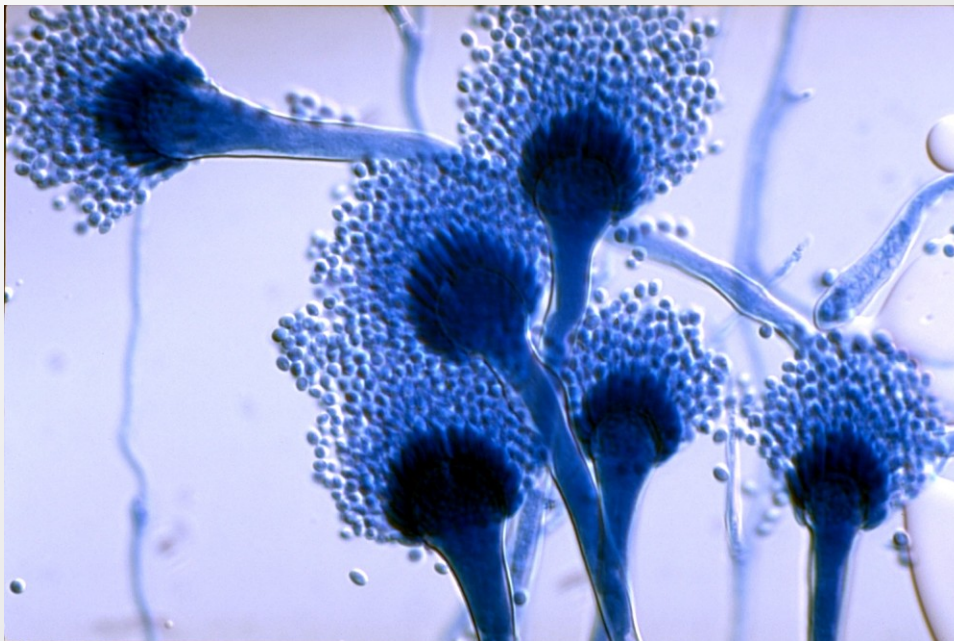




MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

Mikroskopické houby - rod *Aspergillus*



Aspergillus

- ☒ zástupci rodu *Aspergillus* - popsáno 339 druhů, cca 40 druhů popsáno jako původci mykotických infekcí u člověka
- ☒ ubikvitní saprofyty celosvětově rozšířeni, jsou přítomny v půdě, ve vzduchu, v rostlinných i živočišných zbytcích
- ☒ častý kontaminant potravin a krmiv
- ☒ **aspergilózy** - postižení respiračního systému původci povrchových
- ☒ **onychomykózy, otomykózy**
- ☒ **producenti mykotoxinů** (aflatoxin) poškozujících ledviny a játra, zdrojem jsou zejména arašídů, oříšky kešu, pistácie a sušené plody
- ☒ *Aspergillus acidus* - fermentace černého čaje
- ☒ *Aspergillus oryzae* - využíván k přípravě východoasijských potravinářských specialit (např. sojová omáčka)
- ☒ *Aspergillus niger* - produkce kyseliny citrónové

Nomenklatura

http://www.cbs.knaw.nl/publications/Sim78/Phylogeny-identification-and-nomenclature-of-the-genus-Aspergillus_2014_Studies-in-Mycology.pdf

available online at www.studiesinmycology.org

STUDIES IN MYCOLOGY 78: 141–173.

Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*

R.A. Samson^{1*}, C.M. Visagie¹, J. Houbraken¹, S.-B. Hong², V. Hubka³, C.H.W. Klaassen⁴, G. Perrone⁵, K.A. Seifert⁶, A. Susca⁵, J.B. Tanney⁶, J. Varga⁷, S. Kocsubé⁷, G. Szigeti⁷, T. Yaguchi⁸, and J.C. Frisvad⁹

¹CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, NL-3584 CT Utrecht, The Netherlands; ²Korean Agricultural Culture Collection, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, South Korea; ³Department of Botany, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; ⁴Medical Microbiology & Infectious Diseases, C70 Canisius Wilhelmina Hospital, 532 SZ Nijmegen, The Netherlands; ⁵Institute of Sciences of Food Production National Research Council, 70126 Bari, Italy; ⁶Biodiversity (Mycology), Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Agriculture & Agri-Food Canada, Ottawa, ON K1A 0C6, Canada; ⁷Department of Microbiology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, H-6726 Szeged, Hungary; ⁸Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan; ⁹Department of Systems Biology, Building 221, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark

*Correspondence: R.A. Samson, r.samson@cbs.knaw.nl

Abstract: *Aspergillus* comprises a diverse group of species based on morphological, physiological and phylogenetic characters, which significantly impact biotechnology, food production, indoor environments and human health. *Aspergillus* was traditionally associated with nine teleomorph genera, but phylogenetic data suggest that together with genera such as *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* and *Cristaspora*, *Aspergillus* forms a monophyletic clade closely related to *Penicillium*. Changes in the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants resulted in the move to one name per species, meaning that a decision had to be made whether to keep *Aspergillus* as one big genus or to split it into several smaller genera. The International Commission of *Penicillium* and *Aspergillus* decided to keep *Aspergillus* instead of using smaller genera. In this paper, we present the arguments for this decision. We introduce new combinations for accepted species presently lacking an *Aspergillus* name and provide an updated accepted species list for the genus, now containing 339 species. To add to the scientific value of the list, we include information about living ex-type culture collection numbers and GenBank accession numbers for available representative ITS, calmodulin, β -tubulin and RPB2 sequences. In addition, we recommend a standard working technique for *Aspergillus* and propose calmodulin as a secondary identification marker.

Aspergillus

Identifikace druhů rodu *Aspergillus*

Polyfázická taxonomie:

<http://www.cbs.knaw.nl/>

- ☒ morfologie - anamorfa, teleomorfa
- ☒ biochemie - sledování produkce sekundárních metabolitů
- ☒ fyziologie - růst při 25, 37 °C
- ☒ molekulární znaky – ITS, kalmodulin (CaM), β -tubulin (BenA) nebo RNA polymeráza II (podjednotka RPB2)

Identifikace do rodu a druhu – části genu pro rRNA (18S, 5,8S a 28S) nebo sekvence mezerníků (ITS)

Vnitrodruhová typizace aspergilů

- ☒ multilokusová sekvenční typizace (MLST) – sekvenování fragmentů „referenčních“ genů

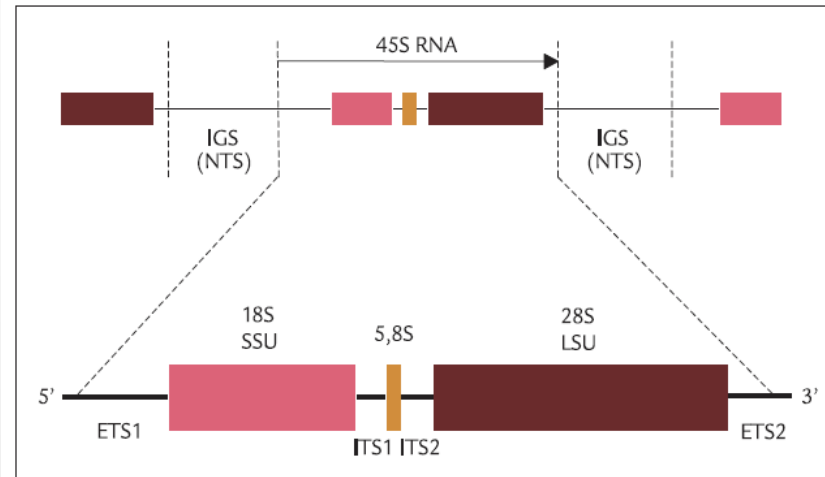


Schéma 1. Schéma rRNA genu.

SSU – malá podjednotka; LSU – velká podjednotka; IGS – mezigenový NTS – non-transcribed spacer; ETS – external transcribed spacer; ITS – internal transcribed spacer.

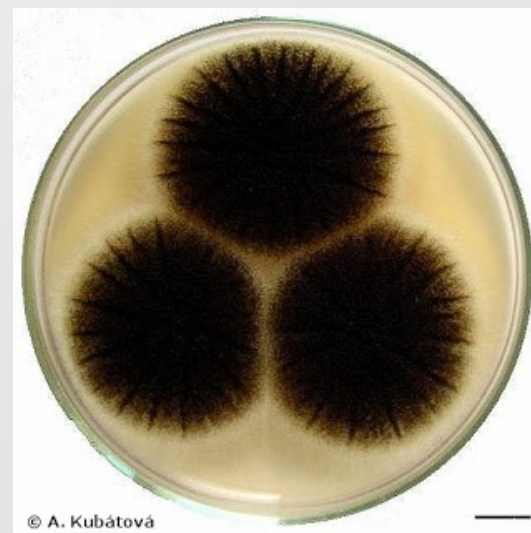
Aspergillus - morfologie

Makroskopické znaky

- rychle rostoucí, plně vybarvené kolonie do pěti dnů
- kolonie bohatě pigmentované (v odstínech žluté, žlutozelené, zelené, zelenomodré, hnědé a černošedé)
- pigmentace je výrazná na Czapek-Doxově agaru (CZ)
- kolonie se hodnotí na standardních živných médiích: Czapkův agar s kvasničným extraktem (CYA), agar se sladovým extraktem (MEA), CZ při standardní kultivační teplotě: 25 C, 37 C

Makroskopické znaky:

- rychlost růstu
- zbarvení kolonií, spodní strany kolonií
- povrchová struktura kolonií
- velikost kolonií po 7, 10, 14 dnech
- vzhled konidiální hlavice pod binokulární lupou



Aspergillus

Makroskopické znaky



Aspergillus

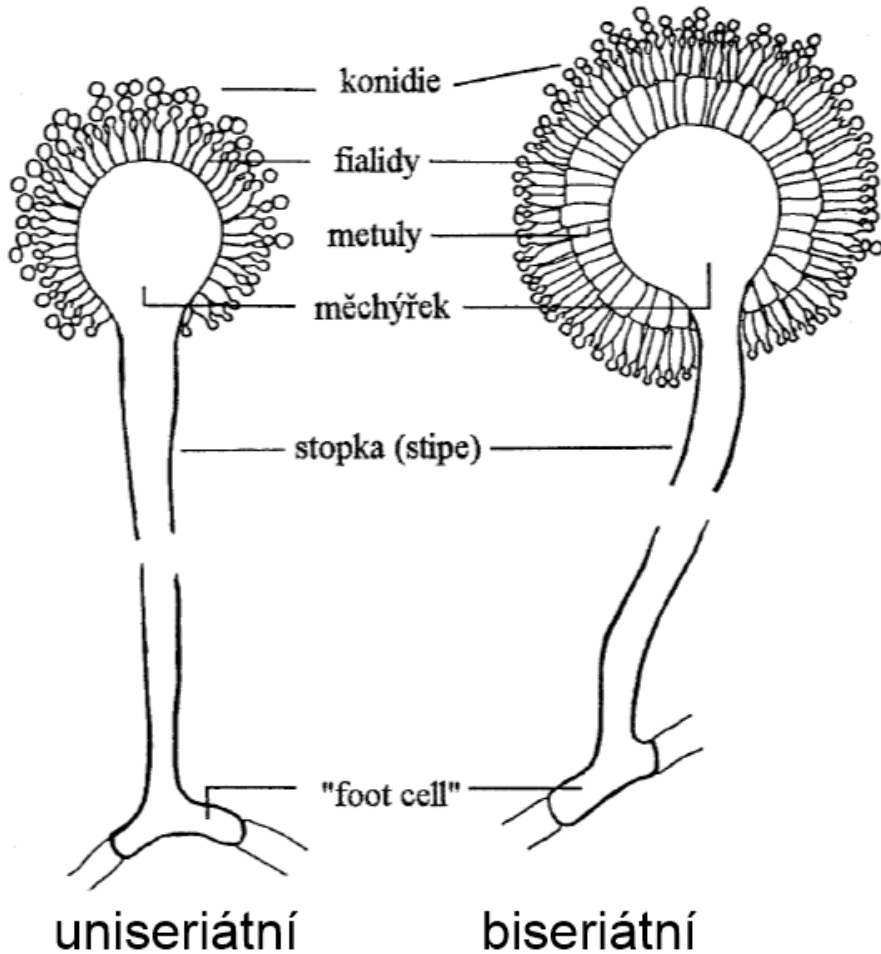
Mikroskopické znaky

Nepohlavní stádium

- **konidiofor** vyrůstá přímo ze substrátu nebo ze vzdušných hyf
- měchýřek (**kolumelu**)
- **fialidy** (konidiogenní buňky) v jedné nebo ve dvou řadách nad sebou (uniseriátní a biseriátní)
- konidiální hlavice - měchýřek s fialidami a řetězci konidií
- tlustostěnné buňky zvané „Hülle cells“ se vytvářejí na konci vláken nebo interkalárně

Aspergillus

Mikroskopické znaky



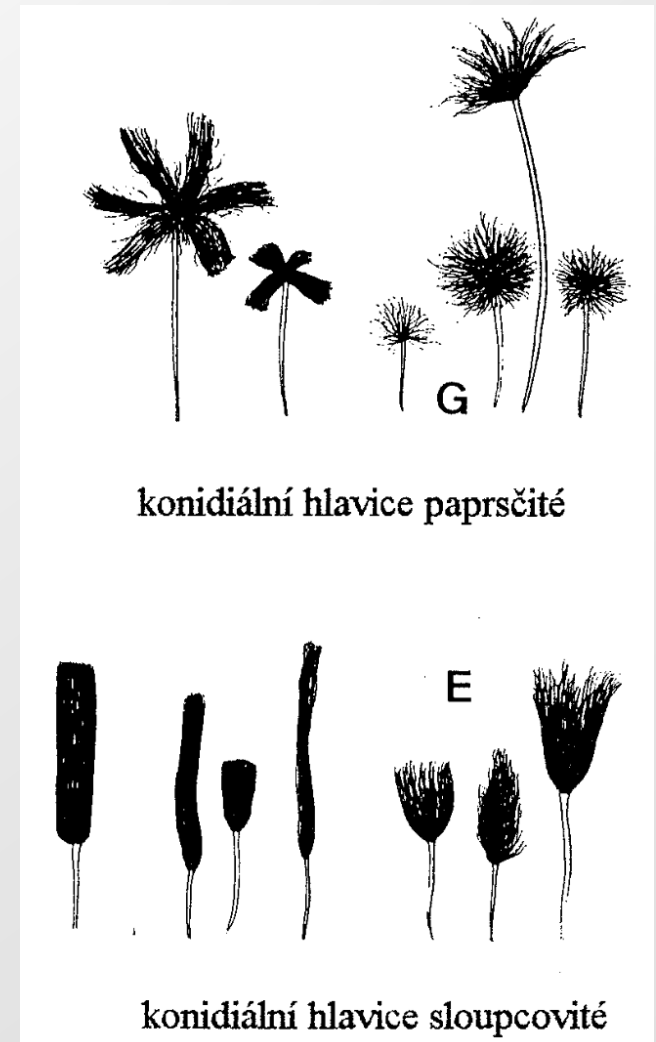
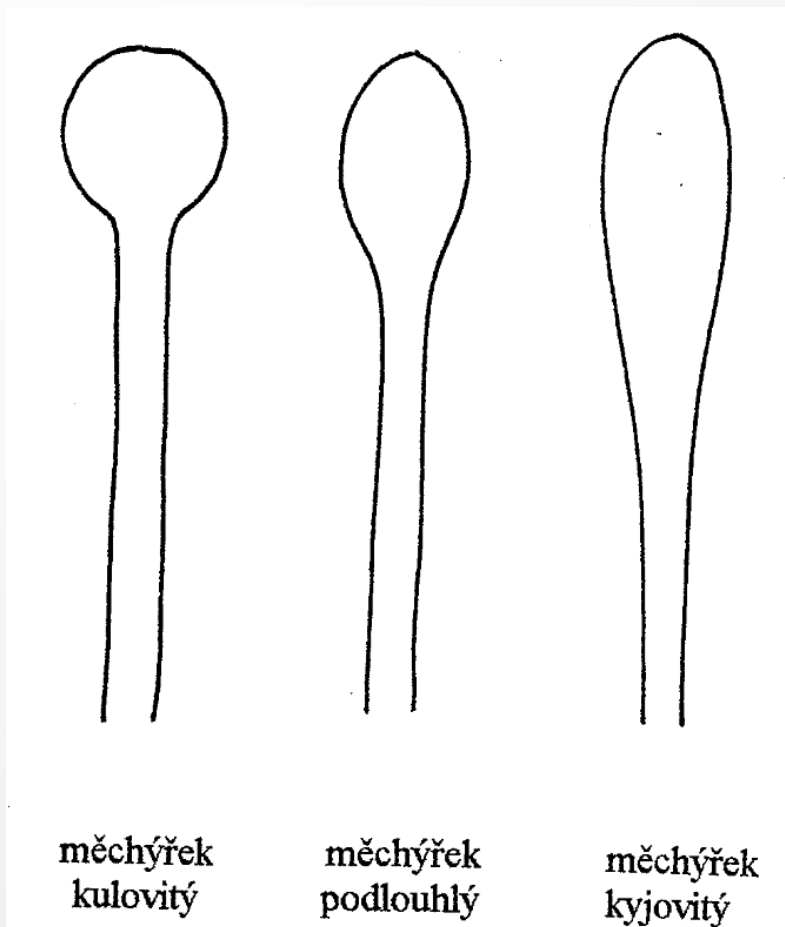
2 typy konidioforů



"hulle - cells"

Aspergillus

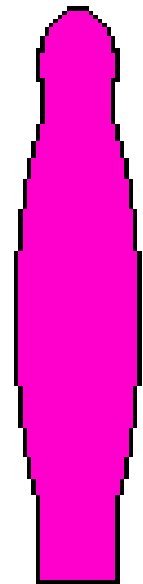
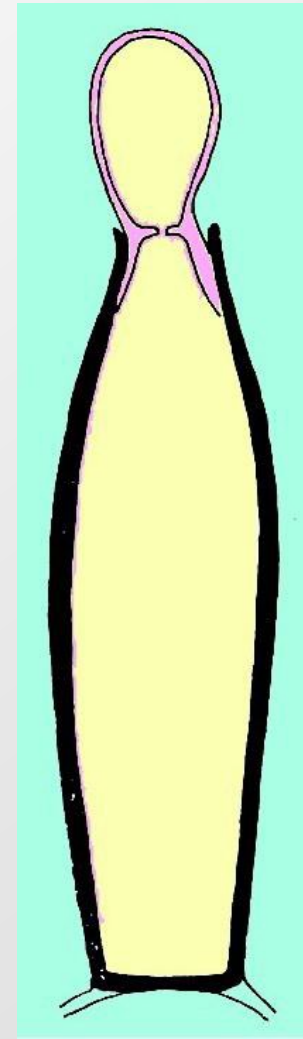
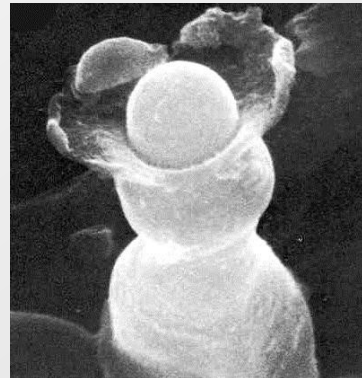
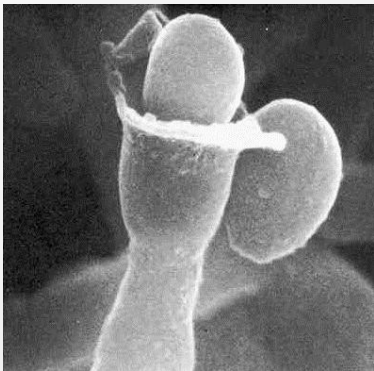
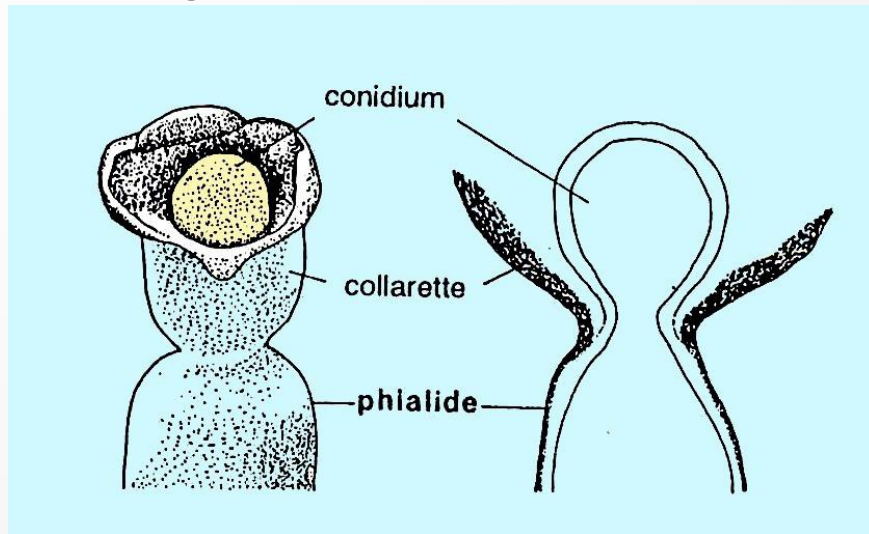
Mikroskopické znaky



Aspergillus - konidiogeneze

ENTEROBLASTICKÁ PHIALIDICKÁ KONIDIOGENEZE

- konidiogenní buňka - **fialida**

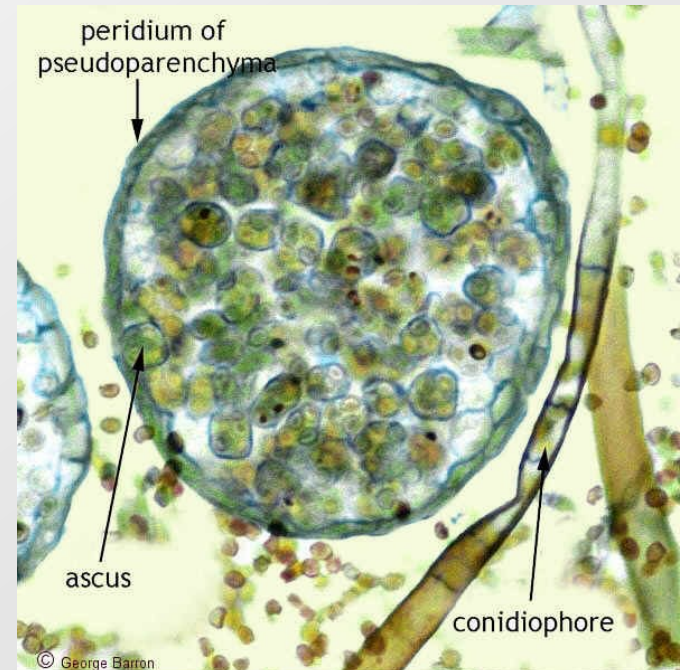
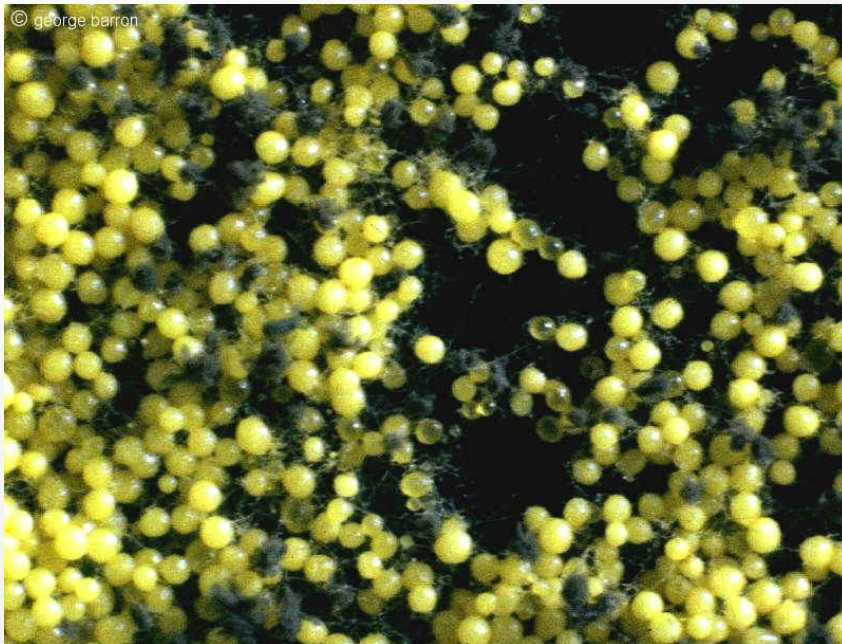


Aspergillus

Mikroskopické znaky

Pohlavní stádium

- tvorba drobných plodnic (menších než 1 mm) typu **kleistothecium**
- tyto druhy se řadí do rodu *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya*



Aspergillus

Kleistothecium

- uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřečka nejsou nijak uspořádána

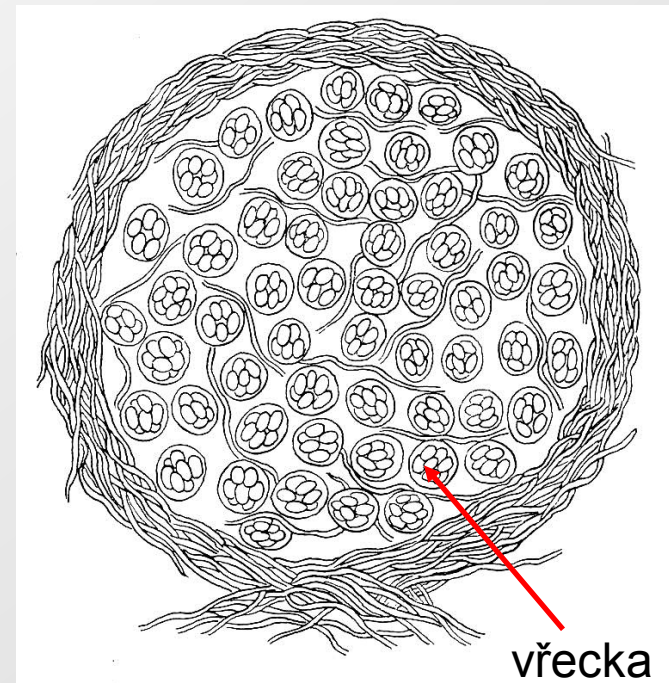


Schéma metod pro identifikaci rodu *Aspergillus*

Spore suspension

- 30 % glycerol + 0.05 % agar + 0.05 % Tween 80 (store at -80 °C)
- 0.2 % agar + 0.05 % Tween80 (store at 4°C)

↓ Micropipette (0.5–1 µl/spot)

Media

- Recommended: CYA & MEA
- Optional: CZ, YES, DG18, OA, CREA, MEAbI, CY20S, ME20S
- 90 mm polystyrene Petri dish
- 20 ml media per plate

Incubate

- 7 days, 25 °C
- Additional CYA at 30, 37 & 50 °C
- Plates unwrapped
- In the dark
- Allow for sufficient aeration

Morphological characterisation

- **Macromorphology**
 - Characters: colony growth rates, texture, degree of sporulation, production of sclerotia or cleistothecia, colours of mycelia, sporulation, soluble pigments, exudates, colony reverses, sclerotia, Hülle-cells and cleistothecia
- **Micromorphology**
 - Preparations made from MEA
 - Mounting fluid: 60 % lactic acid
 - Wash excess conidia away with 70 % ETOH
 - Characters: shape of conidial heads, the number of branching points between vesicle and phialides (i.e. uniseriate or biseriata), colour of stipes, and the dimensions, shapes and textures of stipes, vesicles, metulae (when present), phialides, conidia, Hülle-cells (when present), cleistothecia, asci and ascospores

Extrolites

- CYA and YES
- 5 plugs pooled in one vial
- Extraction: ethyl acetate/dichloromethane/methanol (3:2:1) (v/v/v) with 1 % (v/v) formic acid
- Filtered and analysed by HPLC (Frisvad & Thrane 1987, 1993, Smedsgaard 1997, Klitgaard *et al.* 2014)

Molecular identification

- **Sequencing**
 - Genes for identification: ITS, *CaM*
 - Genes for phylogeny: *BenA*, *RPB2*
- Compare ITS/*CaM* to reference database
 - BLAST (↑ unreliable sequences)
 - RefSeq-BLAST (Verified ITS sequences)
 - Local BLAST (ICPA reference sequences)

Aspergillus

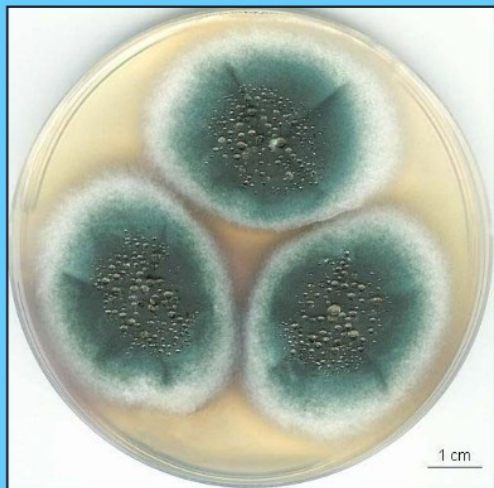
Aspergillus fumigatus

- ☒ kontaminant potravin, oportunní patogen člověka a jiných živočichů
- ☒ častý ve vlhkém teplém prostředí (kompost, ale i zvlhčovací systémy, obytné prostory)
- ☒ zodpovědný za 90% všech případů IA
- ☒ termotolerantní - roste i při 55 C
- ☒ produkuje mykotoxiny gliotoxin, verruculogen, fumitremorginy aj.

Aspergillus

Aspergillus fumigatus

- ☒ kolonie rychle rostoucí při 25 i 37 °C, zelené, sametové



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

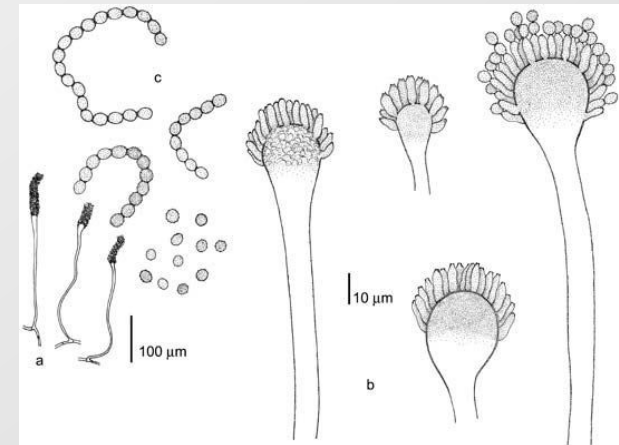


MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus fumigatus

- konidiofory uniseriátní s široce kyjovitým měchýřkem
- konidiální hlavice typicky sloupcovité
- konidie kulovité nebo téměř kulovité, zelené, bradavčité, 2,5-3 μm v průměru



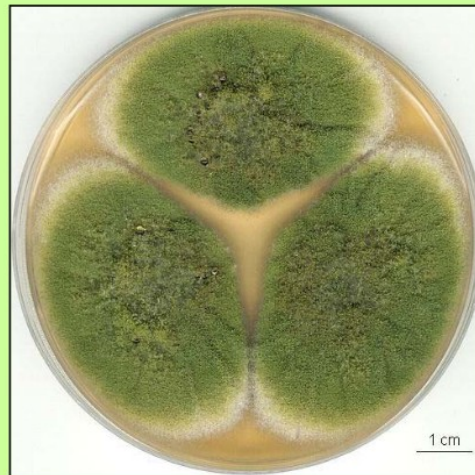
Aspergillus

Aspergillus flavus

- ☒ kolonie rychle rostoucí, žlutozelené, roste i při teplotě až 48 °C
- ☒ výskyt v půdě, na potravinách (arašídý, koření, obiloviny apod.)
- ☒ produkuje mykotoxin aflatoxin B1, 3-nitropropionovou kyselinu, kojovou, aspergilovou a cyklopiazonovou kyselinu



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C



MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus flavus

- ☒ konidiofory biseriátní i uniseriátní, bradavičnaté s kulovitým nebo téměř kulovitým měchýřkem
- ☒ konidiální hlavice paprscité
- ☒ konidie kulovité nebo téměř kulovité, bradavčité

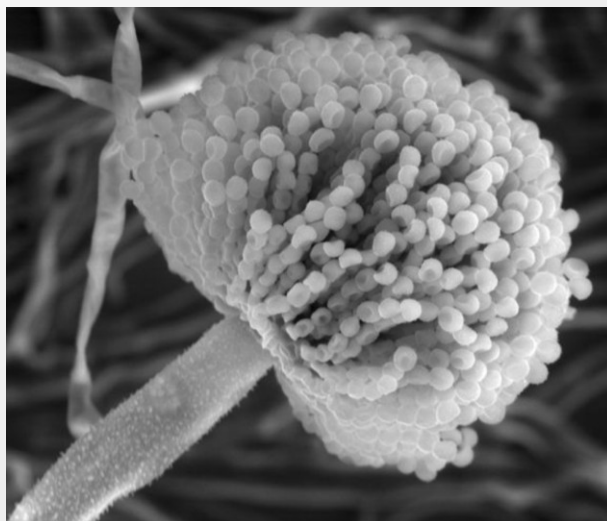


Foto.: J. Machač

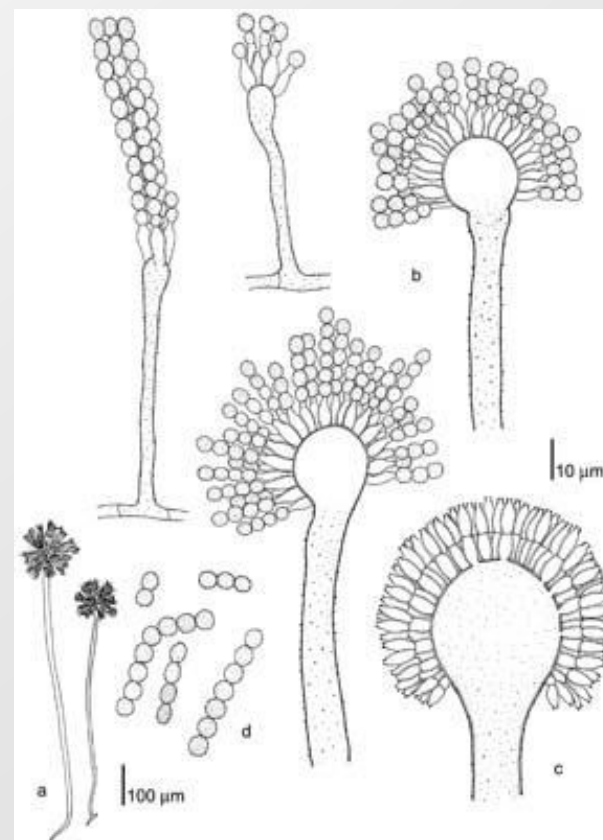
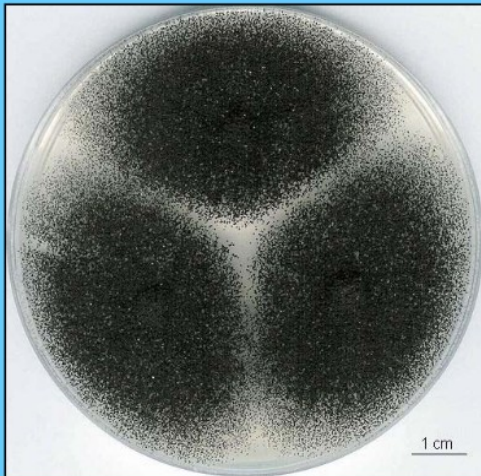


Foto.: A. Kubátová

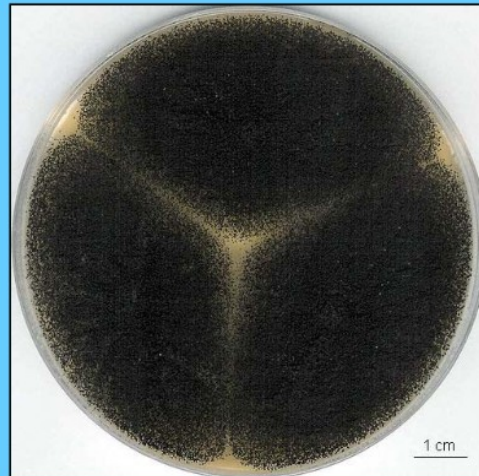
Aspergillus

Aspergillus niger

- ☒ kontaminant potravin rostlinného tak i živočišného původu
- ☒ produkce kyseliny citrónové
- ☒ produkuje naphtho-4-pyrony, malforminy a u několika kmenů byla zaznamenána produkce ochratoxinu A
- ☒ kolonie rychle rostoucí, černé, zrnité, často produkuje žlutý pigment do agaru



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

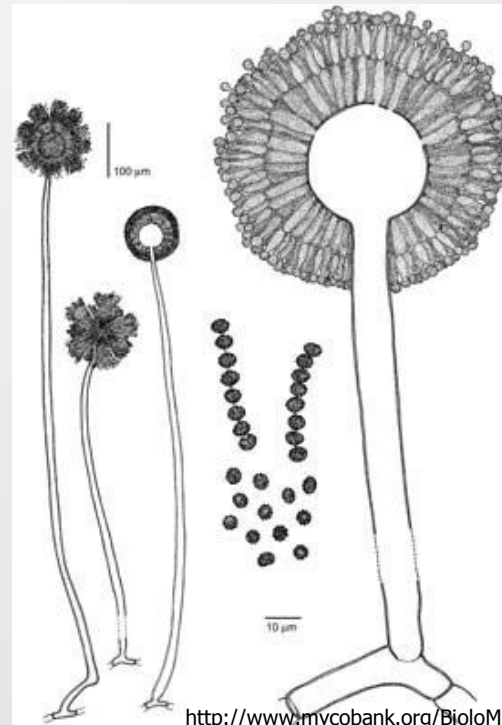


MEA 7 dní, 25 °C

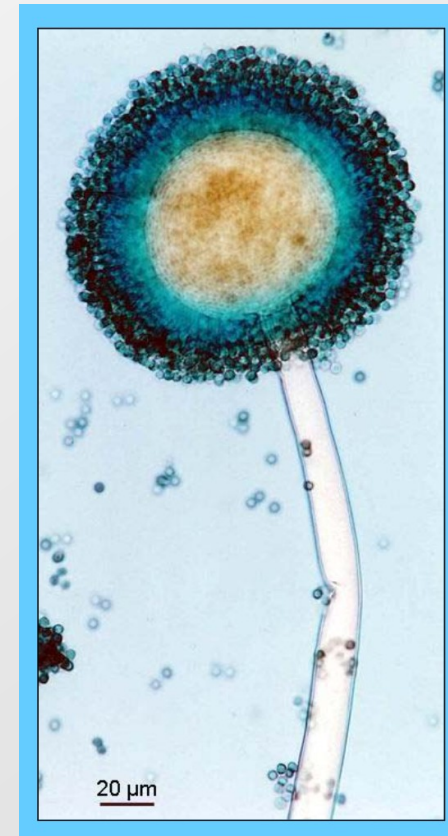
Aspergillus

Aspergillus niger

- konidiofory biseriátní, hladké s kulovitým měchýřkem
- konidiální hlavice paprsčité
- konidie kulovité nebo téměř kulovité, černé, nepravidelně bradavčité, 3,5-5 μm v průměru



<http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=2506&Fields=All>



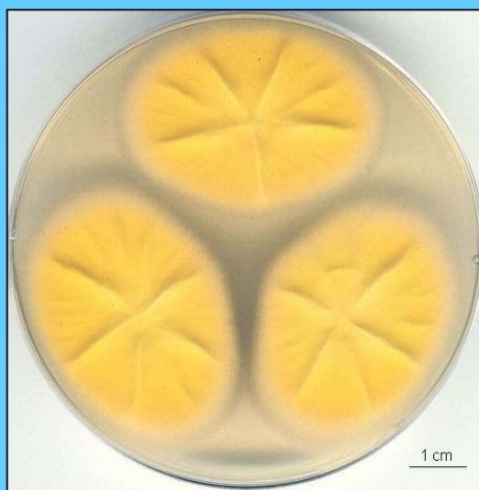
Aspergillus

Aspergillus terreus

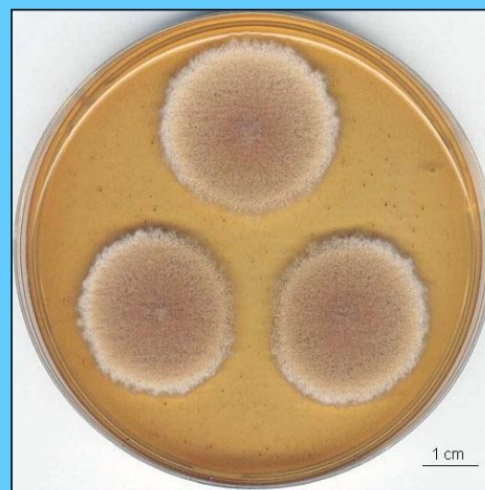
- ☒ kolonie rychle rostoucí, okrové, sametové, roste i při 37 °C
- ☒ výskyt na potravinách a v prostředí budov, bývá izolován i z půdy



CYA 7 dní, 25 °C



**CYA 7 dní, 25 °C,
revers**



MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus terreus

- konidiofory biseriátní, hladké s téměř kulovitým měchýřkem
- konidiální hlavice sloupcovité
- konidie kulovité až elipsoidní, hladké, malé, 1,5 - 2,5 μm v průměru
- na substrátovém myceliu se tvoří kulovité buňky

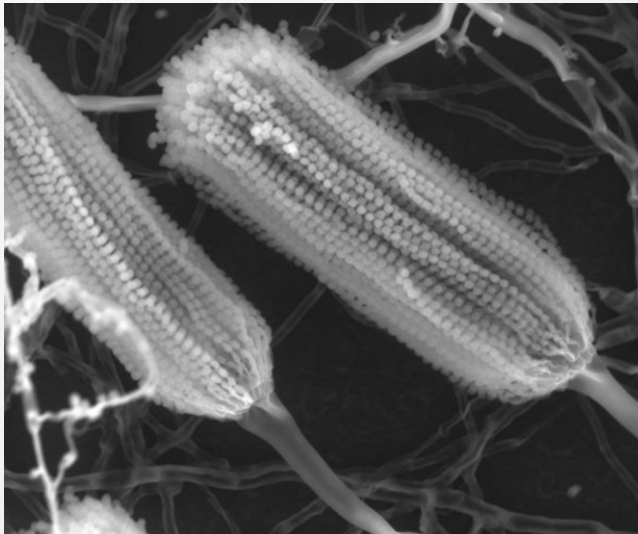
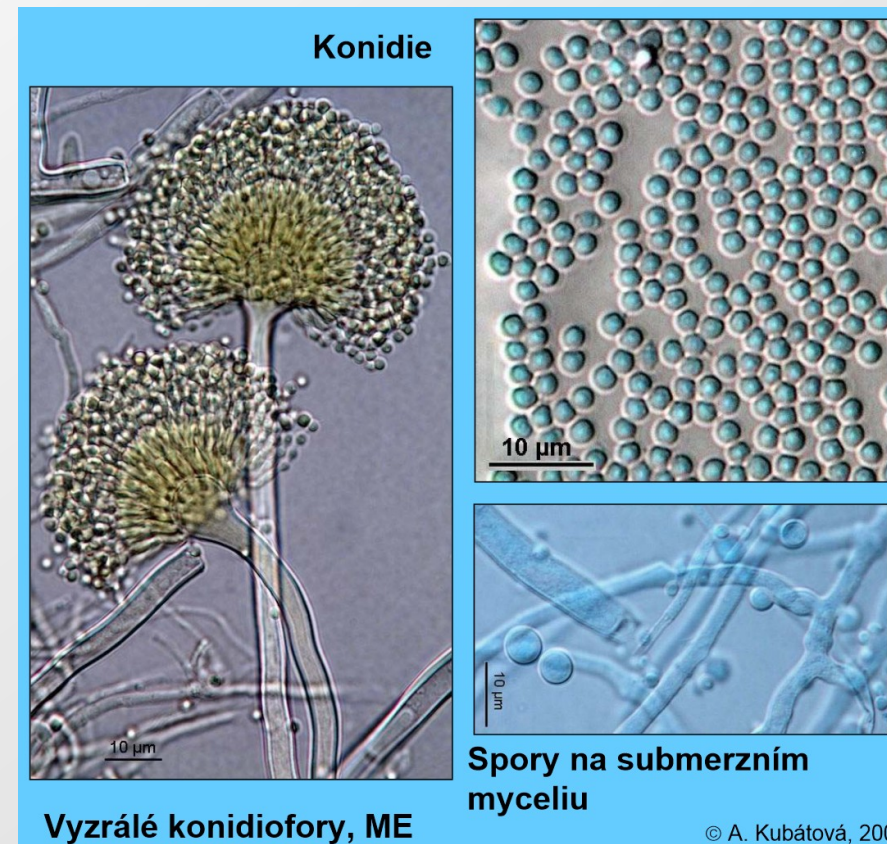


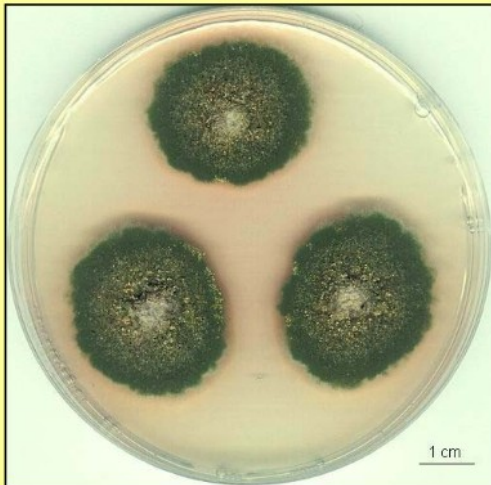
Foto.: J. Machač



Aspergillus

Aspergillus nidulans

- ☒ kolonie rychle rostoucí při 25 i 37 °C, sametové, zelené
- ☒ tvorba plodnic - *Emericella nidulans*
- ☒ kontaminant potravin
- ☒ produkuje mykotoxin sterigmatocystin aj.



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

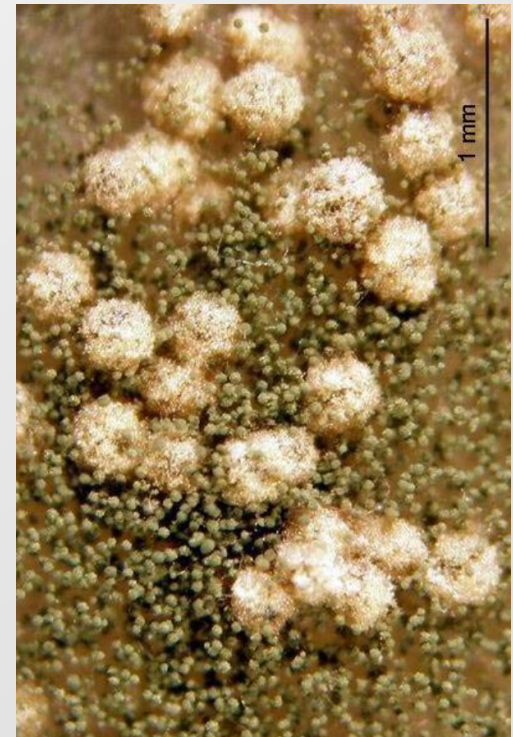
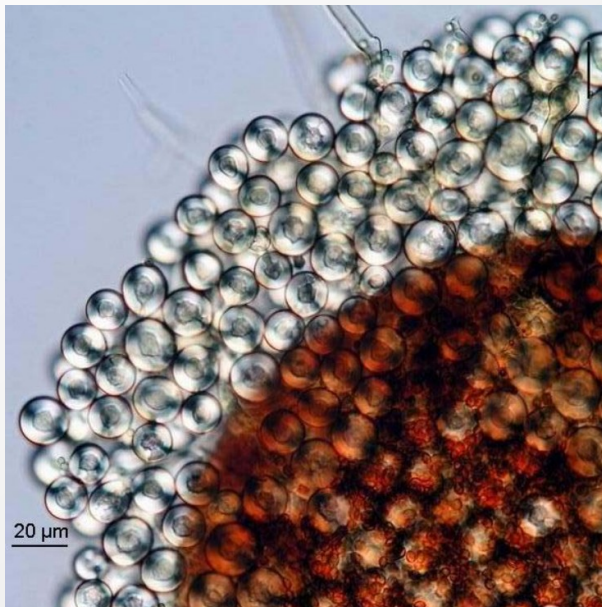


CYA 7 dní, 37 °C

Aspergillus

Aspergillus nidulans

- plodnice kulovité, 100-300 μm v průměru, obalené vrstvou světle žlutých až béžových „hülle cells“
- vřecka kulovitá, s 8 askosporami, askospory červené, čočkovitě zploštělé, hladké, se 2 obvodovými hřebínky



Aspergillus

Aspergillus nidulans

- konidiofory biseriální, hladké, nahnědlé s kulovitým měchýřkem
- konidie v řetězcích, kulovité, bradavčité

