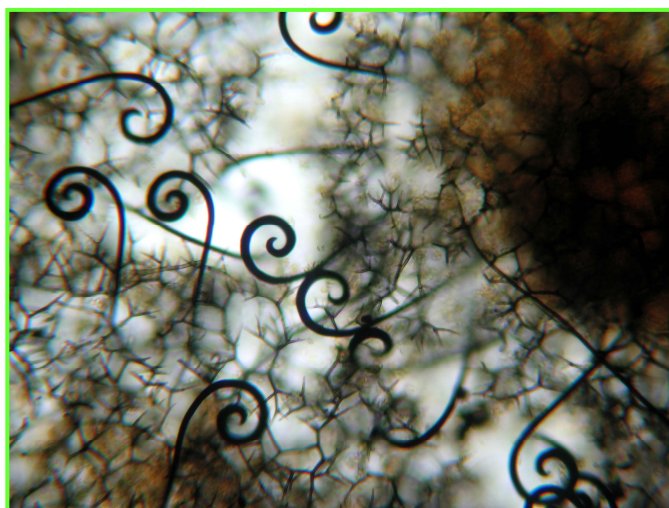


# **Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007**

České Budějovice, 4.-5. září 2007

**Proceedings of the workshop MICROMYCO 2007  
held in České Budějovice, Czech Republic, September 4.-5., 2007**

**Alena Nováková**



Ústav půdní biologie  
Biologické centrum Akademie věd České republiky, v.v.i.  
České Budějovice

Institute of Soil Biology  
Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. České  
Budějovice

**2007**

# Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007

**Editor:** Alena Nováková

Ústav půdní biologie BC AV ČR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

Telefon: +420 385 310 134, +420 385 777 1739

Fax: +420 385 310 133

E-mail: [upb@upb.cas.cz](mailto:upb@upb.cas.cz)

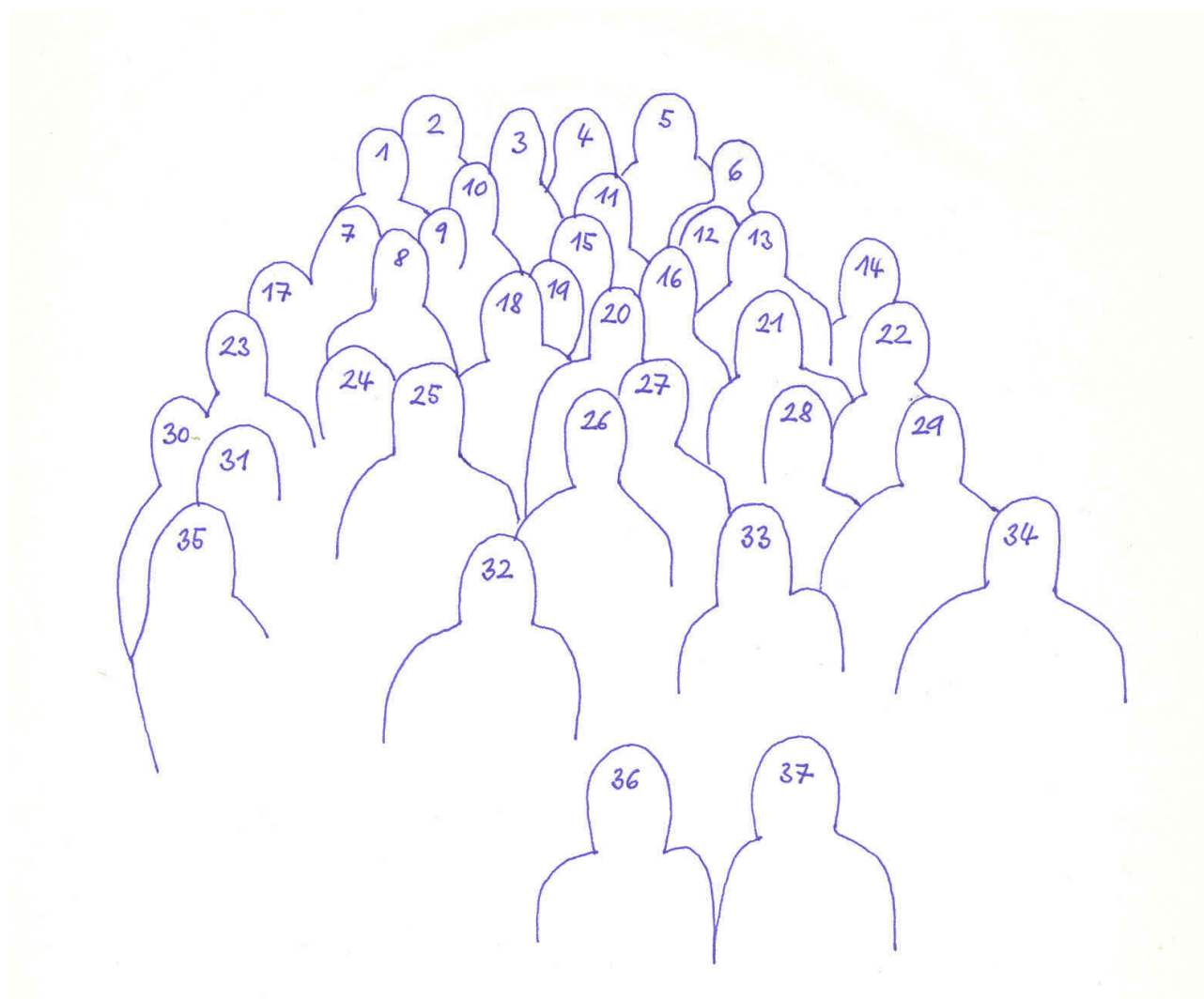
Fotografie na přední straně: *Myxotrichum chartarum* Kunze, zvětšení 12,5 x 40

© A. Nováková

© Ústav půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i., 2007

ISBN 978-80-86525-10-5





1 – David Novotný, 2 - Alexandra Šimonovičová, 3 – Božena Jandová, 4 – Barbora Mieslerová, 5 – Michaela Sedlářová, 6 – Blanka Lašťovičková, 7 - Tereza Konvalinková, 8 - Ondřej Koukol, 9 – Ludmila Slezáková, 10 – Zdeněk Přikryl , 11 – Lucie Soukupová, 12 – Mária Dovičičová, 13 – Soňa Felšóciová, 14 – Hana Lukšanová, 15 – Jana Remešová, 16 – Zuzana Piovarčiová, 17 – Dana Savická, 18 – Taťána Sumíková, 19 – Martina Hujšlová, 20 – Roman Labuda, 21 – Dana Tančinová, 22 – Miroslav Kolařík, 23 – Michal Černý, 24 – Jana Hrdinová, 25 – Dana Hanuláková, 26 – Alena Kubátová, 27 – Eva Prenerová, 28 – Bohumila Voženílková, 29 – Karel Prášil, 30 – Martina Malinová, 31 – Jolana Kyseláková, 32 – Eleonora Franková, 33 – Ivana Šafránková, 34 – Jiří Jirout, 35 – Elena Piecková, 36 – Alena Nováková, 37 – Zuzana Kolláriková

## Obsah

Program workshopu.....	1
Prášil, K. - Krátká historie Sekce pro studium mikroskopických hub České vědecké společnosti pro mykologii.....	3
Dovičičová, M. et al. - Izolácia <i>Pithomyces chartarum</i> z potravinárskej pšenice.....	5
Felšöciová, S. et al. - Výskyt <i>Penicillium</i> spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006.....	9
Hujslová, M. et al. - Mikroskopické houby extrémne kyselých zasolených pôd.....	16
Kolláriková, Z., Piecková, E. - Mikroskopické vláknité houby vo vnútornom prostredí tokajských vínnych pivníc.....	24
Kolařík, M. - Zkušenosti se studiem hub z požerků kůrovců.....	31
Koukol, O. - Mikroskopické houby na opadu jehličnatých dřevin - nové otazníky kolem „starých známých“.....	37
Kubátová, A. et al. - Oportunně patogenní vláknité mikromycety ve Sbírce kultur hub (CCF) v Praze.....	40
Labuda, R. - Nové zdroje klinicky významných húb v životnom prostredí človeka na Slovensku.....	52
Labuda, R., Kačínová, J. - Nové nálezy mikroskopických húb z rodu <i>Chrysosporium</i> , <i>Malbranchea</i> a <i>Myceliophthora</i> zo Slovenska.....	60
Labuda, R. - Notes to the identification of <i>Trichoderma tomentosum</i> and its close relatives within the section <i>Pachybasium</i> .....	64
Mieslerová, B. et al. - Nové potvrzené výskyty padlí na okrasných rostlinách v České republice.....	74
Nováková, A. – Zajímavé nálezy hub z České a Slovenské republiky.....	81
Nováková, A., Chroňáková, A. - Vyskytuje se <i>Histoplasma capsulatum</i> v jeskyních střední Evropy?.....	89
Novotný, D. - Studium endofytických hub zemědělsky významných rostlin.....	97
Piecková, E. et al. - Vyšetrenie vonkajšej, viditeľnej a skrytej vnútornej mykoflóry obytných budov v rôznych oblastiach SR.....	102
Piovarčiová, Z. - <i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber, potenciálny zdroj A- a B- trichotecénov v obilninách.....	117
Piovarčiová, Z. et al. - Výskyt <i>Alternaria</i> spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006.....	124
Prenerová, E. - Studium využiteľnosti entomopatogénnej houby <i>Paecilomyces farinosus</i> (Deuteromycota) proti vajíčkom a 1. instarom ploškohřbetky smrkové <i>Cephalcia abietis</i> (Insecta, Hymenoptera).....	133
Sedlářová, M., Lebeda, A. - Patogeny rostlin – peronosporální „houby“.....	140
Slezáková, L. - Potenciálně toxinogenní mikromycety na transgenní Bt-kukuřici a na netransgenních hybridech kukuřice.....	143
Sumíková, T. et al. - Toxinogenní mikromycety r. <i>Fusarium</i> a jejich chemotypy .....	151
Šafránková, I., Müller, J. - Výskyt rzivosti libečku.....	158
Šimonovičová, A. - Mikroskopické houby v interiéroch historických budov.....	163
Tančinová, D. et al. - Endogénna kontaminácia v zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006.....	169
Voženílková, B. et al. - Problematika <i>Erysiphe trifolii</i> na <i>Lathyrus pratensis</i> L. ....	176
Voženílková, B., Moudrý, J. - Sledování mikroskopických hub na semenech <i>Panicum milliaceum</i> .....	182
Havránková, M., Gryndler, M. - Saprotrovní houby v rhizosféře chrastice rákosovité ( <i>Phalaris arundiancea</i> ).....	185
Abecední seznam účastníků a představení jejich pracovního zaměření.....	194
Představení pracovišť.....	204
Lukšanová, H. - Studium patogenity hub na hostitele na bázi oxidašního stresu (dodáno po uzávěrce).....	212

## Program workshopu

<b>ÚTERÝ 4.9.</b>			
10:30	<b>ZAHÁJENÍ WORKSHOPU</b>		
10:35	10:50	K. Prášil	Sekce pro studium mikroskopických hub ČVSM – historie a současnost
10:50	11:05	K. Prášil T. Konvalinková	představení pracovního zaměření
11:05	11:30	Alexandra Šimonovičová	Mikroskopické huby v interiérech historických budov + <b>představení pracovního zaměření</b>
11:30	11:55	Elena Piecková	Informácia o medzinárodnej sieti ECMM/ISHAM pre studium <i>Pseudoallescheria/Scedosporium</i> + <b>představení pracovního zaměření</b>
11:55	12:20	Zuzana Kolláriková	Mikromycéty v prostredí tokajských vinných pivníc + <b>představení pracovního zaměření</b>
<b>12:30</b>	<b>13:00</b>	<b>OBĚD</b>	
<b>13:00</b>	<b>13:30</b>	<b>PŘESTÁVKA NA KÁVU</b>	
13:30	14:35	<b>POSTER SESSION</b>	
14:35	15:00	David Novotný	Studium endofytických hub rostlin + <b>představení pracovního zaměření</b>
15:00	15:30	<b>Dana Tančinová</b> , Labuda R., Felšóciová S., Piovarčiová Z., Dovičičová M.	Endogénna kontaminácia v zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006 + <b>představení pracovního zaměření celé pracovní skupiny</b>
15:30	15:45	<b>Soňa Felšóciová</b> , Labuda R., Tančinová D.	Výskyt <i>Penicillium</i> spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006
15:45	16:00	<b>Zuzana Piovarčiová</b> , Labuda R., Tančinová D.	Výskyt <i>Alternaria</i> spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006
16:00	16:15	<b>Mária Dovičičová</b> , Labuda R., Tančinová D.	Prvá izolácia <i>Pithomyces chartarum</i> z potravinárskej pšenice
<b>16:15</b>	<b>16:30</b>	<b>PŘESTÁVKA NA KÁVU</b>	
16:30	16:50	Elena Piecková	Atestované laboratórium mykologie vnútorného prostredia a požívatin – mikromycéty vo vnútornom prostredí budov v SR
16:50	17:15	Roman Labuda	Poznámky k identifikácii <i>Trichoderma tomentosum</i> a blízkych druhov zo sekcie <i>Pachybasium</i>
17:15	17:35	<b>A. Šimonovičová</b> , A. Nováková	<i>Piptocephalis lepidula</i> - nový druh pro Slovensko
17:35	17:55	Roman Labuda	Nové zdroje klinicky významných húb v životnom prostredí človeka na Slovensku
<b>19:00</b>	<b>SPOLEČNÁ VEČEŘE</b>		
<b>středa 5.9.</b>			
8:30	8:40	B. Mieslerová, B. Voženílková	představení pracovního zaměření
8:40	9:05	Ondřej Koukol	Mikroskopické houby opadu jehličnatých dřevin; nové otazníky kolem „starých známých“ + <b>představení pracovního zaměření</b>
9:05	9:30	Michaela Sedlářová	Patogeny rostlin – oomycety a padlí + <b>představení pracovního zaměření</b>
9:30	9:55	Hana Lukšanová	Studium patogenity hub na hostitele + <b>představení pracovního zaměření</b>
9:55	10:05	L. Soukupová, Z.	představení pracovního zaměření

		Přikryl	
<b>10:05</b>	<b>10:40</b>	<b>PŘESTÁVKA NA KÁVU</b>	
10:40	10:50	D. Savická D. Hanuláková	představení pracovního zaměření
10:50	11:15	Miroslav Kolařík	Zkušenosti se studiem hub z požerků kůrovců + <b>představení pracovního zaměření</b>
11:15	11:35	M. Malinová + J. Remešová, J. Kyseláková, B. Lašťovičková	představení pracovního zaměření
11:35	12:00	Alena Nováková	Výskytuje se <i>Histoplasma capsulatum</i> v jeskyních střední Evropy? + <b>představení pracovního zaměření</b>
12:00	12:10	L. Slezáková T. Sumíková	představení pracovního zaměření
<b>12:30</b>	<b>13:00</b>	<b>OBĚD</b>	
13:00	13:25	Alena Kubátová, Prášil K., Dobiášová S.	Oportunně patogenní vláknité mikromycety ve Sbírce kultur hub (CCF) v Praze + <b>představení pracovního zaměření</b>
13:25	13:50	Martina Hujslová	Mikroskopické houby extrémně kyselých zasolených půd + <b>představení pracovního zaměření</b>
13:50	14:10	Alena Nováková	Zajímavé nálezy hub z České a Slovenské republiky
14:10	14:15	J. Jirout	představení pracovního zaměření
<b>14:15</b>	<b>14:55</b>	<b>PŘESTÁVKA NA KÁVU</b>	
<b>15:00</b>		<b>UKONČENÍ WORKSHOPU</b>	

### Vystavené postery:

Barbora Mieslerová , Lebeda A., Rybka V., Sedlářová M., Petrželová I.	First record of powdery mildew on <i>Homolocladium platycladum</i> in the Czech Republic
Zuzana Piovarčiová, Labuda R., Tančinová D.	<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenweber, potenciální zdroj A- a N – trichohecénov v obilninách
Roman Labuda	Nové nálezy mikroskopických húb z rodu <i>Chrysosporium</i> , <i>Malbranchea</i> a <i>Myceliophthora</i> zo Slovenska
Ivana Šafránková, Müller J.	Výskyt rzivosti libečku v České republice
Bohumila Voženílková, Kobes M., Klimeš F.	Problematika <i>Erysiphe trifolii</i> na <i>Lathyrus pratensis</i> L.
Bohumila Voženílková, Moudrý J.	Sledování mikroskopických hub na semenech <i>Panicum milliaceum</i>
Eva Prenerová	Studium využitelnosti entomopatogenní houby <i>Paecilomyces farinosus</i> (Deuteromycota) proti vajíčkům a prvním instarům ploskohřbetky smrkové, <i>Cephalcia abietis</i> (Insecta, Hymenoptera)
Ludmila Slezáková	Potentially toxigenic micromycetes on transgenic Bt-maize and nontransgenic hybrids of maize
Taťána Sumíková	Toxinogenní mikromycety r. <i>Fusarium</i> a jejich chemotypy

## **Krátká historie Sekce pro studium mikroskopických hub České vědecké společnosti pro mykologii**

Sekce byla založena v r. 1985 v rámci tehdejší Československé vědecké společnosti pro mykologii při ČSAV. Sekce vznikla v návaznosti na celostátní seminář „Dosavadní vývoj, současný stav a perspektivy studia mikromycetů v ČSSR“, který Společnost uspořádala u příležitosti významných výročí vynikajícího mykologa A. C. J. Cordy (1809-1849), který se jako první na našem území právě mikroskopickými houbami zabýval.

V době svého vzniku měla sekce kolem 50 členů z Čech, Moravy i Slovenska, většinou z řad mykologů profesionálně zaměřených na problematiku mikroskopických hub (fytopatologové, hygienici, lékaři, farmaceuti, mikrobiologové, ale i vědečtí pracovníci základního výzkumu a studenti mykologie). Sekce však byla a stále zůstává otevřená i dalším zájemcům, kteří se o mikromycety zajímají jen příležitostně.

Práci sekce v prvních letech řídil tříčlenný výbor ve složení RNDr. M. Svrček, CSc. (předseda), RNDr. V. Holubová, CSc. (ř) a prom. biol. K. Prášil, CSc. (jednatel). Sekce v těchto letech uspořádala několik celostátních seminářů, neformálních setkání a exkurzí. V následujícím období se činnost sekce postupně redukovala (podobně jako i aktivita ostatních sekcí Společnosti), především v důsledku sociálně-profesních změn v životě členské základny.

Základnímu výzkumu mikroskopických hub se u nás věnuje pouze několik specialistů, ale mnoho dalších pracovníků, zaměřených na fytopatologii, lesnickou, potravinářskou nebo zdravotnickou praxi se s mikroskopickými houbami setkává. Přitom často narážejí na četné problémy při určování mikromycetů a při diagnostice chorob či změn, jež tyto houby způsobují na jiných organismech, surovinách a životním prostředí člověka.

Hlavním úkolem sekce je posílit vzájemný kontakt mezi pracovníky, kteří se studiem mikroskopických hub zabývají. To se děje především formou teoreticky i prakticky zaměřených seminářů a odborných exkurzí. Dalším smyslem činnosti sekce je snaha o koordinaci výzkumu mikromycetů na nejrůznějších výzkumných a resortních pracovištích, sjednocování terminologie a diagnostických metodik, seznamování členů s novými výsledky taxonomických a ekologických studií o nejrůznějších skupinách těchto hub.

Pravidelnou činností sekce zůstávají každoroční exkurze do okolí Prahy, které přispívají k odbornému i společenskému kontaktu zájemců o problematiku mikroskopických hub. Exkurze v uplynulých letech vedli nejčastěji M. Svrček, J. Marková, K. Prášil a M. Suková, mezi 15-20 účastníky vždy byli i studenti mykologie a fytopatologie z Přírodovědecké fakulty UK v Praze.

V roce 2007 díky iniciativě dr. A. Novákové obnovila sekce svou koordinační, odbornou i společenskou funkci. Dr. A. Nováková uspořádala v Českých Budějovicích pracovní setkání zájemců o problematiku mikroskopických hub „MICROMYCO 2007“. Setkání se účastnilo celkem 36 pracovníků i studentů z ČR a SR. Většina účastníků (včetně studentů) přednesla zajímavé odborné příspěvky a hlavním výsledkem akce byla naprostá shoda o prospěšnosti a užitečnosti podobných setkání. Lze tedy doufat, že obnovená činnost sekce pod vedením dr. A. Novákové bude pokračovat a další pracovní setkání, tematické semináře a exkurze přivedou do jejích řad nové, především ty nejmladší zájemce.



## **Přehled seminářů, které Sekce pro studium mikroskopických hub dosud uspořádala:**

1. *Mucorales* – izolace, determinace a význam (1988)
2. Problémy ochrany mikroskopických hub (1988)
3. Problematika a metodika determinace některých skupin hyfomycetů (1989)
4. Problematika mikromycetů ve vodách (1990)
5. *Ophiostomatales* – výsledky současného taxonomického a fytopatologického výzkumu (1991)
6. Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu *Penicillium* (1994)
7. Problematika anamorfního rodu *Fusarium* (1998)

Sekce vydala již tři sborníky s příspěvky z některých seminářů:

- **„Problematika a metodika determinace některých skupin mikroskopických hub“** (1991) - rozebráno;
- **„*Ophiostomatales* – výsledky současného taxonomického a fytopatologického výzkumu“** (1992);
- **„Současný stav, využití moderních metod a perspektivy studia rodu *Penicillium*“** (1995) .

KAREL PRÁŠIL

# Izolácia *Pithomyces chartarum* z potravinárskej pšenice

MÁRIA DOVIČIČOVÁ, ROMAN LABUDA, DANA TANČINOVÁ

**DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D.: An isolation of *Pithomyces chartarum* from wheat grains.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 5-8. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

During mycological investigation of wheat grains carried out on November 2006 in Slovakia a single isolate of *Pithomyces chartarum* was encountered as an element of superficial mycobiota of grains. Article brings notes towards morphology (accompanied with illustrations) and toxicological potential of this fungus.

**Keywords:** wheat grains, *Pithomyces chartarum*

Mária Dovičičová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: maria.dovicicova@uniag.sk

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Z taxonomického hľadiska patrí rod *Pithomyces* Berk. & Broome do čeľade Pleosporaceae, triedy Dothideomycetes a kmeňa, resp. oddelenia Ascomycota (Index Fungorum, 2004). *Pithomyces chartarum* (Berk. & M. A. Curtis) M. B. Ellis je svetovo rozšírená saprotrofná vláknitá mikroskopická huba, ktorú možno izolovať z rozličného rastlinného materiálu, zo vzduchu, pôdy a podobne (ELLIS, 1971; COLE & COX, 1981; ROUX & VANWARMELO, 1997; DOMSCH et al., 1998; Filamentous Fungi database, 2007). Význam tejto huby spočíva okrem iného v jej potencii produkovať mykotoxín sporidezmín. Sporidezmín po požití spôsobuje vážne poškodenia pečenevých a žlčových kanálikov, ktoré vyúsťujú do sekundárnej fotosenzitizácie a tvárového ekzému u prežúvavcov, pasúcich sa na infikovaných pastvinách (COLE & COX, 1981; KIRK et al., 2001; DUNCAN et al., 2005; PINTO et al., 2005; VAN WUIJCKHUISE, 2006).

## Materiál a metodika

Kmeň *Pithomyces chartarum* bol získaný ako zložka povrchovej mykoflóry pšeničného zrna platňovou zriedľovacou metódou bez povrchovej dezinfekcie zŕn na DRBC agare (agar s dichloranom, chloramfenikolom a bengálskou červeňou; Merck, Darmstadt, Nemecko). Na získanie základného riedenia bolo použitých 20 g pšeničného zrna vytrepaného na horizontálnej trepačke v 180 cm<sup>3</sup> sterilnej peptónovej vody, obsahujúcej 0,02 % Tweenu 80. Izolát bol preočkovaný na 2 % vodný agar (SAMSON et al., 2002). Na stimuláciu konidiogenézy sme na povrch agaru pridali vysterilizované pšeničné klíčence (2 – 3 kusy). Kultivácia prebiehala štyri týždne pri izbovej teplote a rozptýlenom dennom svetle s prirodzeným striedaním svetla a tmy. Huba bola primárne identifikovaná podľa ELLIS (1971), ako dopĺňajúca literatúra boli použité DOMSCH et al. (1998) a TSUNEO (2002).

## Výsledky a diskusia

### *Makroskopické a mikroskopické znaky*

Študovaný izolát utváral na 2 % vodnom agare s kľúčiacimi pšeničnými rastlinkami biele až krémové, vatovité, rýchlo rastúce mycélium, pokrývajúce celý povrch 90mm Petriho misky

v priebehu jedného týždňa. Huba s postupujúcim časom dehydratovala pšeničné klíčence, pokožka zrna a korienkov nekrotizovala a bola pokrytá tmavými zhlukmi konídií (obr. 1). Konidiofóry boli hyalínne až svetlo hnedé, solitárne, krátke, s jednotlivými na apikálnych koncoch sa tvoriacimi konídiami. Konídie boli vajcovité alebo elipsovité, hnedej až tmavohnedej farby, rozdelené tromi, najviac štyrmi priečnymi a najviac dvomi pozdĺžnymi septami. V mieste sept (priehradok) vykazovali miernu konstrikciu a výraznejšiu pigmentáciu. Povrch konídií bol bradavičnatý. Na bazálnej časti konídií bolo prítomné hilum (obr. 2). Veľkosť konídií sa pohybovala v rozmedzí 20 – 29 x 14 – 18 µm. Uvedené mikroskopické charakteristiky sú v súlade s vyššie uvedenou diagnostickou literatúrou.

Hoci *Pithomyces chartarum* nebolo doposiaľ uvedené v Zozname bezcievnych rastlín Slovenska, časť Huby (LIZOŇ & BACIGÁLOVÁ, 1998), ani v ďalších štúdiách, ktoré tento zoznam dopĺňajú (napr. ŠIMONVIČOVÁ, 2005), predkladaný izolát nepredstavuje prvý reportovaný nález z územia Slovenska. Štyri izoláty boli diagnostikované z ovzdušia a organického materiálu, odobratého z jaskýň na Slovensku (NOVÁKOVÁ, osobná komunikácia; NOVÁKOVÁ, 2006). Aj podľa PRAŠILA (osobná komunikácia) sa tento toxikologicky významný druh pravdepodobne bežne vyskytuje na zrnách obilnín, preto je prekvapujúce, že dosiaľ nebol zaznamenaný vo vyššie uvedených zoznamoch slovenských húb. V súčasnom období je referovaný kmeň podrobovaný analýze metabolického profilu (J. C. Frisvad, BioCentrum-DTU, Lyngby, Dánsko).

## Záver

*Pithomyces chartarum* je potenciálne toxinogénna saprotrofná huba, ktorej význam narastá pri izolácii z rastlín, slúžiacich ako krmivo. Referovaný izolát bol nájdený ako súčasť povrchovej kontaminácie pšeničného zrna vo vzorke pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.), určenej na potravinárske využitie. Vzorka pochádzala z oblasti juhozápadného Slovenska (Oponice). Reprezentatívny kmeň je uložený v zbierke na Katedre mikrobiológie Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

## Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol s podporou projektov VEGA 1/3456/06 a KEGA 3/5080/07

## Prehľad literatúry

- COLE, R. J., COX, R. H., 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, London, 937 p.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSEN, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi (Vol 1). Academic Press, London, 859 p.
- DUNCAN, E. J., THOMPSON, M. P., PHUA, S. H., 2005. Zinc protection of HepG2 cells from sporidesmin toxicity does not require de novo gene transcription. Toxicol. Lett. 159 (2): 164-172.
- ELLIS, M. B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608 p.
- CBS Filamentous fungi database 2007. - <http://www.cbs.knaw.nl/databases/>
- Index Fungorum 2004. - <http://www.speciesfungorum.org/>
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., DAVID, J. C., STALPERS, J. A., 2001. Dictionary of the Fungi (9th ed.), CAB International, Wallingford, 655 p.

- LIZOŇ, P., BACIGÁLOVÁ, K., 1998. Fungi. In: MARHOLD, K., HINDÁK F. (Eds.), Checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia, Veda, Bratislava, pp. 101-227.
- NOVÁKOVÁ, A. 2006. Mikroskopické houby v Dobšinskej ledovej jaskyni a ve vybraných jeskyniach Národného parku Slovenský Kras. In: BELLA, P. (ed.), Výskum, využívanie a ochrana jaskýň 5, Zborník referátov, Liptovský Mikuláš, pp. 203-210.
- PINTO, C., SANTOS, V. M., DINIS, J., PELETEIRO, M. C., FITZGERALD, J. M., HAWKES, A. D., SMITH, B. L., 2005. Pithomycotoxicosis (facial eczema) in ruminants in the Azores, Portugal. *J. Brit. Vet. Ass.* 157: 805-807.
- ROUX, C., VANWARMEMELO, K. T., 1997. A survey of the mycobiota of a natural Karoo pasture. *Bothalia* 27 (2): 167-173.
- SAMSON, R. A., HOEKESTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6<sup>th</sup> ed., CBS, Utrecht, 389 p.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., 2005. A list of fungi as a supplement to the Checklist of non-vascular anvascular plants of Slovakia - part Fungi. *Phytopedon* 4: 21-28.
- TSUNEO, W., 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, 484 p.
- VAN WUIJCKHUISE, L., SNOEP, J., CREMERS, G., DUVIVIER, A., GROENEVELD, A., OTTENS, W., VAN DER SAR, S., 2006. First case of pithomycotoxicosis (facial eczema) in the Netherlands. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 131 (23): 858-861.

**Prílohy:**



**Obr. 1.** Nekrotizovaný pšeničný klíčeneč s tmavými zhlukmi konídií *Pithomyces chartarum*; zhluky konídií v blízkosti klíčeneča (mierka = 1 mm).



**Obr. 2.** Konídie *Pithomyces chartarum* (mierka = 10 μm).

# Výskyt *Penicillium* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006

SOŇA FELŠÖCIOVÁ, ROMAN LABUDA, DANA TANČINOVÁ

FELŠÖCIOVÁ, S., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D.: Occurrence of *Penicillium* spp. on wheat grains harvested in Slovakia during the season 2006.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 9-15. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Wheat samples from the conventional (6) and ecological (12) agriculture harvested during the season 2006 in Slovakia were surveyed for presence of fungi. The fungal contamination of the samples was investigated in the following ways, i.e. as endogenous contamination, rinsed grains, and meal. A total of 10 *Penicillium* species were recovered from wheat of the conventional farming system, albeit none of them was a component of the endogenous mycobiota. Sixteen species from the ecological farming system were isolated within the all three isolation procedures. Out of 151 isolates of *Penicillium* species encountered, 15 % (22 isolates) belonged to the group of so-called toxigenic species. The presence of some mycotoxin producing penicillia (for citrinin, cyclopiazonic acid, griseofulvin, ochratoxin A, patulin, penitrem A and roquefortin C) was revealed by thin layer chromatography *in vitro*. Out of 22 isolates screened, 20 (91% isolates) produced at least one of the mycotoxins analyzed.

**Keywords:** wheat, *Penicillium*, mycotoxins, thin layer chromatography, toxinogenity

Soňa Felšöciová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [sona.felsociova@uniag.sk](mailto:sona.felsociova@uniag.sk)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Obilné zrná osídľujú dve najdôležitejšie ekologické skupiny mikroskopických vláknitých húb. Sú to poľné huby a skladové huby (JESENSKÁ, 1987). Poľné huby napádajú zrná na poli a sú náročné na vlhkosť, vyhovuje im vyšší stupeň vodnej aktivity a s výnimkou fuzárií nedeštruujú zárodok zrna, nezapríčiňujú jeho osobitné biochemické zmeny ani samozahrievanie zrna. Skladové huby ich napádajú počas skladovania, nie sú náročné na vlhkosť (13 – 18%), rastú pri teplote 5 – 45 °C, optimálne pri 25 – 30 °C a počas žatvy nepredstavujú žiadny vážny problém. Medzi skladové huby patria najčastejšie kmene rodov *Aspergillus* a *Penicillium* (JESENSKÁ, 1987, SANTIN, 2005). Druhy rodu *Penicillium* sú často prítomné ako kontaminanty poľnohospodárskych produktov počas sušenia a následného skladovania (CREPPY, 2002). TANČINOVÁ et al. (2001) zistili, že počas optimálnych podmienok skladovania počet mikroskopických húb klesá. CLARKE & HILL (1981, in JESENSKÁ, 1987) sa nepodarilo izolovať zo zrn poľné huby už za 85 dní v optimálnych podmienkach uskladňovania obilia v silách.

Cieľom tejto predbežnej, stále pokračujúcej štúdie, bolo zhodnotiť výskyt izolátov penicilií a frekvenciu ich výskytu v potravinárskej pšenici z konvenčného a ekologického poľnohospodárstva a testovať izoláty potenciálne toxigénnych druhov na schopnosť produkovať príslušné mykotoxíny.

## Materiál a metodika

### Vzorky

V sezóne roku 2006 bolo analyzovaných 6 vzoriek pšenice potravinárskej z konvenčného poľnohospodárstva a 12 vzoriek pšenice z ekologického poľnohospodárstva, ktoré boli odobrané z rôznych lokalít.

## Izolácia

Izolácia mikroskopických húb bola vykonaná na DRBC (agar s dichlóranom, bengálskou červeňou a chloramfenikolom) a agare so sladínovým extraktom s prídavkom 100 mg chloramfenikolu z oplachu a šrotu. Očkovali sme povrchovo riedeniami  $10^{-2}$  až  $10^{-4}$  v trojnásobnom opakovaní. Kultivácia prebehla pri 25 °C 5 – 7 dní. Endogénna kontaminácia na stanovenie priamej kontaminácie povrchovo sterilizovaných zŕn v NaOCl (0,4%) bola sledovaná na agaroch DRBC a DYSG (agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom), pričom bola použitá metóda priameho ukladania pšeničných zŕn na agarové platne.

## Identifikácia

Izoláty patriace do podrodu *Penicillium* boli preočkované na identifikačné médiá - CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom), MEA (agar so sladínovým extraktom), CREA (agar s kreatínom a sacharózou) a YES (kvasničný extrakt so sacharózou). Izoláty patriace do podrodu *Aspergilloides*, *Biverticillium* a *Furcatum* boli preočkované na CYA 25 °C, CYA 37 °C, MEA a YES. Kultivácia prebehla pri 25 °C 5-7 dní v tme (SAMSON et al., 2002b).

Identifikáciu jednotlivých druhov sme robili podľa nasledovných kľúčov: SAMSON et al. (2002), FRISVAD & SAMSON (2004).

## Stanovenie toxigenity

Schopnosť izolátov produkovať citrinín (C), cyklopiazónovú kyselinu (CPA), grizeofulvín (G), ochratoxín A (OA), patulín (P), penitrém A (PA) a roquefortín C(RC) bola stanovená tenkovrstvovou chromatografiou (TLC) v podmienkach *in vitro*. Agarové výseky z CYA (pre intracelulárne mykotoxíny: CPA, PA, RC) alebo z YES (pre extracelulárne mykotoxíny: C, G, OA, P) boli zmiešané s extrakčným činidlom chlorofom metanol (2:1). Toxíny boli extrahované na Vortexe (V1 plus, Boeco, Germany) 2 – 3 min. Na štart chromatografickej platne (Alugram sil G, Germany) boli nanosené extrakty v množstve 10 µl. Po vysušení boli mykotoxíny vyvíjané v chromatografickej sústave TEF (toluén, etylacetát, kyselina mravčia 5:4:1) a po vysušení detekované na základe fluorescencie a retenčných hodnôt použitých štandard. Citrinín, grizeofulvín a ochratoxín A boli priamo viditeľné pod UV svetlom 365 nm. Pri dennom svetle boli vizualizované cyklopiazónová kyselina – po nanosení Erlichovho činidla, patulín – po nanosení 0,5% MBTH (3-metyl-2-benzotiazolióňhydrazón hydrochlorid) v metanole, zahriatí pri 130 °C, 8 min.; penitrém A – po nanosení 20% AlCl<sub>3</sub> v 60% etanole a zahriatí pri 130 °C, 8 min; roquefortín C – po nanosení Ce(SO<sub>4</sub>) viditeľný pri dennom svetle.

## Výsledky a diskusia

Podľa viacerých štúdií druhy rodu *Penicillium* patria k dominantnej mikroflóre obilnín (ABRAMSON et al., 2005, ČONKOVÁ et al., 2006, TANČINOVÁ & LABUDA, 2006).

Z konvenčného poľnohospodárstva zo 6 vzoriek pšenice (oplach, šrot) bolo vyizolovaných 10 druhov penicilií (tab. 1) *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. hordei*, *P. griseofulvum*, *P. janczewskii*, *P. paxili*, *P. polonicum*, *P. raistrickii* a *P. thomii*. Zo zŕn pšenice neboli žiadne peniciliá vyizolované ako endogénne sa vyskytujúce.

Najviac kontaminované zrná pochádzali z oplachu (10) a len 2 druhy (*P. griseofulvum* a *P. janczewskii*) zo šrotu. Z celkového počtu izolátov 54 najvyšší percentuálny podiel predstavoval *P. janczewskii* (55%), *P. brevicompactum* (9%) a *P. raistrickii* (9%). Je však zrejmé, že ak sa niektoré typicky pôdne druhy z podrodu *Furcatum* (FRISVAD et al., 2000), ako sú napr. *P. janczewskii* alebo *P. raistrickii* nachádzajú v potravinách, krmivách alebo surovinách na ich výrobu, môžu byť zvyčajne považované len za indikátory kontaminácie daného substrátu pôdou (FRISVAD & FILTENBORG, 1990).

**Tab. 1.** Frekvencia výskytu a počet izolátov vyizolovaných druhov rodu *Penicillium* z konvenčného poľnohospodárstva (6) v sezóne 2006 na Slovensku.

Druh	Endogénna kontaminácia			Oplach			Šrot			Celkový počet izolátov*	% podiel izolátov
	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov		
<i>P. aur.</i>	-	-	-	1	17	4	-	-	-	4	7
<i>P. brev.</i>	-	-	-	1	17	5	-	-	-	5	9
<i>P. crus.</i>	-	-	-	1	17	1	-	-	-	1	2
<i>P. hor.</i>	-	-	-	2	33	2	-	-	-	2	4
<i>P. gris.</i>	-	-	-	1	17	1	2	33	2	3	6
<i>P. janc.</i>	-	-	-	1	17	5	3	50	25	30	55
<i>P. pax.</i>	-	-	-	1	17	1	-	-	-	1	2
<i>P. pol.</i>	-	-	-	1	17	1	-	-	-	1	2
<i>P. rai.</i>	-	-	-	4	67	5	-	-	-	5	9
<i>P. tho.</i>	-	-	-	2	33	2	-	-	-	2	4

\* celkový počet izolátov 54

*P. aurantiogriseum*; *P. brevicompactum*; *P. crustosum*; *P. hordei*; *P. griseofulvum*; *P. janczewskii*; *P. paxili*; *P. polonicum*; *P. raistrickii*; *P. thomii*;

Z ekologického poľnohospodárstva z 12 vzoriek bolo vyizolovaných 16 druhov penicilií (tab. 2). Zo všetkých troch spôsobov izolácie (endogénna, oplach, šrot) boli vyizolované peniciliá. Najvyššia diverzita bola zaznamenaná z oplachu (13 druhov), nasledoval šrot (9 druhov) a 6 druhov pochádzalo z endogénnej kontaminácie. Ukazuje sa, že izoláty vyizolované z endogénnej kontaminácie sú diagnostikované aj z oplachu a šrotu.

Z celkového počtu izolátov 97, najvyššie percentuálne podiely predstavovali: *P. aurantiogriseum* (27%), *P. chrysogenum* (10%) a *P. corylophilum* (9%). Spomenuté izoláty boli vyizolované z endogénnej kontaminácie, oplachu aj šrotu. Riziko novej kontaminácie pšenice potravinárskej predstavuje toxikologicky významné *P. verrucosum* (4%), ktoré bolo vyizolované len z oplachu.

Porovnanie celkového počtu izolátov penicilií vyizolovaných zo vzoriek pšenice z konvenčného a ekologického poľnohospodárstva udáva graf 1. *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum* a *P. griseofulvum* sú druhy, ktoré boli diagnostikované zo vzoriek z konvenčného aj ekologického poľnohospodárstva. Celkom 16 druhov bolo zachytených z ekologického poľnohospodárstva, pričom 9 z nich pochádzalo z endogénnej kontaminácie. Z konvenčného poľnohospodárstva sme vyizolovali 10 druhov penicilií, ale ani jeden nebol vyizolovaný priamo zo zrna, t.j. endogénne.



**Tab. 2.** Frekvencia výskytu a počet izolátov vyizolovaných druhov rodu *Penicillium* z ekologického poľnohospodárstva (12) v sezóne 2006 na Slovensku.

Druh	Endogénna kontaminácia			Oplach			Šrot			Celkový počet izolátov*	% podiel izolátov
	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekv. (%)	Počet izolátov		
P. aur.	4	33	12	3	25	9	3	25	5	26	27
P. brev	-	-	-	1	8	1	1	8	1	2	2
P. citr.	-	-	-	-	-	-	2	17	2	2	2
P. cor.	2	17	2	1	8	6	1	8	1	9	9
P. crus.	1	8	1	2	17	3	2	17	2	6	6
P. chry	2	17	2	5	42	7	1	8	1	10	10
P. gla.	-	-	-	1	8	2	-	-	-	2	2
P. gris.	3	25	3	-	-	-	-	-	-	3	3
P. mel.	-	-	-	1	8	1	-	-	-	1	1
P. micz.	-	-	-	1	8	1	-	-	-	1	1
P. purp.	-	-	-	1	8	4	1	8	2	6	6
P. car.	-	-	-	3	25	3	-	-	-	3	3
P. rug.	-	-	-	1	8	1	1	8	1	2	2
P. var.	-	-	-	-	-	-	1	8	1	1	1
P. ver.	-	-	-	3	25	4	-	-	-	4	4
P. vir.	1	8	4	2	17	2	-	-	-	6	6
P. sp.	2	17	4	2	17	4	5	42	5	13	13

\* celkový počet izolátov 97

*P. aurantiogriseum*; *P. brevicompactum*; *P. citrinum*; *P. corylophilum*; *P. crustosum*; *P. chrysogenum*; *P. glabrum*; *P. griseofulvum*; *P. melanoconidium*; *P. miczenskii*; *P. purpurogenum*; *P. carneum/paneum*; *P. rugulosum*; *P. variabile*; *P. verrucosum*; *P. viridicatum*;

Obilné zrná sú veľmi vhodným substrátom na produkciu mykotoxínov a zistilo sa veľa ochorení, ktoré súviseli s konzumovaním výrobkov alebo so skrmovaním splesených obilných zŕn (JESENSKÁ, 1987). Podľa PITT & LEISTNER (1991) druhy rodu *Penicillium* môžu produkovať 27 rôznych mykotoxínov, medzi najdôležitejšie patria ochratoxín A, patulín a citrinín.

Citrinín je nefrotoxín a produkujú ho hlavne *P. citrinum*, *P. expansum* a *P. verrucosum*, v teplotnom rozmedzí 15 – 37 °C, jeho optimálna teplota je 30 °C (PITT, 1997). Pravidelným kontaminantom zŕnín je OA, preto je predmetom častých štúdií (HALSTENSEN et al., 2004). Znižuje technologické, výživné vlastnosti zrna, kvalitu pečenia, kontaminované produkty predstavujú zdravotné riziko ľudí a zvierat (PRANGE et al., 2005, LUGAUSKAS et al., 2006). ČONKOVÁ et al. (2006) sa vo vzorkách cereálií pochádzajúcich z južného Slovenska a Poľska zamerali z mykotoxínov na prítomnosť OA. Žiadna zo sledovaných vzoriek však neprekračovala povolený limit – 5mu g/kg. OA je klasifikovaný ako silný nefrotoxín, teratogén a karcinogén. Môže byť produkovaný už pri 4 °C, pri vodnej aktivite 0,86 (SWEENEY & DOBSON, 1998). V miernych klimatických podmienkach je produkovaný druhom *P. verrucosum*. V sledovaných vzorkách, ako bolo spomenuté vyššie, sa nachádzal tento druh len z oplachu, pričom ich schopnosť produkovať OA v podmienkach *in vitro* nebola detekovaná.

**Tab. 3.** Testované izoláty penicilíí z konvenčného poľnohospodárstva vyizolované z oplachu a šrotu na schopnosť produkovať sledované mykotoxíny v podmienkach *in vitro*.

Testovaný Druh	Oplach					Šrot			
	C A	G	P	PA	RC	C A	G	P	RC
<i>P. crustosum</i>				1*/1* *	1/1				
<i>P. griseofulvum</i>	1/1	1/1	1/1		1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>P. raistrickii</i>		1/1							

\* - počet pozitívnych izolátov; \*\* - počet testovaných izolátov

CA – cyklopiazónová kyselina, G – grizeofulvín, P – patulín, PA – penitrém A, RC – roquefortín C

Zo šiestich vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva sme testovali izoláty troch potenciálne toxínogénnych druhov. Izolát *P. crustosum* z oplachu produkoval penitrém A aj roquefortín C, izoláty *P. griseofulvum* z oplachu a súčasne zo šrotu produkovali kyselinu cyklopiazónovú, grizeofulvín, patulín a roquefortín C. Grizeofulvín produkoval *P. raistrickii*, ktorý bol vyizolovaný z oplachu.

**Tab. 4.** Testované izoláty rodu *Penicillium* vyizolované z endogénnej kontaminácie, oplachu a šrotu na schopnosť produkovať mykotoxíny v podmienkach *in vitro*.

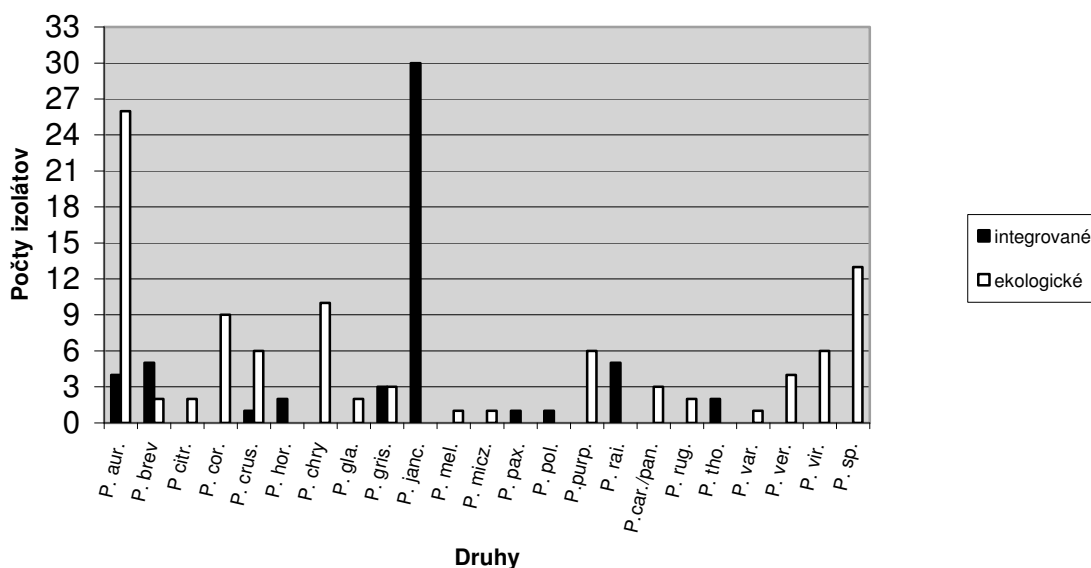
Testovaný druh	Endogénna kontaminácia					Oplach					Šrot		
	C A	G	P	PA	RC	C A	O A	P	PA	RC	C	PA	RC
<i>P. citrinum</i>											2/2		
<i>P. crustosum</i>				1*/1**	1/1				2/2	2/2		2/2	2/2
<i>P. chrysogenum</i>										1/1			1/1
<i>P. griseofulvum</i>	3/3	3/3	3/3		3/3								
<i>P. melanoconidium</i>									1/1				
<i>P. carneum/paneum</i>								2/2					
<i>P. verrucosum</i>						1/3	0/3						

\* - počet pozitívnych izolátov ; \*\* - počet testovaných izolátov

C – citrinín, CA – cyklopiazónová kyselina, G – grizeofulvín, OA – ochratoxín A, P – patulín, PA – penitrém A, RC – roquefortín C

Z 12 vzoriek pšenice z ekologického poľnohospodárstva sme testovali 7 zástupcov potenciálnych producentov mykotoxínov. Išlo o izoláty *P. crustosum* (zo všetkých troch spôsobov izolácie), ktoré produkovali penitrém A aj roquefortín C. U troch izolátov *P. griseofulvum* vyizolovaných len z endogénnej kontaminácie sa potvrdila ich produkcia na všetky 4 sledované mykotoxíny: kyselinu cyklopiazónovú, grizeofulvín, patulín a roquefortín C. Izoláty *P. chrysogenum* (z oplachu aj šrotu) produkovali roquefortín C. Penitrém A produkovalo *P. melanoconidium* a patulín *P. carneum/paneum*. Z troch izolátov *P. verrucosum* len 1 produkoval citrinín, zatiaľ čo ochratoxín A nebolo zistené zo žiadneho z nich. Dva izoláty *P. citrinum* (zo šrotu) produkovali citrinín.

**Celkový počet izolátov vyzolovaných druhov penicilíí z konvenčného (6) a ekologického (12) obhospodarovania pôdy v sezóne 2006 na Slovensku**



*P. aurantiogriseum, P. brevicompactum, P. citrinum, P. corylophilum, P. crustosum, P. hordei, P. chrysogenom, P. glabrum, P. griseofulvum, P. janczewski, P. melanoconidium, P. miczynskii, P. paxili, P. polonicum, P. purpurogenum, P. raistrickii, P. carneum/paneum, P. rugulosum, P. thomii, P. variabile, P. verrucosum, P. viridicatum, P. species*

## Záver

Z analyzovaných vzoriek potravinárskej pšenice z konvenčného (6) a ekologického (12) poľnohospodárstva v sezóne 2006 zo Slovenska bolo vyzolovaných 22 druhov rodu *Penicillium*, z čoho 8 bolo toxínogénnych: *P. citrinum, P. crustosum, P. chrysogenum, P. griseofulvum, P. melanoconidium, P. raistrickii, P. roqueforti* a *P. verrucosum*. Tenkovrstvovou chromatografiou v podmienkach *in vitro* bola potvrdená ich produkcia mykotoxínov (citrinín, kyselina cyklopiazónová, grizeofulvín, ochratoxín A, patulín, penitrém A a roquefortín C). Z 22 testovaných izolátov 20, t.j. 91% izolátov produkovalo minimálne 1 mykotoxín. Z oboch spôsobov poľnohospodárstiev najvyššia biodiverzita druhov penicilíí bola stanovená z oplachu, čo korešponduje so sekundárnou kontamináciou, napr. z ovzdušia, pôdy a pod. Uvádzané výsledky sú čiastkové a v štúdiu sa naďalej pokračuje.

## Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol s podporou projektu VEGA 1/3456/06

## Prehľad literatúry

ABRAMSON, D., HULASARE, R., YORK, R.K., WHITE, N.D.G., JAYAS, D.S., 2005. Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. *J. Stor. Prod. Res.* 41 (1): 67-76

- ČONKOVÁ, E., LACIAKOVÁ, A., STYRIAK, I., CZERWIECKI, L., WILCZYNSKA, G., 2006. Fungal contamination and the levels of mycotoxins (DON and OTA) in cereal samples from Poland and East Slovakia. *Czech J. Food Sci.* 24 (1): 33-40.
- CREPPY, E. E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127: 19-28.
- ELMHOLT, S., RASMUSSEN, P. H., 2005. *Penicillium verrucosum* occurrence and Ochratoxin A contents in organically cultivated grain with special reference to ancient wheat types and drying practice. *Mycopathologia* 159: 421-432.
- FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 1990. Revision of *Penicillium* subgenus *Furcatum* based on secondary metabolites and conventional characters. In: SAMSON, R. A., PITT, J. I. (Eds.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, pp. 159-172.
- FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., LUND, F., SAMSON, R. A., 2000. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. In: SAMSON, R. A., PITT J. I. (Eds.), *Interaction of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, pp. 265-283.
- HALSTENSEN A. S, NORDBY K. C, ELEN O, EDUARD W., 2004. Ochratoxin A in grain dust - Estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Ann. Agri. Environ. Med.* 11 (2): 245-254.
- JESENSKÁ, Z., 1987. Mikroskopické huby v požívatinách a v krmivách, 1. vyd., Alfa, Bratislava, 320 p.
- LUGAUSKAS A., RAILA A., RAILIENE M., RAUDONIENE V., 2006. Toxic micromycetes in grain raw material during its processing. *Ann. Agri. Environ. Med.* 13 (1): 147-161.
- PITT, J.I., 1997. Toxigenic *Penicillium* species. In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R., Montville, T. J. (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington, DC, pp. 406-418.
- PITT, J. I., LEISTNER, L., 1991. Toxigenic *Penicillium* species. In: Smith, J. E., Henderson, R. S. (Eds.), *Mycotoxins and Animal Food*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 91-99.
- PRANGE, A., MODROW, H., HORMES, J., KRAMER, J., KOHLER, P., 2005. Influence of mycotoxin producing fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. *J. Agri. Food Chem.* 53 (17): 6930-6938.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002a. Introduction to Food- and Airborne Fungi. CBS, Utrecht, 389 p.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J. C., 2002b. Methods for the detection, isolation and characterisation of food-borne fungi. In: SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., *Introduction to Food-and Airborne Fungi*. CBS, Utrecht, 389 p.
- SANTIN, E., 2005. Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. (Eds.), *The Mycotoxin Blue Book*, Nottingham University Press, pp. 225-234.
- SWEENEY, M. J., DOBSON, A. D. W., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Intern. J. Food Microbiol.* 43: 141-158.
- TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., 2006. Mykotická kontaminácia vybraných surovín rastlinného pôvodu. In: Výživná a technologická kvalita rastlinných produktov a ich potravinárske využitie. SPU Nitra, pp. 167 – 194.
- TANČINOVÁ, D., KAČÁNIOVÁ, M., JAVOREKOVÁ, S., 2001. Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. *Biologia* 56 (3): 247-250.

# Mikroskopické houby extrémně kyselých zasolených půd

MARTINA HUJSLOVÁ, ALENA KUBÁTOVÁ, MIROSLAV KOLAŘÍK, MILADA CHUDÍČKOVÁ

**HUJSLOVÁ M., KUBÁTOVÁ A., KOLAŘÍK M., CHUDÍČKOVÁ M. : Soil micromycetes in extremely acid saline soils.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 16-23. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Effects of pH and salinity on the growth of some selected fungal species isolated from the saline and acid substrate of National Nature Reserve Soos were investigated. All tested isolates were halotolerant, 15 species showed their optimal growth at medium without salt and four strains showed their optimal growth on saline media (*Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium* sp. 6 – 0.25M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and *Penicillium coprobium* – 0.5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Most of the tested species were acidotolerant. Six species (*Acidomyces richmondensis*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. 4, *Penicillium* sp. 5, *Sporothrix* sp. and *Talaromyces helicus* var. *helicus*) even could growth in extreme low pH (1 - 2). Although most of the strains showed their optimal growth in range of pH 4 – 8, two species showed growth optimum on pH 3.

**Keywords:** acidotolerant fungi, halotolerant fungi, acid and saline soil, National Nature Reserve Soos

Martina Hujsová, Alena Kubátová, Miroslav Kolařík, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 01 Praha 2. E-mail: [pinkponk@seznam.cz](mailto:pinkponk@seznam.cz) [kubatova@natur.cuni.cz](mailto:kubatova@natur.cuni.cz) [miroslavkolarik@seznam.cz](mailto:miroslavkolarik@seznam.cz)

Miroslav Kolařík, Milada Chudíčková, Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20, Praha 4. E-mail: [miroslavkolarik@seznam.cz](mailto:miroslavkolarik@seznam.cz) [chudickova@seznam.cz](mailto:chudickova@seznam.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Půdy s vysokými koncentracemi solí a silně kyselou půdní reakcí jsou typickým příkladem extrémního stanoviště, které představuje zcela specifické podmínky pro život organismů. Díky speciálním adaptačním mechanismům je však řada druhů schopna osidlovat i takovéto substráty.

Dlouhou dobu byly s tímto typem stanovišť spojovány především bakterie, avšak v posledních letech se začala pozornost obracet také k zástupcům eukaryot.

Studiu půdních hub v zasolených půdách se věnovala celá řada autorů (např. BORUT & JOHNSON, 1962; PUGH, 1962; APINIS & CHESTERS, 1964; RANZONI, 1968; MOUSTAFA, 1975; ABDEL-FATTAH et al. 1977; ABDEL-HAFEZ, 1981, 1982; HENDRATO & DICKINSON, 1984; MOUBASHER et al. 1990; STEIMAN et al. 1995, 1997, 2004, GUIRAUD et al. 1995, VOLZ & WASSER, 1995). V převážné většině studií se jednalo o půdy zasolené, avšak s neutrálním nebo slabě kyselým či zásaditým pH. Chybí tedy druhý výše zmíněný stresový faktor, kterým je extrémně nízké pH substrátu. Velká část prací byla kromě toho zaměřena na studium aridních a zasolených oblastí tropů a subtropů, jejichž klimatické poměry jsou výrazně odlišné od klimatu v našich zeměpisných šířkách. Zmíněné klimatické rozdíly se projeví, jak uvádějí výsledky studií, rovněž v přítomnosti odlišných houbových společenstev obou podnebných oblastí.

O studiu hub v zasolených a zároveň extrémně kyselých substrátech je již informací podstatně méně např. SUGIMORI et al. (2002), ŠVANČÁRKOVÁ (2002), BAKER et al. (2004). Obecně lze říci, že půdy, v nichž jsou přítomny oba tyto faktory, se v přírodě vyskytují poměrně zřídka a jejich vznik je spojován buď s vulkanickou činností nebo s antropogenními zásahy (např. těžbou zastižené geologické vrstvy bohaté na sloučeniny síry nebo místa vzniklá jinou průmyslovou činností člověka). V druhém případě jsou však zasolení a acidita často doplněny o další stresový faktor, a tím jsou zvýšené koncentrace těžkých kovů. Jejich

vliv na houbová společenstva v půdě diskutují např. ULFIG et al. (1997), LÓPEZ-ARCHILLA et al. (2001), KUBÁTOVÁ et al. (2002).

Mikroskopické půdní houby v zasolených silně kyselých substrátech v ČR byly dosud studovány pouze na dvou lokalitách. Jednak na antropogenně vzniklé lokalitě, kterou je odkaliště Chvaletice ve východních Čechách (KUBÁTOVÁ et al. 2002; POŽÁROVÁ, 2004). Tato lokalita představuje právě výše zmiňovaný případ společného působení jak salinity a acidity, tak i těžkých kovů. V letech 2003 – 2006 byly pak studovány mikroskopické půdní houby ve zcela specifickém substrátu unikátní lokality NPR Soos (HUJSLOVÁ, 2006). Půdy NPR Soos lze obecně charakterizovat vyšším zasolením, které je v některých místech (plochy zcela bez vegetace) doprovázeno silně kyselou půdní reakcí. Zatímco společenstva mikroskopických hub izolovaná z chvaletického odkaliště byla podobná spíše společenstvům zaznamenávaným z míst zasažených těžkými kovy, mykobiota zjištěná v NPR Soos se ukázala být poměrně specifická. Vedle druhů běžně se vyskytujících v půdě byl z této lokality izolován poměrně vysoký počet nových druhů nejen pro ČR, ale patrně i pro vědu.

Substrát NPR Soos je příkladem extrémního stanoviště, při jehož osidlování jsou upřednostňovány druhy s vyšší schopností adaptace na dané stresové podmínky. V souvislosti s tímto faktem lze tedy u druhů izolovaných z území rezervace s vyšší frekvencí výskytu předpokládat specifitu či vyšší toleranci vůči specifickým podmínkám studovaného substrátu. Stejně tak i u případných „nových“ druhů.

Předmětem zájmu předkládané práce bylo proto studium fyziologických vlastností dominantních a případných nových druhů izolovaných z půdy v NPR Soos. Pomocí růstových testů jsme se pokusili zjistit, jak budou zmíněné druhy reagovat na různé hodnoty pH a zasolení v laboratorních podmínkách. Cílem našeho studia bylo rovněž odhalení případných acido- či halotolerantních zástupců.

## **Materiál a metodika**

Vliv pH a zasolení byl studován u několika vybraných kmenů dominantních a „nových“ druhů izolovaných ze substrátu NPR Soos. Stručná charakteristika odběrových ploch, z nichž byly druhy izolovány, je shrnuta v Tab. 1. Testované druhy s frekvencemi jejich výskytu na jednotlivých odběrových plochách jsou uvedeny v Tab. 2. Podrobnější informace o studovaných druzích jsou uvedeny v práci HUJSLOVÁ (2006). Kromě kmenů izolovaných z NPR Soos byly pro srovnání testovány rovněž dva typové kmene (CBS 335.48 – *Talaromyces helicus* var. *helicus* a CBS 652.66 – *Talaromyces helicus* var. *major*) a dva kmene izolované z chvaletického odkaliště (CCF 2941 - *Penicillium* cf. *varians* a AK18/95 – *Paecilomyces* sp.).

Jako primární médium pro kultivaci byl zvolen malt extrakt agar (MEA), jehož složení bylo upravováno vždy na základě aktuálních požadavků. Vliv pH byl studován na médiích s hodnotami pH 1 – 8 a tolerance vůči zasolení na médiích s různým obsahem soli (bez soli, 0,25M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Pro regulaci pH byla používána H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH a pro úpravu salinity média byl použit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V případě nízkých hodnot pH byl rovněž modifikován technologický postup přípravy, abychom dosáhli ztuhnutí média (přidání většího množství agaru, úprava pH těsně před naléváním média na Petriho misky). Pro inokulaci byla používána spórová suspenze (u několika problematických kmenů byla použita přímá inokulace mycelia na Petriho misku). Každá varianta byla dělána pro každý kmen ve třech opakováních. Čísla uvedená v Tab. 3 – 6 představují průměrnou hodnotu z těchto tří (v případě kontaminace dvou) opakování. Misky byly inkubovány při teplotě 24 °C a kolonie byly měřeny u rychleji rostoucích druhů každý den, u ostatních druhů každý druhý den po dobu 2 týdnů.

**Tab. 1.** Charakteristika čtyř vybraných odběrových ploch na lokalitě NPR Soos.

odběrová plocha	vegetační kryt	pH	vodivost (mS)	obsah SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> v sušině (mg/1000g)	obsah vody ve vzorcích substrátu (v %)
1.	<i>Schoenoplectus tabernaemontani</i>	5,6 – 7	1,6 – 8,7	5901,6 – 27936	82,6 – 92,4
2.	žádný	1,6 – 2,2	13,8 – 24,2	93872,9 – 251660,8	53,4 – 62,9
3.	rozhraní holé plochy a vegetace ( <i>Poa</i> sp., <i>Typha latifolia</i> , <i>Schoenoplectus tabernaemontani</i> )	1,9 – 2,7	9,1 – 12,7	79807,4 – 116516,9	59,3 – 70,8
4.	mechové patro, <i>Poa</i> sp., <i>Rumex</i> sp., <i>Schoenoplectus tabernaemontani</i> , okraj porostu náletových dřevin	6,8 – 7,2	3,9 – 7,4	19848 – 39236,1	75,1 – 82,2

**Tab. 2.** Přehled testovaných druhů izolovaných z NPR Soos s frekvencí jejich výskytu na jednotlivých odběrových plochách (v%). V závorkách jsou uvedeny testované kmeny.

Druh	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3	Plocha 4
„ <i>Acidomyces richmondensis</i> “ (MH 142, AK 72/03)	0	33,3	1,1	0
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 1 (MH 529, MH 152)	0	0	0	2,8
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 2 (MH 578)	0	0	0	0,6
<i>Chrysosporium</i> sp. (MH 518, MH 523)	2,2	0	0	0
<i>Fusarium culmorum</i> (MH 217)	11,7	0	0	0
<i>Fusarium sporotrichioides</i> (MH 216)	12,8	0	0	0,6
<i>Mucor</i> sp. 3 (MH 620)	2,2	0	15	2,8
<i>Paecilomyces</i> sp. (MH 393)	0	0	2,8	0
<i>Penicillium</i> sp. 1 (MH 163)	15	0	16,1	3,9
<i>Penicillium</i> sp. 2 (MH 99)	0	0	0,6	0
<i>Penicillium coprobium</i> (MH 23, MH 319)	1,1	0	0	2,8
<i>Penicillium</i> sp. 4 (MH 39)	0	0,6	0	0
<i>Penicillium</i> sp. 5 (MH 112)	0	0	0,6	0
<i>Penicillium</i> sp. 6 (MH 267)	0	0	16,7	0
<i>Penicillium chrysogenum</i> (MH 369)	0	0	0,6	0
<i>Sporothrix</i> sp. (MH 560)	0	2,2	0	0
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>helicus</i> (MH 452)	0,6	0	0,6	25,6
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>major</i> (MH 298)				
<i>Trichoderma harzianum</i> (MH 694)	17,2	0	0	0,6

## Výsledky

U vybraných kmenů dominantních a „nových“ druhů mikroskopických půdních hub izolovaných z NPR Soos (18 kmenů), odkaliště Chvaletice (2 kmeny) a u dvou typových

kmenů byl testován vliv pH a salinity na jejich růst. Výsledky růstových pokusů jsou uvedeny v Tabulkách 3 – 6. Růst čtyř zástupců rychleji rostoucích druhů je uveden po 3 dnech kultivace (Tab. 3 a 5), ostatní druhy byly zaznamenány po 7 dnech kultivace (Tab. 4 a 6).

**Vliv pH.** Extrémně nízké hodnoty pH (pH 1, pH 2) kultivačního média inhibovaly růst u převážné většiny studovaných zástupců. Nicméně šest druhů prokázalo schopnost růstu i v takto extrémních podmínkách (Tabulka 4), přičemž následující tři druhy: *Penicillium* sp. 5, *Sporothrix* sp. a *Talaromyces helicus* var. *helicus* rostly při pH 2 a u zbývajících tří zástupců: „*Acidomyces richmondensis*“, *Paecilomyces* sp. a *Penicillium* sp. 4 byl zaznamenán růst i na médiu s pH 1. Na pH 3 již byla schopna růst více než polovina testovaných druhů, pH 4 inhibovalo pouze růst druhu *Chrysosporium* sp. a na slabě kyselých hodnotách pH 5 a 6 byl zaznamenán růst všech kmenů. Neutrální a slabě zásaditá hodnota pH inhibovala růst pouze u druhu *Sporothrix* sp.

**Tab. 3.** Průměrná velikost kolonie (mm) na médiích s hodnotami pH 1 – 8 po 3 dnech kultivace. Maximální hodnoty jsou zvýrazněny.

Testovaný druh	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
<i>Fusarium culmorum</i>	-	-	-	15	50,8	47,3	<b>60</b>	<b>60</b>
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-	-	-	12,8	49	46,3	<b>54</b>	51
<i>Mucor</i> sp. 3	-	-	-	18	<b>78</b>	62	64,3	61,3
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	2,8	50,3	<b>66,3</b>	57	49,3	47,7

Růstová optima se u většiny testovaných druhů pohybovala v rozmezí od pH 4 do pH 7. U dvou druhů („*Acidomyces richmondensis*“ a *Sporothrix* sp.) byl optimální růst zaznamenán na pH 3 a čtyři zástupci (*Cylindrocarpon* sp. 1, *Chrysosporium* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium* sp. 1) měli růstová optima posunuta na slabě alkalickou hodnotu pH 8. U dvou druhů (*Fusarium culmorum* a *Penicillium coprobium*) byl optimální růst zjištěn na pH 7 i 8.

Ve čtyřech případech, kdy byly pro testování použity dva kmeny téhož druhu izolované z NPR Soos (Tab. 4) byly výrazné odlišnosti zjištěny pouze u dvou kmenů druhu „*Acidomyces richmondensis*“. U těchto izolátů byla zaznamenána jak různá tolerance vůči extrémní hodnotě pH 1, tak i odlišná růstová optima (Tab. 4). Ke čtyřem kmenům z NPR Soos byly pro srovnání zvoleny kmeny viz kap. Materiál a metodika. Ve všech těchto případech byly zjištěny značné odlišnosti (Tab. 4).

**Vliv salinity.** S výjimkou druhu *Sporothrix* sp. (na 0,5M MEA nerostl) prokázaly všechny testované druhy schopnost růstu na všech použitých médiích (Tab. 5, 6). U druhu *Sporothrix* sp. byl růst na 0,5M MEA zjištěn po devíti dnech kultivace.

Růstové optimum převážné většiny druhů bylo zaznamenáno na médiu bez přídavku soli. U tří zástupců (*Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium* sp. 6) byl zjištěn optimální růst na 0,25M MEA a u jednoho druhu (*Penicillium coprobium*) na 0,5M MEA.

V případě dvojic srovnávaných kmenů byly výraznější růstové odlišnosti zaznamenány u tří z nich (Tab. 6).

**Tab. 4.** Průměrná velikost kolonie (mm) na médiích s hodnotami pH 1 - 8 po 7 dnech kultivace. Maximální hodnoty jsou zvýrazněny.



Testovaný druh	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
„ <i>Acidomyces richmondensis</i> “ – MH 142 – AK 72/03	10,7 0	11,5 2	<b>12,3</b> 2	10,8 5,7	10 5,5	10 <b>6,7</b>	5,25 2,3	3 2
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 1 – MH 529 – MH 152	- -	- -	- -	8,3 13,2	15,25 18	15,5 20,2	15,3 22,3	<b>17,8</b> <b>24</b>
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 2	-	-	3,8	14,7	<b>19,8</b>	17	11,5	12,4
<i>Chrysosporium</i> sp. – MH 518 – MH 523	- -	- -	- -	- -	17,3 17,7	16,3 17,3	23,2 19,5	<b>23,5</b> <b>20</b>
<i>Paecilomyces</i> sp. – MH 393 <i>Paecilomyces</i> sp. – AK 18/95	3,3 -	27,25 -	36,3 20,2	<b>43</b> <b>29,3</b>	41,5 29,2	42,8 25,8	41 8,25	39,5 5,6
<i>Penicillium</i> cf. <i>varians</i> – CCF 2941 <i>Penicillium</i> sp. 1 – MH 163	- -	- -	6,8 12,3	<b>42,8</b> 36	<b>42,8</b> 34,8	40,3 34	32,5 38,3	28,3 <b>39,7</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	11,3	38,7	34,7	37,7	<b>42</b>
<i>Penicillium coprobium</i> – MH 23 – MH 319	- -	- -	- -	8,5 4,8	22,3 23,7	22,7 22,5	<b>25,7</b> <b>24,3</b>	<b>25,7</b> 23,8
<i>Penicillium</i> sp. 2	-	-	3	<b>26,5</b>	21,7	24,8	17,5	10,8
<i>Penicillium</i> sp. 4	7,7	21,5	26	<b>31,7</b>	23,7	25,3	23,2	16,3
<i>Penicillium</i> sp. 5	-	20,75	37,25	50	<b>55,5</b>	34	35,25	33,7
<i>Penicillium</i> sp. 6	-	-	25,7	47,2	45	42,5	53	56
<i>Sporothrix</i> sp.	-	25,5	<b>35</b>	31	28,5	6,5	0	0
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>helicus</i> – MH 452 – CBS 335.48	- -	2,8 6,3	31,3 30,5	33,5 <b>42,3</b>	35,3 37,3	<b>35,5</b> 37,7	26,5 23,5	13 11,5
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>major</i> – MH 298 – CBS 652.66	- -	- -	7,5 8	<b>41</b> <b>29,8</b>	34,8 26,5	35,7 25,7	16,3 21,8	5 19,5

**Tab. 5.** Průměrná velikost kolonie (mm) na médiích bez soli a se zvýšeným obsahem soli po 3 dnech kultivace. Maximální hodnoty jsou zvýrazněny.

Testovaný druh	MEA	0,25M MEA	0,5M MEA
<i>Fusarium culmorum</i>	45,8	<b>50,8</b>	28
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	<b>53,3</b>	53,2	31,5
<i>Mucor</i> sp. 3	<b>67,8</b>	60,5	41
<i>Trichoderma harzianum</i>	<b>80</b>	46	23,7

**Tab. 6.** Průměrná velikost kolonie (mm) na médiích bez soli a se zvýšeným obsahem soli po 7 dnech kultivace. Maximální hodnoty jsou zvýrazněny.

Testovaný druh	MEA	0,25M MEA	0,5M MEA
„ <i>Acidomyces richmondensis</i> “ – MH 142 – AK 72/03	<b>10,8</b> <b>8,5</b>	4,8 3,7	1,7 1,3
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 1 – MH 529 – MH 152	<b>18,3</b> <b>21,3</b>	13 12,8	11,5 10
<i>Cylindrocarpon</i> sp. 2	<b>16,8</b>	9	8,3
<i>Chrysosporium</i> sp. – MH 518 – MH 523	<b>26</b> <b>21,5</b>	21,2 19	11,3 15,3

<i>Paecilomyces</i> sp. – MH 393	<b>42,3</b>	25,3	26,5
<i>Paecilomyces</i> sp. – AK 18/95	<b>44,3</b>	9	4,7
<i>Penicillium</i> cf. <i>varians</i> (CCF 2941)	<b>42,3</b>	26,8	18,2
<i>Penicillium</i> sp. 1 – MH 163	<b>39,2</b>	39	38,5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	35,5	<b>59</b>	56,5
<i>Penicillium coprobium</i> – MH 23	23,8	30,7	<b>31,7</b>
– MH319	25,8	32,3	<b>35,5</b>
<i>Penicillium</i> sp. 2	<b>31,3</b>	22,5	15,5
<i>Penicillium</i> sp. 4	<b>26,3</b>	19	13,5
<i>Penicillium</i> sp. 5	<b>57,8</b>	34,8	27,8
<i>Penicillium</i> sp. 6	49,8	<b>61,3</b>	54,7
<i>Sporothrix</i> sp.	<b>21,5</b>	6,5	0
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>helicus</i> – MH 452	<b>31,5</b>	16,3	8,3
– CBS 335.48	<b>37,8</b>	28	17,5
<i>Talaromyces helicus</i> var. <i>major</i> – MH 298	<b>33,6</b>	22,3	12,8
– CBS 652.66	<b>32,8</b>	19,8	12,5

## Diskuse

Jak uvádějí ZAK & WILDMAN (2004), pH většiny substrátů se pohybuje v rozmezí 4-9, což je důvod, proč spadají optima většiny organismů do tohoto intervalu. Mikroorganismy schopné růst a přežít mimo zmiňované rozmezí hodnot pH jsou pak považovány za acido- nebo alkalotolerantní. V našem případě můžeme tedy za acidotolerantní označit více než polovinu testovaných zástupců, neboť prokázali schopnost růst již na pH 3. V rámci těchto acidotolerantních druhů představuje zcela specifickou skupinu šest zástupců (*Acidomyces richmondensis*“, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. 4, *Penicillium* sp. 5, *Sporothrix* sp. a *Talaromyces helicus* var. *helicus*), kteří byli schopni růst i při tak extrémních hodnotách jako je pH 1 a 2. Tato vysoká schopnost adaptace vůči nízkým hodnotám pH výrazně koreluje s odběrovými plochami, z nichž byly dané druhy izolovány (Tab. 1, 2). Testovaný kmen (MH 452) druhu *Talaromyces helicus* var. *helicus* byl na rozdíl od ostatních kmenů tohoto druhu (izolovány z plochy 4) získán rovněž ze silně kyselé plochy 3. Vysoký stupeň přizpůsobení byl u druhů „*Acidomyces richmondensis*“ a *Sporothrix* sp. podložen rovněž posunem růstového optima na hodnotu pH 3. U druhého zmiňovaného druhu byl jako u jediného inhibován růst při pH 7 a 8. GROSS & ROBBINS (2000) odlišují druhy acidotolerantní od acidofilních právě na základě jejich schopnosti růst při neutrálním případně alkalickém pH. Podle tohoto rozlišení by se dal pak zmiňovaný druh *Sporothrix* sp. označit za acidofilní. K druhu s provizorním názvem „*Acidomyces richmondensis*“ byl jako nejbližší taxon molekulárně přiřazen druh právě s tímto pracovním označením, který byl izolován z extrémně kyselých rudných dolů v Kalifornii BAKER et al. (2004), což podporuje výše zmiňovanou acidotolerantní charakteristiku.

Všechny testované druhy prokázaly schopnost růstu na obou médiích s vyššími koncentracemi soli a lze je tedy považovat za halotolerantní. Nicméně růstová optima převážné většiny druhů byla zaznamenána na médiu bez přídavku soli. Optimální růst na zasolených médiích byl zjištěn pouze u čtyř zástupců (*Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium* sp. 6 – 0,25M MEA a *Penicillium coprobium* - 0,5M MEA). PITT & HOCKING (1997) zavedli v roce 1975 pro několik málo xerofilních druhů (schopné růst na médiích s nízkou vodní aktivitou), které vykazují lepší růst na médiu s přídavkem NaCl než bez ní, termín halofilní. Podle této definice by se pak poslední čtyři testovaní zástupci dali označit za halofilní. V případě druhu *Penicillium coprobium* se jedná o zástupce často izolovaného z půdy a zvířecího trusu, nicméně bez výrazné míry zasolení (FRISVAD &

FILTENBORG, 1989). V NPR Soos byl zaznamenán výhradně ze značně zasolené plochy 3 (Tab. 2). Stejně tak tomu bylo u běžné půdní houby *Penicillium chrysogenum*. DOMSCH et al. (1980) uvádějí tento druh rovněž ze zasolených půd a SAMSON & FRISVAD (2004) ze solivarů. Druh *Fusarium culmorum* je uváděn kromě jiného ze slanisek (DOMSCH et al. 1980).

V případě dvojic srovnávaných kmenů byly značné rozdíly v odpovědi na změnu pH a salinity zaznamenány především mezi izoláty z NPR Soos, CBS a Chvaletic. Jejich příčinou může být částečně odlišný charakter substrátu, z něhož byly kmeny izolovány, různé stáří kmenů či vnitrodruhová variabilita ve fyziologických vlastnostech.

## Závěr

U převážné většiny testovaných druhů byla zjištěna vysoká schopnost tolerance jak nízkých hodnot pH, tak i vyššího zasolení substrátu. Bylo zaznamenáno rovněž šest extrémně acidotolerantních zástupců schopných růst i na silně kyselém pH 1 a 2. Získané výsledky ukazují nejen na specifické fyziologické vlastnosti pravděpodobných nových druhů, ale i na poměrně značnou schopnost adaptace běžných půdních druhů na extrémní podmínky studovaného substrátu. Kmeny z extrémně kyselé půdy (pH 1.5-2) zároveň vykazují optimum růstu při velmi nízkém pH. Na druhou stranu tyto acidotolerantní kmeny nemají růstové optimum na silně slaném médiu, které simuluje podmínky, ze kterých byly izolovány. To ukazuje, že růstové optimum v oblasti nízkých hodnot pH je klíčové pro osídlení extrémně kyselého a slaného substrátu a schopnost efektivního růstu ve slaném prostředí je druhotná.

## Přehled literatury

- ABDEL-FATTAH, H. M., MOUBASHER A. H., ABDEL-HAFEZ S. I., 1977. Studies on mycoflora of salt marshes in Egypt I. Sugar fungi. *Mycopathologia* 61 (1): 19-26.
- ABDEL-HAFEZ, S. I. I., 1981. Halophilic fungi of desert soils in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 75 (2): 75-80.
- ABDEL-HAFEZ, S. I. I., 1982. Osmophilic fungi of desert soils in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 80 (1): 9-14.
- APINIS, A. E., CHESTERS, C. G. C., 1964. Ascomycetes of some salt marshes and sand dunes. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 47 (3): 419-435.
- BAKER, B. J., LUTZ, M. A., DAWSON, S. C., BOND, P. L., BANFIELD, J. F., 2004. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Appl. Env. Microbiol.* 70 (10): 6264-6271.
- BORUT, SH. Y., JOHNSON, R. W. JR., 1962. Some biological observations on fungi in estuarine sediments. *Mycologia* 54: 181-193.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Vol. 1. London etc., 859 p.
- FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 1989. Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81(6): 837 – 861.
- GOULD, W. D., FUJIKAWA, J. I., COOK, F. D., 1974. A soil fungus tolerant to extreme acidity and high salt concentrations. *Can. J. Microbiol.* 20: 1023-1027.
- GROSS, S., ROBBINS, E. I., 2000. Acidophilic and acid-tolerant fungi and yeasts. *Hydrobiologia* 433: 91-109.
- GUIRAUD, P., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F., SAGE, L., 1995. Mycoflora of soil around the Dead Sea. II – Deuteromycetes (except *Aspergillus* and *Penicillium*). *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 318-322.
- HENDRARTO, B. I., DICKINSON, H. C., 1984. Soil and root micro-organisms in four salt marsh communities. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 83(4): 615-620.

- HUJSLOVÁ, M., 2006. Saprotrofní mikroskopické houby v půdách extrémních stanovišť (na příkladu NPR Soos). ms., Dipl. pr., depon. in Knih. kat. bot. PřF UK Praha, 116 p.
- KUBÁTOVÁ, A., PRÁŠIL, K., VÁŇOVÁ, M., 2002. Diversity of soil microscopic fungi on abandoned industrial deposits. *Crypt. Mycol.* 23: 205-219.
- LÓPEZ-ARCHILLA, A. I., MARIN, I., AMILS, R., 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbiol. Ecol.* 41: 20-35.
- MOUBASHER, A. H., ABDEL-HAFEZ, S. I. I., BAGY, M. M. K., ABDEL-SATAR, M. A., 1990. Halophilic and halotolerant fungi in cultivated desert and salt marsh soils from Egypt. *Act. Mycol.* 26 (2): 65-81.
- MOUSTAFA, A. F., 1975. Osmophilous fungi in the salt marshes of Kuwait. *Can. J. Microbiol.* 21 (10): 1573-1580.
- OREN, A., 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 334-348.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1997. *Fungi and food spoilage*. London, 593 p.
- POŽÁROVÁ, E., 2004. Soil microfungi associated with the roots of *Calamagrostis epigejos*, an expansive plant abundant in abandoned sedimentation basin in Chvaletice. In: Kovář, P. (eds.), *Natural Recovery of Human-Made Deposits in Landscape*, Praha, p. 132-146.
- PUGH, G. J. F., 1962. Studies on fungi in coastal soils II. Fungal ecology in developing salt marsh. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 45 (4): 560-566.
- RANZONI, F. V., 1968. Fungi isolated in culture from soils of the Sonoran Desert. *Mycologia* 60: 356-371.
- SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C., 2004. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Stud. Mycol.* 49, 260 p.
- STEIMAN, R., FORD, L., DUCROS, V., LAFOND, J., GUIRAUD, P., 2004. First survey of fungi in hypersaline soil and water of Mono Lake area (California). *Ant. van Leeuw.* 85: 69-83.
- STEIMAN, R., GUIRAUD, P., SAGE, L., SEIGLE-MURANDI, F., 1997. Soil mycoflora from the Dead Sea Oases of Ein Gedi and Einot Zuqim (Israel). *Ant. van Leeuw.* 72: 261-270.
- STEIMAN, R., GUIRAUD, P., SAGE, L., SEIGLE-MURANDI, F., LAFOND, J.-L., 1995. Mycoflora of soil around the Dead Sea. I – Ascomycetes (including *Aspergillus* and *Penicillium*), Basidiomycetes, Zygomycetes. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 310-317.
- SUGIMORI, K. ET AL., 2002. Microbial life in acid lake and hot springs of Poás Volcano, Costa Rica. – work presented at the Colima Volcano International Meeting, Mexico.
- ŠVANČÁRKOVÁ, M., 2002. Microbial characteristics of acid sulphate soils. *Phytopedon* 1: 52-58.
- ULFIG, K., LUKASIK, W., GUARRO, J., CANO, J., GENÉ, J., VIDAL, P., FIGUERAS, M. J., 1997. The seasonal changes of keratinolytic fungi in sediments of Catalanian rivers (Spain). *Water Air Soil Poll.* 96: 269-290.
- VOLZ, P. A., WASSER, S. P., 1995. Soil micromycetes of selected areas of Israel. *Isr. J. Plant Sci.* 43: 281-290.
- ZAK, J. C., WILDMAN, H. G., 2004. Fungi in stressful environments. In: MUELLER G. M., BILLS G. F., FOSTER M. S., *Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods*, London, 777 p.

# Mikroskopické vláknité huby vo vnútornom prostredí tokajských vínnych pivníc

ZUZANA KOLLÁRIKOVÁ & ELENA PIECKOVÁ

**KOLLÁRIKOVÁ, Z., PIECKOVÁ, E.: Microscopic filamentous fungi in indoor environment of classic tufa wine-cellars.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 24-30. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

During two years – in warm (spring - summer) and colder (autumn) parts of a year – indoor mycological analysis (air, walls and other surfaces) was carried out in a classic tufa wine-cellar in Malá Tŕňa, Eastern Slovakia. Samples of the air were taken by an aeroscop, visible moulds were scraped from all indoor surfaces. Dichloran agar with 18 % glycerol and malt extract agar were used for isolation of fungi. Micromycetes were identified according to their macro- and micromorfology after cultivation at 25 and 37 °C for 5 – 14 d. Quantitative aeromycoflora was also characterized. Indoor surfaces (walls, floor, barrels, a sculpture) were colonized mainly by *Penicillium lividum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. sydowii*, rarely by *A. flavus*, *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp. independently onto the season. Penicilia - *P. lividum*, *P. arenicola*, *P. verrucosum* and *Cladosporium sphaerospermum* dominated in the air mycoflora all over the year, in winter-time also *Eurotium herbariorum* and *Alternaria* sp. were found massively. During the warm periods air-borne aspergily *A. fumigatus* and *A. sydowii* were also relevant. *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *P. citrinum*, *P. bilai*, *P. cyaneum*, *P. granulatum*, *P. sublateritium*, *Epicoccum nigrum*, *Scopulariopsis fusca* and *Chrysosporium queenslandicum* were found occasionally in the air, too. Counts of the air micromycetes in 1 m<sup>3</sup> were also stable over the year – in the main corridor by the entrance 330, at the opposite side 405 colony-forming unit (CFU), in a gustation room and neighbouring spaces upto 750 CFU – probably because of changing and mixing of the indoor and outdoor air. In the future, we should focus more on the presence of thermophilic *A. fumigatus* in all scratches. Regarding the quantity of the air-born indoor mycobiota in the corridor, it can be considered to be a healthy environment.

**Keywords:** classic tufa wine-cellar, microscopic filamentous fungi

Zuzana Kolláriková, Elena Piecková, Slovak Medical University, Limbová 12, SK – 833 03 Bratislava, Slovak Republic. E-mail: [zuzana.kollarikova@szu.sk](mailto:zuzana.kollarikova@szu.sk), [elena.pieckova@szu.sk](mailto:elena.pieckova@szu.sk)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

V súvislosti s prítomnosťou mikroskopických húb vo vnútornom prostredí všeobecne sa doteraz najväčšia pozornosť venovala ich schopnosti vyvolať alergické reakcie s dýchacími alebo kožnými prejavmi. Podľa najnovších poznatkov však už nemožno prehladiť ani nepriaznivý účinok mykotoxínov, hubových enzýmov a prchavých organických látok produkovaných hubami, z ktorých mnohé sú známe karcinogény, na zdravie obyvateľov (PIECKOVÁ, 2000, 2001). Napodiv veľmi málo odborných prác sa doteraz venovalo prostrediu vínnych pivníc, hoci tieto predstavujú vynikajúce prostredie pre prežívanie, rast a rozmnožovanie mikroskopických húb – teplotno-vlhkostný režim, znížené vetranie, prítomnosť drevených obkladov, sudov, prach, zárodok húb na hrozne, pracovnom náradí, odevoch pracovníkov atď.

Analýzy pochádzajúce najmä z francúzskeho prostredia ukázali, že vzdušná mykoflóra v 20 študovaných vínnych pivniciach bola bohatá a rôznorodá. Počty zárodokov mikroskopických vláknitých húb v ovzduší rôznych typov pivníc sa v sledovanom ročnom období takmer nelíšili - stovky až tisícky v 1 m<sup>3</sup>, čo je relatívne málo. Najvyššie počty zárodokov sa vyskytovali v letnom období, čo možno vysvetliť najvhodnejšími teplotno-vlhkostnými podmienkami pre ich rast a prežívanie. Z kvalitatívneho hľadiska bola mykoflóra tradičnej pivnice s nízkou výmenou vzduchu a relatívne stabilnou teplotou aj vlhkosťou

pomerne vyrovnaná. V ovzduší všetkých sledovaných pivníc prevládali huby z rodov *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Penicillium*, sporadicky sa izolovali zárodky iných vyšších (hýfomycéty) a nižších (zygomycéty) mikroskopických vláknitých húb (SIMERAY et al. 1998, 2000).

Počas jednorazovej štúdie hubovej kolonizácie stien slovenských tokajských vínnych pivníc sa najčastejšie izolovali penicíliá (BACIGÁLOVÁ et al., 2003; PIECKOVÁ & PIVOVAROVÁ, 2003). Ďalšie významné rody húb zastúpené vo vzorkách zoškrabov z týchto stien boli aspergily, alternárie, fuzáriá, mukory, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Tritirachium*, *Geotrichum*, *Verticillium*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Thielavia*, *Oidiodendron*, ale aj nesporulujúce mycélium a kvasinky.

## Cieľ

Mykologická analýza vnútorného prostredia (ovzdušia, stien a povrchov) v klasickej tufovej vínnej pivnici v Malej Trni opakovane ročne - v teplejších (jar - leto) a chladnejších (jeseň) častiach a jej zhodnotenie.

## Materiál a metódy

Vzorky ovzdušia sa odoberali aeroskopicky (A-AIR-010, Agea, s. r. o., Praha, ČR)) v dýchacej zóne (cca 1,5 m nad zemou) v hlavnej chodbe pivnice pri vchode, na jej opačnom konci, v degustačnej miestnosti a príľahlých bočných chodbách. Z vnútorných povrchov steny, podlahy, sudy, socha) sa viditeľné porasty mikromycét zoškrabávali. Na izoláciu húb sa používal dichlóranový agar s 18 % glycerolu a sladinkový agar (oboje HiMedia, Bombaj, India). Po kultivácii 5 - 14 d pri 25 a 37 °C sa mikromycéty identifikovali na základe ich makro- a mikromorfologie. Stanovila sa tiež koncentrácia aeromykoflóry kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ) v 1 m<sup>3</sup> ovdušia.

## Výsledky

Vnútorne povrchy boli kolonizované predovšetkým *Penicillium lividum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. sydowii*, ojedinele *A. flavus*, *Mortierella* sp., *Trichoderma* sp. nezávisle na ročnom období (Obr. 1).

V ovzduší celoročne dominovali penicíliá - *P. lividum*, *P. arenicola*, *P. verrucosum* a *Cladosporium sphaerospermum*, v jesennom období aj *Eurotium herbariorum* a *Alternaria* sp.. Zriedkavo sa z ovzdušia izolovali *A. versicolor*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *P. citrinum*, *P. bilai*, *P. cyaneum*, *P. granulatum*, *P. sublateritium*, *Epicoccum nigrum*, *Scopulariopsis fusca* a *Chrysosporium queenslandicum* (Obr. 2 - 6).

V koncentrácii vzdušných mikromycét v 1 m<sup>3</sup> bol tiež zaznamenaný celoročný status quo – v hlavnej chodbe pri vchode 330, na opačnom konci 405 kolónie tvoriacich jednotiek (KTJ), v degustačnej miestnosti a príľahlých priestoroch až 750 KTJ – možno usudzovať na výmenu a zmiešavanie vzduchu s vonkajším prostredím (Obr. 7, 8).

V kvalitatívnom hubovom spektre sa vnútorné ovzdušie a povrchy vzájomne reflektovali podľa očakávania.

## Záver

V ovzduší študovanej pivnice prevládali huby z rodov *Aspergillus*, *Cladosporium* a *Penicillium*, sporadicky sa izolovali zárodky iných vyšších (hýfomycéty) a nižších

(zygomycéty) mikroskopických vláknitých húb. Jeden z najčastejších aspergilov v pivnici bol *A. fumigatus*, ktorý patrí k medicínsky významným hubám (potenciálne patogénny) a v budúcnosti je potrebné viac sústrediť pozornosť na prítomnosť tohto termofilného druhu na povrchoch v teplých ročných obdobiach. *A. sydowii* je zas príbuzným najčastejšieho potenciálne toxínogénneho kolonizátora vnútorných priestorov v našich podmienkach *A. versicolor*.

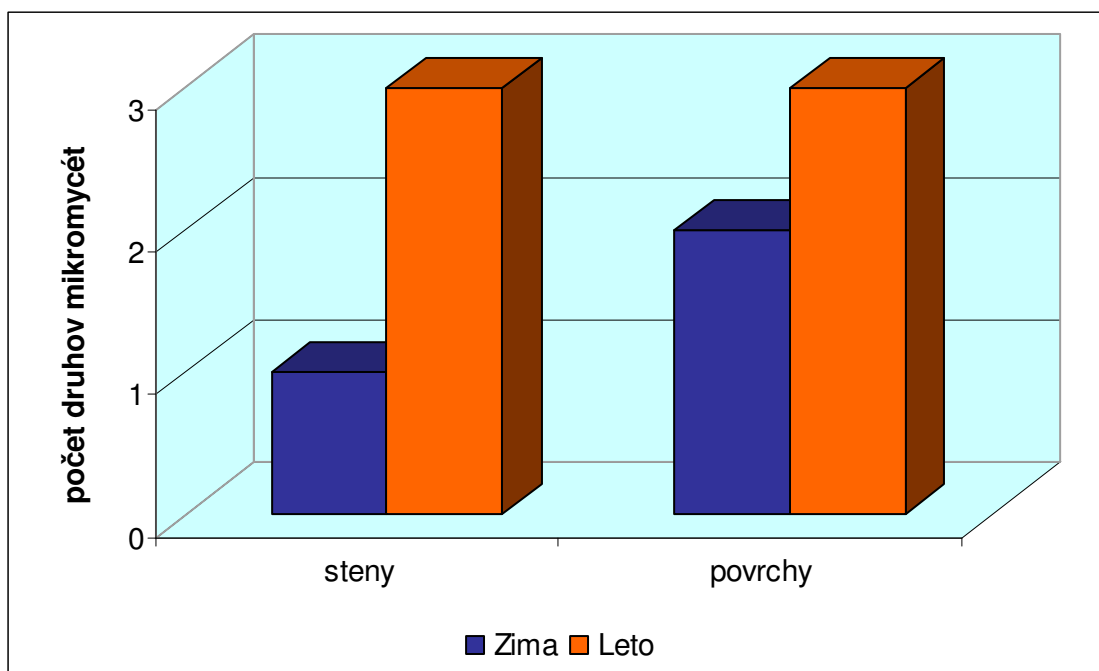
V zimnom období v pivnici boli prítomné aj huby xerofilné, t. j. rastúce pri nižšej využiteľnej vlhkosti, huby – *Eurotium herbariorum*. Zástupcovia rodu *Cladosporium*, najmä *C. sphaerospermum*, prevládali najmä v jesennom období, keďže ide o typické tzv. listové huby. Spektrum penicílií izolovaných z ovzdušia bolo veľmi široké – až 13 druhov. Výsledky sú porovnateľné v predchádzajúcimi publikáciami napr. z vínnych pivníc vo francúzskej Jure (SIMERAY et al. 1998, 2000). Zo zorného uhla zdravotného významu sú huby *Cladosporium sphaerospermum*, *A. flavus* a penicíliá známe ako alergizujúce a ich toxické produkty môžu priamo poškodzovať dýchacie cesty citlivých osôb (PIECKOVÁ & KUNOVÁ, 2002).

Pre mikroskopické huby vo vnútornom prostredí doteraz nie sú stanovené hygienické limity. Zvyčajne sa za akceptovateľnú koncentráciu hubových zárodkov v ovzduší považuje 200 - 500 zárodkov v 1 m<sup>3</sup>, pričom tam nesmú byť patogénne a toxínogénne druhy, ani prevažovať len jeden druh. Z kvantitatívneho mykologického hľadiska je teda možné považovať vnútorné prostredie pivníc za zdravotne nezávadné. Celkovo možno v pivnici konštatovať viac-menej mykologicky stabilné vnútorné prostredie počas celého roka.

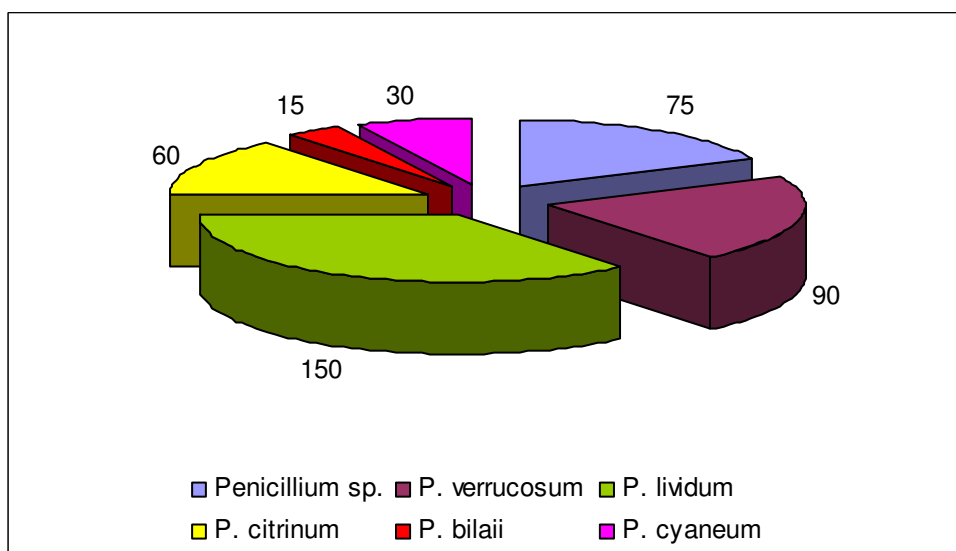
## Prehľad literatúry

- BACIGÁLOVÁ, K., KAČÁNIOVÁ, M., TÓTH, D., 2003. Fungal colonization on the walls in Slovak Tokay wine cellars – a case study. *Biologia* 58 (12): 5-10.
- PIECKOVÁ, E., 2000. Mikroskopické huby vo vnútornom prostredí budov a zdravie ich obyvateľov. *Remedia Klinická Mikrobiológia* 4 (2): 40-41.
- PIECKOVÁ, E., 2001. Mikroskopické vláknité huby v textilných vláknach rastlinného pôvodu a ich zdravotný význam. *Mykol. Listy* 78: 11-17.
- PIECKOVÁ, E., KUNOVÁ, Z., 2002. Indoor Fungi and Their Ciliostatic Metabolites. *Ann. Agri. Environ. Med.* 9: 59-63.
- PIECKOVÁ, E., PIVOVAROVÁ, Z., 2003. Mikroskopické vláknité huby vo vnútornom prostredí vínnych pivníc. *Vinohrad* 41: 22-23.
- SIMERAY, J., MANDIN, D., MERCIER, M., CHAUMONT, J.P., 1998. Survey of airborne spora in French wine cellars. *Aerobiologia* 17 (1): 19-24.
- SIMERAY, J., MANDIN, D., CHAUMONT, J. P., 2000. Annual variations of airborne fungal propagules in two wine cellars in French Jura. *Cryptogamie. Mycology* 21 (3): 163-169.

Obr. 1. Mikromycéty izolované z vnútorných povrchov vo vínnej pivnici.

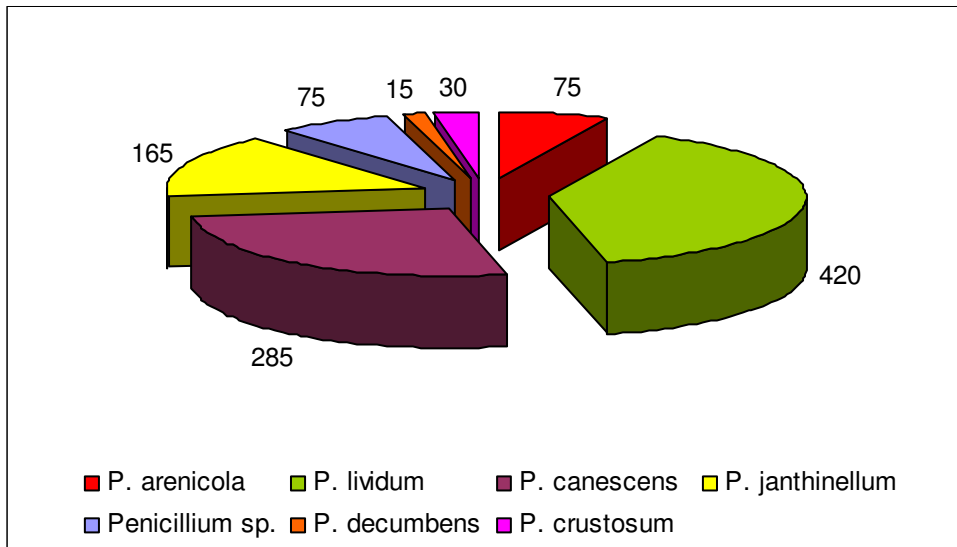


Obr. 2. Druhové spektrum rodu *Penicillium* v ovzduší degustačnej miestnosti v chladnom období roka.

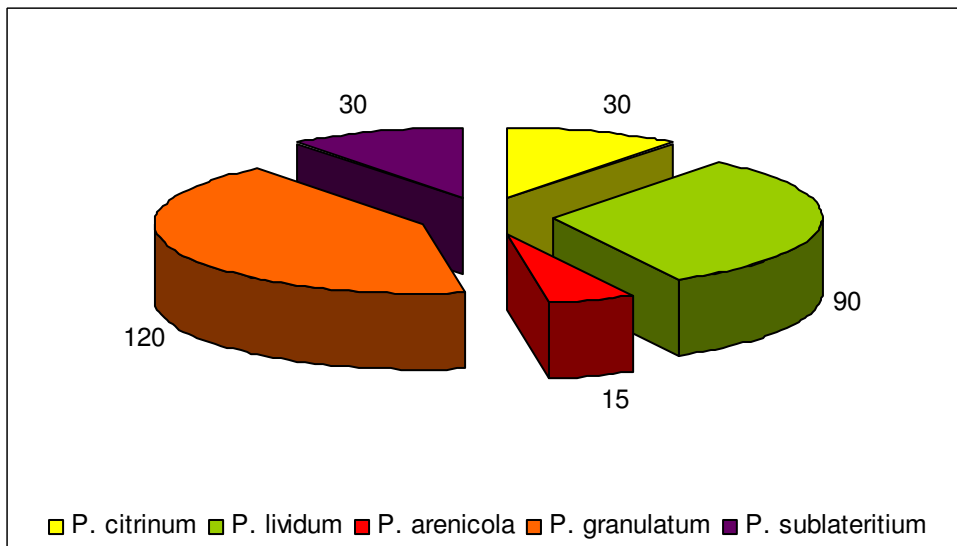




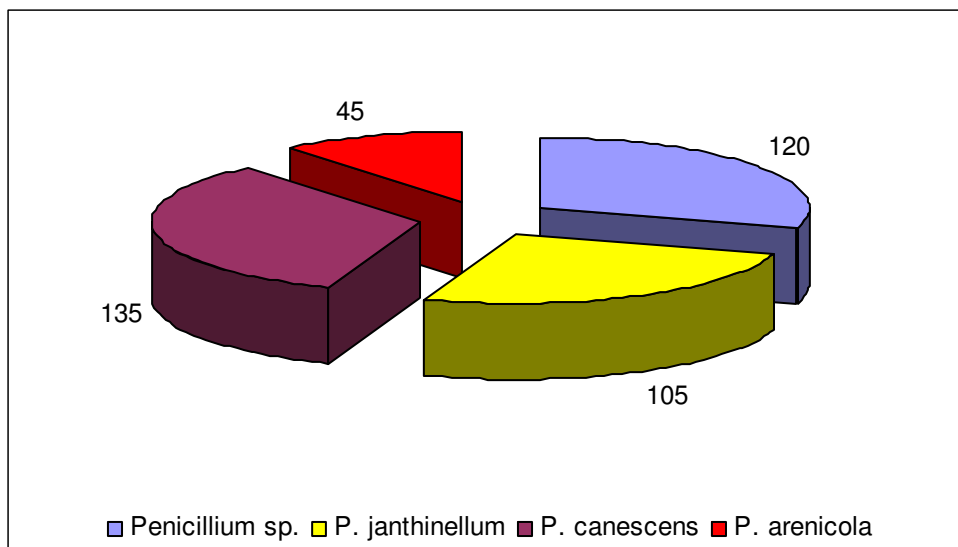
**Obr. 3.** Druhové spektrum rodu *Penicillium* v ovzduší degustačnej miestnosti v teplom období roka.



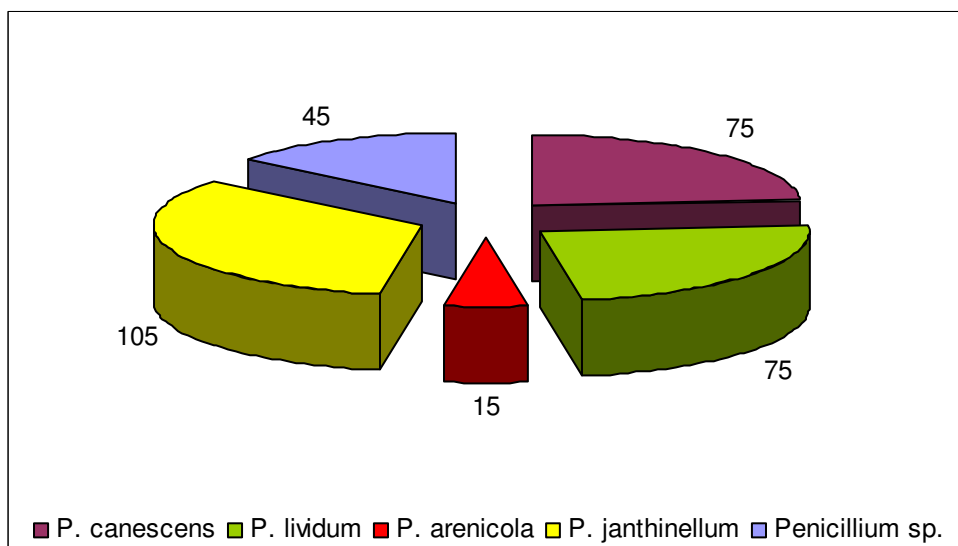
**Obr. 4.** Druhové spektrum rodu *Penicillium* v ovzduší hlavnej chodby (koniec oproti vchodu) v chladnom ročnom období.



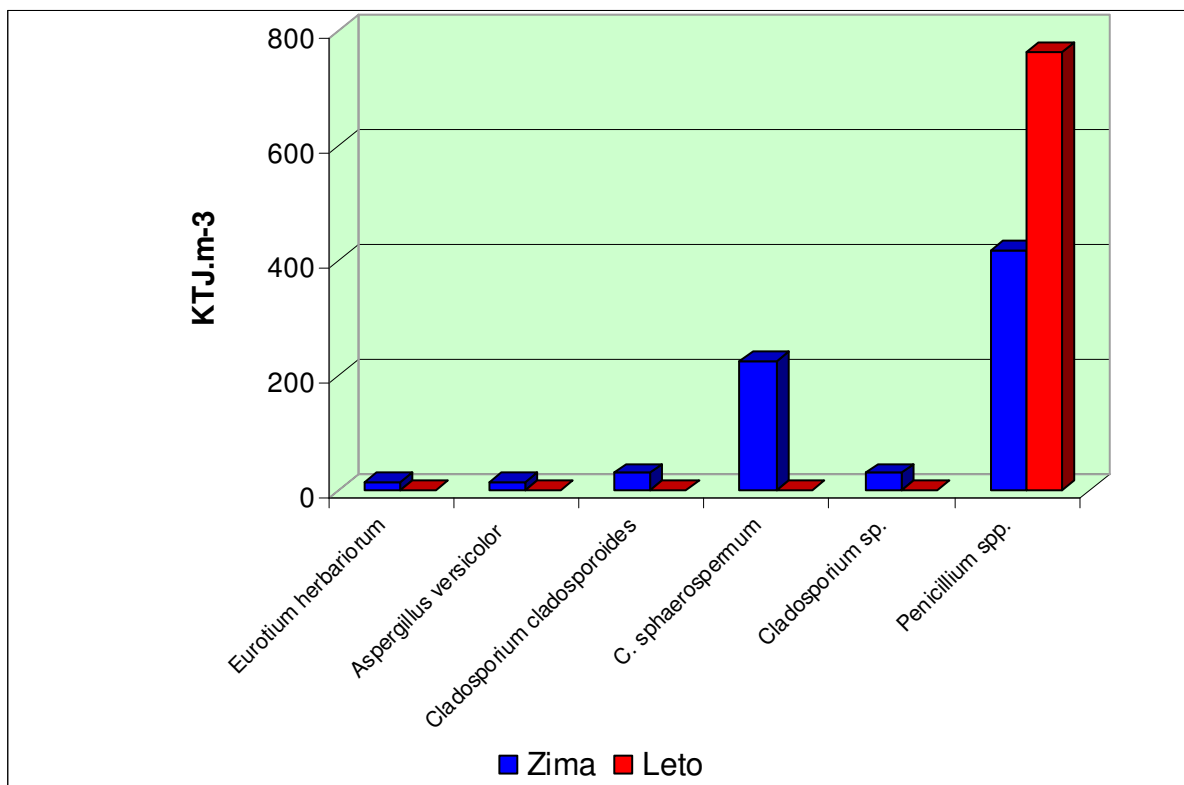
**Obr. 5.** Druhové spektrum rodu *Penicillium* v ovzduší hlavnej chodby (koniec oproti vchodu) v teplom ročnom období.



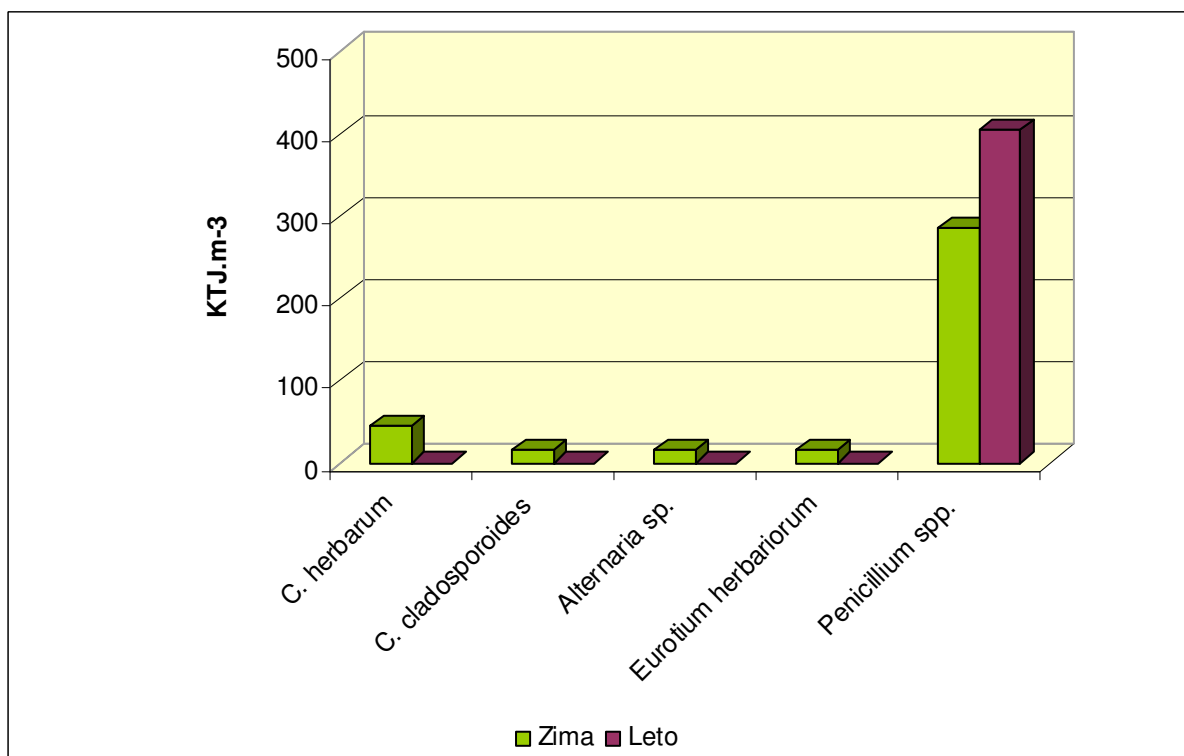
**Obr. 6.** Druhové spektrum rodu *Penicillium* v ovzduší hlavnej chodby (pri vchode) v teplom ročnom období.



Obr. 7. Vzdušná mykoflóra v degustačnej miestnosti počas roka.



Obr. 8. Vzdušná mykoflóra v hlavnej chodbe (oproti hlavnému vchodu) počas roka.



## Zkušenosti se studiem hub vázaných na podkorní hmyz

MIROSLAV KOLAŘÍK

### **KOLAŘÍK, M.: Experiences from studies of fungi associated with subcortical insect.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 31-36. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The paper reviewed methods used in study of fungi associated with subcortical insect, based on the personal experience of the author. In particular, procedures used in study of ophiostomatoid and ambrosia fungi, genera *Daldinia*, *Dipodascus*, *Entonaema*, *Geosmithia* and *Quambalaria* are presented. Described methods include sampling of the subcortical insects from field and definition of the sample size. Next steps is isolation of fungi transmitted on surface of bodies or in mycetangia using standard and special isolation media from intact or surface sterilized bodies. Then the preparation of single spore cultures follows, which ensures purity of cultures necessary for molecular analyses. Fungi are then cultivated on diagnostic media and are divided into groups according to their colonial morphology or/and micromorphology. Validity of this division can be confirmed by PCR fingerprinting (methods RAPD and ISSR-PCR). Representative strains from each group (defined by shared phenotype or genotype) are compared with known taxa (using standard keys or published DNA sequences) and determined as known or unknown species. Knowledge about fungal communities from many samples covering various insect species, host trees and localities can be used in study of areal, host range and host specificity of the particular fungal species. Further, these data can lead to elucidation of environmental variables which shape these fungal communities and can describe the stability of whole symbiosis. Finally, isolated fungi can be used in taxonomical analyses.

**Keywords:** insect, ophiostomatal and ambrosia fungi, PCR fingerprinting, RAPD, ISSR-PCR, *Geosmithia*

Miroslav Kolařík, Institute of Microbiology AS CR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20, Praha 4. E-mail: [mkolarik@biomed.cas.cz](mailto:mkolarik@biomed.cas.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Obecně o houbových symbiontech podkorního hmyzu

Odumírající dřevo láká celou řadu hmyzu, jako jsou kůrovci (Coleoptera, Scolytidae), tesaříci (Coleoptera, Cerambycidae), jádrohlodi (Coleoptera, Platypodidae), krasci (Coleoptera, Buprestidae), nosatci (Coleoptera, Curculionidae), korovníci (Coleoptera, Bostrichidae) a pilořitky (Hymenoptera, Siricidae), kteří zde tráví většinu svého vývojového cyklu. Podkorní prostředí je vlhkostně i teplotně stabilní, se stálou nabídkou potravy a dostatečnou ochranou před predátory. Nicméně obsahuje řadu toxických látek, je relativně chudé na dusík a fosfor a nenabízí látky esenciální pro vývoj hmyzu (steroly, B-vitamíny). Z tohoto důvodu vstupuje podkorní hmyz, stejně jako všichni herbivoři, do ekto- či endosymbióz s houbami. Kromě dodávání živin a detoxifikace substrátu mohou houby oslabit či zabít napadenou dřevinu a tím jí zpřístupnit další invazi hmyzu.

Tyto symbiózy se liší pevností vztahu. Lýkožraví brouci jsou většinou potravně nezávislí a houbami se spíše přikrmují. Hluběji ve dřevě, kde je živin daleko méně tvoří houby výhradní složku potravy. Obligátní symbionti jsou často substrátově specifictí a nenachází se mimo podkorní prostředí. Naopak některé z volněji asociovaných hub známe i z jiných ekologických rolí.

Lýkožravý hmyz, jako jsou kůrovci, krasci a nosatci, je nejčastěji asociován s tzv. ophiostomatálními houbami jako je *Ophiostoma* a *Graphium* (Ascomycota: Ophiostomatales, Microascales), kvasinkami, řadou bazidiomycetů (např. *Entomocorticium*) a nepohlavními hyfomycety rodu *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales). Symbionti dřevokazných (tzv. ambrosiových) brouků patří mezi tzv. ambrosiové houby (např. *Ambrosiella*). Pilořitky, které

také hlodají v bělovém dřevě žijí v symbióze s choroši (*Amylostereum*, *Cerena*) a dřevnatkovitými houbami (*Daldinia*, *Entonaema*).

Symbiózou hub s podkorním hmyzem se zabývá řada přehledových studií, pojednávají zejména o diverzitě symbiontů, hostitelské specifitě a interakcích hmyzu a dřeviny (BARRAS & PERRY, 1975; BATRA, 1967; FRANCKE-GROSMANN, 1967; HARRINGTON, 2005; KIRISITS, 2004; KIRSCHNER, 2001; SIX, 2003, 2005; ŠRŮTKA et al., 2007).

Studium houbových symbiontů hmyzu má řadu specifík. Problémy jsou zejména s jejich izolací a kultivací. Ostatní postupy se neliší od jiných skupin hub. Následující text popisuje postupy, které se mi osvědčily za posledních osm let studia těchto hub.

## Metody izolace

Za prvé je nutné získat dospělce či larvy daného hmyzu. Nejsnazší je volný sběr v terénu, kde v laboratoři vyjmeme hmyz přímo z napadené dřeviny. Velkou výhodou je možnost pozorovat růst hub přímo v chodbičkách hmyzu, které lze také kultivovat ve vlhké komůrce. Hmyzí jedince lze rovněž přímo na lokalitě vyjmout a spolu s fragmenty chodeb uchovávat v epruvetách s minerálním olejem. Takto konzervovaný materiál, uchovávaný při pokojové teplotě, lze kultivovat ještě po několika letech (dle mé zkušenosti minimálně 3 roky). Citlivé ambrosiové houby tuto konzervaci nepřežijí, takže metoda je vhodná zejména pro studium ophiostomatálních hub, rodu *Geosmithia* a *Dipodascus*. Jedince vyjmuté ze dřeviny lze rovnou položit na agarové médium a izolovat celkovou mykofloru. Dále je možno kultivovat suspenzi získanou opláchnutím dospělců či larev (sonifikací v roztoku vody a Tween 80). Nicméně tento postup není více rozšířen, je pracnější a poskytuje podobné výsledky (až na počty CFU, které stejně nejsou moc informativní) jako klasická kultivace těl na agarové půdě. K získání vzorků méně běžných druhů hmyzu standardní kvality (stejná lokalita, doba výletu atd.) lze použít lapákovou metodu. Při ní nastražíme mrtvý strom, který je po invazi hmyzu uzavřen do nádob (eklektorů), ze kterých jsou lapáni vylétající brouci. Brouci z eklektorů jsou, na rozdíl od brouků a larev vyjmutých z chodbiček, kontaminovány nežádoucí mykobiota (*Trichoderma*, *Penicillium*) z povrchu kůry, takže je dobré je povrchově sterilizovat modifikovaným Whitovým roztokem (1%  $HgCl_2$ , expozice 1-3 min, BARRAS, 1972). Dospělci kůrovců a jádrohlodů mají na povrchu těla drobné orgány, mycetangia, v kterých si přenášejí své symbionty. Brouky můžeme povrchově sterilizovat a jejich tělo rozdělit. Následnou kultivací na médiu získáme pouze specifické symbionty, které si jedinec aktivně přenáší a také zjistit lokalizaci přenosu. Z mycetangií lze dále vyjmout jehlou jejich obsah a kultivovat ho. K povrchové sterilizaci používám modifikovaný Whitův roztok a sterilizační metodu dle FRANCKE-GROSMANN (1956). Při ní necháme živé dospělce pobíhat 12 h po vlhkém filtračním papíru, 12 h po papíru suchém, pak těla rozdělíme a položíme na podložní sklíčko s tenkou vrstvou kultivačního média, které uzavřeme do Petriho misky kvůli zachování vlhkosti. Tímto způsobem můžeme izolovat houby z povrchu exoskeletu a mycetangií lýkožravých a řady dřevokazných brouků. V případě pilořitek je nutné vyjmout mycetangium, což je malý váček uvnitř těla samiček v oblasti báze kladélka (ŠRŮTKA et al., 2007; TALBOT, 1977). Toto mycetangium, které obsahuje čistou kulturu symbionta, stačí resuspendovat v 1ml vody a roztok vysít na agar.

K izolaci se nejčastěji používá 2% malt extrakt agar (MEA), nebo MEA s 0,3% kvasničného extraktu (YMEA), či přirozené médium (vodní agar s kousky lýka či bělového dřeva dané hostitelské dřeviny). Ambrosiové houby vyžadují řadu esenciálních látek, např. do YMEA se přidává močovina (1%, 3%, 5%), B-vitaminy (40 ug/l B<sub>1</sub>, 40 ug/l B<sub>2</sub>, 30 ug/l B<sub>6</sub>, 50 ug/l B<sub>5</sub>, 60 ug/l B<sub>3</sub>, což je složení léčiva B-komplex Zentiva), či kasein a pepton (BATRA, 1963, 1967, 1972, 1985; BATRA & MICHIE, 1963; FRANCKE-GROSMANN, 1967). K selektivní izolaci hub z řádu Ophiostomatales, se přidává cyklohexemid (100 µg/l). Kultivace probíhá při 24 °C.

Při izolaci hub obecně nejdříve izolují houby z chodeb. Z nalezených plodnic a

ambrosiové vrstvy zhotovím trvalé preparáty (medium PVA, orámovaný epoxidovým lakem). U některých hub je těžké navodit fruktifikaci *in vitro* (některé heterothalické *Ophiostoma*, *Gondwanamyces* a *Cornuvesica*) nebo nerostou vůbec (ambrosiové houby), takže trvalý preparát je často jediný doklad o jejich existenci. Z vykultivovaných hub je dále nutné zhotovit monosporické izoláty. Spory hub odebrané z jedné kapky spor či konidiálního řetězce se ředí (100x, 1000x) a vysejí na YMEA médium. Vybere se izolovaná kolonie, která se považuje za potomka jedné diaspory a dále se přeočkovává. Z monosporické kultury se následně udělá trvalý preparát a část (0,2-0,55 cm<sup>2</sup>) se uchovává při -20 °C pro izolaci DNA, což opět může být jediný doklad pokud daná houba nesnese podmínky *in vitro* a po dalším přeočkování hyne. Monosporická kultura je jediná záruka čistoty kmene, protože řada asociovaných hub je morfologicky velmi podobná a libovolně se prorůstá. Tyto houby jsou navíc dimorfní (s kvasinkovou i myceliární fází), takže nevíme, zda jde o jeden druh či o hyfomycet kontaminovaný kvasinkou (případ rodu *Ambrosiella*, *Raffaelea*, *Dipodascus*, *Quambalaria*, *Geosmithia*).

## Metody identifikace

Dalším krokem je rozřídění kmenů do skupin dle morfologické podobnosti. Houby se naočkují na identifikační média a kultivují při dvou teplotách (24°C: MEA, CYA, CZD; 37°C: MEA) a následně se rozřídí do skupin dle typu a velikosti kolonie. Jako přídatné mohou být použity některé výrazné znaky mikromorfologické. Při pozorování ophiostomatálních hub se synnematální anarmofou je dobré použít i chudší medium, PCA či SSA, pro navození produkce synnemat (SSA; glukóza 2 g, L-asparagin 0,08 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 mg, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 mg, pyridoxin 0,1 mg, linoleová kyselina 0,5g, agar 15 g, H<sub>2</sub>O 1L) (HINDAL & MCDONALD, 1977). Kolonie vybraných kmenů z každé skupiny dokumentují (digitální kamerou či skenerem) a suším (24h, při 40 °C) jako dokladový materiál pro případné uložení do herbáře. Opět, sušená kultura může být velmi cenná u hub, které v kultuře rychle hynou.

Morfologické porovnávání za účelem redukce počtu klonů je dobré dělat na materiálu z co nejpodobnějších vzorků (blízké lokality, stejný substrát). Dva kmeny se stejným morfotypem pak velmi pravděpodobně patří do stejného druhu. Vybrané kmeny z každé skupiny lze určit do druhů dle morfologie či DNA sekvencí. Při třídění neznámých hub s neznámou vnitrodruhovou fenotypovou variabilitou nevíme, jak významné jsou drobné rozdíly mezi koloniemi (např. intenzita produkce pigmentu, či velikost kolonie). To často vede k vyčlenění několika morfologických skupin spadajících pod jeden druh. Nicméně tato malá tolerance k morfologickým odlišnostem zajistí, že v jedné skupině nebudou dva druhy, ale naopak, což není na škodu. Další metodou jak redukovat počet velmi podobných kmenů či přímo určit danou houbu je PCR-fingerprinting. K tomuto účelu se v naší laboratoři používá metoda RAPD (primery 10R, 8F, OPA02, OPA20, KOLAŘÍK et al. 2005, které fungují na široké spektrum hub) a metoda ISSR-PCR (různé primery dle TUTHILL, 2004). Tyto metody mají rozlišovací schopnost na úrovni druhu a nižší. Tzn. různé kmeny jednoho druhu budou mít stejný či velmi podobný fingerprint (90-100% PCR fragmentů), který se bude velmi lišit od druhů jiných. Výsledkem je sjednocení našich kmenů do geneticky unikátních linií, které buď obsahují určený srovnávací materiál, nebo je jejich identita určena sekvenováním. Geneticky unikátní linie představují biologické druhy, tedy skupiny s přerušným tokem genů, což je důkazem neschopnosti vzájemného křížení (platí i po nepohlavní druhy). Nalezení vymezujícího fenotypového znaku následně vede k jejich formálnímu popisu.

V prvním kroku molekulární identifikace pomocí sekvencí vybereme gen, který je schopen rozlišit velmi blízké druhy a je dostatečně reprezentován v databázích. U ophiostomatálních hub to je rDNA (ITS oblast, SSU) a β-tubulin, u ambrosiových hub to je SSU rDNA, u rodu *Dipodascus* ITS a LSU, u *Geosmithia* jen ITS oblast rDNA, u xylariálních

hub ITS oblast a  $\beta$ -tubulin, u bazidiomycetů obecně to je zejména LSU rDNA. U blíže nezařaditelných kmenů, kde nevím jakou podjednotku rDNA zvolit, amplifikuji větší část rDNA operonu najednou (tj. v jedné PCR reakci). Dobré zkušenosti mám s amplifikací pomocí primerů NS1 a NL4 (či LR4), kdy získám celou 18S a ITS oblast, a prvních nejpoužívanějších 500 bp z 28S rDNA, o celkové délce 2800-3000 kb. Následně sekvenuji ITS oblast pomocí dvou primerů, které ji ohraničují (např. ITS1, ITS4). Sekvenační reakce přečte cca 800 bp, takže kromě oboustranně sekvenované ITS oblasti získám i 300 bp z okolních oblastí, což výrazně zvýší šanci na nalezení vhodného protějšku v databázích sekvencí. Pokud se ukáže, že LSU či SSU oblast je pro daný organismus vhodná, přistoupím k jejímu osekvenování z toho samého fragmentu. Tímto postupem ušetříme za čištění PCR produktu (čistí se pouze jedenkrát).

Získané sekvence jsou pak vloženy do souboru sekvencí daného rodu. V první řadě zjistíme procentuelní podobnost naší sekvence k ostatním. Tato informace může samo o sobě vést i identifikaci. Například 99-100% shoda v sekvencích ITS rDNA a  $\beta$ -tubulinu znamená u většiny skupin (např. kromě komplexu *Ophiostoma piceae*) jasný důkaz, že jde o stejné druhy. U menších shod je třeba provést fylogenetickou analýzu. Hlavní informace získaná fylogenetickou analýzou je příbuznost (nikoliv podobnost) našich sekvencí k těm porovnávaným. Tzn. informace, v jaké fylogenetickém kladu (s jakými druhy hub) o určité statistické podpoře se naše sekvence nachází. Takto můžeme naši sekvenci zařadit do druhu, či do taxonu vyššího.

### **Vymezení vzorku a co všechno nám můžou data říci**

Je nutné si uvědomit k jakým účelům naše data slouží a tomu přizpůsobit vymezení vzorku. Pro účely studia společenstev hub na jednom druhu kůrovce (sledování vlivu vývojového stádia vektora, typu lokality, stavu hostitelské dřeviny atd.) jsou dobrá kvantitativní data získaná z jednotlivých jedinců či jednotlivých požerků (tzn. soustavy chodeb, která patří jednomu pokolení z jedné matky). Pokud studujeme vliv druhu dřeviny či lokality na spektrum hub přenášených různými druhy kůrovců, pak není nutné studovat variabilitu ve společenstvech hub mezi jedinci jednoho druhu kůrovce, ale spíš se snažíme podchytit komplexní mykobiotu daného druhu na každé lokalitě a dřevině. Pro tyto případy vymezují vzorek jako jedince hlodající v jeden čas na jednom, či na několika sousedních stromech, na jedné lokalitě. Každý vzorek obsahuje předem stanovený počet požerků (10-15), z každého požerku zpracují pět jedinců daného hmyzu. Počet požerků nutných k podchycení hub z každé lokality, lze předběžně zjistit analýzou většího počtu požerků. Následně se použije takový počet, který stačil na podchycení hub na dané lokalitě a kůrovci (často to je množství kdy už další ¼ z celkového počtu požerků nepřinesla nové druhy hub. Množství požerků nutných k optimálnímu studiu těchto hub se velmi liší mezi různými druhy kůrovců (KOLAŘÍK et al., 2007a; KOLAŘÍK et al., 2007b) a lokalitami, nicméně kvůli dalšímu srovnání je vhodné použít konstantní počet požerků (zpravidla ten který vyhovuje tomu nejdíverznějšímu substrátu). Negativní vliv malých vzorků, které u hodně diverzních substrátů podhodnotí druhové spektrum hub, lze ošetřit v průběhu statistické analýzy (např. vyloučením či podhodnocením výskytu vzácných druhů, u kterých je velká možnost, že je zachytíme jen náhodou. Na druhou stranu používání malých vzorků (75 jedinců ze vzorku není skutečně mnoho) umožňuje zpracovat stovky vzorků během jedné sezóny, pokrýt sběry velký areál a mnoho hostitelských druhů. V případě studia rodu *Geosmithia* nám tento postup umožnil poznání areálu daného druhu houby, jejího hostitelského spektra a hostitelské preference k přenašeči v oblasti temperátní Evropy a Středomoří. Tyto znalosti nám dovolily spekulovat o celkové diverzitě *Geosmithia* spp. ve studovaném areálu a o procesech, které formují složení jejich společenstev na kůrovcích (KOLAŘÍK et al., 2007a; KOLAŘÍK et al., 2007b). Tento typ údajů bohužel není k dispozici u jiných hub s podobnou ekologií, právě

kvůli absenci více komplexních souborů vzorků.

## Přehled literatury

- BARRAS, S. J., 1972. Improved White's solution for surface sterilization of *Dendroctonus frontalis*. J. Econ. Entomol. 65: 1504.
- BARRAS, S. J., PERRY, T. J., 1975. Interrelationships among microorganisms, bark or ambrosia beetles, and woody plant tissue: an annotated bibliography, 1965-1974. United States Department of Agriculture Forest Service, Southern Forest Experiment Station, General Technical Report SO-10, New Orleans, La.
- BATRA, L. R., 1963. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. Trans. Kansas Acad. Sci. 66: 213-236.
- BATRA, L. R., 1967. Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. Mycologia 59: 976-1017.
- BATRA, L. R., 1972. Ectosymbiosis between ambrosia beetles and fungi. I. Indian J. Mycol. Plant Pathol. 2:165-169.
- BATRA, L. R., 1985. Ambrosia beetles and their associated fungi - research trends and techniques. Proc. Indian Acad. Sci. Plant Sci. 94:137-148.
- BATRA, L. R., MICHIE, M. A., 1963. Pleomorphism in some ambrosia and related fungi. Trans. Kansas Acad. Sci. 66: 470-481.
- FRANCKE-GROSMANN, H., 1956. Grundlagen der Symbiose bei pilzzüchtenden Holzinsekten. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 1956:112-118.
- FRANCKE-GROSMANN, H., 1967. Ectosymbiosis in wood-inhabiting beetles. In: HENRY, S. M. (Ed.), Symbiosis, Academic Press, New York, pp. 141-205.
- HARRINGTON, T. C., 2005. Ecology and evolution of mycetophagous bark beetles and their fungal partners. In: VEGA, F. E., BLACKWELL, M. (Eds.), Insect-Fungal Association, Ecology and Evolution, Oxford University Press, New York, pp. 257-291.
- HINDAL, D. F., MCDONALD, W. L., 1977. Production of synnemata on defined agar media and its relation to pathogenicity of *Ceratocystis ulmi*. Phytopathology 68: 571-575.
- HULCR, J., KOLAŘÍK, M., KIRKENDAL, L. R., 2007. A new record of fungus-beetle symbiosis in *Scolytodes* bark beetles (Scolytinae, Curculionidae, Coleoptera). Symbiosis 43 (in press).
- KIRISITS, T., 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. In: LIEUTIER, F. (Ed.), Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis, Kluwer Academic Publishers, pp.181-235.
- KIRSCHNER, R., 2001. Diversity of filamentous fungi in bark beetle galleries in Central Europe. Misra, J. K., Horn, B. W. (Eds.), *Trichomyces* and Other Fungal Groups: Professor Robert W. Lichtwardt Commemoration Volume Science Publishers, Enfield, (NH), USA, pp. 175-196.
- KOLAŘÍK, M., KOSTOVČÍK, M., PAŽOUTOVÁ, S., 2007a. Host range and diversity of the genus *Geosmithia* (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. Mycol. Res. (in press)
- KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., ČEPIČKA, I., PAŽOUTOVÁ, S., ŠRŮTKA, P., 2005. A complex of three new white-spored, sympatric, and host range limited *Geosmithia* species. Mycol. Res. 109: 1323-1336.
- KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., HULCR, J., PAŽOUTOVÁ, S., 2007b. *Geosmithia* fungi are highly diverse and consistent bark beetle associates: evidence from their community structure in temperate Europe. Microbial Ecol. (in press)
- KÜHNHOLZ, S., 2004. Chemical Ecology and Mechanisms of Reproductive Isolation in Ambrosia Beetles. Simon Fraser University, Burnaby, B.C.
- SIX, D. L., 2003. Bark beetle-fungus symbioses. Insect Symbiosis: 97-114.



- SIX, D. L., 2005. Population genetics of bark beetles and their associated blue-stain fungi with the use of molecular markers. In: LUNDQUIST, J. E., HAMELIN, R. C. (Ed.), *Forest Pathology: from Genes to Landscapes*, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 31-39.
- ŠRŮTKA, P., PAŽOUTOVÁ, S., KOLAŘÍK, M., 2007. *Daldinia decipiens* and *Entonaema cinnabarina* as fungal symbionts of *Xiphydria* wood wasps. *Mycol. Res.* 111: 224-231.
- TALBOT, P. H. B., 1977. The *Sirex-Amylostereum-Pinus* association. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15: 41-54.
- TUTHILL, D. E., 2004. Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and *Eupenicillium species*. *Mycol. Progress* 3: 3-12.

# Mikroskopické houby na opadu jehličnatých dřevin - nové otazníky kolem „starých známých“

ONDŘEJ KOUKOL

## KOUKOL, O.: Microfungi colonizing coniferous litter needles; well-know or still hazed?

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp.37-39. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Microfungi colonizing pine and spruce litter needles have been intensively studied since the 1950s. Classical isolation methods prevailed in the studies from the last century. However, recent advantages in molecular methods caused that these methods were applied during studies of litter needles mycoflora. From routine identification of isolated strains to complete substitution of cultivation using environmental DNA isolation, PCR, cloning and sequencing, standard methods are slowly being redundant. Not only are these molecular methods faster in identification of fungi, but they seem to give more reliable data (above all they do not overestimate fast growing ubiquitous species during isolations.) However, even isolation methods may still reveal surprising data, such as the frequent records of „*Scleroconidioma sphagnicola*“, species probably common, but largely overlooked. They are also useful when ecological studies using experimental approach are performed. For example, knowing that the mycoflora of litter needles is different then previously thought differnt fungal species should be used as model species in experiments (fungal effect on the decomposition, interactions with invertebrates, etc.).

**Keywords:** microfungi, pine, spruce, litter needles, isolation, PCR, DNA isolation

Ondřej Koukol, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. E-mail: [o.koukol@seznam.cz](mailto:o.koukol@seznam.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

Askomycety na opadu jehličnatých dřevin jsou intenzivně studovány již od 50. let minulého století. Za tuto dobu byla většina studií zaměřena především na sledování sukcese na opadu, tj. na spektrum druhů, které kolonizují jehlice určitého stáří a stupně rozkladu. Nejčastěji bylo postupováno klasickými izolačními metodami, tj. jehlice byly sbírány z různých horizontů, nebo uloženy do opadových sáčků a následně odebírány, a v laboratoři byly vysévány vcelku (nebo jejich fragmenty) na různá agarová média. Výsevu často předcházela povrchová sterilizace. Tímto způsobem bylo izolováno několik set druhů hub, především anamorfních askomycetů a zygomycetů. Spektrům často dominovaly druhy rodů *Penicillium*, *Cladosporium* a *Trichoderma*, případně druh *Aureobasidium pullulans* (HAYES 1965a, 1965b). Tyto výsledky jsou však často v rozporu s jinými metodikami, zvláště pak s o něco „primitivnější“ kultivací ve vlhkých komůrkách, kdy jehlice slouží jako jediný zdroj živin. V takovémto případě dominují ve spektru druhy *Verticicladium trifidum*, *Sympodiella acicola*, časté jsou i druhy rodu *Chalara*. (KENDRICK & BURGESS, 1962, KOUKOL, in press).. Zcela jiný obrázek o spektru druhů získáme při použití metod molekulární detekce. Nedávná studie hub kolonizujících opad borovice lesní ve Švédsku prokázala, že při použití čistě molekulárních metod, tj. izolace DNA z jehlic a určení druhového spektra na základě amplifikace vybraných úseků, klonování a sekvenování, dominují ve spektru druhy z čeledi Venturiaceae a řádů Dothideales a Helotiales. Druhy rodů *Trichoderma* a *Penicillium* nebyly zaznamenány téměř vůbec (LINDAHL et al., 2007).

Vezmeme-li v úvahu další ojedinělé či více častější nálezy druhů, které dosud nebyly z jehlic izolovány (*Allantophomopsis lycopodina* viz Obr. 1, *Scleroconidioma sphagnicola*), je zřejmé, že askomycety kolonizující opad jehličnatých dřevin tvoří velmi rozsáhlou skupinu druhů. Každý jednotlivý druh pravděpodobně nemá svou specifickou funkci, ale spíše společenstvo na dané lokalitě a v daném časovém úseku hraje určitou roli v opadu.

Jednou z jejich rolí může být interakce s půdními bezobratlými, především pancířníky (Acari, Oribatida). Tito bezobratlí se podílejí na mechanickém rozkladu opadu. Řada z nich prokázala substrátové preference vůči řadě druhů hub, především dematiiovým anamorfám, takže je zřejmé, že jsou více přitahováni k opadu kolonizovanému než opadu bez hub. Tím pádem urychlují rozklad takto kolonizovaného opadu. Na druhou stranu, preference byly studovány pouze za použití ubikvistních druhů hub a dosud chybí data o preferencích ke specifickým druhům hub kolonizujících pouze opad, které mohou ve společenstvu druhů za určitých podmínek převládat (již zmiňované *V. trifidum*, *S. acicola* dále např. *Hormonema dematioides* a další). Vliv pancířníků na houbové společenstvo může být jak negativní (spásání eliminující růst), tak pozitivní (roznášení spor a úlomků mycelia) a zřejmě jsou oba tyto vlivy v opadu v rovnováze, takže nedochází k eliminaci některých druhů hub, ani k jejich výrazné dominanci.

Jinak uvážíme-li nízkou kompetičnost a minoritní přínos k dekompozici jehlic ve srovnání se saprotrofními bazidiomycety, zdá se, že saprotrofní askomycety na opadu nemohou znatelně „hovořit“ do opadu. Spíše tvoří skupinu druhů, které se snaží vmezeřit na mrtvý rostlinný substrát (protože to nejsou parazité), ale dosud nekolonizovaný výrazně silnějšími bazidiomycety (které by je kompetičně vytlačily). Mezi takové druhy bazidiomycetů patří špička žíněná *Setulipes androsaceus*, která sice kolonizuje a rozkládá jehlice, ale svou silnou enzymatickou výbavou odpovídá houbám bílé hniloby, tj. je schopná rozkládat i lignin. Mimo toho dokáže produkovat řadu environmentálně aktivních chemických látek, např. halogenderivat drosophilin A methyl ether (viz Obr. 2). V myceliu a plodnicích špičky byly rovněž detekovány fosfonáty (KOUKOL et al., in prep.).

## Přehled literatury

- HAYES, A. J., 1965a. Studies on the decomposition of coniferous leaf litter. II. Changes in external features and succession of microfungi. *J. Soil Sci.* 16: 242-257.
- HAYES, A. J., 1965b. Some microfungi from Scots pine litter. *Trans. Br. mycol. Soc.* 48: 179-185.
- KENDRICK, W. B., BURGESS, A., 1962. Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia* 4: 313-342.
- LINDAHL, B. D., IHRMARK, K., BOBERG, J., TRUMBORE, S. E., HÖGBERG, P., SFENOID, J., INLAY, R. D., 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173: 611–620.
- Koukol, O. Effect of *Pinus strobus* L. invasion on the mycoflora of pine litter needles in the Bohemian Switzerland National Park (Czech Republic). (in press)
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R. Phosphonates regularly found in fungal basidiocarps in temperate coniferous forests. (in prep.)

**Přílohy:**

**Obr. 1.** *Allantophomopsis lycopodina* (Höhn.) Carris, příčný řez pyknidou.



**Obr. 2.** Krystaly drosophilin A methyl etheru tvořící se na myceliu špičky žíněné rostoucí na sladínovém agaru při teplotě 5°C.



# Oportunně patogenní vláknité mikromycety ve Sbírce kultur hub (CCF) v Praze

ALENA KUBÁTOVÁ, KAREL PRÁŠIL, STANISLAVA DOBIÁŠOVÁ

## KUBÁTOVÁ, A., PRÁŠIL, K., DOBIÁŠOVÁ, S.: Opportunistic fungal pathogens in the Culture Collection of Fungi (CCF) in Prague.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 40-51. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

In the Culture Collection of Fungi (CCF) in Prague ca 2000 strains of saprotrophic filamentous microfungi are deposited, mainly Ascomycota and Zygomycota. Ninety fungal strains were isolated from clinical material. Several of them belong to the known opportunistic fungal pathogens, e. g. *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Mycocladius ramosus*, *Penicillium marneffeii* (the first finding in the Czech Republic), *Phialophora verrucosa*, *Pseudallescheria boydii*, etc. Among the other interesting fungi are *Beauveria felina*, *Curvularia clavata*, *Emericella rugulosa*, *Myriodontium keratinophilum*, *Myxotrichum deflexum*, *Schizophyllum commune*, and *Trichurus spiralis*. Authors consider as very important to maintain clinical fungi in culture collections for the future study of ecology, taxonomy and diagnostics.

**Keywords:** opportunistic fungi, pathogens, CCF

Alena Kubátová, Karel Prášil, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. E-mail: [kubatova@natur.cuni.cz](mailto:kubatova@natur.cuni.cz), [prasil@natur.cuni.cz](mailto:prasil@natur.cuni.cz)  
Stanislava Dobiášová, MPI Center, Medical Institute Ostrava, Partizánské nám. 7, 702 00 Ostrava, Czech Republic. E-mail: [stanislava.dobiasova@zuova.cz](mailto:stanislava.dobiasova@zuova.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Sbírka kultur hub (CCF - Culture Collection of Fungi) v Praze existuje již více než 40 let. Uchovává kolem 2000 kmenů saprotrofních mikroskopických vláknitých hub, většinou zástupce oddělení Ascomycota (včetně nepohlavních stadií) a Zygomycota. Houby byly izolovány z různých substrátů: z půdy, potravin, ovzduší, hmyzu, ale i z klinického materiálu aj. Seznam uchovávaných izolátů je publikován v katalogu kultur hub (KUBÁTOVÁ et al., 2003; KUBÁTOVÁ & KOLAŘÍK, 2006).

V posledních 10 letech se na našem pracovišti začala ve větší míře rozvíjet spolupráce s lékařskými mykology (viz např. DOBIÁŠOVÁ et al., 2000). Pod vedením M. Váňové a K. Prášila a ve spolupráci se S. Dobiášovou byly zpracovány diplomové práce zaměřené na klinicky významné houby (DOBIÁŠ, 2004; LYSKOVÁ, 2004, 2007; ULMANN, 2005) a spolupráce v oblasti identifikace mikroskopických hub izolovaných z různých klinických substrátů se dále rozvíjela (DOBIÁŠOVÁ et al., 2003, 2006). Některé z těchto hub patří mezi známé oportunní patogeny a vlastní původce onemocnění, jiné patří mezi podezřelé kontaminanty, vyskytující se častěji, než bychom očekávali, ale o jejich roli ve vzniku a vývoji onemocnění není příliš známo. Věnovali jsme pozornost i takovýmto houbám a mnohé z nich deponovali do Sbírky kultur hub (CCF) v Praze jako dokladový materiál.

Cílem tohoto příspěvku je zveřejnit celkový přehled hub izolovaných z klinického materiálu a uchovávaných v současné době ve Sbírce kultur hub (CCF) a některé ze zajímavějších hub představit.

## Materiál a metodika

Ve Sbírce kultur hub (CCF) je nyní uchovááno 90 izolátů hub z klinického materiálu. Pocházejí od více než 20 dárců, největší část (29 %) od Dr. S. Dobiášové (spoluautorky tohoto příspěvku), dále od Dr. M. Skořepové (11 %) a doc. V. Buchty (10 %) (viz Tab. 1).

Jejich druhová identifikace byla prováděna na základě mikro- a makromorfologických znaků na běžných mykologických médiích, jako je malt-extrakt agar (MEA), Czapkův agar (CZ) či Czapkův agar s kvasničným extraktem (CYA), bramboromrkvový agar (PCA), kukuřičný agar (CMA), bramborodextrozový agar (PSA), syntetický živný agar (SNA), aj. (viz DE HOOG et al., 2000; SAMSON et al., 2004). V Tab. 1 jsou u jednotlivých hub uvedeni pracovníci, kteří druhovou identifikaci provedli.

Kultury hub z klinického materiálu jsou ve sbírce uchovávány dvěma způsoby, a to v živém stavu ve zkumavkách při cca 5 °C a některé též v lyofilizovaném stavu v ochranném médiu tvořeném odtučněným mlékem (viz Tab. 1).

## Výsledky a diskuse

Přehled kultur mikroskopických hub izolovaných z klinických substrátů je uveden v Tab. 1. Zahrnuje 90 izolátů představujících 65 druhů, především zástupců Eurotiales (29 %), tmavě pigmentované hyfomycety skupiny Dematiaceae (20 %) a Hypocreales (19 %). Menší část představují různé vřeckovýtrusné houby (např. Onygenales 9 %, Microascales 9 %) a též zygomycety (9 %). Většina z nich (67 %) byla do Sbírky zařazena v posledních 10 letech. Některé z těchto hub patří mezi dobře známé patogeny (např. *Penicillium marneffei*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudallescheria boydii*), o jiných lze jen s obtížemi rozhodnout, zda byly izolovány jen jako kontaminanty, či zda se také nepříznivě podílely na rozvoji onemocnění (např. *Beauveria felina*, *Trichurus spiralis*). Pouze jediný z těchto patogenů patří mezi nejzávažnější houbové patogeny řazené do bezpečnostní kategorie BSL-3 (BioSafety Level), a to je *Penicillium marneffei* (podle DE HOOG et al., 2000). Některé další jsou řazeny do BSL-2 (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Mycocladius ramosus*, *Phialophora verrucosa*, aj.). Ostatní patří do kategorie BSL-1, tj. mezi běžné saprotrofy nebo fytopatogeny, méně nebezpečné pro člověka (viz Tab. 1). Šestnáct izolátů hub z klinického materiálu (viz Tab. 1) je fotograficky dokumentováno v Atlasu mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota) (KUBÁTOVÁ, 2006).

**Komentář k zajímavým izolátům hub** (konkrétní údaje o substrátu viz v Tab. 1):

### ***Acremonium sclerotigenum* (F. et V. Moreau ex Valenta) W. Gams**

CCF 3585, 3586, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

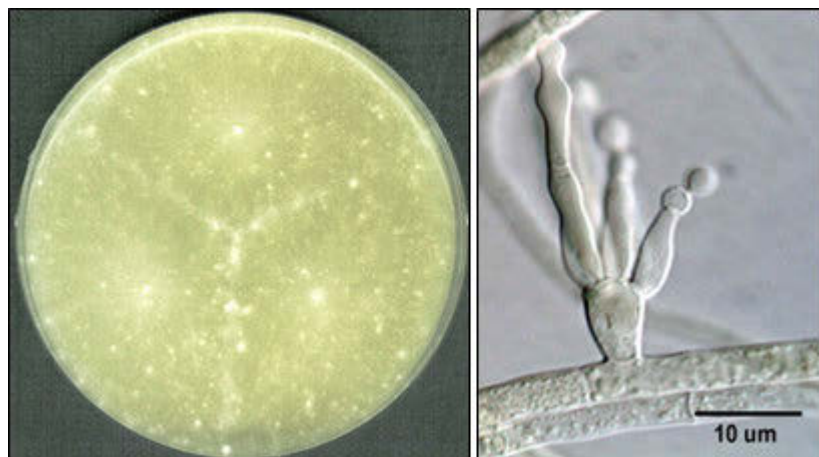
Tento druh je morfologicky velmi blízký druhu *Acremonium strictum*. Liší se pouze tvorbou kulovitých sklerocií, jejichž produkce je podpořena zvláště na ovesném agaru se stonkem lupinu (GAMS, 1971). Vzhledem k tomu, že v lékařské mykologii se ovesný agar s lupinem běžně nepoužívá, je otázkou, zda některé z izolátů nebyly jako *A. strictum* determinovány mylně. Na léčení samotného pacienta by případná záměna patrně neměla žádný vliv, ale z hlediska poznání ekologie této skupiny hub by takové poznatky byly přínosné. Zatímco DE HOOG et al. (2000) uvádějí *Acremonium strictum* jako oportunního patogena, o druhu *A. sclerotigenum* se nezmiňují. Avšak v "CBS Filamentous fungi database" (2007) je uvedeno několik izolátů z klinického materiálu z Kanady, USA, Nizozemí, Francie a Řecka, takže tato houba má své místo mezi oportunními patogeny.

### ***Aspergillus fumigatus* Fresen.**

CCF 3522, Obr. 1 a 2

Tento konkrétní kmen roste velmi dobře při 37 °C. Od ostatních kmenů druhu se liší především velmi slabou sporulací a neschopností vytvořit za běžných podmínek (CYA, MEA,

25 a 37 °C) pravidelné konidiofory. Tvoří jen velmi redukované a nepravidelně utvářené konidiofory; některé z nich mohou vzdáleně připomínat *Polypaecilum insolitum*. Příslušnost našeho kmene k druhu *A. fumigatus* (nebo přinejmenším ke skupině taxonů blízkých druhu *A. fumigatus*) byla potvrzena molekulárními metodami. Jeho totožnost však bude nutné ještě ověřit. V sekci *Fumigati* totiž kromě blízkého druhu *A. viridinutans* a *A. fumisynnematus* (HORIE et al., 1993) jsou nyní nově rozpoznávány ještě další druhy: *A. fumigatiaffinis*, *A. novofumigatus* (HONG et al., 2005) a *A. lentulus* (BALAJEE et al., 2005), který byl popsán dokonce na základě klinických izolátů rezistentních vůči antimykotikům.



**Obr. 1 a 2.** *Aspergillus fumigatus* CCF 3522.  
Atypické téměř nesporulující kolonie a tvorba atypických konidioforů.

***Beauveria felina* (DC.: Fr.) J. W. Carmich.** (syn. *Isaria felina* (DC.: Fr.) Fr.)  
CCF 3140, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

Tento nepříliš běžný druh je nápadný tvorbou dlouhých bělavých synnemat, která jsou navíc zajímavá tím, že vykazují fototropismus. Podobně jako jiné druhy rodu *Beauveria* je entomopatogenní, lze ho však nalézt i na jiných substrátech. Otázka jeho patogenity pro člověka není dořešena. Nález byl zmíněn v práci DOBIÁŠOVÁ et al. (2000).

***Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker**  
CCF 3694, Obr. 3

Anamorfní rod *Bipolaris* Shoemaker (1959) byl vydělen ze známého rodu *Drechslera* na základě specifického (bipolárního) klíčení konidií. Rod *Bipolaris* náleží mezi dematiové hyfomycety s velkými, několikabuněčnými distoseptátními konidii. Popsáno bylo asi 55 převážně graminikolních druhů, které náleží do životního cyklu rodu *Cochliobolus*. Saprotrofní druhy jsou běžné na bylinném opadu, fytopatogenní druhy jsou pak častým původcem listových skvrnitostí, některé druhy jsou uváděny i ze sekundárních substrátů. Jádrem rozšíření je především v tropických a subtropických oblastech, mnohé druhy jsou běžné i v Evropě a v Severní Americe. Z klinického materiálu DE HOOG et al. (2000) uvádějí celkem 4 druhy, druh *Bipolaris sorokiniana* nikoli. Izolát pochází z nehtů dolních končetin, mikroskopický obraz byl pozitivní, dermatofyt při izolaci zaznamenán nebyl. Izolovaný kmen na běžných médiích (MEA, PCA) v kultuře bohatě sporuloval.

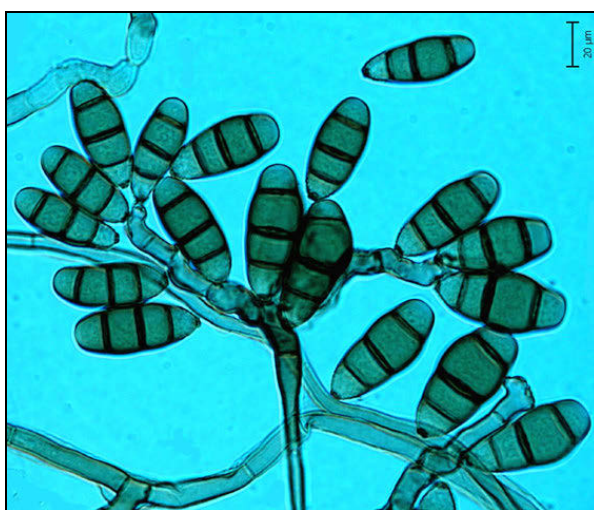


**Obr. 3.** *Bipolaris sorokiniana* CCF 3694  
Tvořící se mladé konidie (světlé) a tmavé distoseptátní zralé konidie.

### ***Curvularia clavata* B. L. Jain**

CCF 3695, Obr. 4

Anamorfní rod *Curvularia* Boedijn (1933) je relativně hojný dematiový hyfomycet s velkými, několikabuněčnými euseptátními konidiiemi a jedná se o jednu z anamorf teleomorfního rodu *Cochliobolus*. Některé druhy rodu tvoří na přírodním materiálu i v kultuře stromata nebo sklerocia. Celkem bylo popsáno asi 35 druhů, převážně z rostlinného opadu, některé druhy jsou uváděny jako fytopatogeni (původci listových skvrnitostí), sedm druhů bylo zjištěno i v klinickém materiálu (DE HOOG et al., 2000). Jádru rozšíření je v tropických a subtropických oblastech Asie a Afriky, ale mnohé druhy jsou známy i z Evropy a Severní Ameriky.



**Obr. 4.** *Curvularia clavata* CCF 3695. Zralé euseptátní konidie na polytretických, sympodiálně proliferujících konidiogenních buňkách.

Druh *Curvularia clavata* byl izolován do primokultury z nehtů dolních končetin, mikroskopický obraz byl pozitivní, dermatofyt při izolaci nebyl zaznamenán. Kromě bohaté sporulace se v kultuře na MEA vytvářely i charakteristické stromatické struktury. Druh je znám jak z kožních infekcí, tak i ze zánětu vedlejších dutin nosních (DE HOOG et al., 2000). V databázi "CBS Filamentous fungi database" (2007) tento druh z klinického materiálu uveden není.



***Emericella rugulosa* (Thom & Raper) C.R. Benj., anamorfa *Aspergillus rugulovalvus* Samson & W. Gams**

CCF 3089, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

Patří mezi méně běžné druhy a z klinických substrátů nebývá uváděn. Avšak jeho schopnost růst mnohem rychleji při 37 °C než při 25 °C nelze opominout, a je třeba ho považovat za možného oportunního patogena podobně jako blízký druh *Emericella nidulans*. Morfologicky lze oba druhy snadno rozlišit: zatímco *E. nidulans* má kleistothecia obalená žlutou vrstvou „hülle cells“ a askospory hladké, *E. rugulosa* má askomata obalena narůžovělou vrstvou „hülle cells“ a askospory bradavčité.

***Myriodontium keratinophilum* Samson et Polon.**

CCF 3677, Obr. 5

Jde o poměrně vzácný druh, patrně keratinofilní, izolovaný z různých substrátů včetně klinického materiálu (DE HOOG et al., 2000), o jeho patogenních schopnostech je však známo jen velmi málo. Naše dva izoláty byly zachyceny v souvislosti s onemocněním nehtů. Jinak byl tento druh nalezen též ve slovenských jeskyních (NOVÁKOVÁ, 2004). Konidie vyrůstají na jemných stopečkách a vzdáleně tak mohou připomínat *Aphanocladium album*. Od roku 1997 je známa teleomorfa tohoto druhu: *Neoarachnotheca keratinophila* Ulfing, Cano & Guarro (Onygenales).



**Obr. 5.** *Myriodontium keratinophilum* CCF 3677. Konidiogenní vlákna s konidiemi na tenkých zoubcích.

***Myxotrichum deflexum* Berk.**

CCF 1439, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

Rovněž zřídka izolovaný druh, uváděný však i z klinických substrátů (DE HOOG et al., 2000). Izolát CCF 1439 je považován za první nález z našeho území ve spojení s onychomykózou (FASSATIOVÁ, 1982). Houba je nápadná jak svými koloniemi, pomalu rostoucími a produkujícími červený pigment do média, tak i mikroskopicky tvorbou zajímavě utvářených plodnic s tmavými rozvětvenými přívěsky. V letech 1998 a 1999 jsme zachytili u dvou žen další dva izoláty z nehtů v souvislosti s onychomykózou (7124/DMF v Šumperku a 1293/KVK v Havířově); ty však bohužel nebyly do Sbírkky uloženy (DOBIÁŠOVÁ et al., 2000).

***Penicillium marneffei* Segretain**

CCF 3217, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

Jediný druh penicilií považovaný za dosti nebezpečného patogena (BSL-3). K onemocnění dochází většinou vdechnutím konidií a objevuje se často u pacientů s AIDS. Vyvolává intracelulární mykózu uvnitř makrofágů. Jde o druh rozšířený v jihovýchodní Asii, kde jsou jeho přenašečem krysy *Rhizomys sinensis*. U nás byl zjištěn zatím pouze jednou u uprchlíka z Vietnamu s disseminovaným plicním procesem a pokročilým onemocněním AIDS

(DOBIÁŠOVÁ et al., 2003). Druh patří mezi biverticilární penicilia, čerstvé izoláty produkují nápadný červený pigment. Tato schopnost však se stářím kultury mizí.

***Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A. A. Padhye & Ajello**

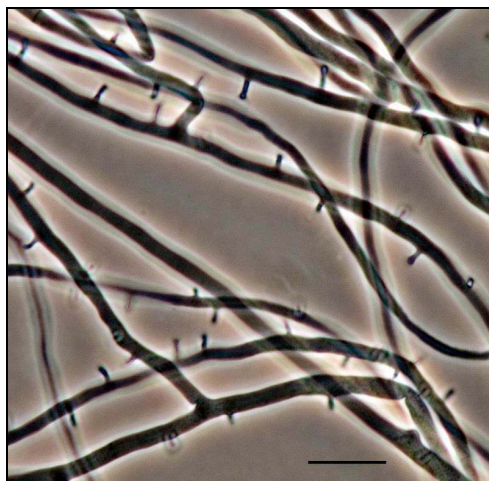
CCF 3082, 3284, 3402, Obr. viz KUBÁTOVÁ (2006)

Této houbě se v poslední době věnuje stále větší pozornost, o čemž svědčí i vytvoření „ECMM working group on *Scedosporium/Pseudallescheria* infections.“ Morfologicky je tento druh zajímavý tvorbou dvou typů anamorf (*Scedosporium* a *Graphium*) a černých kleistotheecií. Ta se však objevují až po delší době a jen u některých izolátů. Jeden z našich izolátů (CCF 3082) je v současné době součástí studie, jejíž výsledky by mohly přispět ke včasné diagnostice tohoto patogena (ŽABKA et al., 2007).

***Schizophyllum commune* Fr.**

CCF 3578, Obr. 6

Na rozdíl od předešlých hub patří tato houba mezi bazidiomycety. U nás je známá jako klanolístka obecná a je dosti hojná na vysychajících větvích, často i ohořelých. Byla však izolována i z klinického materiálu (DE HOOG et al., 2000). Na agarových médiích tvoří rychle rostoucí bělavé mycelium, které roste rychle i při 37 °C. Hyfy jsou nápadné jemnými trnitými výběžky. U nás byl zachycen jako původce pansinusitidy (DOBIÁŠOVÁ et al., 2006).



**Obr. 6.** *Schizophyllum commune* CCF 3578. Hyfy bez přezek, s ostnatými výrůstky.

***Trichurus spiralis* Hasselbr.**

CCF 3726, Obr. 7 a 8

Anamorfní rod *Trichurus* Clem. (1896) náleží mezi synnematální dematiové hyfomycety s annelidickou konidiogenezí a je považován za anamorfní stádium představitelů čeledi Microascaceae (Microascales). Popsáno bylo celkem 5 druhů, z nichž *T. spiralis* patří mezi běžnější zástupce, vyskytující se na rostlinných zbytcích, jehličí, papíře a v půdě. Jádru rozšíření leží především v teplejších oblastech (např. Egypt, Nigeria, Indie), ale druh byl zaznamenán i z Evropy a Severní Ameriky. Z klinického materiálu druh zatím zaznamenán zřejmě nebyl (DE HOOG et al., 2000 jej neuvádějí), náš kmen byl izolován z kožního materiálu (z mezivrstev dolních končetin), mikroskopický obraz byl negativní, dermatofyt při izolaci zaznamenán nebyl. V kultuře se především na PCA a MEA bohatě vytvářela synnemata připomínající morfologicky blízký rod *Doratomyces*, u tohoto druhu doprovázená charakteristickým vlášením spirálovitě stočených hyalinních hyf. Zajímavým aspektem tohoto nálezu byl věk pacienta (roční dítě) a podezření na onychodystrofii. V databázi "CBS Filamentous fungi database" (2007) jsou jako zdroj materiálu u jednoho kmene tohoto druhu uvedeny lidské vlasy bez bližší specifikace.



**Obr. 7 a 8.** *Trichurus spiralis* Hasselbr. CCF 3726

Bohatě sporulující synnemata, na jejichž horní (fertilní) části se vytvářejí charakteristicky stočená sterilní vlákna.

## Závěr

Údaje z literatury i zkušenosti z praxe našich lékařských mykologů naznačují, že množství zachycených oportunních houbových patogenů neklesá, spíše naopak, a že se zvyšuje i jejich diverzita. Dá se předpokládat, že jejich význam ještě poroste, a proto považujeme za velmi užitečné uchovávat tyto klinické významné houby ve sbírce kultur hub. Mohou pak sloužit nejen ve specializované výuce mykologů, ale i pro další studium jejich ekologie, taxonomie, a výzkum v lékařství a farmacii.

## Poděkování

Naše poděkování patří všem spolupracovníkům z lékařské praxe – donorům izolátů hub. Projekt byl podpořen institucionálním záměrem MSM 0021620828.

## Přehled použité literatury

- BALAJEE, S. A., GRIBSKOV, J. L., HANLEY, E., NICKLE, D., MARR, K. A., 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot. Cell 4: 625-632.
- CBS Filamentous fungi database, 2007. <http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>
- DOBIÁŠ, R., 2004. Původci mykotických onemocnění horních a dolních cest dýchacích, sinusitid, otitid a kandidémií u imunodeficitních pacientů ostravské aglomerace. ms., 99 p. [Dipl. pr., školitel M. Váňová]
- DOBIÁŠOVÁ, S., KLEČKA, P., KUBÁTOVÁ, A., SLEZÁČEK, I., DOBIÁŠ, R., 2006. Pansinusitida mykotické etiologie. Zprav. Zdrav. Úst. Ostrava 2(4): 6-7.
- DOBIÁŠOVÁ, S., KOLČÁKOVÁ, J., KUBÁTOVÁ, A., 2003. Fungal infections identified in AIDS patients. In: Trends in Medical Mycology, pp. 193-196.
- DOBIÁŠOVÁ, S., KUBÁTOVÁ, A., PRÁŠIL, K., VÁŇOVÁ, M., 2000. Výskyt dermatofyt a saprotrofních hub při dermatomykózách. In: Sborník abstraktů, 2. česko-slovenská mezioborová konference lékařské mykologie, 9.-11.11.2000, Pardubice, p. 91.

- FASSATIOVÁ, O., 1982. New or rare records of some *Deuteromycetes* and *Ascomycetes* from Czechoslovakia. *Čes. Mykol.* 36(2): 100-108.
- GAMS, W., 1971. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Jena, 262 p.
- HONG, S.-B., GO, S.-J., SHIN, H.-D., FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97(6): 1316-1329.
- HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> ed. CBS, Utrecht & Univ. Rovira i Virgili, Reus, 1126 pp.
- HORIE, Y., MIYAJI, M., NISHIMURA, K., TAGUCHI, H., UDAGAWA, S.-I., 1993. *Aspergillus fumisynnematus*, a new species from Venezuelan soil. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 34: 3-7.
- KUBÁTOVÁ, A., 2006. Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota). [http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova\\_atlas.php](http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova_atlas.php)
- KUBÁTOVÁ, A., KOLAŘÍK, M., 2006. Culture Collection of Fungi (CCF) in Prague – original isolates accessed during 2003-05. <http://botany.natur.cuni.cz/novitates/>
- KUBÁTOVÁ, A., VÁŇOVÁ, M., PRÁŠIL, K., 2003. CCF Catalogue of filamentous fungi. 5<sup>th</sup> ed. *Novit. Bot. Univ. Carol.* 16/2002: 5-137.
- LYSKOVÁ, P., 2004. Dermatofyty a saprotrofní mikroskopické houby doprovázející onemocnění kůže, nehtů a vlasů u pacientů Moravskoslezského kraje. ms., 119 p. [Dipl. pr., školitel M. Váňová]
- LYSKOVÁ, P., 2007. Saprotrophic microscopic fungi and dermatophytes accompanying infections of the skin and nails of patients in the Moravian-Silesian Region (Czech Republic). *Czech Mycol.* 59(1): 125-137.
- NOVÁKOVÁ, A., 2004. Microscopic fungi in caves of the National Park Slovak Karst. *Phytopedon* 3: 26-31.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., 2004. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 7<sup>th</sup> ed. CBS, Utrecht, 389 p.
- ULMANN, V., 2005. Mikroskopické houby čeledi *Dematiaceae* z klinického materiálu. ms., 90 p. [Dipl. pr., školitel K. Prášil]
- ŽABKA, M., NEDVĚD, J., OLŠOVSKÁ, J., SKLENÁŘ, J., ŠULC, M., HAVLÍČEK, V., 2007. Production of cyclic peptide into the serum by strain of *Pseudallescheria boydii* CCF 3082. 25<sup>th</sup> Informal meeting on mass spectrometry, May 6-10, 2007, Nyíregyháza-Sóstó, Hungary. [poster]

**Tab. 1.** Seznam hub izolovaných z klinických substrátů a uchovávaných ve Sběrce kultur hub (CCF) v Praze. Kmeny označené hvězdičkou jsou fotograficky dokumentovány v práci KUBÁTOVÁ (2006).

číslo CCF	druh houby	zdroj, rok izolace a jméno donora	BSL (podle de Hoog et al., 2000)
3503	<i>Acremonium murorum</i> (Corda) W. Gams var. <i>felina</i> (E. J. Marchal) S. Hughes	tinea nehtů, Havířov, Česká republika, 2004, S. Dobiášová No. 3865KVK; det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3490	<i>Acremonium persicinum</i> (Nicot) W. Gams	kožní šupiny z nohy ženy, Pardubice, Česká republika, 2004, K. Mencl; det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3385	<i>Acremonium sclerotigenum</i> (F. et V. Moreau ex Valenta) W. Gams	sputum 57-leté ženy, Hradec Králové, Česká republika, 2001, V. Buchta No. 26824/01, det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3386*	<i>Acremonium sclerotigenum</i> (F. et V. Moreau ex Valenta) W. Gams	nehty 52-leté ženy, Tatenice, Česká republika, 2001, V. Buchta No. 27046/01, det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3519	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams & Schroers	nehty ženy, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika, 2005, S. Dobiášová No. 9585DMF; det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3675	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> (Link) Zare, W. Gams & Schroers	kožní šupiny 62-letého muže, Valašské Meziříčí, Česká republika, 1999, S. Dobiášová ; det. A. Kubátová	neuvedeno
3370	<i>Arthrimum arundinis</i> (Corda) Dyko et B. Sutton	kožní šupiny 28-leté ženy (pustulosis palmaris et plantaris), Frýdek-Místek, Česká republika, 2002, S. Dobiášová No. 2/706/02, det. A. Kubátová; LYO	neuvedeno
3700	<i>Arthrimum arundinis</i> (Corda) Dyko et B. Sutton	nehty nohou 50-letého muže, 2006, M. Skořepová No. 3026/06; det. K. Prášil No. 67	neuvedeno
1128	<i>Arthrographis cuboidea</i> (Sacc. et Ellis) Sigler	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1968, O. Fassatiová; LYO	neuvedeno
3388	<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom	nehty 56-leté ženy (tinea), Ostrava, Česká republika, 2002, S. Dobiášová No. 179/8868/02; det. P. Lysková; LYO	neuvedeno
2447*	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	kožní šupiny, Plzeň, Česká republika, 1989, J. Zelenková; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
1288	<i>Aspergillus flavus</i> Link: Fr.	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová; LYO	BSL-2
1187	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	krční výtěr, Praha, Česká republika, 1970, J. Manych No. 231/56 LFH; LYO	BSL-2
1292	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová; LYO	BSL-2
1293	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1968, O. Fassatiová; LYO	BSL-2
3522	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	punktát z plic 16-letého muže, Vratimov, Česká republika, 2004, S. Dobiášová 5004KVA; det. S. Dobiášová a M. Kolařík	BSL-2
3623	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen.	maxilární dutina muže (leukémie), Olomouc, Česká republika, 2003, P. Hamal No. M62; det. A. Kubátová; LYO	BSL-2
1297	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová; LYO	BSL-1
1299	<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová; LYO	neuvedeno
3621	<i>Aspergillus sydowii</i>	endotracheální sekret muže, Olomouc, Česká republika, 2002, P. Hamal No. 201/02; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
3622	<i>Aspergillus sydowii</i>	sputum ženy s cystickou fibrózou plic, Olomouc, Česká republika, 2003, P. Hamal No. 217/03; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
3691	<i>Aspergillus sydowii</i>	kožní šupiny lokte u muže, Praha, Česká republika, 2007, M. Skořepová No. 373/07; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
3389	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	kožní šupiny (candidosis kůže a nehtů nohy) 51-leté ženy, Dolní Benešov, Česká republika, 2002, S. Dobiášová No. 130/7066; det. P. Lysková; LYO	BSL-2

2775*	<i>Aspergillus ustus</i> (Bainier) Thom et Church	sputum, Česká republika, 1992, I. Mášová; det. O. Fassatiová; LYO	BSL-1
3690	<i>Aspergillus versicolor</i>	nehty nohou u ženy, Liberec, Česká republika, 2006, J. Doležalová; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
3384*	<i>Aspergillus viridinutans</i> Ducker et Thrower	sputum 57-leté ženy, Česká republika, 2001, V. Buchta No. 26103/01, det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3365*	<i>Aspergillus wentii</i> Wehmer	nehty 55-letého muže (tinea), Velké Losiny, Česká republika, 2002, S. Dobiášová No. 67/1343/02, det. P. Lysková and A. Kubátová; LYO	neuveдено
3099	<i>Beauveria felina</i> (DC.: Fr.) J. W. Carmich.	nehty ženy, Havířov, Česká republika, 1998, S. Dobiášová No. 3884/KVK; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3140*	<i>Beauveria felina</i> (DC.: Fr.) J. W. Carmich.	nehty muže, Vyškov, Česká republika, 1999, B. Jandová 768/Z; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3694	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	nehty nohou ženy, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 3514/06; det. K. Prášil No. 90	neuveдено
2792	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	srst koně, Liboš near Olomouc, Česká republika, 1993, I. Bláhová; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
2733*	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	sliznice jícnu, Brno, Česká republika, 1991, I. Mášová; det. K. Prášil; LYO	BSL-1
3125	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> D. Frey ex J. W. Carmich.	nehty muže, Ostrava-Poruba, Česká republika, 1999, S. Dobiášová No. 8160; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
2694	<i>Chrysosporium</i> sp., anam. <i>Arthroderma cuniculi</i> C. O. Dawson	kožní šupiny, Liberec, Česká republika, 1990, V. Kolafa; det. O. Fassatiová; LYO	
2418	<i>Circinella muscae</i> (Sorokin) Berl. et De Toni	pitvané kuře, Česká republika, 1984, V. Neumannová; det. M. Váňová	neuveдено
3688	<i>Cladobotryum sphaerocephalum</i> (Berk.) Rogerson & Samuels	kožní šupiny popálené pokožky 21-letého muže, Mosty u Jablunkova, Česká republika, 1999, S. Dobiášová No. 3560bKVK; det. A. Kubátová No. 14/00; LYO	neuveдено
1372	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	sputum, Ružomberok, Slovensko, 1971, O. Fassatiová; LYO	BSL-1
3313	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	nehty ženy, Ostrava, Česká republika, 2002, S. Dobiášová 6231; det. K. Prášil; LYO	BSL-1
1337	<i>Clonostachys rosea</i> (Link: Fr.) Schroers, Samuels et Seifert f. <i>rosea</i>	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová; LYO	neuveдено
3695	<i>Curvularia clavata</i> B.L. Jain	nehty nohou 53-letého muže, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 3021/06; det. K. Prášil No. 65	BSL-1
2358	<i>Doratomyces purpureofuscus</i> (Schwein.: Fr.) F. J. Morton et G. Sm.	kožní šupiny (ekzém) muže, České Budějovice, Česká republika, 1988, J. Škvrnová; det. O. Fassatiová; LYO	neuveдено
3379	<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.	výtěr ze zvukovodu 21-letého muže, Hradec Králové, Česká republika, 2003, V. Buchta No. 6833/02, det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
3089*	<i>Emericella rugulosa</i> Thom & Raper C.R. Benj.	nekróza perikardu 1-měsíčního novorozence, Praha, Česká republika, 1998, M. Hajíčková; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3573	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	sklivec ženy (okulomykóza), Hradec Králové, Česká republika, 2005, V. Buchta No. 25369	BSL-2
3574	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	sklivec muže (okulomykóza), Hradec Králové, Česká republika, 2005, V. Buchta No. 25594	BSL-2
3575	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	sklivec muže (okulomykóza), Hradec Králové, Česká republika, 2005, V. Buchta No. 25632	BSL-2
3687	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	nehty (onychomykóza), Cheb, Česká republika, 2000, E. Martínková No. 6213; det. A. Kubátová	BSL-2
340	<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Sigler et J. W. Carmich.	kožní šupiny, Liberec, Česká republika, 1964, V. Kolafa; det. O. Fassatiová; LYO	BSL-1
3727	<i>Geomyces pannorum</i> (Link) Sigler et J. W. Carmich.	nehty 69-letého muže, Úsov, sev. Morava, Česká republika, 1998, S. Dobiášová 6196 DMF; det. A. Kubátová No. 167/98	BSL-1
3240*	<i>Hamigera avellanea</i> (Thom et Turesson) Stolk et Samson,	adenom, Sadská, Česká republika, 2001, V. Muzikář; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено

	anam. <i>Merimbla ingelheimensis</i> (J. F. H. Beyma) Pitt		
3676	<i>Hamigera avellanea</i> (Thom & Turesson) Stolk & Samson	kožní šupiny 23-leté ženy, Havířov, Česká republika, 1998, S. Dobiášová No. 5372 KVK; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
1340	<i>Humicola brunnea</i> Fassatiová var. <i>africana</i> Fassatiová	krční výtěr horníka, Příbram, Česká republika, 1967, O. Fassatiová	neuveдено
3489	<i>Microascus cinereus</i> Curzi	nehty, Ostrava, Česká republika, 2004, S. Dobiášová 1064; det. V. Ulmann No. 43/04; LYO	BSL-1
3443*	<i>Microsporium canis</i> E. Bodin ex Guég.	kožní šupiny, Ostrava, Česká republika, 2003, S. Dobiášová No. 8959	BSL-2
3100*	<i>Microsporium gypseum</i> (Bodih) Guiart et Grigorakis	kožní šupiny z prstu ženy, Šumperk, Česká republika, 1998, S. Dobiášová; LYO	BSL-1
2612	<i>Mucor plumbeus</i> Bonord.	plíce pitvaného kuřete, Česká republika, 1979, A. Adámková; det. M. Váňová; LYO	neuveдено
1512	<i>Mycocladus ramosus</i> (Zopf) Váňová	tkáň krávy, Česká republika, 1975, A. Adámková No. 4; det. M. Váňová; LYO	BSL-2
1514	<i>Mycocladus ramosus</i> (Zopf) Váňová	pitvaná kráva, Česká republika, 1975, A. Adámková No. 8; det. M. Váňová	BSL-2
1515	<i>Mycocladus ramosus</i> (Zopf) Váňová	mozková tkáň krávy, 1975, Česká republika, A. Adámková No. 9; det. M. Váňová; LYO	BSL-2
3104	<i>Mycocladus ramosus</i> (Zopf) Váňová	kožní léze na krku předčasně narozeného dvojčete, 1998, Česká republika, V. Buchta; det. M. Váňová; LYO	BSL-2
3362	<i>Myriodontium keratinophilum</i> Samson et Polon.	nehty 52-leté ženy (tinea), Ostrava, Česká republika, 2002, S. Dobiášová; det. P. Lysková; LYO	BSL-1
3677	<i>Myriodontium keratinophilum</i> Samson et Polon.	nehty 64-letého muže, Libina, Ostravsko, Česká Republika, 1999, S. Dobiášová No. 4151DMF; det. A. Kubátová; LYO	BSL-1
1439*	<i>Myxotrichum deflexum</i> Berk.	nehty (onychomycosis), Praha, Česká republika, 1973, J. Bílek; det. O. Fassatiová	BSL-1
3698	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. et Broome) Petch	nehty nohou 37-letého muže, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 3105/06; det. K. Prášil No.76	neuveдено
3497	neurčená houba	nehty 10-leté dívky (tinea), Česká republika, 1999, S. Dobiášová No. 2800; V. Ulmann No. 65	-
1373	<i>Oidiodendron cerealis</i> (Thüm.) G.L. Barron	nehty (onychomycosis), Praha, Česká republika, 1972, J. Krauskopf; det. O. Fassatiová; LYO	BSL-1
3728	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	nehty 40-letého muže, Bruntál, Česká republika, 1998, S. Dobiášová No. 6548 DMF; det. A. Kubátová No. 165/98	BSL-1
3380*	<i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx	nehty 41-leté ženy, Jilemnice, 2001, Česká republika, V. Buchta No. 27053/01; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3097	<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	sputum, Karviná, Česká republika, 1998, S. Dobiášová No. 381b/K; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3217*	<i>Penicillium marneffeii</i> Segretain	krev 26-letého pacienta s AIDS, Ostrava, Česká republika, 2000, S. Dobiášová No. 4580; LYO	BSL-3
2779	<i>Penicillium variabile</i> Sopp	krční výtěr, Příbram, Česká republika, 1991, D. Veselá; det. A. Kubátová; LYO	neuveдено
3498	<i>Phialophora verrucosa</i> Medlar	nehty 29-leté ženy (tinea), Ostrava, Česká republika, 2003, S. Dobiášová No. 9442; det. V. Ulmann No. 14; LYO	BSL-2
3533	<i>Phialophora verrucosa</i> Medlar	kožní šupiny muže (lupénka), Ostrava, Česká republika, 2004, S. Dobiášová No. 8163; det. V. Ulmann No. 52/04; LYO	BSL-2
3696	<i>Pithomyces chartarum</i> (Berk. et M.A. Curtis) M.B. Ellis	nehty nohou 58-leté ženy, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 2886/06; det. K. Prášil 44	neuveдено
3697	<i>Pithomyces chartarum</i> (Berk. et M.A. Curtis) M.B. Ellis	nehty nohou 61-leté ženy, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 2909/06; det. K. Prášil No. 49	neuveдено
3082*	<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello	nosní dutina psa, Chlumeck nad Cidlinou, Česká republika, 1998, M. Dokulilová; det. A. Kubátová; LYO	BSL-2
3284	<i>Pseudallescheria boydii</i>	dialyzát z pacienta s onemocněním ledvin, Praha, Česká	BSL-2

	(Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello	republika, 2002, M. Hájčková; det. A. Kubátová; LYO	
3402*	<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis, A.A. Padhye & Ajello	oko muže (keratitis), Kladno, Česká republika, 2003, I. Mášová No. 1489; det. A. Kubátová; LYO	BSL-2
3271	<i>Pseudeurotium zonatum</i> J. F. H. Beyma	nehty (onychomycosis), Cheb, Česká republika, 2000, E. Martínková; det. A. Kubátová as No. 129/00; LYO	neuveдено
1509	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> (Cohn) Schipper et Stalpers	kráva – abort, 1975, Česká republika, A. Adámková No. 2670; det. M. Váňová	BSL-2
3450	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> (Cohn) Schipper et Stalpers	operační rána, Praha, Česká republika, 2004, A. Adámková; det. M. Váňová; LYO	BSL-2
3458	<i>Sagenomella diversispora</i> (J. F. H. Beyma) W. Gams	nehty muže (tinea), Karviná, Česká republika, 2003, S. Dobiášová No. 190/2268/03, det. P. Lysková and A. Kubátová; LYO	neuveдено
1552	<i>Sagenomella oligospora</i> W. Gams & Luiten	nehet, Liberec, Česká republika, 1975, V. Kolafa No. D-136; det. O. Fassatiová	neuveдено
3692	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier	nehty ženy (sclerodermie), Praha, Česká republika, 2007, M. Skořepová No. 603/07; det. A. Kubátová; LYO	BSL-2
1393	<i>Scopulariopsis fusca</i> Zach	nehty, Česká republika, 1972, J. Krauskopf; det. O. Fassatiová	BSL-1
3578	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.	ethmoideum ženy (chronická sinusitis), Frýdlant n/O., Česká republika, 2005, S. Dobiášová 892KVA; det. A. Kubátová a M. Kolařík	BSL-1
3496	<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb.) S. Hughes	nehty muže, Ostrava, Česká republika, 2003, S. Dobiášová No. 8799; det. V. Ulmann No. 74; LYO	neuveдено
3699	<i>Stemphylium botryosum</i> Sacc.	nehty nohou 54-leté ženy, Česká republika, 2006, M. Skořepová No. 3015/0; det. K. Prášil No. 61	neuveдено
1370	<i>Torula herbarum</i> Link: Fr.	sputum, Sládkovičovo, Slovensko, 1972, D. Malík; det. O. Fassatiová	neuveдено
3726	<i>Trichurus spiralis</i> Hasselbr.	kožní šupiny mezprstí nohou u 1-ročního dítěte, Česká republika, 2007, M. Skořepová No. 2124/07; det. K. Prášil No. 225	neuveдено



# Nové zdroje klinicky významných húb v životnom prostredí človeka na Slovensku

ROMAN LABUDA

**LABUDA, R.: New sources of clinical important fungi in human environment in Slovakia.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 52-59. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

This article draws the attention towards the incidence of fungal opportunistic pathogens in two different niches in Slovakia, i.e. compost (consisting of the remnants from rabbit slaughter and straw; location Hlohovec, and ripped sludge from bio-gas station in Kolíňany) possessing favorable conditions for their rapid growth, reproduction and consequently also distribution into environment via manure of soil. From the preliminary results it seems unlikely that the ripped sludge from bio-gas station may represent a risk due to presence of keratinophilic/keratinolytic fungi (including dermatophytes). Contrary, this substrate is highly colonized by two important BSL-2 fungal pathogens, namely *Aspergillus fumigatus* and *Pseudallescheria boydii*, and thus, it should be considered as a potential source of the opportunists. Concerning the compost, it represents a risk from high occurrence of both keratinolytic fungi (including dermatophytes) and the BSL-2 opportunists.

**Keywords:** keratinophilic fungi, keratinolytic fungi, *Microsporum*, opportunists, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudallescheria boydii*

Roman Labuda, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [Roman.Labuda@uniag.sk](mailto:Roman.Labuda@uniag.sk)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Väčšina mykóz je získaná z prostredí, ako je napr. pôda, znečistená voda, zvyšky rastlín alebo kompost, ktoré tvoria substrát pre saprotrofný rast mnohých druhov klinicky významných húb, čím sa takéto substráty stávajú ich primárnym prostredím a zároveň i zdrojom infekcie (MARCHISIO, 2000; SUMMERBELL, 2004). Osobitnú skupinu tvoria keratinofilné, resp. keratinolytické huby. Tieto sú asociované s aktivitou človeka a zvierat a najčastejšie sa vyskytujú v husto obývaných oblastiach kde sú zvyšky keratínu v podobe srsti, vlasov, pokožky, nechtov atď. do pôdy kontinuálne dodávané. V neobývaných oblastiach je abundancia keratinolytických húb obmedzená zväčša len na polia hnojené maštalným hnojom a miesta neustále alebo dočasne navštevované zvieratami. Veľké množstvá keratinózneho materiálu sa vyskytuje aj v splaškových kaloch a mestskom odpade. Kvôli vysokému obsahu keratínu a vhodných výživným podmienkam splaškové kaly, mestské odpady a odpadom kontaminované prostredia charakterizuje extrémna dominancia keratinolytických húb (ULFIG, 2000). Splaškové kaly sú často aplikované v poľnohospodárstve (ako hnojivo) alebo pri rekultiváciách v lesníctve a devastovaných územiach. Samostatným problémom sa javí determinácia expozície ľudí a zvierat voči epidermálnym mykózam v oblastiach s vysokou koncentráciou keratinolytických húb (SUMMERBELL, 2000; ULFIG, 2000), pretože keratinolytická aktivita je považovaná za údajný faktor virulencie a všetky pôdne keratinolytické huby sú potenciálne patogény (MARCHISIO, 2000). Podobne, každý pôdny keratinolytický druh môže v priebehu svojho vývoja nadobudnúť či získať schopnosť napádať keratinizované ľudské alebo živoššie tkanivá, t.j. vyvolávať rôzne druhy tíneí - dermatofytóz. Niektoré z novo-popísaných keratinofilných húb boli izolované z pôdy, a niekoľko z nich sa neskôr prejavili ako obligátne alebo potenciálne patogény zvierat a ľudí (KURUP & SMITH, 1970).

Prvoradým cieľom predkladanej štúdie bolo zhodnotiť výskyt a abundanciu keratinolytických druhov v dvoch antropogénnych substrátoch, konkrétne kompostu, ktorého

základ tvoria živočíšne zvyšky (odpad) z bitúnku králikov zmiešaného so slamou, a vo vyzreтом kale z bioplynovej jednotky, priamo určeného na hnojenie okolitej poľnohospodárskej pôdy. Pretože sa stanovilo aj pomerne veľké množstvo iných klinicky významných druhov práca pojednáva aj o riziku vyplývajúceho z kontaminácie týchto substrátov oportúnnymi systémovými patogénmi.

## **Materiál a metódy**

### **Vzorky**

Vzorky (cca 1 kg á) povrchových vrstiev voľne uloženého kompostu v lokalite Hlohovec boli odobraté v marci 2007 zo 4 miest kompostovej kopy korešpondujúcich približnému času založenia, resp. uloženia čerstvého substrátu na kompostovanie (vzorka č. 1 = najstaršia frakcia z roku 2004; č. 2 = mladšia frakcia z 2004; č. 3 = z 2005; č. 4 = najmladšia frakcia z roku 2006/07). Kompostovaná hmota (kompost) pozostáva zo živočíšneho odpadu získaného z bitúnka na porážku králikov, t.j. časti kože so srst'ou, ušnice, chvosta a pod.) a slamy. Vzorka (cca 1 kg) vyzretého k a l u, resp. sedimentu priamo určeného na hnojenie pôdy z bio-plynovej jednotky v lokalite Kolíňany bola odobratá v júni 2007. Vstupný substrát pre tvorbu bioplynu do bioplynovej jednotky je zmes maštalného (ošípané a hovädzí dobytok) hnoja a hnojovice. Počas odberu bola do vstupného substrátu zamiešaná aj srvátka. Odobraté vzorky boli do času analýzy (2 -3 d) uchované v chlade pri teplote 8-10°C.

### **Izolácia húb zried'ovacou metódou**

Návažok 5 g vzorky bol homogenizovaný s 45 ml fyziologického roztoku na horizontálnej trepačke po dobu cca 30 min. Po pretrepaní bol 1 ml inokula aplikovaný do Petriho misiek a zaliaty sladínovým agarom s chloramfenikolom (MA, Imuna, SR) a agarom s dichloranom, bengálskou červenou a chloramfenikolom (DRBC, Merck, G) v riedení  $10^{-2}$  až  $10^{-5}$  v trojnásobnom opakovaní. Platne boli kultivované pri 37 °C, 7-14 dní, v tme. Ich identifikácia bola vykonaná na základe fenotypových znakov a prejavov podľa identifikačných kľúčov (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SAMSON et al., 2002; SIGLER & CARMICHAEL, 1976; SIGLER et al., 1998 )

### **Izolácia keratinofilných húb**

Každá vzorka bola rozdelená na 10 subvzoriek (10 Petriho misiek). Subvzorka o hmotnosti cca. 20 g bola nasýpaná do vrstvy približne jednej polovice Petriho misky a ovlhčená 10-20 ml (v závislosti od pôvodnej vlhkosti vzorky) antibiotického roztoku pozostávajúceho z cykloheximidu (aktidión; Calbiochem, USA; 500 mg/l) a chloramfenikol (Penta, ČR; 50 mg/l). Na samotnú izoláciu keratinofilných/-lytických húb boli ako návnada použité sterilizované konské vlasy. Metóda vychádza z postupu podľa Vanbreuseghema z 1952 (SUMMERBELL, 2004). Pred ich použitím boli tieto odmastené saponátom a opláchnuté vodovodnou vodou (pranie). Po nastrihaní na 1-3 cm kúsky boli fragmenty vlasov vysterilizované pri teplote 120°C, tlaku 120 kPa v autokláve. Na povrch substrátu v subvzorke boli vlasy ukladané sterilnou pinzetou v počte cca. 10 kusov/P.miska = subvzorka. Kultivácia prebiehala pri laboratórnej teplote (22-25 °C) pri difúznom dennom svetle, počas 2-3 mesiacov. Petriho misky boli kontrolované na prítomnosť keratinytických húb v priemere každý týždeň. V prípade potreby boli vzorky ovlhčené sterilnou destilovanou vodou. Identifikácia izolovaných húb bola primárne vykonaná na základe makromorfologických a mikromorfologických znakov podľa kľúčov a identifikačných

postupov (DOMSCH et al., 1980; VAN OORSCHOT, 1980; SIGLER et al., 1986; SIGLER et al. 1998; DE HOOG et al., 2000).

## Výsledky a diskusia

O výskyte jednotlivých keratinofilných druhov vo vzorkách kompostu a vzorke vyzretého kalu informuje tabuľka č. 1. Aj napriek jedinej analyzovanej vzorke kalu je zrejmé, že proces zrenia v bioplynovej jednotke, vrátane vyhnívacej nádrže spôsobuje elimináciu typických keratinofilných húb, ktoré sú náročné na prítomnosť kyslíka a majú aj obmedzený teplotný rozsah (DOMSCH et al., 1980; VAN OORSCHOT, 1980). Prostredníctvom vstupného substrátu (maštalný hnoj) sa tieto huby dostávajú do biokalovej jednotky najmä ako kolonizátori zvyškov srsti a odlúpených malých úlomkoch kože (*stratum corneum*) kde využívajú  $\alpha$ -keratín ako hlavný zdroj energie a dusíka (MARCHISIO, 2000). Ukazuje sa preto, že vyzreté kaly nepredstavujú riziko z pohľadu kontaminácie prostredia keratinofilnými, resp. keratinolytickými hubami, vrátane dermatofytov a že proces produkcie metánu za špecifických podmienok eliminuje ich prítomnosť v konečnom produkte, t.j. vyzretom kale. Toto tvrdenie je len predbežné a na jeho overenie je potrebná ďalšia séria mykologických analýz.

Iná situácia je v prípade voľne uložených kôp kompostu z lokality Hlohovec, ktorý pozostáva zo zmesi neupotrebitelných častí králikov priamo z bitúnku a slamy. Zistilo sa, že povrchové vrstvy kompostu obsahujú najmenej 7 druhov keratinofilných húb, z ktorých okrem jediného druhu (*Verticillium* sp.) sú všetky známe svojou silnou keratinolytickou aktivitou (VAN OORSCHOT, 1980; SIGLER et al., 1986; SIGLER et al., 1998). Z epidemiologického hľadiska patrí k dôležitým nálezom zachytenie viac než 50 izolátov *Microsporium gypseum* (Obr. 1), t.j. geofilného dermatofyta, ktorý môže vyvolávať rôzne typy kožných infekcií ľudí a zvierat. Tento druh bol prítomný len vo vzorkách, resp. frakciách korešpondujúcich s najstaršími časťami kompostovej kopy a nebol prítomný v mladších frakciách (č.3 a 4). Je preto pravdepodobné, že sa substrát začína kolonizovať populáciou tohto dermatofyta až po uplynutí istého času (napr. aj niekoľko mesiacov) a jeho abundancia sa zvyšuje vekom kompostu. Konkrétna frakcia kompostu bola v úmysle majiteľa poslúžiť ako hnojný substrát pre okrasné kvety alebo stromy. Z epidemiologického pohľadu je možné považovať tento substrát za rizikový, pretože predstavuje zdroj zárodkov spomínaného dermatofyta. Dôležitým sa javí aj zachytenie druhu *Chrysosporium zonatum* (vo všetkých sledovaných frakciách), ktorý je rovnako známym etiologickým agensom systémovej mykózy a nedávno bol zaznamenaný ako agens rôznych typov systémových mykóz (DE HOOG et al., 2000). Rovnako aj ostatné druhy zistené v komposte sú v literárnych záznamov uvádzané ako príčina niektorých ochorení človeka (text nižšie, pri BSL-1 druhoch), čo potvrdzuje tvrdenie Marchisiovej, že každý keratinolytický druh je nutné považovať za potenciálny patogén ľudí a zvierat. Je to dané ich schopnosťou aktívne rozkladať keratíny prítomné v koži, vlasoch, chlpmoch, srsti a pod (MARCHISIO, 2000).

Pokiaľ ide stanovenie počtu a výskytu druhov húb izolovaných zried'ovacou metódou (DRBC, resp. MA) pri teplote 37 °C sú výsledky vyšetrenia uvedené v tabuľke č. 2. Jeden gram vyzretého kalu obsahoval minimálne  $1,2 \times 10^5$  zárodkov mikroskopických húb schopných rásť pri 37 °C, pričom bolo zastúpených 8 druhov s kvantitatívnou prevahou populácie *Byssoschlamys nivea*. Z epidemiologického hľadiska je dôležité poznamenať, že v jednom grame kalu sa vyskytovalo minimálne  $2,1 \times 10^4$  zárodkov tých druhov, ktoré sú známe pod označením oportúnne patogény a v klasifikácii pre biologickú bezpečnosť (de Hoog et al., 2000) zastupujú triedu BSL-2. Ide o nasledovné druhy *Aspergillus flavus* ( $10^3$  KTJ.g<sup>-1</sup>), *A. fumigatus* ( $10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup>) a *Pseudallescheria boydii* ( $10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup>), o patogenite ktorých je zmienka nižšie. V celkovom počte druhov schopných rásť pri 37 °C v rozsahu od 3 do 6 sa ukázali jednotlivé frakcie kompostu, pri ktorých najväčší počet zárodkov (minimálne

3 mil. na gram substrátu) dosiahla frakcia č. 3 s tromi izolovanými druhmi (*Rhizopus stolonifer*, *Scopulariopsis koningii* a *Penicillium janthinellum*). Hoci, ako uvádzajú správy o klinických nálezoch pri prípadoch rôznych ochorení ľudí (text nižšie), ani jeden z týchto druhov nie je klasifikovaný v kategórii BSL-2. Podobne, hoci s najväčšou diverzitou druhov (6 spp.) bola pozorovaná absencia BSL-2 druhov i v najmladšej frakcii č. 4. Naopak, prítomnosť oportúnneho patogéna *Pseudallescheria boydii* bola zaznamenaná vo veľkom množstve (minimálne  $10^5$  zárodkov v grame substrátu) v stredne starej frakcii č. 3, v ktorej bola objavená aj populácia *Aspergillus fumigatus* v množstve 1000 zárodkov na gram kompostu. Zaujímavosťou ale zostáva, že vo frakcii č. 1 (najstaršia) sa prítomnosť spomínaných druhov nepotvrdila a namiesto nich sa diagnostikoval v množstve  $10^3$  KTJ.g iný BSL-2 druh, a to *Absidia corymbifera*. Odvolávajúc sa na literárne zdroje (napr. KANE et al., 1997; DE HOOG et al., 2000; SIGLER et al., 2003; SUMMERBELL, 2003) všetky spomínané BSL-2 ale i ostatné diagnostikované BSL-1 druhy predstavujú potenciálne riziko predovšetkým u ľudí so zníženou obranyschopnosťou (leukemickí pacienti, pacienti po transplantáciách atď.) alebo pacientov trpiacich na cystickú fibrózu. V konkrétnych vzorkách sa vyskytovalo značné množstvo aj čo do počtu aj druhového zastúpenia práve BSL-2 spp. a preto je možné tieto substráty považovať za nový zdroj (a „liaheň“) potenciálne patogénnych húb spôsobujúcich systémové infekcie ľudí i zvierat.

Týmto príspevkom chce autor poukázať na skutočnosť, že človekom umelo vytvorené substráty na báze organických zvyškov, ako predstavujú vyzreté kaly alebo komposty živočíšneho základu v konkrétnych oblastiach Slovenska sa stávajú potenciálnym zdrojom klinicky významných druhov mikroskopických húb a že ich aplikácia do poľnohospodárskych pôd môže zvýšiť zaťaženie prostredia týmito infekčnými činiteľmi. Je preto nevyhnutné nájsť spôsob eliminácie aspoň niektorých (BSL 2) oportúnnych patogénov a tým zabezpečiť aj hygienicko-epidemiologickú stránku aplikácie takýchto substrátov do pôd a teda do životného prostredia človeka.

**Tab. 1.** Výskyt keratinofilných druhov húb vo vzorkách kompostu a vyzretého kalu

Keratinofilné druhy (*HBM)	Kompost Hlohovec				Kaly Kolíňany
	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	
<i>Aphanoascus</i> sp.	1	-	1	23	-
<i>Chrysosporium europae</i>	-	15	3	2	-
<i>Ch. keratinophilum</i>	-	1	10	-	-
<i>Ch. zonatum</i>	49	26	1	5	-
<b><i>Microsporium gypseum</i>**</b>	52	6	-	-	-
<i>Trichophyton ajelloi</i>	-	5	-	-	-
<i>Verticillium</i> sp.	-	-	-	5	-
<b>Celkom</b>	<b>102</b>	<b>53</b>	<b>15</b>	<b>35</b>	<b>0</b>

\* HBM izolačná metóda vnaďenia fragmentmi konských vlasov (horse-hair baiting method); \*\* dermatofyt; vzorka č. 1 = najstaršia frakcia z rok 2004, č. 2 = mladšia fr. z 2004, č. 3 = z 2005, č. 4 = najmladšia frakcia z roku 2006/07.



**Obr. 1.** *Microsporium gypseum*; mikroskopické štruktúry.

**Tab. 2.** Výskyt a počty izolovaných druhov vo vzorkách kompostu a vyzretého kalu.

Druhy (*37°C)	Kompost Hlohovec				Kaly Kolíňany
	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	
<i>Absidia corymbifera</i>	10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
<i>Acremonium sp.</i>	-	-	-	10 <sup>5</sup>	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	10 <sup>3</sup>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	10 <sup>3</sup>	-	-	10 <sup>4</sup>
<i>Byssochlamys nivea</i>	-	-	-	-	10 <sup>5</sup>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	-	-	10 <sup>5</sup>	-
<i>Emericella nidulans</i>	-	-	-	-	10 <sup>3</sup>
<i>Chaetomium sp.</i>	-	10 <sup>5</sup>	-	-	-
<i>Chrysosporium zonatum</i>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	-	-	-
<i>Malbranchea cinnamomea</i>	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
<i>Malbranchea sp.</i>	-	10 <sup>3</sup>	-	-	-
<i>Monascus ruber</i>	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
<i>Myceliophthora thermophila</i>	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
<i>Penicillium janthinellum</i>	-	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	-
<i>Pseudallescheria boydii</i>	-	10 <sup>5</sup>	-	-	10 <sup>4</sup>
<i>Rhizopus stolonifer</i>	10 <sup>5</sup>	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	-
<i>Scopulariopsis koningii</i>	-	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	-
<i>Staphylotrichum coccosporum</i>	-	-	-	10 <sup>4</sup>	-
Celkom v 1 g (min. hodnota)	10 <sup>5</sup>	2. 10 <sup>5</sup>	3.10 <sup>6</sup>	4,2 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>
<b>Počty BSL-2 druhov v 1 g</b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>2,1 x 10<sup>4</sup></b>

\* použitá zried'ovacia metóda a kultivácia pri 37 °C ; \*\* druhy s označením BSL-2

## Prehľad o patogenite a klinických nálezoch jednotlivých izolovaných druhov húb

### Druhy s označením BSL-2:

#### *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. & Trotter

Tento typicky pôdny druh má celosvetové rozšírenie a je zároveň najčastejšou príčinou mukormykózy pľúc, nosovej dutiny, očnej rohovky ale aj iných orgánov (mozog, obličky, koža) u ľudí a teplokrvných zvierat. Rovnako patrí medzi najčastejšie príčiny mykotických abortov kráv. Ťažké prípady invazívnych infekcií boli zaznamenané u pacientov s AIDS, neutropéniou a transplantáciami (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SCHIPPER & STALPERS, 2003).

#### *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis, A. A. Padhye & Ajello

Tento druh sa často vyskytuje ako saprotrofná huba v poľnohospodárskej pôde, hnoji a znečistenej vode a má celosvetové rozšírenie. Klinické prejavy sú zhodné s prejavmi vyvolanými druhom *Aspergillus fumigatus* a infekcie sa vyskytujú medzi zdravými ľuďmi i pacientmi s oslabenou imunitou. Spektrum klinických syndrómov zahŕňa otomykózu, saprotrofnú pľúcnu kolonizáciu, alergickú sinusitídu a bronchopulmonárnu mykózu, tzv. fungus ball, keratitídu, endokarditídu, osteomyelitídu, endoftalmitídu, invazívnu sinusitídu, alebo pľúcne a diseminované infekcie. Často napáda aj mozog čím spôsobuje mozgové abscesy a meningitídy. Patogén je nebezpečný predovšetkým u leukemických pacientov

a pacientov s transplantáciami. Veľmi často sa vyskytuje v pľúcach ľudí s cystickou fibrózou (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SIGLER, 2003).

### ***Aspergillus fumigatus* Fresen.**

Je to termotolerantná huba s celosvetovým rozšírením v prirodzených i antropogénnych prostrediach. Nachádza sa predovšetkým v teplejších pôdach, pôdach kvetnáčov, rašeliniskách, ale najčastejšie v kompostoch a iných substrátoch obsahujúcich rozkladajúce sa rastlinné zvyšky, v ktorých sa zvyšuje teplota samozahrievaním. Vo veľkom množstve sa jeho spóry objavujú v ovzduší počas manipulácie s biologickým odpadom (napr. kompostom) a spôsobujú mykózy ako následok inhalácie infekčných propagúl. Tento druh predstavuje najčastejšiu príčinu aspergilózy u ľudí s poškodenou prirodzenou imunitou. Diseminované infekcie u pacientov bez poškodenej imunity sú veľmi zriedkavé. Zvyčajne primárne infikuje pľúca, ale príležitostne aj iné časti organizmu, pričom môže vyvolať sinusitídu, otomykózu, peritonitídu a endokarditídu. Zaznamenané boli aj prípady mozgovej aspergilózy (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SUMMERBELL, 2003).

### ***Aspergillus flavus* Link**

Tento druh má celosvetové rozšírenie a je považovaný za kozmopolitný druh asociovaný prevažne s kompostmi alebo ako kolonizátor teplých pôd tropických a subtropických oblastí. Kvôli schopnosti produkovať nebezpečné toxíny (aflatoxíny) zároveň predstavuje aj významný potenciálne toxínogénny druh. Tento druh je jednou z najčastejších príčin alergickej bronchiálnej aspergilózy ľudí a pľúcnych infekcií pacientov s oslabenou imunitou, kde môže byť priebeh ochorenia zhoršený produkciou mykotoxínov. Je tiež jedným z najčastejších agensov mykotickej sinusitídy. Vyvoláva aj oportúnne mykózy, najmä na citlivých častiach tela, ako napr. očné infekcie následkom predchádzajúceho zranenia oka, otomykózu, onychomykózu, peritonitídu a endokarditídu. V porovnaní s *A. fumigatus* spôsobuje vyšší podiel infekcií nosovej a ušnej dutiny a nižší podiel pľúcnych infekcií (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SUMMERBELL, 2003).

### **Druhy s označením BSL 1:**

#### ***Microsporum gypseum* (E. Bodin) Guiart & Grigoraki**

Tento druh má celosvetové rozšírenie. Vyskytuje sa v pôde (geofilný dermatopfyt) a u ľudí spôsobuje *tinea corporis* (mykotická infekcia častí trupu) a *tinea capitis* (infekcia vlasatej časti hlavy). Zaznamenaný bol aj prípad onychomykózy. Zvyšuje sa frekvencia infekcii najmä u pacientov s AIDS. Rovnako vyvoláva infekcie aj u rôznych druhoch zvierat, ako sú mačky, psy, hlodavce a kone (DE HOOG et al., 2000; HOWARD et al., 2003).

#### ***Chrysosporium zonatum* Al-Musallam & C. S. Tan**

Je to termotolerantný druh s výraznou keratinolytickou aktivitou rozšírený prevažne v subtropických a teplejších miernych oblastiach. Doposiaľ boli zaznamenané dva prípady pľúcnej infekcie a jeden prípad systémovej mykózy zasahujúcej pľúca a kosti chronicky chorého pacienta (DE HOOG et al., 2000; HOWARD et al., 2003).

#### ***Chrysosporium keratinophilum* D. Frey: J. W. Carmich.**

Je to geofilný keratinolytický druh hojný predovšetkým v oblastiach s miernou klímou často izolovaný z prípadov onychomykóz a povrchových infekcií (SIGLER, 1997; DE HOOG et al., 2000; HOWARD et al., 2003).

#### ***Trichophyton ajelloi* (Vanbreus.) Ajello**

Je to geofilný druh s výraznou keratinolytickou aktivitou a celosvetovým rozšírením. Infekcie ľudí a zvierat sú zriedkavé a vo všeobecnosti je považovaný za nepatogénny druh - dermatofytoid (KANE, 1997; DE HOOG et al., 2000; SUMMERBELL, 2000).

#### ***Scopulariopsis koningii* (Oudem.) Vuill.**

Je to druh podobný *S. brevicaulis*, izolovaný z niekoľkých prípadov onychomykóz (DE HOOG et al., 2000).

#### ***Monascus ruber* Tiegh.**

Tento prevažne pôdny druh v jednom prípade vyvolal infekciu obličiek ako následok chirurgického zásahu (DE HOOG et al., 2000).

#### ***Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot**

Tento druh sa vyskytuje najmä v substrátoch akým je napr. kompost, kde dochádza k samozahrievaniu. V dvoch prípadoch huba spôsobila fatálnu aortálnu vaskulitídu a pľúcnu inváznu infekciu v prípade leukemického pacienta. Zaznamenané sú i aj infekcie pri úrazoch či chirurgických zákrokoch (DE HOOG et al., 2000; SIGLER, 2003).

#### ***Staphylotrichum coccosporum* J. Meyer & Nicot**

Je to celosvetovo rozšírená pôdna huba, ktorá sa vyskytuje prevažne v teplejších oblastiach sveta. Pôvodne bol tento druh izolovaný z pôdy dažďového pralesa v Zaire. Je považovaný za saprotrofný druh, pričom bol zaznamenaný zatiaľ jediný prípad subkutánnej infekcie spôsobenej súčasne aj dermatofytickou hubou (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000)

#### ***Cladosporium sphaerospermum* Penz.**

Typicky pôdna saprotrofná huba s celosvetovým rozšírením. Klinické nálezy boli zaznamenané v prípadoch infekcie rohovky, kožných lézií a onychomykózy (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000)

#### ***Emericella nidulans* (Eidam.) Vuill.**

Je to typický pôdny druh s celosvetovým rozšírením. Najčastejšie sa však vyskytuje v pôdach teplejších oblastí sveta, obzvlášť tropických a subtropických oblastiach a patrí medzi významných kolonizátorov rozkladajúcich sa rastlinných zvyškov. Tento druh bol zaznamenaný ako etiologický agens rôznych infekcií ľudí i zvierat buď ako jediná príčina ochorenia alebo v asociácii s inými oportúnnymi hubami. Medzi najčastejšie patria pľúcne infekcie, sinusitída, endoftalmitída, osteomyelitída, povrchové a diseminované mykózy (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000; SUMMERBELL, 2003).

#### ***Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill.**

Je v rámci radu Mucorales najbežnejšie sa vyskytujúcim druhom s celosvetovým rozšírením i keď sa najčastejšie vyskytuje v teplejších oblastiach. V súvislosti s týmto druhom boli zaznamenané rinocerebrálne mykózy najčastejšie pacientom s diabetes (DOMSCH et al., 1980; DE HOOG et al., 2000).

## **Pod'akovanie**

Štúdia bola finančne podporená projektom VEGA 1/3459/06. Autor sa chce týmto poďakovať docentom Jánovi Rafayovi (VÚŽV SCPV Nitra) a Jánovi Gadušovi (MF, SPU Nitra) za poskytnutie vzoriek.

## Prehľad literatúry

- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2<sup>nd</sup> ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 1126 pp.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W.- ANDERSON, T. H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London, 859 p.
- HOWARD, D. H., WEITZMAN, I., PADHYE, A. A., 2003. Onygenales: Arthrodermataceae. In: HOWARD, D. H. (Ed.), Pathogenic Fungi in Humans and Animals. 7<sup>th</sup> ed., Marcel Dekker, New York, pp. 141-194.
- KURUP, P. V., SCHMITT, J.A., 1970. Human-pathogenic fungi in the soils of central Ohio. Ohio J. Sci. 70: 291-295.
- MARCHISIO, V. F., 2000. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: KUSHWAHA, R. K. S., GUARRO, J. (Eds.), Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, pp. 86-92.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 389 p.
- SCHIPPER, M. A. A., STALPERS, J. A., 2003. Zygomycetes: the order Mucorales. In: HOWARD, D.H. (Ed.), Pathogenic Fungi in Humans and Animals, 2<sup>nd</sup> ed., Marcel Dekker, New York, pp. 67- 125.
- SIGLER, L., 2003. Miscellaneous opportunistic fungi. Microascaceae and other ascomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes, and Basidiomycetes. In: HOWARD, D.H. (Ed.) Pathogenic Fungi in Humans and Animals, 2<sup>nd</sup> ed., Marcel Dekker, New York, pp. 637-676.
- SIGLER, L., 2003. Ascomycetes: The Onygenaceae and other fungi from the order Onygenales. In: Howard, D.H. (Ed.). Pathogenic Fungi in Humans and Animals. 7<sup>th</sup> ed. Marcel Dekker, New York, pp. 195-236.
- SIGLER, L., CARMICHAEL, J. W., 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthorconidia. Mycotaxon 4: 349-488.
- SIGLER, L., GUARRO, J., PUNSOLA, L., 1986. New keratinophilic species of *Chrysosporium*. Can. J. Bot. 64: 1212-1215.
- SIGLER, L., FLIS, A.L., CARMICHAEL, J. W., 1998. The genus *Uncinocarpus* (Onygenaceae) and its synonym *Brunneospora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. Can. J. Bot. 76: 1624-1636.
- SUMMERBELL, R., 2003. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Piedrai*, and their relatives. In: HOWARD, D. H. (Ed.), Pathogenic Fungi in Humans and Animals. 7<sup>th</sup> ed., Marcel Dekker, New York, pp. 237-498.
- SUMMERBELL, R. C., 2000. Form and function in the evolution of dermatophytes. In: KUSHWAHA, R. K. S., GUARRO, J. (Eds), Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, pp. 30-43.
- SUMMERBELL, R. C., 2004. Fungi associated with vertebrates. In: MUELLER, G. M., BILLS, G. F., FOSTER, M.S. (Eds.) Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 451- 465.
- ULFIG, K., 2000. The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste-contaminated habitats, In: KUSHWAHA, R. K. S., GUARRO, J. (Eds), Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao, pp 44-50.
- VAN OORSCHOT, C. A. N., 1980. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. Stud. Mycol. 20 :1-89.



# Nové nálezy mikroskopických húb z rodu *Chrysosporium*, *Malbranchea* a *Myceliophthora* zo Slovenska

ROMAN LABUDA & JAROSLAVA KAČINOVÁ

LABUDA, R., KAČINOVÁ, J.: New records of microscopic fungi from the genus *Chrysosporium*, *Malbranchea* a *Myceliophthora* from Slovakia.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 60-63. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

In the course of mycological survey of compost and sludge samples from two different locations in Slovakia, three interesting fungal taxa, namely *Chrysosporium zonatum* Al-Musallam & C. S. Tan, *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot & de Hoog and *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot., were encountered. Referring to the lists of recognized fungi from Slovakia (LIZOŇ & BACIGÁLOVÁ, 1998; ŠIMONVIČOVÁ, 2005), these micromycetes represent new taxa to this area. Representative strains of the fungi are deposited in the Microbiology Department Collection, SUA in Nitra.

**Keywords:** keratinophilic fungi, keratinolytic fungi, soil, compost, sludge

Roman Labuda, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [Roman.Labuda@uniag.sk](mailto:Roman.Labuda@uniag.sk)

\* Presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

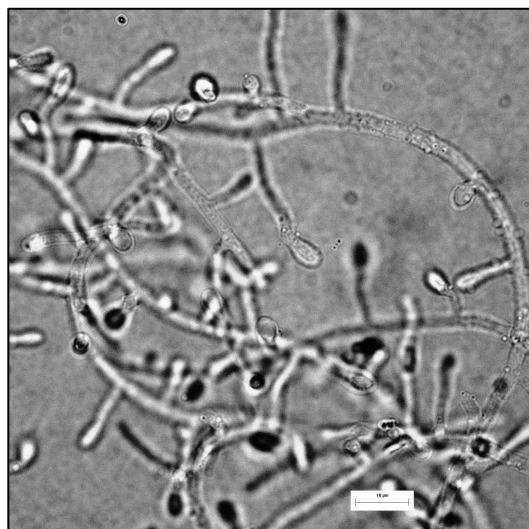
## *Chrysosporium zonatum* Al-Musallam & C. S. Tan (Obr. 1)

= *Chrysosporium gourii* P.C. Jain, Deshmukh & S. C. Agarwal

Teleomorfne štádium: *Uncinocarpus orisii* (Sur & G. R. Ghosh) Sigler & Flis

= *Pseudoarachnietus orisii* Sur & G. R. Ghosh

= *Gymnoascus arxii* Cano & Guarro



Obr. 1. *Chrysosporium zonatum*: SGA, 37 °C, 7 dní; mikroskopické štruktúry.

### **Klasifikácia** (podľa Index Fungorum, 2007):

Onygenaceae, Onygenales, Eurotiomycetidae, Eurotiomycetes, Ascomycota, Fungi

**Izolácia:** Niekoľko desiatok kmeňov *Ch. zonatum* bolo izolovaných v marci 2007 z kompostu (zajačie zvyšky z bitúnku s prídavkom slamy) nachádzajúceho sa v lokalite Hlohovec

pomocou fragmentov konského vlasu („horse baiting method“, VANBREUSEGHEM, 1952) ako i priamo na agare s dichloranom bengálskou červenou a chloramfenikolom (DRBC, Merck, Germany) a kultivácii pri 37 °C pri použití riedení  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$ .

Sledované izoláty sa na Sabouradovom agare s glukózou (SGA; Biokar Diagnostic, France) pri 37 °C vyznačovali veľmi dobrým rastom a dosahovali rýchlejší rast ako pri 25 °C (25-35 vs 15-22 mm na 7 dní). Kolónie po 10 dňoch kultivácie nadobúdali postupne hnedastý až škoricovo hnedý odtieň a pigment charakteristický pre tento druh. Rovnako, výraznejšie a rýchlejší nástup zmeny zafarbenia bol pozorovaný pri 37°C. Mikroskopický obraz odhalil produkciu terminálnych a laterálnych aleuriokonídií (5-8 x 3-5 µm) na charakteristicky jemne zvlnených konídiogénnych bunkách, resp. vláknach. Identifikácia bola vykonaná primárne na základe druhového popisu podľa DE HOOGA et al. (2000), konfrontované boli aj práce autorov SIGLER et al. (1998) a JAIN et al. (1993).

**Kľúčový diagnostický znak:** Dobrý rast na 37 °C, hnedasté zafarbenie kolónií, prítomnosť zvlnených krátkych konídiálnych stopiek a morfológia konídií. Blízky druh *Ch. queenslandicum* Apinis & Rees produkuje biele až žltasté kolónie a vyznačuje sa produkciou veľkého množstva interkalárnych konídií (artrokonídií), ktoré sú pri *Ch. zonatum* zriedkavé.

***Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot & de Hoog (Obr. 2)**

= *Malbranchea sulfurea* (Miehe) Pidopl.

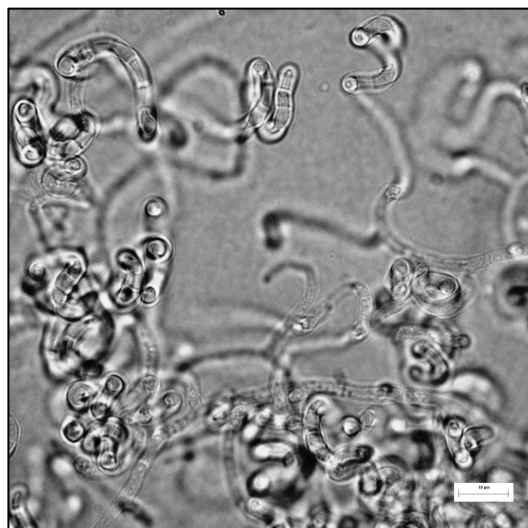
= *Malbranchea sulfurea* (Miehe) Sigler & J. W. Carmich.

= *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (Miehe) Cooney & R. Emers.

= *Geotrichum cinnamomeum* (Lib.) Sacc.

= *Thermoidium sulphureum* Miehe

= *Trichothecium cinnamomeum* Lib.



**Obr. 2.** *Malbranchea cinnamomea*: SGA, 37 °C, 7 dní; mikroskopické štruktúry.

**Klasifikácia:** Myxotrichaceae, Incertae sedis, Incertae sedis, Dothideomycetes, Ascomycota, Fungi

Izolácia: Tri kmene *M. cinnamomea* boli izolované v júni 2007 z vyzretého kalu bioplynovej jednotky nachádzajúcej sa v lokalite Kolíňany (okres Nitra) na DRBC agar a kultivácii pri 37 °C pri použitom riedení 10<sup>-2</sup>.

Sledované izoláty sa na SGA (37 °C) vyznačovali dobrým rastom a dosahovali rýchlejší rast ako pri 25 °C. Kolónie po 14 d kultivácie nadobúdali postupne žltý odtieň charakteristický pre tento druh. Mikroskopický obraz odhalil prítomnosť výrazne stočených (undulátnych) fertílňých hýf, na ktorých sa diferencujú artrokonídie. Identifikácia bola vykonaná primárne na základe druhového popisu k *M. sulfurea* podľa SIGLER & CARMICHAEL (1976) SGA 14 d 25 °C 10-15 mm (biele až žlté kolónie, žltavý reverz a tmavý stred); SGA 7 d 37 °C 55-60 mm (žlté až tmavožlté kolónie, obdobne ako 25 °C)

**Kľúčový diagnostický znak:** Dobrý rast na 37 °C, žlté zafarbenie kolónií, prítomnosť stočených (undulátnych) fertílňých hýf a morfológia artrokonídií. Morfológicky blízke *M. pulchella* Sacc. & Penz. sa odlišuje neschopnosťou rásť pri 37°C, zafarbením kolónií (biele až hnedé) a užšími artrokonídiami (SIGLER & CARMICHAEL, 1976; DE HOOG et al., 2000).

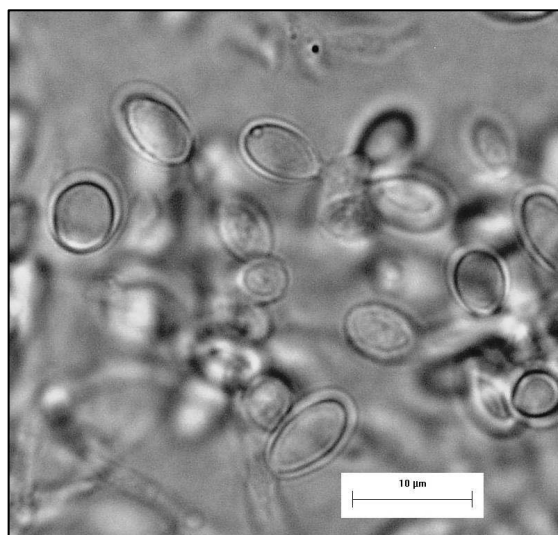
### ***Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot (Obr. 3)**

= *Chrysosporium thermophilum* (Apinis) Klopotek

= *Sporotrichum thermophile* Apinis

Teleomorfné štádium: *Thielavia heterothallica* Klopotek

= *Corynascus heterothallicus* (Klopotek) Arx



**Obr. 3.** *Myceliophthora thermophila*: SGA, 37 °C, 7 d; mikroskopické štruktúry.

### **Klasifikácia:**

Incertae sedis, Incertae sedis, Incertae sedis, Eurotiomycetes, Ascomycota, Fungi

Izolácia: Jediný kmeň *M. thermophila* bol izolovaný v júni 2007 z vyzretého kalu bioplynovej jednotky nachádzajúcej sa v lokalite Kolíňany (okres Nitra) na DRBC agar a kultivácii pri 37 °C pri použitom riedení 10<sup>-2</sup>.

Sledovaný izolát sa na SGA (37 °C) vyznačoval dobrým rastom a dosahovali rýchlejší rast ako pri 25 °C. Kolónie po 7 d kultivácie nadobúdali postupne ružový až škoricovo hnedý odtieň. Mikroskopický obraz odhalil produkciu prítomnosť ampuliformných buniek, z ktorých na stopkách vyrastajú hladké alebo i drsné konídie. Identifikácia bola vykonaná primárne na základe druhového popisu podľa DE HOOGA et al. (2000), konfrontované boli aj práce autorov SIGLER (2003) a VAN OORSCHOT (1980).

SGA 14 d 25 °C 50-60 mm (škoricovo hnedá, reverz čokoládovo hnedý)  
SGA 7 d 37 °C 65-70 mm (farebne ako na 25 °C)

**Kľúčový diagnostický znak:** Dobrý rast na 37 °C, charakteristické škoricovo hnedé zafarbenie kolónie, prítomnosť ampuliformných buniek, z ktorých na stopkách vyrastajú konídie a morfológia konídií. Podobný druh *M. lutea* Cost sa odlišuje žltými kolóniami a produkciou len výhradne hladkých konídií (VAN OORSCHOT, 1980).

### Podakovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom VEGA 1/3459/06. RL sa chce týmto poďakovať docentom Jánovi Rafayovi (VÚŽV SCPV Nitra) a Jánovi Gadušovi (MF, SPU Nitra) za poskytnutie vzoriek.

### Prehľad literatúry

- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2<sup>nd</sup> ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 1126 pp.
- Index Fungorum. 2007. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- LIZOŇ, P., BACIGÁLOVÁ, K., 1998. Part Fungi. In: MARHOLD, K., HINDÁK, F. (Eds.), Checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia, Veda, Bratislava, pp. 101-227
- SIGLER, L., 2003. Miscellaneous opportunistic fungi. Microascaceae and other Ascomycetes, Hyphomycetes, Coelomycetes, and Basidiomycetes. In: HOWARD, D. H. (Ed.), Pathogenic Fungi in Humans and Animals, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, New York, pp. 637-676
- SIGLER, L., CARMICHAEL, J. W., 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other hyphomycetes with arthroconidia. Mycotaxon 4: 349-488.
- SIGLER, L., FLIS, A. L., CARMICHAEL, J. W., 1998. The genus *Uncinocarpus* (Onygenaceae) and its synonym *Brunneospora*: new concepts, combinations and connections to anamorphs in *Chrysosporium*, and further evidence of relationship with *Coccidioides immitis*. Can. J. Bot. 76: 1624-1636 pp.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., 2005. A list of microscopi fungi as a supplement to the checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia - Part Fungi. Phytopedon 4: 21-28.
- VANBREUSEGHEM, R., 1952. Technique biologique pour l'isolment des dermatophytes du sol. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 32: 173-178.
- VAN OORSCHOT, C. A. N., 1980. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. Stud. Mycol. 20: 1-89.

# Notes to the identification of *Trichoderma tomentosum* and its close relatives within the section *Pachybasium*

ROMAN LABUDA

## LABUDA, R.: Notes to the identification of *Trichoderma tomentosum* and its close relatives within the section *Pachybasium*.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 64-73. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Representatives of *Trichoderma tomentosum* and three close relative species within the section *Pachybasium*, namely *T. cerinum*, *T. helicum*, and *T. velutinum* were investigated during this study in terms of their morphology, responses to growth at 10 °C temperature, and cycloheximide tolerance. Strains pertaining to *T. tomentosum* were sorted into two different morpho-types based on the morphology of conidia (shape and size) and conidiophore elongations. The *T. tomentosum* morphotype I. is being characterized by production of mostly ellipsoid to ovoid shaped conidia (usually not exceeding 3.5 µm in length), and more or less undulated conidiophore apical elongations, appearing more or less smooth. The strains representing *T. tomentosum* morphotype II. produce mostly oblong conidia (comparatively larger, usually exceeding 3.6 µm in length) and form only slightly undulated to nearly straight conidiophore apical elongations, appearing very rough due to abundance of small exudates. The study stressed that current species concept of *T. tomentosum* should be broadened to some extent with respect to conidial morphology, and that sequencing data are being urgently needed for reclassification of this species complex to separate *T. tomentosum* sensu stricto from allied taxa.

**Key words:** cycloheximide, fungi, morphology, soil, taxonomy, *Trichoderma cerinum*, *Trichoderma helicum*, *Trichoderma velutinum*

Roman Labuda, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [Roman.Labuda@uniag.sk](mailto:Roman.Labuda@uniag.sk)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Introduction

A total of eighty eight *Trichoderma* taxa have been hitherto described, of them 14 anamorph-teleomorph (i.e. holomorphs) relationship have been demonstrated, furthermore, 49 have been described in *Hypocrea* Fr. (teleomorphs only), and finally, 25 taxa have been described as being *Trichoderma* (anamorphs only) (DRUZHININA & KUBICEK, 2005). Nevertheless, there are likely by far a lot more *Trichoderma/Hypocrea* species here, which may either inhabit atypical or otherwise unusual geographic areas or may represent simply cryptic taxa within so far known species (KRAUS et al., 2004; KUBICEK, personal communication). Not surprisingly, the actual number of *Trichoderma* species may, hence, exceed two hundred as postulated by SAMUELS (1996). From an ecological point of view, species of the genus *Trichoderma* are cosmopolitan and typically wood-decaying fungi or, more typically, soil-borne fungi being recognized to have significant amount of fungal biomass in soil and herbaceous litter, or which are frequently present as an indoor contaminants (BISSET et al., 2003; DRUZHININA & KUBICEK, 2005; GHERBAWY et al., 2004; KRAUS et al., 2004; THRANE et al., 2001). In addition to, *Trichoderma* species are common contaminants of spawn, compost, and wood in commercial mushroom-growing facilities and most of them are considered indicators of compost quality or horticulture practices (Castle et al., 1998). Some of them are economically important producers of industrial enzymes (KUBICEK & PENTTILA, 1998) and antibiotics (SIVASITHAMPARAM & GHISALBERTI, 1998), or have application as bio-control agents against plant pathogens (HJELJORD & TRONSMO, 1998). Particularly, antibiotics produced by some *Trichoderma* isolates have fungicidal as well as

fungistatic effects (DENNIS & WEBSTER, 1971; DOMSCH et al., 1980). In addition, as it has been suggested by LEWIS & PAPAIVAS (1987) naturally produced fungicides, or their analogues, may be developed and formulated for commercial use. In fact, there is a high correlation between antibiotic actions of *Trichoderma* isolates against some important *Fusarium* species, such as *F. culmorum* (MICHIRINA et al., 1995). On the other hand, there is a great deal of reports dealing with implication of some *Trichoderma* species in various fatal human mycoses as it can be seen from the Atlas of Clinical Fungi (DE HOOG et al., 2000) showing an opportunistic pathogenic ability of many of the species. The last but not least what is needed to stress is the capability of some *Trichoderma* species to produce several prominent mycotoxins (toxic extrolites to vertebrates), namely gliotoxin, emodin, trichothecene-like trichodermin and/or isocyanides (FRISVAD & THRANE, 2002). Obviously, all these diverse implications of *Trichoderma/Hypocrea* with human society render an accurate species and strain identification to be a very important issue (DRUZHININA & KUBICEK, 2005), and, at the same time, the exact characterization and identification of strains to the species level is the first step in utilizing the full potential of fungi in specific applications (LIECKFIELD et al., 1999).

The taxonomy and identification of *Trichoderma* species has remained problematic until relatively recently. The first significant attempt to monograph the genus was by Rifai (1969), who recognized that the nine “species aggregates” he was describing were not biological species. A more comprehensive analysis of morphological variation within the genus was presented by BISSETT (1984, 1991a-c, 1992), who differentiated 27 species of *Trichoderma* based on morphological characters (Bisset et al., 2003). However, classical approaches based on the use of morphological criteria are difficult to apply to *Trichoderma*, due to the plasticity of the characters (DRUZHININA & KUBICEK, 2005). Furthermore, morphological analysis is highly prone to error, and consequently roughly 50 % of the *Trichoderma* spp. deposited in culture collections under names obtained by morphological analysis alone are wrong (DRUZHININA & KUBICEK, 2005; KUBICEK, personal communication). On the other hand, BISSETT (1991b) acknowledged that a final resolution of species in *Trichoderma* could only come from an integration of morphological, molecular and life-cycle (i.e. holomorph) studies being, in fact, first exemplified by Samuels et al. (1998), with the resolution of ten species within the section *Longibrachiatum* based on teleomorph and anamorph morphologies and nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) region of the r DNA. Since that time, molecular data has become essential for the delineation of new species in *Trichoderma* and for determining teleomorph connections (BISSETT et al., 2003).

A mycological survey of soil under *Quercus cerris* L. in Arboretum Mlyňany (county of Zlaté Moravce, Slovak Republic) in April 2004 revealed the presence of a single strain of a *Trichoderma* species, which was at that time identified tentatively as *Trichoderma* cf. *tomentosum* (LABUDA & LABUDOVA, 2005). However, later detailed morphological as well as molecular re-examination of the strain has shown some unique characters distinguishing this noteworthy strain, yet being morphologically similar to some known species within *Trichoderma* section *Pachybasium* (BISSETT, 1991b; BISSETT et al., 2003), especially *T. tomentosum* sensu stricto (BISSETT, 1991b). However, a consequent and additional molecular analysis based on *tef 1* confirmed its actual position within the current concept of *T. tomentosum*, even though overall size of conidia differs obviously from that of typical *T. tomentosum*. This obvious discrepancy in conidial morphology confronted with the original description of *T. tomentosum* by BISSETT (1991b), in fact, initiated a study in which several representatives and type strains of *T. tomentosum* and its close relatives were investigated to learn more about the morphological diversity within their original species diagnoses.

## Material and methods

## Strains

Representative strains of the *Trichoderma* species investigated in this study are listed in Table 1.

**Table 1.** Representative strains of the *Trichoderma* species treated in this study

Species	Strain No.	Origin
<i>T. tomentosum</i>	CPK 97 = CBS 349.93 (type)	Canada, Ontario
	CPK 829 = DAOM 178713 (ex type)	-
	CPK 880 = zd 28	Iran
	MA 5031	Slovakia (A. Mlyňany)
	CPK 2065	Sardinia
	CPK 2066	Sardinia
	CPK 2067	Sardinia
	CPK 2088	Sardinia
	CPK 650	South America
	CPK 1833	Etiopia
	CPK 1042	Guatemala
<i>T. cerinum</i>	CPK 293 = DAOM 230012 (type)	Nepal
<i>T. helicum</i>	CPK 415 = DAOM 230017	Malaysia
	CPK 430 = DAOM 230021	Thailand
	CPK 431 = DAOM 230022	Thailand
<i>T. velutinum</i>	CPK 298 = DAOM 230013	Nepal

## Morphological examination

Cultures were grown on 2% malt extract agar (MEA; RIFAI, 1969) at room temperature (22-25°C) under ambient daylight conditions. Microscopic observation and measurement were made from preparations mounted in 90 % (w/v) lactic acid (BISSETT, 1991b) with 0.1 % cotton blue (w/v). Microscopical structures were described from conidiophores taken from the edge of pustules after 4-7 d incubation. Conidial morphology and measurement were recorded after 14 d. The measurements are reported as maxima and minima in parentheses and the mean plus and minus the standard deviation of at least 30 measurements. The microphotographs and measurement were done by means of light microscope of type OLYMPUS Provis AX 70 (OLYMPUS Optical Co., LTD., Tokyo, Japan) equipped with a camera system of type OLYMPUS Provis AX 70 (OLYMPUS Optical Co., (Europa) GMBH, Hamburg, Germany) and software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

## Physiological testing

The ability to growth at 10 °C was observed on pure MEA after 7 d incubation in darkness, while the ability to tolerate cycloheximide was tested on MEA supplemented with 100 ppm cycloheximide. A stock solution of cycloheximide (Calbiochem, La Joila, USA) in 2 ml acetone (KANE et al., 1997) was added to the MEA after autoclaving to obtain the concentration 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Settled plates in 9 cm plastic Petri dishes were then inoculated at three equidistant points (in triplicate) using presterilized transfer needle. Radial growth was measured after 7 days incubation at room temperature (25 ± 2°C) uder ambient daylight.

## Results and discussion

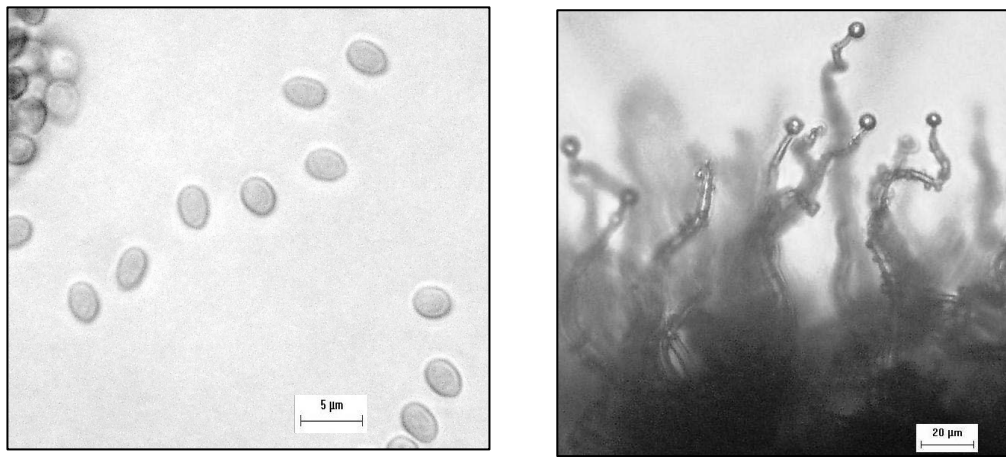
Species in *Trichoderma* section *Pachybasium* are characterized by broad or inflated conidiophore elements and phialides, which give the conidiophore a stout or rigid appearance. The phialides are typically ampuliform, divergent, and arranged in crowded verticils on terminal branches of conidiophore that are repeatedly branched and rebranched at an indefinite number of levels. The majority of the species in section *Pachybasium* have conidiophores aggregated in compact, flat to hemispherical pustules. In addition, many species have conspicuous, sterile elongations of the conidiophore main axis, which is a feature unique to section *Pachybasium* (BISSETT, 1991b). In one of his comprehensive study within the genus, BISSETT (1991b) assigned a total of twenty species to *Trichoderma* section *Pachybasium* based on conidiophore and conidium morphology, twelve of which have been proposed as the new species. Amongst them *T. tomentosum* Bissett has been delimited from the other species by production of compact, grey-green, hemisphaerical conidiogenous pustules, by the small conidia (less than 3.5 x 2.5  $\mu\text{m}$ ), and by spiral sterile apical conidiophore elongations (BISSETT, 1991b).

According to their original descriptions (BISSETT, 1991b; BISSETT et al., 2003), taxa within the *T. tomentosum* species group and its relatives possess a continuum of overlapping cultural, and to some extent also micro-morphological characters rendering their identification rather difficult. However, a combination of morphological characters and approaches suggested in this study may be useful in differentiation of species such as *T. cerinum*, *T. helicum*, *T. velutinum*, and *T. tomentosum sensu lato* from each other, as well as to serve (at least to some extent) on delimitation of the taxa within *T. tomentosum* species group proper, or eventually for separation of the new closely related species within the *Pachybasium* section.

Based on morphological observation, the strains received from the CPK collection as being representatives of *T. tomentosum* Bissett (BISSETT, 1991b) undoubtedly form a species complex (the *T. tomentosum* complex) that may be in a broad sense characterized by production of more or less undulate to nearly straight apical elongations with either sterile apices or in some strains with a limited number of apical fertile points (phialides), though not in a way being seen in *T. cerinum*. Furthermore, the members of the complex showed a relative broad range of conidial morphology, from ellipsoidal-ovoid (not exceeding 3.5  $\mu\text{m}$  in length) to nearly uniformly oblong and comparatively larger (usually exceeding 3.6  $\mu\text{m}$  in length), and/or sometimes seeing as combination of both. Thus, by taking into account combination of the morphology of conidia (shape and size) and the morphology of conidiophore elongations the strains treated as *T. tomentosum* during the study can be sorted into two general morpho-types, as follows:

***T. tomentosum* morphotype I.** is being characterized by production of mostly ellipsoid to ovoid shaped conidia (usually not exceeding 3.5  $\mu\text{m}$  in length; i.e. less than 3.5 x 2.5  $\mu\text{m}$ ) and more or less undulated conidiophore apical elongations, appearing smooth with only some drops of an exudates (Fig. 1). This morpho-type encompasses the following strains studied: CPK 97 (type; Canada), CPK 829 (ex type; Canada), CPK 880 (Iran), CPK 2065, CPK 2066, CPK 2067, CPK 2088 (Sardinia). Referring to the original species diagnosis by Bissett (1991b), the main emphasis in delimitation of *T. tomentosum* species within the section *Pachybasium* laid on morphology of conidia, i.e. a key feature, except characteristic apical conidiophore elongation, is formation of the small conidia (less than 3.5 x 2.5  $\mu\text{m}$ ).



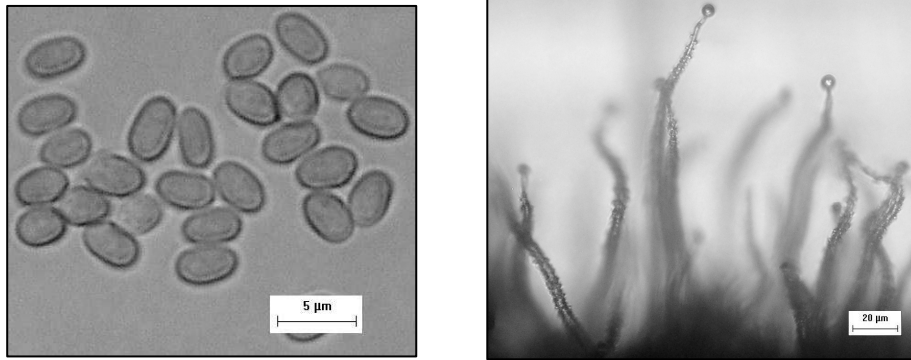


**Fig. 1.** *T. tomentosum* CPK 829 = DAOM 178713 (ex type): conidia and conidiophore elongations, representing morphotype I.

**Note:** Conidia of the strain MA 5031 (Slovakia) are essentially identical as for conidiophore elongations and conidial shape, yet having comparatively larger conidia (average  $3.9 \times 3.0 \mu\text{m}$ ). Moreover, it showed very slow growth in a medium with cycloheximide (1-3 mm in 3d), thus differing somewhat from the others in the morphotype I. (results not presented in detail in this study). Essentially, the same holds for the strain CPK 1042 (Guatemala), conidia of which are somewhat broader (in average of  $2.8 \mu\text{m}$ ) than in other strains within the morphotype, thus forming transmission form in conidial shape towards *T. cerinum* (BISSETT et al., 2003; also observed in this study) that has, however, smaller conidia (average  $3.5 \times 2.7 \mu\text{m}$  versus  $3.8 \times 2.7 \mu\text{m}$ ). The taxonomic status of the two strains remains unresolved and probably may represent new species.

It seems to be very important to consider dimensions and overall morphology of conidia for species identification within the section, since in many cases this is the only feature, which renders morphological identification of otherwise similar taxa possible. Furthermore, it should be noted that with the exception *T. tomentosum* morpho-type I (as suggested in this study), also other so-called small-spored species are known in section *Pachybasium*, such as *T. minutisporum*, *T. harzianum* (BISSETT, 1991b; LU et al., 2004), *T. cerinum*, *T. helicum*, *T. velutinum* (BISSETT et al., 2003), and *T. brevicompactum* (KRAUS et al., 2004) for which conidia less than  $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$  or even smaller are typical and species specific. Thus, it seems logical to pay the greatest attention towards this trait when *Trichoderma* species from the section *Bachybasium* are being identified. Accordingly, all differences in conidial size (even if the other substantial features fit perfectly species concept/diagnosis) and shape may make identification to the appropriate species level within the known taxa impossible, and/or indicate that the current morphological species concept should be broadened to some extent as it is suggested here to include also those *T. tomentosum* strains conidia of which possess different morphology (morphotype II).

***T. tomentosum* morphotype II.** is being characterized by production of mostly oblong conidia (comparatively larger, usually exceeding  $3.6 \mu\text{m}$  in length; i.e.  $3.8\text{-}4.0 \times 2.5\text{-}2.6 \mu\text{m}$ ) and only slightly undulated to nearly straight conidiophore apical elongations, appearing very rough due to abundance of small exudates (Fig. 2). By considering these criteria, morpho-type II. encompasses the following strains studied: CPK 650 (South America) and CPK 1833 (Ethiopia). In this morphotype, the conidial morphology may resemble that of *T. hamatum* (BISSETT, 1991), a type species for the section *Pachybasium*, but the conidiophore elongations are being very different, setting the two species unambiguously apart.



**Fig. 2.** *T. tomentosum* CPK 1833: conidia and conidiophore elongations, representing morphotype II.

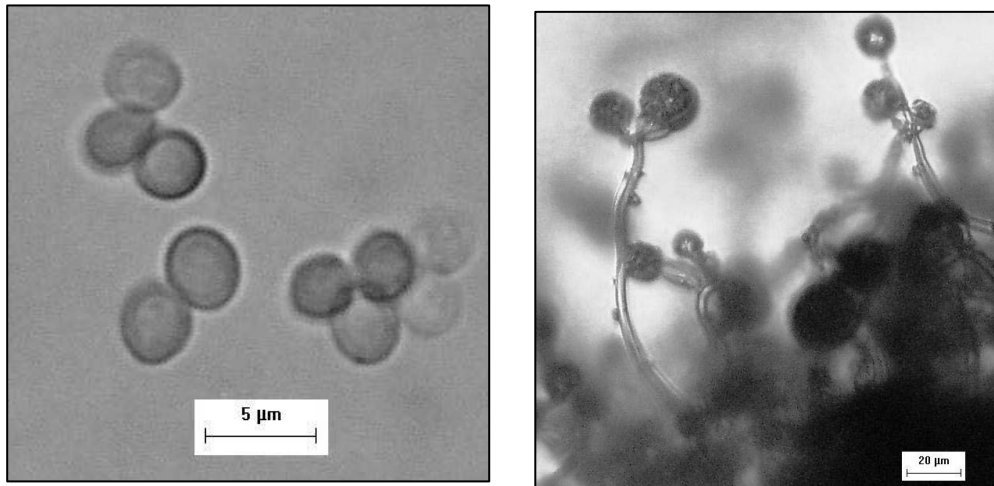
**Note:** In his recent communication with prof. C.P. Kubicek and dr. I. Druzhinina (Section of Applied Biochemistry and Gene Technology, Institute of Chemical Engineering, TU, Wien, Austria), the author of this contribution has been informed about the results of a phylogenetic analysis of the strains used in this study. On the basis of *tef1a* and ITS1 sequences, those strains belonging to the *T. tomentosum* morphotype I. (also including MA 5031 having larger conidia) represent two different clades of *T. tomentosum* 1 and 2., while those two strains pertaining to morphotype II. (CPK 650 and CPK 1833) clearly represent an unknown species. Moreover, the strain CPK 1042 (mentioned above as one having somewhat broader conidia) forms a different clade with *T. cerinum* (C.P. KUBICEK, personal communication).

Concerning the additional physiological tests carried out, i.e cycloheximide tolerance and ability to growth at 10 °C, the following responses were observed. Nearly all strains representing both morphotypes within *T. tomentosum* exhibited a relative good tolerance towards the cycloheximid (100 µg/ml), and colonies in most strains reached diameter that often exceeded 60 mm in 7 d. In a single case, i.e. MA 5031, the diameter did not exceed 44 mm in d, while no growth at all (indicating cycloheximide intolerance) was observed in strain CPK 2067 (*T. tomentosum* morphotype I.). As for ability to growth at 10 °C, all strains representing *T. tomentosum* (within both morphotypes) exhibited comparatively good growth at 10 °C, reaching (27-) 30-36 (-49) mm in diam after 7d. As can be seen below, using the two additional criteria (in combination with morphological ones) may facilitate identification of some close related taxa, such as *T. helicum* and/ or *T. velutinum*.

In the further text, the representatives of *T. cerinum*, *T. helicum*, and *T. velutinum*, will be discussed in terms of their morphology, responses to cycloheximide and 10 °C temperature.

### ***T. cerinum* Bissett, Kubicek & Szakacs (BISSETT et al., 2003)**

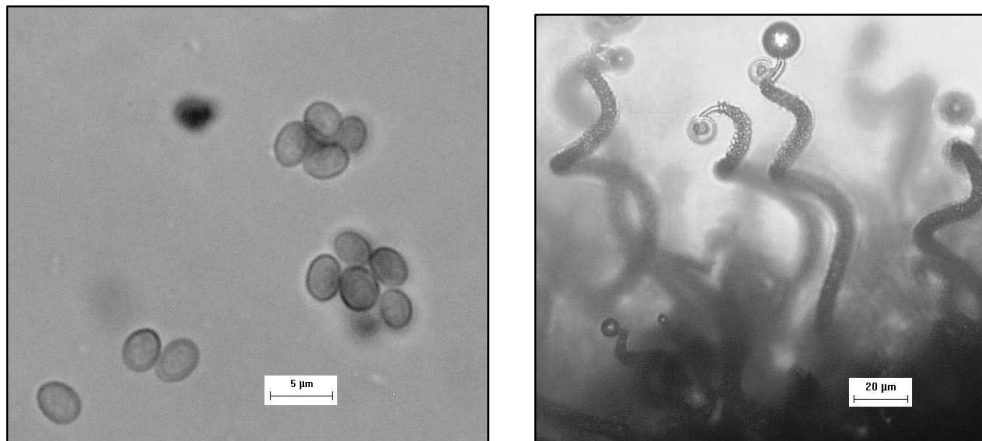
Of the all *Trichoderma* strains tested here, the *T. cerinum* type strain (CPK 293 = DAOM 230012) exhibited comparatively the best growth rate at 10 °C in 7 d (55-57 mm versus 12-49 mm in the others). The type strain of *T. cerinum* may be further readily distinguished from *T. tomentosum* and other relatives, morphologically, by production of highly fertile conidiophore apical elongations and by production of nearly subglobose, small conidia, mostly 3.3–3.8 x 2.5-3.1 µm with average 3.5 x 2.7 µm (Fig. 3). It also showed ability to tolerate 100µg/ml of cycloheximid in growth medium, albeit its colonies did not exceed 9 mm in 3 d (5-9 mm) in dark.



**Fig. 3.** *T. cerinum* CPK 293 = DAOM 230012 (type): conidia and condiphore elongations

***T. helicum* Bissett, Kubicek & Szakacs (BISSETT et al., 2003)**

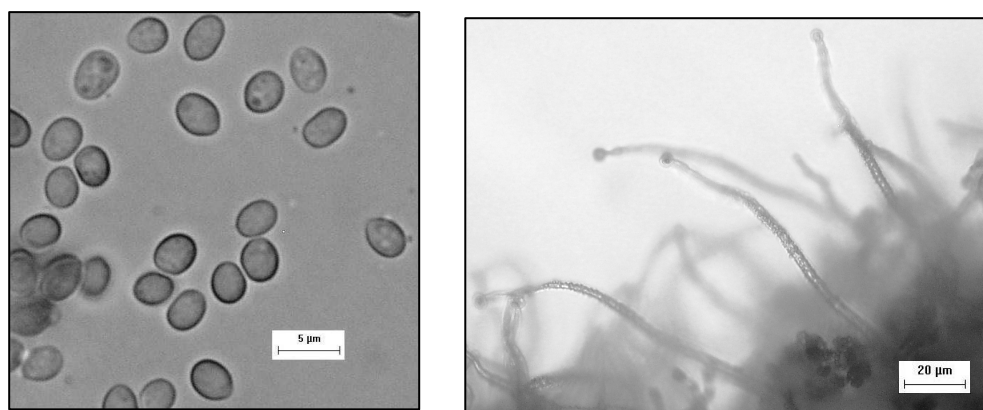
BISSETT et al. (2003) stated that this species is morphologically essentially identical with *T. tomentosum*, distinguishable only on the basis of differences in ITS 1 and 2 and *tef1*  $\alpha$  sequences, and by metabolic differences in assimilation rates of carbon substrate uptake. However, all strains investigated were noteworthy characteristic by their total inability to grow at 10 °C, what along with the formation of strongly spiralsed apical condiphore (Fig. 4) elongations may render the species identification relatively easy. They also showed ability to tolerate 100 μg/ml of cycloheximid in growth medium, albeit their colonies did not exceed 15 mm in 3 d (8-15 mm) in dark. Conidial morphology was essentially in common with that in the *T. tomentosum* species complex (representing morphotype I.), i.e. conidia being mostly of ellipsoid to ovoid shape, 3.0-3.7 x 2.1-2.6 μm (average 3.26 x 2.37 μm).



**Fig. 4.** *T. helicum* CPK 431= DAOM 230022: conidia and condiphore elongations

***T. velutinum* Bissett, Kubicek & Szakacs (BISSETT et al., 2003)**

A single strain of *T. velutinum* available for this study was found to have no tolerance towards cycloheximide in the growth medium, and along with the morphology of condiphore elongations (nearly straight) made the species rather distinctive (Fig. 5). A shape of conidia (mostly ovoidal) was in common with that observed in the *T. tomentosum* species complex (representing morphotype I.). It grew at 10°C, reaching up to 25 mm in 7 d.



**Fig. 5.** *T. velutinum* CPK 298 = DAOM 230013: conidia and conidiophore elongations

From the outcomes of this study it is virtually clear that based on morphology solely, identification of fungi resembling and/or representing *T. tomentosum* sensu stricto to the appropriate species level is not always easy and often may result in lots of confusions and misidentifications. To overcome this problem, additional physiological tests, such as tolerance to cycloheximide and ability to growth at 10 °C were suggested here and may be in future implemented into *Trichoderma* identification schemes. Table 2 consists of summarizing data based on growth at 10 °C and cycloheximide tolerance/intolerance, albeit two species were represented by only a single strain.

**Table 2.** Responses of the *Trichoderma* species investigated to growth at 10 °C and cycloheximide

Species (number of strains tested)	Growth at 10 °C	Cycloheximide tolerance
<i>T. tomentosum</i> (11)	+	+*
<i>T. cerinum</i> (1)	+	+
<i>T. helicum</i> (3)	-	+
<i>T. velutinum</i> (1)	+	-

\* a single strain of morphotype I. showed sensitivity (intolerance) to the antibiotic

## Acknowledgement

The author thanks prof. C.P. Kubicek, drs. I. Druzhinina and M. Komon (Section of Applied Biochemistry and Gene Technology, Institute of Chemical Engineering, TU, Wien, Austria) for providing the *Trichoderma* strains and for disclosing unpublished data on the phylogeny of the strains investigated in this work. The study was financially supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of education of the Slovak Republic, and the Slovak Academy of Sciences (No. 1/3459/06).

## References

- BISSETT, J., 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- BISSETT, J., 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.

- BISSETT, J., 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- BISSETT, J., 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 69: 2418-2420.
- BISSETT, J., 1992. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70: 639-641.
- Bissett, J., Szakacs, G., Nolan, C. A., Druzhinina, I., Gradinger, C., Kubicek, C. P., 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. Can. J. Bot. 81: 570-586.
- CASTLE, A., SPERANZINI, D., RGHEI, N., ALM, G., RINKER, D., BISSETT, J., 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on north american mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 64: 133-137.
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> ed., CBS, Utrecht, 1126 p.
- DENNIS, C., WEBSTER, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 41-48.
- DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol 1. Academic Press, London, 856 p.
- DRUZHININA, I., KUBICEK, C.P., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? J. Zhejiang Univ. Sci. 6B: 100-112.
- FRISVAD, J. C., THRANE, U., 2002. Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., (Eds.) Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6<sup>th</sup> ed., Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, pp. 321-330.
- GAMS, W., VAN DER AA, H. A., VAN DER PLAATS-NITERINK, A. J., SAMSON, R. A., STALPERS, J. A., 1987. CBS Course of Mycology. 3<sup>rd</sup> ed., Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 136 p.
- GHERBAWY, Y., DRUZHININA, I., SHABAN, G. M., WUCZKOWSKY, M., YASER, M., EL-NAGHY, M.A., PRILLINGER, H. J., KUBICEK, C. P., 2004. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. Mycol. Prog. 3: 211-218.
- HJELJORD, L., TRONSMO, A., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: An overview. In: HARMAN, G. E., KUBICEK, C. P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London, pp. 131-151.
- KRAUS, G. F., DRUZHININA, I., GAMS, W., BISSETT, J., ZAFARI, D., SZAKACS, G., KOPTCHINSKI, A., PRILLINGER, H., ZARE, R., KUBICEK, C. P., 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. Mycologia 96: 1059-1073.
- KANE, J., SUMMERBELL, R., SIGLER, L., KRAJDEN, S., LAND, G., 1997. Laboratory Handbook of Dermatophytes. Star Publishing, Belmon, 344 p.
- KUBICEK, C. P., PENTILLÄ, M. E., 1998. Regulation of production of plant polyssacharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E., KUBICEK, C. P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. London: Taylor & Francis. p 49-71.
- KULLNIG-GRADINGER, C. M., SZAKACS, G., KUBICEK, C. P., 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycol. Res. 106: 757-767.
- LABUDA, R., LABUDOVA, S., 2005. Species diversity of microscopic fungi in soil of Arboretum Mlýňany. In: Život v Pôde 5, ČZU Praha, pp. 99-108. (in Slovak)
- LEWIS, J. A., PAPAIVIZAS, G. C., 1987. Permeability changes in hyphae of *Rhizoctonia solani* induced by germling preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Phytopathology 77: 699-703.

- LIECKFELDT, E., SAMUELS, G. J., NIRENBERG, H. I., PETRINI, O., 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2418-2428.
- MICHRINA, J., MICHALÍKOVÁ, A., ROHÁČIK, T., KULICHOVÁ, R., 1995. Antibiosis as a possible mechanism of antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium culmorum*. *Ochrana Rostlin* 31(3): 177-184.
- RIFAI, M. A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 116: 1-56.
- SAMUELS, G. J., 1996. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- SAMUELS, G. J., PETRINI, O., KUHL, K., LIECKFELDT, E., KUBICEK, C. P., 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycol.* 41: 1-54.
- SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERI, E. L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: KUBICEK, C. P., HARMAN, G. E. (Eds.) *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor & Francis, London, pp. 139-191.
- THRANE, U., POULSEN, S. B., NIERENBERG, H. I., LIECKFELDT, E., 2001. Identification of *Trichoderma* strains by image analysis of HPLC chromatograms. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 249-255.

# Nově potvrzené výskyty padlí na okrasných rostlinách v České republice

ALEŠ LEBEDA, BARBORA MIESLEROVÁ, MICHAELA SEDLÁŘOVÁ, VLASTIMIL RYBKA, IRENA PETRŽELOVÁ, IVANA DOLEŽALOVÁ

## LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., SEDLÁŘOVÁ, M., RYBKA, V., PETRŽELOVÁ, I., DOLEŽALOVÁ, I.: New records of powdery mildew on ornamental plants in the Czech Republic.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 74-80. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The occurrence of powdery mildews on ornamental plants in the Czech Republic is very poorly documented. The findings of new powdery mildew species or till now unconfirmed occurrence are thus expected. During the summer and autumn of 1999, the symptoms of powdery mildew disease were first observed on *Pachypodium lamerei* Drake (family Apocynaceae) in the Czech Republic. Comparison of the morphology of this fungus on *Pachypodium lamerei* with all taxa of *Erysiphe* (*Uncinula*) shows that this taxon represents an undescribed species of *Erysiphe*. All known species with septate appendages (*Erysiphe* (*Uncinula*) *actinidiae*, *E. hydrangeae*, *E. necator*, *E. jaborosae*) (Braun, 1987, 1995) differ from this fungus on *P. lamerei* in having pigmented appendages and 4-8 spored asci and some additional deviating features. Therefore the fungus is described as a new species *Erysiphe pachypodii* Lebeda, Mieslerová & Doležalová, sp. nov. In summer 2005 in greenhouses of Botanical Garden in Prague (Prague-Troja) the powdery mildew symptoms on *Homalocladium platycladum* occurred. Although teleomorph stage was not found, the comparison of our results with previous reports of powdery mildew on representatives of family Polygonaceae and *Homalocladium platycladum* clearly demonstrated that this fungus resemble to *Erysiphe polygoni*. According to Braun (1995), occurrence of *Erysiphe polygoni* on *Homalocladium platycladum* (syn. *Muehlenbeckia platyclados*) was reported from Great Britain, Romania, Finland and former Soviet Union. Thus, this is the first report of *Erysiphe polygoni* on *Homalocladium platycladum* from the Czech Republic. During the summer 2007 in private garden in Smržice (district Prostějov) powdery mildew symptoms on *Caragana arborescens* were recorded. On family Fabaceae the occurrence of several powdery mildews is confirmed and they can be joined to two genera – *Erysiphe* and *Microsphaera* (*Erysiphe* sect. *Microsphaera*). In our case according to the features of the teleomorph stage fungus belongs to *Microsphaera* (*Erysiphe* sect. *Microsphaera*) (appendages are dichotomously branched). On the *Caragana arborescens* was described till now only one powdery mildew species – *Microsphaera palczewskii*, which has not been till now confirmed from the Czech Republic. Thus it is probably the first record of this species on *Caragana arborescens* in the Czech Republic.

Aleš Lebeda, Barbora Mieslerová, Michaela Sedlářová, Irena Petrželová, Ivana Doležalová, Palacký University in Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic. E-mail: [ales.lebeda@upol.cz](mailto:ales.lebeda@upol.cz)

Vlastimil Rybka, Botanical Garden Prague, Nádvorní 134, 171 00 Praha – Troja, Czech Republic.

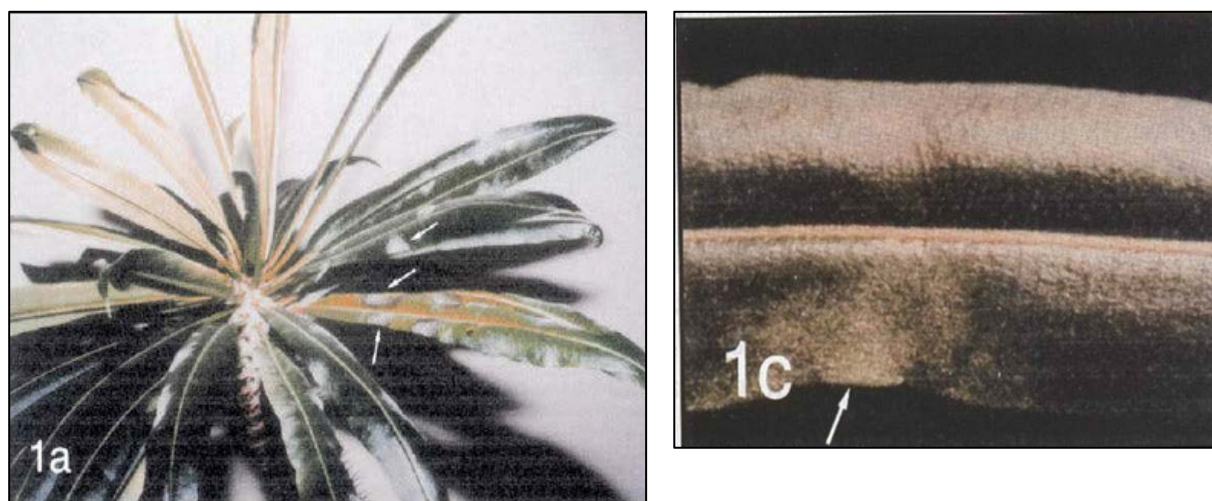
\* Presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## *Erysiphe pachypodii*, nový druh na *Pachypodium lamerei* (LEBEDA et al., 2002, 2005)

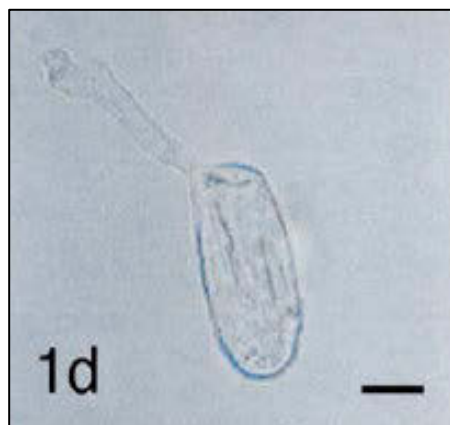
Během léta a podzimu roku 1999, byly poprvé pozorovány symptomy napadení padlím na *Pachypodium lamerei* Drake (čeleď Apocynaceae) v České republice. Bílé léze nepravidelného tvaru se objevily na okrajích listů a šířily se směrem k středové žilce listu často s následkem nekrotizace tkáně listu. Na infikovaných listech bylo pozorováno anamorfní i teleomorfní stadium houby. Do současné doby byl na rodu *Pachypodium* dokumentován výskyt pouze jednoho druhu padlí - *Erysiphe* (*Golovinomyces*) *orontii*. Avšak experimenty studující hostitelský okruh (LEBEDA et al., 2002) a mikroskopické pozorování nepotvrdily podobnost *G. orontii* (Euoidium typ anamorfy) s padlím na *Pachypodium lamerei* (Pseudoidium typ anamorfy). Circinální kleistoteciální přívěsky u studovaného padlí ho přiřazují daleko pravděpodobněji k rodu *Uncinula* (nyní *Erysiphe* sect. *Uncinula*). Srovnání morfologie druhu padlí nalezeného na *Pachypodium lamerei* se všemi druhy rodu *Erysiphe* (*Uncinula*) ukázal, že tento taxon představuje dosud nepopsaný druh rodu *Erysiphe*. Všechny známé druhy s dělenými přívěsky (apendixy) (*Erysiphe* (*Uncinula*) *actinidiae*, *E. hydrangeae*,

*E. necator*, *E. jaborosae*) (BRAUN, 1987; 1995) se odlišují od padlí na *P. lamerei* tím, že mají pigmentované přívěsky a vřecka obsahující 4-8 spor a některé další odlišnosti. Z těchto důvodů bylo padlí popsáno jako nový druh *Erysiphe pachypodii* Lebeda, Mieslerová & Doležalová, sp. nov. (LEBEDA et al., 2005).

Mycelium je povrchové, bílé, větvené, s hyfami 5-7  $\mu\text{m}$  v průměru, s cylindrickými konidii bez fibrosinových tělísek, délka 29,28-41,94  $\mu\text{m}$  (průměr 34,9  $\mu\text{m}$ ), šířka 8,76-13,56  $\mu\text{m}$  (průměr 11,43  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 2,33-4,3 (průměr 3,01), s klíčným vláknem rostoucím z konce konidie, často rozšířeném na konci, apresoria jsou mírně laločnatá až laločnatá. Konidiofory jsou vzpřímené, bazální buňky jsou následovány 1-2(-3) distálními buňkami (průměrný počet 1,7), uvolňovány jsou jednotlivě (*Pseudoidium* typ). Bazální buňky jsou rovné, s délkou mezi 24,4-56,68  $\mu\text{m}$  (průměr 37,03  $\mu\text{m}$ ) a šířkou mezi 6-9  $\mu\text{m}$  (průměr 7,35  $\mu\text{m}$ ). Celková délka konidioforů je mezi 56,12-95,16  $\mu\text{m}$  (průměr 74,31  $\mu\text{m}$ ). Průměr kleistothecií je mezi 68,6-112,7  $\mu\text{m}$  (průměr 91,48  $\mu\text{m}$ ); obsahují 3-8 vřecek; počet přívěsků je mezi 4-17 (průměr 8), členěné (2-4), bez zduřelé báze, hyalinní nebo světle hnědé na bázi, mycelioidní a někdy circinální na konci; circinální vrchol není rozšířený; délka mezi 166-441  $\mu\text{m}$  (průměr 302  $\mu\text{m}$ ) a šířka mezi 4,8-6  $\mu\text{m}$  (průměr 5,4  $\mu\text{m}$ ), 1,5-4 x dlouhé jako průměr kleistothece, tenkostěnné, pouze ztlustělé na bázi, hladké. Vřecka jsou krátce stopkatá s poměrem délka/šířka 1,37 (1,17-1,73), délka je mezi 46,36-63,44  $\mu\text{m}$  (průměr 52,01  $\mu\text{m}$ ) a šířka mezi 31,72-48,8  $\mu\text{m}$  (průměr 38  $\mu\text{m}$ ), s 2-5 askosporami (elipsoidního až ovoidního tvaru), délka mezi 18,3-20,7  $\mu\text{m}$  (průměr 19,5  $\mu\text{m}$ ), šířka mezi 7,3-9,7  $\mu\text{m}$  (průměr 8,5  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 2-2,6 (průměr 2,3).



**Obr. 1.** Příznaky napadení padlím na *Pachypodium lamerei* (1a, 1c)



Klíčící konidie *Erysiphe pachypodii* (1d)





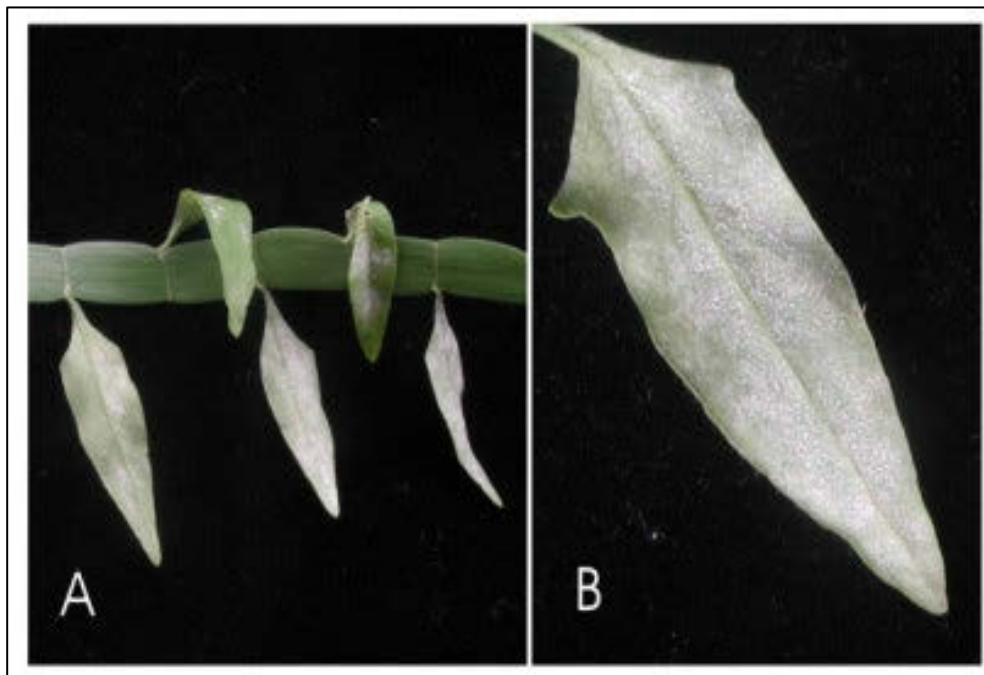
Kleistothecium (1f) a vřecko s askosporami (1g) *Erysiphe pachypodii*

### První výskyt padlí *Erysiphe polygoni* DC. na *Homalocladium platycladum* v České republice (LEBEDA et al., 2007)

*Homalocladium platycladum* (syn. *Muehlenbeckia platyclada*) má celosvětové rozšíření jako okrasná rostlina a v tropických oblastech je používána v parcích jako součást živých plotů; v Evropě je běžně používána jako hrnková květina. Začátkem března 2005 se ve sklenících (“Fata Morgana”) Botanické zahrady v Praze (Praha-Trója), objevily na *Homalocladium platycladum* symptomy napadení padlím a tyto se periodicky opakovaly. Symptomy byly bílé nepravidelné kolonie na svrchní a spodní straně listů; stonky byly bez symptomů (LEBEDA et al., 2007).

Anamorfní stadium bylo určeno jako *Oidium* subgen. *Pseudoidium*, což je nepohlavní stadium rodu *Erysiphe*. BRAUN (1995) popsal pouze jeden druh padlí na zástupcích čeledi Polygonaceae: *Erysiphe polygoni*. Ačkoliv teleomorfní stadium nebylo nalezeno, srovnání našich měření s předchozími zprávami o výskytu padlí na zástupcích čeledi Polygonaceae a *Homalocladium platycladum* jasně ukázalo, že tento druh náleží k druhu *Erysiphe polygoni* DC. V současnosti BRAUN (1995) uvádí hostitelský okruh *Erysiphe polygoni* omezený pouze na zástupce čeledi Polygonaceae (např. na rodech *Antigonum*, *Fagopyrum*, *Muehlenbeckia*, *Polygonum* s.l., *Rheum*, *Rumex*) v Evropě, Asii, Africe, Severní a Jižní Americe. Výskyt *E. polygoni* byl zaznamenán na *Homalocladium platycladum* z Velké Británie, Rumunska, Finska a dřívějšího Sovětského svazu (BRAUN, 1995). Patrně se tak jedná o první záznam výskytu tohoto druhu na *H. platycladum* z České republiky.

Mycelium je bílé, povrchové, větvené, s hyfami 5-6,5  $\mu\text{m}$  v průměru; konidie cylindrické, bez fibrosinových tělísek, délka 31,72-51,24  $\mu\text{m}$  (průměr 39,97  $\mu\text{m}$ ), šířka 10,98-15,86  $\mu\text{m}$  (průměr 13,39  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 2,16-4,2 (průměr 3,00), s klíčním vláknem rostoucím z konce konidie, často rozšířené na vrcholu a s apresorii mírně laločnatými až laločnatými. Konidiofory jsou vzpřímené, s bazální buňkou následovanou 2-3 distálními buňkami (průměr 2,44); konidie jsou tvořeny jednotlivě (*Pseudoidium* typ). Bazální buňky jsou rovné, s délkou mezi 29,28-48,8  $\mu\text{m}$  (průměr 36,11  $\mu\text{m}$ ), a šířkou mezi 7,32-8,54  $\mu\text{m}$  (průměr 7,66  $\mu\text{m}$ ). Celková délka konidioforů byla mezi 68,32-124,44  $\mu\text{m}$  (průměr 92,13  $\mu\text{m}$ ). Teleomorfní (pohlavní) stadium nebylo nalezeno.



**Obr. 2.** Listy *Homalocladium platycladum* infikované padlím. Celkový pohled (A) a detail (B)



**Obr. 3.** Konidiofory (A), konidie (B), a klíčící konidie (C), *Oidium* subgen. *Pseudoidium* (úsečka představuje 40  $\mu\text{m}$ ) na *Homalocladium platycladum*.

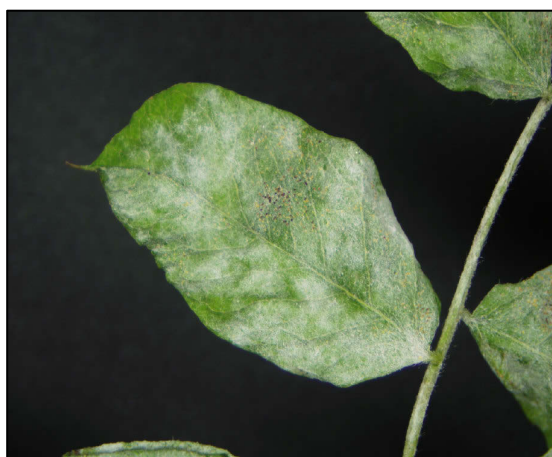
### **První výskyt padlí na čičišníku stromovitém (*Caragana arborescens*) v České republice**

V létě 2007 byly na soukromé zahradě ve Smržicích (okres Prostějov) nalezeny (A. Lebeda) listy čičišníku stromovitého (*Caragana arborescens* „Pendula“) napadené padlím, přičemž tento výskyt se již opakoval v několika posledních letech (LEBEDA, 2007, pers.

comm). Bílým sporulujícím myceliem byly kompletně pokryty listy ze svrchní i spodní strany. Na obou stranách listů byly nalezeny i kleistothecia. Na stejné zahradě bylo rovněž zaznamenáno slabé napadení na *C. arborescens* var. *Lorbergii* (A. Lebeda).

Na čeledi vikvovitých (Fabaceae) se vyskytuje několik druhů padlí, které lze zařadit podle charakteristiky pohlavního stadia (kleistothecií) do dvou rodů – *Erysiphe* a *Microsphaera* (*Erysiphe* sect. *Microsphaera*). V současnosti bylo na základě molekulárně – genetických výzkumů (MORI et al., 2000; BRAUN & TAKAMATSU, 2000) přehodnoceno vymezení rodů *Erysiphe* a *Microsphaera*, takže již není tak velký důraz kladen na znaky pohlavního stadia (v tomto případě větvení (dichotomické) přívěsků kleistothecií) a rod *Erysiphe* se vymezuje na základě znaků nepohlavního stadia, má tzv. Pseudoidium typ utváření konidioforů. V našem případě se podle znaků pohlavního stadia – dichotomicky větvené přívěsky - jedná o r. *Microsphaera* (*Erysiphe* sect. *Microsphaera*). Na druhu *Caragana arborescens* je popsán pouze jediný druh padlí – *Microsphaera palczewskii* (výskyt původně v Asii, pak zavlečen do Evropy - Německo, Polsko, Rumunsko, Švédsko, bývalý Sovětský svaz), z České republiky zatím nebyl potvrzen. Ze srovnání našich morfologických měření padlí na *Caragana arborescens* a charakteristiky *Microsphaera palczewskii* uvedené BRAUNEM (1995) vyplývá, že se jedná pravděpodobně o první záznam výskytu tohoto druhu z České republiky.

Mycelium je povrchové, bílé, větvené, s hyfami 5-7  $\mu\text{m}$  v průměru, s cylindrickými konidii bez fibrosinových tělísek, délka 20-37,5  $\mu\text{m}$  (průměr 27,9  $\mu\text{m}$ ), šířka 8,75-17,5  $\mu\text{m}$  (průměr 12,28  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 1,5-3,75 (průměr 2,29), s klíčním vláknem rostoucím z konce konidie, často rozšířeném na konci. Konidiofory jsou vzpřímené, bazální buňky jsou následovány 2-3 distálními buňkami (průměr 2,72), jsou uvolňovány po jedné (*Pseudoidium* typ). Bazální buňky jsou rovné, s délkou mezi 15-40  $\mu\text{m}$  (průměr 26,4  $\mu\text{m}$ ) a šířkou mezi 6-9  $\mu\text{m}$  (průměr 7,35  $\mu\text{m}$ ). Celková délka konidioforů je mezi 45-92,5  $\mu\text{m}$  (průměr 67,1  $\mu\text{m}$ ). Průměr kleistothecií je mezi 75,5-107,5  $\mu\text{m}$  (průměr 89,4  $\mu\text{m}$ ); obsahují 3-8 vřecek, krátce stopkatých; počet přívěsků je mezi 4-13 (průměr 8,7), bez zduřelé báze, hyalinní, mycelioidní a dichotomicky větvené na konci; délka mezi 180-330  $\mu\text{m}$  (průměr 244  $\mu\text{m}$ ), tenkostěnné, 2,7 x delší než průměr kleistothecia (1,8-3,2). Vřecka jsou krátce stopkatá, délka mezi 52,5-77,5  $\mu\text{m}$  (průměr 63,77  $\mu\text{m}$ ) a šířka mezi 29,25-42,5  $\mu\text{m}$  (průměr 33,32  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 1,9 (1,4-3,2); s 3-8 askosporami (elipsoidního až ovoidního tvaru), délka mezi 17,5-27,5  $\mu\text{m}$  (průměr 21,07  $\mu\text{m}$ ), šířka mezi 8,75-16,25  $\mu\text{m}$  (průměr 12,52  $\mu\text{m}$ ), index tvaru 1,16-2,11 (průměr 1,69).



Obr. 4. List *Caragana arborescens* infikovaný padlím.



Obr. 5. Konidiofory a kleistothecia *Microsphaera palczewskii*

## Poděkování

Předložená práce byla vypracována za podpory grantu MSM 6198959215.

## Přehled literatury

- BRAUN, U., 1987. A Monograph of the Erysiphales (Powdery Mildew). Nova Hedwigia 89 (suppl.), 700 p.
- BRAUN, U., 1995. The Powdery Mildews (Erysiphales) of Europe. Gustav Fischer-Verlag, Jena, Germany.
- BRAUN, U., TAKAMATSU, S., 2000. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences. Schlechtendalia 4: 1-33.
- LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., DOLEŽALOVÁ, I., 2002. The first record and characterization of powdery mildew (*Erysiphe pachypodiae* sp. nov.) on *Pachypodium lamerei* (Apocynaceae). J. Phytopath. 150: 149-154.
- LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., DOLEŽALOVÁ, I., 2005. *Erysiphe pachypodii* – a new species on *Pachypodium lamerei*. Mycotaxon 92: 285-287.
- LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., RYBKA, V., SEDLÁŘOVÁ, M., PETRŽELOVÁ, I., 2007. First record of powdery mildew on *Homalocladium platycladum* in the Czech Republic. Plant Pathol. 56: 722.
- MORI, Y., SATO, Y., TAKAMATSU, S., 2000. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. Mycologia 92: 74-93.

# Zajímavé nálezy hub z České a Slovenské republiky

ALENA NOVÁKOVÁ

## NOVÁKOVÁ, A.: Interesting records of fungi from Czech and Slovak Republics.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp.81-88. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Some microfungi (*Goidanichiella barronii*, *Truncatella angustata*, *Myxotrichum deflexum*, *M. chartarum*, *Penicillium vulpinum*, *P. cf. glandicola*, *Pidoplitchkoviella terricola*, *Zygosporium mycophilum*, *Coemansia cf. aciculifera*, *Gymnoascus reesii*) isolated from various substrates from Czech and Slovak Republics are presented. These microfungi are interesting in the point of view of their morphological character and of a substrate from which they were isolated, too.

**Keywords:** microfungi, Czech and Slovak Republics

Alena Nováková, Institute of Soil Biology, Biology Centre AS CR, v.v.i., České Budějovice, Czech Republic. E-mail: [alena@upb.cas.cz](mailto:alena@upb.cas.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Při studium saprotrofních mikromycetů z různých substrátů (půdy, exkrementy živočichů, jeskynní ovzduší a sediment, apod.) České a Slovenské republiky byly izolovány některé velice zajímavé druhy mikromycetů. Jedná se jak o první nálezy těchto druhů na našem území či území Slovenské republiky, tak i o izolace druhů, které jsou určitým způsobem zajímavé (svou morfologií, typem substrátu, ze kterého byly izolovány, frekvencí izolace apod.)

Tato práce uvádí některé tyto druhy mikroskopických hub s údaji o jejich výskytu, typu substrátu, makro- a mikromorfologických vlastnostech a srovnání s literárními údaji.

### ***Truncatella angustata* (Pers.) S. Hughes (Obr. 1)**

Tento druh patří mezi několik málo melankoniálních hub (pomocný řád Melanconiales, pomocná třída Coelomycetes), které vytvářejí acervulus i při kultivaci na Petriho miskách. Přestože se jedná o fytopatogenní druh, vyskytující se v různých půdách po celém světě, bývá v literatuře uváděn z tohoto prostředí s nízkou frekvencí (BARRON, 1968). Autorka naopak zjistila, že jeho výskyt v půdách ČR (a zřejmě v celosvětovém měřítku) je zřejmě mnohem vyšší, ale vzhledem k tomu, že ke konidiogenezi většinou dochází až po dlouhé době kultivace, mnohdy až po několika týdnech, většina izolátů je zřejmě zařazena mezi *Mycelia sterilia*.

### ***Gymnoascus reesii* Baran. (Obr. 2)**

*G. reesii* byl izolován z jeskynního sedimentu jeskyně Domica. Tento zástupce čeledi Gymnoascaceae (řád Trichocomatales ?) byl rovněž izolován pomocí zředovací metody z jeskynního sedimentu Zellerovou (ZELLER, 1962) z jeskyně Baradla, jeskynní systém Domica – Baradla.

### ***Zygosporium mycophilum* (Vuil.) Sacc. (Obr. 3)**

Tento druh byl izolován v roce 2005 z ovzduší Jeskyně na Turoldu. *Z. mycophilum* bylo dosud izolováno převážně z rostlinného materiálu (CBS Filamentous Fungi database, Ellis, 1971), ale i z ovzduší (CBS Filamentous Fungi database). Z území České republiky je tato houba uváděna HOLUBOVOU-JECHOVOU (1990) ze zahnívajícího jablka napadeného botrytidou a z ovzduší v Praze (KUBÁTOVÁ et al., 2003).

#### ***Tetracoccosporium paxianum* Szabó (Obr. 4)**

Výskyt konidií *T. paxianum* byl nejprve pozorován v mikroskopických preparátech připravených z odebraných vzorků netopýřího guana a dropinek a posléze bylo opakovaně izolováno jak z netopýřího guana, ale i z dalších substrátů (exkrementy stejnonožců a žížal, jeskynní sediment) z několika jeskyní NP Slovenský kras. Jeho opakované izolace ukazují na určitou vazbu na jeskynní substráty, zvláště na netopýří guano. Doposud byl znám jediný publikovaný nález (ŠIMONVIČOVÁ, 2007) – tento druh izoloval BERNÁT (1954) z lesních půd (*Fagus sylvatica*, *Carpinus betulus*). ELLIS (1971) udává výskyt v půdě a na exkrementech.

#### ***Goidanichiella barronii* W. Gams, Steiman & Seigle-Murandi (Obr. 5)**

*G. barronii* byla izolována z půdy staré paseky ve smrkovém porostu (*Picea abies*) na území NP Šumava (v oblasti Studené hory). Tento druh patří mezi méně často izolované druhy mikromycetů – dosud je známo jen několik málo údajů o izolaci (GAMS et al., 1990), CBS Filamentous Fungi database).

#### ***Pidoplitchkoviella terricola* Kirilenko (Obr. 6)**

Tento druh byl izolován v roce 2002 z exkrementů žížal, odebraných na krápníkové stěně v boční chodbě u Japonské čajovny v jeskyni Domica (NP Slovenský kras, Slovenská republika). Jedná se o druhý nález této houby v celosvětovém měřítku. *P. terricola* byla izolována a popsána Kirilenkem (ARX et al., 1988) z rhizosféry *Quercus ruber* na Ukrajině.

#### ***Myxotrichum deflexum* Berk. (Obr. 7)**

Tento druh byl opakovaně izolován pomocí zředovací metody z exkrementů stejnonožců a žížal a z jeskynního sedimentu jeskyně Domica (NP Slovenský kras). Z našeho území byl tento druh izolován z ovzduší Zbrašovských aragonitových jeskyní (BOSÁK et al., 2001). ZELLER (1964) mezi keratinofilními houbami izolovanými pomocí keratin bait-technique z jeskyně Baradla (Maďarsko, součást jeskynního systému Domica-Baradla) uvádí i *M. deflexum* (izolace z netopýřího guana). CURRAH (198x) naopak uvádí, že zástupci čeledi Myxotrichaceae (řád Onygenales) patří mezi celulolytické houby, zatímco zástupci ostatních čeledí tohoto řádu představují keratinofilní a keratinolytické druhy.

#### ***Myxotrichum chartarum* Kunze (Obr. 8)**

*M. chartarum* bylo izolováno tmavého nárostu na stěně ve sklepním prostoru rodinného domku v Českých Budějovicích. Dosud byl tento druh z našeho území zjištěn při studiu deteriorizace textilií v rakvích (mumie, Brno a šaty sv. Ludmily, Pražský hrad) (NOVOTNÝ –

ústní sdělení). CURRAH (1985) uvádí mezi studovanými kmeny i dva izoláty z papíru z bývalého Československa bez bližších informací. Tento zástupce řádu Onygenales (čeleď Myxotrichaceae) je charakteristický helikálními výrůstky na askokarpu a zřejmě celulólytickou aktivitou.

#### ***Penicillium cf. glandicola* (Oud.) Seifert & Samson (Obr. 9, 10)**

Tato houba je již několik let opakovaně izolována z exkrementů kuny v jeskyni Domica a její vazba na exkrementy živočichů je více než zřejmá. Dále byla opakovaně izolována z netopýřího guana (Domica, Čertova díra, Hrušovská jeskyně, Ardovská jeskyně), ale i z ovzduší těchto jeskyní. Konidiofór je výrazně drsný a typem větvení velice připomíná *P. glandicola*, ale izolované kmeny tvoří poměrně výrazná prstovitá synnemata a tím se od *P. glandicola* výrazně liší. FRISVAD & SAMSON (2004) řadí všechna penicilia ze série Claviformia mezi koprofilní druhy.

#### ***Penicillium vulpinum* (Cooke & Masee) Seifert & Samson (Obr. 11)**

*P. vulpinum* bylo opakovaně izolováno z bílých vatičkovitých koloniích na kuních exkrementech či na jeskynním sedimentu v místech, kde se dříve exkrementy kuny nebo možná i plcha vyskytovaly (Gombasecká jeskyně, Ardovská jeskyně, Šingliarova propast), ale bylo izolováno také z mrtvých těl pavouků na stěnách vstupní chodby Gombasecké jeskyně. Jeho vazba na exkrementy je všeobecně známa (FRISVAD & SAMSON, 2004).

#### ***Coemansia cf. aciculifera* Linder (Obr. 12)**

Tuto houbu se bohužel nepodařilo izolovat - byla pozorována pouze v mikroskopických preparátech připravených z odebraných kolonií. Světle žluté vatičkovité kolonie byly nalezeny na čerstvém netopýřím guanu v Sieni terás v jeskyni Domica v říjnu 2005. Vazba tohoto druhu na netopýří guano je známa i z literárních údajů (KENDRICK, 2002). HO & HSU (2004) uvádějí výskyt pŕdách v Japonska, Litvy, Taiwanu a ve Spojeném království. Z České republiky je známa izolace z ovzduší Punkevní jeskyně (Moravský kras) (BOSÁK et al., 2001) a byla zjištěna na odkališti Chvaletice (KUBÁTOVÁ et al., 2002).

#### ***Trichoderma polysporum* (Link: Fr.) Rifai (Obr. 13)**

Výskyt tohoto druhu rodu *Trichoderma* byl v jeskyních zaznamenán jako bílé pustulky narostlé na netopýřích dropinkách. Na základě mikroskopických pozorování preparátů zhotovených z těchto pustulek byla zjištěna pravá totožnost této houby, i když její izolace se zatím nepodařila. Tento druh s celosvětovým rozšířením v různých typech pŕd nebyl dosud z netopýřího trusu uváděn, znám je údaj z exkrementů žízal a sovích vývržků (DOMSCH et al. 1980). Tento druh byl ve sledovaných jeskyních zjištěn jak v ovzduší, tak i v jeskynním sedimentu. Z ovzduší Punkevní jeskyně uvádějí tento druh také BOSÁK et al. (2001).

#### **Poděkování**

Práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB (No. AV0Z60660521). Zvláštní poděkování patří Měšťanskému pivovaru České Budějovice za dlouholeté bezplatné



poskytování sladiny pro přípravu sladinového agaru. Pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie PaÚ BC AV ČR děkuji za přípravu preparátů a pomoc při mikroskopování.

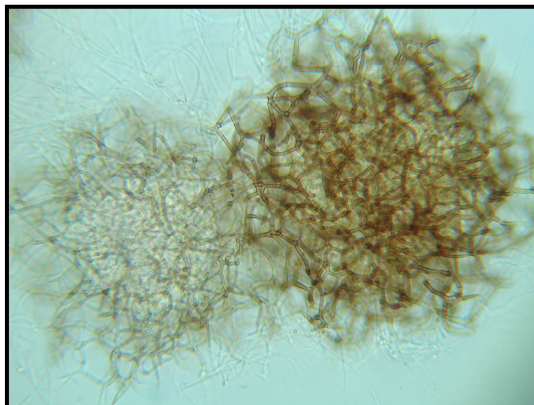
## Přehled literatury

- VON ARX, J. A., FIGUERAS, M. J., GUARRO, J., 1988. Sordariaceous Ascomycetes without Ascospore Ejaculation. J. Cramer, Berlin & Stuttgart, 104 p.
- BARRON, G. L., 1968. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Baltimore, 364 p.
- BERNÁT, J., 1954. Mykoflóra lesních půd. Preslia 26: 277-284.
2001. Czech Republic. In: Jubertie, C., Decu, C. (Eds.), Encyclopaedia Biospéléologica, Tom III, pp. 1405-1426.
- BOSÁK, P., VAŠÁTKO, J., CÍLEK, V., DUMNICKA, E., HANULÁKOVÁ, D., HORÁČEK, I., JENÍK, J., KOPEČKÝ, J., MARVANOVÁ, L., MLEJNEK, R., RŮŽIČKA, J., ZACHARDA, M., 2001. Czech Republic. In: JUBERTIE, C., DECU, C. (Eds.), Encyclopaedia Biospéléologica, Tom III, Moulis – Bucarest, pp. 1405-1426.
- CBS Filamentous fungi database, 2007. <http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>
- CURRAH, R. S., 1985. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. Mycotaxon 24: 1-216.
- DOMSH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. London etc., 859 p.
- ELLIS, M. B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B., Kew, 608 p.
- FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins In: SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C. (Eds.), *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: New Taxonomic Schemes and Mycotoxins and Other Extrolites. Stud. Mycol. 49, pp. 1-168.
- GAMS, W., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F., 1990. The hyphomycete genus *Goidanichiella*. Mycotaxon 28: 149-159.
- HO, H.-M., HSU, C.-H., 2005. The merosporangiferous fungi from Taiwan (V): Two new records of *Coemansia* (Kickxellaceae, Kickxellales, Zygomycetes). Taiwania 50(1): 22-28.
- KENDRICK, B., 2002. The Fifth Kingdom. - <http://www.mycolog.com/fifhtoc.html>
- KUBÁTOVÁ, A., PRÁŠIL, K., VÁŇOVÁ, M., 2002. Diversity of soil microscopic fungi on abandoned industrial deposits. Cryptogamie, Mycologie 23 (3): 205-219.
- KUBÁTOVÁ, A., VÁŇOVÁ, M., PRÁŠIL, K., 2003. CCF catalogue of filamentous fungi. 5<sup>th</sup> ed. Nov. Bot. Univ. Carol. 16: 7-137 p.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., (2007). Soil microscopic fungi II. a supplement to the checklist of non-vascular and vascular plants of Slovakia - Part Fungi. Phytopedon (in press)
- ZELLER, L., 1962. Gymnoascaceae from the Aggtelek cave „Baradla“. (Biospeologica Hungarica XVI.) Ann. Univ. Sci. Budapest, Sect. Biol. 5: 273-280.
- ZELLER, L., 1966. Keratinophilic fungi from the „Baradla“ cave in Aggtelek. (Biospeologica Hungarica XXII.) Ann. Univ. Sci. Budapest, Sect. Biol. 8: 375-388.

## Přílohy



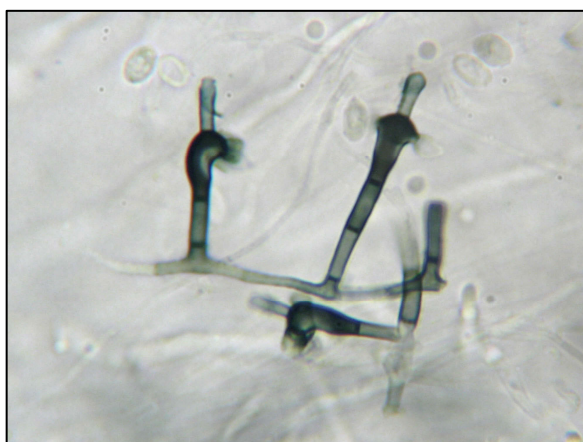
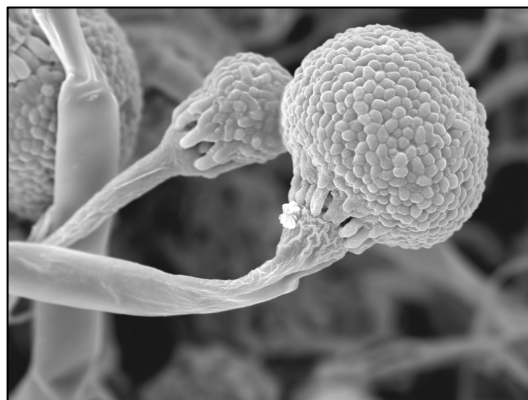
**Obr. 1.** *Truncatella angustata*, acervulus a 4buněčné konidie



**Obr. 2.** *Gymnoascus reesii* - ascokarpy (zvětšení 12,5 x 20)



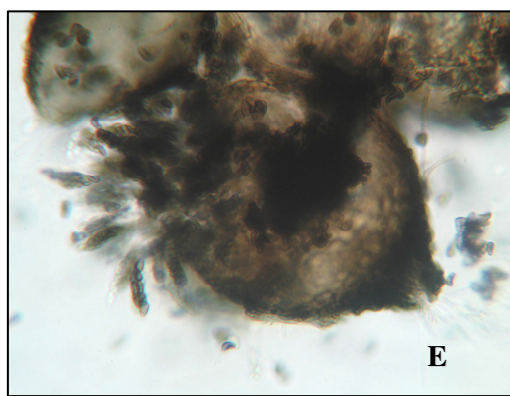
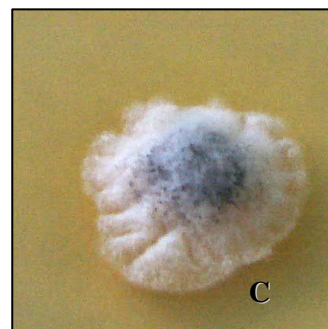
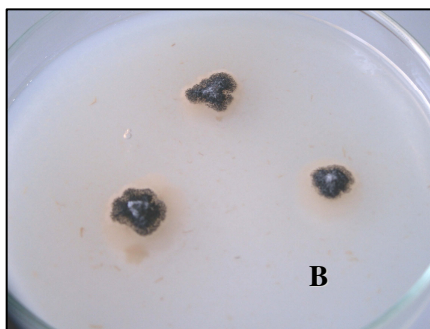
**Obr. 3.** *Goidanichiella barronii* - A - konidiofor a konidie, B - vesikulus s fialidami a masou konidií (SEM)



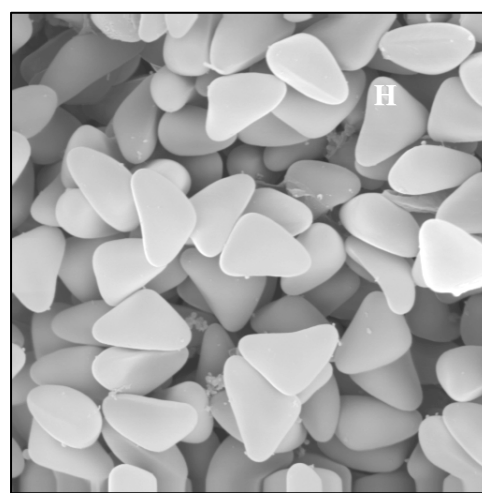
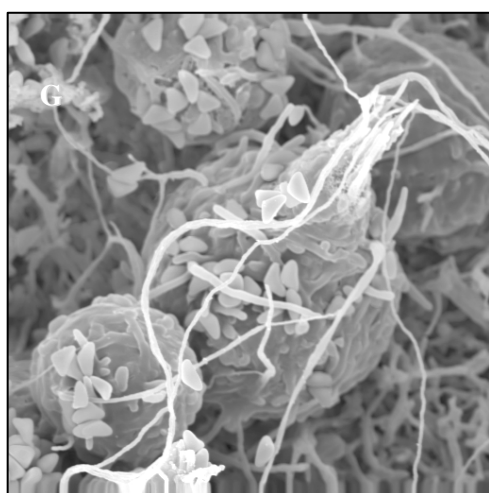
**Obr. 4.** *Zygosporium mycophilum* - konidiofor s konidiogenními buňkami a hyalinními konidii (zvětšení 12,5 x 40)

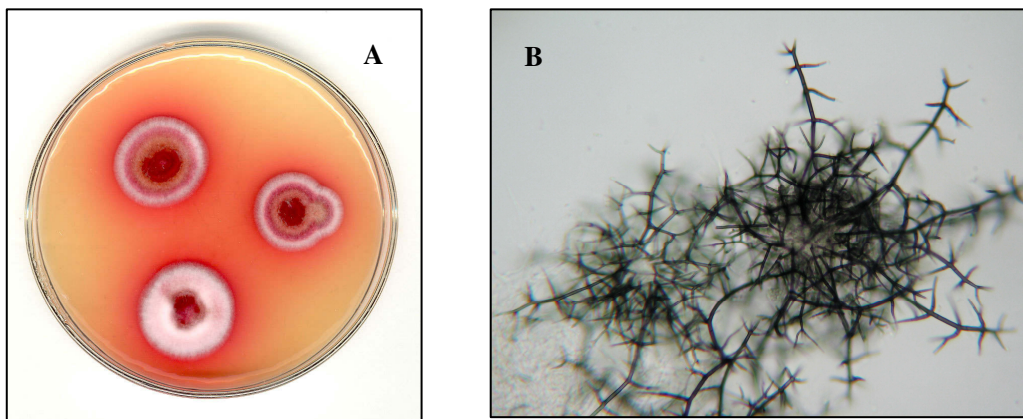
**Obr. 5.** *Tetracosporium paxianum* - konidiogenní buňky a konidie (zvětšení 12,5 x 40)



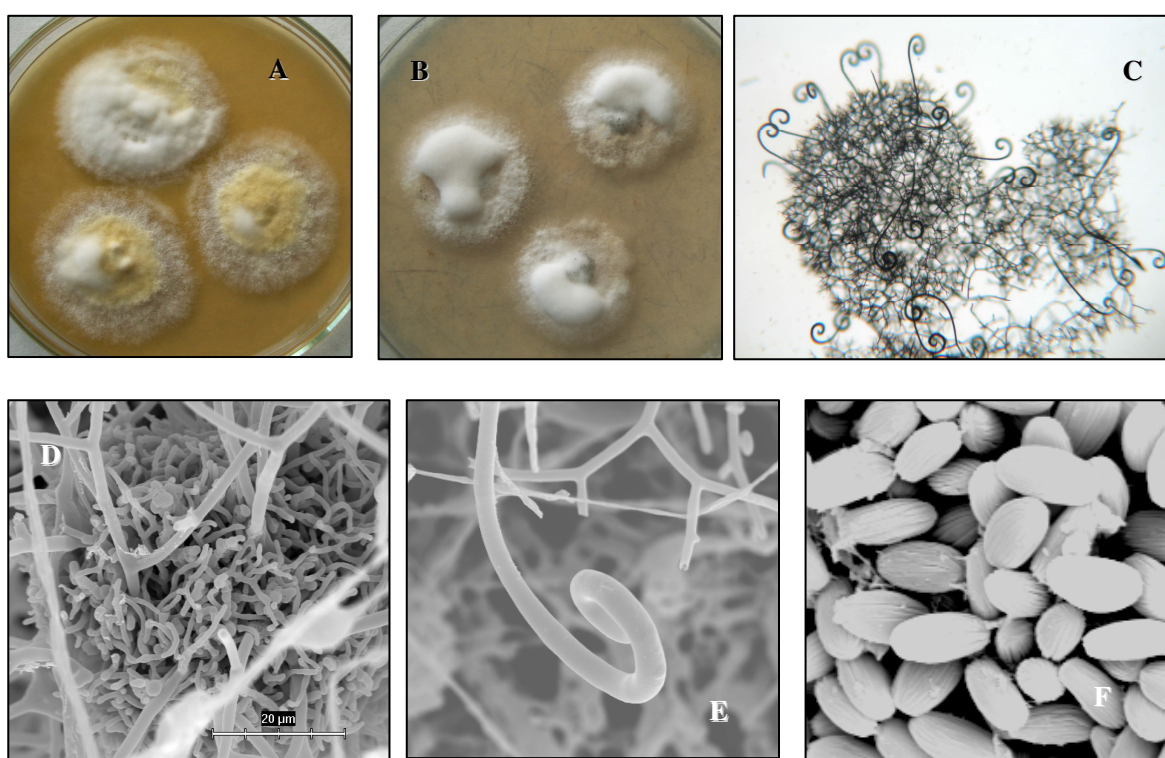


**Obr. 6.** *Pidoplitchkoviella terricola* - **A, B** - 10denní kolonie na PDA a CA, **C** - 30 denní kolonie na PDA, **D, E** - plodničky a věčka, **F** - triangulární askospory, **G** - plodničky (SEM), **H** - askospory (SEM)





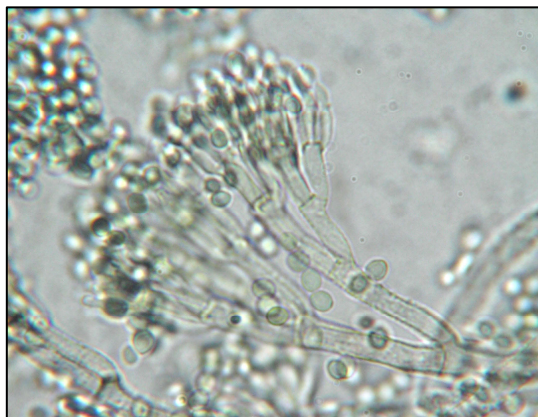
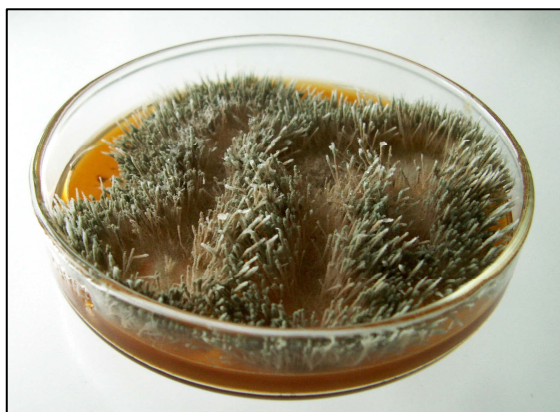
**Obr. 7.** *Myxotrichum deflexum* – **A** - 14denní kolonie (PDA), **B** - plodničky s větvenými výrůstky



**Obr. 8.** *Myxotrichum chartarum* - **A, B** - 3týdenní kolonie na sladínovém a mrkvovém agaru, **C** - ascoma s výrůstky, **D** - povrch plodničky (SEM), **E** - helikální výrůstek (SEM), **F**- askospory (SEM)

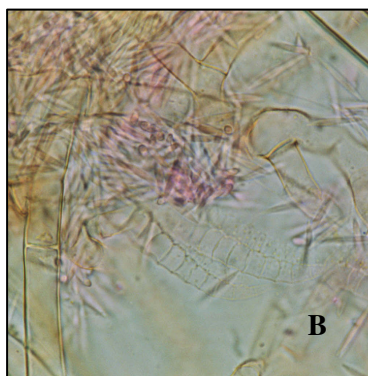
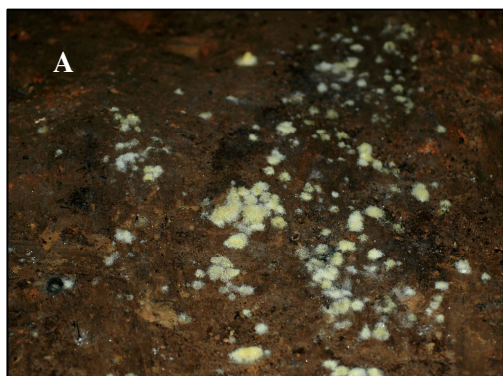
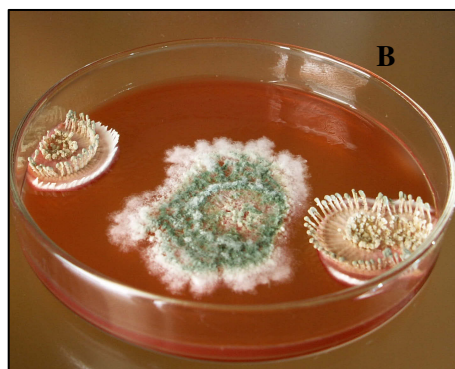
**Obr. 9.** Porostlé kuní exkrementy na krápníkové výzdobě v chodbě, jeskyně Domica



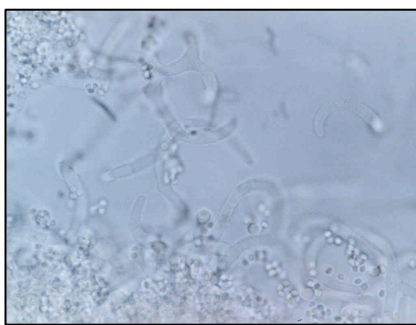
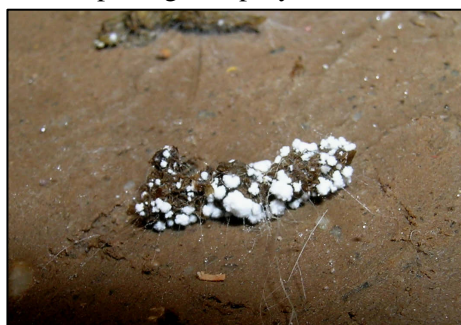


**Obr. 10.** *Penicillium cf. glandicola* – **A** – kolonie na sladínovém agaru, **B** – konidiofór s konidiemi

**Obr. 11.**  
*Penicillium vulpinum* – **A** – vatičkovitá kolonie na kuním exkrementu, **B** – kolonie na SEA (zřed'ovací metoda izolace)



**Obr. 12.** *Coemansia cf. aciculifera* - **A** - kolonie na netopýřím guanu (jeskyně Domica), **B, C** – merosporangia a spory



**Obr. 13.**  
*Trichoderma polysporum* – kolonie na netopýří dropince (Foto J. Stankovič) a konidiofory (mikroskopický preparát z dropinek)

## Vyskytuje se *Histoplasma capsulatum* v jeskyních střední Evropy?

ALENA NOVÁKOVÁ & ALICA CHROŇÁKOVÁ

### NOVÁKOVÁ, A., CHROŇÁKOVÁ, A.: Does *Histoplasma capsulatum* occur in caves of middle Europe?

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp.89-96. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

During studies of micromycetes in several caves (Slovakia - NP Slovak Karst, Czech Republic), white-yellow to yellow coloured microfungus colonies on bat droppings are observed. Tuberculate conidia were estimated in microscopic slides prepared from these colonies. These conidia reminded with their size, shape, surface structures and type of conidiogenesis pathogenous micromycete fungus *Histoplasma capsulatum*. This micromycete species occurs on bat guano in warmer regions of the world. In Europe, this fungus was recorded from Italian caves and soils and it was also reported from Romania, but without the evidence of thermal dimorphism. After repeatedly isolations, two strains of this fungus were isolated from Slovak caves (Domica Cave and Jasovská Cave). Tests of pathogenity (intranasal and intraperitoneal application to SCID mice) and of the evidence of thermal dimorphism were negative. DNA analysis indicated the affinity to several microfungus species (*Coccidiomyces posadasii*, *Auxarthron californiense*, *Ajellomyces dermatidis* and *Chrysosporium keratinophilum*), but these species are in the point of view of their morphological characteristics quite dissimilar, and no affinity was found to *Renispora flavissima* which is also known from bat guano. The macromorphological characters were also found dissimilar to literature records about this fungus.

**Keywords:** bat guano, caves, Czech and Slovak Republics, tuberculate conidia, *Histoplasma capsulatum*

Alena Nováková, Institute of Soil Biology BC AS CR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. E-mail: [alena@upb.cas.cz](mailto:alena@upb.cas.cz)

Alica Chroňáková, Institute of Soil Biology BC AS CR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice and Faculty of Sciences, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic. E-mail: [alicach@upb.cas.cz](mailto:alicach@upb.cas.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

V průběhu posledních několika let byly při studiu mikroskopických hub v jeskyních s výskytem netopýřího guana v NP Slovenský kras (Domica, Domica-Čertova díra, Ardovská jeskyně a Jasovská jeskyně) i v jeskyních České republiky (Chýnovská jeskyně, Jeskyně Na Turoldu, Javoříčské jeskyně) pozorovány bílo-žluté až žluté kolonie mikroskopických hub na netopýřích dropinkách. Tyto kolonie se však nedařilo izolovat a to i při použití několika izolačních metod a různých izolačních médií. V mikroskopických preparátech však byly pozorovány tuberkulární konidie, které svými rozměry, tvarem, povrchovou strukturou, ale i typem konidiogeneze velice připomínaly makrokonidie patogenního druhu *Histoplasma capsulatum*, původce závažného onemocnění. Výskyt této houby na netopýřím guanu je znám z jeskyní celé řady zemí světa, ale z temperátní zóny zatím nebyly žádné údaje o jejím výskytu publikovány – pouze WHO uvádí na svých webových stránkách upozornění pro turisty při návštěvě jeskyní včetně evropských zemí zahrnující také Velkou Británii, Norsko, země bývalého SSSR, Rakousko, Maďarsko a Irsko. Stejně upozornění uvádějí i FRIDKIN & PARK, 2007). Dosud zaznamenané údaje o výskytu *H. capsulatum* v Evropě ( FARINA et. al., 2005) jsou z půd Itálie, Albánie, Rakouska, Francie, Spojeného království, Maďarska, Portugalska, Rumunska, Švýcarska, Turecka a Ruska (autochtonní případy onemocnění) a z rumunských jeskyní (Cave-Associated Disease Database) – zde izolát s odpovídajícími morfologickými znaky, ale bez prokázaného teplotního dimorfismu (MANTOVANI, 1972). Teplotní podmínky sledovaných jeskyní České a Slovenské republiky (8– 11 °C) však představují zcela nevhodnou teplotu pro růst tohoto druhu (teplotní růstové optimum je 25 °C).

Je známo, že *H. capsulatum* je možné zaměnit s jinými druhy mikroskopických hub, které také vytvářejí podobné konidie, zvláště s některými druhy rodů *Sepedonium* (vytváří většinou spinózní makrokonidie, ale mikrokonidie typu fialospor) a *Chrysosporium* (nevytváří mikrokonidie) (CBS Filamentos Database, DE HOOG et al., 2005, DOMSCH et al., 1980, BARRON, 19668). Tyto druhy se liší jak svými makromorfologickými znaky, tak mikromorfologií a dále schopností růstu při vyšších teplotách kultivace. Dalším druhem, který vytváří také tuberkulární konidie a rovněž roste na netopýřím guanu je *Renispora flavissima* (SIGLER et al., 1979). V roce 2005 bylo popsáno nový druh rodu *Chrysosporium*, který také vytváří velké tuberkulární konidie a byl izolován ze srsti netopýřů (BENGUIN et al., 2005)

V roce 2006 se konečně podařilo tuto houbu izolovat (kmen G14-6 z jeskyně Domica – Čertova díra, NP Slovenský kras) a byla kultivována na různých médiích (Sabouraudův agar, DSA, OAT, sladivový agar) i při různých teplotách (25 a 37 °C), byla testována její schopnost rozkládat keratin, dále byly připraveny preparáty pro SEM a uskutečněny testy infekčnosti (ty provedl dr. O. Ditrich z PaÚ BC AV ČR, v.v.i. intranasální a intraperitoneální aplikací spor SCID myším). Kultivací v tekutém Sabouraudově médiu bylo získáno mycelium pro izolaci DNA a následně byla provedena sekvenace hypervariabilní oblasti SSU – ITS – LSU rDNA oblasti a porovnání získané sekvence s volně dostupnými v databázi GenBank. Výsledky těchto testů a pozorování však neprokázaly ani schopnost růstu při vyšší teplotě a ani teplotní dimorfismus (tj. přechod v kvasinkovitý růst při teplotě 37 °C), keratinolytickou schopnost, ani schopnost vyvolat onemocnění u testovaných laboratorních myší. Snímky z SEM ukazují podobnost povrchové struktury konidií jak s *H. capsulatum*, tak s *Renispora flavissima* – tj. s keratofilním druhem, jehož teplotní růstové minimum je obdobně jako u *H. capsulatum* 20 °C (CBS Filamentous Fungi database, CURRAH, 1985, SIGLER et al., 1979).

Kmeny byly porovnány také s nověji popsaným druhem *Chrysosporium chiropterorum*, který je rovněž charakterizován tvorbou tuberkulárních konidií – ty jsou ale mnohem větších rozměrů než u našeho kmene a kolonie jsou převážně růžové, zatímco náš kmen vytváří krémově bílé až žlutavé kolonie. Sekvenováním se ukázala určitá příbuznost s několika druhy mikromycetů (*Coccidiomyces possadasii*, *Auxarthron californiense*, *Ajellomyces dermatidis* a *Chrysosporium keratinophilum*). Tyto druhy se však odlišují od izolovaného kmene svými mikro- i makromorfologickými charakteristikami. Příbuznost s *H. capsulatum* ani s *R. flavissima* se analýzou DNA neprokázala.

## Závěr

Na základě uskutečněných testů a analýz je možné konstatovat, že izolované kmeny není možné ztotožnit s *Histoplasma capsulatum*, ale ani s *Renispora flavissima* nebo *Chrysosporium chiropterorum*, a pro jejich identifikaci bude nezbytné uskutečnit další analýzy.

Výsledky této studie budou podrobně publikovány ve sborníku z konference Výskum, využívanie a ochrana jaskýň (Ždiar, 1. – 5. 10. 2007).

## Poděkování

Práce byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB (No. AV0Z60660521) a projektem MŠMT (LC06066). Poděkování patří Měšťanskému pivovaru České Budějovice za poskytnutí sladiny pro přípravu sladivového agaru. Pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie PaÚ BC AV ČR děkuji za přípravu preparátů a pomoc při mikroskopování. Zvláštní poděkování patří dr. Olegu Ditrichovi za provedení testu infekčnosti.

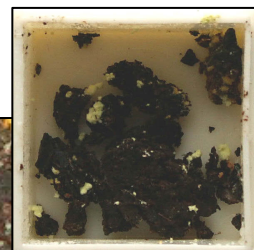
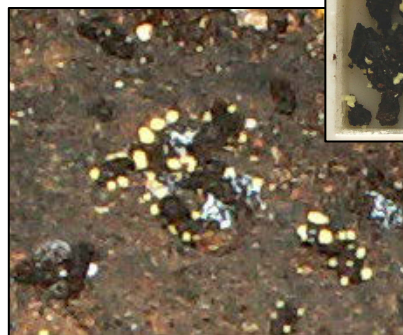
## Přehled literatury

- BARRON, G. L., 1968. The Genera of Hyphomycetes from Soil. Baltimore, 364 p.
- BEGUIN, H., LARCHER, G., NOLARD, N., CHABASSE, D., 2005. *Chrysosporium chiropteroorum* sp. nov., isolated in France, resembling *Chrysosporium* state of *Ajellomyces capsulatus* (*Histoplasma capsulatum*). Med. Mycol. 43(2): 161-169.
- Cave-Associated Disease Database – [http://www.latech.edu/tech/education/cavedis/cave-disease-table2\\_1.html](http://www.latech.edu/tech/education/cavedis/cave-disease-table2_1.html)
- CBS Filamentous fungi database, 2007. <http://www.cbs.knaw.nl/databases/index.htm>
- CURRAH, R. S., 1985. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. Mycotaxon 24: 1-216.
- DOMSH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. London etc., 859 p.
- FARINA, C., RIZZI, M., RICCI, L., GABBI, E., CALIGARIS, S., GOGGIO, A., 2005. Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. Rev. Iberoam. Micol. 22: 169-171.
- FRIDKIN, S., PARK, B., 2007. Prevention of specific infectious Diseases. In: Traveler's Health: Yellow Book. CDC Health Information for International Travel 2008. - <http://wwwn.cdc.gov/travel.aspx>
- DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J., 2005. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> ed., Utrecht & Reus, 1126 p.
- [http://www.medicalhealthcareinfo.com/content/Positive\\_histoplasmin\\_skin\\_tes3.php](http://www.medicalhealthcareinfo.com/content/Positive_histoplasmin_skin_tes3.php)
- <http://www.medicalhealthcareinfo.com/categories/Fungi>
- <http://www.mycology on-line>
- <http://www.miravistalabs.com>
- MANTOVANI, A., 1972. Histoplasmosis in Europe. Ann. Soc. belge Méd. trop. 52: 421- 434.
- SIEGLER, L., GAUR, P. K., LICHTWARD, R. W., CARMICHAEL, J. W., 1979. *Renispora flavissima*, a new gymnoascaceous fungus with tuberculate *Chrysosporium* conidia. Mycotaxon 10: 133-141.





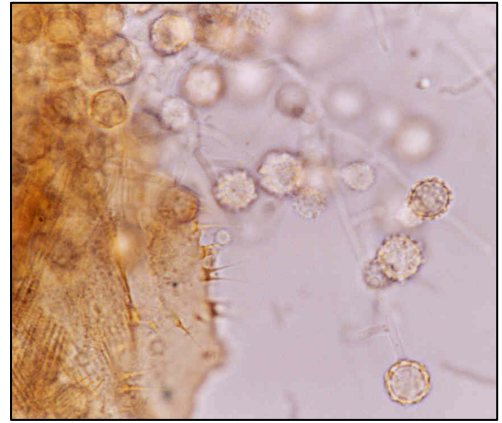
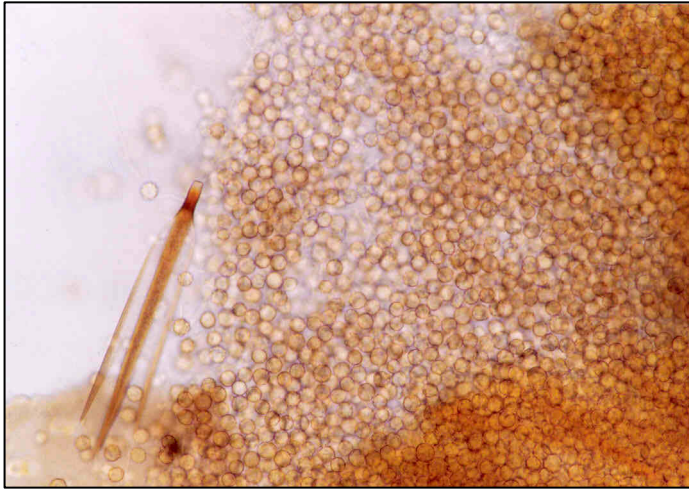
Jeskyně Domica : **A** – guanový hrnec, **B** – detail houbového nárůstu, **C** – kupka netopýřích dropinek na chodníku.



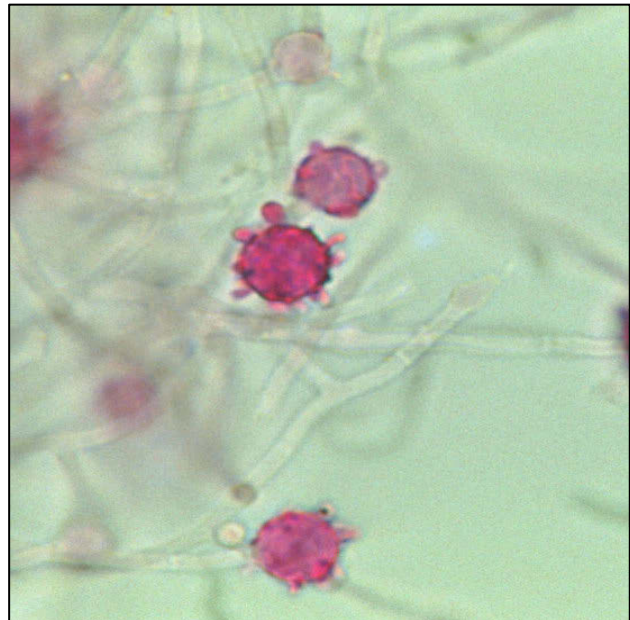
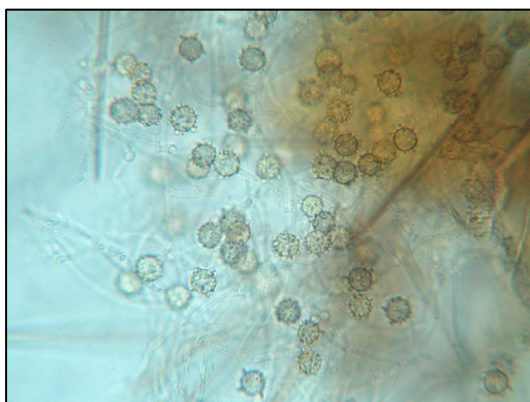
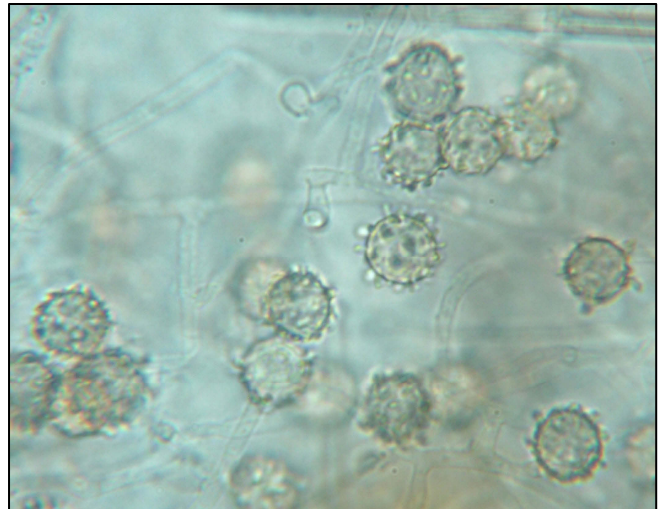
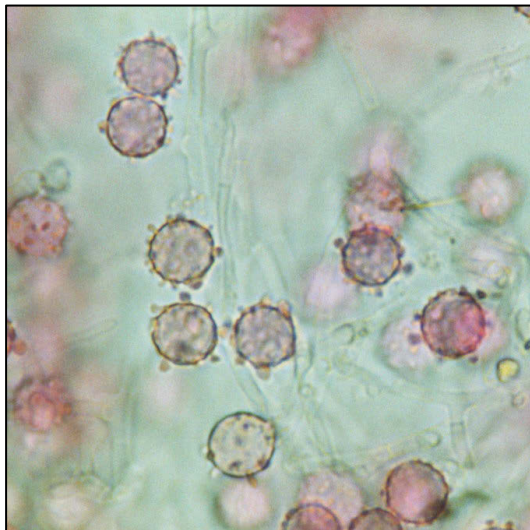
Jasovská jeskyně: **A** - netopýří exkrementy s žlutými koloniemi, **B, C** - detail

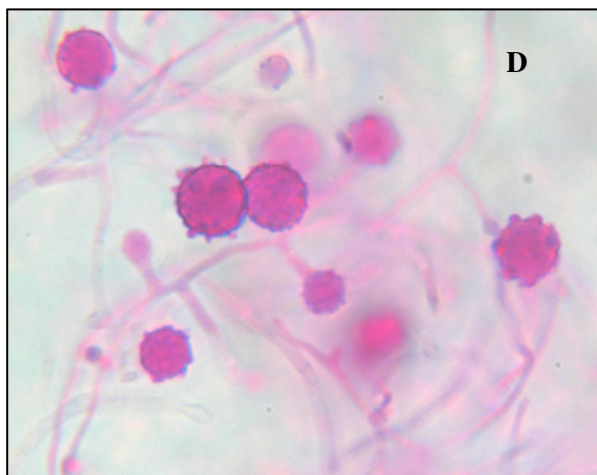
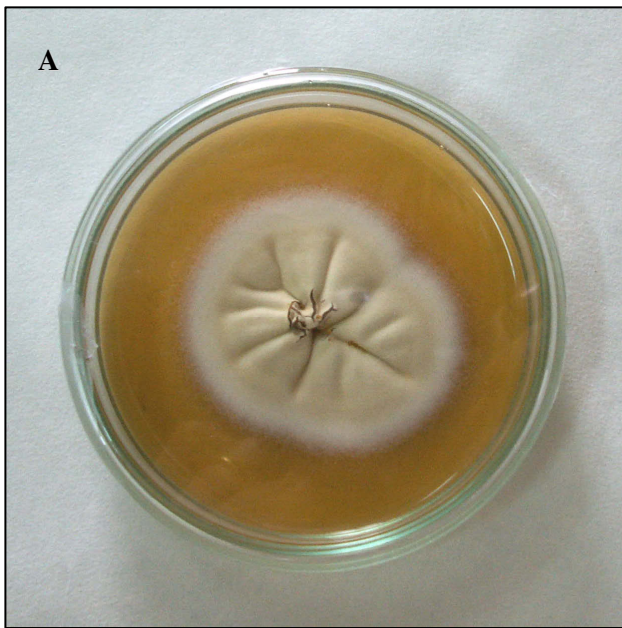


Ardovská jeskyně – guanová kupka s žlutými koloniemi



Tuberkulární konidie – mikroskopické preparáty ze žlutých kolonií na netopýřích dropinkách



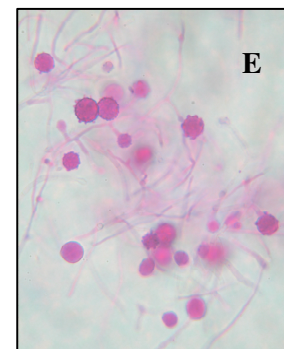
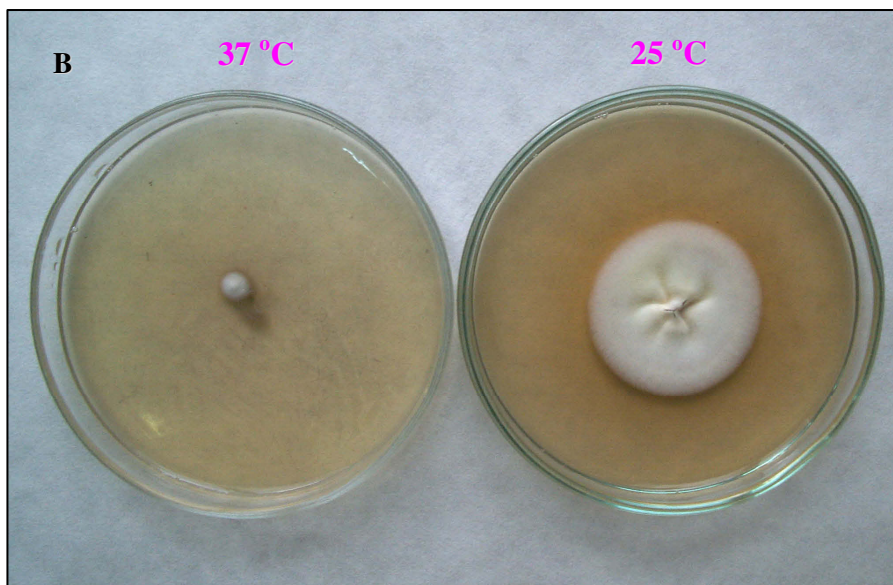


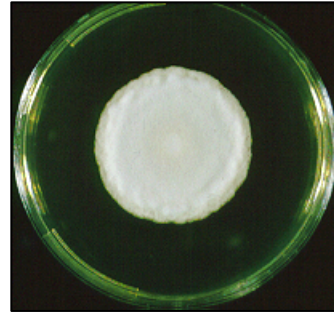
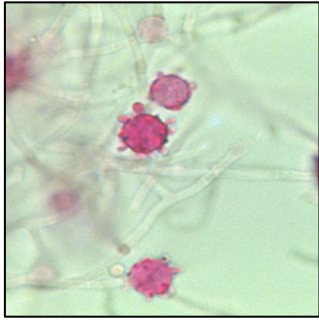
**kmen G14-6** - izolovaný z netopýřího guana  
(Domicia - Čertova díra)

**A** – 30denní kolonie na sladínovém agaru

**B** - 30denní kolonie na Sabouraudově agaru

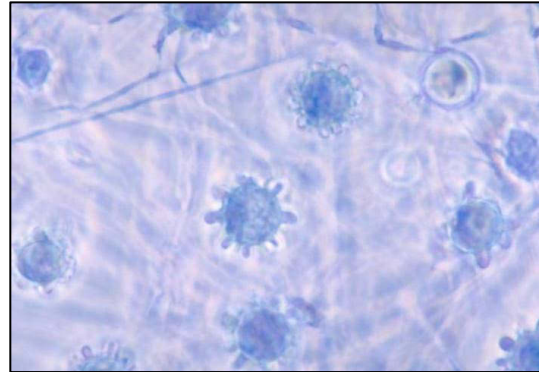
**C, D, E** – tuberkulární konidie





kmen G14-6

*H. capsulatum* (www.mycology on-line)

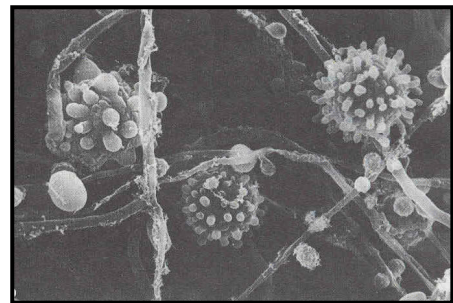


Tuberkulární makrokonidie - *H. capsulatum*

[http://www.medicalhealthcareinfo.com/content/Positive histoplasmin skin tes3.php](http://www.medicalhealthcareinfo.com/content/Positive_histoplasmin_skin_test3.php)

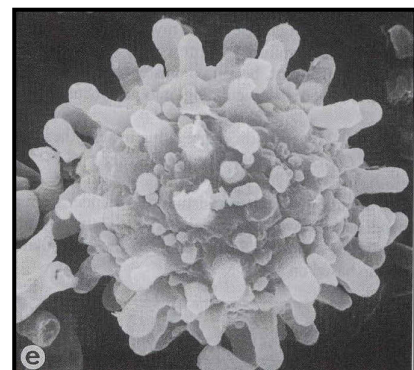
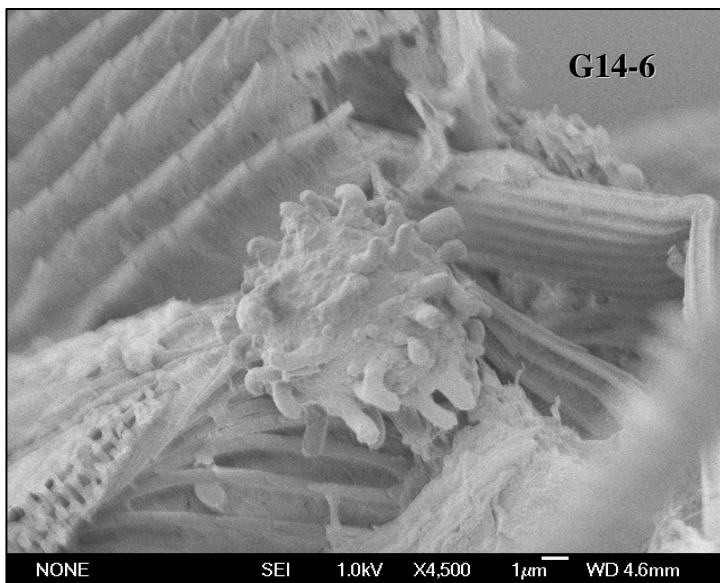
<http://www.medicalhealthcareinfo.com/categories/Fungi>

**Porovnání kmene G14-6 s *H. capsulatum***  
- mikroskopické snímky, růst kolonie a SEM

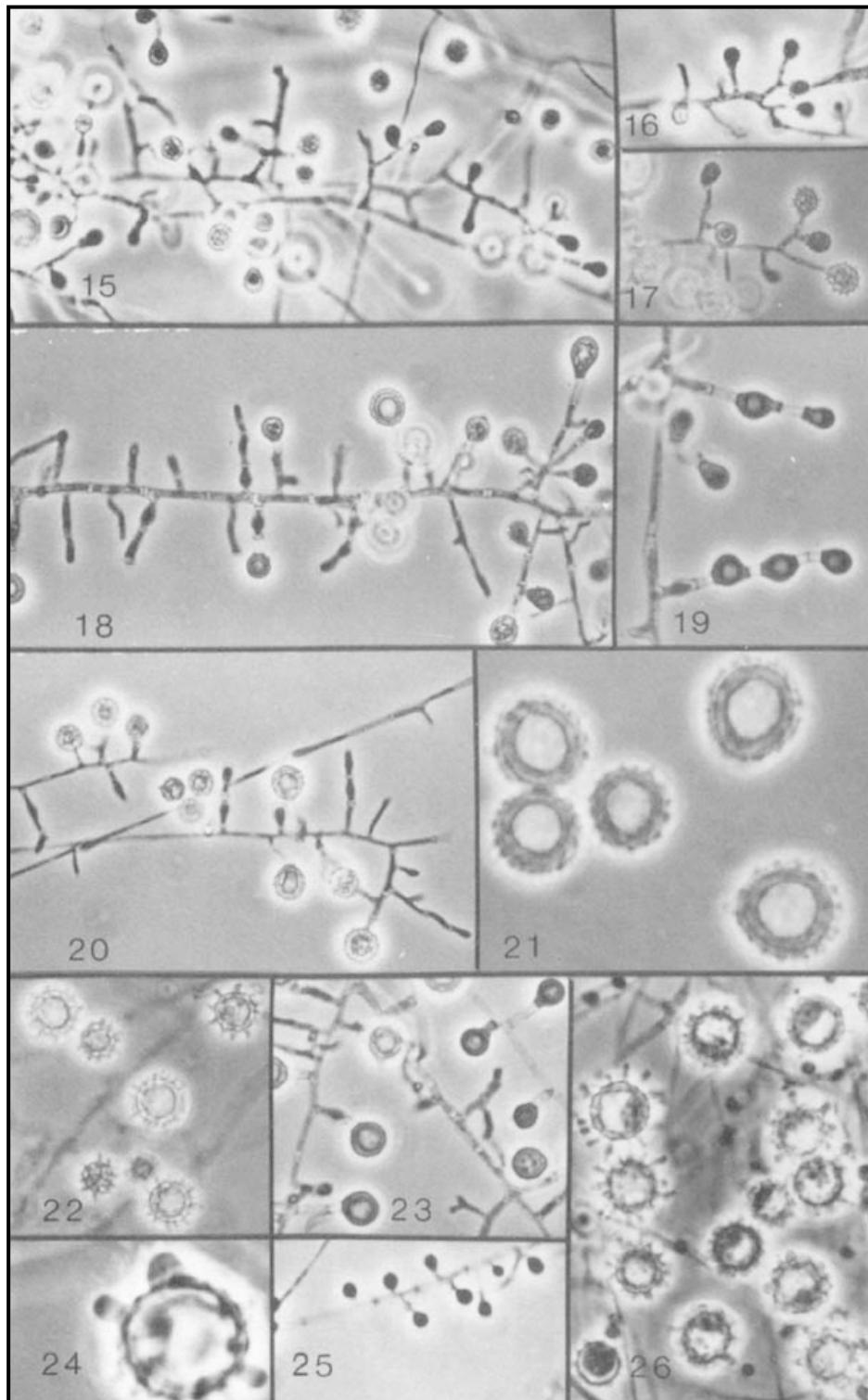


DOMSCH et al. (1980)

DE HOOG et al. (2000)



SIEGLER, L. et al., 1979. *Renispora flavissima*, a new gymnoascaceous fungus with tuberculate *Chrysosporium* conidia. Mycotaxon 10: 133-141.



*Renispora flavissima*, Obr. 24 - 26 – *Histoplasma capsulatum*

# Studium endofytických hub zemědělsky významných rostlin

DAVID NOVOTNÝ

## NOVOTNÝ, D.: A study of endophytic fungi of important agricultural plants

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 97-101. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The reason for study of endophytic mycobiota of agricultural plants is surveyed. The study of endophytic fungi of leaves, branches, stems and roots of apple trees is presented.

**Keywords:** endophytic mycobiota, agricultural plants

David Novotný, Crop Research Institute, Division of Plant Medicine, Department of Mycology, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Czech Republic. E-mail: [novotny@vurv.cz](mailto:novotny@vurv.cz), [novotdad@natur.cuni.cz](mailto:novotdad@natur.cuni.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Endofytické houby rostlin jsou od zhruba poloviny osmdesátých let 20. století stále větším předmětem zájmu mykologů. Jsou to organismy, které žijí uvnitř pletiv rostlin aniž by se jejich přítomnost projevila na vzhledu hostitele. Tento vztah je velmi blízký parazitismu a dá se říci, že endofyt „jede na přiškrcený plyn“. V současné době se rozeznávají dva typy endofytismu. Prvním je tzv. ustálený (constitutive) endofytismus, kdy jde o systémovou infekci rostlin, houba se přenáší semeny a tento vztah je znám téměř výlučně u travin. Druhým typem je tzv. vyvolaný (inducible) endofytismus, kdy vazba houby vůči hostiteli je daleko volnější, přenos je horizontálně z rostliny na rostlinu a vyskytuje se u většiny rostlin (CARROLL 1986, KEHR 1998).

Dosud byly studovány především endofyty jehličnatých i listnatých dřevin (např. CARROLL & CARROLL 1978, DANTI et al. 2002), travin (např. LATCH et al. 1984, WHITE & BALDWIN 1992), zástupci čeledi *Ericaceae* (např. OKANE et al. 1998, PETRINI 1985) a poměrně málo ovocných dřevin a jiných hospodářsky významných druhů rostlin (*Oryza sativa* - FISHER & PETRINI 1992; *Triticum aestivum* - RIESEN & SIEBER 1985, CROUS et al. 1995; *Vitis vinifera* - MOSTERT et al. 2000; *Zea mays* - FISHER et al. 1992; *Malus domestica* - SERDANI et al. 1998, CAMATTI-SARTORI et al. 2005). Většinou jsou zkoumány endofyty nadzemních částí (listy, větve) než podzemní části (kořeny).

V České republice byly dosud zkoumány endofyty travin (B. Cagaš a L. Marvanová), dubů (NOVOTNÝ 2003a, b) a jsou nyní studovány endofyty vybraných listnatých dřevin (A. Kubátová, K. Prášil, M. Kolařík a C. Korittová). Co se týče zemědělsky významných rostlin, tak v současné době probíhá nebo se dokončuje výzkum endofytů jabloní (větve, listy, kořeny – D. Novotný) a révy vinné (listy a větve - M. Šilhánová a D. Novotný).

Studium endofytů zemědělsky významných rostlin není pouze akademickou záležitostí, ale má i praktické opodstatnění.

1) Bez pochopení celého životního cyklu a ekologie nelze vyvozovat závěry o jednotlivých fytopatogenních druzích hub nebo hub produkujících mykotoxiny a je těžké hledat cesty omezení jejich negativního vlivu na zemědělské produkty.

2) V době kdy dochází ke globální změně klimatu se mění rozšíření a ekologie druhů hub a některé endofytické druhy se mohou stát výraznými patogeny rostlin.

3) Pro detekci závažných fytopatogenních hub je dnes velmi často používána detekce pomocí specifických primerů a při takovéto detekci je absolutně nežádoucí, aby docházelo k falešným reakcím, kdy se stejnými specifickými primery stejně reagují různé druhy hub.

Proto je třeba při vývoji těchto primerů zajistit negativní reakci s druhy hub, které přirozeně žijí v rostlinách (endofyty).

4) Při vývoji mikročipů pro detekci fytopatogenních hub nemá praktický smysl vyvíjet čipy pro jednotlivé hospodářsky významné rostliny, které budou zahrnovat primery pro velké množství druhů hub včetně endofytů, ale pouze pro fytopatogenní druhy, které poškozují rostlinu, protože jinak budou pravidelně detekovány druhy přirozené mykobioty, které nelze a nemá smysl snažit se je odstranit z těchto rostlin.

## Cíl práce

Cílem předkládané práce studia endofytických hub je zjistit přítomnost druhů *Neofabraea malicorticis*, *N. alba* a *Colletotrichum gloeosporioides* ve větvích a listech jabloní, protože je třeba poznat četnost výskytu uvedených druhů hub v jabloních a poznat složení endofytické mykobioty jabloní. Toto úsilí je vedenou snahou zajistit absenci *Neofabraea malicorticis*, *N. alba* a *Colletotrichum gloeosporioides* v matečných rostlinách jabloní, tak jak je určeno v tzv. certifikačním schématu pro matečné rostliny jabloní, hrušní a kdoulí vydané OEPP/EPPO.

## Materiál a metodika

Vzorky z větví byly odebrány ze 41 stromů z 10 lokalit z různých částí České republiky, vzorky listů pochází z 25 stromů z 6 lokalit z různých částí České republiky, vzorky z kmenů a kořenů jsou z 9 stromů z 1 lokality v České republice.

Odebrané vzorky větví, listů a kořenů byly očištěny pod tekoucí vodovodní vodou a následně povrchově sterilizovány. V případě větví a kořenů byla procedura povrchové sterilizace následující: 1) 1 minutu v 96% ethanolu, 2) 3 minuty v 10% roztoku chlornanu sodného (NaClO), 3) 30 sekund v 96% ethanolu a 4) opláchnutí ve sterilní vodě. V případě listů byla procedura povrchové sterilizace následující: 1) 30 sekund v 70% ethanolu, 2) 1 minutu v 1% roztoku chlornanu sodného (NaClO), 3) 15 sekund v 70% ethanolu a 4) opláchnutí ve sterilní vodě. Listy byly rozděleny na řapíky a čepele, slabé kořeny a větve pouze rozříznuty podélně, silné a středně silné větve a kořeny byly rozděleny na kůru, subperidermální a peridermální kůru. Všechny uvedené vzorky byly rozřezány na (3-5 x 3-5 x 1 mm velké segmenty a inkubovány na 2% sladidlovém agaru (MA2) při teplotě 18-20 °C a po 4 týdnech byly vyrostlé kultury prohlíženy, identifikovány nebo odočkovány.

## Výsledky

Během studia větví bylo dosud zaznamenáno okolo 65 morfotypů hub. Nejčastěji zaznamenanými druhy byly *Pleurophoma cava*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Seimatosporium* cf. *lichenicola*, *Phomopsis* cf. *mali* a *Microsphaeropsis* sp. Byly zjištěny rozdíly ve výskytu mezi jednotlivými lokalitami, v tloušťce větví, typu pletiva (nejvíce kolonizována peridermální kůra). Z dosud neúplných výsledků je vidět podobnost s endofytickou mykobiotou listů.

### Přehled zjištěných a dosud určených druhů hub ve větvích jabloní:

<i>Alternaria alternata</i>	Basidiomycet sp. 2
<i>Arthrinium phaeosphaerum</i>	Basidiomycet sp. 3
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
Basidiomycet sp. 1	<i>Chaetomium</i> sp. 1

*Cladosporium cladosporioides*  
*Cladosporium herbarum*  
*Cladosporium sphaerospermum*  
*Coryneum* sp.  
*Cryptosporiopsis* sp.  
*Epicoccum nigrum*  
*Fusarium* sp.  
*Geniculosporium serpens*  
*Microsphaeropsis* sp.  
*Nodulisporium* sp. 1  
*Penicillium* sp.  
*Phoma* sp. 1

*Phoma* sp. 2  
*Phoma* sp. 3.  
*Phoma* sp. 4  
*Phomopsis* cf. *mali*  
*Pleurophoma cava*  
*Prosthemium* sp.  
*Sarcinomyces crustaceus*  
*Seimatosporium* cf. *pestalotioides*  
*Sordaria* sp. 1  
*Sordaria fimicola*  
*Spiniger* sp.

Dosud bylo během studia v listech zjištěno okolo 60 morfotypů hub. Nejčastěji vyskytujícími se byly druhy *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum* a *Venturia inaequalis*. Bylo zjištěno, že četnost výskytu stoupá se stářím listu a byly zaznamenány rozdíly ve složení mykobioty mezi lokalitami.

#### **Přehled zjištěných a dosud určených druhů hub v listech jabloní:**

*Acremonium* sp.  
*Alternaria alternata*  
*Apiospora montagnei*  
*Aureobasidium pullulans*  
Basidiomycet sp. 1  
*Botrytis cinerea*  
*Chaetomium* sp.  
*Cladosporium cladosporioides*  
*Cladosporium herbarum*  
*Cladosporium sphaerospermum*  
*Cladosporium herbarum* var. *macrocarpum*  
*Epicoccum nigrum*  
*Fusarium* sp.  
*Geniculosporium serpens*  
*Microsphaeropsis* sp.  
*Nodulisporium* sp. 1  
*Nodulisporium* sp. 2  
*Periconia* sp.  
*Pezicula* sp.  
*Phoma* sp. 1  
*Phoma* sp. 2  
*Phoma* sp. 3  
*Phoma* sp. 4  
*Phomopsis* cf. *mali*  
*Pleurophoma cava*  
*Seimatosporium* cf. *lichenicola*  
*Sordaria fimicola*.  
*Sordaria* sp.  
*Ulocladium* sp.  
*Venturia inaequalis*



V kmenech jabloní bylo zaznamenáno 6 druhů hub. Během studia byly izolovány druhy *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Pleurophoma cava* a *Microsphaeropsis* sp. Dominantními druhy byly *Alternaria alternata* a *Pleurophoma cava*, což je velmi připomíná složení mykobioty větví.

V kořenech jabloní bylo doposud zjištěno 9 druhů mikroskopických hub. Mykobiotě dominují druhy *Cylindrocarpon destructans* a *Phialophora* sp. a dále byly zaznamenány *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Gliocladium roseum*, *Microsphaeropsis* sp., „bílé mycelium“ a „šedé mycelium“. Složení spektra hub kořenů je velmi podobné spektru hub vyskytujícímu se v kořenech dubu letní a zimního (NOVOTNÝ, 2001, 2003a, b). Je vidět malá podobnost se složením mykobioty listů a větví.

Z žádného zkoumaného vzorku (větve, listu, kmene, kořene) nebyly izolovány druhy *Neofabraea malicorticis*, *N. alba* a *Colletotrichum gloeosporioides* a tyto druhy evidentně nepatří mezi běžné endofyty jabloní.

## Poděkování

Práce podpořena projekty MZe NAZV č. QF 4074 a MZe 000270603.

## Přehled literatury

- CAMATTI-SARTORI, V., DA SILVA-RIBEIRO, R. T., VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M., PAGNOCCA, F. C., ECHEVERRIGARAY, S., AZEVEDO, J. L., 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. J. Basic Microbiol. 45: 397-402.
- CARROLL, G. C., 1986. The biology of endofytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N., J., HEUVEL, J. (Eds.), Microbiology of Phyllosphere, Cambridge. pp. 205-222.
- CARROLL, G. C., CARROLL, F. E., 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Can. J. Bot. 56: 3034-3043.
- CROUS, P. W., PETRINI, O., MARAIS, G. F., PRETORIUS, Z., A., REHDER, F., 1995. Occurrence of fungal endophytes in cultivars of *Triticum aestivum* in South Africa. Mycoscience 36: 105-111.
- DANTI, R., SIEBER, T. N., SANGUINETI, G., 2002. Endophytic mycobiota of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. Mycol. Res. 106: 1343-1348.
- FISHER, P. J., PETRINI, O., 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). New Phytol. 120: 137-143.
- FISHER, P. J., PETRINI, O., SCOTT, H. M. L., 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). New Phytol. 122: 299-305.
- KEHR, R., 1998. Zur Bedeutung pilzlicher Endophyten bei Waldbäumen. Mitt. Biol. Bundesanst. Land - Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 349: 8-30.
- LATCH, G. C. M., CHRISTENSEN, M. J., SAMUELS, G. J., 1984.: Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Mycotaxon 20: 535-550.
- MOSTERT, L., CROUS, P. W., PETRINI, O., 2000. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* komplex. Sydowia 52: 46-58.

- NOVOTNÝ, D., 2001. Contribution to the knowledge of the mycoflora in roots of oaks with and without tracheomycotic symptoms. *Czech Mycol.* 53: 211-222.
- NOVOTNÝ, D., 2003a. A comparison of two methods for the study of microscopic fungi associated with oak roots. *Czech Mycol.* 55:73-82.
- NOVOTNÝ, D., 2003b. Ekologie mikroskopických hub dubů, se zřetelem na kořenové endofyty a ophiostomatální houby. PhD thesis, 190 p. [Depon. in: Library Dep. Bot., Fac. Sci., Charles Univ., Prague; in Czech]
- RIESEN, T., SIEBER, T., 1985. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Zürich, 190 p.
- SERDANI, M., CROUS, P. W., HOLZ, G., PETRINI, O., 1998. Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species. *Sydowia* 50: 257-271.
- WHITE, J. F., BALDWIN, N. A., 1992. A preliminary enumeration of grass endophytes in west central England. *Sydowia* 44: 78-84.

## Výšetrenie vonkajšej, viditeľnej a skrytej vnútornej mykoflóry obytných budov v rôznych oblastiach SR

ELENA PIECKOVÁ, ZUZANA KOLLÁRIKOVÁ, ZUZANA STERNOVÁ, JANA BENDŽALOVÁ

### PIECKOVÁ, E., KOLLÁRIKOVÁ, Z., STERNOVÁ, Z., BENDŽALOVÁ, J.: A study of outdoor, visible and invisible indoor mycoflora in apartment houses in various parts of Slovakia

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 102-116. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Fungal colonization of mouldy and control apartment houses of various constructions in several regions of Slovakia (Košice, Bratislava, Kvetoslavov, Poprad, Hodruša-Hámre, Lehota, Lučenec, Banská Bystrica, Hurbanovo, Komárno and Šamorín), together with outdoor mycoflora, was evaluated over springs, falls and summers 2004 – 2007. Household characteristics based on questionnaires were studied as well. And all flats were described according to their thermal-humid parameters. Living and sleeping rooms (80 % r. h., less than 18 °C) were visibly mouldy the most frequently, kid's rooms the less. The indoor aeromycoflora reflected the outdoor one, while *Cladosporium cladosporioides*, *C. macrocarpum*, *C. sphaerospermum* dominated in both, *Penicillium brevicompactum* was isolated rarely. *Aspergillus nidulans* and *Trichoderma viride* were found in the air in mouldy flats, too. *Cladosporium* sp., *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Penicillium* sp., *P. brevicompactum* a thermophilic *P. chrysogenum* were predominant in wall scratches.

**Keywords:** fungal colonization, apartment houses, indoor, outdoor

Elena Piecková, Zuzana Kolláriková, Slovak Medical University, Limbová 12, 833 03 Bratislava, Slovak Republic. E-mail: [elena.pieckova@szu.sk](mailto:elena.pieckova@szu.sk)  
Zuzana Sternová, Jana Bendžalová, VVÚPS-NOVA, s.r.o., Bratislava, Slovak Republic

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

V jarnom, jesennom a zimnom období r. 2004 - 2007 sa hodnotila hubová kolonizácia súborov bytov kontaminovaných mikroskopickými hubami a bytov kontrolných v panelových a tehlových bytových domoch 6 stavebno-technických konštrukčných typov v Košiciach, v Bratislave, Kvetoslavove, v Poprade, v Hodruši-Hámroch, Lehote, Lučenci, Banskej Bystrici, Hurbanove, Komárne a Šamoríne spolu s príslušnou vonkajšou mykoflórą. Vyhodnocoval sa aj užívateľský režim vo vyšetrovaných bytoch dotazníkovou metódą medzi ich obyvateľmi a režim dodávateľský (teplotno-vlhkostné objektívne parametre) odbornými stavebnými posudkami.

V uvedenom zmysle sa vykonala komplexná analýza 147 viditeľne mikromycétami kontaminovaných a 23 kontrolných bytov. Merala sa teplota a relatívna vlhkosť vnútorného ovzdušia, ako aj povrchová teplota na miestach s hubovým porastom, rovnako ako na vzorovom liste:

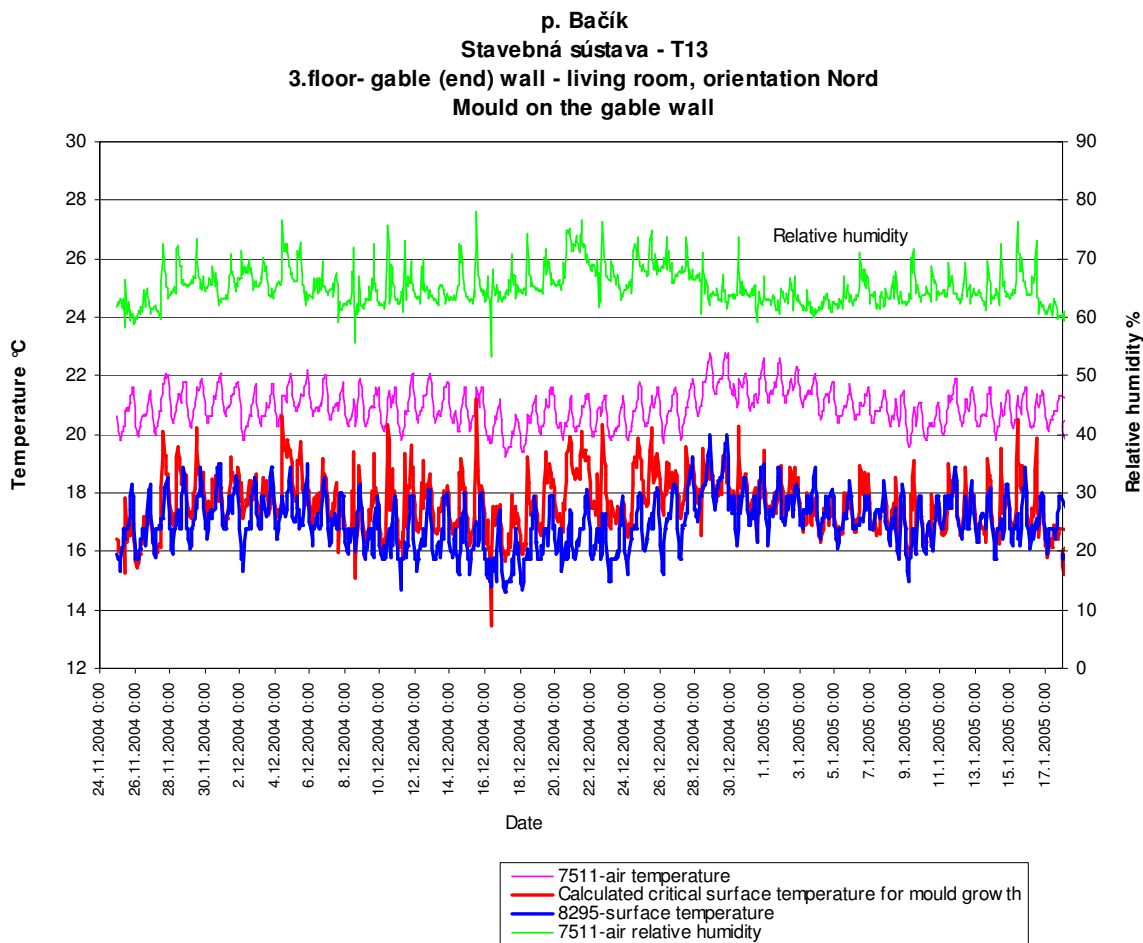
<b>Adresa</b>	Banická 804/26, Horec, Poprad
<b>Stavebná sústava</b>	murovaný dom T13
<b>Č. teplomera</b>	7511, 8295
<b>Merané veličiny</b>	teplota vzduchu, relatívna vlhkosť vzduchu, povrchová teplota
<b>Nadzemné podlažie</b>	3
<b>Názov miestnosti</b>	obývacía izba
<b>Orientácia</b>	S
<b>Popis poruchy</b>	plesne, po celej dĺžke
<b>Okná</b>	drevené zdvojené

Vetrание	2-3x denne, krátko
Termostatické ventily	cez deň
Povrchová úprava stien	Omletka
Počet osôb dospelý + dieťa	2+pes
Vek dieťaťa	
Poznámky	byt pri štítovej stene

Výsledky meraní v dňoch 25.11. 2004 až 24.1.2005:

Veličina	Teplota vonkajšieho vzduchu °C	Teplota vnútorného vzduchu °C	Relatívna vlhkosť vnútorného vzduchu %	Relatívna vlhkosť prepočítaná pre 20 °C	Kritická povrchová teplota na vznik plesní °C	Teplota rosného bodu °C	Nameraná povrchová teplota °C
Priemer	- 0,3	20,9	64,9	68,6	17,5	14,0	16,9
Maximum	20,8	22,8	78,2	86,3	21,2	17,6	20,0
Minimum	- 15,5	19,2	53,4	52,7	13,4	10,1	14,6
Medián	0,0	20,9	64,3	68,3	17,5	14,0	16,9

Takmer počas celého času merania bola nameraná povrchová teplota nižšia ako kritická teplota pre vznik plesní, to znamená, že v blízkosti povrchu bola relatívna vlhkosť vyššia ako 80%.



V uvedenom zmysle sa vykonala komplexná analýza 95 viditeľne mikromycétami kontaminovaných a 15 kontrolných bytov. Merala sa teplota a relatívna vlhkosť vnútorného ovzdušia, ako aj povrchová teplota na miestach s hubovým porastom rovnako ako v priebehu Etapy 1 – vid' priebežná správa o riešení projektu za rok 2005. Znovu sa počas meraní stanovila povrchová teplota vnútorných stien „plesnivých“ bytov nižšia ako kritická teplota pre vznik plesní, to znamená, že v blízkosti povrchu bola relatívna vlhkosť vyššia ako 80 %.

Vnútorná a vonkajšia aeromykoflóra, odobratá aeroskopicky, sa hodnotila kvalitatívne aj kvantitatívne (kolónie tvoriace jednotky - KTJ.m<sup>-3</sup>). Zoškraby a stery, adhezívne vzorkovacie pásy a prach sa podrobili analýze na zjavnú (“plesnivé” steny, nesprávne skladovaný organický materiál, komory, kuchyne, kúpeľne, chladničky, klimatizačné systémy) a skrytú mykoflóru pod obkladmi a tapetami, kobercami, na/v matracoch. Všetky vzorky sa vyhodnocovali priamou mikroskopiou a mikromycéty sa izolovali na agarovom médiu s dichlóranom a 18 % glycerolu po kultivácii 5 – 15 dní pri 25 a 37 °C.

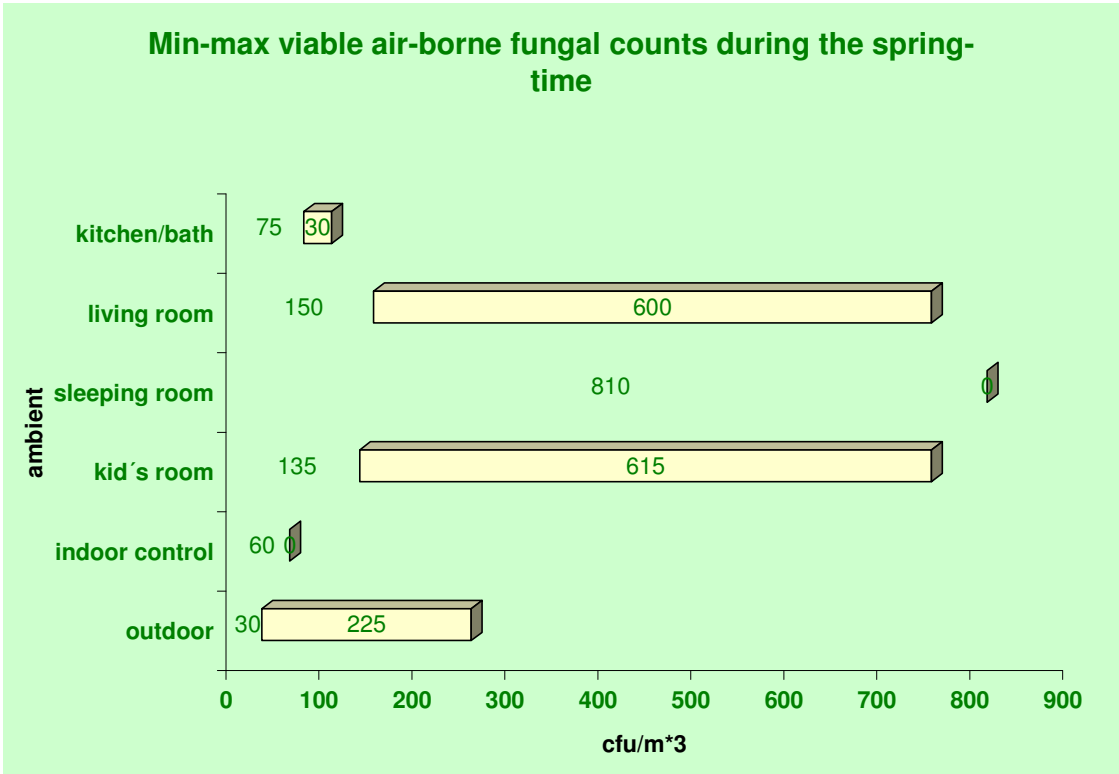
Všetky vyšetované byty boli staršie ako 20 r., s 1 – 7 obyvateľmi vo veku 0 – 78 r. s nižším priemerným sociálnym postavením, žijúcimi tam 2 – 50 r. Najčastejšie boli mikroskopickými hubami viditeľne kolonizované obývacie izby a spálne (80 % r. h., menej ako 18 °C), kým detské izby najmenej. Vnútorná aeromykoflóra kontrolných bytov odrážala kvalitatívne vonkajšiu s prevahou životaschopných zárodkov *Cladosporium cladosporioides*, *C. macrocarpum*, *C. sphaerospermum*, menej *Penicillium brevicompactum*. *C. sphaerospermum* sa izolovalo aj zo zoškrabov stien. “Plesnivé” byty boli kolonizované vzdušnými kladospóriami, *Alternaria* spp., *Aspergillus nidulans* a *Trichoderma viride*. *Cladosporium* sp., *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Penicillium* sp., *P. brevicompactum* a termofilné *P. chrysogenum* prevažovali vo vzorkách z kontaminovaných povrchov. Získané výsledky zo 14 “plesnivých” a 4 kontrolných bytov v Poprade počas teplej (jar) a chladnej (jeseň – zima) časti roka sú zosumarizované na obr. 1 – 6. Získané výsledky z vyšetovaných súborov bytov v Košiciach, Bratislave, Banskej Bystrici, Hodruši-Hámroch, Lehote, Lučenci, Kvetoslavove, Komárne, Šuranoch a Hurbanove počas teplej a chladnej časti roka sú ilustrované na obr. 7 – 27 .

Všetky hubové izoláty pochádzajúce z “plesnivých” obydlií indikujú dlhotrvajúcu vnútornú vlhkosť – nedostatočné vetranie, domáce zvieratá, izbové rastliny, sústavné podchladzovanie cez otvorené vetráky. Aj nedostatočné upratovanie a údržba domácnosti boli identifikované ako faktory podporujúce mikroskopické huby vo vnútornom prostredí. Trichodermý, fuzária a kvasinky sú indikátormi výrazných problémov s vlhkosťou vo vnútri bytov. Aspergily, penicíliá, alternárie a kladospória sú súčasťou bežnej vzdušnej mykoflóry nesterilných priestorov, ale ich monokultúrny výskyt poukazuje na vnútorné zdroje znečistenia v sledovaných bytoch. Boli v nich masívne kolonizované steny a povrchy (nábytok, koberce), ale nenašli sa skryté zdroje (matrace, obklady). Výsledky korešpondujú s nálezmi iných autorov zo všetkých oblastí mierneho klimatického pásma.

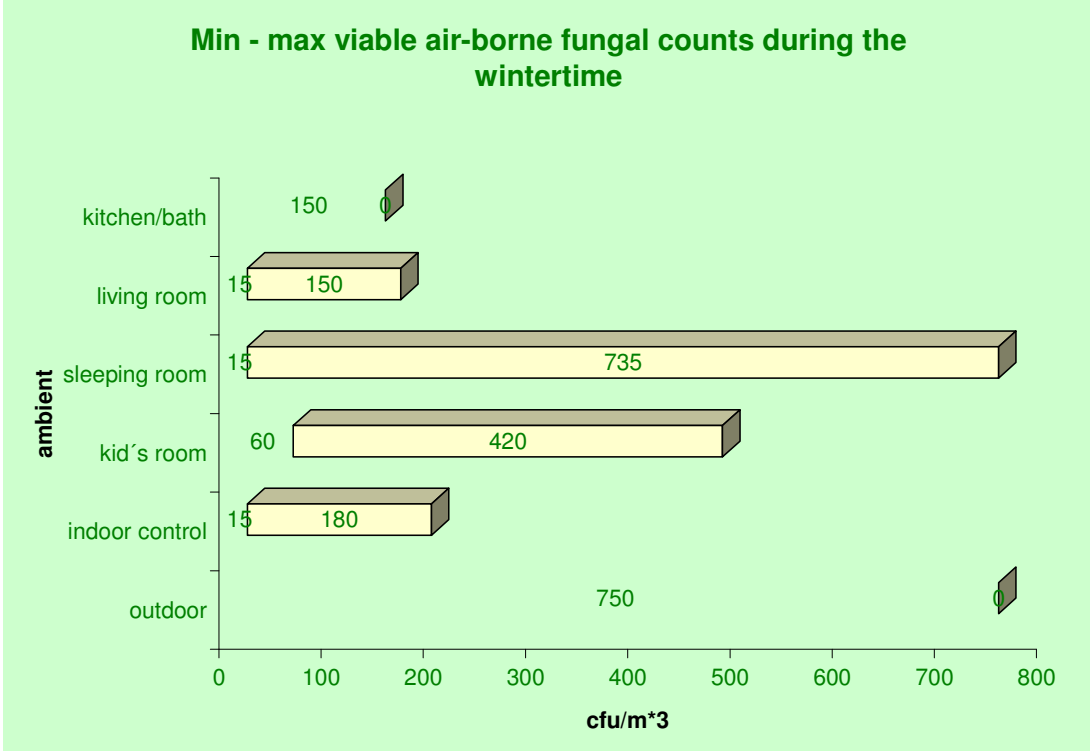
*Štatistické vyhodnotenie vzájomných vzťahov hubovej kolonizácie vnútorných priestorov, vonkajšej mykoflóry, stavebných a užívateľských charakteristík jednotlivých súborov bytov prebieha, bude predmetom súbornej publikácie.*

**Prílohy:**

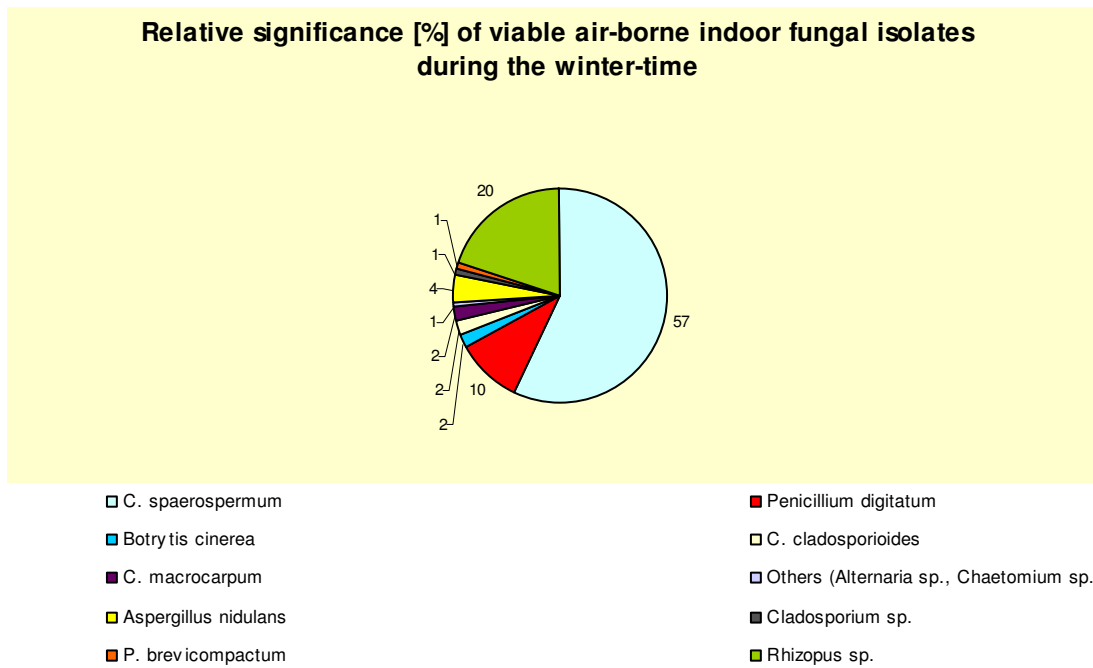
Obr. 1.



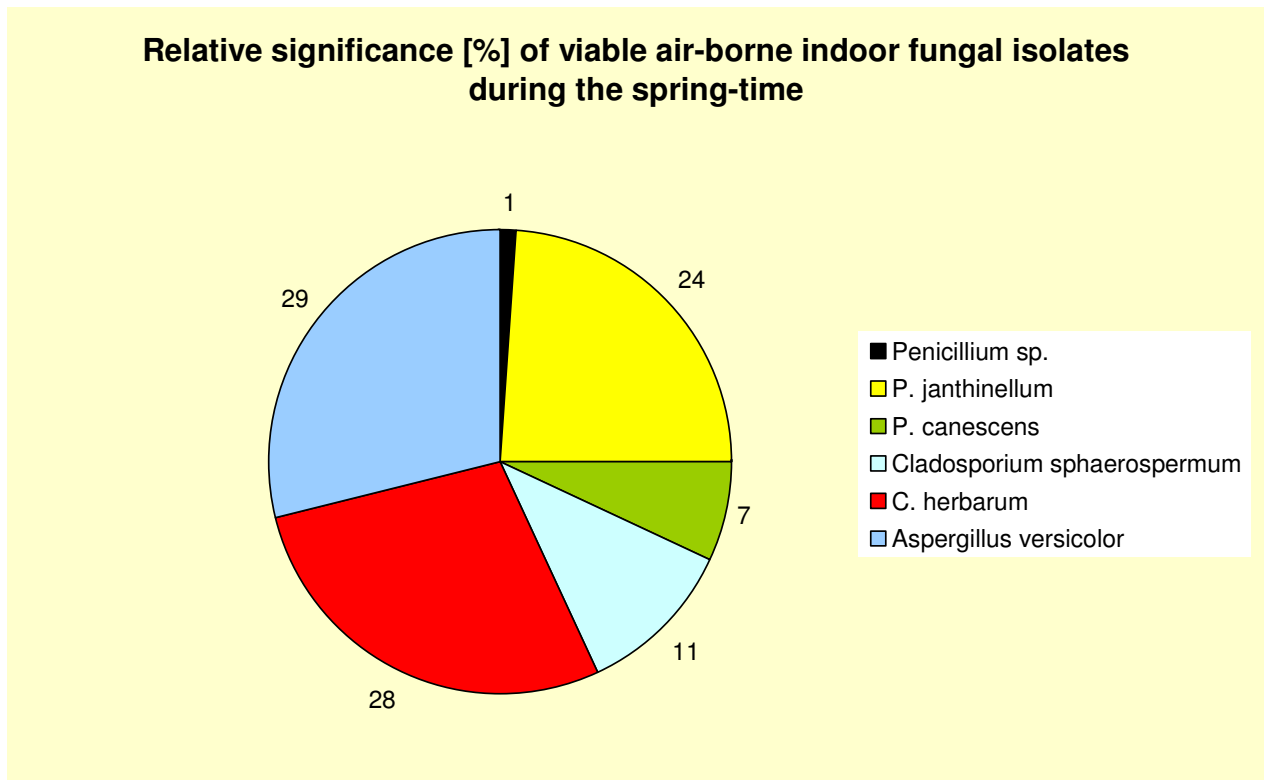
Obr. 2.



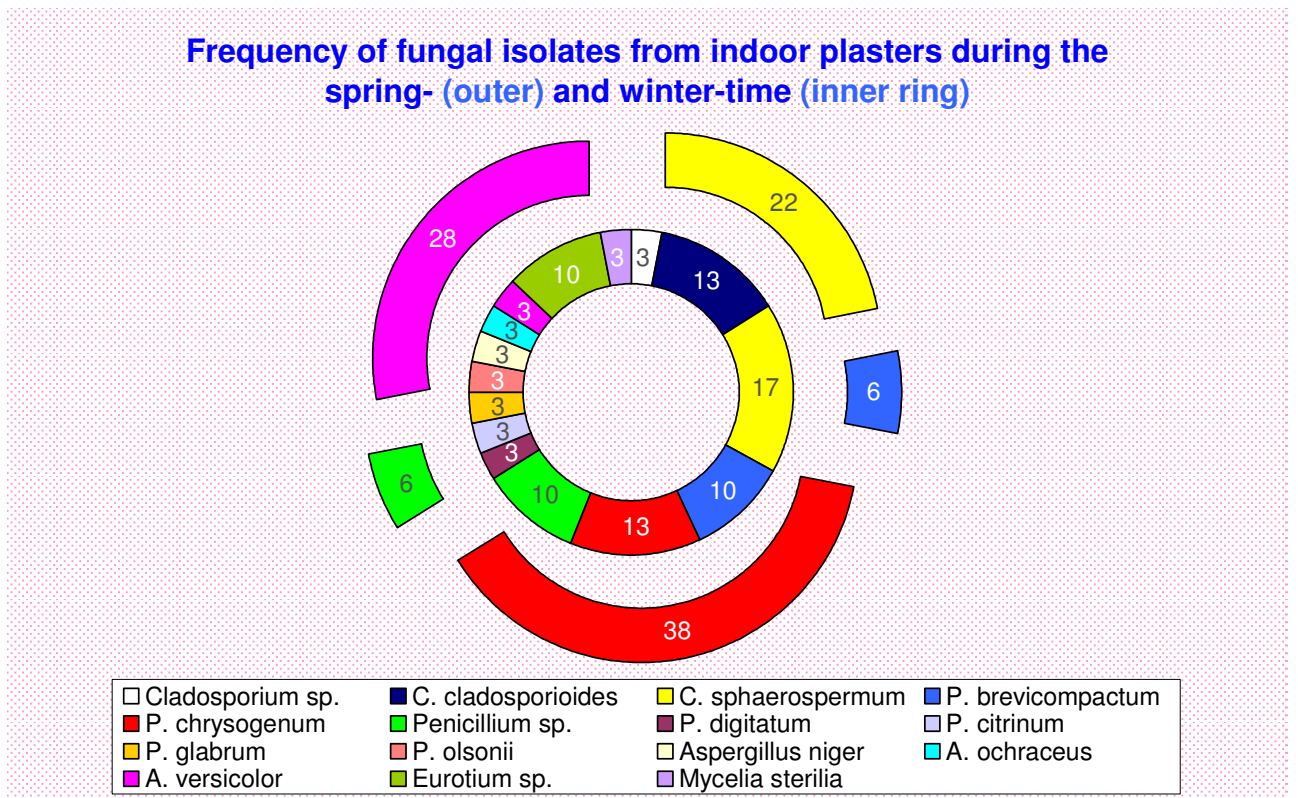
Obr. 3.



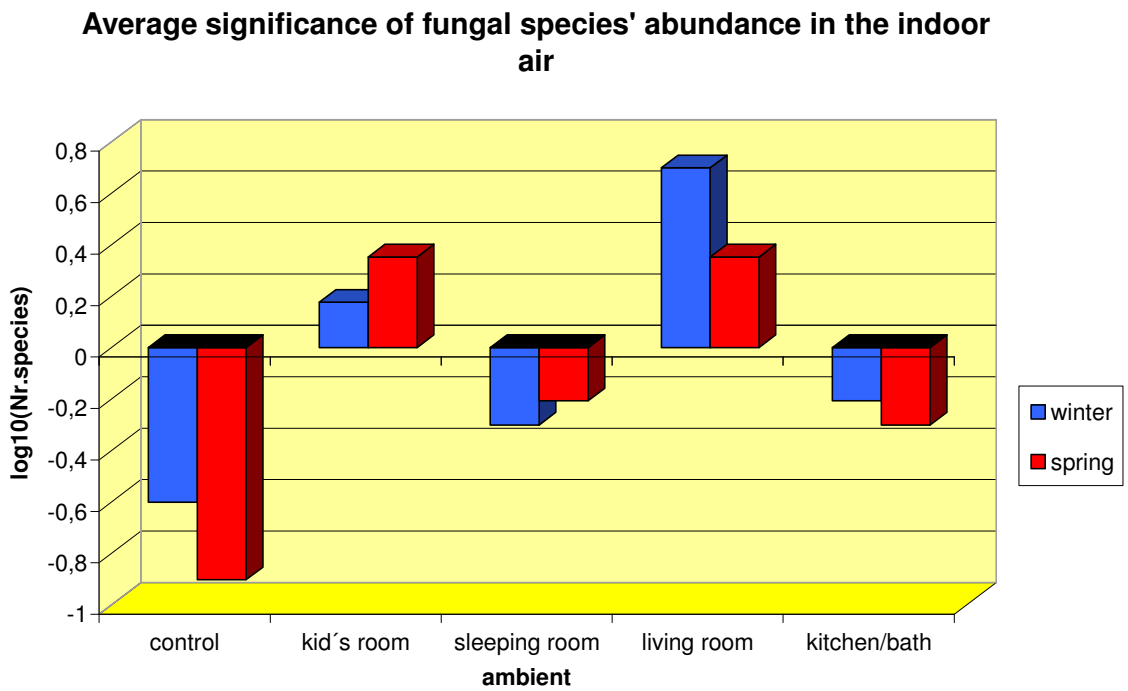
Obr. 4.



Obr. 5.



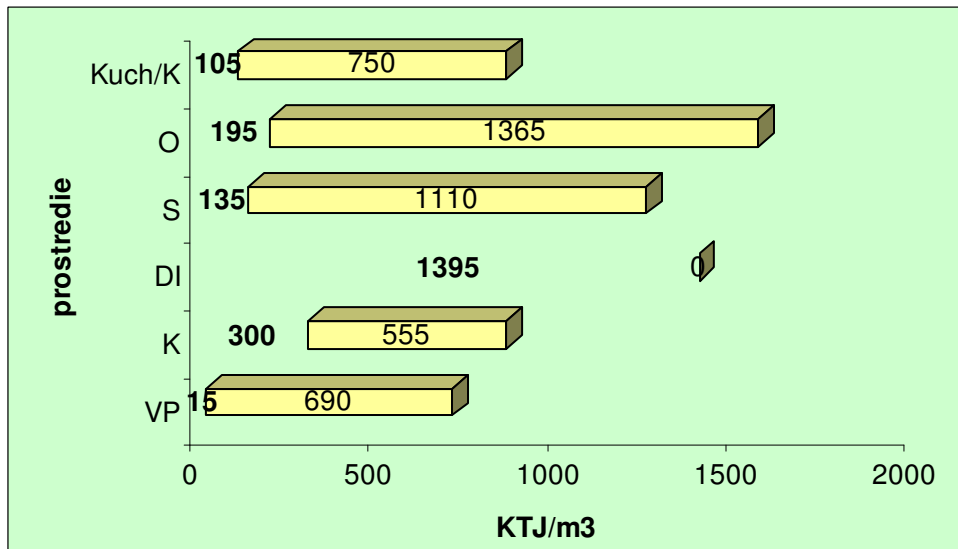
Obr. 6.





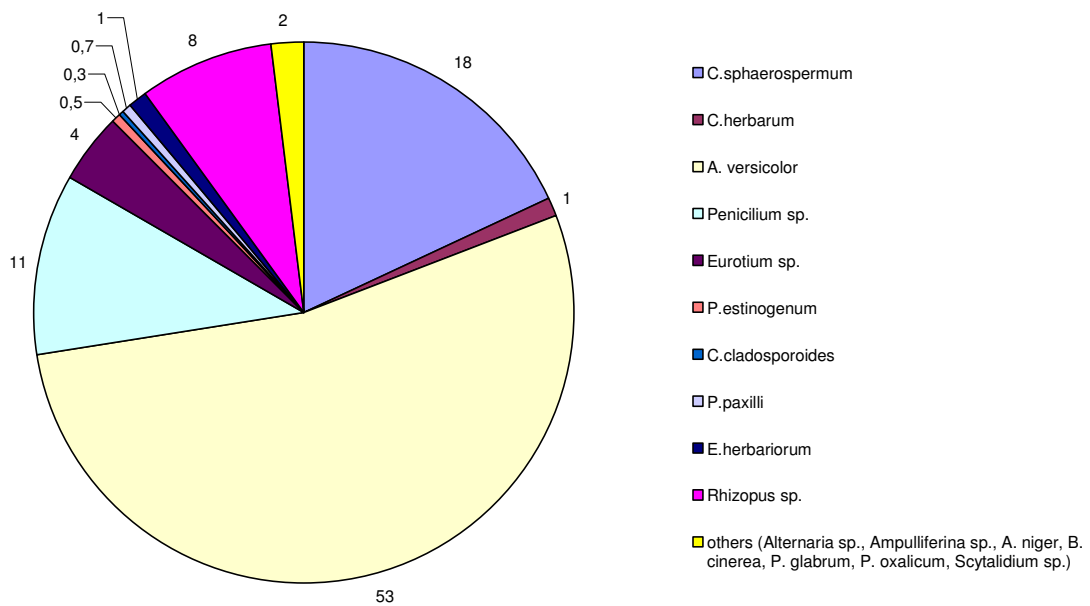
Košice

**Obr. 7.** Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas zimného obdobia



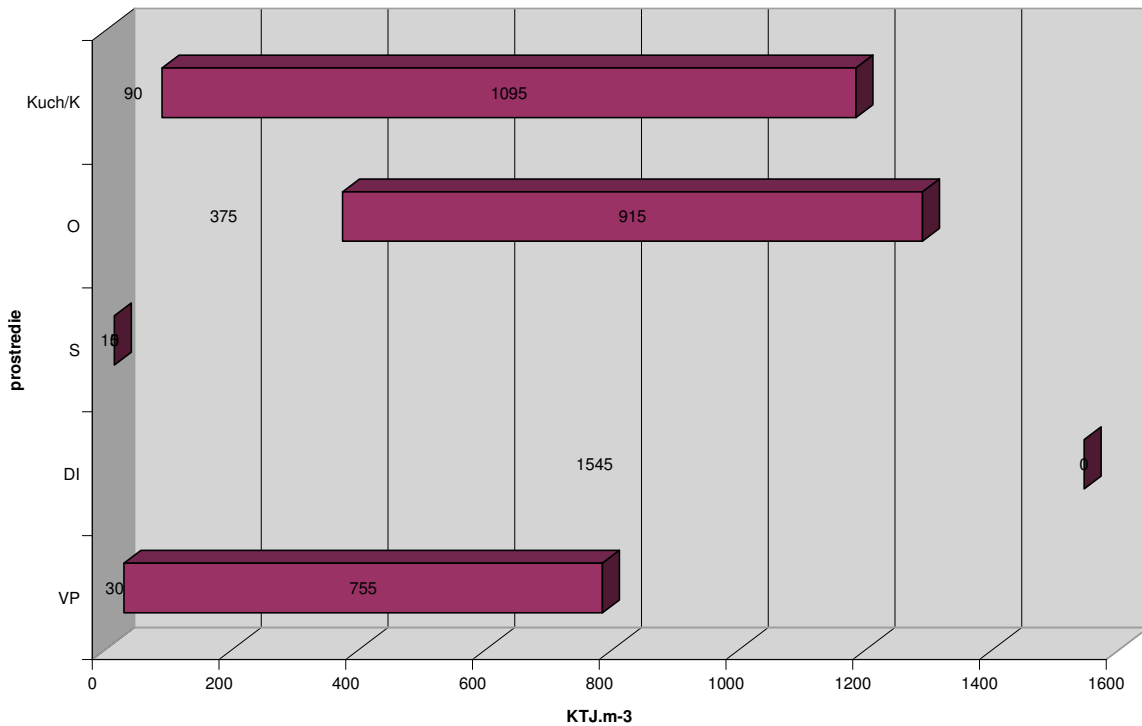
**Legenda – platí pre všetky nasledujúce grafy:** Kuch/K – kuchyňa/kúpeľňa, O – obývačka, S – spálňa, SI – detská izba, K – kontrola, VP – vonkajšie prostredie

**Obr. 8.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v zimnom období

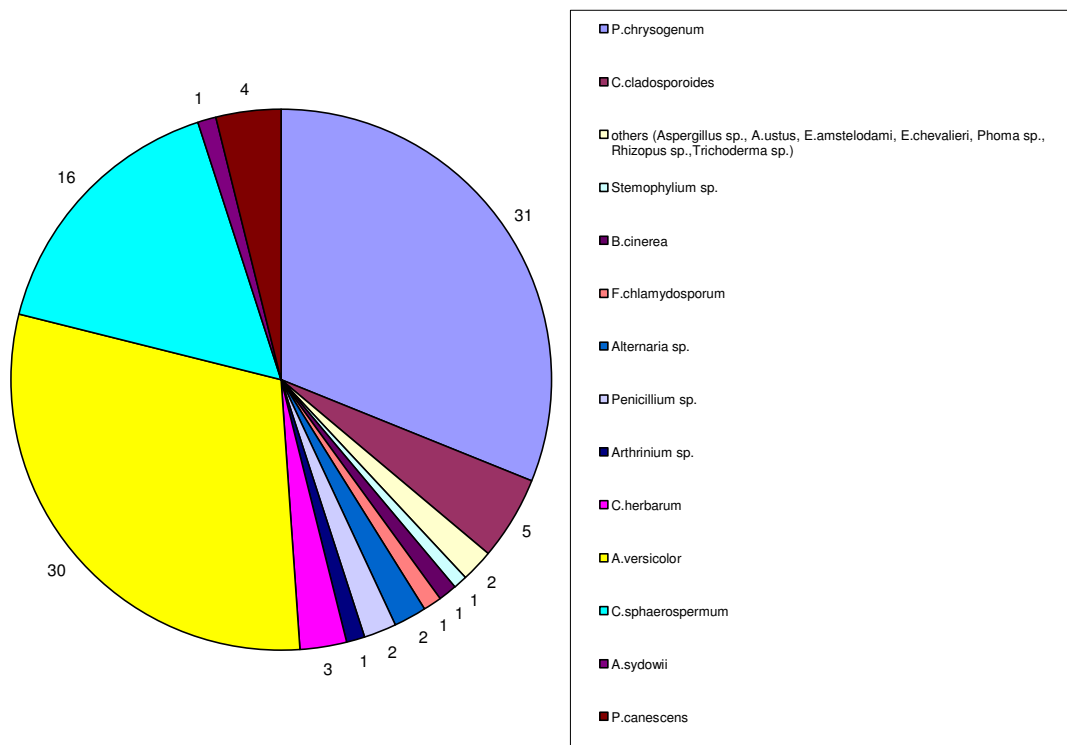


Bratislava

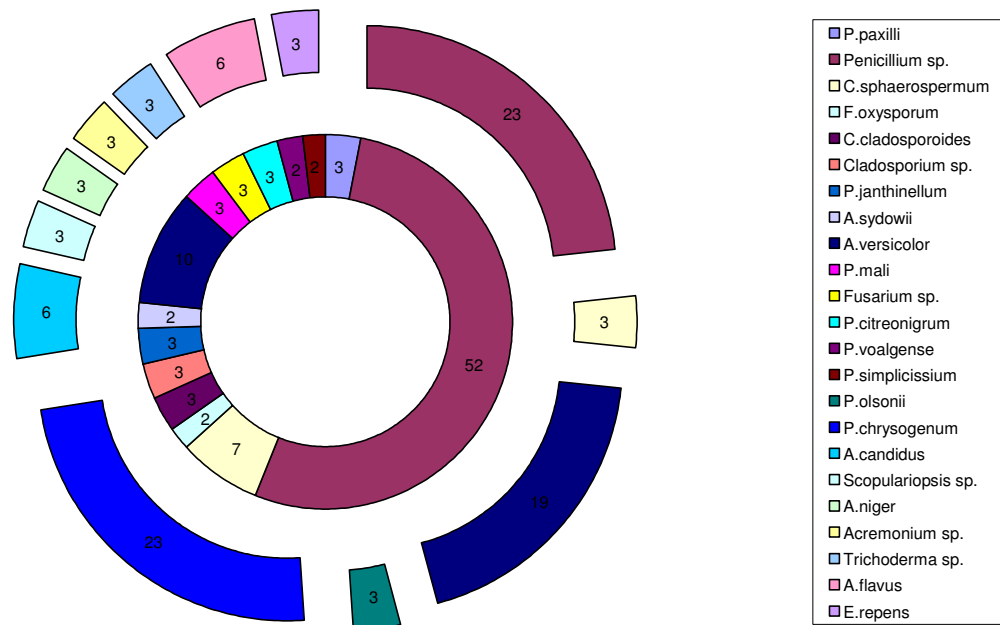
**Obr. 9.** Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas jarného obdobia



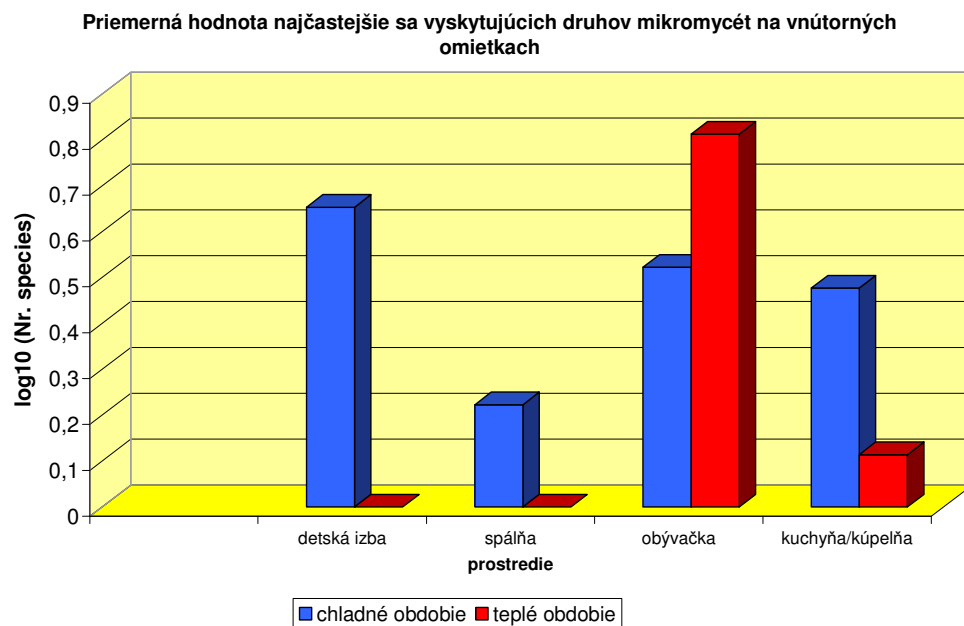
**Obr. 10.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v teplejšom období roka



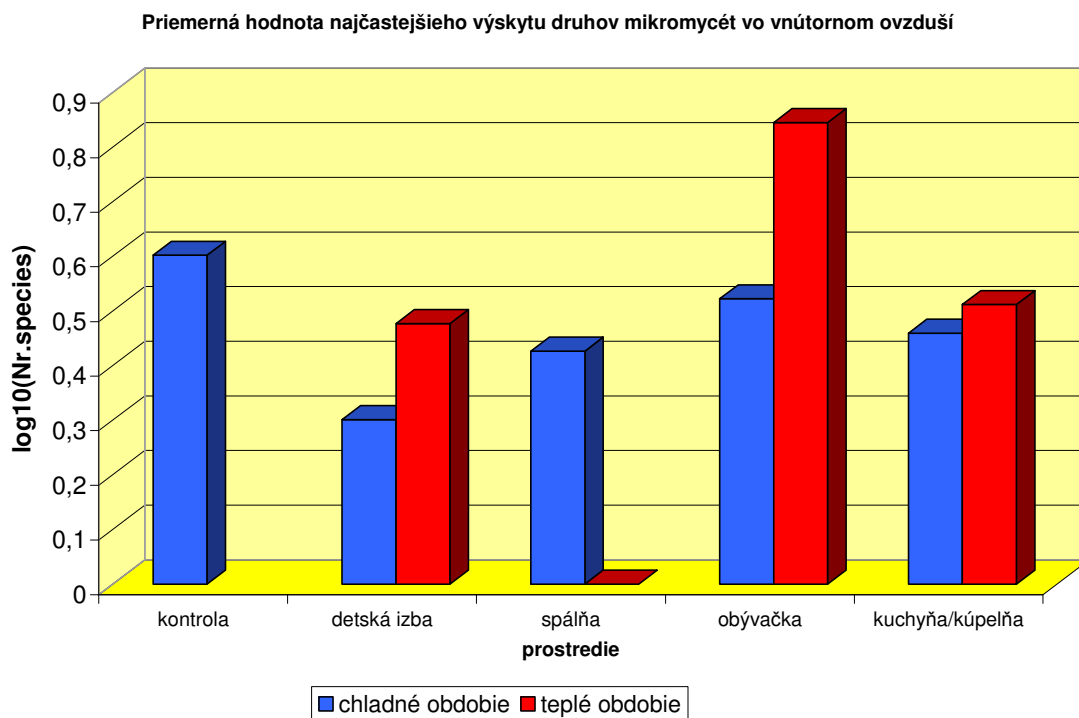
**Obr. 11.** Frekvencia výskytu hubových izolátov z vnútorných povrchov počas jarného (vonkajší kruh) a zimného (kruh vnútorný) obdobia v oblastiach s približne rovnakými klimatickými podmienkami (KE vs. BA)



**Obr. 12.**

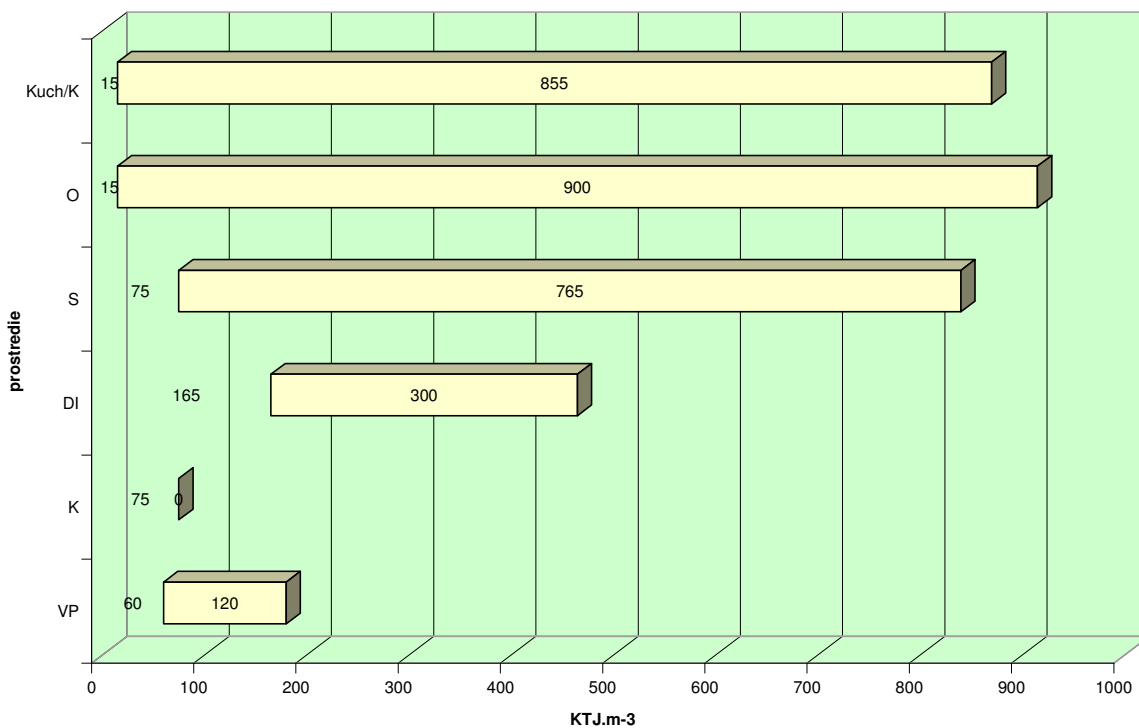


Obr. 13.

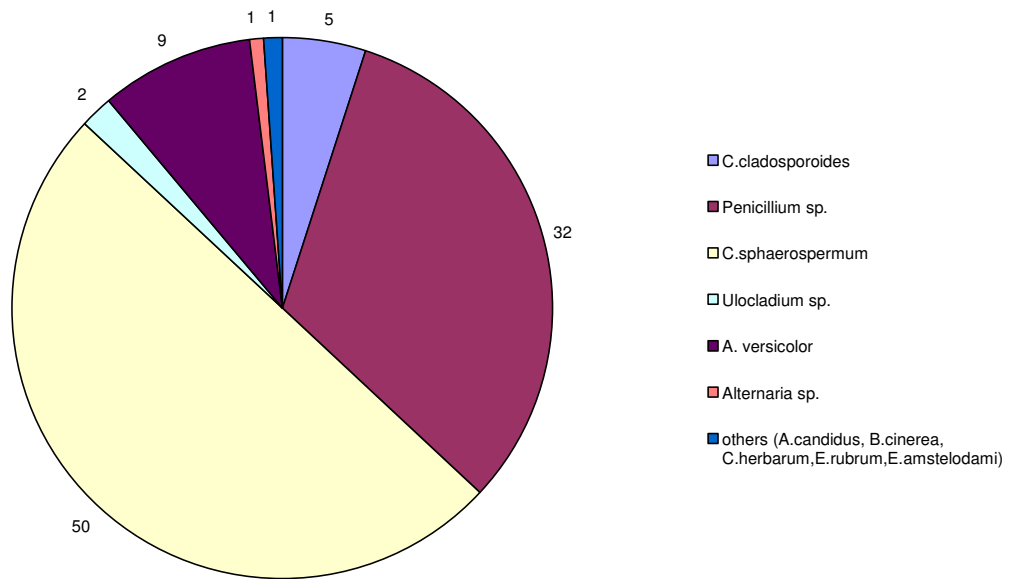


Lučenec, Lehota

Obr. 14. Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas zimného obdobia

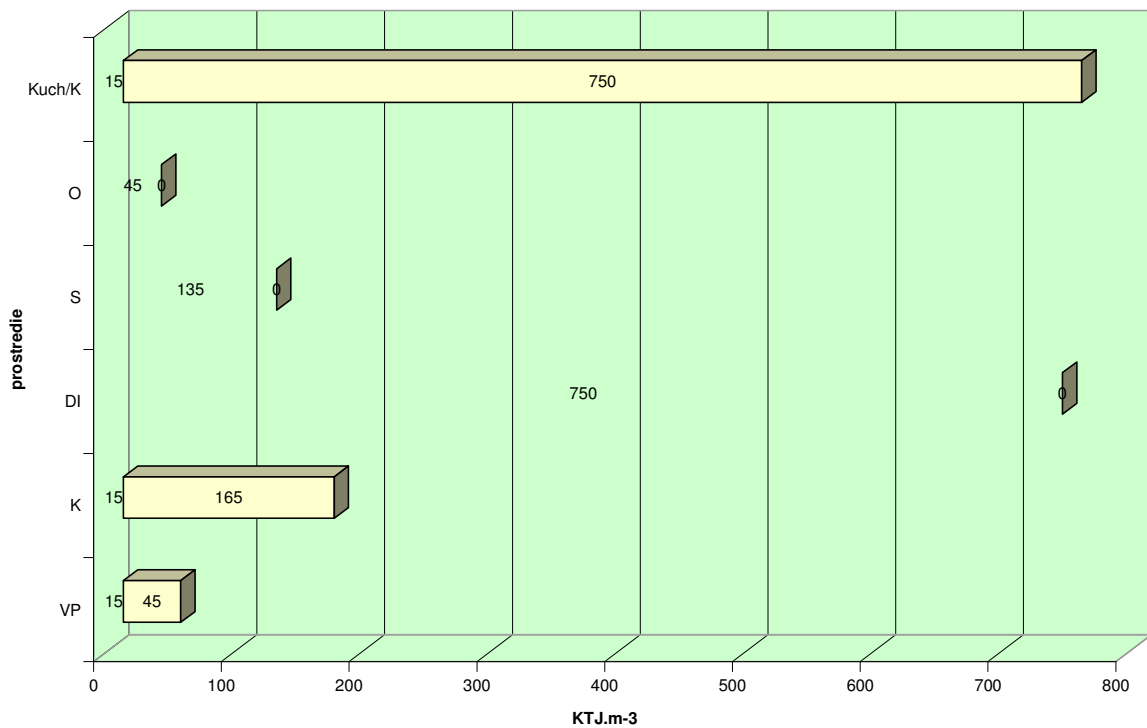


**Obr. 15.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v zimnom období

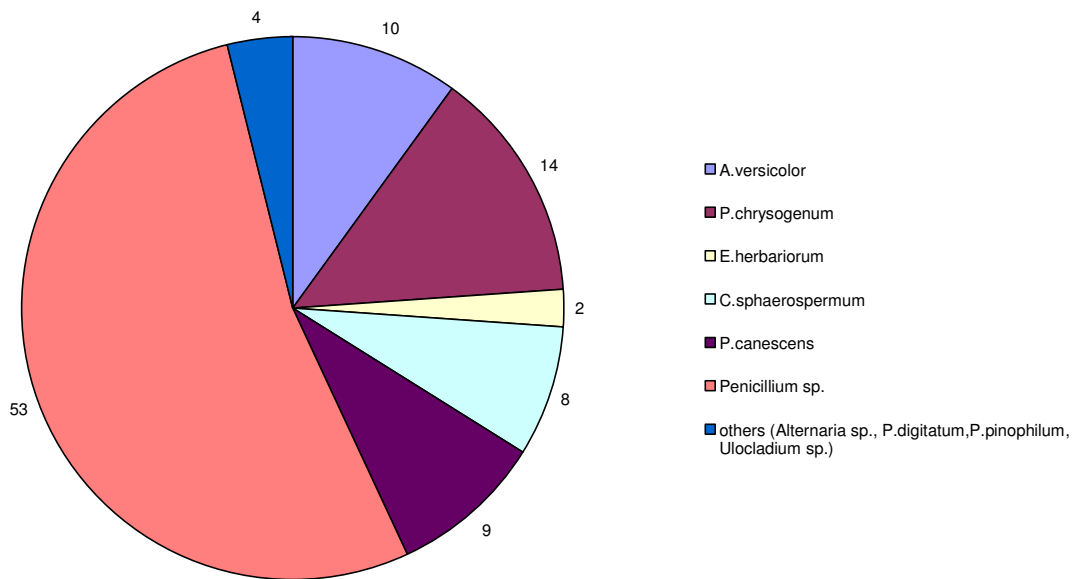


Hodruša-Hámre, Banská Bystrica

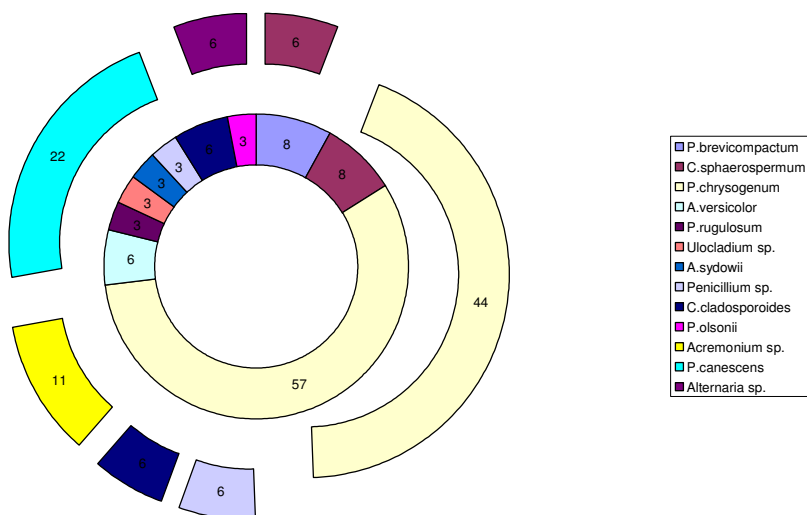
**Obr. 16.** Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas jarného obdobia



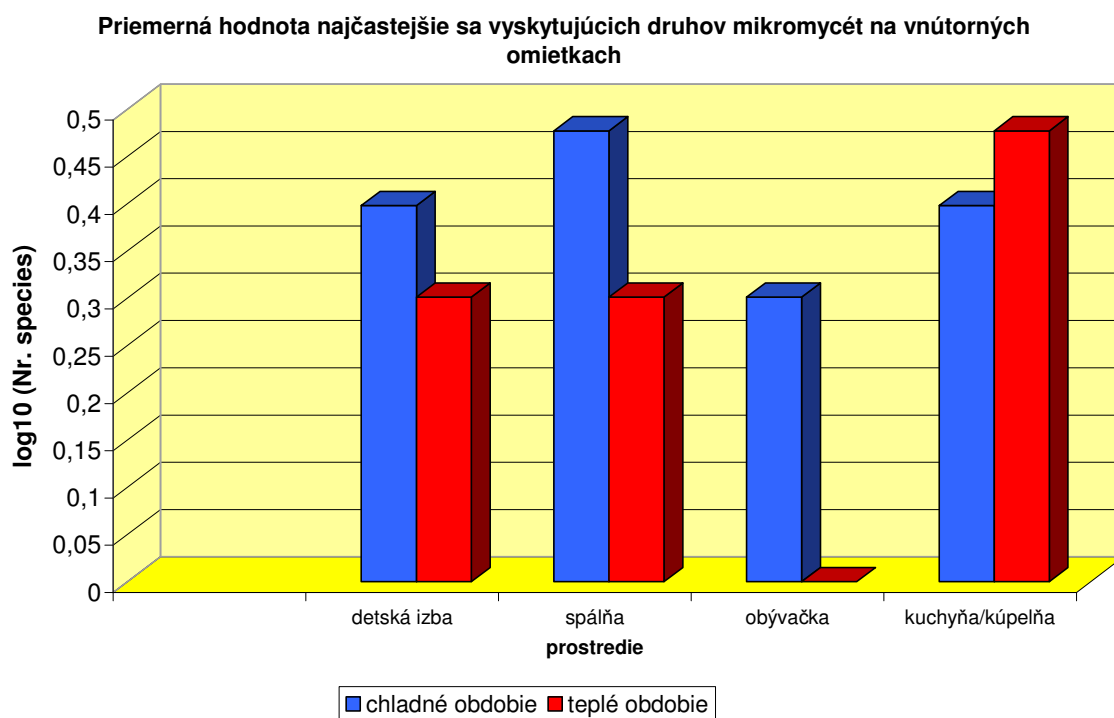
**Obr. 17.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v teplejšom období roka



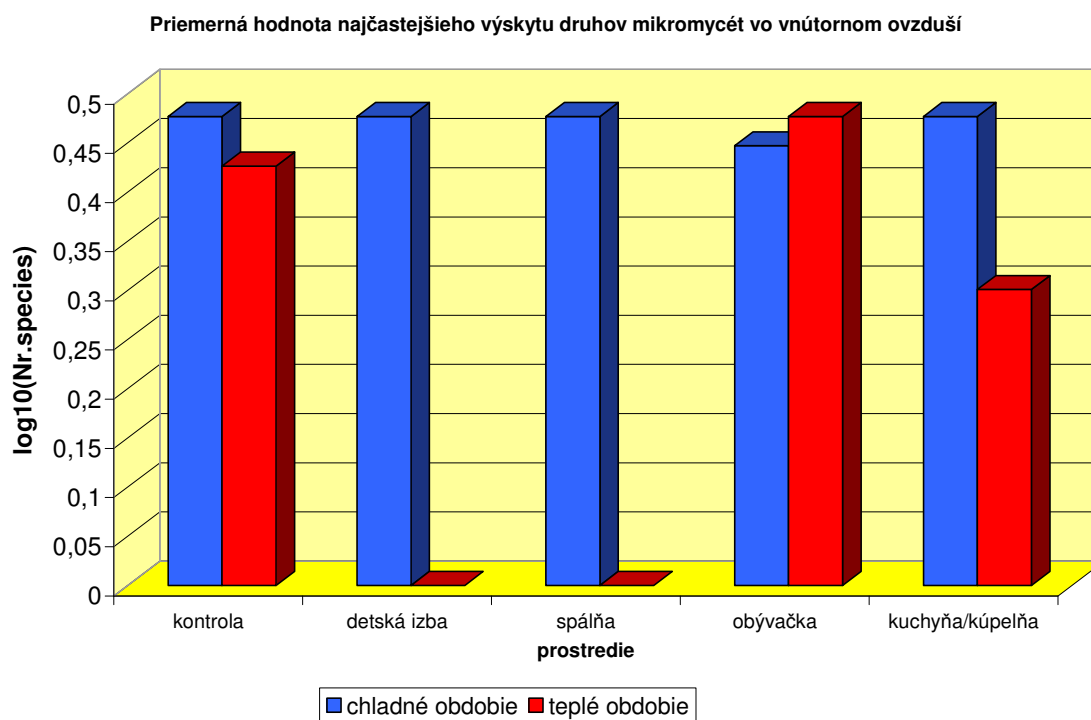
**Obr. 18.** Frekvencia výskytu hubových izolátov z vnútorných povrchov počas jarného (vonkajší kruh) a zimného (kruh vnútorný) obdobia v oblastiach s približne rovnakými klimatickými podmienkami (LC, Lehota vs. BB, Hodruša-Hámre)



Obr. 19.

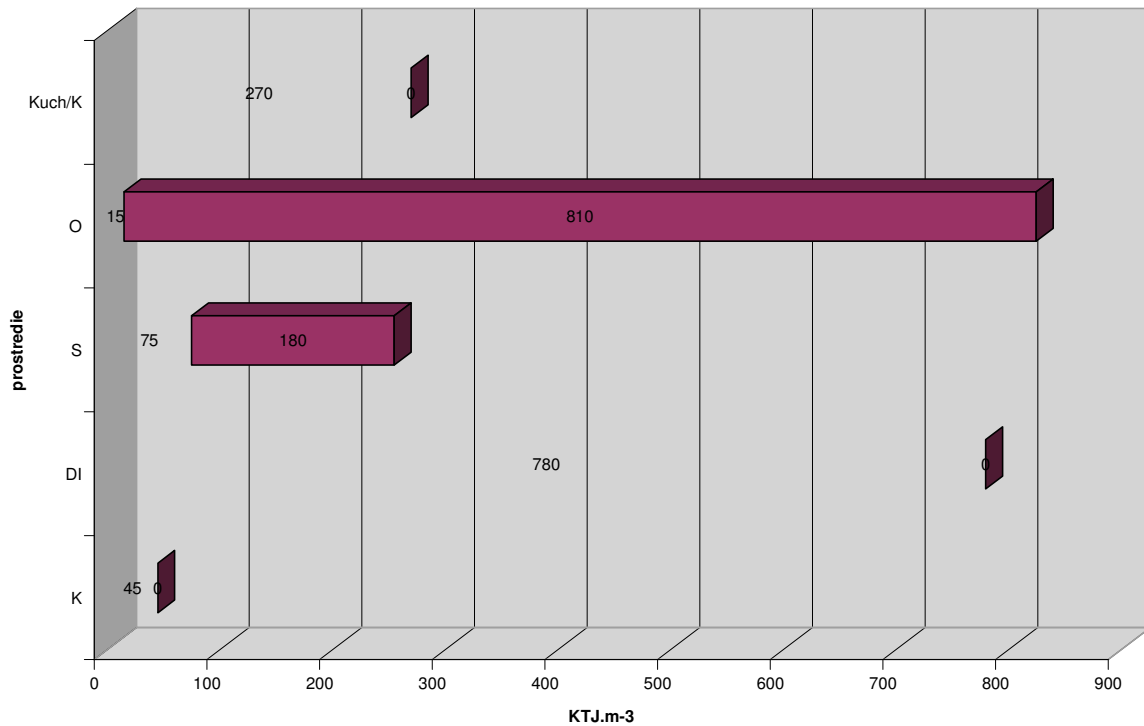


Obr. 20.

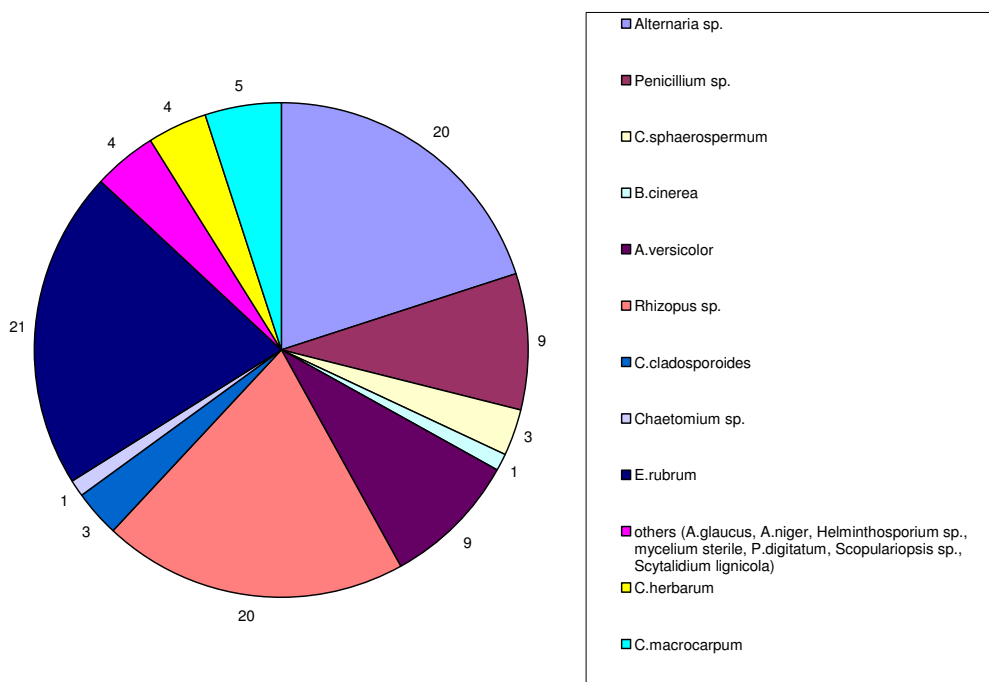


Kvetoslavov, Bratislava (juh, západ)

**Obr. 21.** Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas zimného obdobia



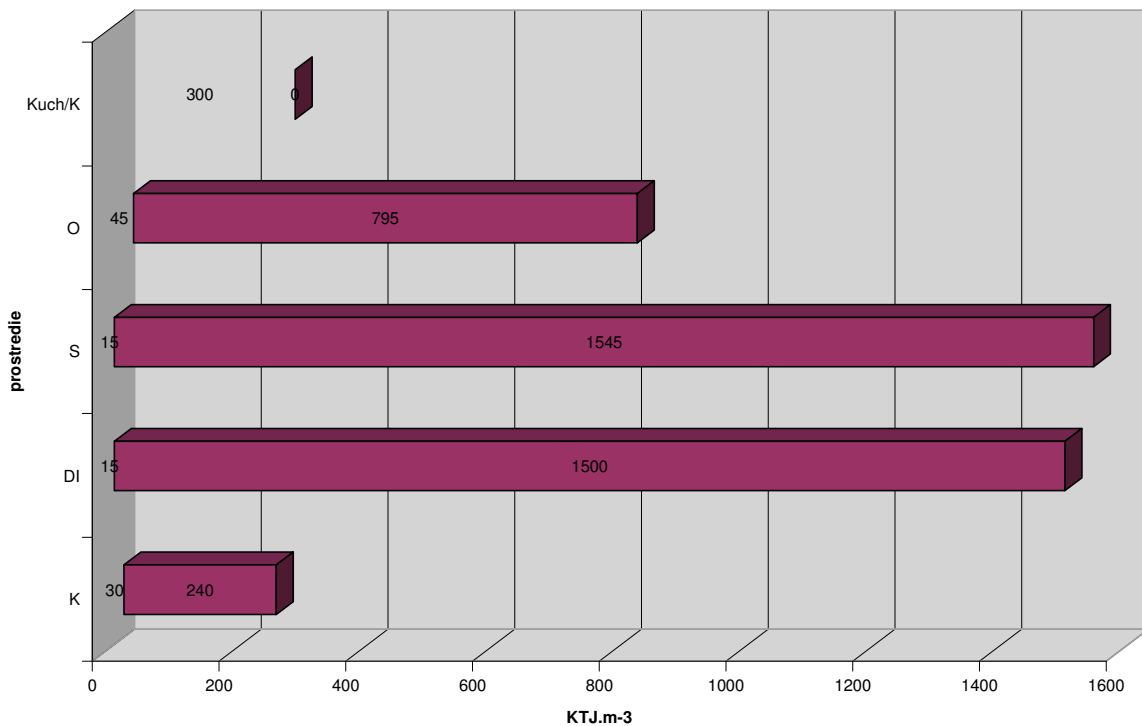
**Obr. 22.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v zimnom období



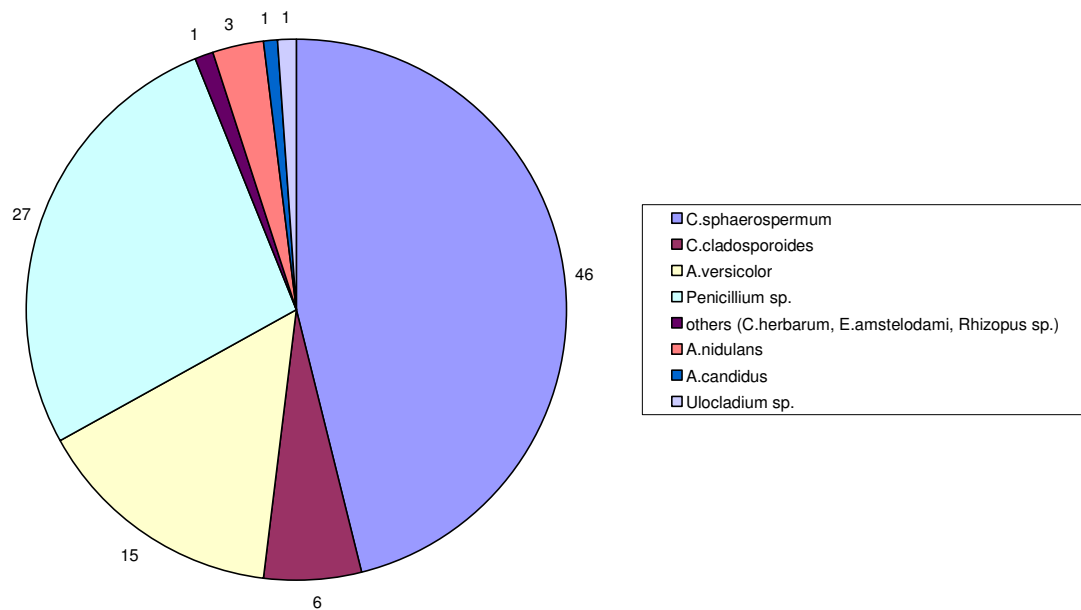


Šurany, Komárno, Hurbanovo

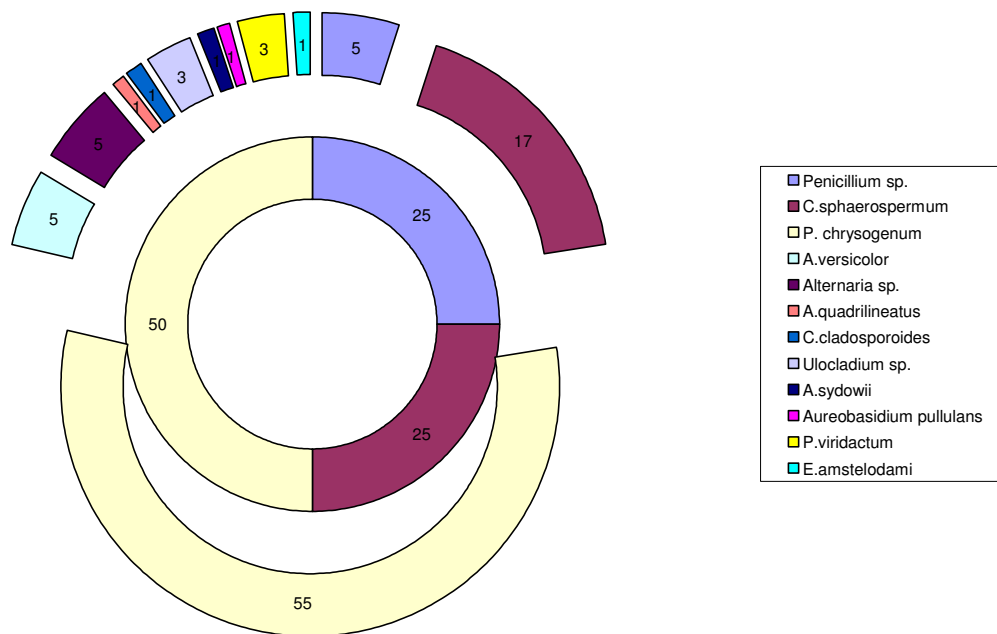
**Obr. 23.** Min-max počty kultivovateľných hubových zárodkov počas jarného obdobia



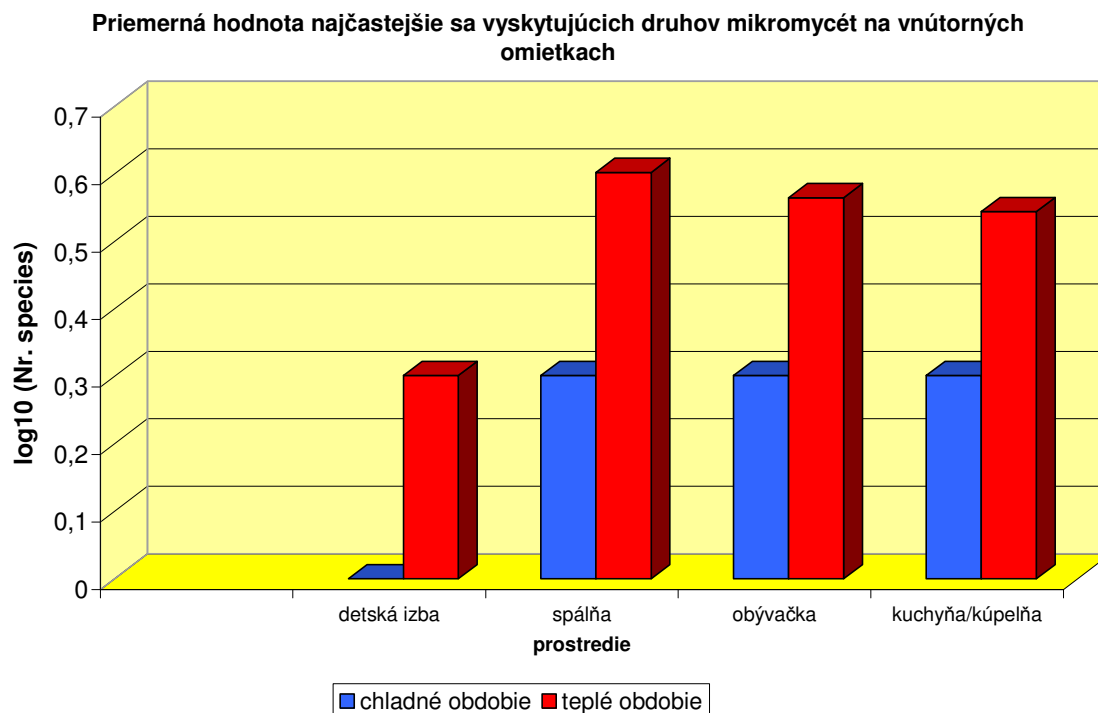
**Obr. 24.** Relatívne zastúpenie [%] kultivovateľných hubových zárodkov vo vnútornom ovzduší bytov v teplejšom období roka



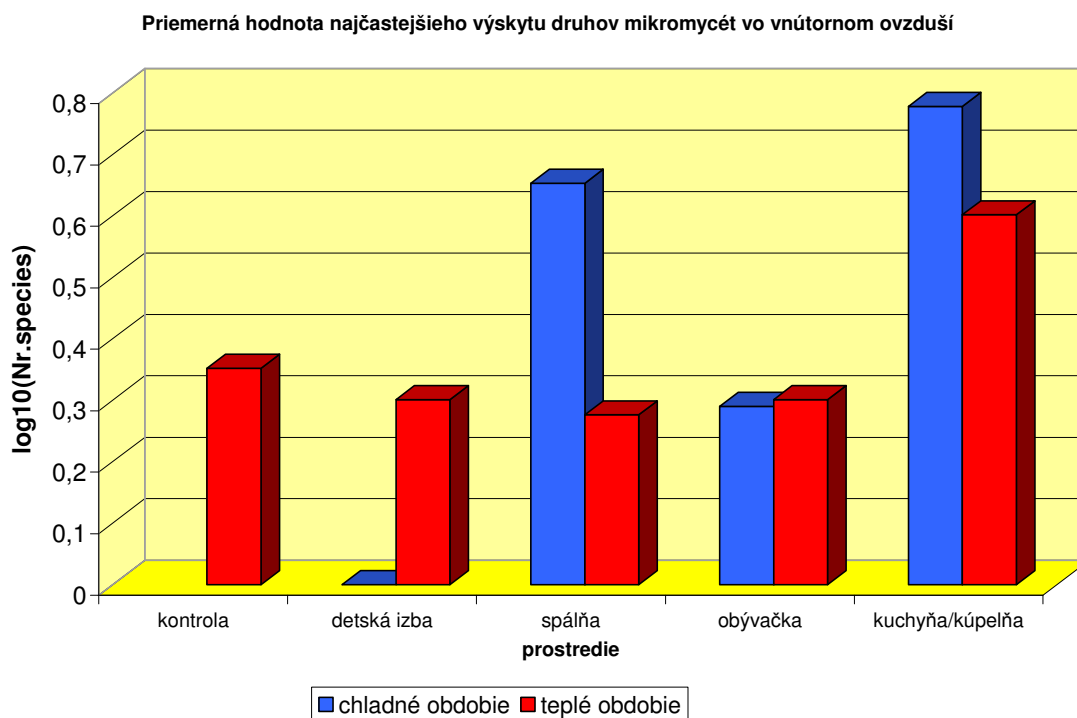
**Obr. 25.** Frekvencia výskytu hubových izolátov z vnútorných povrchov počas jarného (vonkajší kruh) a zimného (kruh vnútorný) obdobia v oblastiach s približne rovnakými klimatickými podmienkami (BA – juh, západ, Kvetoslavov vs. Šurany, KN, Hurbanovo)



**Obr. 26.**



Obr. 27.



## ***Fusarium poae* (Peck) Wollenweber, potenciálny zdroj A- a B-trichotecénov v obilninách**

ZUZANA PIOVARČIOVÁ, ROMAN LABUDA, DANA TANČINOVÁ, GEORG HÄUBL

**PIOVARČIOVÁ, Z., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., HÄUBL, G.: *Fusarium poae* (Peck) Wollenweber, potential source of A- and B- trichothecenes on wheat.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 117-123. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

A total of 17 *Fusarium poae* strains recovered from wheat samples originated in several areas of Slovakia during the season period 2006 were tested for their ability to produce selected A- as well as B- trichothecenes *in vitro*. Of the A-trichothecenes, formation of monoacetoxyscirpenol (MAS) and diacetoxyscirpenol (DAS) was detected in all strains tested. While T-2 toxin production was observed only in 18 % strains, the HT-2 toxin formation was not observed in none of the strains tested. Of the B-trichothecenes, production of fusarenon-X (FX) was found in 88 % of the strains, while nivalenol (NIV) was detected only from 12 % of the strains.

**Keywords:** mycotoxins, toxicity, wheat.

Zuzana Piovarčiová, Roman Labuda, Dana Tančinová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail:

[zuzana.piovarciova@uniag.sk](mailto:zuzana.piovarciova@uniag.sk)

Georg Häubl, R&D, Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

\* Presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

### **Úvod**

*Fusarium poae* (Peck) Wollenw. bolo po prvýkrát popísané v roku 1902 ako *Sporotrichum poae* mykológom Charlesom H. Peckom. V roku 1913 ho H. W. Wollenweber zaradil do rodu *Fusarium* (DESJARDINS, 2006). *Fusarium poae* je veľmi rozšírené, no najčastejšie sa vyskytuje v miernych pásmach, kde je obvyčajne izolované zo semien a obilných zŕn (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Kolónie sú obvyčajne rýchlo rastúce na kultivačných médiách PDA (Potato Dextrose Agar) a PSA (Potato Sucrose Agar) a majú mycéliá bielej, svetlo ružovkastej, broskyňovej, v blízkosti povrchu agaru červenkastej, alebo fialkovej farby. Reverz má žltočervené odtiene. Vzdušné mycélium je v čerstvých izolátoch obvyčajne hojne zastúpené a má plstnatú až chlpatú formu. Niekedy však môže byť redukované, alebo u nadmerne sporulujúcich druhov môže chýbať. Kolónie, ktoré sú kultivované na SNA (Synthetischer Nährstoffarmer Agar), alebo CLA (Carnation Leaf Agar) sú obvyčajne nepigmentované, majú riedke vzdušné mycélium a ovocnú vôňu (SAMSON et al., 2002a). Makrokonídie, ktoré sa vyskytujú len zriedkavo, majú rovný, niekedy kosákovitý, takmer mesiačikovitý tvar a sú relatívne krátke. Nožná bunka je dobre vyvinutá. Makrokonídie sú 3- až 5-septované a obvyčajne dosahujú najväčšiu hrúbku v okolí stredného septa. Mikrokonídie sú globózneho (okružleho) až citrónovitého tvaru a vznikajú hojne v charakteristických zhlukoch na monofialidách. Nepriítomnosť polyfialíd umožňuje priamo odlíšiť *F. poae* od *F. sporotrichioides* (DESJARDINS, 2006; LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Z mykotoxikologického hľadiska predstavuje druh *F. poae* potenciálneho producenta nasledovných toxických metabolitov, ktorých toxicita je uvedená v tabuľke č. 1.

Pretože druh *F. poae* patril medzi najčastejšie diagnostikované druhy fuzárií vo vzorkách pšenice dopestovanej v sezóne 2006 z rôznych lokalít na Slovensku, cieľom predkladanej štúdie bolo stanoviť metabolický profil vybraných čerstvých kmeňov tejto huby zachytených na zrne pšenice (12 vzoriek v ekologickom a 6 vzoriek v konvenčnom systéme hospodárstva) so zameraním na vybrané mykotoxíny.

**Tab. 1.** Potenciálne toxické metabolity kmeňa *F. poae* (WEIDENBÖRNER, 2001).

Mykotoxín		Toxicita
Monoacetoxyscirpenol (MAS)	A-trichotecén	- bilaterálne zápaly oblasti zobáka a gastrointestinálne hemoragie u vtákov, dermatotoxicita u potkanov
Diacetoxyscirpenol (DAS)	A-trichotecén	- karcinogénne, dermatotoxické, hemoragické a fytotoxické účinky - alimentárna toxická aleukia
Neosolaniol (NEO)	A-trichotecén	- degenerácia buniek, nepriaznivé účinky na lymfatické uzliny, slezinu, kostnú dreň, tráviaci trakt a na semenníky - je dermatotoxický
HT-2 toxín	A-trichotecén	- dermatotoxické účinky - inhibuje iniciačný krok pri syntéze proteínov
T-2 toxín	A-trichotecén	- dermatotoxické, imunosupresívne, karcinogénne účinky - vyvoláva dávenie, zápaly a hemoragie tráviaceho traktu, edémy, leukopéniu, degenerácie kostnej drene, až smrť u dobytky a prasiat
Fuzarenón-X (FX)	B-trichotecén	- imunosupresívne, karcinogénne a cytotoxické účinky - môže vyvolávať dávenie, hnačky - na experimentálnych zvieratách vyvoláva hypotermiu a spomalené dýchanie
Nivalenol (NIV)	B-trichotecén	- vyvoláva dávenie - dermatotoxické účinky - inhibuje syntézu DNA, čo zároveň inhibuje aj syntézu proteínov
Beauvericín (BEA)		- je vysokotoxický pre hmyz, myši a ľudské bunky, v ktorých vyvoláva apoptózy

## Materiál a metodika

Schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny bola stanovená podľa metódy agarových výsekov z čistých kultúr podľa SAMSON et al. (2002b) a samotná detekcia mykotoxínov podľa SULYOK et al. (2006).

Čerstvé kmene *Fusarium poae* boli kultivované na agare s kvasničným extraktom a sacharózou pri teplote 25 °C, po dobu 7 dní v tme. Z narastených kolónií bol aj s agarom vykrojený štvorec približnej veľkosti 2 cm x 2cm a v malých kúskoch bol vložený do

Eppendorfovej skúmavky spolu s 0,5 ml roztoku chloroform:metanol (2:1; v/v) (chloroform - Reachem Slovakia s. r. o., Bratislava; metanol – Slavus s. r. o., Bratislava). Extrakcia mykotoxínov bola vykonaná výdatným miešaním sústavy po dobu 5 min na vortexe (V1 plus, Boeco, Nemecko), pričom surové extrakty boli následne prefiltrované a koncentrované vysušením pri teplote cca 60 °C. Pred samotnou detekciou bola vzorka (extrakt) zmiešaná s 1000 µl roztoku acetonitril:voda (1:1; v/v) a následne premiešaná na prístroji IKA MS1 Minishaker (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko). Filtrácia zriedeného extraktu do HPLC vialiek bola vykonaná pomocou filtrovacej striekačky (Minisart SRP 4 Satorius, Nemecko) o priemere 4 mm, s veľkosť pórov 0,45 µm. Toxíny boli detekované a kvantifikované podľa SULYOK ET AL. (2006) na zariadení QTrap 4000 LC/MS/MS vybavenom TurboIonSpray ESI zdrojom a 1100 Series HPLC systémom. Chromatografická separácia bola vykonaná pri teplote 25 °C na zariadení Gemini 5 µ C<sub>18</sub>, 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex, USA).

## Výsledky a diskusia

Vo vzorkách zŕn pšenice (*Triticum aestivum* L.) určenej na potravinárske účely dopestovanej v rôznych lokalitách Slovenska v sezóne 2006 bola preukázaná najväčšia frekvencia výskytu druhov *Fusarium graminearum* (56 %) a *F. poae* (50 %). V menšej miere sa vyskytovalo aj *F. avenaceum* (22 %) a len zriedkavo *F. culmorum* (6 %) a *F. tricinctum* (6 %). Zvýšená incidencia *F. poae* na pšenici môže indikovať kontamináciu zrna rôznymi typmi trichotecénov. Medzi dôležité toxíny patria A-trichotecény - diacetoxyscirpenol (DAS), monoacetoxyscirpenol (MAS), T-2 toxín, HT-2 toxín a neosolaniol (NEO), a rovnako tak i B-trichotecény - nivalenol (NIV) a fuzarenón-X (FX) (MOSS & THRANE, 2004; THRANE et al., 2004; DESJARDINS, 2006). Práve produkciou B- trichotecénov sa *F. poae* chemicky odlišuje od blízkych príbuzných v sekcii *Sporotrichiella*, a to *F. sporotrichioides* a *F. langsethiae* (TORP & NIRENBERG, 2004; THRANE et al., 2004).

Ako vyplýva z tabuľky č. 2, je zrejmé, že *F. poae* nepredstavuje výrazné riziko, pokiaľ ide o produkciu A- trichotecénov typu T-2 a HT-2 toxínov, avšak situácia je opačná v prípade A-trichotecénov typu DAS a MAS, ktoré boli detekované vo veľkých kvantitách pri všetkých testovaných kmeňoch. Podobné výsledky reportovali aj THRANE ET AL. (2004), ktorí zaznamenali produkciu T-2 a HT-2 toxínov len v malom percente testovaných kmeňov z rôznych oblastí Európy, pričom DAS a MAS produkovalo 46, resp. 45 zo 49 testovaných kmeňov. Z B- trichotecénov, izoláty *F. poae* testované v tejto štúdii produkovali najčastejšie FX (88 % kmeňov), zatiaľ čo NIV bol produkovaný len 12 % kmeňov.

Pokiaľ ide o produkciu B- trichotecénov (deoxynivalenolu - DON, NIV a FX) v pšenici a iných obilninách BOTTALICO & PERRONE (2002) uvádzajú, že najdôležitejším producentom je *F. graminearum*, ktorý je spolu s *F. culmorum* zároveň aj najčastejším etiologickým agensom fuzarióz obiliek pšenice. Aj pre oblasť Slovenska ŠROBÁROVÁ (2001) upozornila na častú koincidenciu *F. graminearum* s *F. culmorum*, a je preto zaujímavé, že *F. culmorum* bol počas tejto štúdie izolovaný len z jednej vzorky a bol reprezentovaný len jediným kmeňom.

Vo všeobecnosti v súvislosti s fuzariózou obiliek pšenice *F. poae* v štúdiách iných autorov vystupuje ako menej frekventovaný druh (BOTTALICO & PERRONE, 2002), hoci zriedkavo jeho zvýšený výskyt až dominanciu hlásili z niektorých oblastí Európy (LOGRIECO et al., 2002; DESJARDINS, 2006).

**Tab. 2.** Produkcia A- a B trichotecénov kmeňmi *Fusarium poae* izolovanými zo pšenice v sezóne 2006 na Slovensku.

	MAS	DAS	FX	NIV	HT-2	T-2
Číslo kmeňa	μg/L					
<b>Ekologické poľnohospodárstvo:</b>						
1.	2,97	191	-	-	-	-
2.	5540	11000	1260	-	-	-
3.	1,66	298	-	-	-	-
4.	207	7780	669	-	-	-
5.	938	15800	1130	-	-	-
6.	66,7	5490	217	-	-	-
7.	616	5430	272	-	-	-
8.	221	8920	754	-	-	-
9.	4750	12400	1460	-	-	-
10.	35,7	1940	165	-	-	-
11.	77,9	1420	459	-	-	-
12.	1890,2	282	36,1	6,34	-	26
<b>Konvenčné poľnohospodárstvo:</b>						
13.	266	2180	115	-	-	-
14.	13,9	7340	455	-	-	-
15.	679	7340	396	-	-	-
16.	640,2	72,1	38,8	-	-	10,8
17.	515,2	52,9	31,6	1860	-	36

## Záver

Z dôvodu, že % toxinogenity *F. poae* pre niektoré A- a B- trichotecény sa javí byť relatívne vysoké, bude pre oblasti s nadmerným výskytom druhu *F. poae* (vrátane Slovenska) potrebné venovať zvýšenú pozornosť kontaminácii pšenice mykotoxínmi, ako sú DAS, MAS a FX.

## Pod'akovanie

Štúdiá bola financovaná projektom VEGA 1/3456/06.

## Prehľad literatúry

- BOTTALICO, A., PERRONE, G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 998-1003.
- DESJARDINS, A. E., 2006. *Fusarium* Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology. The American Phytopathological Society, Minnesota, 260 p.
- LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Australia, 388 p.
- LIU, W. Z. ET AL., 1998. Trichothecene production and the relationship to vegetative compatibility groups in *Fusarium poae*. Mycopathologia 140: 105-114.

- LOGRIECO, A., MORETTI, A., RITIENI, A., CAIFFA, M. F., MACCHIA, L., 2002. Beauvericin: chemistry, biology and significance. In: UPADHYAY, R. K. (Ed.), *Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation*, pp. 23-30.
- MILLER, J. D., 1991. Trichothecene chemotypes of 3 *Fusarium* species. *Mycologia* 83: 121-130.
- MOSS, M. O., THRANE, U., 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicol. Lett.* 153: 23-28.
- PETTERSSON, H., 1991. Nivalenol production by *Fusarium poae*. *Mycotoxin Res.* 7A: 26-30.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002a. Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 389 p.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C., 2002b. Method for the Detection, Isolation and Characterisation of Food-borne Fungi. In: SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O. (Eds.), *Introduction to Food- and Airborne Fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 283-297.
- SULYOK, M., BERTHILLER, F., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., 2006. Development and validation of a liquid chromatography / tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun. Mass Sp.* 20: 2649-2659.
- ŠROBÁROVÁ, A., 2001. *Fusarium* spp. on cereals in Slovakia. In: LOGRIECO, A. (Eds.), *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe*, Office for official publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 159-165.
- THRANE, U., 1990. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. *J. Microbiol. Meth.* 12: 23-39.
- THRANE, U., HANSEN, U., 1995. Chemical and physiological characterization of taxa in the *Fusarium sambucinum* complex. *Mycopathologia* 129: 183-190.
- THRANE, U., ADLER, A., CLASEN, P. E., GAVANO, F., LANGSETH, W., LOGRIECO, A., NIELSEN, K. F., RITIENI, A., 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *Inter. J. Food Microbiol.* 95: 257-266..
- TORP, M., LANGSETH, W., 1999. Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia* 147: 89-96.
- TORP, M., NIRENBERG, H. I., 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *Inter. J. Food Microbiol.* 95: 247-256.
- UENO, Y., AIKAWA, Y., OKUMURA, H., SUGIURA, Y., NAKAMURA, K., MASUMA, R., TANAKA, T., YOUNG, C. Y., SAVARD, M. E., 1997. Trichothecenes produced by *Fusarium* species Fn 2B. *Mycotoxins* 45: 25-31.
- WEIDENBÖRNER, M., 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Gießen, 294 p.



## Výskyt *Alternaria* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006

ZUZANA PIOVARČIOVÁ, ROMAN LABUDA, DANA TANČINOVÁ

### PIOVARČIOVÁ, Z., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D.: The occurrence of *Alternaria* spp. on wheat in Slovakia during season 2006.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 124-132. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

This pilot study was focused on monitoring of *Alternaria* species-groups occurring on wheat (from conventional and ecological farming system) harvested in Slovakia during the season 2006. The endogenous contamination of wheat kernels with *Alternaria* fungi was observed on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC). In the samples of concern three species-groups of *Alternaria* were recorded, namely *A. alternata*, *A. infectoria* and *A. tenuissima*. In the all samples tested (within both conventional and ecological system), representatives of the *A. tenuissima* species-group were recovered, i.e. with 100 % occurrence frequency. The *A. alternata* spp.-group and the *A. infectoria* spp.-groups were found in a lesser number of the samples with 83 % and 67 % occurrence frequency, respectively, in conventional farming system. Contrary, in the ecological system, the *A. infectoria* spp.-group contaminated 83 % and *A. alternata* spp.- group 67 % of wheat samples. A total of 320 isolates of the genus *Alternaria* were recovered from 6 samples of the conventional farming system being represented by 40 % *A. alternata* spp.-group, 34 % *A. infectoria* spp.-group, and 26 % *A. tenuissima* spp.-group. In the ecological farming system, a total of 561 *Alternaria* isolates were recovered (from 12 wheat samples) and they were represented by 7 % *A. alternata* spp.-group, 56 % *A. infectoria* spp.-group, and 37 % *A. tenuissima* spp.-group. The capability to produce altenuene, alternariol, and alternariol monomethyl ether was screened in selected *Alternaria* strains. None of the *A. infectoria* spp.-group strains exhibited toxigenic potential for the mycotoxins, while strains of the remnant two species-groups (*A. alternata* and *A. tenuissima*) showed 100 % toxigenity for them. These preliminary outcomes stress on a risk due to potential contamination of wheat *per se* by hazardous *Alternaria* toxins.

**Keywords:** altenuene, alternariol, alternariol monomethyl ether, cereals, identification, mycotoxins, toxinogenity.

Zuzana Piovarčiová, Roman Labuda, Dana Tančinová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [zuzana.piovarciovaa@uniag.sk](mailto:zuzana.piovarciovaa@uniag.sk)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Rod *Alternaria*, vďaka kozmopolitnému rozšíreniu, môžeme nájsť na širokej škále materiálov a produktov. Obsahuje druhy, ktoré môžu byť saprotrofy, alebo patogénne organizmy, ktoré sú schopné spôsobovať choroby na plodinách. Ako saprotrofy sú schopné spôsobiť kazenie potravín a krmív a produkovať mykotoxíny a iné biologicky aktívne látky (ANDERSEN et al., 2001). Ako rastlinné patogény môžu spôsobovať vážne problémy v poľnohospodárstve znížením úrody a plesnivením pri uskladňovaní (STRANDBERG, 1992). Podľa ABRAMSONA ET AL. (1980) môžu niekedy alternárie kontaminovať až 90 % zrn. Ich spóry sa i napriek veľkej veľkosti môžu rozptyľovať stovky míľ od zdroja. Najviac spór z rodu *Alternaria* sa nachádza v suchom prostredí, počas veterných dní v rozsahu 500 – 1000 m<sup>3</sup>, v trávnatých alebo obilninárskych oblastiach (WEBER, 2001). Obilné zrná môžu byť v niektorých prípadoch infikované rodom *Alternaria* do takej miery, že hovoríme o tzv.

čiernej škvrnitosti, čo je jedna z najčastejších poľných alebo pozberových chorôb obilia (BOTTALICO & LOGRIECO, 1992).

Mikromycéty rodu *Alternaria* sa na kultivačných médiách vyznačujú rýchlym rastom a tvoria spočiatku biele, neskôr šedé až olivovo hnedé kolónie. Textúra prechádza od zrnitého až k vlnitému vzhľadu. Charakteristická je tvorba hrubostenných, vo viacerých rovinách predelených makrokonidií dictyospór), obvykle zafarbené v tmavohnedých odtieňoch (MALÍŘ et al., 2003). Jednotlivé druhy rodu *Alternaria* sú schopné produkovať širokú škálu chemicky odlišných látok. Niektoré sú toxické pre cicavce a vtáky (mykotoxíny) a iné pre rastliny (fytotoxíny) (KING & SHADE, 1984). Pretože *Alternaria* predstavuje typický rod tzv. poľných húb (JESENSKÁ, 1987), ktorý je schopný produkovať rôzne štrukturálne typy mykotoxínov, je dôležité sledovať ich výskyt v surovinách na výrobu potravín, ako sú napr. rôzne druhy obilnín

Cieľom tejto, naďalej prebiehajúcej štúdie, bolo predložiť predbežné výsledky zhodnotenia výskytu a zastúpenia jednotlivých toxikologicky významných druhov z rodu *Alternaria* v potravinárskej pšenici (*Triticum aestivum*) a poukázať na význam implementácie nových taxonomických postupov pri identifikácii jednotlivých taxónov.

## **Materiál a metodika**

### **Vzorky**

V pokusnom roku 2006 bolo sledované zloženie endogénnej mykocenózy potravinárskej pšenice so zameraním na rod *Alternaria*. Analyzované vzorky boli odobraté z pšenice pestovanej v konvenčnej a ekologickej sústave obhospodarovania pôdy z rôznych lokalít a mykologické analýzy boli vykonané ihneď po odbere vzoriek.

### **Izolácia**

Na stanovenie endogénnej kontaminácie bola použitá metóda priameho ukladania pšeničných zŕn na agarové platne po predchádzajúcej sterilizácii zŕn v 0,4 % roztoku NaOCl. Po povrchovej sterilizácii bolo z každej vzorky uložených 100 zŕn na DRBC agar a podrobených kultivácii počas 7 dní pri teplote 25 °C.

### **Identifikácia**

Pre štúdium morfológických a kultivačných znakov rodu *Alternaria* bolo nevyhnutné získať čisté kultúry jednotlivých kmeňov. Proces izolácie bol prevedený preočkovaním na PCA živnú pôdu (Potato-carrot agar, zemiakový-mrkvový agar) a uvedené bolo kultivované pri izbovej teplote pri prirodzenom rozptýlenom svetle (SIMMONS, 1992).

Identifikácia rodu *Alternaria* bola primárne vykonaná podľa SIMMONS & ROBERTS (1993), ANDERSEN ET AL. (2001, 2002) a DUGAN & PEEVER (2002).

SIMMONS & ROBERTS (1993) definovali 6 rôznych sporulačných paternov, ktoré zahŕňajú 3-dimenzionálne štruktúry konidií a konidiofórov pri 50-násobnom priblížení. Tento poznatok bol nosný pri určovaní alternárií a ich rozdelenie je nasledovné:

#### **Sporulačný patern 1**

- krátke až stredne dlhé reťazce 5 – 10 konidií,
- vetvenie reťazcov sa nevyskytuje, alebo je minimálne,
- reťazce sa obyčajne javia štíhle v porovnaní so skupinou 2.,

### **Sporulačný patern 2**

- krátke až stredne dlhé, nerozvetvené reťazce (max. 10 konídií),
- väčšina konídií v reťazcoch sa javí byť masívne a širšie v porovnaní so skupinou 1.,

### **Sporulačný patern 3**

- rozkonárené, kompaktné, alebo otvorené zhluky vetviacich sa reťazcov krátkej až stredne dlhej dĺžky,
- nápadný „kmeň“, podobajúci sa stromu, je tmavý
- má krátky a niekedy až veľmi dlhý primárny konídiofór, ktorý vyrastá priamo zo substrátu, alebo z vetviacich sa hýf a sporuluje hlavne blízko jeho vrcholu,

### **Sporulačný patern 4**

- husté zhluky dobre rozvetvených reťazcov konídií,
- primárne konídiofóry sú krátke, alebo nenápadné v porovnaní so skupinou 3.,

### **Sporulačný patern 5**

- stredne dlhé až dlhé reťazce 10 – 15 (20) konídií,
- vetvenie je minimálne, alebo absentuje,
- konídie sa javia trochu tenké a obyčajne chýba robustný vzhľad ako pri skupine 2.,

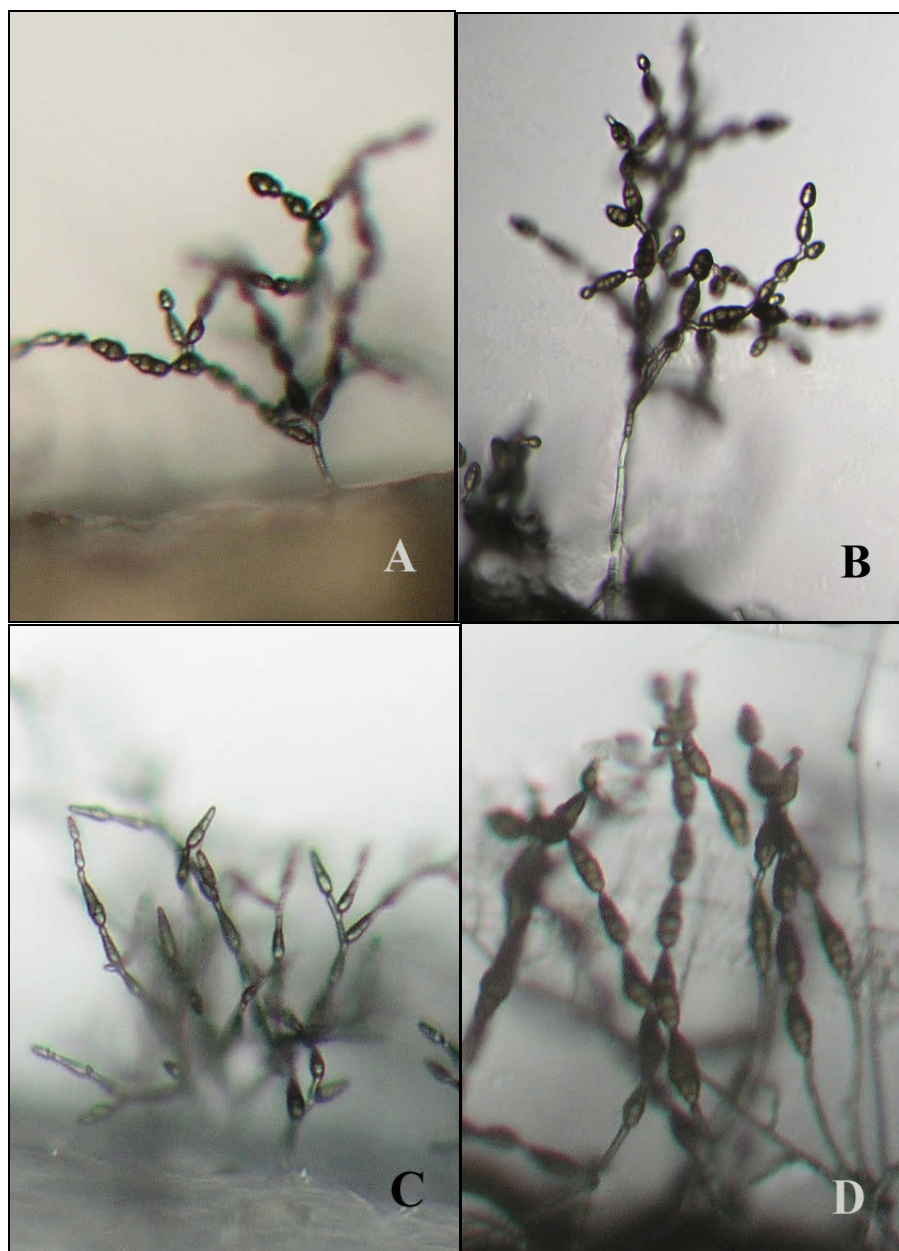
### **Sporulačný patern 6**

- voľné zhluky vetviacich sa reťazcov,
- širšie sporulačné orgány sú spojené prerušeným, často drsným, predĺženým sekundárnym konídiofórom (SIMMONS & ROBERTS, 1993).

## **Stanovenie toxinogenity**

Po identifikácii boli jednotlivé druhy preočkované na platne s YES agarom (kvasničný agar so sacharózou) (SAMSON ET AL., 2002) a kultivované pri 25 °C, 7 - 14 d, v tme. Po siedmych a štrnástich dňoch boli jednotlivé izoláty testované na schopnosť produkovať altenuén (ALT), alternáriol monometyléter (AME) a alternáriol (AOH) pomocou tenkovrstvovej chromatografie. Táto metóda spočíva v extrakcii mykotoxínov pomocou roztoku chloroform : metanol (2 : 1; Reachem, SR) a v následnom nanášaní extraktu na chromatografickú platňu (Alugram®SIL G, Macherey – Nagel, Nemecko). Zmes toluénu : etylacetátu : kyseliny mravčej (5 : 4 : 1; toluén – Mikrochem; etylacetát a kyselina mravčia – Slavus, SR) bola použitá ako chromatografická sústava. Identita stanovených mykotoxínov bola potvrdená na základe porovnania so štandardami (ALT, AME; Merck, Nemecko). Identita AOH bola stanovená na zariadení QTrap 4000 LC/MS/MS vybavenom TurboIonSpray ESI zdrojom a 1100 Series HPLC systémom. Chromatografická separácia bola vykonaná pri teplote 25 °C na zariadení Gemini 5 μ C<sub>18</sub>, 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex, USA).

**Obr. 1.** **A** – *A. alternata* (E. G. S. 34-016), sporulačný patern č. 4, **B** – *A. arborescens* (BA 578), sporulačný patern č. 3, **C** – *A. infectoria* (E. G. S. 27-193), sporulačný patern č. 6, **D** – *A. tenuissima* (E. G. S. 34-015), sporulačný patern č. 5.



## Výsledky a diskusia

V tejto štúdií bola pozorovaná endogénna kontaminácia pšenice z dvoch typov poľnohospodárstva. V rámci pšenice pochádzajúcej z konvenčného poľnohospodárstva boli odobraté vzorky z dvoch odberových miest – Oponice a Veľké Lovce, ktoré zahŕňali 5 rôznych odrôd. V tejto sústave boli detekované 3 rôzne skupiny alternárií, t.j. *A. alternata*, *A. infectoria* a *A. tenuissima* skupina, pričom ich sporulačné paterny boli zhodné s tými, ktoré uvádza SIMMONS & ROBERTS (1993). Tento spôsob identifikácie a jeho využitie bol využitý a

publikovaný aj slovenskými autormi, ako napr. LABUDA et al. (2005) a LABUDA & TANČINOVÁ (2006). Frekvencie výskytu izolovaných skupín v odrodách udáva Tab. 1.

**Tab. 1** - Frekvencia výskytu skupín *Alternaria* spp. vo vzorkách (6) pšenice z konvenčného poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.

Druh	<i>A. alternata</i>	<i>A. infectoria</i>	<i>A. tenuissima</i>
Pozitívne vzorky zo	5	4	6
Frekvencia druhov	83%	67%	100%

Medzi skupiny s najväčšou výskytovou variabilitou (početnosť izolátov) patrili *A. alternata* a *A. infectoria*, kde sa počty v jednotlivých odrodách pohybovali od 0 po 50 izolátov (Tab. 2). BOTTALICO & LOGRIECO (1992) vo svojej štúdii tiež potvrdili, že skupina *A. alternata* patrila medzi najčastejšie sa vyskytujúce skupiny a hovoria, že táto skupina je typickým pôvodcom choroby listov pšenice a je možné, že následne prechádza i na zdravé zrná. Skupina *A. tenuissima* mala v rámci všetkých odrôd relatívne vyrovnané počty izolátov, pričom najnižší počet bol 7 a najvyšší 17 izolátov.

**Tab. 2.** Endogénna kontaminácia vo vzorkách (6) pšenice z konvenčného poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.

Číslo vzorky	Odborné miesto	Odroda	<i>A. alternata</i>	<i>A. infectoria</i>	<i>A. tenuissima</i>
1.	Oponice	AXIS I.	50	0	7
2.	Oponice	AXIS II.	5	37	17
3.	Oponice	SOLARIA	0	29	15
4.	Oponice	ARMELIS	6	42	11
5.	Veľké Lovce	HANA	29	1	17
6.	Veľké Lovce	ARIDA	37	0	17

Z ekologického poľnohospodárstva bolo sledovaných 12 rôznych odrôd potravinárskej pšenice. Tieto vzorky reprezentovali opäť 3 zhodné skupiny alternárií, aké sa vyskytli v konvenčnom poľnohospodárstve (Tab. 3).

**Tab. 3.** Frekvencia výskytu skupín *Alternaria* spp. vo vzorkách (12) pšenice z ekologického poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.

Druh	<i>A. alternata</i>	<i>A. infectoria</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> sp.
Pozitívne vzorky	8	10	12	1
Frekvencia druhov	67%	83%	100%	8%

V prípade jednej odrody boli 3 izoláty zaradené do skupiny *Alternaria* spp., a to z dôvodu kontaminácie, ktorá znemožnila bližšie určenie skupiny. *A. alternata* sa vyskytovala v 8

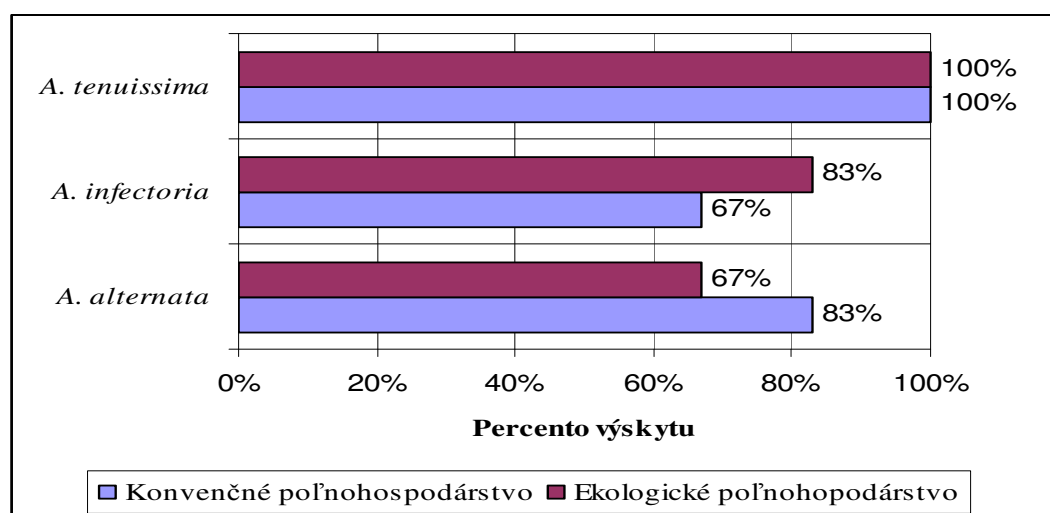
vzorkách a jej maximálny počet v jednej vzorke dosiahol 18 izolátov. Ostatné skupiny sa vyskytli vo väčšom rozsahu – *A. infectoria* od 0 do 60 izolátov a *A. tenuissima* bola detekovaná vo všetkých vzorkách s maximálnym počtom 60 izolátov (Tab. 4).

**Tab. 4.** Endogénna kontaminácia vo vzorkách (12) pšenice z ekologického poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.

Číslo vzorky	<i>A. alternata</i>	<i>A. infectoria</i>	<i>A. tenuissima</i>	<i>Alternaria</i> spp.
1.	2	23	10	0
2.	0	17	6	3
3.	1	39	11	0
4.	2	51	8	0
5.	0	5	38	0
6.	2	0	60	0
7.	0	18	4	0
8.	7	60	7	0
9.	18	0	3	0
10.	2	46	11	0
11.	0	9	43	0
12.	2	48	8	0

Je zrejmé, že populácia tvoriaca *A. tenuissima* skupinu bola zistená vo všetkých vzorkách tak konvenčného, ako i ekologického poľnohospodárstva. Celkový prehľad o zastúpení jednotlivých skupín rodu *Alternaria* poskytuje Graf 1.

**Graf 1.** Porovnanie frekvencie výskytu skupín z rodu *Alternaria* vo vzorkách pšenice z konvenčného (6) a ekologického (12) poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.



**Tab. 5.** Toxinogenita testovaných izolátov získaných z pšenice z konvenčného a ekologického poľnohospodárstva v sezóne 2006 na Slovensku.

Druh	Počet izolátov	ALT		AME		AOH	
		7. deň	14. deň	7. deň	14. deň	7. deň	14. deň
<i>A. infectoria</i>	16	0	0	0	0	0	0
<i>A. tenuissima</i>	18	7	17	17	17	17	17
<i>A. alternata</i>	7	5	7	7	7	7	7

ALT – altenuén, AME – alternáriol monometyl éter, AOH - alternáriol

Produkcia sekundárnych metabolitov (mykotoxínov) na jednej strane poukazuje na toxinogenitu a schopnosť produkovať vybrané nebezpečné metabolity, a na strane druhej, slúži i ako pomocný ukazovateľ pri identifikácii (chemotaxonómia), najmä pri odlíšení *A. infectoria* od ostatných testovaných skupín alternárií. Do dnešnej doby nebola preukázaná produkcia toxických sekundárnych metabolitov kmeňmi v rámci *A. infectoria* skupiny (ANDERSEN & THRANE, 1996, PITT & HOCKING, 1997), avšak u skupín *A. alternata*, či *A. tenuissima* je známe, že produkujú až niekoľko typov mykotoxínov, napr. altenuén, alternáriol a alternáriol monometyl éter (ANDERSEN ET AL., 2002), čo sa potvrdilo i v tejto štúdii. Celkom bolo testovaných 16 kmeňov skupiny *A. infectoria*, 18 kmeňov *A. tenuissima* a 7 kmeňov *A. alternata*. Ako sa očakávalo, *A. infectoria* preukázala 0 % toxinogenitu a naopak zvyšné dve skupiny v každom teste produkovali dané mykotoxíny. Výnimkou bol len 7. deň pri teste na altenuén, avšak na 14. deň sa ukázal ako pozitívny. Z toho dôvodu môžeme v týchto prípadoch hovoriť o 100 % toxinogenite. BOTTALICO & LOGRIECO (1992) uvádzajú, že podľa ich výskumov je *A. alternata* schopná produkovať veľké množstvá toxínov a tiež tvrdia, že jej prirodzený výskyt v obilninách predstavuje skutočné riziko.

V nasledovných tabuľkách (6, 7) je zaznamenaný percentuálny podiel jednotlivých skupín rodu *Alternaria*. Pri porovnaní konvenčného a ekologického poľnohospodárstva sa aj napriek zatiaľ obmedzenému počtu vyšetrených vzoriek ukazuje, že z pohľadu toxinogenity sa javí byť ekologické poľnohospodárstvo výhodnejšie, pretože tu prevažujú netoxinogénne druhy alternárií (*A. infectoria*) nad toxinogénnymi (*A. alternata*, *A. tenuissima*). V ekologickom poľnohospodárstve z celkového počtu alternáriových izolátov *A. infectoria* skupina zastupovala 56 %, pričom v konvenčnom to bolo len 34 % a zvyšok tvorili potenciálne toxínogénne druhy.

Avšak i napriek tomuto tvrdeniu boli v oboch typoch obhospodarovania pôdy vysoké množstvá izolátov rodu *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*), čo môže mať v konečnom dôsledku negatívny vplyv na zdravie človeka.

**Tab. 6.** Celkový počet izolátov a ich podiely v konvenčnom poľnohospodárstve.

Druh	Počet izolátov	% podiel
<i>A. alternata</i>	127	40%
<i>A. infectoria</i>	109	34%
<i>A. tenuissima</i>	84	26%
<b>Spolu</b>	320	100%

Tab. 7. Celkový počet izolátov a ich podiely v ekologickom poľnohospodárstve.

Druh	Počet izolátov	% podiel
<i>A. alternata</i>	36	7%
<i>A. infectoria</i>	316	56%
<i>A. tenuissima</i>	209	37%
Spolu	561	100%

## Záver

Touto štúdiou boli získané poznatky o aktuálnom výskyte druhov z rodu *Alternaria* na pšenici dopestovanej na Slovensku v roku 2006 v dvoch odlišných typoch obhospodarovania pôdy (konvenčné a ekologické). Izoláty rodu *Alternaria* sa s výnimkou *A. infectoria* ukázali vysoko toxinogénne, t.j. produkujúce alternáriol, alternáriol monometyl éter, alternuén. Testované toxíny majú predovšetkým cytotoxické, fétotoxické, teratogénne a mutagénne účinky a z toho dôvodu je dôležité sledovať ich prítomnosť (vrátane ich producentov) v surovinách na výrobu potravín.

## Pod'akovanie

Štúdia bola financovaná projektom VEGA 1/3456/06. Autori sa chcú touto cestou poďakovať prof. E.G. Simmonsovi (Indiana, USA) a dr. B. Andersenovej (TU, Lyngby, Dánsko) za poskytnutie reprezentatívnych kmeňov alternárií. Za stanovenie a potvrdenie identity alternáriolu ďakujeme Ing. G. Häublovi (Biopure, Tulln, Rakúsko).

## Prehľad literatúry

- ABRAMSON, D., SINHA, R. N., MILLS, J. T., 1980. Mycotoxin storage and odor formation in moist cereal grain during granary storage. *Cereal Chemistry* 57: 346.
- ANDERSEN, B., KRØGER, E., ROBERTS, R. G., 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* 106: 170-182.
- ANDERSEN, B., KRØGER, E., ROBERTS, R. G., 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105: 291-299.
- ANDERSEN, B., THRANE, U., 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* 42: 685-689.
- BOTTALICO, A., LOGRIECO, A., 1992. *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. In: CHEŁKOWSKI, J., VISCONTI, A., *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Elsevier, London, 564 p.
- DUGAN, F. M., PEEVER, T. L., 2002. Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from *Poaceae*. *Mycotaxon* 83: 229-264.
- JESENSKÁ, Z., 1987. Mikroskopické huby v požívatínách a v krmivách. Alfa, Bratislava, 319 p.
- KING, A. D. JR., SCHADE, J. E., 1984. *Alternaria* toxins and their importance in food. *J. Food Prot.* 47: 886-901.



- LABUDA, R., KRIVÁNEK, L., TANČINOVÁ, D., MÁTÉOVÁ, S., HRUBCOVÁ, S., 2005. Mycological survey of ripped service tree fruits (*Sorbus domestica* L.) with an emphasis on toxinogenic fungi. *Inter. J. Food Microbiol.* 99 (2): 215-223.
- LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., 2006. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. *Ann. Agri. Environ. Med.* 13: 193-200.
- MALÍŘ, F., OSTRÝ, V., BÁRTA, I., BUCHTA, V., DVOŘÁKOVÁ, I., PAŘÍKOVÁ, J., SEVERA, J., ŠKARKOVÁ, J., 2003. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno, 349 p.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1997: *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, 593 p.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002: *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 389 p.
- SIMMONS, E. G., 1992: *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: CHELKOWSKI, J., VISCONTI, A., *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites, Elsevier, Amsterdam, pp 1-35.
- SIMMONS, E. G., ROBERTS, R. G., 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 48: 109-140.
- STRANDBERG, J. O., 1992. *Alternaria* species that attack vegetable crops: Biology and options for disease management. *Alternaria* Biology. *Plant Dis. Met.*: 175-208.
- WEBER, M. D., 2001. *Annals of Allergy*. [cit. 2005-04-20]. Dostupné na internete: <http://www.salinas-allergyclinic.com>.

# Studium využitelnosti entomopatogenní houby *Paecilomyces farinosus* (Deuteromycota) proti vajíčkům a 1. instarům ploskohřbetky smrkové *Cephalcia abietis* (Insecta, Hymenoptera)

EVA PRENEROVÁ

**PRENEROVÁ, E.: A study of the applicability of entomopathogenous fungus *Paecilomyces farinosus* (Deuteromycota) against the eggs and first instars of the false spruce webworm *Cephalcia abietis* (Insecta, Hymenoptera).**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): 133-139. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The paper refers on the results of a 5-year project „The study of applicability of entomopathogenic fungi (Deuteromycota) against the eggs and first instars of the false spruce webworm *Cephalcia abietis* in the frame of the IPM of the spruce stands”, which was contracted to the Laboratory of Plant Protection, Olešná by the Granting Service of the Forests of the Czech Republic in 2002. The project can be divided into two themes. The problems of the first theme were solved in 2003-2005 and dealt with the development of a new bioagent. Based on earlier experience the entomopathogenic fungus *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*) (Hypocreales) was chosen for *C. abietis*. The aim was to obtain virulent native strains of the fungus from the localities, where this pest naturally occurs in the Czech Republic, namely from soil samples and infected specimens of the target species. Next the quality of the obtained strains was evaluated. Then the conditions of cultivation, finalization and storage were optimized. By the end of 2005 new prototype-bioagents were obtained – oil blastospore paste and frozen blastospore paste based on *I. farinosa*. In the second phase of research (2006-2007) attention was focused on biotesting of the prototypes directly on the target species. Determination of the optimal conditions for the course of infection was done in the laboratory. In standardized biotests on the *Cephalcia* eggs 95 % mortality in 8 days was recorded in all prototypes applied in a dose of  $5 \times 10^{10}$  of blastospores.m<sup>-2</sup>. In order to evaluate effectiveness of the fungal bioagents against eggs and young larvae in the open, large field cage experiments were designed and performed in the forests in 2006. The results showed that application of the biopreparation ( $5 \times 10^{10}$  of blastospores.m<sup>-2</sup>) lead to the decrease of larval population density by two thirds.

**Keywords:** bioagens, mycoinsecticide, entomopathogenic fungi, blastospora, *Isaria farinosa*, *Paecilomyces farinosus*, Deuteromycota, *Cephalcia abietis*, spruce webworm

Eva Prenerova, Laboratory of Plant Protection Olešná, Olešná 87, 398 43 Bernartice. E-mail: eva.prenerova@seznam.cz

\* Presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Akutní ochrana rostlin před hmyzími škůdci a fytofágními roztoči se provádí převážně pomocí konvenčních chemických pesticidů. Jejich používání je však z hlediska ochrany životního prostředí a bezpečnosti práce problematické. Hmyz se na ně stává postupně stále víc rezistentní, což vyvolává potřebu zvyšovat dávky nebo přecházet na jiné typy účinnějších pesticidů. Rovněž zpřísňující se legislativa omezuje tento způsob boje. Jedním z východisek je výzkum a vývoj nových ochranných prostředků na principech biologického boje, při nichž se využívají přirození nepřátelé škůdců, jako jsou predátoři, parazité nebo patogenní organismy. Biologické prostředky označované jako bioinsekticidy využívají přirozených antagonistických vztahů mezi organizmy za účelem potlačení populací škůdce bez podstatného narušení přírodní rovnováhy a tím přispívají k udržení stability ekosystémů v antropogenně změněných podmínkách prostředí. Potvrdilo se, že tyto patogenní mikroorganismy jsou pro necílové organismy včetně člověka neškodné a na rozdíl od klasických insekticidů nepředstavují žádnou ekologickou zátěž pro přírodní prostředí. Podstatně tak přispívají k ochraně druhové biodiverzity fyto- a zoocenóz v kulturní krajině.

Proto se s nimi ve světovém měřítku stále více počítá jako s alternativními prostředky regulace hmyzích škůdců. Použití mykoinsekticidů v ochraně dřevin před hmyzími škůdci je jedním z potencionálních přístupů v moderní aplikované lesnické entomologii a v některých zemích dospěl jejich vývoj už do stadia výroby komerčních bioinsekticidů. Tento směr je proto třeba rozvíjet i u nás.

V roce 2002 zadala **Grantová služba LČR** pracovišti **Laboratoři ochrany rostlin v Olešné (LOR Olešná)** řešení projektu, jehož cílem bylo prozkoumat, zda lze v ochraně před ploskohřbetkou smrkovou využít entomopatogenní houby (tj. houby působící u hmyzu smrtelnou nákazu) tak, aby došlo k významné redukci populace tohoto škůdce.

## **Ploskohřbetka smrková - příležitostní kalamitní škůdce smrkových porostů**

Ploskohřbetka smrková (*Cephalcia abietis* L., Hymenoptera) spolu se dvěma svými příbuznými — ploskohřbetkou severskou a ploskohřbetkou černou — patří k hlavním listožravým škůdcům smrku ztepilého. Gradační potenciál ploskohřbetky smrkové však významně převyšuje zmíněné dva druhy. V podmínkách střední Evropy se významně přemnožuje především v souvislých stejnověkových smrkových monokulturách v podhorských a horských oblastech v nadmořských výškách zhruba od 600 do 1000 m. V průběhu druhé poloviny minulého století jsme byli na našem území svědky několika silných gradací ploskohřbetky. Nejhorší kalamity byly zaznamenány v 80. letech, kdy bylo ploskohřbetkou napadeno téměř 50 tisíc ha porostů především v imisemi poškozených oblastech severních pohraničních horstev. Jelikož při přemnožení dochází opakovaným žírem housenic k silným defoliacím, jež mohou vést až k úhynu napadených stromů, je ploskohřbetka smrková zařazena mezi kalamitní škůdce.

Cílem uměle rozšiřované houbové nákazy jsou vajíčka a mladé housenice ploskohřbetky, a to ze tří důvodů. Za prvé – vajíčka jsou nejzranitelnější stádium životního cyklu tohoto škůdce, za druhé – je zde reálná možnost aplikovat preparát leteckým postříkem a za třetí – zabráněním líhnutí housenic výrazně omezíme požery v roce silného rojení. Samičky kladou vajíčka do korun smrků na jehlice a první stádia larev se z nich líhnou v závislosti na počasí za 2-4 týdny. To je dosti dlouhé období na provedení dobře načasovaného zákroku. Zásah je potřeba směřovat právě proti vajíčkům také proto, že vylíhlé malé housenice se později soustřeďují v paždí větví a tam si zhotovují předivové vaky, v nichž už jsou těžce zasažitelné. Navíc, vajíčka nejsou přirozeně chráněna před houbovou nákazou, neboť se s ní za normálních okolností nesetkávají jako třeba nymfální a kuklová stádia přežívající někdy až tři roky v půdě.

## **Řešení projektu a jeho výsledky**

Úkoly zadané v rámci projektu lze rozdělit do dvou tématických okruhů.

### **1. tématický okruh (2003-2005)**

#### **- vývoj nového bioagens na bázi *I. farinosa* (PRENEROVÁ, 2004; 2005; 2006)**

Na základě dřívějších zkušeností byla pro daného škůdce vybrána entomopatogenní houba *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*) (Hypocreales). Nativní kmeny entomopatogenních hub byly získány z vybraných 43 lokalit výskytu ploskohřbetky smrkové v rámci celého území ČR, a to jak izolací z půdních vzorků, tak z infikovaných jedinců cílového škůdce. Ze vzorků půdy byly získány izoláty entomopatogenních hub pomocí tzv.

“metody živých pastí“. Jako návnada byly použity housenky zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Poté byly jednotlivé kmeny odizolovány a byla provedena jejich identifikace. Celkem bylo získáno 60 nativních kmenů entomopatogenní houby *I. farinosa*.



**Obr. 1.** Předivový vak se zbytky trusu a jehlic, (foto P. Kapitola).



**Obr. 2.** Kladoucí samička plosohřbetky.



**Obr. 3.** Kmeny hub byly izolovány z nakažených housenic plosohřbetky.



**Obr. 4.** Ze vzorků půdy byly kmeny *I. farinosa* získány pomocí živých pastí – housenek zavíječe.

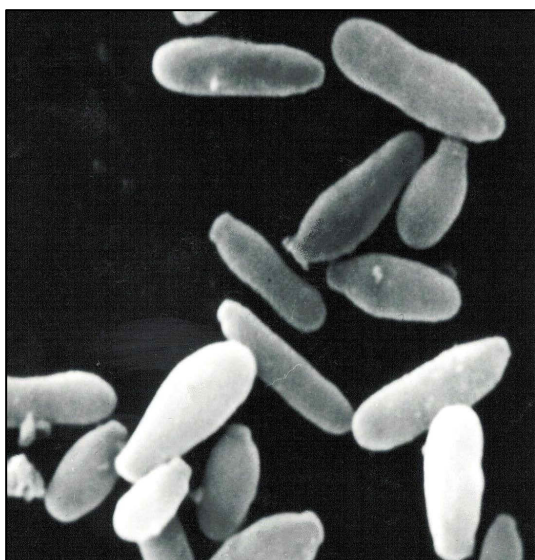
Byla vypracována metodika standardizovaného biotestu při kolísavé teplotě:  $23 \pm 1$  °C (15 hodin) a  $15 \pm 1$  °C (9 hodin), kterým byla otestována virulence všech získaných kmenů. Pro plnění dalších úkolů byl na základě výsledků testů vybrán kmen SEH.56.Pf, který vykazoval signifikantně nejlepší výsledky. K posílení virulentní aktivity vybraného kmene byla zahájena série jeho kontinuálních pasáží přes housenice plosohřbetky. Po každé pasáži byl kmen otestován standardizovaným biotestem. Byl prokázán signifikantní účinek pasážování na zvýšení virulentní aktivity kmene.

Biotesty bylo zjištěno, že blastospory produkované při submerzní kultivaci jsou účinnou infekční formou. V první fázi optimalizace kultivačních podmínek bylo stanoveno složení

kultivačního média, poté bylo optimalizováno pH média, teplota, počáteční titr spor včetně jejich formy a doba kultivace. K produkci blastospor v laboratorních podmínkách byla použita laboratorní orbitální třepačka a maloobjemový fermentor. Podařilo se získat  $2 \times 10^9$  blastospor v 1 ml kultivačního média. Po odstředění nakultivované suspenze byl získán blastosporový koncentrát pastovité konzistence. V 1 g bylo obsaženo  $2 \times 10^{10}$  spor. Blastosporový koncentrát byl finalizován dvěma způsoby podle uvažovaného způsobu použití:

- 1) pro vodní letecký postřik (100-200 litrů na ha) byl koncentrát zmražen: vznikl tak prototyp ZBK;
- 2) pro nízkoobjemovou ULV aplikaci (10 litrů na ha) byl koncentrát finalizován s olejovými přípravky povolenými v současnosti pro ochranu lesa (Dedal 90 EC, Ikar 95 EC, Istroekol, Alimo). Vznikly tak 4 prototypy: OBK(Dedal), OBK(Ikar), OBK(Istroekol), OBK(Alimo) uchovávané v 5 °C.

Na konci roku 2005 tak byly získány nové prototypy bioagens – olejové blastosporové koncentráty a zmražený blastosporový koncentrát na bázi *I. farinosa*. Mohlo se proto přistoupit k řešení druhého tématického okruhu.



Obr. 5. Homogenní suspenze blastospor *I. farinosa*.



Obr. 6. Vzorek blastosporového koncentrátu finalizovaného s olejem Istroekol.

## 2. tématický okruh (2006-2007)

### – testování účinnosti nového bioagens (PRENEROVÁ, 2007a; 2007b).

V druhé fázi řešení (2006-2007) byla pozornost zaměřena na testování prototypů přímo proti cílovému škůdci. Na území LZ Kladská (LČR s.p.) a KI Karlovy Vary byly postaveny 3 velkoobjemové izolátory v porostu asi desetileté smrčiny, kam bylo vypuštěno větší množství rojivců ploskohřbetky nasmýkaných v oblasti kalamity. Vajíčka nakladená v izolátorech byla použita pro laboratorní i terénní testování.

Laboratorní testování probíhalo pomocí Potterovy věže. V doposud provedených standardizovaných biotestech na vajíčkách ploskohřbetky bylo dosaženo 95 % mortality za 8 dní u všech testovaných prototypů při aplikaci dávky  $5 \times 10^{10}$  blastospor. $m^{-2}$ .

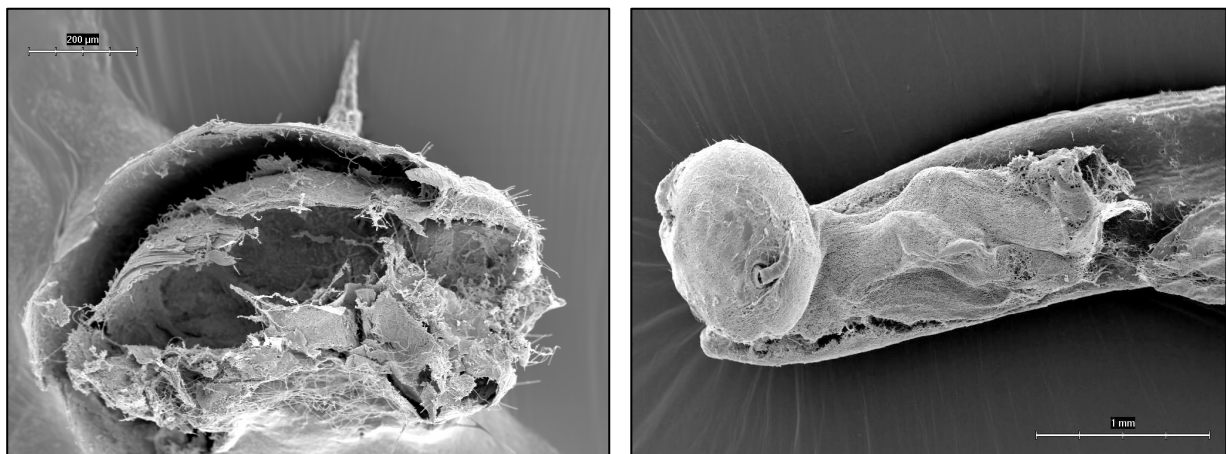
Pro ověření účinnosti bioagens i v terénních podmínkách byly v roce 2006 založeny pokusy s cílem stanovit celkovou redukci populace ploskohřbetky (vajíček i housenic) po zásahu houbovým agens. Pokus probíhal v jednom ze tří izolátorů rozměrů 5,3×10,3×1,8 m. Porovnával se zde vývoj vajíček nakladených na smrčky, které byly poté ošetřeny prototypem

ZBK v dávce  $5 \times 10^{10}$  blastospor na  $m^2$ , s vývojem vajíček na neošetřených (kontrolních) stromcích. Po vyhodnocení provedeném v září téhož roku bylo zjištěno, že **ošetření biopreparátem snížilo populaci larev ploskohřbetky o 62,4 %**.

Kromě toho nás zajímalo, zda u housenic, které unikly nákaze na stromě a budou přezimovat v půdě, kde jsou vhodné podmínky pro rozvoj mykózy, nákaza případně nepropukne později a tím nepřispěje ke zvýšení celkové mortality v populaci škůdce způsobené houbou. Proto jsme pod každý pokusný smrček zhotovili rám a naplnili ho půdou. Pod rámem bylo dno z umělohmotného pletiva, aby zahrabané housenice nemohly uniknout. Na jaře 2007 jsme půdu z rámců prohlédli a udělali další porovnání obou variant. Předpoklad se splnil, v ošetřené variantě jsme zjistili 7 % housenic s vyvinutou mykózou *I. farinosa*, zatímco v kontrolních rámech jsme žádné nakažené housenice nenašli. Dá se předpokládat, že se jedná o stejný kmen SEH.56.Pf, jaký byl použit jako infekční agens při pokusu. Po zavedení příslušných metodik plánují odizolované kmeny podrobit genetické analýze k potvrzení této domněnky.



**Obr. 7.** Na území LZ Kladská (LČR s.p.) byly postaveny velkoobjemové izolátory, do kterých byly vypuštěny rojivci ploskohřbetky.



**Obr. 8.** Infikovaná housenice ploskohřbetky (1. instar); hyfy houby *I. farinosa* aktivně pronikají do hlavičky housenice (SEM).

Předmětem další studie bylo zdokumentování průběhu infikace. Studie patogeneze houbové nákazy vajíček a prvých instarů ploskohřbetky smrkové byla provedena s využitím elektronové mikroskopie (SEM i TEM) na pracovišti Laboratoře elektronové mikroskopie Biologického centra AV ČR, v.v.i., v Č. Budějovicích. Ukázalo se, že hyfy houby aktivně pronikají do dutiny vajíčka i mladé housenice. Obsah dutiny pak postupně stravují a rozrůstají se v mycelium s fruktifikačními orgány vytvářejícími spory, které slouží k druhotné infekci tkání.

## Závěr

Na základě výsledků našeho výzkumu můžeme konstatovat, že v laboratoři vyvinutý biopreparát ZBK v dávce  $5 \times 10^{10}$  blastospor na  $m^2$  účinně infikuje vajíčka a mladé housenice ploskohřbetky smrkové, ale může se podílet i na snížení populační hustoty přemnožených diapauzních larev škůdce. Odborníci v oboru aplikované entomologie se obecně shodují, že dvoutřetinové snížení početnosti škůdce houbovým biopreparátem je možno považovat za úspěch. Vzhledem k tomu, že se s každou aplikací houbového agens zvyšuje jeho zásoba v ekosystému, dá se předpokládat, že se houba bude v tomto prostředí postupně přirozeně etablovat. Proto předpokládám, že se může účinek biopreparátu, na rozdíl od rychle degradujících toxických pesticidů, projevit i v následujících generacích škůdce. Jsem přesvědčena o tom, že tato strategie „dlouhodobějšího (protrahovaného) působení introdukovaného bioagens v populacích škůdce“ si zaslouží pozornost, a proto bych se jí chtěla věnovat i v dalším výzkumu. Předpokládám, že ze stejných hypotéz vychází i prof. Z. Landa (JČU, Č. Budějovice), který letos zahájil sérii pokusných aplikací houbového preparátu na bázi *Beauveria bassiana* na lokalitách napadených lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) na území NP Šumava.

Při řešení daného projektu bylo prioritně požadováno získat bioagens s vysokou účinností, které bude možno průmyslově vyrábět. Nezanedbatelné bylo též respektování požadavku aplikovatelnosti bioagens v lesnické ochrannářské praxi (přízpusobení letecké aplikaci). Téma bylo tedy řešeno komplexně – od objasnění teoretických základů přes samotný vývoj bioagens až po jeho laboratorní a terénní testování. Doposud získané výsledky dávají naději, že získaný biopreparát najde své uplatnění v ochraně lesa i u nás. Bude je ovšem potřeba ještě ověřit rozsáhlejším velkoplošným pokusem, pokud by se uvažovalo o použití bioagens na komerční bázi. Záleží teď jen na podnikatelské sféře, zda se dovede výroba tohoto moderního prostředku – houbového insekticidu – až do stádia komerčního využití.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory LČR s.p.; (Smlouva o dílo 1/2002). Za pomoc v terénu děkuji zaměstnancům LZ Kladská, KI Karlovy Vary (LČR s.p.), RNDr. J. Vaňkovi a jeho spolupracovníkům (KRNAP). Za spolupráci při laboratorním výzkumu děkuji doc. RNDr F. Weydovi, CSc., Ing. R. Zemkovi, CSc., prof. RNDr J. Weiserovi, DrSc., pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie (Biologické centrum AV ČR, v.v.i.) a prof. RNDr J. Žďárkovi, DrSc. (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.). Za poskytnutí fotografie (obr. 1.) děkuji Ing. P. Kapitolovi.

## Přehled literatury

- PRENEROVÁ, E., 2004. Průběžná zpráva za rok 2003, výzkumný projekt: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Smlouva o dílo 1/2002, APOL Teplice LČR s.p., 43 p.
- PRENEROVÁ, E., 2005. Průběžná zpráva za rok 2004, výzkumný projekt: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Smlouva o dílo 1/2002, APOL Teplice LČR s.p., 49 p.
- PRENEROVÁ, E., 2006. Průběžná zpráva za rok 2005, výzkumný projekt: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Smlouva o dílo 1/2002, APOL Teplice LČR s.p., 39 p.
- PRENEROVÁ, E., 2007a. Průběžná zpráva za rok 2006, výzkumný projekt: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Smlouva o dílo 1/2002, APOL Teplice LČR s.p., 37 p.
- PRENEROVÁ, E., 2007b. Průběžná zpráva za rok 2007 - 1. část , výzkumný projekt: Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvních instarů. Smlouva o dílo 1/2002, APOL Teplice LČR s.p., 19 p.



# Patogeny rostlin – peronosporální „houby“

MICHAELA SEDLÁŘOVÁ & ALEŠ LEBEDA

**SEDLÁŘOVÁ, M., LEBEDA, A.: Plant pathogens – downy mildews.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 140-142yy. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007.  
ISBN 978-80-86525-10-5

Current views on the downy mildews (Peronosporales) biology, taxonomy, and physiology are discussed as well as the specific aspects of their cultivation. Information concerning activities of the Phytopathological Laboratory, Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc are presented with a focus on the Collection of Phytopathological Microorganisms UPOC.

**Keywords:** Peronosporales, biology, cultivation

Michaela Sedlářová, Aleš Lebeda, Palacký University in Olomouc, Faculty of Science, Department of Botany, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, Czech Republic. E-mail: [ales.lebeda@upol.cz](mailto:ales.lebeda@upol.cz) , [michaela.sedlarova@upol.cz](mailto:michaela.sedlarova@upol.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

V příspěvku byla shrnuta činnost laboratoře fytopalogie Katedry botaniky PřF UP v Olomouci (se zaměřením na studium původců mykóz u rostlin) a představena sbírka fytopatogenních mikroorganismů UPOC, která je součástí Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů (MZe ČR). Bližší pozornost byla věnována taxonomii, biologii a kultivaci „peronospor“ či „peronosporálních hub“ (zástupci ř. Peronosporales, tř. Peronosporomycetes – dříve Oomycetes).

## Sbírka mikroorganismů UPOC

Kolekce mikroorganismů udržovaných na KB a KBBG PřF UP zahrnuje 172 izolátů 16 druhů fytopatogenních hub a peronospor, 31 izolátů 26 druhů sinic a řas, 29 izolátů 9 druhů fytoplazem a virů. Kromě těchto kmenů zařazených do oficiální Národní databáze genových zdrojů mikroorganismů ( [http://www.vurv.cz/collections/collection\\_cz.htm](http://www.vurv.cz/collections/collection_cz.htm) ) naše pracoviště disponuje několikanásobně větší pracovní sbírkou izolátů každoročně rozšiřovanou terénními sběry. Co se týče mikromycet, kromě padlí (ř. Erysiphales) a deuteromycet (především r. *Fusarium*, *Colletotrichum*), je významnou součástí kolekce tzv. „downy mildews“ - zástupců ř. Peronosporales, způsobující na spodní straně listů rostlin povlaky sporangiokonidioforů (odtud pojmenování) a česky označovaných jako plísně či peronospory.

## Peronospory

Tyto parazitické mikroorganismy, vyznačující se céncytickou vláknitou stélkou, byly pro svou podobnost s „pravými“ mikroskopickými houbami dlouhou dobu řazeny do říše Fungi. S postupujícím poznáním se však názory na zařazení těchto organismů dynamicky mění a jsou navrhovány nové taxonomické skupiny. V systému šesti říší CAVALLIER-SMITHA (1998) jsou „peronosporální houby“ vydělovány do říše Chromista, nejnověji někteří autoři upřednostňují zařazení do říše Chromalveolata (např. ADL ET AL., 2005). Recentní poznatky podrobně shrnují LEBEDA & MIESLEROVÁ (2006). Kritéria v současnosti používaná v klasifikaci

peronospor jsou: složení buněčné stěny, ultrastruktura bičíku, biosyntéza lyzinu, morfologie mitochondrií a na molekulární úrovni struktura 18S rDNA. V taxonomii podtř. Peronosporomycetiae dochází k neustálým změnám na základě výsledků nových molekulárních a mikroskopických výzkumů. Mikroskopické znaky ne vždy korespondují s molekulárními daty, zato velmi důležitými se jeví znaky získané SEM a vazba na hostitelskou rostlinu. Tyto výsledky i další aspekty studia peronospor byly prezentovány ve dnech 2.- 6. 7. 2007 v Olomouci na 2<sup>nd</sup> Downy Mildew Symposium (<http://www.downymildews.upol.cz/>). Práce věnované evoluci a taxonomii, biologii a ekologii, genetické variabilitě, patogenitě, epidemiologii a způsobům kontroly vůči peronosporám lze najít v publikaci LEBEDA & SPENCER-PHILLIPS (2007).

Z hlediska biologie peronospor je významná závislost na steroidech čerpaných z hostitelské rostliny. Asociace s těmito obligátními biotrofními či hemibiotrofními parazity byly nalezeny u rostlin bez mykorhizy, což je diskutováno v souvislosti s možným vyšším obsahem sekundárních metabolitů (LEBEDA & MIESLEROVÁ, 2006). Změny ve fyziologii hostitelské rostliny v důsledku patogeneze jsou na našem pracovišti podrobně studovány u patosystému *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae* (LEBEDA et al., 2008). Významnou signální molekulou ve zmíněných interakcích je např. peroxid vodíku; regulace jeho hladiny v rostlinných pletivech úzce souvisí s projevem interakce genotyp rostliny – rasa patogenu (SEDLÁŘOVÁ et al., 2007).

Původce plísně salátové, *Bremia lactucae*, je zajímavý i díky dynamické mikroevoluci, jejímž výsledkem je diferenciací ras v populaci patogenu. Nové izoláty jsou získávány terénními sběry a udržovány na pletivech náchylných genotypů hostitelských rostlin ověřenými metodami (MIRANDA & LEBEDA, 2007). V laboratorních podmínkách je testován fenotyp interakce na diferenciacním souboru hostitelských genotypů. Naše pracoviště je součástí IBEB (International Bremia Evaluation Board), který tyto postupy standardizuje.

Peronospory jsou na našem pracovišti studovány v rámci několika projektů (kromě patosystému *Lactuca* spp.-*B. lactucae* např. interakce tykvovitě-*Pseudoperonospora cubensis*, slunečnice-*Plasmopara halstedii*). Pozornost je věnována především následujícím tématům: struktura populací patogenu (frekvence výskytu jednotlivých ras, časové změny struktury populací), odolnost vůči chemickým faktorům (fungicidy, růstové regulátory), reakce rostlin na napadení (biofyzikální, molekulární, biochemické a anatomicko-morfologické parametry).

## Poděkování

Práce byla finančně podpořena dotačním titulem MZe ČR (NPGZ-M/03-023) a projekty MŠMT ČR (MSM 6198959215), NAZV(QH 71254), GA ČR (GP 522/02/D011).

## Přehled literatury

- ADL, S.M. et al. (28 autorů), 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Euk. Microbiol.* 52: 399-451.
- CAVALLIER-SMITH, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73: 203-266.
- LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., 2006. Charakteristika a význam říše Chromista se zaměřením na třídu Peronosporomycetes. In: LEBEDA, A., MAZÁKOVÁ, J., TÁBORSKÝ, V. (Eds.), *Protozoa a Chromista. Taxonomie, biologie a hospodářský význam*, Česká fytopatologická společnost, Praha, pp. 22-46.

- LEBEDA, A., SEDLÁŘOVÁ, M., PETŘIVALSKÝ, M. & PROKOPOVÁ, J. Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: A case study of *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*. *Europ. J. Plant Pathol.* 1-2. (prepared for press)
- LEBEDA, A., SPENCER-PHILLIPS, P.T.N. (Eds.), 2007. *Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings of The 2nd International Downy Mildews Symposium.* JOLA, Kostelec na Hane, Czech Republic, 278 p.
- MIRANDA, M., LEBEDA, A. (Eds.), 2007. *Mass Screening Techniques for Early Selection of Disease Resistance in Neglected Crops: A Critical Appraisal,* Springer Publishers. (prepared for press)
- SEDLÁŘOVÁ, M., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M., LEBEDA, A., 2007. Localization and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca* spp. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 607-616.

# Potenciálně toxinogenní mikromycety na transgenní Bt-kukuřici a na netransgenních hybridech kukuřice

LUDMILA SLEZÁKOVÁ

## SLEZÁKOVÁ, L.: Potential toxinogenic micromycetes on Bt-transformed maize and on non- Bt-transformed maize hybrides

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 143-150. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The potentially toxigenic species of genera *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* are widespread and common fungi infecting maize and causing a wide range of diseases. The toxigenic species enter into maize through different routes. The very often route is damage of plants created by insects, especially by European corn borer (ECB) which is the major pest of maize in the Czech Republic. This damage of plants and their ears is often the initial infection site for toxigenic species. Bt-transformed maize can reduce the occurrence of toxigenic species and their mycotoxins. This transgenic Bt-maize contains the gene from soil bacterium (*Bacillus thuringiensis*) express the toxic Cry 1 Ab protein which protects the maize against European corn borer. During the years 2002-2005 different samples of corn (preharvest, harvest and postharvest) from different localities of the Czech Republic (Ivanovice na Hané, Praha-Ruzyně, Troubsko and Potěhy) were collected. The main aim of this study was to analyse the spectrum of toxigenic species occurring in different samples of maize (preharvest ears, harvest and postharvest grains). In total, 47 potentially toxigenic species were isolated. The highest number of isolated species was in the years 2002, 2005, and from the locality Praha-Ruzyně. The most frequent species were *Fusarium subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *Penicillium crustosum*, *P. chrysogenum*, and *P. expansum*. The efficacy of Bt-maize was showed in lower occurrence of potentially toxigenic species.

**Keywords:** Bt-transformed and non-Bt-transformed maize, toxinogenic microfungi

Ludmila Slezáková, Crop Research Institute, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha-Ruzyně and Czech Agricultural University, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6-Suchbát, Czech Republic. E-mail: [Slezakova@seznam.cz](mailto:Slezakova@seznam.cz)

\* presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Bezpečnost a nezávadnost zemědělských surovin a potravin je výrazným fenoménem dnešní doby a výrazně stoupá zájem široké veřejnosti o původ a kvalitu potravin (NEDĚLNÍK & MORAVCOVÁ, 2004). Kukuřice patří v současné době u nás i v zahraničí mezi významné produktivní polní plodiny. Její pěstování se v ČR v posledních letech stabilizovalo na 210-220 tisících ha na ploch určených ke sklizni na siláž (70% všech ploch kukuřice) a na přibližně 80-85 tisících ha určených ke sklizni na zrno (ZAHRADNÍČEK et al., 2007).

Potenciálně toxinogenní druhy rodu *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium* jsou velmi rozšířené a časté houby, které infikující kukuřici a způsobují její onemocnění s následnou redukcí výnosu a kvality. Tyto houby mohou napadat kukuřici v různých fázích růstu, různými způsoby, ale velmi častým způsobem je poškození hmyzem, především zavíječem kukuřičným, který patří v dnešní době mezi hlavní škůdce kukuřice.

Zavíječ kukuřičný je motýl, který se běžně vyskytuje na různých větších bylinách (lebeda, merlík, kopřiva, atd.), ale k jeho významnému rozšíření došlo s nástupem pěstování kukuřice, která je pro něj velmi výhodnou hostitelskou rostlinou (BAGAR, 2002). Housenky zavíječe kukuřičného škodí přímo svým žírem ve stéblech, případně v palicích a oslabují rostliny

kukuřice. K nepřímým škodám dochází tím, že poranění umožňují vstup původcům houbových chorob do rostliny, zejména rodu *Fusarium*. Ochrana kukuřice před zavíječem kukuřičným není jednoduchou záležitostí, a proto je nutné uplatňovat řadu opatření, která povedou ke snížení populační hustoty tohoto škůdce, např. agrotechnická opatření (správný osevní postup, likvidace posklizňových zbytků, zpracování půdy), biologická ochrana (vosička rodu *Trichogramma*), chemická ochrana a v poslední době i genetická ochrana (MON 810) (ROTREKL, 2007). Biologická ochrana znamená přímou ochranu kukuřice pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma* - přípravek Trichocap, Trichoplus. Drobná vosička *Trichogramma evanescens maydis* (drobněnka vejcožravá) je vaječný parazitoid, který klade vajíčka do vajíček hostitelských druhů motýlů. V době aplikace jsou vosičky ve stadiu kukel a předkukel. Na poli se vosičky líhnou, vylétávají ven z kapsle a vyhledávají snůšky vajíček zavíječe. V porostu se pak dále množí a po celou dobu náletu zavíječe dochází k parazitaci (BAGAR, 2002, 2004). Aplikace přípravku je na základě signalizace dle náletu motýlů do světelných lapačů (ROTREKL, 2004). Důležité je provést aplikaci ve správném termínu, to je na počátku náletu zavíječe, dříve než se objeví první snůšky vajíček. Splnění této podmínky je nezbytné, protože *Trichogramma* coby vaječný parazitoid, je schopna zachytit vývoj zavíječe pouze ve stadiu vajíčka (BAGAR, 2000a). Bohužel vlivem nepříznivých podmínek již několikátým rokem nedochází k optimálnímu sfázování kladení vajíček zavíječem a aplikace a případného namnožení vosiček rodu *Trichogramma*, a následně účinnost biologické ochrany byla v posledních 4 letech poměrně nízká (ŘÍHA, 2007).

Transgenní Bt-kukuřice může snižovat výskyt zavíječe kukuřičného (a tím i výskyt potenciálně toxinogenních rodů) díky genu z půdní bakterie *Bacillus thuringiensis*, který indukuje tvorbu toxického proteinu Cry 1 Ab v zelených částech rostliny, letálního pro škůdce. V dnešní době je to jedna z nejběžněji pěstovaných transgenních plodin na celém světě (WU, 2006). GATCH & MUNKVOLD (2002) uvádějí výrazně nižší napadení stébel Bt-kukuřice druhy *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* než u ostatních hybridů kukuřice, jak při sledování přírodní infekce larvami, tak v infekčních pokusech se zavíječem kukuřičným.

Problému kontaminace obilovin se věnuje celá řada autorů z různých zemí, jejichž výčet by byl nekonečný a tak uvádím jen menší přehled.

LEW & al. (2001) v Rakousku zjišťovali výskyt toxinogenních mikromycetů na rostlinách, v krmivech a potravinách. Převládajícími druhy na kukuřičných palicích byly *Fusarium subglutinans*, *F. graminearum*, méně časté byly druhy *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. cerealis* (syn. *F. crookwellense*), *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* a *F. sporotrichioides*.

Při rozsáhlém studiu v Polsku byly na cereáliích zjištěny druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. chlamydosporum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. solani*, *F. oxysporum* a *F. coeruleum* (CHEŁKOWSKI et al., 2001). LOGRIECO et al. (1993) v okolí Varšavy izolovali na všech viditelně poškozených rostlinách kukuřice druh *F. subglutinans*.

PEPELJNAK et al. (1998) v Chorvatsku izolovali z 60 vzorků kukuřice 25 kmenů rodu *Fusarium*. Nejvíce se vyskytovaly druhy *Fusarium verticillioides* (40% vzorků), *F. oxysporum* (16%), v menší míře druhy *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. graminearum* a *F. culmorum*.

LEVITIN (2001) řadí mezi nejfrekventovanější druhy v cereáliích (kukuřice, oves, ozimá pšenice) v Rusku *Fusarium avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae* a *F. culmorum*. Dominantní druhy izolované z rhizosféry obilok byly *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. solani*.

V Norsku se STENWIG & LIVEN (1988) zabývali kontaminací na nevhodně uskladněných obilkách. Nejčastěji byl ze zástupců rodu *Aspergillus* izolován druh *Aspergillus fumigatus*, ze zástupců rodu *Fusarium* druhy *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. acuminatum*, *F. graminearum*, *F. chlamydosporum*, *F. lateritium*, *F. subglutinans*, *F. sporotrichioides* (seřazení podle frekvence výskytu). Ze zástupců rodu *Penicillium* byly izolovány druhy *Penicillium puberulum*, *P. brevicompactum*, *P. viridicatum*, *P. aurantiogriseum*, *P. solitum*, *P. hordei*, *P. verrucosum*, *P. crustosum*, *P. rugulosum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. chrysogenum*, *P. concentricum*, *P. roquefortii* a *P. variabile* (seřazeno rovněž podle frekvence výskytu).

BAKAN (2001) ve Francii nejčastěji izoloval z obilek kukuřice druhy *Fusarium proliferatum*, *F. verticillioides* a *F. culmorum*.

Ve Španělsku SANCHIS et al. (2001) izolovali z krmiv druhy *Aspergillus alliaceus*, *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* a *E. rubrik*. Na zkoumaných kukuřičných potravinách a krmivech byl dominantní druh *Fusarium verticillioides*, dále *F. avenaceum*, *Microdochium nivale*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* a *F. subglutinans*. JIMÉNEZ & MATEO (2001) izolovali z cereálií druhy *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. ochraceus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, s menší frekvencí druhy *A. versicolor*, *A. clavatus* a *A. terreus*. Ze zástupců rodu *Penicillium* a *Fusarium* se s vysokou frekvencí vyskytovaly druhy *Penicillium variabile*, *P. islandicum*, *P. purpurogenum*, *P. chrysogenum*, *P. capsulatum*, *P. thomii*, *P. oxalicum*, *P. griseofulvum*, *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. oxysporum*.

BOTTALICO & LOGRIECO (2001) uvádí nejčastěji se vyskytující potenciálně toxinogenní druhy na kukuřičných obilkách v Itálii – *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *Microdochium nivale*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. compactum* a *F. heterosporum*.

ŠROBÁROVÁ (2000) na 21 lokalitách na Slovensku studovala výskyt zástupců rodu *Fusarium* na kukuřičných obilkách v letech 1996-1998. Mezi dominantní druhy patřily *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* a *F. subglutinans*. Poměrně často byl přítomen i druh *Fusarium graminearum*. Mezi méně frekventovaný druh patřil *Fusarium anthophilum*. Druhy, které se nevyskytovaly po všechny sledované roky, byly *Fusarium poae*, *F. solani*, *F. compactum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum* a *F. avenaceum*.

NEDĚLNÍK (2000, 2001) uvádí, že z dosavadních výsledků vyplývají jako hlavní kontaminanti kukuřice v našich podmínkách druhy *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*. S menší intenzitou byl zaznamenán výskyt druhů *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, a velmi nízký výskyt druhů *F. poae*, *F. oxysporum* a *F. solani*.

## **Materiál a metodika**

V průběhu let 2002-2005 byly provedeny odběry vzorků kukuřice z několika lokalit ČR - Ivanovice na Hané, Troubsko, Potěhy a Prahy-Ruzyně. Pro zjištění celkového spektra potenciálně toxinogenních druhů na kukuřici byly vzorky odebírány v průběhu vegetace, při sklizni a následně i po určité době skladování v provizorních podmínkách ve skladu. V průběhu vegetace byly v porostu kukuřice odebírány palice kukuřice s viditelným požerkem od zavíječe kukuřičného a s patrným myceliem na povrchu kukuřice (*Zea mays* L.) a u Bt-kukuřice byly odebírány palice s mechanickým poškozením nebo viditelným myceliem na povrchu. Na lokalitách byly zkoušeny různé ochrany kukuřice proti zavíječi kukuřičnému: 1) transgenní Bt-kukuřice MON 810 (genetická ochrana), 2) netransgenní hybrid (kontrolní varianta – agrotechnická ochrana), 3) netransgenní hybrid biologicky ošetřen proti zavíječi kukuřičnému pomocí parazitické vosičky rodu *Trichogramma* (biologická ochrana).

Pro izolaci potenciálně toxinogenních rodů byly použity izolační metody: přímá izolace viditelného mycelia z povrchu palice na izolační médium a povrchová sterilizace obilek kukuřice. Pro izolaci mikromycetů z již uskladněné kukuřice byla použita metoda izolace z povrchově sterilizovaných obilek a z povrchově neošetřených obilek. Jako základní izolační média byla zpočátku použita: agar se sladovým extraktem (MEA), kukuřičný agar (CMA) a půdní agar s glukózou a bengálskou červení (SEGA). Následně byla použita selektivní média pro potenciálně toxinogenní rody: Czapek-Dox agar s iprodionem a dichloranem (CZID) a agar s dichloranem, chloramfenicolem a bengálskou červení (DBRC). Pro determinaci jednotlivých druhů rodu *Aspergillus* byla použita média - agar se sladovým extraktem (MEA) a Czapkův agar (CZ). Determinace druhů rodu *Fusarium* probíhala na médiích – speciální živný agar (SNA), ovesný agar (OA) a bramboro-dextrózový agar (PDA). Druhy rodu *Penicillium* byly určovány na agaru se sladovým extraktem (MEA) a Czapkově agaru s kvasničným extraktem (CYA).

Pro determinaci izolovaných hub byly použity publikace: BOOTH (1971), BRAYFORD (1993), BURGESS et al. (1988), FASSATIOVÁ & KUBÁTOVÁ (1990), GERLACH & NIRENBERG (1982), KLICH & PITT (1988), KOZAKIEWICZ (1989), PITT (1979), PITT (1991), RAMIREZ (1982), RAPER & FENNELL (1965), RAPER & THOM (1949), REENEN-HOEKSTRA et al. (1990), SAMSON et al. (1996), SAMSON & PITT (1990), SEIFERT (1996), STOLK et al. (1990), TZEAN et al. (1990, 1994).

## Výsledky a diskuse

Během studovaných let 2002-2005 bylo získáno celkem 615 vzorků kukuřice, z nichž bylo izolováno 47 taxonů potenciálně toxinogenních hub: 7 taxonů rodu *Aspergillus*, 17 taxonů rodu *Fusarium* a 23 taxonů rodu *Penicillium* (viz Tab.1).

**Tab. 1.** Přehled izolovaných potenciálně toxinogenních druhů rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium*.

Druhy	2002	2003	2004	2005	I	II	III	IV	Bt	Non Bt	A	B	C
<i>Aspergillus flavus</i>	+			+	+	+	+	+	+	+		+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+		+	+	+		+	+	+			+
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	+					+			+	+		+	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.		+				+				+			+
<i>Fusarium acuminatum</i>	+			+	+			+		+	+		
<i>Fusarium avenaceum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium culmorum</i>		+		+	+		+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium equiseti</i>	+				+					+	+		
<i>Fusarium graminearum</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
<i>Fusarium poae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium sambucinum</i>	+			+		+	+		+	+		+	
<i>Fusarium scirpi</i>				+			+			+		+	
<i>Fusarium semitectum</i>				+	+		+			+	+	+	
<i>Fusarium solani</i>		+		+	+	+				+	+		
<i>Fusarium</i> sp. div.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium subglutinans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium tricinctum</i>	+					+				+	+		
<i>Fusarium verticillioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i>	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+

Druhy	2002	2003	2004	2005	I	II	III	IV	Bt	Non Bt	A	B	C
<i>brevicom pactum</i>													
<i>Penicillium canescens</i>	+					+				+	+		
<i>Penicillium citreonigrum</i>	+				+				+	+			+
<i>Penicillium corylophilum</i>			+	+	+	+			+	+			+
<i>Penicillium crustosum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium digitatum</i>		+				+				+			+
<i>Penicillium expansum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium glabrum</i>			+	+	+					+	+		+
<i>Penicillium griseofulvum</i>		+		+		+		+	+	+		+	+
<i>Penicillium hordei</i>	+	+			+	+			+	+	+		+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium islandicum</i>	+	+		+	+	+		+	+	+	+		+
<i>Penicillium minioluteum</i>	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
<i>Penicillium olsonii</i>			+	+		+	+			+		+	+
<i>Penicillium oxalicum</i>		+		+	+	+	+		+	+		+	+
<i>Penicillium pulvillorum</i>	+	+				+				+	+	+	
<i>Penicillium purpurogenum</i>	+	+		+	+	+		+	+	+		+	+
<i>Penicillium purpurogenum</i> var. <i>rubrisclerotium</i>	+	+	+		+	+			+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. div.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> cf. <i>spinulosum</i>	+				+					+	+		
<i>Penicillium thomii</i>		+	+			+			+	+	+	+	
<i>Penicillium</i> cf. <i>variabile</i>	+					+				+			+
<i>Penicillium viridicatum</i>		+	+	+		+	+			+	+	+	
<b>47</b>	<b>34</b>	<b>29</b>	<b>23</b>	<b>34</b>	<b>34</b>	<b>39</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>31</b>	<b>46</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>

**Vysvětlivky:** lokalita I – Ivanovice na Hané (2002-2005), lokalita II – Praha-Ruzyně (2002-2004), lokalita III – Troubsko (2005), lokalita IV – Potěhy (2005), A – předsklizňové vzorky, B – sklizňové vzorky, C – posklizňové vzorky

Nejvyšší počet taxonů (39) byl izolován ze vzorků z lokality Praha-Ruzyně, odkud byly vzorky získávány po dobu tří let a dále v letech 2002 a 2005 (34 taxonů).

Nejčastěji izolované druhy ze vzorků kukuřice v roce 2002 byly *Fusarium subglutinans*, *F. oxysporum*, *Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *Penicillium crustosum* a *P. hordei*.

V roce 2003 patřily mezi nejčastější druhy *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans* a *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*.

V roce 2004 to byly druhy *Fusarium subglutinans*, *F. verticillioides*, *Aspergillus fumigatus* a *Penicillium crustosum* a v roce 2005 druhy *Fusarium subglutinans*, *F. sporotrichioides*, *Penicillium chrysogenum* a *P. expansum*. Druh *Fusarium subglutinans* patřil ve všech čtyřech letech k nejčastějším izolovaným druhům z kukuřice, čemuž odpovídají i výsledky z literatury, stejně jako u druhu *F. verticillioides* (BAKAN, 2001; LEW & AL., 2001; LOGRIEGO et al, 1993; LOGRIEGO et al., 2002; ŠROBÁROVÁ, 2000; atd.).

Podle výskytu hub v předsklizňových (31 taxonů), sklizňových (32 taxonů) a posklizňových vzorcích (33 taxonů) nelze mykobiotu kukuřice jasně rozdělit na tzv. polní (rody *Fusarium* a *Penicillium*) a skladištní (rody *Aspergillus* a *Penicillium*). Je zjištěno (ONO et al., 2002), že druhy rodu *Fusarium* se mohou vyskytovat určitou dobu i při skladování kukuřice, aniž by byla dodržena pro ně typická vlhkost růstu kolem 20%.

Účinnost transgenní Bt-kukuřice se projevila nejen v odolnosti k napadení kukuřice zavíječem kukuřičným, ale hlavně ve snížení výskytu fuzáriových druhů, stejně jako uvádí např. (GATCH & MUNKVOLD, 2002). V roce 2002 byla frekvence výskytu druhu *Fusarium subglutinans* na Bt-kukuřici nižší o 11% a u druhu *F. oxysporum* o 16,6% oproti netransgenní kukuřici. V roce 2003 byla frekvence výskytu druhu *F. verticillioides* na Bt-kukuřici nižší dokonce až o 76,6% a o 39% u druhu *F. subglutinans*. Taktéž v roce 2004 byly frekvence výskytu fuzáriových druhů výrazně nižší na Bt-kukuřici oproti netransgenní kukuřici, a to



o 68,7% u druhu *Fusarium subglutinans* a o 100% u druhu *F. verticillioides*. V roce 2005 se frekvence výskytu druhu *F. subglutinans* snížila na Bt-kukuřici o 39,1% a u druhu *F. sporotrichioides* o 14,3%.

Z tabulky je také zřejmé, že výskyt potenciálně toxinogenních hub na Bt-kukuřici (31 taxonů) je nižší než na netrasgenních hybridech kukuřice (46 taxonů). I když by někdo očekával úplnou absenci hub na Bt-kukuřice, musím podotknout, že tyto houby byly izolovány z viditelně poškozených palic (mechanikou, ptáky, atd.), čímž byla vytvořena vstupní brána pro tyto patogeny.

## Poděkování

Práce byla finančně podpořena projekty MZe ČR - QD 1360 a 1B 53043.

## Použitá literatura

- BAGAR, M., 2000. Biologická ochrana kukuřice před zavíječem kukuřičným. Stav a perspektivy. *Agro* 5(3): 26-27.
- BAGAR, M., 2002. Napadení kukuřice zavíječem bylo v loňském roce opět vysoké. *Obil. Listy* 10(2): 39.
- BAGAR, M., 2004. Ochrana kukuřice před zavíječem. *Obil. Listy* 7(1): 8-17.
- BAKAN, B., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in France. In: LOGRIECO, A. (Ed.), *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe*, Brussels, pp. 44-50.
- BOOTH, C., 1971. *The Genus Fusarium*. Kew, 237 p.
- BOTTALICO, A., LOGRIECO, A., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. In: LOGRIECO, A. (Ed.), *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe*, Brussels, pp. 69-104.
- BRAYFORD, D., 1993. *The Identification of Fusarium Species*. Egham, 118 p.
- BURGESS, L. W., LIDDELL, C. M., SUMMERELL, B. A., 1988. *Laboratory Manual for Fusarium Research*. Sydney, 156 p.
- FASSATIOVÁ, O., KUBÁTOVÁ, A., 1990. Evaluation of the diagnostic features of some species of *Penicillium* section *Divaricatum*. In: SAMSON, R. A., PITT, J. I. (Eds.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, New York & London, pp. 149-157.
- GATCH, E. W., MUNKVOLD, G. P., 2002. Fungal species composition in maize stalks in relation to European corn borer injury and transgenic insect protection. *Plant Dis.* 86(10): 1156-1162.
- GERLACH, W., NIRENBERG, H., 1982. *The Genus Fusarium – a Pictorial Atlas*. Berlin & Hamburg, 406 p.
- CHEŁKOWSKI, J., PERKOWSKI, J., GRABARKIEWICZ-SZCZĘSNA, J., KOSTECKI, M., 2001. Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals and feeds in Poland. In: LOGRIECO, A. (Ed.), *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe*, Brussels, pp. 111-130.
- JIMÉNEZ, M., MATEO, R., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in agricultural commodities in Spain. In: LOGRIECO, A. (Ed.), *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe*, Brussels, pp. 173-190.
- KLICH, M. A., PITT, J. I., 1988. *A Laboratory Guide to the Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*. North Ryde, 116 p.

- KOZAKIEWICZ, Z., 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycol. Pap. 161: 1-188.
- LEVITIN, M., 2001. Distribution and toxicology *Fusarium* species on cereals in Russia. In: LOGRIECO, A. (Ed.), Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe, Brussels, pp. 151-157.
- LEW, H., ADLER, A., THIMM, N., KRŠKA, R., WIEDNER, G., SCHUH, M., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in plants, food and feed in Austria. In: LOGRIECO, A. (Ed.), Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe, Brussels, pp. 25-36.
- LOGRIECO, A., MORETTI, A., RITIENI, A., CHEŁKOWSKI, J., ALTOMARE, C., BOTTALICO, A., RANDAZZO, G., 1993. Natural occurrence of beauvericin in preharvest *Fusarium subglutinans* infected corn ears in Poland. J. Agric. Food Chem. 41(11): 2149-2152.
- LOGRIECO, A., MULÈ, G., MORETTI, A., BOTTALICO, A., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Eur. J. Pl. Path. 108(7): 597-609.
- NEDĚLNÍK, J., 2000. Poškození kukuřice houbami rodu *Fusarium* a kontaminace jejich metabolity. Úroda 48(2): 26-27.
- NEDĚLNÍK, J., 2001. Aktuální srovnání množství deoxynivalenolu a fumonisinu v identických vzorcích kukuřice. In: Sborník. Mykotoxiny a jejich stanovení metodou ELISA, Praha, pp. 17-21.
- NEDĚLNÍK, J., MORAVCOVÁ, H., 2004. Současný pohled na problematiku mykotoxinů. In: BADALÍKOVÁ, B. (Ed.), Nové poznatky v pěstování, šlechtění a ochraně rostlin, Troubsko, pp. 383-386.
- ONO, E. Y. S., SASAKI, E. Y., HASHIMOTO, E. H., HARA, L. N., CORRÊA, B., ITANO, E. N., SUGIURA, T., UENO, Y., HIROOKA, E. Y., 2002. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. Food Add. Contam. 19(11): 1081-1090.
- PEPELJNIAK, S., SEGVIC, M., CVETNIC, Z., JESENSKÁ, Z., PIECKOVÁ, E., 1998. Fumonisin production ability of *Fusarium* species isolated from corn in Croatia and Slovak Republic. In: Book of abstracts. 21<sup>st</sup> Congress of the Czechoslovak Society for Microbiology with international participation, Hradec Králové.
- PITT, J. I., 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. New York etc, 634 p.
- PITT, J. I., 1991. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. 2<sup>nd</sup> ed., North Ryde, 188 p.
- RAMIRÉZ, C., 1982. Manual and Atlas of the *Penicillia*. Amsterdam, 874 p.
- RAPER, K. B., FENNELL, D. I., 1965. The Genus *Aspergillus*. Baltimore, 686 p.
- RAPER, K. B., THOM, C., 1949. A Manual of the *Penicillia*. Baltimore, 875 p.
- REENEN-HOEKSTRA, E. S. VAN, FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., STOLK, A. C., 1990. The *Penicillium funiculosum* complex – well defined species and problematic taxa. In: SAMSON, R. A., PITT, J. I. (Eds.), Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, New York & London, pp. 103-119.
- ROTREKL, J., 2004. Závažní škůdci kukuřice a ochrana proti nim. Agro Magazín 5(1): 22-24.
- ROTREKL, J., 2007. Stanovení optimálního termínu pro chemické ošetření kukuřice proti zavíječi kukuřičnému. Rostlinolékař 3: 14-15.
- ŘÍHA, K., 2007. Registrační řízení geneticky modifikovaných hybridů kukuřice. Úroda 2:19-21.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 1996. Introduction to foodborne fungi. Baarn & Delft, 322 p.
- SAMSON, R. A., PITT, J. I., (Eds.) 1990. Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification. New York & London, 478 p.

- SANCHIS, V., MARÍN, S., RAMOS, J., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and related mycotoxins in Spain. In: LOGRIECO, A. (Ed.), Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feed in Europe, Brussels, pp. 191-199.
- SEIFERT, K., 1996. FusKey – Fusarium interactive key. [<http://res.agr.ca/brd/fusarium>].
- STENWIG, H., LIVEN, E., 1988. Mycological examination of improperly stored grains. Acta Agric. Scand. 38(2): 199-205.
- STOLK, A. C., SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 1990. The systematics of the terverticillate penicillia. In: SAMSON, R. A., PITT, J. I. (Eds.), Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, New York & London, pp. 121-136.
- ŠROBÁROVÁ, A., 2000. Populácie húb *Fusarium* spp. sekcie Liseola na zrnách kukurice. In: HÝSEK, J. (Ed.), Mykologická fytopatologie ve 20. a 21. století, Praha, pp. 73-75.
- TZEAN, S. S., CHEN, J. L., LIOU, G. Y., CHEN, C. C., HSU, W. H., 1990. *Aspergillus* and Related Teleomorphs from Taiwan. Hsinchu, 113 p.
- TZEAN, S. S., CHIU, S. C., CHEN, J. L., HSEU, S. H., LIN, G. H., LIOU, G. Y., CHEN, C. C., HSU, W. H., 1994. *Penicillium* and Related Teleomorphs from Taiwan. Hsinchu, 159 p.
- WU, F., 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. Transgenic Research 15: 277-289.
- ZAHRADNÍČEK, J., NEČASOVÁ, M., KOŽNAROVÁ, V., TURKOVÁ, T., BROŽKA, J., 2007. Výnosy a kvalita kukuřice v suchém roce 2006. Úroda 5: 18-19.

# Toxinogenní mikromycety r. *Fusarium* a jejich chemotypy

TAĀANA SUMÍKOVÁ, JANA REMEŠOVÁ, JANA CHRPOVÁ, VÁCLAV ŠÍP

## SUMÍKOVÁ, T., REMEŠOVÁ, J., CHRPOVÁ, J., ŠÍP, V.: Toxinogenic micromycetes of the genus *Fusarium* and their chemotypes

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 151-159. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The aim was to determine the representation of *Fusarium* species and analyze chemotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* using DNA markers for genes Tri7 and Tri13. In total, 72 samples were processed. *Fusarium* species were found in 35 samples and 190 monospore isolates were isolated from the samples. The most frequent micromycetes were *Fusarium graminearum* (57 %); next species were occurred with following frequency *F. culmorum* (14 %), *F. avenaceum* (12 %), *F. poae* (11.5 %), *F. equiseti* (0.5%) and *Fusarium* sp. (5%). The isolates with difficulty determined by morphological methods were detected using published species specific DNA markers. 72 isolates of *F. graminearum* and *F. culmorum* were analyzed using six DNA markers to detect their chemotypes. The analyses revealed two producers of nivalenol.

**Key words:** chemotypes, DNA-markers, deoxynivalenol, *Fusarium*, micromycetes, wheat

TaĀana Sumíková, Jana Remešová, Czech Agricultural University, Kamýcká 129, CZ-165 21, Praha 6, Czech Republic. E-mail: [sumikova@vurv.cz](mailto:sumikova@vurv.cz)

TaĀana Sumíková, Jana Chrprová, Václav Šíp, Crop Research Institute, v.v.i., Drnovská 507, CZ-161 06, Praha 6, Czech Republic.

\* presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, Āeské BudĀjovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Mikromycety rodu *Fusarium* vyskytující se na pšenici a dalších obilovinách jsou známy z celé Evropy (BOTTALICO & PERRONE, 2002). Fuzarióza klasu (scab), choroba klasů způsobená druhy rodu *Fusarium*, se projevuje předčasným odumřením klasů nebo jejich zbělením. Hlavními hostiteli jsou pšenice, ječmen a kukuřice. Toto onemocnění je zvláště významné ve vlhkých oblastech. V takových případech může dojít k význačným ztrátám na výnosech způsobených sterilitou klásků a nedostatečně vyvinutými obilkami. Hlavními původci fuzarióz klasu jsou následující mikromycety rodu *Fusarium*: *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *Microdochium nivale*. Jedná se o fakultativní nespecifické parazity, kteří také mohou infikovat další části rostlin (PARRY et al., 1995, PETROWSKI et al., 2003, LEMMENS et al., 2004). V menší míře se vyskytují další druhy rodu *Fusarium* např. *F. tricinctum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum* a *F. oxysporum* (IOOS et al., 2004). Poškození klasů tedy může být doprovázeno infekcí kořenů nebo listů nebo následným napadením klíčnicích rostlin. Nároky těchto patogenů na výživu jsou nenáročné, jedná se o všudypřítomné saprofyty. Limitujícím faktorem pro přechod do parazitické fáze je obvykle vlhkost. Zvláštní pozornost je věnována schopnosti mnohých původců fuzarióz klasu produkovat mykotoxiny, z důvodů možné kontaminace následných produktů (BOTTALICO & PERRONE, 2002). Přítomnost mykotoxinů, zejména u pšenice, je celosvětově sledovaný problém, protože kontaminace krmiv a potravy se zdá být nevyhnutelná. Následně dochází k projevům chronické nebo akutní mykotoxikózy (trávicí potíže, poruchy plodnosti), především u dobytka a v menší míře i u člověka (IARC, 1993).

Syntéza mykotoxinů DON a NIV u hub rodu *Fusarium* je komplexní proces, do kterého je zahrnuto několik Tri genů, tvořících tzv. trichotecénový biosyntetický cluster. Gen Tri13 se

podílí na přeměně DONu na NIV a gen Tri7 na acetylaci NIVu na 4-acetyl-nivalenol (4-ANIV) (LEE et al., 2001, 2002, BROWN et al., 2001).

Cílem uvedené studie bylo stanovit druhového složení původců fuzarióz klasu pšenice v České republice a detekce chemotypů druhů *F. graminearum* a *F. culmorum* pomocí molekulárních markerů odvozených od genů Tri7 a Tri13.

## Materiál a metodika

Celkem bylo zpracováno 72 vzorků ozimé pšenice z různých lokalit České republiky z let 2003 a 2004. Mikromycety rodu *Fusarium* byly zjištěny ve 35 vzorcích. Z uvedených vzorků bylo vyizolováno a určeno 190 monosporických izolátů r. *Fusarium*.

Povrch obilek byl sterilizován omytím v 1% NaClO po dobu 3 min. a poté třikrát omyt sterilní vodou po dobu 1 min. Pro kultivaci byla použita následující média (ATLAS & PARKS 1997): Pentachloronitrobenzene agar a iprodionem (PCNB) a bramborovo-dextrózový agar (PDA). Petriho misky byly inkubovány při 20-25°C. Jednotlivé druhy byly určovány pomocí světelného mikroskopu při kultivacích na příslušných diagnostických médiích: Speciální živný agar (SNA), bramborovo-dextrózový agar PDA, ovesný agar (OA). Mikromycety byly determinovány s použitím následujících klíčů: BOOTH (1971), BRAYFORD (1993), BURGESS (1988), SAMSON et al. (1996) SEIFERT (1996) a LESLIE & SUMMERELL (2006).

Izoláty, u kterých byla determinace pomocí klasických morfologických metod obtížná nebo nejednoznačná, byly testovány pomocí druhově specifických primerů pro druhy *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. equiseti* (NICHOLSON et al., 1998, LEES, 1995, PARRY & NICHOLSON, 1996, MISHRA et al., 2003).

Chemotypy byly hodnoceny u 72 izolátů druhů *F. graminearum* a *F. culmorum* použitím primerů a optimalizované metodiky podle CHANDLER et al. (2003).

DNA byla izolovaná metodou CTAB (LEISOVA et al., 2005). Kvalita a koncentrace DNA byla ověřena pomocí transluminátoru po separaci v 0,8% agarózovém gelu, po obarvení ethidiumbromidem a srovnána s délkovým standardem Lambda DNA/*Hind*III.

Všechny PCR reakce proběhly v celkovém objemu 25µl obsahujícím 10× pufr Qiaqen, 2,5 mM dNTP mix (Promega), 0,8 U Taq polymerase (Qiaqen), 100nM jednotlivých primerů a 10ng DNA. PCR cyklus na termocykleru UNO II (Biometra) byl následující: 95°C 5 min, 35 cyklů při 95°C 30s, 62/60°C 30s, 72°C 40s a konečná extenze při 72°C 5 min (teploty annealingu pro jednotlivé primery viz. tab. 1). Produkty reakce byly separovány elektroforézou v 2% gelu a po obarvení ethidiumbromidem byly vizualizovány pod UV lampou.

**Tab. 1.** Použité primery, teplota annealingu a velikost produktu PCR reakce

název primeru	detekce druhu/chemotypu	annealing (°C)	produkt (bp)
Fg16 <sup>a</sup>	<i>F. graminearum</i>	62	570
Fc51 <sup>a</sup>	<i>F. culmorum</i>	60	400 - 500
Fa <sup>b</sup>	<i>F. avenaceum</i>	60	920
Fp <sup>c</sup>	<i>F. poae</i>	62	220
Fe <sup>c</sup>	<i>F. equiseti</i>	62	400
Tri13DON <sup>d</sup>	DON	60	282
Tri13NIV <sup>d</sup>	NIV	60	312
Tri7 <sup>d</sup>	DON/NIV	60	436 (NIV), 458 – 535 (DON)
Tri7NIV <sup>d</sup>	NIV	60	465
Tri7DON <sup>d</sup>	DON	60	381 – 445
MinusTri7 <sup>d</sup>	DON	58	483 (produkt detekuje absenci genu Tri7)

<sup>a</sup> Nicholson et al., 1998

<sup>b</sup> Lees, 1995

<sup>c</sup> Parry & Nicholson, 1996

<sup>d</sup> Chandler et al., 2003

<sup>e</sup> Mishra et al., 2003

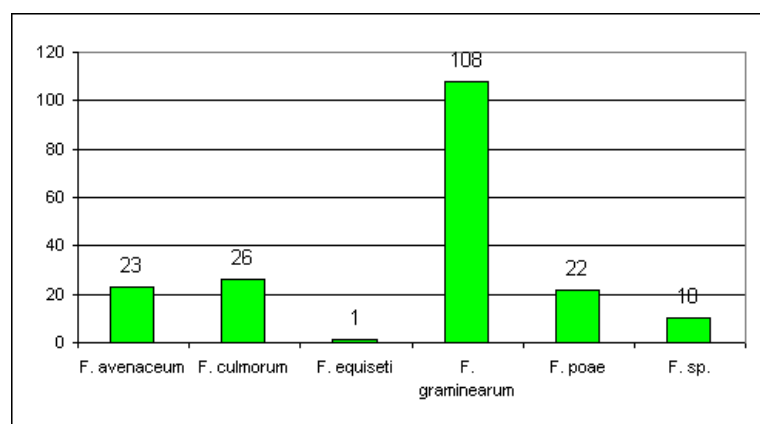
## Výsledky

Mikromycety r. *Fusarium* byly zjištěny ve 35 vzorcích ozimé pšenice, odebrané na území České republiky. Z uvedených vzorků bylo celkem izolováno a determinováno 190 monosporických izolátů. Nejčastěji se vyskytovaly mikromycety druhu *F. graminearum* (57%), ostatní druhy byly zjištěny v následujících frekvencích *F. culmorum* (14 %), *F. avenaceum* (12 %), *F. poae* (11,5 %), *F. equiseti* (0,5%) a *Fusarium* sp. (5%).

Analýzou 72 izolátů druhů *F. graminearum* a *F. culmorum* byly detekovány dva producenti nivalenolu – izolát č.1 (*F. graminearum*) a izolát č. 99 (*F. culmorum*). Ostatní testované izoláty patří mezi producenty deoxynivalenolu. V příloze č.1 jsou uvedeny reakce testovaných izolátů k jednotlivým markerům.

Izoláty obtížně určitelné pomocí klasických morfologických metod byly detekovány pomocí publikovaných druhově specifických markerů pro druhy *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* a *F. poae*.

**Graf 1.** Zastoupení izolovaných mikromycetů rodu *Fusarium* (počet izolátů).



Mykologický průzkum vzorků ozimé pšenice z území České republiky z let 2003 a 2004 odhalil, že dominantním druhem r. *Fusarium* bylo *F. graminearum*. Dalšími detekovanými druhy byly *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* a *F. equiseti*. Zjištěný výsledek je v souladu s posledními výzkumy, které uvádějí, že na území České republiky začíná převažovat *F. graminearum* oproti minulým letům, kdy bylo dominantním druhem *F. culmorum* (SÝKOROVÁ et al., 2003, CHRPOVÁ et al., 2004, OSTRÝ et al., 2004). Uvedená skutečnost může být způsobena klimatickými změnami, které jsou vhodnější pro druh *F. graminearum*, který preferuje teplejší a sušší klima oproti druhu *F. culmorum* (PARRY et al., 1995).

Analýza 72 izolátů druhů *F. graminearum* a *F. culmorum* pomocí šesti různých DNA markerů odvozených od genů Tri7 a Tri13 odhalila pouze 2 producenty nivalenolu. Zbývající izoláty byly určeny jako producenti deoxynivalenolu. LEE et al. (2002) zjistili, že gen Tri13 je potřebný k přeměně DONu na NIV a gen Tri7 se podílí na modifikaci nivalenolu na 4-ANIV. LEE et al. (2002) dále uvádí, že existují izoláty, které mohou mít funkční gen Tri7 a zároveň nefunkční gen Tri13. Z přírody jsou však známy jen izoláty (včetně těch zde použitých), které mají buď oba geny funkční - NIV producenti nebo oba geny mutované a proto nefunkční - DON producenti (CHANDLER et al., 2003, BROWN et al., 2002).

Výrazná převaha DON producentů v ČR se shoduje s údaji v literatuře o mnohem častějším výskytu DONu v napadených obilkách na území Evropy (BOTTALICO et al., 1998). Dosavadní výsledky potvrdily předpoklad, že výskyt NIV producentů je natolik nízký, že nehrozí závažnější kontaminace obilky toxičtějším nivalenolem.

## Poděkování

Práce byla vypracovaná za podpory projektu QG50076 Mze České republiky. Molekulární analýza chemotypů byla provedena na pracovišti John Innes Centre Norwich, department of Disease & Stress Biology. Autoři děkují vedoucímu týmu Dr. Paulovi Nicholsonovi a jeho kolegům za umožnění práce a všestrannou pomoc.

## Literatura

- BRAYFORD, D., 1993. The identification of *Fusarium* species. Egham, 118 p.
- BOOTH, C., 1971. The genus *Fusarium*. Kew, 237 p.
- BOTTALICO, A., 1998 *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxine profiles, in Europe. J. Plant Pathol. 80: 85-103.
- BOTTALICO, A., PERRONE, G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 611-624.
- BROWN, D. W., MCCORMIC, S. P., ALEXANDER, N. J., PROCTOR, R. H., DESJARDINS, A. E., 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*. Fungal Genet. Biol. 32: 121-133.
- BROWN, D.W., MCCORMIC, S.P., ALEXANDER, N.J., PROCTOR, R.H., DESJARDINS, A.E., 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 in a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. Fungal Genet. Biol. 36: 224-233.
- BURGESS, L.W., LIDDELL, C.M., SUMMERELL, B.A., 1988. Laboratory Manual for *Fusarium* Research, 150 p.
- CHANDLER, E. A., SIMPSON, D. R., THOMSETT, M. A, NICHOLSON, P., 2003. Development of PCR assays to *Tri7* and *Tri13* trichothecene biosynthetic genes, and characterization of chemotypes of *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. cerealis*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 62: 355-367.
- CHRPOVÁ, J., ŠÍP, V., SÝKOROVÁ, S., SYCHROVÁ, E., MATĚJOVÁ, E., 2004. Beitrag zur Problematik der Ährenfusariosen bei Getreide. J. Appl. Bot. Food Qual. 78: 153-156.
- DOOHAN, F. M., PARRY, D. W., JENKINSON, P., NICHOLSON, P., 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyze *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47, 197-205.
- IARC, 1993. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 56. Some Naturally Occuring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 571 p.
- IOOS, R., BELHADJ, A., MENEZ, M., 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. Mycopathologia 158: 351-362.
- LEE, T., HAN, Y-K., KIM, K-H., YUN, S-H., LEE, Y-W., 2002. *Tri13* and *Tri7* determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. Applied and Environmental Microbiology 68: 2148-2154.

- LEE, T., OH, D-W., KIM, H-S., LEE, J., KIM, Y-H., YUN, S-H., LEE, Y-W, 2001. Identification of Deoxynivalenol- and Nivalenol-producing chemotypes of *Giberella zeae* by using PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2966-2972.
- LEES, A., 1995. Diagnostic and control of root pathogens of wheat. Buckinghamshire, UK: Open University, PhD thesis; in DOOHAN, F.M., PARRY, D.W., JENKINSON, P., NICHOLSON, P., 1998. The use of species-specific PCR-based assays to analyze *Fusarium* ear blight of wheat. *Plant Pathology* 47, 197-205.
- LEIŠOVÁ, L., KUČERA, L., MINAŘÍKOVÁ, V., OVESNÁ, J., 2005. AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net form of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathol.* 54: 66-74.
- LEMMENS, M., BUERSTMAYER, H., KRŠKA, R., SCHUHMACHER, R., GRAUSGRUBER, H., RUCKENBAUER, P., 2004. The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 299-308.
- LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa, 338 p.
- MISHRA, P. K., FOX, R. T. V., CULHAM, A., 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2118: 329-332.
- NICHOLSON, P., SIMPSON, D. R., WESTON, G., REZANOOR, H. N., LEES, A. K., PARRY, D. W., JOYCE, D., 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assay. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53: 17-37.
- OSTRÝ, V., ŠKARKOVÁ, J., MALÍŘ, F., SÝKOROVÁ, S., 2004. Advances on the Occurrence of Toxicogenic Fungi and Mycotoxins in the Czech Republic, 99. 67 – 81. In: Logrieco, A. & Visconti, A. (Eds.), „An Overview on Toxicogenic Fungi and Mycotoxins in Europe“, Kluwer, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London, pp. 67-81.
- PARRY, D. W., NICHOLSON, P., 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathol.* 45: 383 – 391.
- PARRY, D. W., JENKINSON, P., MC. LEOD, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small-grain cereals - a review. *Plant Pathol.* 44: 207-238.
- PETROWSKI, J., KIECANA, I., KACZMAREK, Z., 2003. Natural occurrence and distribution of *Fusarium* toxins in contaminated cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 331-339.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S, FRISVAD, J. C, FILTENBORG, O., 1996. Introduction to foodborne fungi. Baarn & Delft, 322 p.
- SEIFERT, K., 1996. FusKey - *Fusarium* interactive key. [<http://res.agr.ca/brd/fusarium>].
- SÝKOROVÁ, S., ŠÍP, V., NEVRKLOVÁ, M., SYPECKÁ, Z., HAJŠLOVÁ, J., HÝSEK, J., 2003. The survey of *Fusarium* mycotoxins content in grain of winter wheat cultivars collected from different regions of Czech Republic. In: Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium, 1. – 6.9.2003, Paestrum Italy, Vol. 3 , pp. 1266 – 1268.

## Příloha č. 1

Chemotypy druhů *F. graminearum* a *F. culmorum*

izolát	<i>Fusarium</i> sp.	Fg11	Fc51	Tri13DON	Tri13NIV	Tri7	Tri7NIV	Tri7DON	MinusTri7	Toxin
1	<i>graminearum</i>	+	\	\	+	+	+	\	\	NIV
4	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	\	\	DON
10	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
11	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
12	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	\	\	DON
13	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	\	\	DON
14	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	\	\	\	\	DON



20	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
27	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
28	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
29	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	\	\	DON
30	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
31	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
32	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
33	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
35	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
36	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
37	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
39	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
43	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
44	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
46	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
47	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
48	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
49	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
51	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
52	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
58	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
60	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
61	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
62	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
63	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
64	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
65	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
66	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
67	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
71	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
72	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
73	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
84	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
85	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	+	+	DON
89	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
99	<i>culmorum</i>	\	+	\	+	\	+	\	\	NIV
105	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
106	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
108	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
195	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
196	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
197	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
198	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
200	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
201	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
202	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
205	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
206	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
207	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
210	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	+	+	DON
211	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
214	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON

215	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
217	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
218	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
219	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
220	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
221	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
222	<i>culmorum</i>	\	+	+	\	\	\	\	+	DON
223	<i>culmorum</i>	\	+	+	\	\	\	\	+	DON
224	<i>culmorum</i>	\	+	\	\	\	\	\	+	DON
225	<i>culmorum</i>	\	+	+	\	\	\	\	+	DON
226	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
227	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON
228	<i>graminearum</i>	+	\	+	\	+	\	+	\	DON

+ amplifikace produktu předpokládané velikosti (viz. tabulka č. 1)

\ nedošlo k amplifikaci očekávaného produktu

## Výskyt rzivosti libečku

IVANA ŠAFRÁNKOVÁ & JIŘÍ MÜLLER

Šafránková, I., Müller, J.: **The rust occurrence on the lovage.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp.158-162. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

Lovage (*Levisticum officinale* Koch) is a traditional spice in Southern Europe and it is still common in Southern and Central Europe. Until 2006, there were no records of any important diseases of lovage in the Czech Republic. Rust on the lovage was found north-west of Brno in May 2006. On the leaves there were a lot of uredinia and one group of spermogonia. Production of teliospores was noted in September. Based on morphological characters this rust pathogen was identified as *Puccinia bornmuelleri* Magnus.

**Keywords:** rust, lovage, *Puccinia bornmuelleri*

Ivana Šafránková, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic. E-mail: safran@mendelu.cz  
Jiří Müller, Provazníková 76, 613 00 Brno, Czech Republic

\* presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

Přestože se libeček lékařský (*Levisticum officinale*) Koch pěstuje ve většině států Evropy a Severní Ameriky, není jeho původ dosud přesně určen. Blízce příbuzný druh *Levisticum persicum* pochází z území bývalé Persie a předpokládá se, že plané formy libečku se vyskytují v těžce přístupných pohořích jihozápadní Asie (Heeger, 1989). Na *L. persicum* se vyskytuje rez, které byla nalezena i na *L. officinalis* (Müller & Šafránková, 2007).

V roce 2006 byly nalezeny v Brně rzivé listy libečku lékařského se spermogoniemi, urediemi a teliemi rzi. Podle symptomů choroby na listech a stvolech libečku, charakteristických znaků patogenu a morfologické charakteristiky izolátů byl určen původce rzivosti libečku jako rez *Puccinia bornmuelleri* Magnus (1899).

Dosud je známo pouze několik lokalit výskytu rzi *P. bornmuelleri*, a to na *Levisticum persicum* Freyn & Bornm. v jižním Íránu v provincii Kermān, na hoře Kuh-i-Häsar (Magnus, 1899) a v Afghánistánu v provincii Bāmyān, Band-i-Amir u jezera Band-i-Zolfikar (Petra, 1966). V Evropě na *Levisticum officinale* Koch v Rumunsku v r. 2000 v Iași, v roce 2001 v Botoșani a v roce 2002 Pitești (Cătălin et al., 2007). V roce 2006 byla nalezena i v České republice v Brně (Müller & Šafránková, 2007), a v roce 2007 ve Zručí nad Sázavou a v Lutíně (ústní sdělení).

***Puccinia bornmuelleri* Magnus**, Verh. Zool.-Bot. Ges. Wien 1899 p. 94

Popis patogenu:

spermogonia ve skupinách na líci listů ponořená v pletivu, medově žlutá, kulovitá až mírně zploštělá, 82–88 μm × 79–85 μm, perifysy až 46 μm dlouhé, na bázi 3 μm široké, k vrcholu se zužující do špičky nebo háčkovitě zahnuté;

spermacie elipsoidní, bezbarvé, 3–4 × 2,5 μm;

uredia na zelenožlutých skvrnách ø 1,5–3 mm, roztroušená po obou stranách listů, zejména na rubu, okrouhlá, ø 0,6–1,2 mm, splývající, na žilkách ve skupinách, které jsou až 4 mm dlouhé

a 1,6 mm široké, prášivá, skořicově hnědá, lemovaná protrženou epidermis, později často uspořádaná kruhovitě kolem centrální kupky.

urediospory široce elipsoidní, široce opakvejitě až kulovité, v bazální části často zúžené nebo zaokrouhlené, 28–35 × 25–30 μm, stěna světle hnědá, ca 2,5 μm tlustá, na vrcholu ztloustlá o síle 4–5,5 μm, jemně ostnitá, vzdálenost ostnů ca 2,5 μm; (2)–3–(4) klíční póry, stopka bezbarvá, stejně dlouhá jako spora nebo kratší;

telia vznikají z uredií, černohnědá, okrouhlá, ø 0,25–1,0 mm, splývající, na řapících až 8 × 1,8 mm (za sucha).

teliiospory hruškovité, 38–51 × 21–25 μm, na vrcholu zaokrouhlené, dole zúžené, řidčeji zaokrouhlené, na obrysu mírně hrbolaté či jemně bradavkaté, odstup bradavek cca 1–1,5 μm, stěna 1,5 μm tlustá, na vrcholu poněkud tlustší, kaštanově hnědá, klíční pór horní buňky vrcholový, bez papily nebo se světlejší papilou, klíční pór spodní buňky v dolní třetině; stopka krátká, bezbarvá, spory opadavé.

*Puccinia bornmuelleri* je vývojově brachypuccinia.

### Poděkování

Príspevek byl zpracován s podporou Výzkumného záměru č. MSM6215648905 „Biologické a technologické aspekty udržitelnosti řízených ekosystémů a jejich adaptace na změnu klimatu“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

### Literatura

- Cătălin, T., Gjørum, H. B., Constantinescu, O., 2007. *Puccinia bornmuelleri* on cultivated *Levisticum*. Mycologia Balcanica, 4: 75–76.
- Heeger, E.F., 1989. Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenbaues. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 792 p.
- Magnus, P., 1899. J. Bornmüller, Iter Persico-turcicum 1892/93. Fungi, Pars II. Wien, Verh. Zool.- Bot. Ges. 49: 87–103.
- Müller, J., Šafránková, I., 2007: Occurrence of *Puccinia bornmuelleri* Magnus in the Czech Republic. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. 2: 95–98.
- Petrak, F., 1966. Kleine Beiträge zur Ustilagineen- und Uredineenflora von Afghanistan und Pakistan. Sydowia 20: 278–287.

**Přílohy:**



**Obr. 1.** Zelenožluté skvrny s uredii na listu libečku.



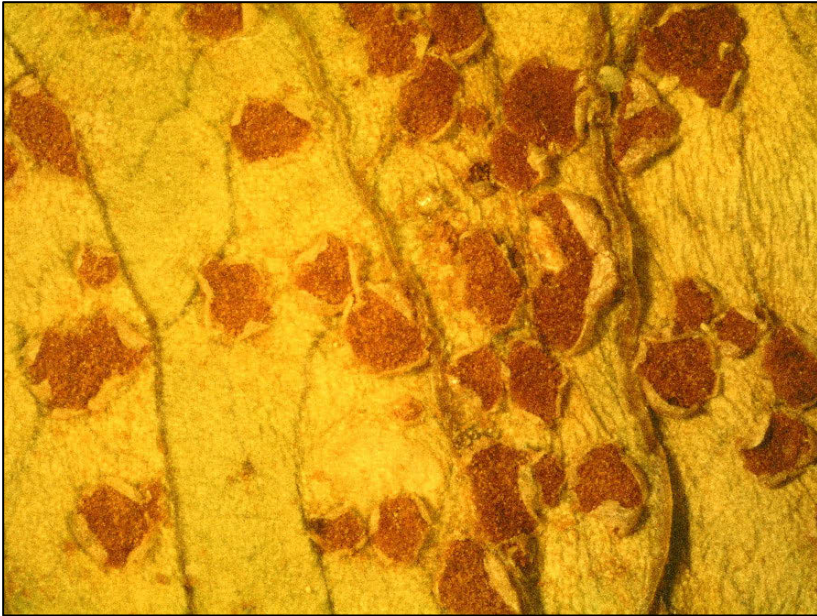
**Obr. 2.** Teleutospory *Puccinia bornmuelleri*



**Obr. 3.** Uredospora *P. bornmuelleri*



**Obr. 4.** Uredia na stvolu libečku



**Obr. 5 a 6.** – Uredia na rubu listu

# Mikroskopické huby v interiéroch historických budov

ALEXANDRA ŠIMONVIČOVÁ

## ŠIMONVIČOVÁ, A.: Microscopic fungi in inside of historical buildings

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp.163-168. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The checklist of microscopic fungi isolated inside of historical buildings in period of 1998 to 2007 is presented. Microscopic fungi were isolated from variable substrates as air, wooden material, stone, wall paintings, textile. Most of all species (38) were from wooden substrate (African Art - Curia Brämer) and stone monuments in hypogean cemetery (Crypt of Chatam Sófer) isolated. On the other hand, only 4 species of microscopic fungi were from the air in Slovak National Gallery isolated.

**Keywords:** microscopic fungi, historical buildings, inside, air, wooden material, stone, wall paintings, textile

Alexandra Šimonovičová, Department of Pedology, Faculty of Sciences, Komenský University, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovak Republic. E-mail: [asimonovicova@fns.uniba.sk](mailto:asimonovicova@fns.uniba.sk)

\* presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Priestory mnohých historických budov sú dnes využívané ako galérie, múzeá, knižnice, či depozity alebo archívy rôznych kultúrnych a umeleckých objektov značného historického významu. Veľmi často však dochádza ku kontaminácii interiérov historických budov mikroskopickými hubami, ktoré sú v tomto prostredí ako invázne organizmy. Tieto organizmy sa do vnútorných priestorov dostávajú vo forme rôznych odpočinkových útvarov (spóry, úlomky mycélia a pod.) spolu s prachom alebo aj na odeve návštevníkov, resp. pracovníkov. V prípade vhodného organického substrátu, dostatočnej vlhkosti a teploty dochádza ku klíčeniu spór a rastu mycélia. Kontaminácia mikroskopickými hubami sa prejaví napr. ako viditeľné belavé povlaky, tmavšie bodky alebo fľaky, čo závisí od konkrétneho druhu a jeho fyziologických prejavov. Rast mikroskopických húb a produkcia metabolitov často vedie k deštrukcii a biodegradácii poškodeného objektu, resp. substrátu.

Kontaminácia interiérov mikroskopickými hubami si zasluhuje pozornosť jednak z hľadiska reštaurátorov (poškodenie historických objektov, resp. ochrana pred poškodením) a jednak zo zdravotného hľadiska pracovníkov (alergické reakcie, bronchitické a kožné problémy a pod. vyvolané obrovským množstvom suchých konídií).

## Materiál a metódy

V období od 1998 - 2007 sme izolovali mikroskopické huby z rôzneho materiálu, resp. substrátu v interiéroch viacerých historických budov:

- Martin 1998/2005 - Slovenské národné múzeum (SNM), depozit gotiky. Drevené plastiky s polychrómiou a bez polychrómie, obrazy, obrazové plátna - textil, vzduch.
- Trnava 1999 - kaplnka seminára Sv. Štefana - Stephaneum (r. 1724) a kaplnka Arcibiskupského úradu - Konvikt. Neskorobarokové nástenné maľby pred reštaurovaním, vzduch.



- Bratislava 1999 - Židovský cintorín z r. 1670, Krypta Chatama Sófera, pred reštaurovaním. Kamenný substrát - náhrobné kamene, stena a strop.
- Bratislava 2003 - Hudobné múzeum v bašte Luginsland na Bratislavskom hrade. Drevo (rôzne fúkacie nástroje, drevená časť gájd), stena, vzduch.
- Bratislava 2003 - Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria. Drevo (plastiky, kultové tvárové masky), kamenný substrát (plastiky zo zeleného serpentínu), závesná textília, stena, vzduch.
- Banská Bystrica 2005 - tzv. „Zelená miestnosť“ v Thurzovom dome, Stredoslovenské múzeum. Nástenné maľby pred reštaurovaním.
- Bratislava 2005 - Slovenská národná galéria (SNG) stála expozícia gotiky. Drevené plastiky s polychrómiou a bez polychrómie bez viditeľného poškodenia mikroskopickými hubami, vzduch.

Na mykologickú analýzu sme odoberali rôznych materiálov:

- Vzduch - sedimentačná metóda (30 až 60 min.) priamo na Petriho misky so živným médiumom.
- Stena - maľba, poškodená omietka (sterilné vatové tampóny + jemný zoškrab sterilným skalpelom).
- Drevené objekty - plastiky, rámy obrazov (jemný zoškrab sterilným skalpelom + sterilné vatové tampóny).
- Textil - obrazové plátna, závesné textílie (sterilné vatové tampóny).

Spracovanie odobratého materiálu:

- Aplikácia vatových tampónov s odobratým materiálom priamo na živné médium.
- Vytrepávanie vatových tampónov s odobratým materiálom do sterilnej destilovanej vody a očkovanie zriedeného inokula na živné médium.
- Vytrepávanie materiálu získaného zoškrabom do sterilnej destilovanej vody a očkovanie zriedeného inokula na živné médium.
- Živné média - CzD, CDY, RB, SAB, GKCH, DRBC, PDA (Himedia, Bombay). S každou vzorkou sme pracovali minimálne v troch opakovaníach.
- Získanie zmesnej kultúry.
- Príprava čistej kultúry - identifikácia - mikroskopicky pomocou diagnostickej literatúry, PCR (PANGALLO et al., 2007).

## Výsledky a diskusia

Za obdobie od roku 1998 - 2007 sme z mykologického hľadiska analyzovali pomerne veľké množstvo rôzneho substrátu (FRANKOVÁ et al., 1999; MACHARIKOVÁ-GÓDYOVÁ, 2005; PANGALLO et al., 2007; ŠIMONVIČOVÁ & PANGALLO, 2007; ŠIMONVIČOVÁ et al., 2000, 2002, 2004), ktorý sme odoberali z interiérov historických budov (Tab. 1). Vo väčšine prípadov sa jednalo o budovy, resp. objekty, ktoré boli v ostatných rokoch výrazne zanedbávané alebo využívané len ako skladové priestory. Nebola im venovaná patričná starostlivosť a v dobe odberu materiálu sa nachádzali tesne pred rekonštrukciou.

Množstvo a druhová skladba izolovaných mikroskopických húb sa líši tak vo vzťahu k sledovanému substrátu ako aj vo vzťahu k objektu. Najbohatšiu druhovú skladbu (38) sme izolovali z drevených objektov (plastiky a tvárové masky) a z textilného materiálu (26) v Múzeu afrického umenia v Brämerovej kúrii v Bratislave. Budova Brämerovej kúrie bola postavená v r. 1620. V čase odberu vzoriek priestory boli veľmi vlhké, steny zatečené, na

mnohých miestach opadávala omietka a boli vyzrážané soli. Na exponátoch sme voľným okom pozorovali viditeľné nárasty a povlaky mikroskopických húb. Tzv. Petrovského zbierka umeleckých predmetov pochádza z rôznych častí afrického kontinentu a bola veľmi hojne navštevovaná.

Druhú najbohatšiu rodovú a druhovú skladbu mikroskopických húb (34) sme zistili na náhrobných kameňoch, ktoré pochádzajú zo starého židovského cintorína z r. 1670. Tieto priestory, ktoré sú pietnym miestom významného židovského rabína Chatama Sófera a viacerých náboženských teoretikov a pedagógov svetoznámej bratislavskej ješivy - rabínskej školy, zo 14. storočia, však boli a sú uzatvorené a navštevované len sporadicky, resp. po dohode. Na náhrobných kameňoch boli viditeľné farebné povlaky až porasty mycélia. V priestoroch podzemnej krypty bola nízka teplota, vysoká vzdušná vlhkosť a miestami voda presakovala cez strop po stenách, t.j. podmienky boli vhodné pre rozvoj mikroskopických húb.

Na druhej strane, stála expozícia gotiky (SNG v Bratislave) sa nachádza v priestoroch, ktoré majú stálu a nepretržite kontrolovanú teplotu a vlhkosť. Napriek tomu, že plastiky, ktoré sme podrobili mykologickej analýze nevykazovali žiadne známky viditeľného poškodenia alebo farebných zmien, zistili sme na nich 16 druhov (PANGALLO et al., 2007). Mykocenóza vzduchu bola v týchto priestoroch minimálna (4).

Drevené plastiky v depozite SNM v Martine sme podrobili mykologickej analýze opakovaně, t.j. pred reštaurovaním (FRANKOVÁ et al., 1999) a po reštaurovaní (ŠIMONVIČOVÁ & PANGALLO, 2007). Zistili sme, že účinok aj opätovného reštaurovania za použitia viacerých petrifikačných roztokov (solakryl BT-55, klinčeková silica, včelí vosk v toluéne, 7 %-ný roztok ajatínu) bol minimálny alebo takmer žiaden ak sa objekt znova umiestnil do nevyhovujúcich priestorov ako sú vlhké a tmavé priestory. Druhová skladba sa značne zvýšila (Sv. Mikuláš, 18. stor., drevená plastika bez polychrómie) a zaznamenali sme masívny výskyt druhu *Chrysosporium pannorum*. V upravených a suchých priestoroch s kontrolovanou teplotou a vlhkosťou sa po reštaurovaní (Sv. Barbora, 16. stor., drevená plastika s polychrómiou) mykocenóza naopak znížila.

V priebehu sledovania mykocenózy z rôznych substrátov v interiéroch historických budov sme zaznamenali tiež pre Slovensko niektoré nové druhy ako napr. *Merimbla ingelheimensis*, *Penicillium arenicola* (GÓDYOVÁ, 2000), *Myxotrichum deflexum* (KRAKOVSKÁ & GÓDYOVÁ, 2003) a *Engyodontium album* (ŠIMONVIČOVÁ et al., 2004).

Medzi najčastejšie izolované mikroskopické huby, bez ohľadu na substrát a interiér, patria početné druhy rodu *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* a *Trichoderma*. Ascomycota a Zygomycota sú zastúpení minimálne (Tab. 1).

**Tab. 1.** Zoznam mikroskopických húb izolovaných z rôzneho substrátu v interiéroch viacerých historických budov v priebehu rokov 1998 - 2007

Substrát	Lokalita / Mikroskopické huby
<b>Vzduch</b>	<b>Kaplnky, Trnava:</b>
	<i>Alternaria tenuis</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. expansum</i> , <i>Stemphylium</i> sp., <i>Trichoderma koningii</i> , <i>T. viride</i>
	<b>Depozit gotiky SNM, Martin:</b>
	<i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. penicillioides</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>P. frequentans</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.
	<b>Hudobné múzeum, Bratislava:</b>
	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. brassicicola</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ,

	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. macrocarpum</i> , <i>C. sphaeospermum</i> , <i>Fusarium sporotrichoides</i> var. <i>sporotrichoides</i> , <i>Helminthosporium velutinum</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Torula herbarum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	<b>Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria:</b>
	<i>Acremonium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>A. consortiale</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Stachybotrys chartarum</i>
	<b>Stála expozícia gotiky, SNG, Bratislava:</b>
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. glabrum</i>
<b>Drevený substrát:</b>	<b>Depozit gotiky SNM, Martin:</b>
	<i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus amstelodami</i> , <i>A. fischeri</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.
	<b>Hudobné múzeum, Bratislava:</b>
	<i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. macrocarpum</i> , <i>Humicola nigrescens</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i>
	<b>Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria, Bratislava:</b>
	<i>Acremonium</i> sp., <i>A. murorum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>A. alternata</i> , <i>A. consortiale</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. penicillioides</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. resinae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Humicola</i> sp., <i>Nigrospora sphaerica</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. thomii</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>T. viride</i> , <i>Ulocladium</i> sp., <i>Verticillium tenerum</i>
	<b>Stála expozícia gotiky, SNG, Bratislava:</b>
	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>Eurotium amstelodami</i> , <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. herquei</i> , <i>P. sacculum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> , <i>Trichoderma viride</i>
<b>Kamenný substrát:</b>	<b>Krypta Chatama Sófera, Bratislava:</b>
	<i>Acremonium</i> sp., <i>A. murorum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>P. restrictus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>C. cladosporioides</i> , <i>Clonostachys roseum</i> , <i>Doratomyces</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Mortierella</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>P. lilacinus</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. arenicola</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>P. olsoni</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp., <i>Stachybotrys</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.
	<b>Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria, Bratislava:</b>
	<i>Alternaria</i> sp., <i>A. alternata</i> , <i>Arthrinium phaeospermum</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>C. cladosporioides</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Oidiodendron</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>P.</i>

	<i>farinosus</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. glandicola</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Ulocladium chartarum</i> , <i>Verticillium</i> sp.
<b>Nástenná maľba:</b>	<b>Kaplnky, Trnava:</b>
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Phialophora bubaki</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Stemphylium</i> sp. <i>Trichoderma koningii</i>
	<b>Zelená miestnosť v Thurzovom dome, Banská Bystrica:</b>
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Neosartorya fischeri</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>
<b>Stena</b>	<b>Hudobné múzeum, Bratislava:</b>
	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>A. radicina</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. macrocarpum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Helminthosporium velutinum</i> , <i>Humicola nigrescens</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Phialophora</i> sp., <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Ulocladium</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.
	<b>Krypta Chatama Sófera, Bratislava:</b>
	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Doratomyces</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Gliocladium</i> sp., <i>Mortierella</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Verticillium</i> sp.
	<b>Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria, Bratislava:</b>
	<i>Acremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. candidus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Alternaria consortiale</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Botryotrichum piluliferum</i> , <i>Chrysosporium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>Engyodontium album</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>P. griseofulvum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp.
<b>Textil</b>	<b>Depozit gotiky SNM, Martin:</b>
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. restrictus</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium frequentans</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>Trichoderma viride</i>
	<b>Múzeum afrického umenia, Brämerova kúria:</b>
	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. consortiale</i> , <i>Arthrinium phaeospermum</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. penicillioides</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. macrocarpum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Myxotrichum deflexum</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>P. variotii</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>

## Záver

Mnohé objekty, ktoré sú buď súčasťou expozície alebo sa na určité obdobie nachádzajú v depozitoch, predstavujú pre národ cenné historické a kultúrne dedičstvo. Preto im je potrebné venovať patričnú pozornosť a to nielen už poškodeným, ale aj tým, ktoré na prvý pohľad nejavia známky poškodenia. Preto si monitoring výskytu mikroskopických húb v interiéroch historických budov vyžaduje pozornosť nielen z hľadiska reštaurátorov ako aj zo zdravotného hľadiska pracovníkov.

## Pod'akovanie

Príspevok je súčasťou grantovej úlohy VEGA 2/5066/26.

## Prehľad literatúry

- FRANKOVÁ, E., ŠIMONVIČOVÁ, A., BACIGÁLOVÁ, K., 1999: Mikroskopické huby izolované z depozitov Slovenského národného múzea v Martine. Bull. Slov. Bot. Spoločn. 21: 39-42.
- GÓDYOVÁ, M., 2000: *Merimbla ingelheimensis* (T. H. Beyma) Pitt and *Penicillium arenicola* Chalab. (Deuteromycota) - nové druhy pôdných mikromycét pre Slovensko. Bull. Slov. Bot. Spoločn. 22: 29-35.
- KRAKOVSKÁ, Z., GÓDYOVÁ, M., 2003: *Myxotrichum deflexum* Berk. - isolation and in vitro antimycotis susceptibility testing. Biológia 58: 25-27.
- MACHARÍKOVÁ-GÓDYOVÁ, M., 2005: Výskyt a význam pôdných mikroskopických húb v životnom prostredí. ms, Dizertačná práca, katedra pedológie Pr.f. KU, Bratislava, 121 p.
- PANGALLO, D., ŠIMONVIČOVÁ, A., CHOVANOVÁ, K., FERIANC, P., 2007: Wooden art objects and museum environment: identification and biodegradative characteristics of isolated microflora. Lett. Appl. Microbiol. 45(1): 87-94.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., PANGALLO, D., 2007: Mikroskopické huby vo vzťahu k degradácii drevených objektov. Acta Environ. Univ. Comen. (in press).
- ŠIMONVIČOVÁ, A., FRANKOVÁ, E., GÓDYOVÁ, M., 2000: Biokorózia historickej architektúry ako dôležitý faktor jej chátrania. Životné prostredie 6: 317-321.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., GÓDYOVÁ, M., KUNERT, J., 2004: *Engyodontium album*, a new species of microscopic fungi for Slovakia and its keratinolytic activity. Biológia 59(1): 17-18.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., GÓDYOVÁ, M., ŠEVC, J., 2004: Airborne and soil microfungi as contaminants of stone in a hypogean cemetery. Int. Biodeter. Biodeg. 54: 7-11.
- ŠIMONVIČOVÁ, A., FRANKOVÁ, E., GÓDYOVÁ, M., ŠIMONVIČ, V., 2002: Pôdne mikromycéty znehodnocujúce drevnú hmotu. In: HLAVÁČ, P. (Ed.), Ochrana lesa 2002. Zborník z medzinárodnej konferencie pri príležitosti 195. výročia lesníckeho vysokoškolského štúdia na Slovensku a 50. výročia pôsobenia technickej univerzity vo Zvolene, pp. 97-102.

## Endogénna kontaminácia v zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006

DANA TANČINOVÁ, ROMAN LABUDA, SOŇA FELŠÖCIOVÁ, ZUZANA PIOVARČIOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ

### TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., FELŠÖCIOVÁ, S., PIOVARČIOVÁ, Z., DOVIČIČOVÁ, M.: Endogenous contamination of wheat grains harvested in Slovakia during the season 2006

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 169-175. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The wheat (*Triticum aestivum* L.) intended for food industry were obtained from various locations of Slovakia. A total of 18 wheat samples (6 from the conventional and 12 from the ecological farming system) harvested in 2006 were analyzed for presence of fungi. The endogenous contamination was investigated after direct cultivation of the surface sterilized wheat grains on Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC). Percentage of the endogenously contaminated grains ranged from 58 to 92 % (average 70 %) in wheat from conventional farming system, while from 51 to 100 % (average 74 %) in that of the ecological system. Altogether 16 genera were recovered, namely *Alternaria*, *Aspergillus*, *Arthrimum*, *Bipolaris*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Mycelia sterilia*, *Nigrospora*, *Penicillium* and *Pleospora* (12 on conventional and 15 on ecological wheat). The most dominating fungi were represented by *Alternaria* and *Epicoccum* genera being found in 100 % samples within both farming systems. In wheat from conventional farming system, none representative of *Aspergillus* and/or *Penicillium* genera (including teleomorphs), was recovered. The majority of fungal isolates pertained to the genus *Alternaria*, rendering 54.5 % contamination of the grains from the conventional, while a comparatively lower contamination (47.6 %) of the grains was observed in wheat represented the ecological farming system.

**Keywords:** fungi, *Alternaria*, *Fusarium*, *Triticum aestivum* L., wheat

Dana Tančinová, Roman Labuda, Soňa Felšöciová, Zuzana Piovarčiová, Mária Dovičičová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic. E-mail: [dana.tancinova@uniag.sk](mailto:dana.tancinova@uniag.sk)

\* presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

Problematike mykotickej kontaminácie obilnín a produkcie toxických metabolitov – mykotoxínov sa celosvetovo venuje veľká pozornosť (SCHNÜRER & JONSSON, 1992; PITT & HOCKING, 1997, KUBÁTOVÁ, 2000, LACA et al., 2006). V súčasnom období sa kladie zvýšená pozornosť venovaná potravinovej bezpečnosti, s tým súvisí aj indikácia rizikových faktorov v komponentoch vstupujúcich do potravinového reťazca. Jedným z rizikových faktorov je výskyt potenciálne toxigénnych druhov mikroskopických húb, ktorých životný cyklus je viazaný na tieto substráty.

Zrná pestovaných obilnín predstavujú hlavný zdroj potravín pre ľudí a dôležitú surovinu pre mnohé priemyselné produkty. Obilniny sú počas rastu, zrenia, skladovania, spracovania a použitia objektom znehodnotenia rôznymi biologickými činiteľmi. Hlavným z týchto činiteľov sú mikroskopické huby.

Kontaminácia obilnín mikroskopickými hubami je jedna z hlavných príčin znehodnocovania skladovaných zrn. Mikroskopické huby menia kvalitu zrn, znižujú klíčivosť a nutričné vlastnosti (RAMOS et al., 1998). ELMHOLT (2003) zistil výskyt *Penicillium verrucosum* v 51 % vzoriek obilnín (raž a pšenica), pred sušením a uskladnením. Na základe získaných výsledkov upozorňuje na dôležitosť venovať zvýšenú pozornosť pozberovej manipulácii ako i skladovaniu obilnín, najmä ak boli identifikovaní potenciálni producenti

mykotoxínov. Kolonizácia rastlín mikroorganizmami začína už pri klíčení rastliny. Baktérie sú obvyčajne prvými kolonizátormi, ale veľmi skoro ich nasledujú kvasinky, patogénne a saprofytické vlákňité huby (mikromycéty). Vlákňité mikroskopické huby pokračujú vo vývoji počas rastu rastliny, zvlášť pri dozrievaní semien. Žatva výrazne narúša ekosystém zrna. Zrno sa dostáva z extrémneho prostredia klasu do relatívne stáleho prostredia skladu. Tento proces sprevádza značná zmena v zložení mikroflóry (LACEY, 1989). Obzvlášť počas prepravy a skladovania len malá časť mikroorganizmov sa bude rozmnožovať a môže spôsobiť vážne znehodnotenie potravín a ich komponentov. Ktoré mikroorganizmy sa budú rozvíjať, alebo ktoré chemické reakcie vyvolajú, závisí na druhu potraviny a vonkajších podmienkach (HUIS IN 'T VELD, 1996). Obilniny predstavujú všeobecne vhodný substrát pre rast a rozmnožovanie chemoorganotrofných mikroskopických húb, najmä v prípade nevhodných skladovacích podmienok, ako je vysoká vlhkosť a zvýšená teplota (PITT & HOCKING, 1997; KUBÁTOVÁ, 2000). Mykotická kontaminácia obilnín je najvyššia v období zberu, kedy môže dosahovať až hodnoty  $10^6$  KTJ mikroskopických húb v jednom grame. Počas optimálnych podmienok skladovania počet mikroskopických húb klesá (TANČINOVÁ et al., 2001). Kvalita obilnín po žatve je ovplyvňovaná mnohými abiotickými a biotickými faktormi, ktoré predstavujú ekosystém skladovaných zrn. Interakcie medzi týmito faktormi ovplyvňujú dominanciu húb obzvlášť mykotoxinogénnych druhov (LEE & MAGAN, 1999; MAGAN et al., 2003). Rast húb i produkciu mykotoxínov ovplyvňujú podmienky prostredia, limity pre produkciu mykotoxínov sú však zvyčajne užšie ako pre rast samotnej huby (FRISVAD & SAMSON, 1991; SAMSON et al., 2002).

Cieľom práce bolo sledovanie endogénnej kontaminácie zrn z dvoch typov obhospodarovania pôdy, tzv. ekologického a konvenčného, so zameraním na identifikáciu kontaminujúcich rodov.

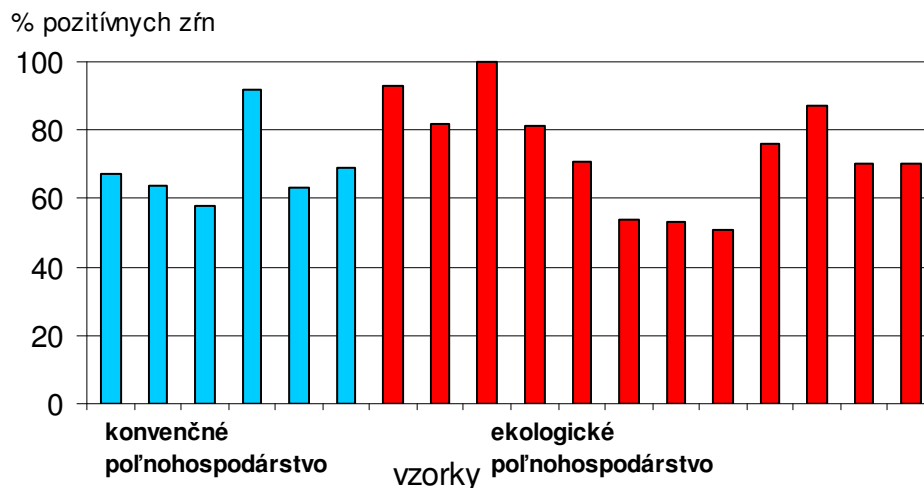
## **Materiál a metodika**

Vzorky pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) pochádzali z viacerých regiónov Slovenska. Celkovo bolo analyzovaných 6 vzoriek dopestovaných konvenčným spôsobom a 12 vzoriek ekologickým spôsobom. Analyzované vzorky boli zberané v roku 2006. Endogénna kontaminácia bola zisťovaná po priamej kultivácii povrchovo sterilizovaných pšeničných zrn na DRBC (agar s dichlóranom, chloramfenikolom a bengálskou červenou; Merck, Nemecko; 100 zrn). Povrchová sterilizácia prebiehala pôsobením 0,4 % roztoku chloramínu po dobu dvoch minút (SAMSON et al., 2002). Následne boli zrná trikrát prepláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Kultivácia prebiehala 5–7 dní v tme pri teplote  $25 \pm 1$  °C. Na identifikáciu mikroskopických húb sme použili nasledovné živné pôdy (podľa jednotlivých rodov): CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom, PITT, 1979; PITT & HOCKING, 1997), CY20S (Czapkov agar s kvasničným extraktom a 20 % sacharózy, PITT & HOCKING, 1997, SAMSON et al., 2002), MEA (agar so sladínovým extraktom, PITT & HOCKING, 1997, SAMSON et al., 2002), CREA (agar s kreatínom a sacharózou; SAMSON et al., 2002). Identifikácia izolátov sa robila podľa PITT (1985), PITT & HOCKING (1997), KLICH (2002), SAMSON et al. (2002), SIMMONS (1993).

## **Výsledky a diskusia**

Endogénna kontaminácia pšeničných zrn sa pohybovala od 58 do 92 % (priemerne 70 %) pri vzorkách zrn z konvenčného poľnohospodárstva a od 51 do 100 % (priemerne 74 %) pri

vzorkách zrn z ekologického poľnohospodárstva (Obr. 1). SCHNÜRER & JONSSON (1992) uvádzajú priemernú endogénnu kontamináciu zrn v závislosti od odrody od 87 do 92 %.



**Obr. 1.** Endogénna kontaminácia pšenice z ekologického a konvenčného poľnohospodárstva (v %)

Z analyzovaných vzoriek pšeničných zrn sme vyizolovali a identifikovali zástupcov 16 rodov vláknitých mikroskopických húb (12 rodov zo vzoriek z konvenčného poľnohospodárstva, 15 rodov zo vzoriek z ekologického poľnohospodárstva) (Obr. 2, Tab. 1). Najvyššiu frekvenciu výskytu sme zaznamenali u zástupcov rodov *Alternaria* a *Epicoccum* (100 % frekvencia výskytu) a to v oboch spôsoboch obhospodarovania. 100 % frekvenciu sme vo vzorkách z konvenčného poľnohospodárstva detegovali aj u zástupcov rodu *Arthrrium*. Zástupcov rodu *Fusarium* sme detegovali v 83 % vzoriek z oboch spôsobov obhospodarovania pôdy. Ani v jednej vzorke z konvenčného poľnohospodárstva z úrody 2006 sme nezistili v endogénnej mykoflóre zástupcov rodov *Aspergillus* a *Penicillium* (vrátane ich príslušných teleomorf). Vo vzorkách z ekologického poľnohospodárstva sme zástupcov týchto rodov detegovali: *Aspergillus* (33 % vzoriek), *Eurotium* (42 %), *Emericella* (8 %) a *Penicillium* (50 %). V Tab. 1 uvádzame počet izolátov identifikovaných z endogénnej mykoflóry pšeničných zrn. Najvyšší počet izolátov zaraďujeme do rodu *Alternaria* (327 izolátov zo 600 zrn, tj. 54,5 % kontaminovaných zrn z konvenčného poľnohospodárstva a 564 izolátov z 1185 zrn, tj. 47,6 % z ekologického poľnohospodárstva). Napriek vysokej frekvencii výskytu zástupcov rodu *Fusarium*, počet identifikovaných izolátov z endogénnej mykoflóry bol 12 z konvenčného poľnohospodárstva a 45 z ekologického poľnohospodárstva, čo predstavuje 2 resp. 3,8 % endogénne kontaminovaných zrn zástupcami tohto rodu. KOSIAK et al. (2004) uvádzajú, že *Alternaria* spp. je dominujúcim rodom v akceptovateľných vzorkách zrn (z pohľadu ich kvality) z najčastejšie vyskytujúcou sa *Alternaria infectoria* skupina, zatiaľ čo rod *Fusarium* spp. dominuje vo vzorkách so zníženou kvalitou. V našich vzorkách sme detegovali zástupcov *Alternaria alternata* skupina, *Alternaria infectoria* skupina a *Alternaria tenuissima* skupina. *Alternaria infectoria* skupina, ktorá predstavovala z celkovej populácii alternárií v našich vzorkách 33,3 % (konvenčné poľn.), resp. 56,0 % (ekologické poľn.), neprodukuje žiadne známe mykotoxíny, ako sú altenuén, alternáriol,



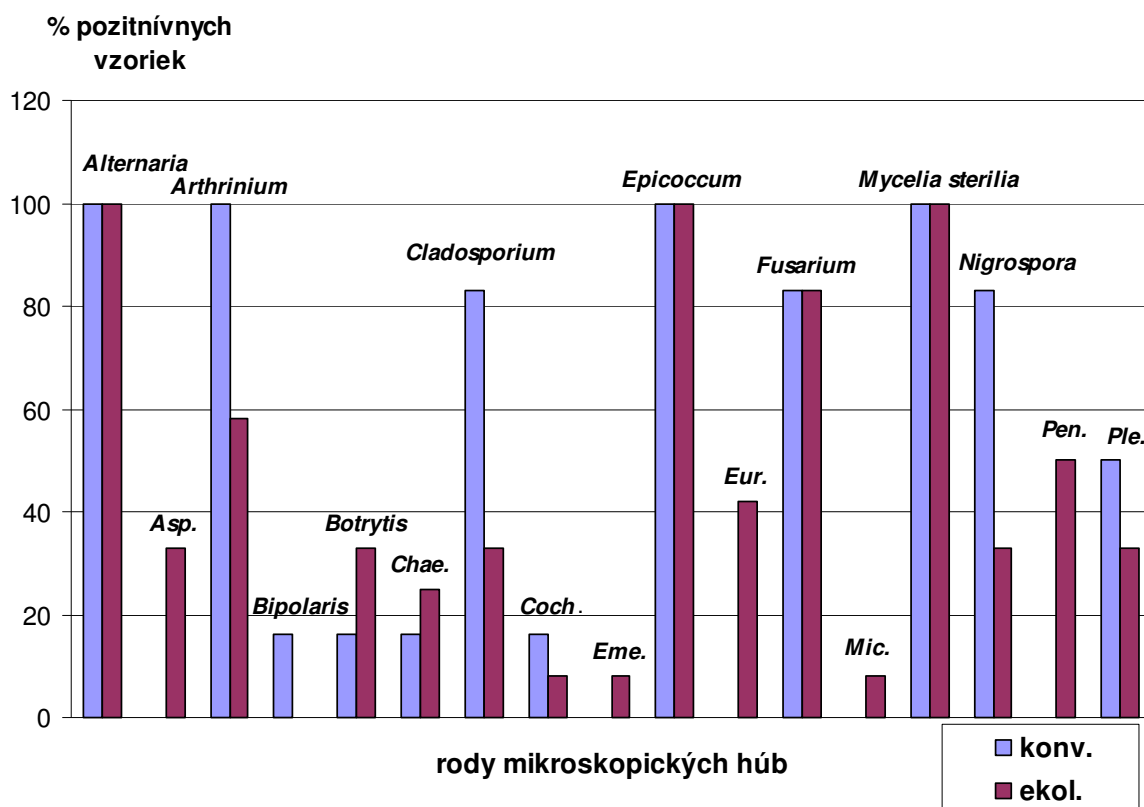
alternáriuol monometyl éter, altertoxín a kyselina tenuazónová (ANDERSEN et al., 2002; ANDERSEN & THRANE, 1996; SERDANI et al., 2002).

Mnohé z mikroskopických húb, schopných produkovať mykotoxíny sa často vyskytujú ako kontaminanty potravín a poľnohospodárskych komodít, vrátane obilných zrn. Mykotoxinogénne huby významné v potravinovom reťazci človeka sú zaraďované hlavne do troch rodov: *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (D'NELLO & MACDONALD, 1997; DALCERO et al., 1997; PITT et al. 2000). Zatiaľ čo druhy rodu *Fusarium*, patria medzi patogénov rastlín, produkujú mykotoxíny predovšetkým pred alebo bezprostredne po žatve, druhy rodov *Aspergillus* a *Penicillium* kontaminujú komodity najmä počas sušenia a skladovania (PITT et al., 2000a). V nami analyzovaných zrnách s ekologického spôsobu obhospodarovania sme detegovali zástupcov všetkých troch uvedených rodov aj z endogénnej mykoflóry zrna. Zo zrn z konvenčného spôsobu obhospodarovania pôdy, ako uvádzame vyššie, sme zástupcov typických skladových húb – *Aspergillus* a *Penicillium*, nevyizolovali ako súčasť endogénnej mykoflóry.

**Tab. 1.** Endogénna kontaminácia pšeničných zrn na DRBC

Druh resp. rod	Konvenčné poľnohospodárstvo	Ekologické poľnohospodárstvo	Druh resp. rod	Konvenčné poľnohospodárstvo	Ekologické poľnohospodárstvo
<i>Alternaria alternata</i> sk.	127	36	<i>E. amstelodami</i>		3
<i>Alternaria infectoria</i> sk.	109	316	<i>E. chevalieri</i>		6
<i>Alternaria tenuissima</i> sk.	84	209	<i>Eurotium</i> sp.		4
<i>Alternaria</i> sp.		3	<b><i>Eurotium</i></b>	<b>0</b>	<b>13</b>
<b><i>Alternaria</i></b>	<b>320</b>	<b>564</b>	<i>F. avenaceum</i>		10
<i>Aspergillus candidus</i>		1	<i>F. graminearum</i>	2	22
<i>Aspergillus flavus</i>		2	<i>F. culmorum</i>	1	
<i>Aspergillus niger</i>		2	<i>F. poae</i>	9	10
<i>Aspergillus</i> sp.		1	<i>F. tricinctum</i>		1
<b><i>Aspergillus</i></b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<i>Fusarium</i> sp.		2
<i>Arthriniium phaeospermum</i>	9	14	<b><i>Fusarium</i></b>	<b>12</b>	<b>45</b>
<b><i>Arthriniium</i></b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<i>Microdochium nivale</i>		3
<i>Bipolaris</i> sp.	1		<b><i>Microdochium</i></b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<b><i>Bipolaris</i></b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b><i>Mycelia sterilia</i></b>	<b>28</b>	<b>59</b>
<i>Botrytis cinerea</i>		41	<b><i>Mycelia sterilia dem.</i></b>	<b>4</b>	
<b><i>Botrytis</i></b>	<b>1</b>	<b>41</b>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	3	2
<i>Chaetomium</i> sp.	5	22	<i>Nigrospora oryzae</i>	11	8
<b><i>Chaetomium</i></b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b><i>Nigrospora</i></b>	<b>14</b>	<b>10</b>
<i>C. herbarum</i>	1	2	<i>P. aurantiogriseum</i>		12
<i>C. cladosporioides</i>	12	9	<i>P. chrysogenum</i>		2
<i>C. macrocarpum</i>	1		<i>P. corylophilum</i>		2
<i>C. sphaerospermum</i>		1	<i>P. crustosum</i>		1
<b><i>Cladosporium</i></b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<i>P. griseofulvum</i>		3

<i>Cochliobolus</i> sp.	2	18	<i>P. viridicatum</i>		4
<b><i>Cochliobolus</i></b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<i>Penicillium</i> sp.		5
<i>Emericella nidulans</i>		1	<b><i>Penicillium</i></b>	<b>0</b>	<b>29</b>
<i>Emericella</i>	<b>0</b>	<b>1</b>	<i>Pleospora herbarum</i>	9	8
<i>Epicoccum nigrum</i>	18	65	<b><i>Pleospora</i></b>	<b>9</b>	<b>8</b>
<b><i>Epicoccum</i></b>	<b>18</b>	<b>65</b>			



Použité skratky: *Asp.* – *Aspergillus*, *Chae.* – *Chaetomium*, *Coch.* – *Cochliobolus*, *Eme.* – *Emericella*, *Eur.* – *Eurotium*, *Mic.* – *Microdochium*, *Pen.* – *Penicillium*, *Ple.* – *Pleospora*

**Obr. 2.** Frekvencia výskytu vyizolovaných rodov v analyzovaných vzorkách povrchovo sterilizovaných zŕn pšenice

## Záver

Z analyzovaných povrchovo sterilizovaných zŕn sme vyizolovali a identifikovali zástupcov 16 rodov vláknitých mikroskopických húb (12 rodov zo vzoriek konvenčného poľnohospodárstva a 15 rodov z vzoriek ekologickeho poľnohospodárstva). Najvyšší počet izolátov z celkového počtu zaraďujeme do rodu *Alternaria*, ktorý bol dominantnou zložkou endogénnej mykoflóry všetkých analyzovaných vzoriek. V analyzovaných vzorkách z konvenčného spôsobu obhospodarovania pôdy sme nedetegovali zástupcov rodov typických tzv. skladových húb rodov *Aspergillus* a *Penicillium* (vrátane ich teleomorf). Vo vzorkách s ekologickeho poľnohospodárstva sme zástupcov týchto rodov vyizolovali, i keď v malom percente zŕn (0,5 % *Aspergillus* a 2,5 % kontaminovaných zŕn rodom *Penicillium*). Mykotická

kontaminácia obilných zrn je ovplyvnená mnohými abiotickými a biotickými faktormi. Ovplyvňuje hygienickú kvalitu obilnín ako i potravín, ktorých súčasťou sú obilniny. Vzhľadom na možnú produkciu mykotoxínov je potrebné venovať jej stále pozornosť.

## PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol s finančnou podporou projektov VEGA 1/3456/06 a KEGA 3/5080/07

## Prehľad literatúry

- ANDERSEN, B., KROGER, E., ROBERTS, R.G., 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* 106: 170-182.
- ANDERSEN, B., THRANE, U., 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *A. alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* 42: 685-689.
- DALCERO, A., MAGNOLI, C., CHIACCHIERA, S., PALACIOS, G., REYNOSO, M., 1997. Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137: 179-184.
- D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Sci. Tech.* 69: 155-166.
- ELMHOLT, S., 2003. Ecology of the ochratoxin A producing *Penicillium verrucosum*: Occurrence in field soil and grain with special attention to farming system and on-farm drying practices. *Biol. Agri. Horti.* 20(4): 311-337.
- FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A., 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. In: ARORA, D. K., MUKERJI, K. G., ELMER, H. M., *Handbook of Applied Mycology, Vol. 3 - Foods and Feeds*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 31-67.
- HUIS IN'T VELD, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. In *Int. J. Food. Microbiol.* 33: 1-18.
- KLICH, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Ponsen & Looijen, Wageningen, 116 p. ISBN 90-70351-46-3
- Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., Andersen, B. 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality – a matched pair sample study. *Int. Food Mycol.* 93: 51-62.
- KUBÁTOVÁ A., 2000. Nové druhy toxinogenných penicilií nalezene na potravinách a jejich identifikace. In: Sborník přednášek z konference “Aktuální problematika mikrobiologie potravin II.”, Liblice, pp. 103-107.
- LACA, A., MOUSIA, Z., DÍAZ, M., WEBB, C., PANDIELLA, S. S., 2006. Distribution of microbial contamination within cereal grains. *J. Food Eng.* 72: 332-338.
- LACEY, J., 1989. Pre- and post- harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *J. Appl. Bact. Suppl.* 11S-25S.
- LEE, H. B., MAGAN, N., 1999. Environment factors influence in vitro interspecific interaction between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. *Mycopathologia* 146 (1): 43-47.
- MAGAN, N., HOPE, R., CAIRNS, V., ALDRED, D., 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and Mycotoxin accumulation in stored grain. *European J. Plant Pathol.* 109: 723-730.

- PITT, J. I., 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, 634 p.
- PITT, J. I., 1985. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. CSIRO Division of Food Research, North Ryde, 184 p.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D., 1997. Fungi and Food Spoilage. 2<sup>nd</sup> ed., Blackie Academic & Professional, London, 593 p.
- PITT, J. I., BASÍLICO, J. C., ABARCA M. L., LÓPEZ, C., 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.* 38: Supplement I, pp. 41-46.
- RAMOS, A. J., LABERNIA, N., MARÍN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N., 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int. J. Food Microbiol.* 44:133-140.
- SAMSON, R. A., HOEKSTRA, E. S., FRISVAD, J. C., FILTENBORG, O., 2002. Introduction to Food- and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, 389 p.
- SCHNÜRER, J., JONSSON, A., 1992. Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grains of food and food grade. *Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil Plant Sci.* 42: 240-245.
- SERDANI M, KANG J. C., ANDERSEN B, CROUS P.W., 2002. Characterisation of *Alternaria* species- groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycol. Research* 106: 561-569.
- SIMMONS, E.G., 1993. *Alternaria* themes and variations (73). *Mycotaxon* 58: 109-140.
- TANČINOVÁ, D., KAČÁNIOVÁ, M., JAVOREKOVÁ, S., 2001. Natural occurrence of fungi in feeding wheat after harvest and during storage in the agricultural farm facilities. *Biológia*, 56: 247-250.

# Problematika *Erysiphe trifolii* na *Lathyrus pratensis* L.

BOHUMILA VOŽENÍLKOVÁ, MILAN KOBES, FRANTIŠEK KLIMEŠ

VOŽENÍLKOVÁ, B., KOBES, M., KLIMEŠ, F.: Problems of *Erysiphe trifolii* on *Lathyrus pratensis* L.

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp.176-181. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The aim of small-site experiments carried out in the area of the foothills of the Šumava Mts. was to determine the etiological agent of the disease of meadow peavine (*Lathyrus pratensis* L.). The experimental locality (Kaplice – Chuchelec) was situated in an elevation of 655 m a.s.l. The investigation was accomplished in the years 2004 – 2006. During the vegetation period we observed whitish to grey-white soft cover of mycelium on the leaves of meadow peavine. These characteristic symptoms of powdery mildew (*Erysiphe trifolii* Grev. 1824) were found on the plants in the observed area at the end of summer and in autumn. In the area of interest with permanent grassland we evaluated the following variants: 1) M – mulched stands (mulched once), 2) L – fallow stands, 3) K – mown stands (mowing once to three times), and 4) P – pasture stands (grazed by cattle twice to four times). The observed stands were managed in different ways from 2000, and in relation to the ways and intensity of management we observed the changes and coverage of creeping legumes including *Lathyrus pratensis*. Phytopathological analysis of plants with the symptoms of *Erysiphe* fungi attack was accomplished in all variants and repetitions during the whole vegetation period. The observation of particular variants was carried out in four repetitions, the size of the sites being 30 m<sup>2</sup> (4 x 30m<sup>2</sup>), and we evaluated the total number of *Lathyrus pratensis* plants as well as the number of the plants attacked by powdery mildew. The evaluation of the symptoms manifestation in this experiment was based on the method of Dixon and Doodson (1971). Powdery mildew occurrence on *Lathyrus pratensis* at different management methods of grass stands was statistically processed (in STATISTICA program). The three-year investigation of *Lathyrus pratensis* L. yielded statistical evidence that the most significant growth of fungal disease *Erysiphe trifolii* Grev. was recorded in fallow stands (68.9%). On the other hand, the least occurrence of the disease was found in the pasture stands, which were grazed by the cattle. Powdery mildew determination itself was carried out in cooperation with Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany (RNDr. J. Marková, CSc.).

**Keywords:** *Lathyrus pratensis*, powdery mildew

Bohumila Voženílková, Milan Kobes, František Klimeš, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: [vozenil@zf.jcu.cz](mailto:vozenil@zf.jcu.cz)

\* presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

V letech 2004 až 2006 byl v oblasti předhůří Šumavy (Rojovský hřbet) na lokalitě Kaplice – Chuchelec u experimentálních trvalých travních porostů hodnocen výskyt a stupeň napadení rostlin hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis* L.), padlím pravým (*Erysiphe trifolii*). Houba *Erysiphe trifolii* napadá nadzemní části rostlin *Lathyrus pratensis* a nejčastěji postihuje listy, kde vytváří na povrchu bělavé myceliové povlaky. Patogen se šíří konidii o velikosti 28 až 40 x 16 až 22 μm. Na podzim se na listech vytvářejí tmavé plodničky kleistothecia (90 až 125 μm) s 5 až 10 asky, která obsahují 3 až 4 askospory o velikosti 20 až 25 x 10 až 15 μm (HOFMANN & SCHUTTERER, 1983).

Výskyt a stupeň napadení rostlin hrachoru lučního byl hodnocen u různých obhospodařovaných experimentálních travních porostů (kosených, spásaných skotem, mulčovaných, kombinovaně využívaných a ponechaných ladem bez využívání) a při různé intenzitě jejich obhospodařování (kosení 1 – 3x, pastva 2 – 4x, bez hnojení a při dávce 100 kg N/ha +PK (Tab. 1). Sledované porosty byly diferencovaně obhospodařovány již od roku

2000 a v závislosti na způsobech a intenzitě využívání byly sledovány změny výskytu i pokryvnosti popínavých leguminóz, včetně druhu *Lathyrus pratensis*. Experimenty byly založeny na trvalém travním porostu, využívaném pastvou skotu, s dominantními druhy *Phleum pratense*, *Festuca pratensis*, *Trisetum flavescens*, *Lolium perenne* a *Trifolium repens*, patřícím do asociace *Lolio-Cynosuretum*. Trvalé travní porosty v okolí pokusných ploch byly v experimentálním období využívány pastvou masných plemen skotu 3-4x ročně, nebo kombinovaně 1x ročně koseny a 1x ročně spásány.

## Materiál a metodika

Pokusná lokalita (Kaplice - Chuchelec) byla situována v nadmořské výšce 655m (Tab. 1). Vlastní šetření bylo uskutečněno v letech 2004 - 2006. Během vegetačního období jsme zaznamenali na listech hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis* L.) bělavé, až šedobílé, jemné povlaky mycelia. Tyto charakteristické symptomy pro padlí (*Erysiphe trifolii* Grev. 1824) jsme zjistili na sledované ploše na sklonku léta a na podzim.

V zájmovém území trvalých travních porostů byly posuzovány následující varianty:

- Mulčované porosty (mulčované 1x),
- Nesklížené porosty (ležící ladem),
- Kosené porosty (kosení 1x - 3x) a
- Pastevní porosty spásané skotem (2x - 4x )

Fytopatologickou analýzu rostlin s příznaky napadení hub rodu *Erysiphe* jsme prováděli u všech variant a opakování po celé vegetační období. Sledování jednotlivých variant bylo prováděno ve 4 opakováních o velikosti parcelky 30 m<sup>2</sup> (4 x 30 m<sup>2</sup>), kdy byl hodnocen celkový počet rostlin *Lathyrus pratensis* a počet rostlin napadených padlím. V tomto pokusu byla použita metoda pro hodnocení projevu symptomů rostlin podle autorů, DIXONA a DOODSONA.

Tab. 1. Charakteristika pokusné lokality a klimatické charakteristiky pokusného období.

Územní charakteristiky								
Katastrální území		Kaplice – Velký Chuchelec						
Nadmořská výška		655 m						
Hloubka půdy		Velmi hluboká						
Půdní druh		Hlinitá						
Půdní typ		Kambizem illimerizovaná, skeletovitá						
Klimatické charakteristiky								
Průměrné měsíční teploty					Měsíční úhrn srážek			
	50-letý průměr	2004	2005	2006	50-letý průměr	2004	2005	2006
I	-3,20	-3,6	-1,1	-5,7	29,0	42,3	24,3	44,9
II	-1,90	0,8	-4,7	-2,9	32,0	52,1	41,6	17,7
III	1,90	1,7	0,4	0,0	33,0	69,7	34,1	85,8
IV	6,30	8,0	8,9	7,6	54,0	70,1	96,2	74,3
V	11,60	11,0	12,9	12,1	79,0	89,0	80,1	106,8
VI	14,60	15,0	16,8	16,5	97,0	165,4	75,0	161,8
VII	16,50	16,8	17,9	21,4	122,0	80,4	146,7	59,4
VIII	15,70	18,4	16,0	14,5	88,0	36,0	161,7	166,8

IX	12,20	13,2	14,3	15,3	62,0	43,0	62,4	10,2
X	6,90	9,4	9,1	9,6	49,0	50,8	32,3	8,6
XI	1,70	2,4	2,0	4,9	34,0	58,4	27,3	17,9
XII	-1,70	-1,9	-1,9	1,5	36,0	6,2	24,9	25,8
Za vegetaci	<b>12,82</b>	<b>13,73</b>	<b>14,47</b>	<b>14,57</b>	<b>502,0</b>	<b>483,9</b>	<b>622,1</b>	<b>579,3</b>
Za rok	<b>6,70</b>	<b>7,60</b>	<b>7,55</b>	<b>7,90</b>	<b>715,0</b>	<b>763,4</b>	<b>806,6</b>	<b>780,0</b>

\*Srovnání s normálem (– pod normálem, + nad normálem)– odhad – budou doplněna konkrétní čísla

## Výsledky a diskuse

U trvalého travního porostu (asociace *Lolio-Cynosuretum*), obhospodařovaného odlišnými pratotechnickými postupy a u stejného neobhospodařovaného porostu docházelo během šestiletého období diferencovaného obhospodařování k rozdílnému rozvoji a uplatnění nepopínavých i popínavých jetelovin, včetně hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis*). Při vyšší frekvenci sklizní docházelo k rozvoji nepopínavých jetelovin, především jetele plazivého (*Trifolium repens*). Naopak při extenzivním využívání porostů a u porostu ponechaného ladem byly více zastoupeny popínavé jeteloviny (*Lathyrus pratensis* a *Vicia cracca*), kdy projektivní dominance *Lathyrus pratensis* dosahovala 6 – 18 % D a počet rostlin na ploše 30 m<sup>2</sup> byl v rozpětí 6 – 15 rostlin (Tab. 2). Ve vícekrát sklízených porostech měl hrachor luční nižší zastoupení a převažovaly zde mladší výhonky, obrůstající po sečích, naopak v extenzivních porostech byly rostliny starší, ve fenofázi kvetení až zrání lusků a byly zastoupeny ve vyšším patru porostů (spolu s vysokými travami).

Při různých způsobech a intenzitě obhospodařování travních porostů byl zjišťován podíl rostlin hrachoru lučního, napadených padlím pravým (*Erysiphe trifolii*). Jak uvádí autoři (HOFMANN & SCHUTTERER (1983), tak i v našich pokusech, první symptomy onemocnění byly zaznamenány na povrchu zelených asimilujících listů *Lathyrus pratensis* a to v podobě bělavého mycelia. Největší infekční tlak u sledovaného patogena nastal na sklonku léta a během podzimu a tyto poznatky dokládají rovněž autoři KAZDA et al. (2003) a ČAČA et al. (1990).

Vyšší podíl napadených rostlin byl zjištěn v extenzivních porostech (Tab. 2, Tab. 4), kosených nebo mulčovaných 1x ročně a v porostech ponechaných ladem. U těchto porostů k rychlejšímu šíření padlí přispívá větší hustota rostlin hrachoru v porostech, příznivější fenofáze a poloha rostlin v porostu a delší doba mezi sklizněmi nebo i absence sklizně. V pastevních porostech vykázaly rostliny hrachoru lučního při stejné frekvenci sklizní lepší zdravotní stav oproti porostům koseným.

Rovněž se projevil velmi výrazný vliv ročníku (klimatických podmínek) na rozvoj padlí *Erysiphe trifolii*, kdy v roce 2004 byl výskyt napadených rostlin v porostech vysoký (až 68 %, Tab. 2), zatímco v roce 2005 byl výskyt napadených rostlin minimální a u většiny variant nebylo napadení rostlin hrachoru lučního padlím vůbec zjištěno. V roce 2006 byl výskyt padlí vyšší oproti roku 2005, silnější rozvoj padlí byl zaznamenán v měsíci září. K rozvoji padlí přispívá nedostatek srážek a vyšší teploty, zejména v měsících červenec a srpen (rok 2004), resp. červenec a září (rok 2006), naopak vlhčí klima, tj. více srážek a nižší teploty rozvoj této choroby inhibuje (rok 2005 a srpen roku 2006, Tab. 1 a 2).

Varianty *	Průměrný počet rostlin				Průměrný počet napadených rostlin				Podíl napadených rostlin v %			
	2004	2005	2006	$\bar{x}$	2004	2005	2006	$\bar{x}$	2004	2005	2006	$\bar{x}$
<b>K1x*</b>	13,0	11,0	10,0	11,33	7,0	0,5	3,5	3,67	<b>53,85</b>	<b>4,55</b>	<b>35,00</b>	<b>31,13</b>
<b>M1x</b>	11,5	11,0	11,5	11,33	6,7	0,5	4,0	4,07	<b>58,70</b>	<b>4,55</b>	<b>43,48</b>	<b>35,43</b>
<b>L</b>	14,5	13,5	15,0	14,33	10,0	1,2	8,0	6,90	<b>68,97</b>	<b>9,26</b>	<b>63,33</b>	<b>47,06</b>
<b>M+K</b>	8,7	5,5	7,5	7,23	4,2	0,2	3,0	2,47	<b>48,57</b>	<b>4,55</b>	<b>40,00</b>	<b>30,64</b>
<b>K2x/0</b>	7,0	5,7	6,0	6,23	3,0	0,2	2,0	1,73	<b>42,86</b>	<b>4,35</b>	<b>33,33</b>	<b>26,57</b>
<b>K2x/NP</b>												
<b>K</b>	6,7	6,0	6,0	6,23	3,0	0,2	1,5	1,57	<b>44,44</b>	<b>4,17</b>	<b>25,00</b>	<b>24,37</b>
<b>K3x/0</b>	2,2	2,2	2,0	2,13	0,5	0,0	0,5	0,33	<b>22,22</b>	<b>0,00</b>	<b>25,00</b>	<b>15,91</b>
<b>K3x/NP</b>												
<b>K</b>	3,0	2,7	2,5	2,73	0,7	0,0	0,2	0,30	<b>25,00</b>	<b>0,00</b>	<b>8,00</b>	<b>10,44</b>
<b>M+P</b>	4,5	5,0	4,5	4,67	1,7	0,0	1,5	1,07	<b>38,89</b>	<b>0,00</b>	<b>33,33</b>	<b>23,70</b>
<b>K+P/0</b>	2,5	2,0	3,0	2,50	0,7	0,0	0,5	0,40	<b>30,00</b>	<b>0,00</b>	<b>16,67</b>	<b>14,89</b>
<b>K+P/NP</b>												
<b>K</b>	3,2	3,2	3,5	3,30	0,7	0,0	0,7	0,47	<b>23,08</b>	<b>0,00</b>	<b>20,00</b>	<b>13,96</b>
<b>P2x/0</b>	2,5	2,0	2,0	2,17	0,7	0,0	0,3	0,33	<b>30,00</b>	<b>0,00</b>	<b>15,00</b>	<b>14,33</b>
<b>P2x/NP</b>												
<b>K</b>	1,5	1,7	1,7	1,63	0,5	0,0	0,5	0,33	<b>33,33</b>	<b>0,00</b>	<b>29,41</b>	<b>20,92</b>
<b>P3x/0</b>	1,5	1,2	2,0	1,57	0,2	0,0	0,5	0,23	<b>16,67</b>	<b>0,00</b>	<b>25,00</b>	<b>12,78</b>
<b>P3x/NP</b>												
<b>K</b>	2,2	1,7	2,0	1,97	0,5	0,0	0,2	0,23	<b>22,22</b>	<b>0,00</b>	<b>10,00</b>	<b>10,91</b>
<b>P4x/0</b>	1,5	1,0	1,0	1,17	0,2	0,0	0,0	0,07	<b>16,67</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>4,44</b>
<b>P4x/NP</b>												
<b>K</b>	1,5	1,2	1,0	1,23	0,2	0,0	0,0	0,07	<b>16,67</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>4,44</b>

\*K – kosení, P – pastva skotu, M – mulčování, L - porost ponechán ladem, 1x – 4x – počet sklizní za rok, 0 – bez hnojení, NPK – porost hnojený dávkou 100 kg N/ha + PK

**Tab. 2.** Uplatnění hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis* L.) a výskyt rostlin napadených padlím *Erysiphe trifolii* na ploše 30 m<sup>2</sup> při různých způsobech a intenzitě obhospodařování travních porostů v letech 2004 až 2006

## Závěr

Zjištěné rozdíly v počtu napadených rostlin hrachoru lučního v různě obhospodařovaných porostech jsou statisticky vysoce významné (Tab. 3). Na variabilitě napadení se různé způsoby obhospodařování podílely ze 27,8 % ( $F = 99,25^{**}$ ), ročník z 64,8 % ( $F = 231,23^{**}$ ) a interakce varianta obhospodařování x ročník z 5,51 % ( $F = 19,67^{**}$ ). U jednotlivých způsobů obhospodařování tedy ročník působí odlišně v interakci se způsobem obhospodařování, tedy s počtem a termínem sklizní a stavem porostu během vegetace.



**Tab. 3.** Analýza variancí počtu rostlin napadených padlím *Erysiphe trifolii* na ploše 30 m<sup>2</sup> při různých způsobech a intenzitě obhospodařování travních porostů v letech 2004 až 2006

Zdroj proměnlivosti	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F vypočtené	Hladina p	Podíl z celkové proměnlivosti v %
Varianty (A)	596,79	16	37,30	99,25**	0,000	27,81
Roky (B)	173,80	2	86,90	231,23**	0,000	64,79
Interakce AxB	236,53	32	7,39	19,67**	0,000	5,51
Opakování (C)	2,23	3	0,74	0,23	0,876	0,55
Interakce AxC	22,93	48	0,48	0,15	1,000	0,36
Interakce BxC	3,76	6	0,63	0,14	0,991	0,47
Int. AxBxC	28,57	96	0,30	-	-	-
Chyba	57,50	153	0,37	-	-	-
Celkem	1122,11	356	134,11	-	-	-

**Tab. 4.** Průměrný počet rostlin hrachoru lučního (*Lathyrus pratensis* L.), napadených padlím *Erysiphe trifolii* na ploše 30 m<sup>2</sup>, při různých způsobech a intenzitě obhospodařování travních porostů s vyznačením homogenních skupin na hladině pravděpodobnosti P<sub>0,05</sub>

Varianty	Průměrný počet napadených rostlin na ploše 30 m <sup>2</sup>	Homogenní skupiny na hladině pravděpodobnosti P <sub>0,05</sub> (Fischerův LSD test)					
		1	2	3	4	5	6
L		**					
M1x			**				
K1x			**				
M+K				**			
K2x/0					**		
K2x/NPK					**		
M+P						**	
K+P/NPK							**
K+P/0							**
P2x/NPK							**
P2x/0							**
K3x/0							**
K3x/NPK							**
P3x/0							**
P3x/NPK							**
P4x/0							**
P4x/NPK							**
Roky							
2004		*					
2006			*				
2005				*			

## Poděkování

Příspěvek byl zpracován za podpory projektu MŠMT: MSM: 6007665806 a NAZV: QG 3018. Vlastní determinace padlí byla provedena ve spolupráci s Katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (RNDr. J. Marková, CSc.).

## Přehled literatury

- ČAČA, Z., DUŠEK, J., ŘÍMOVSKÝ, K., SVÍTIL, J., 1990. Protection of Field and Garden Crops. SZN, Praha, 150 p. (in Czech)
- DIXON, G. R., DOODSON, J. K., 1971. Assessment keys for some diseases of vegetable, fodder and herbage crops. J. Nat.. Inst.. Agri. Bot. 12: 299 – 307.
- HOFFMANN, M., SCHMUTTERER, H., 1983. Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen, Kulturpflanzen, pp. 381 – 382.
- KAZDA, J., JINDRA, Z., KABÍČEK, J., PROKINOVÁ, E., RYŠÁNEK P., STEJSKAL, V., 2003. Diseases and pests of field crops, fruit and vegetables. Zemědělec, Praha, p. 38. (in Czech)

# Sledování mikroskopických hub na semenech *Panicum milliaceum*.

BOHUMILA VOŽENÍLKOVÁ & JAN MOUDRÝ

VOŽENÍLKOVÁ, B., MOUDRÝ, J.: **Observation Microscopic fungi on grains of *Panicum milliaceum*.**

Proceedings of the MICROMYCO 2007, Nováková, A. (Ed.): pp. 182-184. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

In the period 2000 – 2002 there was found statistical difference in *Fusarium* and *Penicillium* fungi representation according to different temporal intervals of the stored seeds collection, which took place in October, March and May. During our experiments in vitro we found the highest percentage of the occurrence of *Fusarium* fungi, namely *F. acuminatum*, in the variety Vilskoje White (47.3%). In the other varieties - Veselopodoliánsko, Hanácká Mana and Polyploid – the infestation was about 26 – 36%; in Hanácká Mana we identified species *F. tricinctum*. The lowest infestation, i.e. 26.1%, was found in the variety Toldánsko. The occurrence of *Penicillium* fungi on the tested seeds of millet was the highest in the variety Hanácká Mana (6.0%), whereas the lowest rate of infestation was found in the variety Toldánsko (2.1%). The occurrence of *Fusarium* and *Penicillium* fungi on the surface of seeds of particular millet varieties in the period 2000 - 2002 was statistically different. It was also proved that the length of storing period influences the development of *Fusarium* and *Penicillium* fungi. It is necessary to point out that the fungi of *Fusarium* and *Penicillium* genus belong to phytopathogenic fungi which should be paid attention even if their occurrence is low. Their capacity to produce dangerous mycotoxins (especially in *Fusarium* fungi) should not be underestimated as it can cause the infestation of grain, foods and fodder, which can bring about serious health damage in case of infested products consumption.

**Keywords:** stored seeds, millet, *Fusarium*, *Penicillium*

Bohumila Voženílková, Jan Moudrý, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: [vozenil@zf.jcu.cz](mailto:vozenil@zf.jcu.cz)

\* presented as a poster at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Proso seté (*Panicum milliaceum* L.) se řadí mezi alternativní plodiny, které se znovu zavádějí a je předpoklad pro rozšiřování pěstitelských ploch pro potravinářské využití. Představuje cennou surovinu ve farmaceutickém, krmivářském a potravinářském průmyslu. Loupané zrno je velmi vhodné ke krmení okrasného ptactva, mladé drůbeže, prasat a ryb. Rozemleté zrno je výborným koncentrovaným krmivem. Podíl zrna ke slámě je 1 : 2 - 2,5 (MOUDÝ & STRAŠIL, 1999). Proso seté (*Panicum milliaceum*) je jednou z mnoha plodin pro energetické využití při jednoletém pěstování (FRYDRYCH, 2000).

Cílem maloparcelkových pokusů založených na školním pozemku katedry rostlinné výroby JU ZF v Č. Budějovicích, byla povrchová mikrobiální analýza skladovaných obilek odrůd prosa setého a to u 5 testovaných odrůd v pokusném období roku 2000 - 2002.

Z patogenních hub podléjících se na problematice skladování obilek *Panicum milliaceum* jsme se soustředili na parazitické houby rodu *Fusarium* a *Penicillium*.

Fuzária působí škody po celou dobu vývoje a růstu obilnin a bezprostředně ovlivňují nejen množství, ale hlavně kvalitu sklizně. K vlastní infekci dochází především v době kvetení a tvorby zrna (PROKINOVÁ, 2001). Mohou způsobit ztráty na sklizni až ve výši 10%. Při epidemii může dojít ke snížení výnosu až o 50 - 70% (ADLER, 1993).

Zástupci rodu *Penicillium* mohou inhibovat klíčivost zrn a některé druhy napadající obilky, produkují silné toxické látky- ochratoxiny (PROKINOVÁ, 2001).

## Materiál a metodika

V roce 2000 - 2002 probíhaly maloparcelkové pokusy s alternativní obilninou *Panicum milliaceum* na stanovišti v Českých Budějovicích (školní pozemek katedry rostlinné výroby Jihočeské univerzity, Zemědělské fakulty). Do půdy přirozeně zamořené houbami rodu *Fusarium* se vysely následující odrůdy: - Vilskoye White, Veselopodolianskoe, Toldanskoe, Hanácká mana a Polyploid.

Po sklizni byly jednotlivé odrůdy prosa setého (*Panicum milliaceum*) uloženy ve skladovacích podmínkách při teplotě 18 - 20 °C a 12 - 13% vlhkosti semen.

V podmínkách *in vitro* jsme k fytopatologické analýze během měsíce října, rok 2000 a 2001 a rovněž během měsíce března a května v letech 2001 a 2002 odebírali průměrný vzorek o velikosti 100g semen z posuzovaných skladovaných pěti odrůd *Panicum milliaceum* (Vilskoye White, Veselopodolianskoe, Toldanskoe, Hanácká mana a Polyploid). Kultivace semen probíhala v plastických Petriho miskách (o průměru 90mm) na pevné živné půdě (2% bramboro-glukózový agar).

Do každé Petriho misky bylo vloženo 50 zrn *Panicum milliaceum* dané odrůdy a to tak, aby se jednotlivá zrna vzájemně nedotýkala. Pokus probíhal ve tmě při teplotě 22 - 24 °C po dobu 7 - 14 dní. Sledování probíhalo v pěti opakování.

Na povrchu skladovaných zrn prosa setého byly mikroskopicky zjišťovány u jednotlivých variant pokusu v podmínkách *in vitro*, hodnoty úrovně zastoupení hub a to rodu *Fusarium* a *Penicillium*.

## Výsledky a diskuse

V pokusném období roku 2000 - 2002 byla statisticky prokázána, odlišnost v zastoupení hub rodu *Fusarium* a *Penicillium* při sledování třech časově odlišných intervalů odběrů skladovaných semen, kdy odběry probíhaly během měsíce října, března a května.

V našich pokusech v podmínkách *in vitro* jsme zaznamenali u odrůdy Vilskoye White nejvyšší procento výskytu hub rodu *Fusarium* a to druh *F. acuminatum* (47,3 %). U ostatních odrůd - Veselopodolianskoe, Hanácká Mana a Polyploid se napadení pohybovalo v rozmezí 26 - 36 %, kde jsme u odrůdy Hanácká Mana identifikovali druh *F. tricinctum*. Nejnižší zastoupení hub rodu *Fusarium* jsme zjistili u odrůdy Toldanskoe a to 26,1 %.

Výskyt hub rodu *Penicillium* na hodnocených semenech prosa setého byl nejvyšší u odrůdy Hanácká Mana (6,0 %) a nejnižší napadení jsme zaznamenali u odrůdy Toldanskoe (2,1 %) jak ukazuje Tab. 1.

Na povrchu skladovaných semen jednotlivých odrůd prosa setého v období let 2000 - 2002 bylo statisticky prokázáno, že se liší zastoupení hub rodu *Fusarium* a *Penicillium* na semenech jednotlivých odrůd. Rovněž ze statistických výsledků vyplývá, že délka skladování má vliv na rozvoj hub rodu *Fusarium* a *Penicillium* (Tab. 2).

Na základě našich výsledků by se měly mykologické a toxikologické rozborů zemědělských produktů a surovin stát součástí posklizňového procesu. U skladovaných produktů je to o to důležitější, že se při skladování může vytvářet vhodné mikroklima pro sekundární rozvoj houbových mikroorganismů (NEDĚLNÍK, 2000). Plísňe představují vážné riziko nejen vzhledem k užitkovosti a zdraví hospodářských zvířat, ale i pro bezpečnost potravin a zdraví lidí. FAO odhaduje, že 25% světových zásob zrnin je ročně kontaminováno mykotoxiny (SUCHÝ & HERZIG, 1998).

**Tab. 1.** Rozvoj hub rodu *Fusarium* a *Penicillium* v závislosti na odrůdě během skladování - rok 2001 - 2002

Odrůda	<i>Fusarium</i> (%)	<i>Penicillium</i> (%)
1 - Vilskoye White	47,3	5,7
2 - Veselopodolianskoe	32,3	2,5
3 - Toldanskoe	26,1	2,1
4 - Hanácká Mana	30,5	6,0
5 - Polyploid	35,6	2,6

**Tab. 2.** Vliv termínu hodnocení na výskyt sledovaných hub rodu *Fusarium* a *Penicillium* ve skladovaných podmínkách (%)

	19. 10. 2001	4. 3. 2002	17. 5. 2002
<i>Fusarium</i> spp.	27,2	39,2	36,6
<i>Penicillium</i> spp.	8,4	2,3	0,7

## Závěr

Závěrem lze říci, že houby rodu *Fusarium* a *Penicillium* patří mezi fytopatogenní houby, které nelze přehlížet ani při nízkém výskytu. Neměla by být podceňována jejich schopnost produkovat nebezpečné mykotoxiny, zvláště u hub rodu *Fusarium* a tím kontaminovat zrno, potraviny a krmivo, vzhledem k tomu, že konzumace produktů, které obsahují mykotoxiny může vést k vážným poruchám zdraví lidí i zvířat.

## Poděkování

Príspevek byl zpracován za podpory projektu MŠMT: MSM: 6007665806 a NAZV: QG 50034.

## Přehled použité literatury

- ADLER, A., 1993. *Fusarium* auf heimeschen Feldfrüchten. In: Mykotoxine in der landwirtschaftlichen Produktion (II), Linz, 21: 43-51.
- FRYDRYCH, J., 2000. Možnosti pěstování prosa setého pro energetické účely v marginálních oblastech. Farmář 5:19.
- NEDĚLNÍK, J., 2000. Poškození kukuřice houbami rodu *Fusarium* a kontaminace jejich metabolity. Tématická příloha. Úroda 2: 26-27.
- MOUDRÝ, J., STRAŠIL, Z., 1999. Pěstování alternativních plodin. Učební texty. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, pp. 26-31.
- PROKINOVÁ, E., 2001. Choroby klasů a jejich význam. Agro 5: 10–15.
- SUCHÝ, P., HERZIG, I., 1998. Mykotoxiny v krmivech a potravinách. Farmář 7 - 8: 41-44.

## Saprotrofní houby v rhizosféře chrastice rákosovité (*Phalaris arundinacea*)

MARIE HAVRÁNKOVÁ & MILAN GRYNDLER

\*\*\* Příspěvek nebyl na workshopu prezentován (náhlé onemocnění autorky)

### Havránková, M., Gryndler, M.: Saprotrophic fungi in rhizosphere of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*)

Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 185-193. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007. ISBN 978-80-86525-10-5

The effect of fertilisation and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on diversity of saprotrophic microfungi inhabiting rhizosphere of reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) was observed and tested by cultivation methods, CCA analysis and Monte Carlo tests. Samples were collected at field experimental area near Chomutov in June and August 2006. The difference in the community composition between June and August samplings was significant ( $p=0.001$ ) and explained 0.65 % of variability (after fitting covariables). The effect of fertilisation was also significant ( $p=0.004$ ) and explained 0.23% of the variability (after fitting covariables). In June, six times more CFUs of microfungi were isolated, compared to the August sampling. In June, the rhizosphere was colonised by fungi which tolerate untreated Miocene clays much better than high concentration of organic compounds. The dominant species of rhizosphere in June were *Penicillium pinophilum* (52.84 % of all CFUs isolated in June) and *Penicillium spinulosum* (44.98 % of all CFUs isolated in June), while the strongly dominant species of rhizosphere in August was *Aspergillus cf ochraceus* (87.47 % of all CFUs), followed by *Penicillium purpurogenum* (5.69 % of all CFUs) and *Penicillium pinophilum* (3.19 % of all CFUs). No significant effect of inoculation with AM fungi was detected.

**Keywords:** arbuscular mycorrhizal fungi, saprotrophic microfungi, rhizosphere, reed canarygrass

Marie Havránková, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Institute of Botany AS CR, v.v.i., Lesní 322, 252 43 Průhonice, Czech republic. E-mail: [havránkova@ibot.cas.cz](mailto:havránkova@ibot.cas.cz)  
Milan Gryndler, Institute of Botany AS CR, v.v.i., Lesní 322, 252 43 Průhonice, Czech Republic.

## Úvod

Při těžbě hnědého uhlí vznikají úložiště šedého miocénního jílu, která je nutno rekultivovat a případně využít k pěstování některých technických rostlin. K těmto účelům lze použít např. chrastici rákosovitou (*Phalaris arundinacea*), jejíž biomasa je využitelná jako energetický zdroj a k výrobě buničiny (STRAŠIL & HUTLA, 2004). Rekultivace úložišť šedého miocénního jílu technickými rostlinami je však dosud řešena bez hlubších znalostí úlohy mikroorganismů. Základními údaji, které musí předcházet praktické úvahy o využití mikroorganismů při rekultivacích, jsou data o jejich výskytu. Cílem této práce je popis vývoje společenstva saprotrofních mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité pěstované v jílu.

## Materiál a metodika

Sukcese mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité je pozorována v maloparcelkovém pokusu na výsypce Chomutovského povrchového dolu. Výzkumná plocha je rozdělena na 48 parcelek o rozměrech 7,5 x 4 m. Jednotlivé parcelky jsou od sebe vzdáleny 0,5 m, vzdálenost mezi osmičlennými bloky parcelek je 1 m.

Chrastice rákosovitá byla vyseta 18. 5. 2006. Předtím byly parcelky ošetřeny různými hladinami hnojení směsí lignocelulozového substrátu a kompostem vytvořeným z organické hmoty rostlinného původu a stabilizovaného kalu z čistíren odpadních vod (1:1) a některé

parcelky byly inokulovány buď přírodním inokulem indigenních arbuskulárních mykorhizních hub (homogenizovaná spontánně prokořeněná vrstva jílu z lokality), komerčním mykorhizním inokulem nebo směsí komerčního mykorhizního a bakteriálního inokula (viz. Tab. 1). Pro sledování mikroskopických hub byly vybrány parcelky bez inokulace a parcelky inokulované komerčním inokulem arbuskulárních mykorhizních hub, vždy hnojené buď dávkou 40 nebo 400 tun organických látek na hektar plochy.

Odběry byly provedeny 22. června 2006 a 13. září 2006. Z každé zkoumané parcelky byl odebrán směsný vzorek kořenů 3 – 6 rostlin, který byl převezen do laboratoře a do dvou dnů zpracován. Kořeny byly nejprve omyty tekoucí vodou, poté třepány na třepáče Tatlock 2x 5 min. v nesterilním  $MgSO_4$  a 2x 5 min. ve sterilním 0,2%  $MgSO_4$ ) a nakonec rozetřeny ve třech miskách. Do sterilních Petriho misek bylo pipetováno 0,5 ml homogenátu zředěného 0,2%  $MgSO_4$  100x a 1000x a smícháno se zchlazeným médiem SEA, v němž byl půdní extrakt nahrazen kvasničným extraktem. Takto byly vždy připraveny tři Petriho misky pro každé ředění a každý vzorek. Misky byly kultivovány ve tmě při 25°C. Po 7 dnech byly zaznamenány počty CFU jednotlivých morfotypů. Morfotypy byly určeny klasickými morfologickými metodami na speciálních identifikačních médiích (CYA, MEA, PDA, SNA, NSA).

Substráty používané v pokusu (jíl odebraný z výsypky povrchového Chomutovského dolu, přirozené mykorhizní inokulum, umělé mykorhizní inokulum, kompost) byly zředěny 10x sterilní vodou. 50 ml směsi bylo 20 minut třepáno na třepáče Tatlock. 0,05 ml homogenátu, v němž byly jednotlivé substráty zředěny 10x, 100x a 1 000x, bylo pipetováno na sterilní Petriho misky a smícháno s médiem SEA, v němž byl půdní extrakt nahrazen kvasničným extraktem. Takto bylo připraveno po třech Petriho miskách ze stejného substrátu a se stejným ředěním. Misky byly kultivovány ve tmě při 25°C. Po 7 dnech byly zaznamenány počty CFU jednotlivých morfotypů.

Vliv proměnných prostředí odběr, hnojení, ředění, inokulace umělým mykorhizním inokulem na data o počtu CFU jednotlivých morfotypů v prvních dvou odběrech byl testován pomocí mnohorozměrných ordinačních technik v programu Canoco for Windows 4.5 (TER BRAAK & ŠMILAUER, 2002). K rozhodnutí, zda použít lineární či unimodální modely, byla použita nepřímá mnohorozměrná analýza DCA (detrendovaná kanonická analýza). Pomocí této analýzy bylo zjištěno, že délka gradientu je pro všechny zkoumané proměnné prostředí větší než 4. Vliv proměnných prostředí na výskyt jednotlivých druhů a morfotypů tedy není lineární a maxima výskytu jednotlivých morfotypů se pravděpodobně nalézají jen v části gradientu (HERBEN & MÜNZBERGEROVÁ, 2003). Proto byla data dále analyzována přímou unimodální mnohorozměrnou analýzou CCA.

Signifikance vlivu proměnných prostředí na variabilitu dat byla testována pomocí Monte Carlo permutačních testů, permutace byly provedeny v blocích kovariát (vždy 999 permutací).

## Výsledky

Test signifikace kanonických os metodou Monte Carlo s permutacemi v blocích kovariát prokázal signifikantní vliv proměnných prostředí odběr a hnojení na variabilitu mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité (viz. Obr. 1). Proměnná prostředí odběr vysvětluje po odečtení vlivu kovariát 0,65 % variability mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité (p-hodnota = 0,001). Proměnná prostředí hnojení vysvětluje po odečtení vlivu kovariát 0,23 % variability mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité (p-hodnota = 0,004).

Signifikantní vliv proměnných prostředí ředění a inokulace umělým mykorhizním inokulem na variabilitu mikroskopických hub v rhizosféře chrastice rákosovité nebyl prokázán.

Z prvního odběru bylo izolováno 2657 CFU mikroskopických hub, z druhého odběru 439 CFU mikroskopických hub. V prvním odběru byla většina mikroskopických hub izolována

z variant s nižší hladinou hnojení (98,19 % všech CFU izolovaných v 1. odběru), naopak ve 2. odběru byla většina hub izolována z variant s vyšší hladinou hnojení (81,8 % všech CFU izolovaných v 2. odběru).

Celkem bylo izolováno 17 druhů a morfotypů mikroskopických hub, počet druhů izolovaných v obou odběrech je srovnatelný (viz. Tab. 2, Tab. 3). V 1. odběru výrazně dominovaly druhy *Penicillium pinophilum* (52,84 % všech CFU izolovaných v 1. odběru), *Penicillium spinulosum* (44,98 % všech CFU izolovaných v 1. odběru), ostatní druhy se vyskytovaly s relativní četností nižší než 1% všech CFU izolovaných v 1. odběru. *Penicillium spinulosum* bylo v prvním odběru izolováno pouze z variant s nízkou hladinou hnojení.

Ve druhém odběru výrazně dominoval *Aspergillus cf. ochraceus* (87,47 % všech CFU izolovaných ve 2. odběru), poměrně časté byly též druhy *Penicillium purpurogenum* (5,69 % všech CFU izolovaných ve 2. odběru) a *Penicillium pinophilum* (3,19 % všech CFU izolovaných ve 2. odběru). Ostatní druhy a morfotypy mikroskopických hub se vyskytovaly s relativní četností nižší než 1% všech CFU izolovaných v 2. odběru. Kolonie druhu *Aspergillus cf. ochraceus* tvořily 98,6 % všech CFU izolovaných z variant s vyšší hladinou hnojení ve druhém odběru. *Penicillium purpurogenum* a *Penicillium pinophilum* byly izolovány ve druhém odběru pouze z variant s nižší hladinou hnojení.

Z různých substrátů bylo izolováno celkem 612 CFU (viz. Obr. 2). Nejvíce CFU bylo izolováno z umělého inokula 274 CFU, dále z přirozeného inokula 183 CFU a z kompostu 115 CFU. Nejméně hub bylo izolováno z jílu (40 CFU). Více než 60% všech CFU izolovaných ze všech substrátů náleželo do druhu *Penicillium pinophilum* (63,72 % všech izolovaných CFU), pětinu všech izolovaných CFU tvořily kolonie *Trichoderma harzianum* (20,92 %).

*Penicillium pinophilum* bylo dominantním druhem jílu (92,5 % všech CFU izolovaných z jílu), přirozeného inokula (53,01 % všech CFU izolovaných z přiroz. inokula) a umělého inokula (86,13 % všech CFU izolovaných z um. inokula). V čistírenském kalu dominovala *Trichoderma harzianum* (53,91 % všech CFU izolovaných z kalu). Tato houba byla hojně izolována i z přirozeného inokula (20,77% všech CFU izolovaných z přirozeného inokula) a z umělého inokula ( 10,22 % všech CFU izolovaných z umělého inokula).

## Diskuse

Z 2. odběru bylo izolováno 6x méně CFU mikroskopických hub, v 1. odběru bylo výrazně více hub izolováno z variant s nižší hladinou hnojení, ve 2. odběru tomu bylo naopak. Je možné, že v 1. odběru byly izolovány houby schopné žít v miocénním jílu (*Penicillium spinulosum*, *P. pinophilum*) a ve 2. odběru se jednalo o houby, kterým vyhovují substráty s vyšším obsahem organických látek (*Aspergillus cf. ochraceus*, *Trichoderma harzianum*).

Morfotyp *Aspergillus cf. ochraceus* byl izolován pouze ve druhém odběru, nebyl izolován z původních substrátů a podle výsledků mnohorozměrných metod preferuje varianty s vyšší hladinou hnojení. Je možné, že se jedná o druh žijící v bližším vztahu k rostlině, schopný prosperovat v rhizosféře rostlin, rostoucích v prostředí silně hnojeném. Druh *Aspergillus ochraceus* a druhy jemu příbuzné rostou uvnitř pletiv rostlin i v dlouhodobě relativně suchých podmínkách (PARDO ET AL., 2006, MARÍN ET AL., 1998). *Aspergillus ochraceus* a druhy jemu příbuzné jsou producenty mykotoxinů, např. ochratoxinů, peniciliových kyselin, xanthomeglinů (FRISVAD ET AL., 2004), což je nutné zvážit před dalším vliv na další využití biomasy chřastice rákosovité pěstované na výsypkách, ačkoli se toxicita těchto látek se projevuje hlavně při jejich požití.

Na rozdíl od *A. cf. ochraceus* byl druh *Penicillium pinophilum* častější ve variantách s nižší hladinou hnojení a v 1. odběru. Tento druh byl častý ve všech substrátech, zvláště pak v umělém mykorhizním inokulu. Jedná se pravděpodobně o druh schopný úspěšně konkurence



vůči ostatním houbám. Jeho silně fungicidní metabolit 3-o-metylfunicon je například schopen úplně blokovat růst *Rhizoctonium solani* (DE STEFANO ET AL., 1999).

V 1. odběru bylo *Penicillium spinulosum* izolováno jako druhá nejčastější houba vůbec, ale pouze z variant s nižšími hladinami hnojení. Naopak v 2. odběru byla tato houba izolována pouze v počtu 1 CFU (z varianty s vyšší hladinou hnojení). Tato houba byla navíc při izolaci ze všech použitých substrátů izolována pouze z jílu (7,5 % všech CFU izolovaných z jílu). Je možné, že je tato houba adaptována na život v tak nepříznivém prostředí, jako je šedý miocénní jíl.

Naopak *Trichoderma harzianum* byla izolována častěji z variant s vyššími hladinou hnojení a byla izolována přímo z čistírenského kalu a nikoli z jílu. Této houbě pravděpodobně vyhovuje vyšší zastoupení organických látek v půdě. Podobně uvažuje i PAPAVIDAS (1985), který považuje houby rodu *Trichoderma* za sekundární kolonizátory, hojně na již dobře rozložených organických substrátech.

## Závěr

Z dat je výrazně patrný kvantitativní i kvalitativní vývoj společenstva mikroskopických hub rhizosféry chřastice rákosovité (*Phalaris arundinacea* L.) v čase i rozdílů mezi jednotlivými hladinami hnojení. Více informací o vývoji sukcese v rhizosféře chřastice rákosovité použité k rekultivaci miocénního jílu bude patrné po vyhodnocení dalších odběrů. Zajímavé výsledky lze v neposlední řadě očekávat od souběžného vyhodnocení jednotlivých odběrů pomocí molekulárně genetických metod.

## Poděkování

Tento výzkum je financován z prostředků projektu číslo 1M0571 MŠMT ČR (Výzkumné centrum pro bioindikaci a revitalizaci). Naše poděkování patří rovněž RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za cenné rady při identifikaci hub.

## Přehled použité literatury

- DE STEFANO, S., NICOLETTI, R., MILONE, A., ZAMBARDINO, S., 1999. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. *Phytochemistry* 52 (8): 1399-4001.
- FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F. A., SAMSON, R. A., 2004: New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50: 23-43.
- HERBEN, T., MÜNZBERGEROVÁ, Z., 2003: Zpracování geobotanických dat v příkladech. – Část 1. Data o druhovém složení. Praha, 118 p.
- MARÍN, S., SANCHIS, V., SÁENZ, R., RAMOS, A. J., VINAS, I., 1998: Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *J. Appl. Microbiol.* 84 (1): 25–36.
- PAPAVIDAS, G. C., 1985: *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- STRAŠIL, Z., HUTLA, P., 2004: Chřastice rákosovitá - pěstování a možnosti využití. *Biom.cz* [online]. [cit. 2006-06-14]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/index.shtml?x=168155>.
- PARDO, E., MARÍN, S., RAMOS, A. J., SANCHIS, V., 2006: Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention – a review. *Food Addit. Contam.* 23 (4): 398-410.

TER BRAAK, C. J. F., ŠMILAUER, P., 2002: CANOCO Reference manual and CanoDraw for Window's User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca, 500 p.

## Přílohy

**Tab. 1** – Rozvržení parcelk na výzkumné ploše.

Čísla parcelk jsou uvedena tučně, dávky organického hnojení (t/ha) jsou uvedeny v závorce. Parcelky, kterých se týká studie mikroskopických hub jsou zvýrazněny šedou barvou. A – žádné inokulum nebylo použito, B – inokulace přírodním inokulem, C – inokulace komerčním mykorhizním inokulem, D – inokulace směsí komerčního mykorhizního a bakteriálního inokula.

A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
<b>25</b> (400)	<b>26</b> (400)	<b>27</b> (400)	<b>28</b> (400)	<b>29</b> (120)	<b>30</b> (120)	<b>31</b> (120)	<b>32</b> (120)	<b>33</b> (40)	<b>34</b> (40)	<b>35</b> (40)	<b>36</b> (40)
<b>37</b> (40)	<b>38</b> (40)	<b>39</b> (40)	<b>40</b> (40)	<b>41</b> (400)	<b>42</b> (400)	<b>43</b> (400)	<b>44</b> (400)	<b>45</b> (120)	<b>46</b> (120)	<b>47</b> (120)	<b>48</b> (120)
<b>49</b> (120)	<b>50</b> (120)	<b>51</b> (120)	<b>52</b> (120)	<b>53</b> (40)	<b>54</b> (40)	<b>55</b> (40)	<b>56</b> (40)	<b>57</b> (400)	<b>58</b> (400)	<b>59</b> (400)	<b>60</b> (400)
<b>61</b> (40)	<b>62</b> (40)	<b>63</b> (40)	<b>64</b> (40)	<b>65</b> (400)	<b>66</b> (400)	<b>67</b> (400)	<b>68</b> (400)	<b>69</b> (120)	<b>70</b> (120)	<b>71</b> (120)	<b>72</b> (120)

**Tab. 2** - Počet CFU izolovaných v jednotlivých variantách v 1. odběru.

Údaje z parcelek hnojených dávkou 400 t/ha jsou zvýrazněny šedou barvou, plošky hnojené dávkou 40 t/ha jsou nezvýrazněné. Relativní četnost 1 (%) – procentuální podíl CFU izolovaných z dané plošky, vztahený k celkovému počtu CFU izolovaných v daném odběru, relativní četnost 2 (%) – procentuální podíl izolovaných CFU daného druhu, vztahený k celkovému počtu CFU izolovaných v daném odběru

číslo plošky	25	27	33	35	37	39	41	43	53	55	57	59	celkem	relativní četnost 2 (%)
druh/morfotyp														
<i>Penicillium pinophilum</i>	0	3	18	389	587	42	6	14	232	106	4	3	1404	52,84
<i>Penicillium purpurogenum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2	0,08
<i>Penicillium spinulosum</i>	0	0	0	1176	4	0	0	0	3	12	0	0	1195	44,98
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	3	0	0	0	1	2	1	3	0	0	0	10	0,38
<i>Penicillium</i> sp. 29	0	0	0	0	0	1	0	0	0	9	2	4	16	0,60
<i>Penicillium</i> sp. 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,04
<i>Penicillium</i> sp. 6	0	0	0	20	0	0	0	0	3	0	0	0	23	0,87
<i>Penicillium islandicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0,08
<i>Trichoderma</i> sp. 24	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0,11
<i>Trichoderma</i> sp. 27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,04
celkem CFU	0	7	18	1585	591	47	9	15	241	127	8	9	2657	100
relativní četnost 1 (%)	0,00	0,26	0,68	59,65	22,24	1,77	0,34	0,56	9,07	4,78	0,30	0,34	100	---

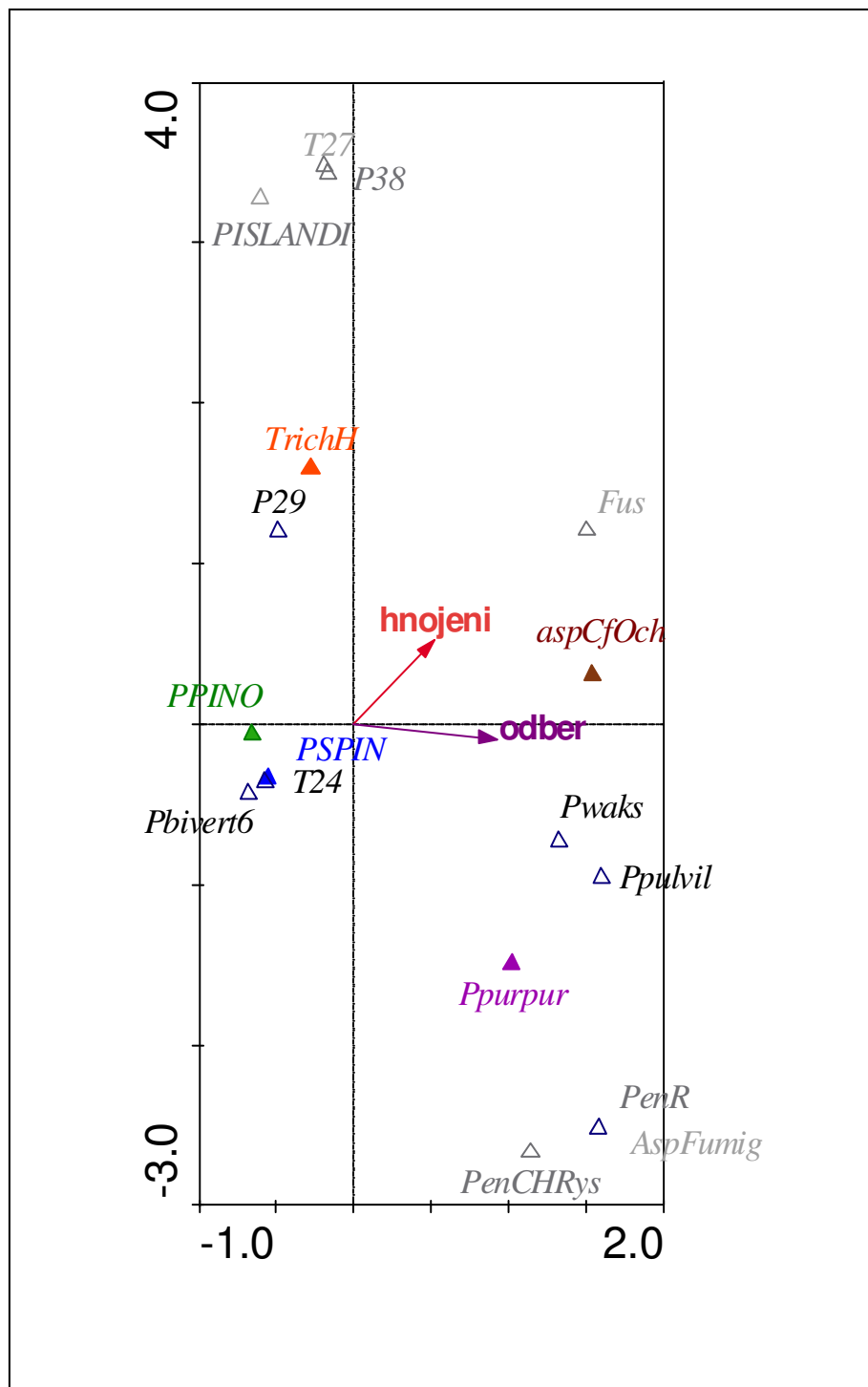
**Tab. 3 - Počet CFU izolovaných v jednotlivých variantách v 2. odběru.**

Údaje z parcel ek hnojených dávkou 400 t/ha jsou zvýrazněny šedou barvou, plošky hnojené dávkou 40 t/ha jsou nezvýrazněné. Relativní četnost 1 (%) – procentuální podíl CFU izolovaných z dané plošky, vztažený k celkovému počtu CFU izolovaných v daném odběru, relativní četnost 2 (%) – procentuální podíl izolovaných CFU daného druhu, vztažený k celkovému počtu CFU izolovaných v daném odběru

číslo plošky	25	27	33	35	37	39	41	43	53	55	57	59	celkem	relativní četnost 2 (%)
druh/morfotyp														
druh/morfotyp	216	49	21	0	2	4	20	0	2	4	59	7	384	87,47
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0,46
<i>Fusarium</i> sp. 1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,23
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,46
<i>Penicillium verrucosum</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0,68
<b><i>Penicillium pinophilum</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>3,19</b>
<i>Penicillium pulvillorum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	4	0,91
<b><i>Penicillium purpurogenum</i></b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>5,69</b>
<i>Penicillium spinulosum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,23
<i>Penicillium waksmanii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0,46
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,23
celkem CFU	217	49	24	2	18	11	20	1	3	25	60	9	439	100
relativní četnost 1(%)	49,43	11,16	5,47	0,46	4,10	2,51	4,56	0,23	0,68	5,69	13,67	2,05	100	

**Obř. 1** - Grafický výřtup z řpřímě lineární analýzy CCA. Vliv hnojení a doby odběru na variabilitu společenřva hub rhizosfěry chrastice rákosovitě (*Phalaris arundinacea* L.) .

aspCfOch = *Aspergillus* cf. *ochraceus*, AspFumig = *Aspergillus fumigatus* Fresen., Fus = *Fusarium* sp. 1, P29 = *Penicillium* sp. 29, P38 = *Penicillium* sp. 38, Pbivert6 = *Penicillium* sp.6, PenCHRys = *Penicillium chrysogenum* Thom, PenR = *Penicillium verrucosum* Dierckx, PISLANDI = *Penicillium islandicum* Sopp, PPINO = *Penicillium pinophilum* Thom, Ppulvil = *Penicillium pulvillorum* Turfitt, Ppurpur = *Penicillium purpurogenum* Stoll, PSPIN = *Penicillium spinulosum* Thom, Pwaks = *Penicillium waksmanii* K.M. Zalessky, T24 = *Trichoderma* sp. 24, T27 = *Trichoderma* sp. 27, TrichH = *Trichoderma harzianum* Rifai



FU).

## ABECEDNÍ SEZNAM ÚČASTNÍKŮ A PŘEDSTAVENÍ JEJICH PRACOVNÍHO ZAMĚŘENÍ

Pracovní zaměření jsou uvedena jen u těch účastníků, kteří své zaměření zaslali. Pokud je u jména uveden symbol #, informace o pracovním zaměření, případně podrobnější informace, jsou k dispozici v prezentacích příslušných pracovišť.

### **Ing. Michal ČERNÝ**

Laboratoř ekologie lesa ÚSBE, v.v.i., České Budějovice

[ing.mcerny@seznam.cz](mailto:ing.mcerny@seznam.cz)

- *mikromycety z P.abies lesní půdy rozkládající se biomasy, endofyty*

### **Ing. Mária DOVIČIČOVÁ #**

Katedra mikrobiologie, Fakulta biotechnologie a potravinářstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

[maria.dovicicova@uniag.sk](mailto:maria.dovicicova@uniag.sk)

### **Ing. Soňa FELŠÖCIOVÁ, Ph.D. #**

Katedra mikrobiologie, Fakulta biotechnologie a potravinářstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

[sona.felsociova@uniag.sk](mailto:sona.felsociova@uniag.sk)

### **RNDr. Dana HANULÁKOVÁ #**

IFCOR – 99, s.r.o, mikrobiologická laboratoř, Viniční 235, 615 00 Brno

[hanulakova@ifcor.cz](mailto:hanulakova@ifcor.cz)

- *klinická mykologie, mykologie prostředí, výroba vakcín*

### **Mgr. Marie HAVRÁNKOVÁ**

Centrum pro bioindikaci a revitalizaci, BÚ AVČR, v.v.i., Zámek 1, 252 43 Průhonice

Katedra botaniky, PŘF UK, Benátská 2, 128 00 Praha 2

Laboratoř biologie hub, MBÚ AVČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4 – Krč

[ledenec@centrum.cz](mailto:ledenec@centrum.cz)

Studentka postgraduálního studia na PŘF UK, Praha, školitelem doktorské práce je doc. RNDr. Milan Gryndler CSc., konzultanti RNDr. Alena Kubátová, CSc. a Mgr. Karel Prášil, CSc. Téma doktorské práce: **Studium sukcese hub v šedém miocenním jílu kolonizovaném kořeny *Phalaris arundinacea*.**

Doktorská práce je součástí projektu CBR, jehož cíle jsou:

1. Ověřit potenciál mikrobiálních inokulací pro revitalizaci hnědouhelných výsypek vybranými rekultivačními plodinami.

2. Navrhnout optimální režim mikrobiálních inokulací a hnojení pro vytvoření stabilního vegetačního krytu a snížení nákladů na management rekultivovaných ploch.

3. Zhodnotit vliv pěstované rostliny, mikrobiálních inokulací a hnojení na rozvoj charakteristik půdního prostředí

- Zjištění vlivu hnojení a umělé inokulace jílu arbuskulárními mykorhizními houbami na výskyt jednotlivých taxonů hub a jeho časový průběh, vyhodnocení vlivu jednotlivých proměnných pomocí mnohorozměrných metod.
- Sledování sukcese různých skupin hub v průběhu osídlení šedého miocénního jílu kořeny *Phalaris arundinacea* na základě klasických mikrobiologických metod (oplachování kořenů na třepače, výsevy na misky, kultivace morfologická determinace, izolace) i molekulárně genetickými metodami.
- Charakterizace vybraných izolátů hub metodami molekulární genetiky.
- Vypracování metody extrakce environmentální DNA ze vzorků jílu. Využití této DNA k charakterizaci společenstev hub ve studovaném substrátu např. pomocí TRFLP.
- Porovnání výsledků o vlivech proměnných prostředí získaných pomocí molekulárně biologických metod a klasickými kultivačními metodami.

**MVDr. Jana HRDINOVÁ**

BIO PLUS, s.r.o., laboratoř klinické mykologie, Lazaretní 6, 615 00 Brno  
[hrdinova25@seznam.cz](mailto:hrdinova25@seznam.cz)

**Mgr. Martina HUJSLOVÁ**

Katedra botaniky Př. f. UK Praha  
[pinkponk@seznam.cz](mailto:pinkponk@seznam.cz)

- *studium diverzity, ekologie a taxonomie mikroskopických půdních hub extrémních substrátů*

Ve své práci se zaměřuji na lokality (příp. plochy) s vyšším zastoupením solí v substrátu a se silně kyselou půdní reakcí. Při studiu postupuji od odběru a zpracování vzorků přes izolaci hub až po determinaci získaných izolátů, a to jak pomocí morfologických znaků, tak i molekulárních metod. Vybrané druhy (dominantní, příp. nové) jsou následně detailněji studovány, a to jak po stránce morfologické, tak i taxonomické a fyziologické (testování vlivu pH a salinity na růst).

Hlavním polem mé působnosti je katedra botaniky PřF UK a Laboratoř fyziologie a genetiky vláknitých hub v MBÚ AV ČR, v.v.i.. Uvedené problematice se v současné době věnuji v rámci své disertační práce a zabývám se jí ve spolupráci s A. Kubátovou a M. Kolaříkem.

**RNDr. Božena JANDOVÁ, CSc.**

BIO PLUS, s.r.o., laboratoř klinické mykologie, Lazaretní 6, 615 00 Brno  
[bjandova@seznam.cz](mailto:bjandova@seznam.cz)

- *lékařská mykologie*



**Mgr. Jiří JIROUT**

Př. f. JCU, České Budějovice

Ústav půdní biologie BC AV ČR, v.v.i., České Budějovice

[jiri.jirout@prf.jcu.cz](mailto:jiri.jirout@prf.jcu.cz)

Bakalářská a magisterská práce (Biologická fakulta JCU): „**Změny společenstva půdních saprotrofních mikromycetů v podmínkách simulovaného posunu vegetačních zón.**“

- Posun byl uskutečněn přesunem opadových sáčků s opadem buku a dubu do bukového a smrkového lesa, tj. o jednu až dvě vegetační zóny výše.
- Byly sledovány kvantitativní i kvalitativní změny ve společenstvu hub (klasické kultivační metody, stanovení ergosterolu pomocí GC-MS/MS, molekulárně biologické fingerprintové techniky PCR-ARDRA s využitím sady primerů NS1/FR1 a restričních endonukleás *TaqI* a *HinfI*, fingerprintové profily složení buněčných mastných kyselin).

Disertační práce: „**Vliv volně paseného skotu na společenstva půdních hub.**“

Cílem disertační práce je s využitím dostupných metod mikrobiální ekologie popsat změny komplexního společenstva půdních hub se zaměřením na arbuskulárně mykorrhizní houby. Pro studium vlivu skotu byla vybrána pastvina sloužící jako zimoviště skotu na pozemku soukromé farmy Borová, blízko Českého Krumlova. Lokalita je výjimečná zejména přítomností velice dobře vytvořeného gradientu vlivu pasených zvířat. Na lokalitě byla vybrána tři kvalitativně odlišná stanoviště lišící se mírou zátěže volně paseným skotem. Stanoviště **S** (severe impact) představuje místo nejvíce zatížené působením skotu, půda je přesycena živinami z exkrementů skotu. Stanoviště **M** (moderate impact) představuje místo středně zatížené, nasycení živinami je zde nižší. Stanoviště **C** (control) slouží jako kontrola a odpovídá charakteru původní nenarušené pastviny.

Pro sledování rozdílů v kvantitě i kvalitě společenstev hub v půdách ovlivněných volně paseným skotem oproti kontrolní (neovlivněné) půdě pastviny bude využit tzv. „polyfázický“ přístup, ve kterém se spojuje využití kultivačních i kultivačně nezávislých metod.

**Ing. Zuzana KOLLÁRIKOVÁ #**

Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava

[zuzana.kollarikova@szu.sk](mailto:zuzana.kollarikova@szu.sk)

**Mgr. Miroslav KOLAŘÍK, Ph.D.**

Laboratoř fyziologie a genetiky vláknitých hub MBÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Katedra botaniky Př. f. UK Praha

[mkolarik@biomed.cas.cz](mailto:mkolarik@biomed.cas.cz)

- *studium diverzity, ekologie a taxonomie hub žijících v symbiózách s podkorním hmyzem* (spolu s R. Jankowiakem)

Ze symbiontů kůrovců to je zejména rod *Geosmithia* a *Quambalaria*. Dále studuji ambrosiové a ophiostomatální houby ambrosiových brouků tropů (spolu s Z. Příkrylem a J. Hulcrem) a symbionty pilořítek (spolu se S. Pažoutovou a P. Šrůtkou). Při studiu daného společenstva postupují od sběru kůrovců v terénu a izolace přenášených hub k jejich roztřídění do skupin dle morfologické podobnosti. Dalším krokem je porovnání genetické podobnosti mezi skupinami (metoda ISSR-PCR, RAPD, sekvenování ITS rDNA) a zjištění jejich příbuznosti pomocí fylogenetických analýz vybraných genů. Skupiny s unikátním genotypem (PCR

fingerprintem či sekvencí daného genu), které jsou u těchto hub rozlišitelné i morfologicky jsou považovány za biologické druhy. Takto otypovaný materiál slouží dále k taxonomickým (revize starých druhů či popisy nových) a evolučním analýzám (studium fylogeografie *Geosmithia* spp. spolu s M. Kostovčíkem). Znalost spektra hub na daném vzorku pak slouží k analýzám ekologickým jako je studium hostitelské specifity dané skupiny hub a faktory ovlivňující složení houbového společenstva na daném hmyzu, dřevině a areálu (studuje se Evropa mírného pásu vs. Středomoří a tropy).

- **molekulárně genetická identifikace hub z projektů kolegů jako jsou půdní houby (M. Hujšlová, A. Kubátová) a endofyti jilmu (A. Kubátová, K. Prášil).**

V tomto případě postupuji od sekvenování ITS rDNA oblasti spolu s LSU rDNA a případně SSU rDNA a genu pro beta-tubulin, které jsou nejvíce zastoupeny v databázi GenBank. Tento postup vede buď k přímému určení dle velké podobnosti s referenční sekvencí z databáze či určení do rodu atd.

Obecným cílem projektů, na kterých pracuji, je zaprvé poznání (tj. publikace) diverzity hub v daném substrátu. Záměrně jsou vybírány opomíjená společenstva, kde se dá předpokládat mnoho nového a kde houby přežívají pomocí specifických fyziologických adaptací (interakce s hmyzem pomocí řady metabolitů, acido- a halotolerance, endofytismus).

Dalším cílem je vybrat druhy hub, které jsou významné pro společenstvo a dále je studovat. Tzn. studovat taxonomii a spektrum sekundárních metabolitů (spolu s laboratoří M. Fliegera a V. Havlíčka a dalších v MBÚ AVČR a na PřF UK).

Cílem studia sekundárních metabolitů je hledat biologicky aktivní látky (antimikrobiální, imunosupresivní) či další látky využitelné v biotechnologii (barviva, mořidla).

### **Tereza KONVALINKOVÁ**

Katedra botaniky Př. f. UK, Praha

[konvalin@natur.cuni.cz](mailto:konvalin@natur.cuni.cz)

### **Mgr. Ondřej KOUKOL, Ph.D.**

Katedra botaniky Př.f. UK, Benátská 2, 128 01 Praha

[o.koukol@seznam.cz](mailto:o.koukol@seznam.cz)

- **ekologie saprotrofních askomycetů kolonizujících opad jehličnanů, především borovice (*Pinus sylvestris*) a smrku (*Picea abies*)**

V tomto poměrně širokém tématu sleduji dva aspekty – *interakce askomycetů s ostatními druhy hub* (interspecifické kompetice) a *s bezobratlými živočichy kolonizujícími opad, především s pancířníky (Acari: Oribatida)*.

Další náplní mé práce je **výuka**. Na katedře botaniky Př. f. UK vyučuji Ekologii hub, Pracovní metody kryptogamologie a podílím se i na vedení praktických cvičení a terénních cvičení z botaniky.

### **RNDr. Alena KUBÁTOVÁ, CSc. #**

Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, 128 01 Praha

[kubatova@natur.cuni.cz](mailto:kubatova@natur.cuni.cz)

Hlavní výzkumná témata, kterými jsem se v posledních letech zabývala, souvisela především s diverzitou mikroskopických hub na nejrozmanitějších substrátech. Přehled řešených grantů a publikovaných výsledků najdete na <http://botany.natur.cuni.cz/cz/lide/kubatova.php>.

**Ing. Jolana KYSELÁKOVÁ #**

VULHM, v.v.i., UH Kunovice

[kyselakova@vulhmuh.cz](mailto:kyselakova@vulhmuh.cz)

**Ing. Roman LABUDA, Ph.D. #**

Katedra mikrobiologie, Fakulta biotechnologie a potravinářstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

[Roman.Labuda@uniag.sk](mailto:Roman.Labuda@uniag.sk)

**Mgr. Blanka LAŠŤOVIČKOVÁ**

Klinlab, s.r.o., U Vojenské nemocnice 1200, 169 00 Praha 6 – Střešovice

[lastovickova@klinlab.cz](mailto:lastovickova@klinlab.cz)

- *klinická mykologie, mykologie prostředí*

**Mgr. Hana LUKŠANOVÁ**

VURV, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha – Ruzyně

[luksanova@vurv.cz](mailto:luksanova@vurv.cz)

**Ing. Martina MALINOVÁ #**

VULHM, v.v.i., UH Kunovice

[malinova@vulhmuh.cz](mailto:malinova@vulhmuh.cz)

**Mgr. Barbora MIESLEROVÁ, Ph.D. #**

Katedra botaniky, Př. f. PU v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 871 Olomouc- Holice

[barbora.mieslerova@upol.cz](mailto:barbora.mieslerova@upol.cz)

**RNDr. Alena NOVÁKOVÁ, CSc.**

Ústav půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice

[alena@upb.cas.cz](mailto:alena@upb.cas.cz)

- *půdní mikroskopické houby*  
studium druhového spektra a kvantitativního zastoupení (počty CFU, stanovení délky mycelia a biomasy) saprotrofních mikromycetů v různých typech půd – přirozená stanoviště, půdy ovlivněné činností člověka, výsypky hnědouhelných dolů

- *interakce mezi půdními mikromycety a bezobratlými živočichy*

izolace mikromycetů ze střevního traktu a exkrementů různých zástupců zooedafonu, pokusy potravní preference, vzájemné ovlivnění půdních mikromycetů a žížal,...

- ***studium mikromycetů v jeskyních ČR a Slovenska***

izolace mikromycetů z ovzduší jeskyní a z dalších substrátů (jeskynní sediment, netopýří exkrementy a guano, exkrementy bezobratlých živočichů a obratlovců, vermikulace na stěnách jeskyní, ...), interakce mezi mikroskopickými houbami a jeskynnými bezobratlými živočichy (izolace ze střevního traktu, pokusy potravní preference)

- ***Sbírka mikroskopických hub Ústavu půdní biologie (CMF ISB)***

vedoucí a kurátor sbírky, ve sbírce uloženo cca 1100 kmenů mikroskopických hub izolovaných převážně z různých půd ČR, Slovenska, Makedonie, Německa a Ruska a z dalších substrátů (rostlinný opad, střevní traktory a exkrementy bezobratlých živočichů, ovzduší, vermikompost, jeskynní sediment, guano, atd.)

### **Mgr. David NOVOTNÝ, Ph.D.**

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Odbor rostlinolékařství, Oddělení mykologie  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně  
email: novotny@vurv.cz, [novotdad@natur.cuni.cz](mailto:novotdad@natur.cuni.cz), tel.: 233022373, 233022358

- *mikroskopické houby*
- *endofytická mykobiota rostlin*
- *fytopatogenní a potenciálně fytopatogenní houby*
- *ophiostomatální houby*
- *uchovávání a sbírky kultur hub*

### **Další současné aktivity týkající se mykologie:**

- člen výboru České vědecké společnosti pro mykologii
- autor a správce webových stránek České vědecké společnosti pro mykologii (ČVSM) - [www.natur.cuni.cz/cvsm](http://www.natur.cuni.cz/cvsm)
- autor a správce webových stránek Federace česko-slovenských sbírek mikroorganismů (FCCM) - [www.natur.cuni.cz/fccm](http://www.natur.cuni.cz/fccm)
- vedoucí a kurátor Sbírek kultur hub a referenčních protilátek VÚRV, v.v.i.

### **Ing. Elena PIECKOVÁ, M.Ph., Ph.D. #**

Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 12, 833 03 Bratislava  
[zuzana.kollarikova@szu.sk](mailto:zuzana.kollarikova@szu.sk)

### **Ing. Zuzana PIOVARČIOVÁ #**

Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra  
[zuzana.piovarciova@uniag.sk](mailto:zuzana.piovarciova@uniag.sk)

### **Mgr. Karel PRÁŠIL, CSc. #**

Katedra botaniky, Př. f. UK, Benátská 2, 128 01 Praha  
[prasil@natur.cuni.cz](mailto:prasil@natur.cuni.cz)

**Ing. Eva PRENEROVÁ, CSc.**

Laboratoř ochrany rostlin Olešná, Olešná 87, 398 43 Bernartice

[eva.prenerova@seznam.cz](mailto:eva.prenerova@seznam.cz)

- **studium entomopatogenních hub**

( touto problematikou se zabývala již během svého vysokoškolského studia na VŠZ v Českých Budějovicích, 1985-1994 byla zaměstnána v Entomologickém ústavu AV ČR, kde pokračovala ve studiu entomopatogenních hub v rámci své disertační práce pod vedením prof. J. Weisera a dr. M. Kučery na Oddělení patologie hmyzu. V letech 1987-1988 absolvovala postgraduální mykologický kurs vedený dr. Fassatiovou a dr. Skalickým na Př. f. UK v Praze).

- **produkce dřevin metodou in vitro**

(od 1994 nastoupila vedoucí Laboratoře biotechnologií v Olešné u firmy Jihočeské lesy České Budějovice a.s., jejím úkolem bylo zařídit laboratoř a navrhnout a zprovoznit aklimatizační sklení, a dále vyvinout kompletní výrobní technologie pro pěstování důležitějších listnatých dřevin - *Prunus avium*, *Ulmus carpinifolia*, *Ulmus glabra*, *Ulmus laevis*, *Tilia cordata*, *Sorbus aucuparia*, *S. torminalis* a *S. domestica*, *Populus tremula*, *Quercus robur* a *Fagus sylvatica* - a okrasných dřevin - *Rhododendron*)

LOR v Olešné je to privátní pracoviště, které bylo zřízeno v roce 2002 a zabývá se základním a aplikovaným výzkumem a poradenskou činností v oblasti biotechnologií použitelných v ochraně rostlin a při záchraně genofondu. Spolupracuje s předními odborníky u nás (Entomologický ústav AVČR v.v.i., VÚLHM, ČZU i dalších vědeckých a výzkumných institucí ČR).

V současnosti jsou na pracovišti realizovány výzkumné práce v oblasti vývoje nových prostředků biologické ochrany před významnými hmyzími škůdci, a to v rámci:

1) Smlouvy o dílo 1/2002 s Lesy České republiky s.p., (projekt 2002-2007): Studium využitelnosti entomopatogenních hub (Deuteromycota) v systému integrované ochrany smrkových porostů proti ploskohřbetce smrkové *Cephalcia abietis* ve stádiu vajíček a prvých instarů;

2) projektu MŠMT (2006-2011): Nové alternativní možnosti regulace klíněnky jírovcové podporující biodiverzitu jejích přirozených nepřátel. Cílem projektu je získat nové poznatky týkající se využitelnosti entomopatogenních hub v ochraně jírovců proti klíněnce *Cameraria ohridella* a ověřit, zda nemají negativní vliv na biodiverzitu jejích parazitoidů.

<http://www.entu.cas.cz/klinenka/>

**Ing. Zdeněk PŘIKRYL**

Katedra ochrany lesa FLD ČZU a Laboratoř vláknitých hub MBÚ AV ČR, v.v.i., Praha

[budikz@seznam.cz](mailto:budikz@seznam.cz)

- **determinace ambrosiových hub**

(vzorky z Papuy Nové Guinee (ze 75 000 km<sup>2</sup> nížinného tropického deštného pralesa), jde o extrakci a výsev hub z brouků a požerků naložených v minerálním oleji. Kultury se následně se morfologicky popisují a určují pomocí genetických metod.(sekvenace je hrazena za pomoci grantu ČZU IG 15/2007).

Novotný, A. et al., 2007. *Low beta diversity of herbivorous insects in tropical forests.*  
Nature 448: 692-695.

- **mykorhiza**

Spolupráce na Slovenském projektu zkoumajícím nspecifické odumírání smrku

Laboratoř biologie hub

(Milan Gryndler, Hana Hršelová, Hana Gryndlerová, Lucie Soukupová, Marie Havránková, Zdeněk Přikryl )

Laboratoř se dále zabývá biologií arbuskulárních mykorhizních hub a interakcemi mezi humusovými látkami a ektomykorhizními houbami a kultivací zejména ektomykorhizních basidiomycetů.

**Mgr. Jana REMEŠOVÁ #**

VULHM, v.v.i., UH Kunovice

[remesova@vulhmuh.cz](mailto:remesova@vulhmuh.cz)

**Ing. Dana SAVICKÁ**

VŠCHT, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 160 00 Praha 6

[dana.savicka@vscht.cz](mailto:dana.savicka@vscht.cz)

**RNDr. Michaela SEDLÁŘOVÁ, Ph.D. #**

Katedra botaniky, Př. f. PU v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 871 Olomouc- Holice

[michela.sedlarova@upol.cz](mailto:michela.sedlarova@upol.cz)

**Mgr. Ludmila SLEZÁKOVÁ**

VURV, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha – Ruzyně

[slezakova@seznam.cz](mailto:slezakova@seznam.cz)

**Mgr. Lucie SOUKUPOVÁ**

MBÚ AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha - Krč

[lucii@email.cz](mailto:lucii@email.cz)

**Bc. Zuzana SUCHÁNKOVÁ**

Katedra botaniky, Př. f. UK, Praha

[wanahcawin@centrum.cz](mailto:wahahcawin@centrum.cz)

**Mgr. Taťána SUMÍKOVÁ**

VURV, v.v.i., Odbor genetiky, šlechtění a kvality produkce, oddělení šlechtitelských metod

Drnovská 507, 161 06 Praha – Ruzyně

[sumikova@vurv.cz](mailto:sumikova@vurv.cz)

- **Molekulární analýza původců fuzariós klasu**

- *Druhová determinace pomocí druhově specifických PCR markerů*
- *Detekce mezidruhové a vnitrodruhové variability pomocí metody AFLP*
- *Stanovení chemotypů produkující nivalenol a deoxynivalenol u druhů *F. culmorum* a *F. graminearum* pomocí PCR markerů*

#### Doktorandské studium

- Česká zemědělská universita, fakulta Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra Ochrany rostlin
- Disertační práce na téma: Studium diversity patogenů rodu *Fusarium* a jejich škodlivost
- Zaměření na variabilitu původců fuzarióz klasu v České republice a stanovení chemotypů
- Sběry z let 2003 – 2006
- Vyhodnocení těchto šetření s výsledky mykologických analýz, studia patogenity a rozborů vzorků zrna na obsah závažných mykotoxinů.
- Disertační práce navazuje na projekty řešené ve VÚRV v.v.i.

#### **Ing. Ivana ŠAFRÁNKOVÁ, Ph.D.**

Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Zemědělská 1, 613 00 Brno – Černá Pole  
[safran@mendelu.cz](mailto:safran@mendelu.cz)

- *uredologie*

#### **doc. RNDr. Alexandra ŠIMONOVICHOVÁ, CSc.**

Katedra pedologie, Pr. f. KU, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava  
[asimonovicova@fus.uniba.sk](mailto:asimonovicova@fus.uniba.sk)

- *izolácia a identifikácia mikroskopických húb z pôdného prostredia*  
(pôdy kontaminované ťažkými kovmi, pôdy poškodené, resp. ovplybnené rôznymi negatívnymi ekologickými faktormi apod.)
- *študium mikroskopických húb v procese akumulácie a sorpcie rôznych kovov z vodného prostredia*
- *izolácia a identifikácia mikroskopických húb z vnútorného prostredia historických budov*  
(drevené plastiky, kamenné objekty, steny, vzduch,...)

#### **doc. Ing. Dana TANČINOVÁ, Ph.D. #**

Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra  
[dana.tancinova@uniag.sk](mailto:dana.tancinova@uniag.sk)

**doc. Ing. Bohumila VOŽENÍLKOVÁ, CSc.**  
ZF JCU, České Budějovice  
[vozenil@zf.jcu.cz](mailto:vozenil@zf.jcu.cz)

- **studium rozšíření a škodlivosti patogenních hub z fytopalogického pohledu**
- **studium výskytu houby *Puccinia perplexans* na *Alopecurus pratensis***  
- v centrální části Šumavy, lokalita Zhůří a to při různém způsobu obhospodařování trvalých travních porostů.
- **studium antagonistické houby *Trichoderma harzianum***  
- v polních maloparcelkových pokusech je aplikována antagonistická houba *Trichoderma harzianum* proti fytopatogenním houbám (*Fusarium spp.*, *Pyrenophora spp.*, *Blumeria graminis*, *Puccinia graminis*, *Ustilago hordei*, *Ustilago avenae* *Tilletia spp.*)
- **makroskopické posouzení zdravotního stavu rostlin během vegetační sezóny**
- **mikrobiální aktivita hub a bakterií na uskladněných zrnech**
- **vliv bioagens na hlavní výnosové prvky**  
(hmotnost tisíce zrn a objemová hmotnost, maloparcelkové pokusy jsou založeny na školním pozemku katedry rostlinné výroby, JU ZF v Českých Budějovicích)

Garant předmětů Obecná Fytopatologie a Zemědělská fytopatologie (ZF JCU České Budějovice)



## PŘEDSTAVENÍ PRACOVIŠŤ

### **Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova Benátská 2, 128 01 Praha 2**

Vybraná témata studia mikroskopických hub:

- ***Mikroskopické houby v asociaci s dřevinami a kůrovci***

Touto tematikou se na našem pracovišti zabýváme již od roku 1991, kdy jsme se v rámci projektu MZe zapojili do řešení problematiky hromadného odumírání dubů, smrků aj. dřevin (O. Fassatiová, V. Skalický, K. Prášil, A. Kubátová, D. Novotný). V letech 1997-99 jsme v rámci grantu GAČRu studovali mikroskopické houby asociované s bělokazem dubovým (K. Prášil, A. Kubátová, D. Novotný). V současné době začínáme studovat endofytické houby na jilmu, kde se kromě askomycetů setkáváme i s bazidiomycety (A. Kubátová, M. Kolařík, K. Prášil).

- ***Saprotrofní půdní houby přirozených stanovišť***

V rámci institucionálních záměrů MŠMT jsme v letech 1999-2004 věnovali pozornost diverzitě vláknitých mikromycetů v půdách vybraných lokalit na Šumavě a v Krkonoších. Navázali jsme tak na náš dřívější výzkum půdních mikromycetů na Šumavě. V současné době bychom měli výzkum dokončit publikací výsledků (A. Kubátová, M. Váňová).

- **Saprotrofní mikromycety antropogenních půd**

V letech 1993-1995 jsme tuto problematiku začali studovat na odkališti Chvaletice (P. Kovář a kol., A. Kubátová, M. Váňová, K. Prášil). V současné době dokončujeme výzkum v rámci projektu MŽP, který volně navazuje na předešlé aktivity a je zaměřen na úlohu biologických půdních krust a roli mikroorganismů (především sinic, řas, lišejníků a mikroskopických hub), které ji tvoří (Z. Soldán, J. Neustupa a kol., A. Kubátová, K. Prášil, P. Bukovská). Výzkum probíhá jak na odkalištích, tak v omezené míře na vybraných výsypkách i přirozených lokalitách.

- **Kontaminanty potravin**

Tato problematika je řešena formou příležitostné spolupráce s pracovníky z praxe, kteří mají zájem o identifikaci zachycených kontaminantů potravin. V poslední době jsem spolupracovala např. s V. Muzikářem (Zdravotní ústav se sídlem v Praze) a různými firmami.

- **Houby z klinických substrátů**

V posledních letech intenzivněji spolupracujeme s lékařskými mykology (např. S. Dobiášová, M. Skořepová, V. Buchta, P. Hamal, K. Mencl) při druhové identifikaci oportunních mikromycetů, izolovaných z klinických substrátů (nehty, pokožka, sputum apod.), které způsobují stále častěji komplikace různých onemocnění.

## **Prezentace NZZ IFCOR – 99, s.r.o. se zaměřením na představení mykologické laboratoře a laboratoře vakcín**

RNDr. Dana Hanuláková  
IFCOR – 99, s.r.o, Viniční 235, 615 00 Brno, Tel.: 533 306 416  
<http://www.ifcor.cz>

NZZ IFCOR – 99, s.r.o. provádí komplexní laboratorní servis: mikrobiologie ( bakteriologie, virologie, mykologie, parazitologie), klinická imunologie, alergologie, hematologie, molekulární diagnostika, genetika.

### **Mykologická laboratoř**

Je zaměřena třemi směry:

- ▶ klinická mykologie
- ▶ mykologie prostředí
- ▶ poradenská činnost v oblasti odstraňování plísní, používání biocidních přípravků

### ***Klinická mykologie***

Růst frekvence mykóz v posledních letech

Rozšiřuje se skupina oportunních patogenů (kvasinky, mikromycety – často vyvolávají závažné mykózy komplikující průběh a léčení řady základních onemocnění)

Jednoduše dělíme mykózy podle typu napadených tkání:

- kůže a její adnexa (dermatomykózy)
- kůže a podkoží (subkutánní mykózy)
- vnitřní orgány (systémové mykózy – některé mohou mít i kožní projevy)

### ***Mykologie prostředí***

V této oblasti můžeme nabídnout:

- odběr vzorků z vnějšího i vnitřního prostředí na mykologické vyšetření
- přesnou identifikaci plísní
- jejich hodnocení z hlediska zdravotní závadnosti

Vyšetřujeme plísně z nejrůznějšího materiálu a prostředí (omítky, podlahy, textil, papír, kůži, plasty, archivní materiály, historické předměty, potraviny, krmiva, ovzduší a další)

Nabízíme rovněž vyšetření při podezření na výskyt dřevokazných hub a napojení na firmy, které se zabývají jejich likvidací

Spolupracujeme s alergology a veterináři

### ***Poradenská činnost***

- Návrhy šetrného postupu při likvidaci plísní
- Sledování spektra schválených biocidních přípravků – poskytování poradenství
- Návrhy preventivních opatření proti nežádoucímu výskytu mikroskopických hub

### **Laboratoř vakcín**

Bakteriální a kvasinkové vakcíny vyráběné v naší laboratoři se používají k terapii recidivujících a chronických infekcí těžko léčitelných antibiotiky a chemoterapeutiky, ale také k preventivní stimulaci imunity.

Připravujeme tři typy pro perorální podávání ve formě kapek:

- ☺ autovakcíny
- ☺ stock vakcíny (univerzální vakcíny)
- ☺ kombinované vakcíny

**Součástí všech služeb je odborná konzultační činnost.**  
a exkrementy bezobratlých, jeskynní substráty, ovzduší atd.

# Katedra mikrobiológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

## Pracovníci v oblasti mykológie mikroskopických húb:

- ❖ doc. Ing. Dana Tančinová, PhD.
- ❖ Ing. Roman Labuda, PhD.
- ❖ Ing. Soňa Felšöciová, PhD.
- ❖ Ing. Mária Dovičičová
- ❖ Ing. Zuzana Piovarčiová

## Pracovné zameranie:

V oblasti mykológie riešime výskumné projekty z nasledujúcich oblastí:

- mykológia potravín (mykotická kontaminácia surovín a potravín rastlinného pôvodu), našou prioritou je štúdium výskytu mikroskopických húb na resp. v obilných zrnách, druhová identifikácia a sledovanie schopnosti izolátov (druhy rodov *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* a *Penicillium*) produkovať vybrané mykotoxíny v podmienkach *in vitro*.
  - **Mykotoxikologické hodnotenie kvality zŕn pšenice (*Triticum aestivum*) domáceho pôvodu s ohľadom na karcinogénne metabolity a ich producentov VEGA 1/3456/06 – projekt koordinovaný na katedre**
- mykológia krmív
- mykológia prostredia
  - **Determination of mold and fungal metabolite prevalence in buildings** (Austrian Research Promotion Agency) – spolupracujeme na riešení projektu s IFA Tulln (Rakúsko)
- mykológia pôdy – prioritné zameranie na keratinolytické a termorezistentné druhy
  - **Biodiverzita pôdných mikroorganizmov v agroekosystémoch VEGA 1/3459/06 - projekt koordinovaný na katedre**

Prioritnou úlohou na našom pracovisku je aj pedagogická činnosť. V súčasnosti sa na našej katedre vyučuje 10 predmetov na bakalárskom a inžinierskom stupni. Problematike mikroskopických húb sa vo vyučovacom procese venujeme vo viacerých predmetoch.

- ❖ Mykológia
- ❖ Úvod do potravinárskej mykológie (vyučovaný v anglickom jazyku)
- ❖ Potravinárska mykológia

Mykologicky zameraný je aj KEGA projekt koordinovaný na našej katedre:

- **Vláknité mikroskopické huby významné vo výučbe predmetov z oblasti potravinárstva a biotechnológie KEGA 3/5080/07**

## Mykologické laboratórium Slovenskej zdravotníckej univerzity

Elena Piecková  
SZU, Limbová 12, 833 03 Bratislava  
elena.pieckova szu.sk

Mykologické laboratórium Slovenskej zdravotníckej univerzity sa venuje predovšetkým **environmentálnej mykológii**. Predmetom štúdia tohto laboratória je široký okruh otázok výskytu a vlastností mikroskopických vláknitých húb, najmä producentov toxických (karcinogénnych) metabolitov a (podmienene) patogénnych a alergizujúcich druhov mikromycét v ovzduší na pracoviskách, v domácnostiach (indoor mycology), vo vodách pitných i povrchových, v prostredí zdravotníckych zariadení, v potravinárskych surovinách, v požívatinách a pod., odkiaľ môžu mikromycéty ohrozovať zdravie a komfort človeka, ale tiež poškodzovať svojou nežiaducou činnosťou užitočné substráty. Od r. 2003 je pracovisko jediným atestovaným laboratóriom pre mykológiu vnútorného prostredia a potravinársku v nových členských štátoch EÚ (certifikáty kvality z Landesgesundheitsamt Baden-Wuerttemberg, Stuttgart, D v polročných intervaloch).

Pracovníci mykologického laboratória sa v tejto súvislosti zaoberajú nasledovnými problémami:

- Diagnostika vláknitých mikromycét.
- Metódy izolácie mikromycét z environmentálnych vzoriek.
- Produkcia mykotoxínov, toxinogénne druhy, prirodzené podmienky produkcie toxínov a podmienky *in vitro*, metódy dôkazu toxinogenity, možnosti degradácie toxických metabolitov, charakteristika producentov, ich vlastnosti, biotop u nás.
- Výskyt a ekológia zdravotne významných a toxinogénnych kmeňov - pôvodcov mykóz, mykotoxikóz, alergií, indikátorov stavu životného prostredia a jeho nežiadúcich znehodnocovateľov.
- Hodnotenie zdravotného, hygienického a environmentálneho významu izolovaných kmeňov.
- Vplyv toxických metabolitov mikromycét na teplokrvné živočíchov *in vitro* na orgánových a tkanivových kulturách, najnovšie aj respiračná toxicita *in vivo*, zber epidemiologických údajov o vplyve mykotoxínov na organizmus človeka, vlastnosti mykotoxínov, výskyt, množstvá, otázky legislatívy a jej zosúladovanie s EÚ.
- Antimycetiká a antimykotiká: výskyt primárne a sekundárne rezistentných mikromycét, metódy testovania citlivosti izolátov mikromycét *in vitro*, interpretácia výsledkov *in vivo* v súvislosti so zvyšujúcim sa výskytom klinických rezistentných kmeňov, účinná dezinfekcia.

Mykologické laboratórium vykonáva expertíznu činnosť (náročná identifikácia mikromycét vzácnějších a zriedkavých druhov od pacientov s mykózami a zo vzoriek z prostredia, chemická analýza – tenkovrstvovou chromatografiou - vybraných mykotoxínov) pre praktické klinické mikrobiologické laboratória, Hlavného hygienika SR a výrobo-obchodné podniky. Identifikácia kmeňov si vyžaduje značné taxonomické vedomosti diagnostikujúcich mykológov v laboratóriu a tiež pomoc priebežne budovanej a aktualizovanej rozsiahlej databázy (viac ako 16 000 separátnych výtlačkov) taxonomickej literatúry na pracovisku. Tento trend ovládania diagnostiky mikroskopických vláknitých húb a objektívneho moderného hodnotenia ich výskytu sa na Slovensku musí udržať. Pracovníci mykologického laboratória (1 samostatný vedecký pracovník, 1 výskumný pracovník, 1

technický pracovník), ktoré je ako jedno z mála mykologických pracovísk v Slovenskej republike na vysokej odbornej úrovni, poskytujú terénnym pracoviskám zdravotníctva a mimo zdravotníctva Slovenska i Čiech sústavne celý rad praktických konzultácií a informácií (o. i. 20 ročníkov pravidelných konzultačných dní Mykologické aktuality; hromadné školiace miesta Slovenskej zdravotníckej univerzity Bratislava Mikroskopické vlákňité huby v životnom prostredí – hygienický význam a riziká; individuálne školiace miesta pre pracovníkov hygienickej služby a iných organizácií; vedecko-populárne osvetové vystúpenia s celoštátnym dosahom). Zodpovední pracovníci sú členmi domácich a zahraničných odborných vedeckých spoločností a výsledky pracoviska sú uznávané v odborných kruhoch celého sveta.

Mykologické laboratórium SZU vykonávalo v rokoch 1982 – 91 činnosť Referenčného laboratória na vyšetovanie mikroskopických húb a mykotoxínov (Vestník MZ SSR, ročník XXIX, čiastka 24 z 30. 12. 1981) ako jediné pracovisko svojho druhu v bývalom Československu.

## **Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v.v.i., Výzkumná stanice Kunovice (útvár reprodukčních zdrojů)**

Činnosti Výzkumné stanice VÚLHM, v.v.i. v Kunovicích jsou v oblasti výzkumu a v oblasti expertní, poradní a informační činnosti orientovány na dvě základní skupiny lesnické problematiky:

### **1. Lesní semářství (Semenářská kontrola, Akreditovaná zkušební laboratoř) (Vedoucí: Zdeňka Procházková, prom. biol., Csc.)**

- **Mgr. Jana Remešová** (výzkumný pracovník, specializace: zdravotní rozbor semen a reprodukčního materiálu lesních dřevin)

#### **Hlavní činnosti:**

- **výzkum** šlechtitelské a ekonomické efektivnosti semenných sadů modřínu opadavého a borovice lesní, studium metod sběru, skladování, předosevní přípravy a zjišťování kvality semen lesních dřevin keřů, vývoj metod hodnocení kvality semenného materiálu lesních dřevin
- **zkoušení kvality** semenného materiálu lesních dřevin národně a mezinárodně akreditovanou zkušební laboratoří "Semenářská kontrola"
- **informační, poradenský a expertní servis** v oblasti lesního semenařství pro vlastníky lesa, státní správu a další subjekty

#### **Činnosti v oblasti mykologie – lesnické fytopatologie:**

- zdravotní rozbor semenného reprodukčního materiálu - neakreditovaná zkouška kvality semen lesních dřevin, zjišťování saprofytických a patogenních hub (*Botrytis cinerea*, *Caloscypha fulgens*, *Ceratocystis Cylindrocarpon*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Ophiostoma*, *Phytophthora cactorum*, *Phomopsis*, *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium*).
- informační činnost v oblasti fytopatologie semen lesních dřevin: informační servis v rámci Lesní ochranné služby (LOS) – např. přílohový leták v Lesnické práci – Z. PROCHÁZKOVÁ, V. PEŠKOVÁ, 12/2006: *Ciboria batschiana* (Zopf) Buchwald – Hlízenka Žaludová, pravidelné informace do Zpravodaje ochrany lesa)
- prostřednictvím Z. Procházkové je pracoviště zapojeno v mezinárodních výzkumných aktivitách ( IUFRO, pracovní skupina 7.03.04 Diseases and Insects in Forest Nurseries)
- zastoupení v České vědecké společnosti pro mykologii ( Z. Procházková, J. Remešová), V České fytopatologické společnosti ( Z. Procházková)

### **2. Šlechtění rychlerostoucích dřevin a záchrana genofondu listnatých dřevin (Rychlerostoucí dřeviny)** (Vedoucí: Ing. Lud'ka Čížková, Ph.D)

- **Ing. Martina Malinová** (výzkumný pracovník, specializace: šlechtění a testování rychlerostoucích dřevin, monitoring zdravotního stavu v klonových archivech topolů)
- **Ing. Jolana Kyseláková** ( výzkumný pracovník, specializace: provenienční výzkum, inventarizace a zachování genových zdrojů listnatých dřevin)

#### **Hlavní činnosti:**

- **výzkumná činnost** (šlechtění rychlerostoucích dřevin; provenienční výzkum dubu, lípy, jasanu, javoru klenu a olše lepkavé; inventarizace a uvažované speciální využití ořešáku)

černého, záchrana populací topolu bílého a černého; záchrana genových zdrojů vzácnějších domácích druhů dubů; selekce, reprodukce a testování populací javoru kleny a olše lepkavé)  
- **klonové archivy listnatých dřevin**, zvláště rodů *Populus* a *Salix*, udržované zejména: pro další šlechtitelské práce, k další reprodukci jako zdroj uznaného testovaného ( 22 kultivarů šlechtěných topolů) a kvalifikovaného ( jednotka topolu černého, jednotka topolu osiky a jednotka vrb) reprodukčního materiálu, k zachování cenných a ohrožených genotypů  
- **informační, poradenský a expertní servis** v oblasti pěstování rychlerostoucích dřevin

#### **Činnost v oblasti mykologie – lesnické fytopatologie:**

- *M. Malinová*: zpracování problematiky zdravotního stavu rychlerostoucích dřevin (především topolů), monitoring zdravotního stavu klonových archivů topolů (např. MALINOVÁ M. (2006): Nejvýznamnější choroby a škůdci topolů.- Les. Práce, 2006, 85:596-597; MALINOVÁ, M.: Topolové rzi rodu *Melampsora* a hodnocení výskytu v klonovém archivu VÚLHM VS Kunovice v letech 2005-6, Zprávy lesnického výzkumu, 2007, č.4, /v řízení/)  
- *J. Kyseláková*: zpracování problematiky zdravotního stavu listnatých dřevin (duby, olše lepkavá, javor klen, ořešák černý), hodnocení zdravotního stavu vybraných populací olše lepkavé

#### **Kontakt:**

VÚLHM, v.v.i., Výzkumná stanice Kunovice

Na Záhonech 601

www.vulhmuh.cz, tel. 572 420 911

e-mail: [malinova@vulhmuh.cz](mailto:malinova@vulhmuh.cz), [kyselakova@vulhmuh.cz](mailto:kyselakova@vulhmuh.cz), [prochazkova@vulhmuh.cz](mailto:prochazkova@vulhmuh.cz), [remesova@vulhmuh.cz](mailto:remesova@vulhmuh.cz)



# Studium patogenity hub na hostitele na bázi oxidačního stresu

HANA LUKŠANOVÁ

**LUKŠANOVÁ, H.: A study of fungal pathogenicity against to host plants on the basis of oxidation stress**  
Proceedings of the MICROMYCO 2007, NOVÁKOVÁ, A. (Ed.): pp. 212-214. ISB BC AS CR, v.v.i., 2007.  
ISBN 978-80-86525-10-5

The level of pathogenicity can be studied by many ways. One of perspective possibilities is study of the production of free radicals. The plant self-protects against pathogen attack by stress reaction. Free oxygen radicals (reactive oxygen species- ROS) are involved in the cellular signalization induced by pathogen. The plant defensiveness against pathogens depends on ROS production and on their subsequent successful disposal due to antioxidative mechanism. Considering high ROS reactivity, they can attack all types of cell components. The Cell damage, as a result of the attack, can be evaluated using series of methods. Moreover, the level of antioxidant protection is observed, too.

**Keywords:** pathogenicity, ROS production, free radicals

Hana Lukšanová, Crop Research Institute, Division of Plant Medicine, Department of Mycology, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Czech Republic. E-mail: [luksanova@vurv.cz](mailto:luksanova@vurv.cz)

\* Presented at workshop MICROMYCO 2007, České Budějovice, September 4-5, 2007.

## Úvod

Rostlina je během svého života vystavována celou řadou nepříznivých vlivů, které ji vážně ohrožují a projevují se zpomalením životní funkce rostliny, poškozením jednotlivých orgánů a úhynem rostliny. Tyto vlivy se nazývají stresové faktory nebo stresory (Procházka et al., 1998). Stav rostliny, která je vystavena stresovým faktorům se označuje stres. Odpověď rostliny na stresové působení záleží na typu stresu, rostliny, intenzitě a délce působení stresoru tzv. adaptační schopnost rostliny (DAT et al., 2000).

Stresorové faktory dělíme na abiotické a biotické. Do skupiny abiotických patří faktory fyzikální a chemické povahy. Biotický stres je způsobený herbivorními živočichy, patogenními mikroorganismy (viry, bakterie, houby) a vzájemným ovlivňováním rostlin. Rostlinná buňka je před atakem mikroorganismů chráněná svou buněčnou stěnou. Především patogenní houby jsou vybaveny lytickými exoenzymy, které buněčnou stěnu narušují a tak dochází k průniku patogenu do hostitelské buňky (PROCHÁZKA et al., 1998; DAT et al., 2000). Průnik či kontakt patogenu s hostitelskou buňkou vyvolá celou řadu koordinačních vnitrobuněčných změn, které vedou k eliminaci působení a šíření patogenu do dalších buněk. Tento způsob ochrany se nazývá hypersenzitivní reakce. Jedná se o typ ochranné nekrózy, při kterém dochází k prudkému zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) a NO (oxidační vzplanutí (oxidative burst)) v místě průniku patogenu a vede tak k zániku patogenu a okolních buněk hostitele (NEILL et al., 2003).

Obranná reakce hostitelské buňky je spuštěna specifickým metabolitem tzv. elicitorem. Během ochranné reakce dochází k aktivaci vhodných genů (stresové proteiny, látky s antibiotickými účinky). K aktivaci nedochází přímo elicitory, ale pomocí tzv. signálových přenašečů (2. posílů). Nejčastějšími a nejrychlejšími přenašeči a aktivátory genové exprese jsou ROS, a to převážně superoxid a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAT et al., 2000; MLÍČKOVÁ et al., 2003).

Změny v hostitelské buňce, které vedou ke zvýšení odolnosti vůči stresovým faktorům je tvorba ROS. Vzhledem k tomu, že ROS jsou velice reaktivní a poškozují všechny typy molekul v buňce, je nutné pro zvýšenou odolnost rostlinné buňky i účinné odstraňování ROS.

Rovnováha mezi tvorbou a odstraňováním ROS v buňce je řízena antioxidačním mechanismem, který zahrnuje jak antioxidační enzymy, tak nízkomolekulární látky. Jestliže je tato rovnováha porušena dochází k oxidačnímu stresu (BLOKHINA et al., 2000; DAT et al., 2000; MLÍČKOVÁ et al., 2003).

### **Metody stanovení míry patogenity na bázi oxidačního stresu**

Míru patogenity na hostitelkou buňku lze určit pomocí míry poškození buněčného materiálu ROS či studiem změn antioxidačního mechanismu.

Nejčastěji sledované markery působení ROS na lipidy při tzv. peroxidaci lipidů jsou malondialdehyd (MDA) (Munné-Bosch and Peñuelas, 2003), lipofuscinoïdní pigmenty (LFP) a aldehydy (WILHELM et al., 2006; WILHELMOVÁ et al., 2006a).

Míra poškození proteinů pomocí ROS se určuje detekcí karbonylů (SKOUMALOVÁ et al., 2003) a stupně oxidace a nitrace proteinů (SKOUMALOVÁ et al., 2003; WILHELMOVÁ et al., 2006b).

Detekcí 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu je většinou určována míra poškození DNA reaktivními formami kyslíku (KASAI, 1997). Navíc, pomocí kometového testu lze určit jedno- a dvojřetězové zlomy DNA (GICHNER, 2000).

Antioxidační mechanismus lze sledovat na několika úrovních.

Účinnost ochrany buňky před reaktivními formami kyslíku pomocí antioxidačních enzymů (katalasa, askorbát oxidasa, glutathionreduktasa, superoxid dismutasa atd.) se sleduje jak pomocí aktivity jednotlivých enzymů tak určením jejich kvantitativního zastoupení (DUTILLEUL et al, 2003; HODGES et al., 1997).

Dalším ze sledovaných parametrů je zastoupení hydrofobních nízkomolekulárních antioxidantů a to  $\alpha$ -tokoferolu (WILHELM et al., 2006; MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS, 2003) a  $\beta$ -karotenu (MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS, 2003). U hydrofilních nízkomolekulárních antioxidantů askorbátu a glutathionu se kromě kvantitativního zastoupení určuje i zastoupení jejich redukované formy (MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS, 2003; DUTILLEUL et al, 2003).

Změny funkce fotosyntézy lze určit ze zastoupení chlorofylu *a* a *b* a pigmentů xantofylového cyklu, který chrání fotosyntetický aparát před nadměrnou tvorbou ROS (MUNNÉ-BOSCH & PEÑUELAS, 2003; SUNKAR et al., 2003).

Pomocí DPPH stanovení lze určit celkovou antioxidační aktivitu ve vybraných extraktech (FAYAZ et al., 2005).

Navíc lze přímo detekovat hladinu ROS v buňce (DUTILLEUL et al, 2003; MLÍČKOVÁ et al., 2003).

### **Cíl práce**

Cílem práce je studium patogenity čtyř izolátů *Macrophomina phaseolina* na slunečnici na bázi oxidačního stresu. Pomocí sledování poškození buněčného materiálu volnými radikály a změn antioxidačního mechanismu v buňce určit míru patogenity jednotlivých izolátů a zároveň adaptační schopnost rostliny na vybrané izoláty *Macrophomina phaseolina*. Navíc pomocí aktivity celulólytických enzymů určit průchodnost jednotlivých izolátů *Macrophomina phaseolina* do hostitelské buňky.

### **Přehled literatury**

- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., VAN MONTANU, M., INZÉ, D., VAN BREUSEGEM, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-795.
- DUTILLEUL, C., GARMIER, M., NOCTOR, G., MANHIEU, C., CHÉTRIT, P., 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15: 1212-1226.
- FAYAZ, M., NAMITHA, K. K., CHIDAMBARA MURTHY, K. N., MAHADEVA SWAMY, M., SARADA, R., KHANAM, S., SUBBARAO, P. V., RAVISHANKAR, G. A., 2005. Chemical of *Kappaphycus alvarezzi* (Doty). *J. Agri. Food Chem.* 53: 792-797.
- GICHNER, T., PTÁČEK, O., STAVREVA, D. A., WAGNER, E. D., PLEWA, M. J., 2000. A comparison of DNA repair measured by the Comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mut. Res.* 470: 1-9.
- HODGES, D. M., ANDREWS C. J., JOHNSON D. A., HAMILTON R. I., 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot.* 48: 1105-1113.
- KASAI, H., 1997. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mut. Res.* 387: 147-163.
- MLÍČKOVÁ, K., SEDLÁŘOVÁ, M., LUHOVÁ, L., PEČ, P., LEBEDA, A., 2003. Histochemické metody stanovení patologických změn v listech rostlin v průběhu patogeneze biotrofních houbových parazitů. *Biol. Listy* 68(3): 212-219.
- MUNNÉ-BOSCH, S., PEÑUELAS, J., 2003. Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. Grown under mediterranean field conditions. *Ann. Bot.* 92: 385-391.
- NEILL, S. J., DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159: 11-35.
- PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., (Eds.) 1998. *Fysiologie rostlin.* Academia Praha.
- SKOUMALOVÁ, A., ROFINA, J., SCHWIPPELOVÁ, Z., GRUYS, E., WILHELM, J., 2003. The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. *Exp. Gerontol.* 38 (6): 711-719.
- SUNKAR, R., BARTELS, D., KIRCH, H. H., 2003. Overexpression of stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J.* 35: 452-464.
- WILHELM, J., FUKSOVÁ, H., SCHWIPPELOVÁ, Z., VYTÁŠEK, R., PICHLOVÁ, A., 2006. The effects of reactive oxygen and nitrogen species during yeast replicative ageing. *Biofactors* 27: 185-193.
- WILHELMOVÁ, N., DOMINGUES, P. M. D. N., SRBOVÁ, M., FUKSOVÁ, H., WILHELM, J., 2006a. Changes in nonpolar aldehydes in bean cotyledons during ageing. *Bio. Plant.* 50 (4): 559-564.
- WILHELMOVÁ, N., FUKSOVÁ, H., SRBOVÁ, M., MIKOVÁ, D., KUTINOVÁ, Z., PROCHÁZKOVÁ, D., VYTÁŠEK, R., WILHELM, J., 2006b. The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *Biofactors* 27: 203-211.