybně identifikovaných organismů systémy VITEK MS a Bruker Biotyper MALDI-TOF MS.

Podrobněji se pak budeme dále věnovat především systému Bruker Biotyper, který byl k výzkumu využit.

3.7 Biotyper

Systém Biotyper byl koncipován a uveden na trh výhradně společností Bruker Daltonics a je schopen analyzovat vzorky včetně bakteriálních, mykobakteriálních a houbových, získaných přímo z pozitivních kultur. Ze všech softwarů používaných pro hmotnostní spektrální analýzu je platforma Biotyper zřejmě nejčastěji využívaný softwarový balíček ve Spojených státech. Software je prodáván jako všestranný nástroj pro klinickou mikrobiologii. Stejně jako ostatní softwarové systémy, je Biotyper částečně otevřená platforma, která umožňuje uživateli vlastní rozšiřování databáze uložených spekter pomocí nástrojů obsažených v softwaru (MALDI Biotyper CA Systém 2014). Získaný hmotnostní profil je při datové analýze porovnáván s databází referenčních MS spekter a je přiřazen buď identickým, nebo nejvíce příbuzným spektrům obsaženým v databázi, přičemž je hodnocena míra shody naměřeného spektra a nejpodobnějšího spektra v databázi (Clark et al. 2013).

Hmotnostní spektra jsou generována a data jsou analyzována s ohledem na frekvenci, polohu a intenzitu čárového spektra. Uživatel má možnost vytvářet nová databázová spektra pomocí softwaru a rozšířit databázi o další izolované mikroorganismy. Při tvorbě databáze v MALDI Biotyperu je nejprve předběžně zpracováno neznámé surové spektrum a převedeno na seznam hromadných píků a jejich odpovídající intenzity, pro vytvoření referenčních hmotnostních spekter. Dále je seznam neznámého seskupení píků porovnán s referenčním seznamem píků referenčních hmotností spektra a pro každou MSP (referenční profil spekter) databáze je generována hodnota skóre. Čím vyšší je hodnota log skóre, tím vyšší je pravděpodobnost, že neznámé spektrum patří stejnému rodu a/nebo druhu jako referenční hmotnostní spektra s nejvyšší hodnotou log skóre (Cassagne et al. 2016).

Pro analýzu výsledků při vyhledávání ve spektrální databázi se používají dvě odlišná kritéria: hodnota log skóre a kategorie konzistence. Hodnoty log skóre se pohybují v rozmezí od 0,000 do 3,000 a jsou porovnávány s daty uložených rodů a druhů v databázi. Skóre, které se pohybuje od 2,300 do 3,000, je softwarem interpretováno jako vysoce pravděpodobná identifikace druhu. Log skóre mezi 2,000 a 2,299 představují bezpečné identifikace rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu. V obou případech jsou výsledky podle testovacích algoritmů prováděných v praxi při testování obvykle považovány za pozitivní identifikaci. Log skóre v rozmezí od 1,700 do 1,999 představují pravděpodobnou identifikaci rodu, přičemž je zapotřebí další testování pro pozitivní a reportovatelnou identifikaci. Pro log skóre menší než 1,699 se identifikace nepovažuje za spolehlivou a získaná data nelze ztotožnit s žádným organismem obsaženým v dané databázi (MALDI Biotyper CA Systém 2014).

3.8 Analýza fungálních fytopatogenů pomocí MALDI – TOF MS

Chalupová et al. (2012) provedli vývoj a vyhodnocení metodiky MALDI-TOF MS houbových a jim podobných patogenů představujících důležité biotrofní parazity plodin. Většina typických fytopatogenů patří ke dvěma poměrně vzdáleným taxonomickým skupinám: říši *Chromista*, třídě *Oomycota*, řádu *Peronosporales*, nebo prachovitým plísním třídy *Leotiomyces*, řádu *Erysiphales*. Experimentální přístupy pro analýzy MS byly zpracované s *Bremia lactucae*, která je příčinou plísní hlávkového salátu a *Oidium neolycopersici*, způsobující padlí rajčete.

Skupina vláknitých hub z rodu *Monilinia*, které představují významné patogeny zodpovědné za velké ztráty při produkci ovoce, byla analyzována kapilární elektroforézou, izoelektrickou fokusací, polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a MALDI-TOF MS s cílem zhodnotit použitelnost těchto metod pro identifikaci izolátů získaných z nakažených plodů (Horká et al. 2012). Vysoké rozlišení a diskriminační síla MALDI-TOF MS usnadnila diferenciaci úzce příbuzných druhů nebo dokonce různých kmenů stejných druhů hub (SA byla použita jako matrice). Avšak při použití u infikovaných plodů byla analýza MALDI negativně ovlivněna komplexitou vzorků (zdálo se, že existují různé kmeny různých druhů hub). MALDI-TOF MS je také silným nástrojem pro identifikaci askomycetických fytopatogenních hub z rodu *Alternaria* (Brun et al. 2013).

Závěry studie Ranque et al. (2014) poukazují na to, že pomocí jednoduchého postupu umožnilo MALDI-TOF MS přesnou identifikaci komplexních řadů vláknitých hub, které jsou v současné době izolovány v klinických podmínkách, včetně běžných i nově popsaných neobvyklých druhů. Ve srovnání s klasickou identifikací MALDI-TOF MS dramaticky zlepšila identifikace laboratorních vzorků izolátů klinických forem, zejména u hub non-*Aspergillus*, kde byl zaznamenán významný nárůst z 31% na 61% správnou identifikaci.

Firma Bruker Daltonics, jejíž databáze vláknitých hub (verze MBT 6903 MSP Library) obsahuje 25 rodů a 42 druhů, doporučuje kultivaci v kapalném médiu po dobu jedné noci, následnou centrifugaci, promytí a extrakci etanolem, kyselinou mravenčí a acetonitrilem. Další databáze MS-VITEK (verze 3.0) zahrnuje 32 rodů a 81 druhů a databáze SARAMIS (verze RUO 4.13) obsahuje rozsáhlejší databázi s 45 rody a 168 druhy. Na rozdíl od uvedeného protokolu firmy Bruker, postupy firmy BioMérieux nedoporučují kultivaci v kapalném prostředí, namísto toho doporučují konvenční extrakci etanolem, kyselinou mravenčí a acetonitrilem (Siller-Ruiz et al. 2017).

Nicméně pokud obě metody porovnáme, tak bylo v rámci recentních studií s použitím metodiky doporučené firmou Bruker správně identifikováno v rámci druhů pouze 72 % izolátů a metodika s použitím VITEK (verze 3.0) 66,8 % z 318 izolátů, což nelze přičíst pouze nedostatečnému rozsahu databází. V současné době tedy identifikace vláknitých hub pomocí MALDI-TOF MS nemůže ještě zcela nahradit konvenční identifikační metodiku a je třeba metodu dále rozvíjet (Siller-Ruiz et al. 2017).

3.9 Přehled metod přípravy extraktů

Mezi nejdůležitější kroky při identifikaci houbových patogenů patří příprava vzorku, která je v případě MALDI-TOF analýzy provedena extrakcí. Je známo však několik způsobů, jakými lze extrakci houbových proteinů provést, a proto je níže uveden jejich přehledný výčet a zdůvodnění dále popisovaných metod extrakce.

První metodou je krátká rychlá extrakce houbových proteinů, kdy byly pro analýzu MALDI-TOF MS připraveny proteinové extrakty z kryptokokových izolátů pěstovaných na Sabouraudově dextrózovém agaru po dobu 48 hodin při 30 °C a suspendovaných v 10% mravenčí kyselině. Jeden μl směsi byl nanesen na leštěnou ocelovou destičku, sušen na vzduchu a překryt 1 μl absolutního etanolu. Po dehydrataci 1 μl a přidání nasyceného roztoku kyseliny kyano-4-hydroxyskořicové v 50% koncentraci byl přidán acetonitril-2,5% kyselina trifluoroctová a vzorek byl ponechán krystalizovat při pokojové teplotě (Posteraro et al. 2012)

Další typ extrakce byl vyvinut pro rozšíření klinicky komplexní databáze a zároveň vývoj jednoduchého postupu pro identifikaci plísní z pevných médií. V tomto případě byl pro extrakci bílkovin pro MALDI-TOF MS z kultivačního média vyříznut malý bloček kultury (5 mm v průměru) a umístěn do zkumavky Eppendorf se šroubovacím uzávěrem o objemu 1,5 ml obsahující 250 μl 100% etanolu a 50 μl silikagelu se skleněnými kuličkami o průměru 0,1 mm. Vzorek byl homogenizován do suspenze pomocí sterilní dřevěné tyčinky a pak 15 minut míchán při maximální rychlosti. Každá zkumavka byla centrifugována při 9447 otáčkách/min po dobu 2 min a etanol byl odstraněn za použití sterilní transferové pipety s jemným hrotem. Sediment byl resuspendován v 50 μl 70% kyseliny mravenčí a vortexován 5 minut. Po krátké centrifugaci pro odstranění veškerého zbytkového obsahu z víčka bylo přidáno 50 μl acetonitrilu a zkumavka byla znovu protřepána (5 minut) a centrifugována při 9447 otáčkách/min po dobu 2 min. Supernatant byl buď okamžitě hodnocen pomocí MALDI-TOF MS nebo byl skladován při teplotě -20 °C až do testování (během 1 týdne po jeho extrahování). Jako pozitivní kontrola kvality byl pro každý pokus použit *Aspergillus ustus* (CBS 261.67T) (Lau et al. 2013).

Třetím postupem byla příprava vzorků hlívy ústřičné (*Pleurotus pulmonarius*) spojená s následnou frakcionací. Plodnice byly nejprve rozkrájeny na malé kousky a zmrazeny při -20 °C. Lyofilizované sušené houbové plodnice byly poté rozemlety na jemný prášek

a vzorky byly před extrakcí uchovávány v suché nádobě při pokojové teplotě. Práškový lyofilizát (30 g) byl zvážen a namočen v 300 ml destilované vody (poměr 1:10).

Směs byla potom homogenizována a homogenát byl oddělen filtrací za použití vakua. Filtrát byl zachycen a centrifugován rychlostí 5000 otáček/min při teplotě 4 °C. Supernatant byl pak uložen při -20 °C. Obsah bílkovin byl odhadnut pomocí BCA Protein Assay Kit (Pierce). Série proteinových frakcí byla získána v podobě vodných extraktů pomocí nasyceného síranu amonného ((NH₄)₂SO₄), který byl pomalu přidáván za kontinuálního míchání. Roztok byl potom centrifugován při 10000 otáček/min po dobu 30 minut (4 °C). Protein byl izolován resuspendováním sraženiny v 1 ml destilované vody a poté dialyzován za použití potahované dialyzační hadičky SnakeSkin, pro udržení molekulové hmotnosti více než 3500 Da. Dialyzační proces byl prováděn při 4 °C po dobu 48 hodin, přičemž byla 4krát vyměněna destilovaná voda. Dialyzát byl poté lyofilizován, skladován při -20 °C a označován jako frakce ((NH₄)₂SO₄) proteinu (F10-F100) (Wahab et al. 2014).

K rychlé a přesné identifikaci klinicky relevantních druhů *Aspergillus* byl použit další postup extrakce. Kmeny byly pěstovány na Sabouraudově dextrózovém agaru (SDA) s chloramfenikolem a gentamicinem při teplotě 30 °C a denně bylo kontrolováno zrání (dostatečná sporulace a vývoj mycelií). Povrchový materiál, (směs spor, konidií a mycelií) byl jemně sejmuto z povrchu kolonie a smíchán v 1 µl čisté vody, která byla nanášena na MALDI destičku. Tato směs byla ponechána při pokojové teplotě zaschnout. Na každý spot byl přidán 1 µl absolutního etanolu a směs byla znovu vysušena. Byl přidán 1 µl roztoku matrice (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 80 mg / ml, 30% acetonitril, 0,1% kyselina trifluoroctová), načež byl takto připravený vzorek nechán krystalizovat. Pro ověření kalibrace byla použita interní kontrola s *Pseudomonas aeruginosa*. Vzorky byly identifikovány spektrometrem MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker Daltonics). Pozitivní ionty byly extrahovány s akceleračním napětím 20 kV v lineárním režimu. Analýza byla provedena softwarem Flex analysis (Alanio et al. 2011).

Pro extrakci hub je možné použít i kyselinu mravenčí, což je v následujícím pátém postupu popsáno několika způsoby. Vzorky houbových kultur byly smíchány s 300 ml sterilní vody a 900 ml bezvodého etanolu ve sterilní 1,5 ml zkumavce. Po 10 minutách centrifugace při 13 000 otáčkách/min byl sediment inkubován 5 minut v 10 ml 70%. Potom bylo přidáno 10 ml 100% acetonitrilu po dobu 10 minut inkubace před centrifugací (13 000 otáček, 2 minuty) a supernatant byl odstraněn. Bylo testováno pět operací před předcházející metodou extrakce (Cassagne et al. 2011)

Při první z nich byly houby kultivovány na Sabouraud gentamicin-chloramfenikol agarových destičkách a inkubovány 72 hodin při 27 °C. Vzorky, tj. houby a jejich spory, byly jemně setřeny sterilní plastovou kličkou, a poté podrobeny extrakci kyselinou mravenčí, jak je popsáno výše.

Při druhém postupu byly houby kultivovány 24 hodin při 27 °C na tekutém Sabouraudově médiu. Po 10 minutách centrifugace při 13000 otáčkách/min byl sediment třikrát promýván 1 ml sterilní vody a suspendován s 300 ml HPLC sterilní vody a 900 ml bezvodého etanolu ve sterilní zkumavce o objemu 1,5 ml a podroben extrakci kyselinou mravenčí.

Třetí postup byl shodný s postupem prvním kromě toho, že suspenze houbového materiálu v ředěném etanolu byla zahřívána 1 hodinu při 95 °C před extrakcí.

Čtvrtý postup se také shodoval s prvním kromě toho, že byla hydroalkoholová suspenze houbového materiálu v ředěném etanolu byla mechanicky homogenizována třemi cykly mikro-kuliček.

Pátý postup se prakticky shodoval s předchozím až na to, že byla hydroalkoholová suspenze houbového materiálu zahřívána po dobu 1 hodiny při 95 °C před mechanickou homogenizací, jak je popsáno výše (Cassagne et al. 2011)

Poslední zde zmíněnou metodou přípravy vzorků hub je extrakce pomocí směsi kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Přibližně 5 mm³ části klobouku nebo stopky bylo rozříznuto chirurgickou čepelí a bílkoviny byly extrahovány ve 400 ml směsi mravenčí kyseliny a acetonitrilu (1:1), ve které byly skleněné kuličky, 300 mg o průměru 0,1 mm společně se 2 kusy o průměru 5 mm ve 2 ml těsnící zkumavce. Vzorek byl homogenizován při 2000 rpm po dobu 3 min za stálého třepání a poté centrifugován (20000 otáček, 2 minuty). Část supernatantu (přibližně 50 ml) byla přenesena do nové zkumavky a analyzována týž den, kdy byla připravena (Sugawara et al. 2016).

4 Metodika

V rámci práce byla testována aplikovatelnost metody MALDI biotypingu na vláknité oomycety, způsobující problémy v rostlinné zemědělské produkci. Tato metoda je založena na porovnávání profilových hmotnostních spekter vzorků získaných pomocí MALDI-TOF MS se spektry uloženými ve specifické databázi (knihovně spekter) naměřenými identickým způsobem. Diplomová práce byla také zaměřena na vytvoření standardizované metody přípravy extraktů identifikovaného materiálu a následného vytvoření knihovny spekter houbových patogenů, které nebyly dosud tímto způsobem zpracovány.

4.1 Materiál

4.1.1 Použitý biologický materiál

Celkem bylo analyzováno vzorků 43 různých druhů a kmenů vláknitých hub z rodu *Phytophthora* ve třech sadách, získaných z odlišných zdrojů. Izolace, genetická identifikace a kultivace vzorků probíhala ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i. (VÚKOZ), pod vedením doktora Karla Černého. Druhy byly náhodně vybrány z veřejné sbírky, kdy byl každý vzorek odebrán z určité lokace, v různém stádiu, čase a z různých hostitelů. Následně bylo provedena morfologická identifikace a určení na základě DNA. Pro tuto práci byly vzorky z tekutého živného media převedeny do 70% etanolu a uchovávány ve zkumavkách typu Eppendorf v roztoku etanolu při -20 °C. Přehled druhů včetně jejich sbírkových čísel je uveden v tabulce 1.

Tab. 1. Přehled testovaných druhů rodu *Phytophthora*

Číslo ze sbírky	1. sada Jméno druhu	Číslo ze sbírky	2. sada Jméno druhu	Číslo ze sbírky	3. sada Jméno druhu
385/10	<i>Phytophthora lacustris</i>	754/15	<i>Phytophthora ramorum</i>	617/12	<i>Phytophthora megasperma</i>
366/09	<i>Phytophthora multivora</i>	635/13	<i>Phytophthora citrophthora</i>	831/17	<i>Phytophthora taxon Walnut</i>
419/10	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	531/11	<i>Phytophthora hedraiaandra</i>	734/14	<i>Phytophthora rubi</i>
239/08	<i>Phytophthora alni uniformis</i>	483/11	<i>Phytophthora taxon Raspberry</i>	673/13	<i>Phytophthora gregata</i>
256/09	<i>Phytophthora plurivora</i>	544/11	<i>Phytophthora rosacearum</i>	890/17	<i>Pythium folliculosum</i>
286/09	<i>Phytophthora cambivora</i>	578/12	<i>Phytophthora hedraiaandra</i>	772/15	<i>Phytophthora pseudosyringae</i>
393/10	<i>Phytophthora cambivora</i>	518/11	<i>Phytophthora taxon Walnut</i>	846/17	<i>Phytophthora cryptogea</i>
534/11	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	851/17	<i>Phytophthora cactorum</i>	865/17	<i>Phytophthora gregata</i>
408/10	<i>Phytophthora gonapodyides</i>	345/09	<i>Phytophthora ramorum</i>	620/12	<i>Phytophthora syringae</i>
361/09	<i>Phytophthora lacustris</i>	456/11	<i>Phytophthora cf. Kelmania</i>	806/16	<i>Phytophthora chlamydospora x amnicola</i>
242/08	<i>Phytophthora multivora</i>	778/15	<i>Phytophthora megasperma</i>	803/16	<i>Phytophthora chlamydospora x amnicola</i>
240/08	<i>Phytophthora alni alni</i>	766/15	<i>Phytophthora polonica</i>	812/16	<i>Phytophthora cryptogea</i>
453/11	<i>Phytophthora palmivora</i>	862/17	<i>Phytophthora cactorum</i>	829/17	<i>Phytophthora rosacearum</i>
382/10	<i>Phytophthora cinnamomi</i>				
398/10	<i>Phytophthora lacustris</i>				
295/09	<i>Phytophthora lacustris</i>				
299/09	<i>Phytophthora alni uniformis</i>				

4.1.2 Chemikálie pro izolaci a kultivaci

PARPHN: 100 ml džusu V8 (Campbell Grocery Products Ltd., Norfolk, Anglie), 3 g CaCO₃, 200 mg ampicilinu, 10 mg rifampicinu, 25 mg pentachlornitrobenzen (PCNB), 50 mg nystatinu a 50 mg hymexazolu na 1 l deionizované vody

Caso – Bouillon, Carl Roth, Art. – Nr. X938.2

Sterilní a ultrasterilní H₂O

99,8% etanol

4.1.3 Izolace a kultivace

Při odběru vzorku je velmi důležité roční období. V případě patogenů rodu *Phytophthora* je ideální doba pro identifikaci a izolaci od května do listopadu. Pro odběr se využívají 2 způsoby, buď přímo z rostlinných pletiv, které však musí být aktivní, nebo z kořenů. Druhá metoda je takzvaná metoda lapacích listů. Ve VÚKOZu se k izolaci těchto patogenů využívá rododendronu, který je citlivý na jejich výskyt a tvoří se na něm mikrotické léze. Tyto léze se následně vystříhnou, vysterilují etanolem, vysuší a nechají se 3 až 7 dní v závislosti na druhu růst na vhodném médiu. Nejčastěji užívaným a univerzálním médiem je PARPHN, který je tvořen z agaru V8, což je džus z 8 druhů zeleniny, uhličitanu vápenatého a z 5 druhů antibiotik. Antibiotika jsou při kultivaci velmi důležitá, jelikož zabraňují kontaminaci, která způsobuje potíže při následné identifikaci. Pro mikroskopování a morfologii se využívají CA neboli mrkvové agary, které jsou průhledné na rozdíl od V8, která je sytě oranžové barvy. Dále se pak využívají i ovesné, kukuřičné nebo bramborové agary. Jejich příprava není náročná a nákladná. Důležité je dodržovat teplotu maximálně 45 °C, aby nedošlo k poškození vzorků a zároveň bylo při očkování médium dostatečně tekuté. Pro získání vzorků pro tuto práci bylo zapotřebí kultivace narostlého mycelia ve výživném bujónu. Nejprve se odebere malý kousek mycelia do lahví s výživným bujónem, s použitím sterilní vody a nechá se třepat 5 dní na třepačce. Poté se odpipetuje tekutina, přidá se 900 µl sterilní H₂O a 5 minut se vortexuje. Znovu se odpipetuje tekutina a přidá se 300 µl ultra čisté H₂O, 900 µl 99,8% etanolu, nechá se vortexovat a může se takto uskladnit při -20 °C nebo s nimi nadále pracovat. Je velmi důležité dodržovat při práci sterilní podmínky kvůli náchylnosti na kontaminaci. Oomycety se dají dlouhodobě uchovávat, a to na již zmíněných ovesných agarových médiích, jejichž základem je pouze ovesná mouka, agar a voda.

4.2 MALDI-TOF analýza

4.2.1 Chemikálie pro kalibraci a přípravu vzorku

Acetonitril, Honeywell

99% Trifluoroctová kyselina, Sigma-Aldrich

Bruker Bacterial Test Standard, Part No. 8255343, Bruker

MALDI matrice, α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA), Sigma-Aldrich

Etanol 96%, Lach-Ner, s. r. o.

Kyselina mravenčí, Acros organics

Ultra čistá voda, systém Mili-Q

4.2.2 Přístrojové a další vybavení

MALDI-TOF Autoflex speed, Bruker

Scout MTP destička

Centrifuga Universal 320 R, Hettich zentrifugen

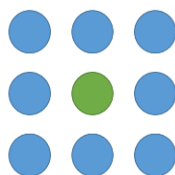
Ruční homogenizátor, Pestle 1,5 ml, VWR International (47747-358)

4.2.3 Kalibrace

MALDI Biotyper k analýze využívá hmotnostní spektrometr typu MALDI-TOF, kde je doba letu přepočítána pomocí kalibračních konstant na hodnoty m/z jednotlivých iontů. Je zde však několik faktorů, které mají vliv na dobu letu a tím pádem i na kalibrační konstanty. Jsou to zejména teplota, stabilita zdrojů, které generují napětí v přístroji a další. K co nejpřesnější identifikaci je tedy důležité mít co nejpřesnější kalibraci metody.

Součástí každého měření byly proto využívány kalibrační spoty. Kalibrační roztok byl připraven z roztoku acetonitrilu, destilované vody a 99% trifluoroctové kyseliny (50:47,5:2,5). V 50 μ l takto připraveného roztoku byl rozpuštěn Bruker Bacterial Standard. Použitými chemikáliemi ke kalibraci byly tedy Bruker Bacterial Standard, MALDI matrice alfa-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (HCCA) a Organické rozpouštědlo (OR). Je důležité používat chemikálie nejvyšší čistoty určené pro hmotnostní spektrometrii.

Pro 1 ml OR je zapotřebí 500 μ l 100% acetonitrilu (AN), 475 μ l destilované vody a 25 μ l 100% trifluoroctové kyseliny (TFA). Do mikrozkušavky s HCCA matricí bylo přidáno 250 μ l OR a následně vortexováno, dokud se nerozpustily všechny krystalky matrice. Účinnost byla zkontrolována pohledem proti světlu. K Bruker Bacterial Standardu, již připravenému, bylo přidáno 50 μ l OR a pipetováním (nejméně dvacetkrát nahoru a dolů) byl pelet rozpuštěn. Je důležité se vyhnout pění roztoku. Následně se standard při laboratorní teplotě inkuboval po dobu 5 minut a poté se opakovale postup pipetování. Pokud se roztok zakalí, může se centrifugovat 1 minutu při maximálních otáčkách. Připravený roztok je možné po použití uchovat při min. -18 °C v mrazáku a opakovaně jej použít po dobu několika měsíců. Časem sice vznikají oxidační produkty, které však nemají významný vliv na kalibraci. Dle příručky Bruker (MALDI Biotyper CA Systém 2014), je doporučeno při každé analýze na jedno místo nanést *Escherichia coli*, kdy při vyšším skóre, než je 2,2 lze považovat kalibraci za dostatečnou. Při tvorbě databáze se však vždy musí kalibrovat každý měřený vzorek, a to za použití standartu na prostřední spot (Obr. 4).



Obr. 4. Kalibrační schéma

4.2.4 Příprava vzorku

Pro přípravu bylo použito několik čistých mikrozkušavek typu Eppendorf (1,5 ml), do kterých byla přenesena část z uchovávaného vzorku. Mycelium bylo rozděleno na Petriho miskách pomocí skalpelu na přibližně stejně velké kousky materiálu, což bylo podle možností 5-10 mg. K tomuto vzorku bylo přidáno 300 μ l destilované vody a důkladně promícháno. Ke směsi bylo přidáno 900 μ l etanolu a znovu promícháno. Poté bylo centrifugováno při maximálních otáčkách po dobu dvou minut. Následně byl supernatant slit a vzorek znovu krátce centrifugován. Zbytek supernatantu byl opatrně odpipetován od peletu, který se nechal následně schnout při laboratorní teplotě. Mezitím byl připraven roztok 70% kyseliny mravenčí pomocí 300 μ l destilované vody a 700 μ l 100% kyseliny mravenčí do čisté mikrozkušavky a promíchán vortexováním. K peletu byla připravená kyselina přidána v množství odpovídajícímu velikosti peletu, tak aby byl celý ponořen (20 μ l).

Bylo velmi důležité důkladně promíchat a nechat kyselinu působit po dobu 3 minut. Posledním krokem extrakce bylo přidání 100% acetonitrilu v množství odpovídajícímu objemu kyseliny mravenčí. Po důkladném promíchání byl vzorek opět centrifugován při maximálních otáčkách po dobu 2 minut a aplikován na MALDI destičku.

Na každý spot byl nanesen 1 μ l supernatantu a byl ponechán uschnout při laboratorní teplotě. Ihned po zaschnutí byl supernatant překryt stejným množstvím roztoku matrice a opět ponechán zaschnout při laboratorní teplotě. Do středového spotu byl pak nanesen připravený roztok Bruker Bacterial Standardu v množství 0,5 μ l, ve stejném pořadí nanášení na spoty byla přidána matrice. Po zaschnutí všech spotů byla destička připravena k vložení do přístroje a vlastní analýze vzorků. Každý vzorek byl tímto způsobem nanesen na 8 spotů a do středu standart, který sloužil jako kalibrant viz obrázek 4.

4.3 Vyhodnocení

Vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí programů flexAnalysis 3.4 Compass 1.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) a MALDI Biotyper Version 3.1 (66). Výsledky byly porovnávány na základě podobnosti spekter v MALDI Biotyperu v rozsahu 2–20 kDa. K vyhodnocení byla zvolena standardní metoda identifikace MSP, kdy je frekvenční práh pro úpravu spektra 50, pro kalkulaci skóre 5, maximální hmotnostní chyba prvotního spektra 2000, hmotnostní tolerance pro upravená spektra 350 a akceptovaná hmotnostní tolerance píku 600. Metoda MBT FC. par, kdy se využívá 2000 laserových výstřelů ve 200 krocích. Touto metodou bylo nasbíráno celkem 144 MSP spekter ze 43 odlišných vzorků. MSP spektra byla porovnána s celkovou databází. Poté byly vzorky porovnávány mezi sebou vzhledem k druhovému a kmenovému zařazení.

Tab. 2. Význam hodnoty log skóre při porovnání MSP spekter v MALDI Biotyperu

Rozsah	Popis	Symboly	Barva
2,300 ... 3,000	vysoce pravděpodobná identifikace druhů	(+++)	Zelená
2,000 ... 2,299	bezpečná identifikace rodu, pravděpodobná identifikace druhů	(++)	Zelená
1,700 ... 1,999	pravděpodobná identifikace rodu	(+)	Žlutá
0,000 ... 1,699	nespolehlivá identifikace	(-)	Červená

5 Výsledky

5.1 Validace a verifikace metody

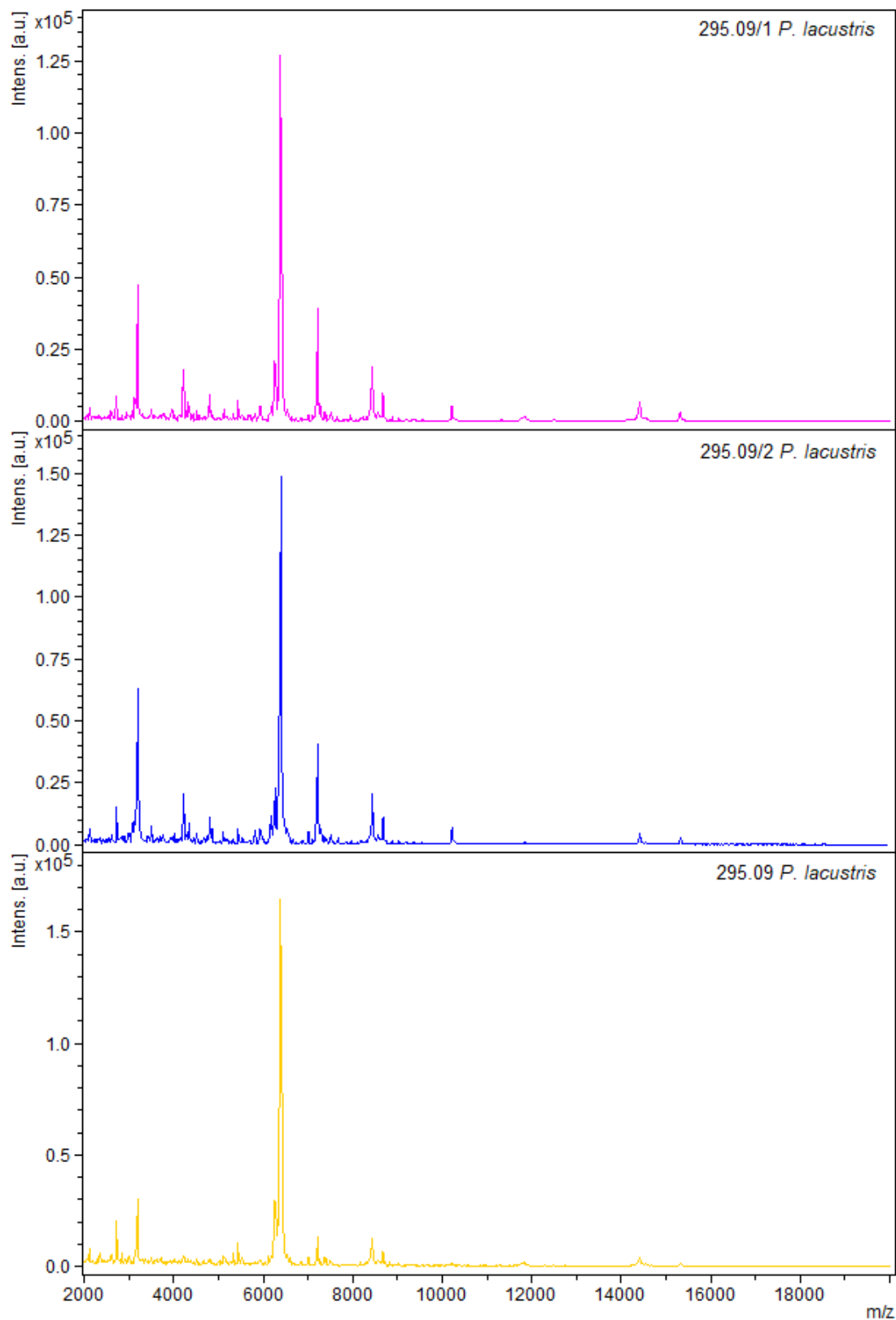
K přípravě vzorku byla vybrána metoda, která je vhodná pro všechny nesporeující mikroorganismy, u nichž nebyla úspěšná identifikace metodou přímého přenosu, která je také využívána pro kvasinky (např. rody *Candida* nebo rod *Saccharomyces*). Pro účel validace byla použita universální metoda extrakce pomocí etanolu a kyseliny mravenčí. Stejná metoda extrakce byla použita i pro přípravu všech dalších vzorků.

Pro zjištění přesnosti a správnosti vybrané metody sloužilo porovnání spekter s databází. Určení přesnosti jednotlivých měření bylo prováděno na základě opakované analýzy daného vzorku. Intraday variabilita byla stanovena na základě úspěšného měření 8 spotů stejného vzorku ve třech opakováních, interday variabilita pak z podobnosti spekter vzorků měřených v různé dny. Každý vzorek byl měřen minimálně 3x. Vždy byl dodržen totožný postup a stejné podmínky. Na obrázku 5 je znázorněno porovnání spekter u vzorku *Phytophthora lacustris* se sbírkovým číslem 295.09. Z tabulky 3 je zřejmé, že log skóre shodných vzorků měřených v různé dny jsou velice blízka, a zároveň rozdíly mezi jednotlivými kmeny v rámci druhu jsou vysoce průkazné.

Tab. 3. Porovnání skóre u druhu *P. lacustris* 295.09/1*

Sbírkové číslo	295.09/1	295.09/2	295.09
Skóre	3	2,759	2,536

*číslo za lomítkem je číslo biologického opakování



Obr. 5. Porovnání spekter v rámci interday variability u izolátu 295.09 *P. lacustris*

Dále pak byla k validaci metody použita analýza slepého vzorku. Z použitých 43 vzorků byl náhodně vybrán 1 vzorek, který byl rychlou identifikací na 3 spotech změřen v programu MALDI Biotyper Realtime Classification. Po zpětné kontrole byl pokus vyhodnocen jako úspěšný, to znamená, že MSP spektra slepého (testovaného) vzorku se shodovala se vzorkem původním (viz tabulka 4).

Tab. 4. Vyhodnocení rychlé identifikace slepého vzorku

Název analytu	ID Analytu	Organismus (nejlepší shoda)	Log skóre	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Log skóre
Měření 1 (+++)(C)	Slepý vzorek	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/2	2,686	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/1	2,624
Měření 2 (+++)(C)	Slepý vzorek	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/2	2,725	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/1	2,688
Měření 3 (+++)(C)	Slepý vzorek	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/2	2,718	<i>Phytophthora lacustris</i> 398.10/1	2,697

5.2 Ověření databáze

Jelikož jedním z cílů práce bylo rozšíření databáze o sbírku fytopatogenů, v tomto případě rodu *Phytophthora*, bylo v první řadě důležité zjistit, zda již specifická databáze měřené vzorky neobsahuje. Proto bylo provedeno srovnání změřených spekter se spektry již obsaženými v databázi, naměřenými za stejných podmínek. Pro porovnání bylo náhodně vybráno 8 spekter. Jako mezní hodnota spolehlivosti bylo stanoveno log skóre 1,7, která je doporučena výrobcem (Bruker Daltonics). Výsledky jsou uvedeny dále v tabulce 5.

Tab. 5. Porovnání naměřených spekter s celkovou databází

Testovaný vzorek	Organismus (nejlepší shoda)	Log skóre	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Log skóre
239.08/1 (-)(C)	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>ssp hominis</i>	1,417	<i>Bacteroides uniformis</i>	1,395
382.10/1 (-)(C)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1,616	<i>Clostridium cochlearium</i>	1,531
851.17/3 (-)(C)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,516	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1,471
393.10/2 (-)(C)	<i>Lactobacillus ruminis</i>	1,562	<i>Lactobacillus ruminis</i>	1,521
673.13/3 (-)(C)	<i>Neisseria cinerea</i>	1,376	<i>Burkholderia andropogonis</i>	1,362
578.12/1 (-)(C)	<i>Clostridium cochlearium</i>	1,626	<i>Trichosporon mucoides</i>	1,591
578.12/3 (-)(C)	<i>Lactobacillus helveticus</i>	1,535	<i>Candida sake</i>	1,526
865.17/2 (-)(C)	<i>Enterococcus faecium</i>	1,419	<i>Candida tropicalis</i>	1,383

5.3 Porovnání v rámci rodu

V rámci rodu *Phytophthora* bylo srovnáváno 42 vzorků a 1 vzorek patřil do příbuzného rodu *Pythium*, který je též zařazen do sbírky ve VÚKOZ a byl použit jako referenční. Tabulka porovnání MSP spekter v podobě hodnot log skóre je zpracována jako příloha 1.

Z celkového počtu vzorků se shodovalo 42 se svými vlastními MSP (biologická opakování) měřenými v jiný den, kdy naměřené hodnoty log skóre byly vyšší než 2,3. U jednoho vzorku (*P. gonapodyides* se sbírkovým číslem 419.10) byla nalezena nejvyšší kategorie shody (do 2,3) pouze s jedním biologickým replikátem, s druhým bylo dosaženo skóre 2,2, což splňuje kategorii pravděpodobné identifikace druhu (viz tab. 2). Výsledky spolehlivosti identifikace všech druhů byly zpracovány v následující tabulce 6.

Tab. 6. Spolehlivost identifikace druhů v rámci rodu

Druh	Počet kmenů	Biologická opakování	Mezní hodnota 2	Mezní hodnota 1,7
<i>Phytophthora alni alni</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora alni uniformis</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora cactorum</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora cambivora</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora cf. Kelmania</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora citrophthora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora cryptogea</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	2	6	5	6
<i>Phytophthora gregata</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora hedraiondra</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora chlamydospora x amnicola</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora lacustris</i>	4	12	12	12
<i>Phytophthora megasperma</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora multivora</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora palmivora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora plurivora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora polonica</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora ramorum</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora rosacearum</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora rubi</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora syringae</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora taxon Raspberry</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora taxon Walnut</i>	2	6	6	6
<i>Pythium folliculosum</i>	1	3	3	3
Celkem	43	129	128 (99,2 %)	129 (100 %)

5.4 Porovnání v rámci druhu

U druhu *P. lacustris* bylo dosaženo spolehlivé identifikace kmenů i v rámci druhu, jak je ukázáno dále pomocí log skóre uvedených v tabulce 8, porovnání MALDI-TOF spekter a MSP dendrogramem. Vybrány byly 3 kmeny druhu *P. lacustris*, lišící se místem odběru, datem izolace i hostitelem.

Tab. 7. Informace o izolátech ze sbírky získané z:

http://www.vukoz.cz/dokumenty/056/Sbirka_Katalog_Jan_2018.pdf

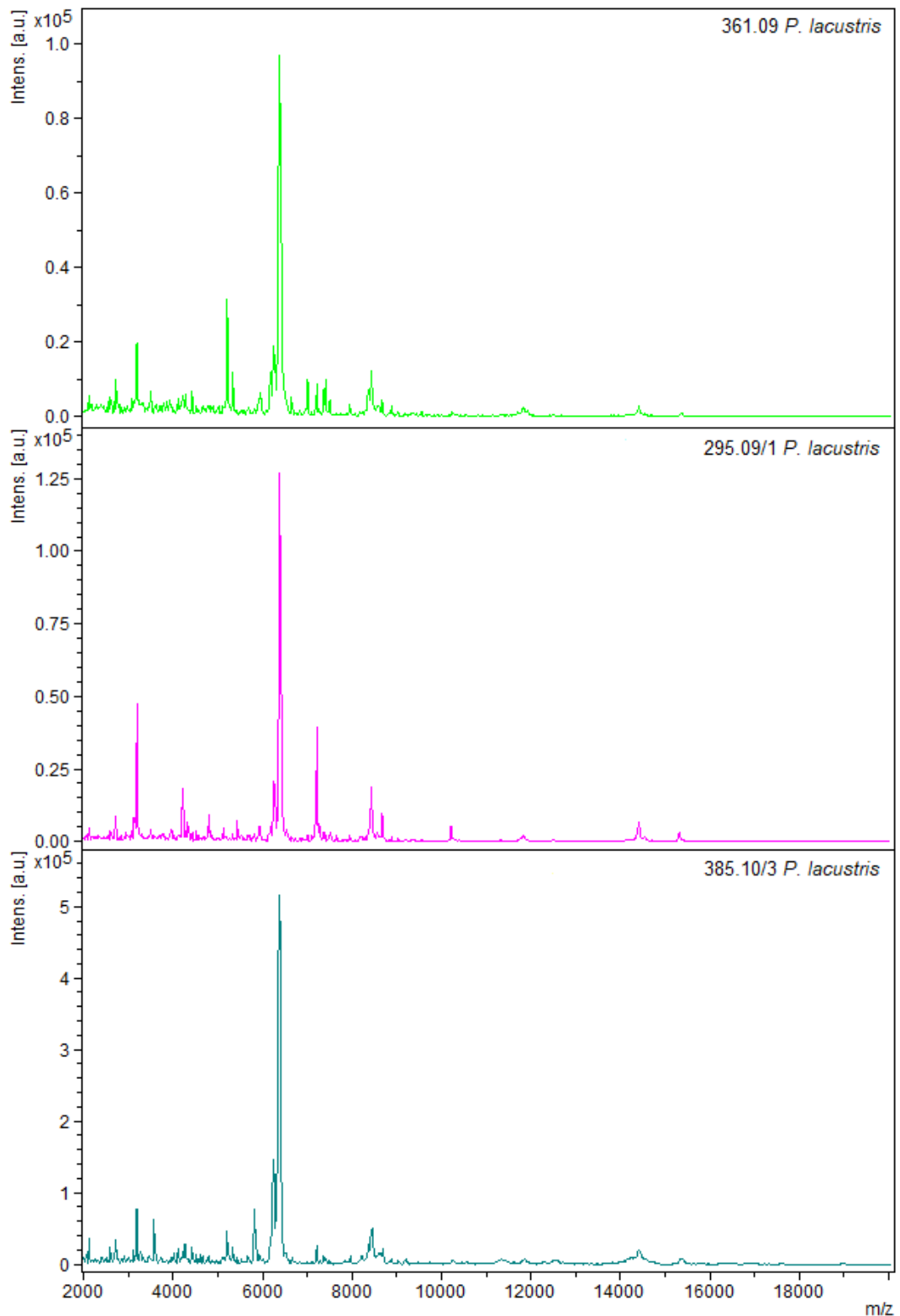
Sbírkové číslo	Lokace	Datum izolace	Hostitel
361.09 <i>P. lacustris</i>	Pikovice (Praha – západ)	listopad 2009	<i>Salix fragilis</i>
295.09 <i>P. lacustris</i>	Chocerady (Benešov)	září 2009	<i>Alnus glutinosa</i>
385.10 <i>P. lacustris</i>	Čejkovice (Benešov)	srpen 2010	<i>Salix sp.</i>

Tab. 8. Výsledky log skóre u *P. lacustris* z tabulky porovnání všech vzorků této práce viz příloha 1

Vzorek	Shoda s databází*								
	361.09/2	385.10/2	295.09/1	385.10	295.09/2	361.09	385.10	295.09	398.10/1
361.09 Log skóre	2,796	2,668	2,593	2,589	2,464	2,463	2,423	2,378	2,352
295.09 Log skóre	2,759	2,64	2,591	2,536	2,362	2,218	2,171	2,149	1,995
385.10 Log skóre	2,749	2,599	2,586	2,578	2,445	2,439	2,426	2,347	2,312

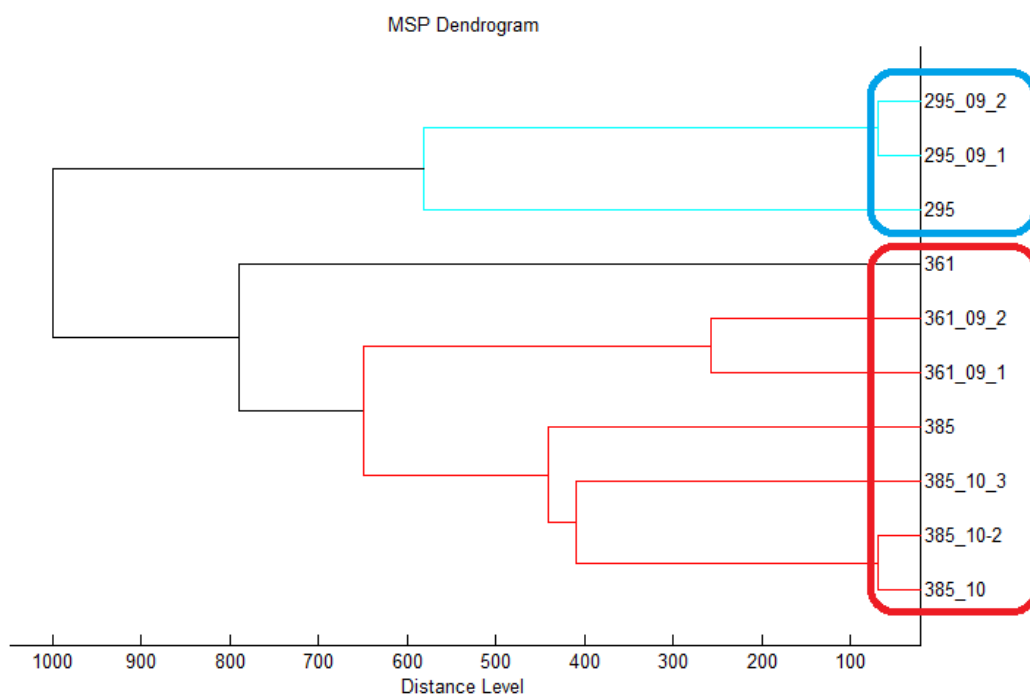
*číslo za lomítkem označuje biologické opakování

V případě spekter získaných z programu flex Analysis (obrázek 6) byly detekovány charakteristické píky proteinových iontů u všech vzorků v oblasti 6500 a 14500 m/z, u každého vzorku však s jinou intenzitou. Všechna spektra byla před vyhodnocením vyhlazena a byla srovnána základní linie.



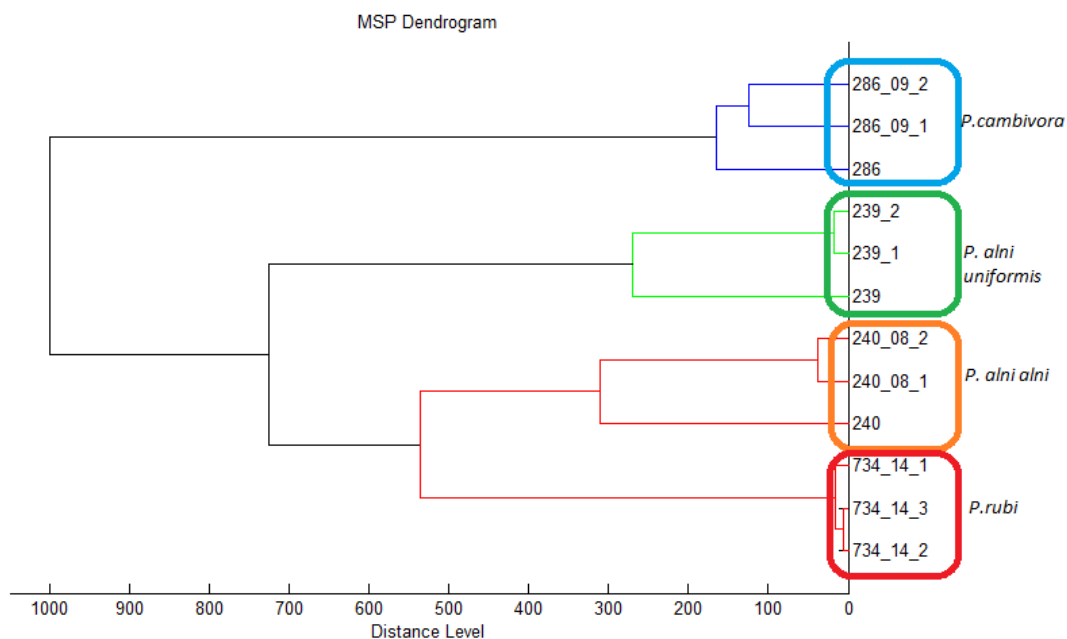
Obr. 6. Porovnání spekter u vybraných vzorků stejného druhu

V programu MALDI Biotyper lze použít pro porovnání MSP také zobrazení pomocí dendrogramu. Z matice podobnosti vybraných spekter je provedena klastrová analýza. Shluky vytvořené na základě podobnosti spekter se pak zobrazí jako dendrogram, kdy jsou zároveň vypočítávány vzdálenosti mezi jednotlivými klastry. Při tvorbě dendrogramu byly v editoru metody upraveny následující parametry: měření vzdálenosti korelací, středová vazba, maximálně 2 uzly nejvyšší úrovně, prahová hodnota pro jeden organismus byla 700 a prahová hodnota pro příbuzné organismy 150. Jedná se o dendrogram orientovaný na skóre. V tomto případě byl zřejmý rozdíl mezi jednotlivými kmeny. Kmen 295.09 se od ostatních lišil nejvíce, byl zařazen do jiného klastru. Vzorky 361.09 a 385.10 si byly více podobné.



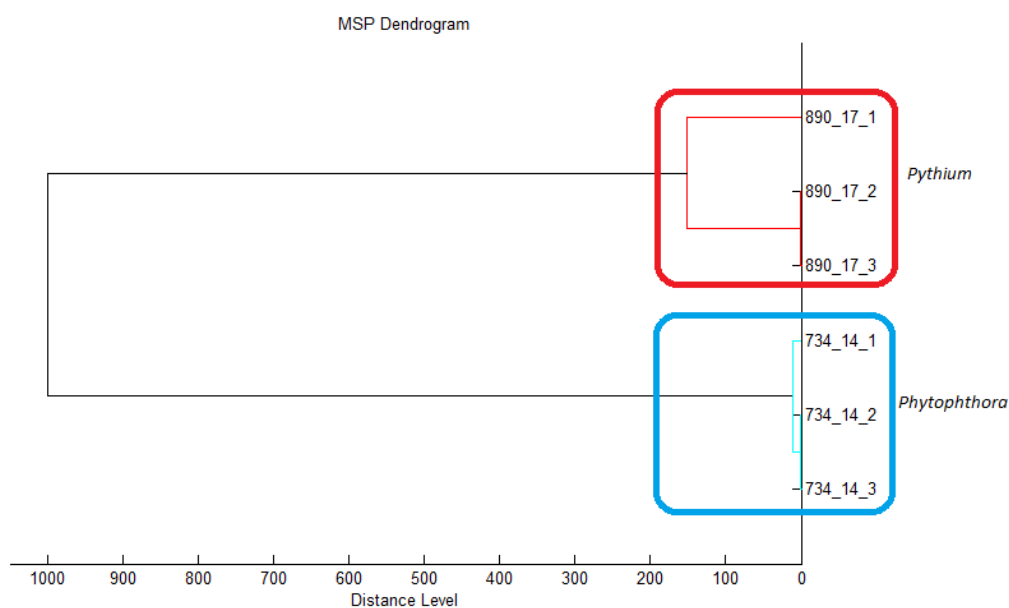
Obr. 7. Znázornění rozdílu mezi izoláty *P. lacustris* pomocí dendrogramu

U kmene druhu *P. alni uniformis* se sbírkovým číslem 239.08 se MSP spektra silně shodovala se spektry *P. cambivora*, *P. alni alni* a *P. rubi*. Hodnota log skóre byla v rozsahu od 2,4 do 2, tudíž byla mezi těmito druhy zřejmá určitá spojitost. Nicméně na dendrogramu byly patrné rozdíly, kdy byly oba druhy zařazený do rozdílných klastrů (viz Obr. 8.). Tak tomu bylo i u *P. cactorum* 862.17, kde byla shoda log skóre na úrovni druhu s *P. hedraiandra*.



Obr. 8. Rozdělení odlišných druhů pomocí klastrové analýzy MSP dendrogramu

Samotný rod *Pythium* vykazoval shodu pouze v biologických opakováních. Log skóre ve srovnání s rodem *Phytophthora* bylo menší než 1,6. Jejich vzdálenost lze vidět i na dendrogramu v podobě rozdělených klastrů (Obr. 9.) Stejně tomu bylo ale i u dalších druhů, například *P. pseudosyringae*, *P. syringae*, *P. polonica* a *P. palmivora*. Celkem u 27 kmenů (62,79 %) byla detekována významná shoda v rámci stejného druhu.



Obr. 9. Vzdálenost druhu *Pythium* (890.17) od rodu *Phytophthora* (734.14) zobrazená pomocí MSP dendrogramu

V následující tabulce (tabulka 9) je výčet všech měřených druhů a počet měřených kmenů a jejich biologických opakování. Bylo provedeno porovnání log skóre kmenů v rámci druhů a následně vypočítána procentuální úspěšnost. Byly určeny 2 mezní hodnoty dle doporučení výrobce. Při mezní hodnotě 2 byla spolehlivost identifikace 78,3 % a při nižší hranici 1,7 byla úspěšnost 90,7 %.

Tab. 9. Úspěšnost identifikace kmenů v rámci druhu

Druh	Počet kmenů	Biologická opakování	Mezní hodnota 2	Mezní hodnota 1,7
<i>Phytophthora alni alni</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora alni uniformis</i>	2	6	5	6
<i>Phytophthora cactorum</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora cambivora</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora cf. Kelmania</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora citrophthora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora cryptogea</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora gonapodyides</i>	2	6	5	6
<i>Phytophthora gregata</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora hedraiandra</i>	2	6	2	5
<i>Phytophthora chlamydospora x amnicola</i>	2	6	0	6
<i>Phytophthora lacustris</i>	4	12	8	10
<i>Phytophthora megasperma</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora multivora</i>	2	6	0	0
<i>Phytophthora palmivora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora plurivora</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora polonica</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora pseudosyringae</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora ramorum</i>	2	6	6	6
<i>Phytophthora rosacearum</i>	2	6	0	3
<i>Phytophthora rubi</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora syringae</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora taxon Raspberry</i>	1	3	3	3
<i>Phytophthora taxon Walnut</i>	2	6	6	6
<i>Pythium folliculosum</i>	1	3	3	3
Celkem	43	129	101 (78,3 %)	117 (90,7 %)

6 Diskuze

V současnosti jsou pro detekci fytopatogenů rodu *Phytophthora* běžně využívány dvě převládající metody. První je založena na zkoumání morfologických rozdílů mezi druhy na základě taxonomického klíče. Miles (2017) uvádí, že tuto metodu nelze spolehlivě použít pro všechny druhy, protože rozdíly mezi druhy nemusí být vždy viditelné. Naproti tomu naše výsledky naznačují, že použití MALDI-TOF MS biotypingu spojeného s jednoduchým zpracováním vzorku a následným porovnáním spekter s databází může být efektivnější pro přesnější a rychlejší identifikaci rodů a druhů. Navíc by tato metoda díky své jednoduchosti mohla být užitečná i pro laboratoře s omezenými odbornými znalostmi v oblasti mykologie.

Druhá tradiční metoda diagnostiky a identifikace vláknitých oomycet spočívá v analýze DNA. Zatím nejpřesnější molekulární metoda pro identifikaci izolátů na úrovni druhu se provádí sekvenční analýzou specifických lokusů, kdy se používá region ITS. Nicméně tento region není optimální pro všechny druhy, zejména ty, které jsou úzce fylogeneticky příbuzné, jako například *P. rubi* a *P. fragariae* (Martin et al. 2012). Navíc je postup sekvenování na rozdíl od naší použité metody stále dosti nákladný, což je pro identifikaci založenou na sekvenaci DNA omezujícím faktorem (del Castillo-Múnera et al. 2013).

Vzhledem ke vhodnosti matricové laserové desorpce/ionizace (MALDI) pro analýzu oligonukleotidů byl zaveden přímý postup pro zkoumání produktů molekulárně biologických stanovení. Specifičnost a "měkkost" MALDI v kombinaci s jednoduchostí a rychlostí TOF hmotnostních spektrometrů je obzvláště přitažlivá pro genomické analýzy, kde je spolehlivost a výkonnost velmi důležitým faktorem. Dle Shahgholiho et al. (2001) se MALDI například používá k detekci PCR produktů, pro delecí nebo vkládání a mikrosatelitové analýzy, detekci sekvenčních rejstříků, detekci produktů a pro rozšíření primerů pro polymorfistickou analýzu (Shahgholi et al. 2001).

Spolehlivost a přesnost metody MALDI Biotypingu byla prokázána v řadě studií včetně naší práce a její výhodou je, že různé systémy a softwary jsou již komerčně dostupné. Kromě identifikace úrovně mikrobiálních druhů jsou rovněž zkoumány nové aplikace systému. Na rozdíl od obou výše uvedených metod je další výhodou naší zvolené metody velmi vysoká rychlost. Identifikace jednoho vzorku trvá pouze několik minut, v závislosti na počtu opakování měření.

Chalupová et al. (2014) ve své práci uvádí, že hlavní výhodou MALDI-TOF MS spočívá v její použitelnosti pro mnohem mladší kultury (3 dny) než pro profilované metabolity (7–14 dnů), z čehož vyplývá, že se dá využít pro včasnou detekci. V případě naší práce byly použity vzorky různého stáří a dle výsledků neměla délka kultivace izolátu vliv na identifikaci. Například u porovnání kmenů druhu *P. lacustris*, kdy odběr každého kmene proběhl v jinou dobu, bylo log skóre vyšší než 2. Lze tedy předpokládat spolehlivou detekci i u vzorků lišících se stářím od vzorků, jejichž spektrum bude uloženo v databázi.

V dalším recentním výzkumu bylo pomocí MALDI-TOF správně identifikováno 53 izolátů *Pythium insidiosum* (rozsah log skóre 1,93–2,51). Identifikace založená na MALDI-TOF v izolátech *P. insidiosum* ukázala rozdíly proteinových spekter i mezi geograficky různými izoláty (Mani et al. 2019). Naše vzorky byly též odebrány z geograficky rozdílných stanovišť. Každý kmen měl jiného hostitele z různých míst v České republice. Mezi kmeny byly znatelné rozdíly, ale z výsledků je zřejmé, že to nemělo vliv na spolehlivost identifikace.

Při konstrukci interní databáze pro rychlou identifikaci kvasinek pomocí MALDI-TOF MS De Carolis et al. (2014) nejprve vyhodnotili spolehlivost metody krátké extrakce kyseliny mravenčí pro přípravu vzorku MALDI-TOF MS, která byla dříve použita k identifikaci izolátů *Cryptococcus* v rámci druhů a poddruhů. Podobně tomu bylo i v naší práci, kdy byla zvolena metoda rychlé extrakční metody s použitím kyseliny mravenčí na základě aplikovatelnosti u kvasinek a vláknitých hub.

De Carolis et al. (2014) také uvádí, že touto extrakční metodou bylo zajištěno odstranění extracelulárních a dalších potenciálně inhibujících sloučenin a dosaženo dostatečného počtu spektrálních píků pro rozlišení druhů hub. Navíc se snížil celkový čas potřebný pro identifikaci MALDI-TOF MS v porovnání s dobou při použití úplné extrakce. Poté byly vzorky referenčních a klinických kmenů zpracovány, aby vznikla „rychlá“ kvasinková knihovna MALDI-TOF MS. Stejně tak i v našem případě byl u prvních pokusů vygenerován dostatečný počet píků v rozmezí 2000–20000 Da a metoda extrakce byla určena jako vhodná. Navíc tato metoda poskytla dostatečný počet kvalitních spekter pro vytvoření „rychlé“ knihovny MALDI-TOF MS spekter.

Dle studie De Carolise et al. (2014) byl pro každý izolát generován MSP prostřednictvím akumulace 5000 laserových záběrů z 10 technických replikátů stejného spektra a každé MSP spektrum bylo zkontrolováno na specifičnost před vstupem do databáze. Při našem měření bylo 144 MSP generováno akumulací 2000 laserových výstřelů ve 200 krocích a každé měření

bylo opakováno nejméně 3krát. Spolehlivost identifikace byla v rámci rodu u 99,2 % biologických opakování nad hranicí log skóre 2. Stejně tak u studie De Carolise et al. (2014) se spektra zkoumaných 156 izolátů shodovala s vynikajícím stupněm (s hodnotami skóre kolem 2,5) se svými vlastními MSP.

V předchozí studii Fedorka et al. (2012) byly identifikovány anaerobní bakterie také pomocí Bruker Biotyper a byla použita extrakce mimo destičku. Metodou bylo dosaženo správné identifikace druhu u 79 % izolátů s použitím mezní hodnoty 2 pro identifikaci druhu. V naší studii bylo při stejné mezní hodnotě v rámci druhu správně identifikováno 78,3 % kmenů. Fedorko et al. (2012) navíc zaznamenali další nárůst úspěšnosti identifikace v rámci druhu na 86 %, když bylo skóre na druhové úrovni sníženo na 1,8. Kdybychom v našich experimentech posunuli hranici na tutéž úroveň, hodnoty úspěšnosti by výrazně stouply, jelikož při mezní hodnotě log skóre 1,7 byla spolehlivost identifikace 90,7 %. Naopak další studie využívající systém Bruker Biotyper ukázaly nižší procento úspěšné identifikace druhů, která se pohybovala od 51 %, (Velloo et al. 2011) po 67,2 % (Justesen et al. 2011).

Při identifikaci bakterií však nelze opomenout velikost a kvalitu databáze. I přesto byla míra naší úspěšnosti identifikace pomocí MALDI-TOF významně lepší. Byla dokonce lepší než ta, kterou popsal Theel et al. (2012) u 90 studovaných klinických kvasinkových izolátů. V této studii byla použita přímá metoda extrakce kyselinou mravenčí a na rozdíl od naší práce byla laboratorně validovaná mezní log skóre (1,5 a 1,7). U 86 (95,6 %) izolátů byl správně identifikován rod a u 73 (81,1 %) izolátů druh (Theel et al. 2012). Tato procentuální úspěšnost byla srovnatelná s tou, kterou uvádí Dhiman et al. (2011), kdy byly stejné izoláty dříve zpracovány úplnou extrakční metodou, nicméně mezní hodnota log skóre byla posunuta na 1,8.

Při porovnání druhů v naší práci došlo u některých z nich k dostatečnému odlišení jednotlivých taxonů. Bylo tomu tak u druhů *P. alni uniformis* s *P. alni alni*, *P. cambivora* a *P. rubi*, kde byla hodnota log skóre těsně nad hranicí spolehlivé identifikace. Dle Brasiera a Kirka (2001) sdílí *P. alni* a její poddruhy, což je i *P. alni uniformis*, *P. cambivora* a *P. cinnamomi* mnoho společných funkcí a všechny se řadí do stejné fylogenetické skupiny 7, která je značně variabilní a v současnosti je rozdělena na 4 subkategorie (viz příloha 2). V případě dalších dvou druhů, *P. cactorum* a *P. hedraiaandra*, je situace obdobná. Vyskytují se ve stejné skupině 1 a mají tedy podobný fylogenetický původ. To by mohlo vysvětlovat určitou shodu měření.

Celkem je v nedávno publikované fylogenetické analýze rodu *Phytophthora* popsáno 142 druhů a 43, které čekají na zveřejnění (Yang et al. 2017).

Existuje předpoklad, že pomocí hmotnostní spektrometrie budou některé blízce příbuzné druhy identifikovány s menší přesností. Také při zobrazení v dendrogramu lze sledovat vztahy a rozdíly mezi jednotlivými druhy, kdy dochází k chybnému zařazení do klastrů u vzorků navzájem odlišných. Nicméně využití systému MALDI Biotyper poskytuje poměrně přesnou, rychlou a nenákladnou identifikaci nejen u bakterií a kvasinek, ale i u patogenů jiného původu, jako v našem případě vláknitých oomycet.

7 Závěr

Závěrem lze říci, že pomocí MALDI-TOF MS jsme schopni identifikovat fytopatogeny rodu *Phytophthora*. V rámci rodu byla spolehlivost identifikace druhu 99,2 % a 100 % u klasifikace rodu. Úspěšnost v rámci druhu pak byla 78,3 % při mezní hodnotě 2 a 90,7 % při nižší hranici log skóre (1,7). Identifikace a klasifikace fungicidních mikroorganismů na bázi MALDI využívají proteinové profily obsahující charakteristické biomarkerové píky v oblasti m/z 2000 až 20000 Da. Jejich přítomnost je důležitá pro následné vyhledávání v databázi a porovnání experimentálních dat s údaji pro referenční kmeny v databázi. Doporučená metoda extrakce pro tento patogen velmi podobný vláknitým houbám, je rychlá extrakce proteinů pomocí etanolu, kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Pro budoucí vývoj metodiky MALDI-TOF MS identifikace vláknitých oomycet bude potřeba průběžné aktualizace současných databází poskytovaných prodejci spolu s přístroji a budování nových databází pro specializované výzkumné účely. Ve výhledu vývoje je také možnost detekce typických iontových markerů příslušných kmenů přímo v napadeném rostlinném materiálu.

8 Seznam literatury

Agrios G. 2005. Plant pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press, Boston.

Alanio A, Beretti J, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, Amara A, Berche P, Nassif X, Bournoux M. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clinical Microbiology and Infection* **17**:750-755.

Ali S et al. 2017. *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora*, closely related causal agents of cacao black pod rot, underwent increases in genome sizes and gene numbers by different mechanisms. *Genome Biology and Evolution* **9**:536-557.

Bennett J, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* vol. **16**:497-516.

Brasier C, Kirk S. 2001. Comparative aggressiveness of standard and variant hybrid alder phytophthoras, *Phytophthora cambivora* and other *Phytophthora* species on bark of *Alnus*, *Quercus* and other woody hosts. *Plant Pathology* **50**:218-229.

Brun S, Madrid H, Gerrits Van Den Ende B, Andersen B, Marinach-Patrice C, Mazier D, De Hoog G. 2013. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. *Fungal Biology* **117**:32-40.

Carlile M, Watkinson S, Gooday G. 2001. The fungi, 2nd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Cassagne C, Normand A, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. 2016. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **59**:678-690.

Cassagne C, Ranque S, Normand A, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, Hendrickx M, Piarroux R, Cai Y. 2011. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* **6** (e28425) DOI: 10.1371/journal.pone.0028425.

Clark A, Kaleta E, Arora A, Wolk D. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **26**:547-603.

De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanguinetti M, Posteraro B. 2014. Development and Validation of an In-House Database for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Yeast Identification Using a Fast Protein Extraction Procedure. *Journal of Clinical Microbiology* **52**:1453-1458.

del Castillo-Múnera J, Cárdenas M, Pinzón A, Castañeda A, Bernal A, Restrepo S. 2013. Developing a taxonomic identification system of *Phytophthora* species based on microsatellites. *Revista Iberoamericana de Micología* **30**:88-95.

DeMarco M, Ford B. 2013. Beyond Identification. *Clinics in Laboratory Medicine* **33**:611-628.

Demirev P, Fenselau C. 2008. Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms. *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**:71-93.

- Dhiman N, Hall L, Wohlfiel S, Buckwalter S, Wengenack N. 2011. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:1614-1616.
- Feau N, Taylor G, Dale A, Dhillon B, Bilodeau G, Birol I, Jones S, Hamelin R. 2016. Genome sequences of six *Phytophthora* species threatening forest ecosystems. *Genomics Data* **10**:85-88.
- Fedorko D, Drake S, Stock F, Murray P. 2012. Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**:2257-2262.
- Feng X, Liu X, Luo Q, Liu B. 2008. Mass spectrometry in systems biology: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* **27**:635-660.
- Gekenidis M, Studer P, Wüthrich S, Brunisholz R, Drissner D, Schaffner D. 2014. Beyond the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Biotyping Workflow: in Search of Microorganism-Specific Tryptic Peptides Enabling Discrimination of Subspecies. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:4234-4241.
- Girolamo F, Lante I, Muraca M, Putignani L. 2013. The Role of Mass Spectrometry in the "Omics" Era. *Current Organic Chemistry* **17**:2891-2905.
- Horká M, Kubesová A, Šalplachta J, Zapletalová E, Horký J, Šlais K. 2012. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS – Suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica Chimica Acta* **716**:155-162.
- Chalupová J, Sedlářová M, Helmel M, Řehulka P, Marchetti-Deschmann M, Allmaier G, Šebela M. 2012. MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews. *Journal of Mass Spectrometry* **47**:978-986.
- Jagutzki O, Mergel V, Ullmann-Pfleger K, Spielberger L, Spillmann U, Dörner R, Schmidt-Böcking H. 2002. A broad-application microchannel-plate detector system for advanced particle or photon detection tasks: large area imaging, precise multi-hit timing information and high detection rate. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **477**:244-249.
- Judelson H, Blanco F. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* **3**:47-58.
- Juroch J. 2011. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary původce chorob plísně bramboru a rajčete. Page in www.eagri.cz. Ministerstvo zemědělství ČR, Praha. Available from <http://eagri.cz/public/web/file/125259/plisen.pdf> (accessed November 2018).
- Justesen U, Holm A, Knudsen E, Andersen L, Jensen T, Kemp M, Skov M, Gahrn-Hansen B, Moller J. 2011. Species Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:4314-4318.
- Klaban V. 2001. Svět mikrobů: ilustrovaný lexikon mikrobiologie životního prostředí, 2., rozš. a přeprac. vyd. Gaudeamus, Hradec Králové.

- Koppenaar D, Barinaga C, Denton M, Sperline R, Hieftje G, Schilling G, Andrade F, Barnes J. 2005. MS Detectors. *Analytical Chemistry* **77**:10.
- Lacroix C et al. 2014. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clinical Microbiology and Infection* **20**:153-158.
- Lau A, Drake S, Calhoun L, Henderson C, Zelazny A. 2013. Development of a Clinically Comprehensive Database and a Simple Procedure for Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **51**:828-834.
- MALDI Biotyper CA System. 2014. Clinical Application for Identification of Microorganisms. Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA-USA. Available from https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI-biotyper-CA-Brochure_08-2014_ebook.pdf (accessed March 2019).
- Malíř F, Ostrý V. 2003. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka, Vyd. 1. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno.
- Mani R, Vilela R, Kettler N, Chilvers M, Mendoza L. 2019. Identification of *Pythium insidiosum* complex by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology* **68**:1
- Martin F, Abad Z, Balci Y, Ivors K. 2012. Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* **96**:1080-1103.
- McCartney H, Foster S, Fraaije B, Ward E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* **59**:129-142.
- Meszka B, Michalecka M. 2016. Identification of *Phytophthora* spp. isolated from plants and soil samples on strawberry plantations in Poland. *Journal of Plant Diseases and Protection* **123**:29-36.
- Miles T, Martin F, Robideau G, Bilodeau G, Coffey M. 2017. Systematic Development of *Phytophthora* Species-Specific Mitochondrial Diagnostic Markers for Economically Important Members of the Genus. *Plant Disease* **101**:1162-1170.
- Mrázková M, Černý K, Strnadová V, Filipová N. 2011. Identifikace symptomů napadení dřevin a okrasných rostlin patogeny z rodu *Phytophthora* de Bary.: Certifikovaná metodika č. 6/2011-056. QH71273:37. VÚKOZ, Průhonice.
- Park J, Blick R. 2013. A Silicon Nanomembrane Detector for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) of Large Proteins. *Sensors* **13**:13708-13716.
- Patel R. 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases* **57**:564-572.
- Portz R, Fleischmann F, Koehl J, Fromm J, Ernst D, Pascholati S, Osswald W. 2011. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. *Forest Pathology* **41**:202-211.

- Posteraro B, Vella A, Cogliati M, De Carolis E, Florio A, Posteraro P, Sanguinetti M, Tortorano A. 2012. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Discrimination between Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* **50**:2472-2476.
- Ranque S, Normand A, Cassagne C, Murat J, Bourgeois N, Dalle F, Gari-Toussaint M, Fourquet P, Hendrickx M, Piarroux R. 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* **57**:135-140.
- Shahgholi M, Garcia B, Chiu N, Heaney P, Tang K. 2001. Sugar additives for MALDI matrices improve signal allowing the smallest nucleotide change (A:T) in a DNA sequence to be resolved. *Nucleic Acids Research* **29** (E91).
- Shearer B, Crane C, Cochrane A. 2004. Quantification of the susceptibility of the native flora of the South-West Botanical Province, Western Australia, to *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* **52**:435-443.
- Schena L, Cooke D. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* **67**:70-85.
- Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago J, Muñoz-Bellido J. 2017. Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)* **35**:303-313.
- Sugawara R, Yamada S, Tu Z, Sugawara A, Suzuki K, Hoshiba T, Eisaka S, Yamaguchi A. 2016. Rapid and reliable species identification of wild mushrooms by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Analytica Chimica Acta* **934**:163-169.
- TeKippe E, Burnham C. 2014. Evaluation of the Bruker Biotyper and VITEK MS MALDI-TOF MS systems for the identification of unusual and/or difficult-to-identify microorganisms isolated from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **33**:2163-71.
- Theel E, Schmitt B, Hall L, Cunningham S, Walchak R, Patel R, Wengenack N. 2012. Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and *Corynebacterium* Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **50**:3093-3095.
- van den Boom D, Wjst M, Everts R. 2013. MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Pharmacogenomics Humana Press, Totowa, NJ.* **1**:71-85.
- Veloo A, Knoester M, Degener J, Kuijper E. 2011. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **17**:1501-1506.
- Vetukuri R, Tripathy S, Malar C M, Panda A, Kushwaha S, Chawade A, Andreasson E, Grenville-Briggs L, Whisson S, Cordaux R. 2018. Draft Genome Sequence for the Tree Pathogen *Phytophthora plurivora*. *Genome Biology and Evolution* **10**:2432-2442.

Wahab N, Abdullah N, Aminudin N. 2014. Characterisation of Potential Antidiabetic-Related Proteins from *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. (Grey Oyster Mushroom) by MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry. *BioMed Research International* (131607) DOI: 10.1155/2014/131607

Wieser A, Schubert S. 2016. MALDI-TOF MS entering the microbiological diagnostic laboratory – from fast identification to resistance testing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **84**:80-87.

Yang X, Tyler B, Hong C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* **8**:355-384.

9 Seznam obrázků

Obr. 1. Příklad životního cyklu hub rodu <i>Phytophthora</i> . Upraveno dle: http://phytophthora.pppmb.cals.cornell.edu/biology.html	14
Obr. 2. Zjednodušené schéma MALDI-TOF. Upraveno dle (Wieser & Schubert 2016).....	18
Obr. 3. Chemické vzorce nejpoužívanějších matric. Upraveno dle (Chalupová et al. 2012) ...	19
Obr. 4. Kalibrační schéma	32
Obr. 5. Porovnání spekter v rámci interday variability u izolátu 295.09 <i>P. lacustris</i>	35
Obr. 6. Porovnání spekter u vybraných vzorků stejného druhu	40
Obr. 7. Znázornění rozdílu mezi izoláty <i>P. lacustris</i> pomocí dendrogramu	41
Obr. 8. Rozdělení odlišných druhů pomocí klastrové analýzy MSP dendrogramu	42
Obr. 9. Vzdálenost druhu <i>Pythium</i> (890.17) od rodu <i>Phytophthora</i> (734.14) zobrazená pomocí MSP dendrogramu	42

10 Seznam tabulek

Tab. 1. Přehled testovaných druhů rodu <i>Phytophthora</i>	29
Tab. 2. Význam hodnoty log skóre při porovnání MSP spekter v MALDI Biotyperu	33
Tab. 3. Porovnání skóre u druhu <i>P. lacustris</i> 295.09/1*	34
Tab. 4. Vyhodnocení rychlé identifikace slepého vzorku	36
Tab. 5. Porovnání naměřených spekter s celkovou databází	37
Tab. 6. Spolehlivost identifikace druhů v rámci rodu	38
Tab. 7. Informace o izolátech ze sbírky získané z: http://www.vukoz.cz/dokumenty/056/Sbirka_Katalog_Jan_2018.pdf	39
Tab. 8. Výsledky log skóre u <i>P. lacustris</i> z tabulky porovnání všech vzorků této práce viz příloha 1	39
Tab. 9. Úspěšnost identifikace kmenů v rámci druhu	43

11 Seznam zkratek

PCR	polymerázová řetězová reakce
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
CE	kapilární elektroforéza
GC	plynová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MALDI-TOF	matricová laserová desorpce/ionizace ve spojení s letovým analyzátozem
MCP	mikrokanálový detektor
HCCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
SA	3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
FA	4-hydroxy-3-methoxyskořicová kyselina
SDA	Sarabaudův dextrózový agar
VÚKOZ	Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.
PARPHN	univerzální médium pro růst vláknitých hub
AN	acetonitril
OR	organické rozpouštědlo
TFA	kyselina trifluoroctová
MSP	referenční profil spekter

12 Seznam příloh

1. Přehledová tabulka všech naměřených MSP s výčtem nejlepších log skóre
2. Fylogenetické vztahy rodu *Phytophthora* (Martin et al. 2012).

<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P. rubi</i>
239.08	239.08/1	239.08/2	416.10	299.09/1	286.09	240.08	286.09/1	734.14/2	734.14/1
Log skóre	2,42	2,326	2,188	2,177	2,14	2,135	2,087	2,078	2,062
<i>P. plurivora</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. palmivora</i>
256.09	256.09/2	256.09.1	029.06	102.07	036.06	772.15/1	453.11	534.11/1	453.11/2
Log skóre	2,534	2,52	2,513	2,29	2,101	1,455	1,334	1,284	1,241
<i>P. multivora</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. hedraiana</i>	<i>P. palmivora</i>
242.08	242.08/2	242.08/1	772.15/2	518.11/3	036.06	408.10	772.15/3	531.11/1	453.11
Log skóre	2,655	2,59	1,457	1,416	1,363	1,355	1,326	1,289	1,254
<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P. cambivora</i>
240.08	240.08/1	012.06	240.08/2	299.09	299.09/1	299.09/2	734.14/3	734.14/2	393.10
Log skóre	2,497	2,463	2,452	2,449	2,447	2,412	2,365	2,311	2,309
<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. cambivora</i>
382.10	382.10/1	534.11	382.10/2	534.11/1	534.11/3	534.11/2	114.07	366.09	416.10
Log skóre	2,685	2,629	2,573	2,451	2,439	2,36	2,3	1,438	1,381
<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni uniformis</i>
286.09	416.10	286.09/1	286.09/2	393.10	393.10/2	239.08	393.10/1	012.06	239.08/1
Log skóre	2,595	2,591	2,518	2,357	2,326	2,275	2,24	2,235	2,164
<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
295.09	295.09/2	361.09/2	361.09/1	295.09	361.09	385.10	385.10/2	385.10	398.10/1
Log skóre	2,759	2,64	2,591	2,536	2,362	2,218	2,171	2,149	1,995
<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. alni uniformis</i>	<i>P. alni alni</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P. rubi</i>
299.09	299.09	299.09/2	240.08	239.08/2	240.08/1	239.08/1	240.08/2	734.14/3	734.14/2
Log skóre	2,621	2,533	2,488	2,455	2,445	2,422	2,406	2,354	2,303
<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. cf. kelmania</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>
345.09	754.15/2	345.09/2	754.15/3	345.09/3	754.15/1	620.12/1	456.11/1	846.17/1	456.11/2
Log skóre	2,726	2,72	2,649	2,581	2,573	1,491	1,358	1,281	1,259
<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
361.09	361.09/2	385.10/2	295.09/1	385.10	295.09/2	361.09	385.10	295.09	398.10/1
Log skóre	2,796	2,668	2,593	2,589	2,464	2,463	2,423	2,378	2,352

<i>P. palmivora</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. chlamydospora x amnicola</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. lacustris</i> 385.10/2	<i>P. plurivora</i>	<i>P. cambivora</i> 286.09/1	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. cinnamomi</i>
453.11 Log skóre	453.11/2	453.11	803.16/1	534.11/3	2	029.06	1	544.11/1	534.11
	2,752	2,698	1,498	1,455	1,453	1,42	1,405	1,369	1,327
<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P.alni uniformis</i> 299.09/1	<i>P. rubi</i>	<i>P.alni uniformis</i>
393.10 Log skóre	393.10/2	393.10	286.09/1	299.09	020.06	286.09	1	734.14/1	299.09/2
	2,774	2,603	2,292	2,285	2,25	2,241	2,233	2,231	2,18
<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 361.09/1	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 361.09/2	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
398.10 Log skóre	398.10/2	398.10	385.10	385.10/2	1	385.10	2	385.10/3	361.09
	2,747	2,537	2,439	2,431	2,352	2,317	2,293	2,246	2,069
<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i> 419.10/1	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>
408.10 Log skóre	408.10/2	408.10	408.10	419.10/2	1	002.06	419.10	617.12/2	778.15/1
	2,873	2,554	2,498	2,415	2,367	2,249	2,227	1,779	1,716
<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i> 361.09/1	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. rosacearum</i>
419.10 Log skóre	419.10/2	408.10/1	408.10/2	002.06	419.10	408.10	1	408.10	544.12/3
	2,797	2,369	2,347	2,237	2,2	1,983	1,875	1,856	1,802
<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i> 812.16/1	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i> 846.17/2	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. citrophthora</i>
456.11 Log skóre	456.11/2	456.11/3	812.16/2	846.17/3	1	812.16/3	2	846.17/1	635.13/3
	2,817	2,746	2,409	2,374	2,352	2,351	2,333	2,274	1,688
<i>P. polonica</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. rosacearum</i> 544.11/1	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. citrophthora</i> 635.13/1	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>
766.15 Log skóre	766.15/2	766.15/3	578.12/1	578.12/3	1	578.12/2	1	862.17/2	456.11/1
	2,738	2,728	1,721	1,691	1,634	1,561	1,536	1,528	1,477
<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 295.09/2	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
361.09 Log skóre	361.09/2	385.10/2	295.09/1	385.10	2	361.09	385.10	295.09	398.10/1
	2,796	2,668	2,593	2,589	2,464	2,463	2,423	2,378	2,352
<i>P. palmivora</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. chlamydospora x amnicola</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. lacustris</i> 385.10/2	<i>P. plurivora</i>	<i>P. cambivora</i> 286.09/1	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. cinnamomi</i>
453.11 Log skóre	453.11/2	453.11	803.16/1	534.11/3	2	029.06	1	544.11/1	534.11
	2,752	2,698	1,498	1,455	1,453	1,42	1,405	1,369	1,327

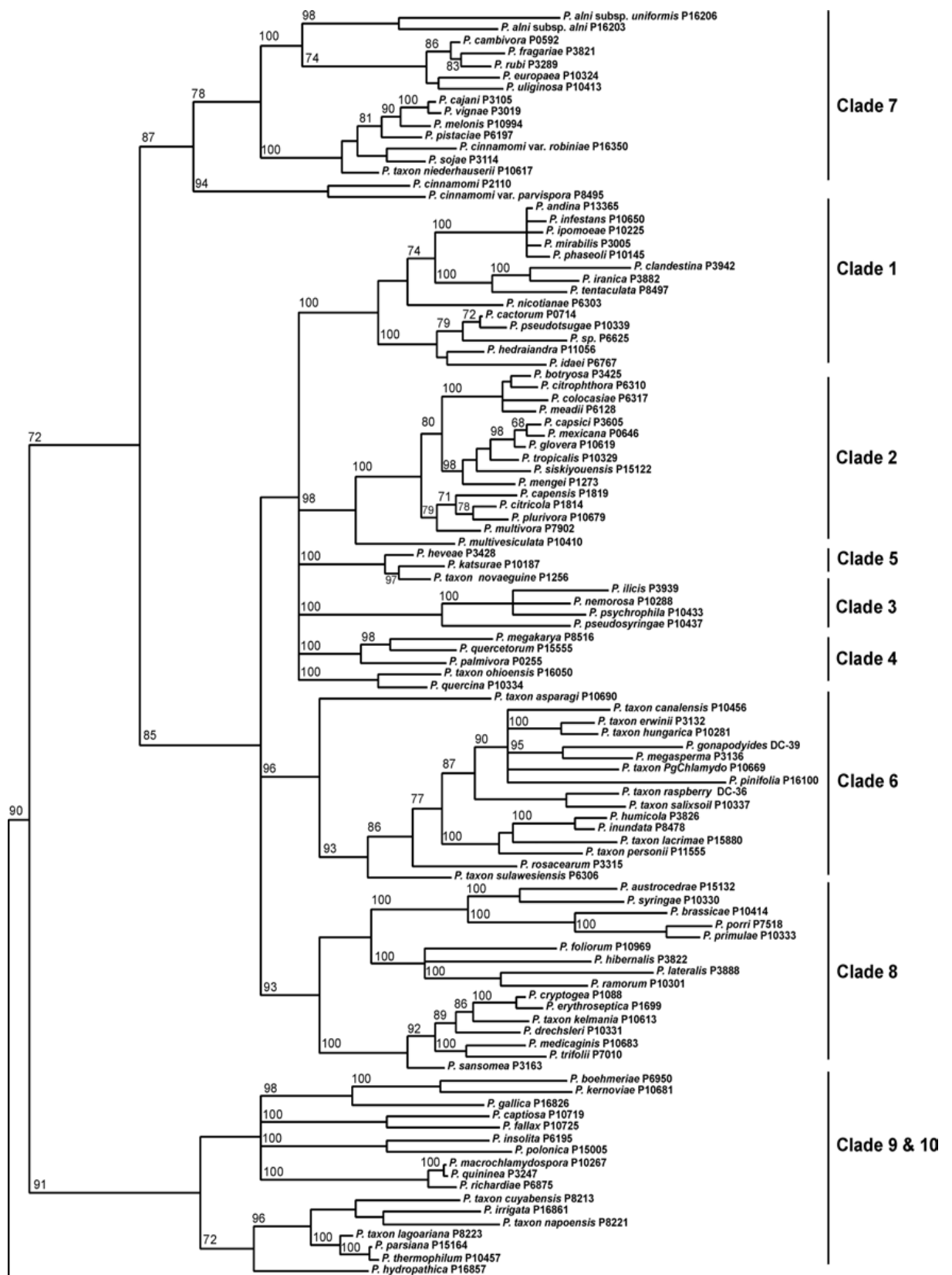
<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P.alni uniformis</i>
393.10	393.10/2	393.10	286.09/1	299.09	020.06	286.09	299.09/1	734.14/1	299.09/2
Log skóre	2,774	2,603	2,292	2,285	2,25	2,241	2,233	2,231	2,18
<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
398.10	398.10/2	398.10	385.10	385.10/2	361.09/1	385.10	361.09/2	385.10/3	361.09
Log skóre	2,747	2,537	2,439	2,431	2,352	2,317	2,293	2,246	2,069
<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>
408.10	408.10/2	408.10	408.10	419.10/2	419.10/1	002.06	419.10	617.12/2	778.15/1
Log skóre	2,873	2,554	2,498	2,415	2,367	2,249	2,227	1,779	1,716
<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. rosacearum</i>
419.10	419.10/2	408.10/1	408.10/2	002.06	419.10	408.10	361.09/1	408.10	544.12/3
Log skóre	2,797	2,369	2,347	2,237	2,2	1,983	1,875	1,856	1,802
<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>
862.17	862.17/2	851.17/2	851.17/3	862.17/3	531.11/3	531.11/1	851.17	578.12/3	578.12/1
Log skóre	2,82	2,748	2,681	2,581	2,401	2,384	2,349	2,335	2,245
<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. citrophthora</i>
456.11	456.11/2	456.11/3	812.16/2	846.17/3	812.16/1	812.16/3	846.17/2	846.17/1	635.13/3
Log skóre	2,817	2,746	2,409	2,374	2,352	2,351	2,333	2,274	1,688
<i>P. polonica</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cf. kelmiana</i>
766.15	766.15/2	766.15/3	578.12/1	578.12/3	544.11/1	578.12/2	635.13/1	862.17/2	456.11/1
Log skóre	2,738	2,728	1,721	1,691	1,634	1,561	1,536	1,528	1,477
<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. taxon Raspberry</i>	<i>P. taxon Raspberry</i>	<i>P. taxon Raspberry</i>	<i>P. taxon Walnut</i>
778.15	778.15/3	617.12/2	778.15/2	617.12/1	617.12/3	483.11/2	483.11/1	483.11/3	518.11/2
Log skóre	2,594	2,544	2,437	2,427	2,363	2,034	1,964	1,912	1,817
<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>
851.17	531.11/2	851.17/3	851.17/2	531.11/1	862.17/3	531.11/3	862.17/1	862.17/2	578.12/3
Log skóre	2,605	2,547	2,541	2,468	2,449	2,396	2,36	2,314	1,843

<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i> 865.17/ 3	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. megasperma</i> 778.15/ 3	<i>P. megasperma</i>	<i>P. taxon</i> Walnut
673.13	673.13/2	673.13/3	865.17/1	865.17/2	3	829.17/3	3	617.12/1	831.17/2
Log skóre	2,858	2,809	2,809	2,773	2,718	1,756	1,706	1,704	1,697
<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. megasperma</i> 778.15/ 1	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. gregata</i> 673.13/ 2	<i>P. gregata</i>	<i>P. rosacearum</i>
617.12	617.12/3	617.12/2	778.15/3	778.15/2	1	806.16/1	2	865.17/2	544.11/2
Log skóre	2,799	2,791	2,63	2,475	2,432	1,826	1,753	1,743	1,738
<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. cf. kelmania</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. pseudosyringae</i> 772.15/ 1	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. taxon</i> Raspber ry 483.11/ 1	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. rosacearum</i>
620.12	620.12/3	620.12/2	456.11/3	803.16/3	1	544.12/3	1	382.10/1	544.11/2
Log skóre	2,886	2,881	1,642	1,396	1,352	1,348	1,291	1,242	1,238
<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i> 846.17/ 3	<i>P. cf. kelmania</i>	<i>P. cf. kelmania</i> 456.11/ 2	<i>P. cf. kelmania</i>	<i>P. pseudosyringae</i>
812.16	812.16/2	846.17/2	812.16/3	846.17/1	3	456.11/3	2	456.11/1	772.15/1
Log skóre	2,792	2,782	2,777	2,734	2,678	2,46	2,39	2,353	1,665
<i>P. rubi</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P.alni alni</i>	<i>P. cambivora</i>	<i>P.alni uniformis</i> 239.08/ 1	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P. cambivora</i>
734.14	734.14/2	734.14/3	239.08/2	299.09/1	240.08	393.10/2	1	299.09	393.10/1
Log skóre	2,782	2,782	2,344	2,297	2,294	2,265	2,264	2,247	2,236
<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. pseudosyringae</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. plurivora</i> 256.09/ 2	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. megasperma</i>
772.15	772.15/2	772.15/3	102.07	002.06	256.09	366.09/2	2	382.10/1	617.12/1
Log skóre	2,81	2,792	1,531	1,514	1,513	1,491	1,474	1,472	1,446
<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 385.10/ 3	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. lacustris</i> 398.10/ 2	<i>P. lacustris</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>
803.16	803.16/3	803.16/2	361.09/1	361.09/2	3	806.16/1	2	361.09	806.16/3
Log skóre	2,84	2,757	2,1	2,013	1,976	1,965	1,93	1,874	1,874
<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. megasperma</i> 778.15/ 2	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
806.16	806.16/3	806.16/2	361.09	803.16/1	2	803.16/3	385.10	295.09/1	295.09/2
Log skóre	2,682	2,654	2,071	1,964	1,901	1,877	1,872	1,871	1,868

Pythium folliculosum	<i>Pythium folliculosum</i>	<i>Pythium folliculosum</i>	<i>P. rubi</i>	<i>P.alni alni</i>	<i>P. cambivora</i> 286.09/ 2	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P. rubi</i> 734.14/ 2	<i>P.alni uniformis</i>	<i>P.alni uniformis</i>
890.17 Log skóre	890.17/2 2,59	890.17/3 2,548	734.14/1 1,578	240.08 1,478	2 1,468	299.09/1 1,387	2 1,353	239.08 1,303	239.08/1 1,288
P. rosacearum	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i> 544.12/ 3	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i> 865.17/ 2	<i>P. gregata</i>	<i>P. taxon Walnut</i>
829.17 Log skóre	829.17/3 2,872	829.17/2 2,867	673.13/2 1,785	544.11/2 1,767	3 1,738	865.17/3 1,694	2 1,639	673.13/3 1,609	518.11/2 1,574
P. taxon Walnut	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i> 518.11/ 2	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i> 829.17/ 2	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. lacustris</i>
831.17 Log skóre	831.17/3 2,709	831.17/2 2,676	518.11/1 2,403	518.11/3 2,294	2 2,284	829.17/3 1,782	2 1,74	544.12/3 1,655	361.09 1,641
P. cryptogea	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i>	<i>P. cryptogea</i> 812.16/ 3	<i>P. cf. kelmaniana</i>	<i>P. cf. kelmaniana</i> 456.11/ 1	<i>P. cf. kelmaniana</i>	<i>P. gonapodyides</i>
846.17 Log skóre	846.17/2 2,79	812.16/1 2,737	846.17/3 2,678	812.16/2 2,633	3 2,592	456.11/3 2,356	1 2,275	456.11/2 2,25	419.10/2 1,723
P. gregata	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gregata</i> 865.17/ 3	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i> 831.17/ 2	<i>P. megasperma</i>	<i>P. rosacearum</i>
865.17 Log skóre	865.17/2 2,888	673.13/2 2,809	673.13/1 2,806	673.13/3 2,787	3 2,756	831.17/3 1,836	2 1,764	617.12/1 1,707	829.17/3 1,658
P. lacustris	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 361.09/ 2	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i> 398.10/ 1	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
385.10 Log skóre	385.10/2 2,749	385.10 2,599	361.09/1 2,586	385.10/3 2,578	2 2,445	361.09 2,439	1 2,426	398.10 2,347	398.10/2 2,312
P. multivora	<i>P. multivora</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. multivora</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. cinnamomi</i> 534.11/ 2	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. lacustris</i> 361.09/ 1	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. lacustris</i>
366.09 Log skóre	366.09/2 2,77	366.09/3 2,588	366.09 2,573	361.09/2 1,658	2 1,626	803.16/1 1,587	1 1,526	534.11/3 1,51	361.09 1,473
P. ramorum	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. ramorum</i>	<i>P. cf. kelmaniana</i>	<i>P. syringae</i> 620.12/ 3	<i>P. cf. kelmaniana</i>	<i>P. taxon Walnut</i>
754.15 Log skóre	754.15/3 2,804	345.09/3 2,784	345.09/2 2,72	754.15/2 2,612	345.09 2,572	456.11/3 1,369	3 1,239	456.11/2 1,165	518.11/3 1,103
P. taxon Rasperry	<i>P. taxon Rasperry</i>	<i>P. taxon Rasperry</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. chlamydosporax amnicola</i>	<i>P. gonapodyides</i> 419.10/ 2	<i>P. gregata</i>	<i>P. citrophthora</i> 635.13/ 2	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. cactorum</i>
483.11 Log skóre	483.11/3 2,805	483.11/2 2,493	778.15/1 1,766	803.16/3 1,686	2 1,633	865.17/2 1,564	2 1,56	419.10 1,556	862.17/3 1,525

<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. gonapodyides</i>
518.11 Log skóre	518.11/2	518.11/3	831.17/3	831.17/2	831.17/1	544.12/3	408	865.17/3	408.10/1
	2,685	2,638	2,403	2,386	2,383	1,868	1,683	1,638	1,626
<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>
531.11 Log skóre	531.11/3	851.17/3	851.17/2	531.11/2	862.17/1	862.17/3	851.17	862.17/2	578.12/3
	2,796	2,629	2,529	2,48	2,36	2,312	2,295	2,267	2,055
<i>P. cinna momi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. palmivora</i>	<i>P. cambivora</i>
534.11 Log skóre	534.11/3	534.11	534.11/2	382.10/1	382.10/2	382.10	114.07	453.11	416.10
	2,888	2,735	2,686	2,674	2,552	2,452	1,929	1,37	1,278
<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. rosacearum</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. megasperma</i>	<i>P. taxon Walnut</i>	<i>P. gregata</i>	<i>P. lacustris</i>	<i>P. lacustris</i>
544.12 Log skóre	544.12/3	544.11/2	829.17/3	361.09/2	617.12/2	518.11/1	865.17/3	398.10/1	295.09/1
	2,648	2,56	1,899	1,845	1,815	1,762	1,752	1,747	1,729
<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. hedraiaandra</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. polonica</i>
578.12 Log skóre	578.12/3	578.12/2	862.17/1	862.17/2	531.11/1	851.17/2	531.11/3	862.17/3	766.15/1
	2,785	2,543	2,238	2,135	2,04	2,024	1,933	1,861	1,699
<i>P. citrophthora</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. gonapodyides</i>	<i>P. polonica</i>	<i>P. hedraiaandra</i>
635.13 Log skóre	635.13/3	635.13/2	081.07	766.15/3	851.17/2	862.17/1	419.10/1	766.15/1	531.11/1
	2,772	2,688	2,482	1,781	1,757	1,628	1,516	1,511	1,477

Příloha 1. Přehledová tabulka všech naměřených MSP s výčtem nejlepších log skóre



Příloha 2. Fylogenetické vztahy rodu *Phytophthora* (Martin et al. 2012)