

Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2008

České Budějovice, 2.-3. září 2008

**Proceedings of the workshop MICROMYCO 2008
held in České Budějovice, Czech Republic, September 2.-3., 2008**

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

2008

Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2008

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

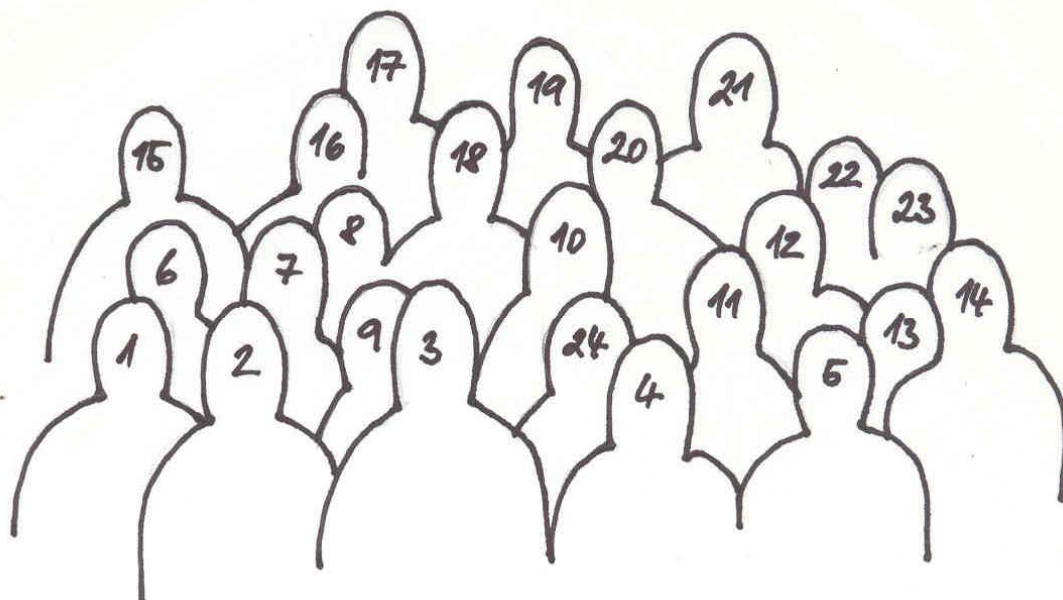
Fotografie na přední straně: *Phycomyces nitens* Kunze, kolumela, zvětšení 12,5 x 20

© A. Nováková

© Ústav půdní biologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i., 2008

ISBN 978-80-86525-12-9





1- Alena Kubátová, 2 – Michaela Sedlářová, 3 – Ondřej Koukol, 4 – Alena Nováková, 5 – Karel Prášil, 6 – Tereza Konvalinková, 7 – Zuzana Kolářová, 8 – Kristýna Černá, 9 – Martina Hujslová, 10 – Dana Tančinová, 11 – Mária Dovičičová, 12 – Zuzana Piovarčiová, 13 – Dana Savická, 14 – Jana Šimková, 15 – David Novotný, 16 – Alexandra Šimonovičová, 17 – Božena Jandová, 18 – Miroslav Kolařík, 19 – Dana Jurčová, 20 – Zdeněk Landa, 21 – Blanka Lašťovičková, 22 – Eva Prenerová, 23 – Soňa Felšöciová, 24 – Jaroslava Marková

Obsah

program workshopu	1
ČERNÁ, K., KOUKOL, O., MOUREK, J., JANKOVSKÝ, Z.: The effect of oribatid mites on the sporulation of <i>Sympodiella acicola</i> and <i>Fusicladium pini</i> species	3
DOVIČIČOVÁ, M., TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S.: A study of species of <i>Eurotium herbariorum</i> group isolated from wheat of Slovak origin	4
FELŠÖCIOVÁ, S., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., PIOVARČIOVÁ, Z., DOVIČIČOVÁ, M. – The occurrence of <i>Penicillium</i> spp. on wheat grains harvested in Slovakia during the season 2007.....	13
HEJNÁ, M., KOLAŘÍK, M., MARKOVÁ, J.: Molecular analysis of grass rust fungi having aecia on <i>Ranunculus</i> and <i>Ficaria</i>	24
HUJSLOVÁ, M., KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., CHUDÍČKOVÁ, M.: Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in National Natural Reserve Soos, Czech Republic.....	25
KOLÁŘOVÁ, Z.: Diversity and function of microscopic fungi in <i>Picea abies</i> litter.....	27
KOUKOL, O.: Microfungal diversity and interactions in needle-leaved litter.....	28
KUBÁTOVÁ, A.: News in the taxonomy of <i>Aspergillus</i> (minireview dealing with increasing species diversity).....	29
LANDA, Z., BOHATÁ, A., ŠIMKOVÁ, J.: Monitoring of entomopathogenic fungi associated with spruce bark beetle <i>Ips typographus</i> L. (Coleoptera, Scolytidae) at National Park and Protected Landscape Area Šumava.....	39
NOVÁKOVÁ, A.: Phytophagous mites – a danger for mycological laboratories.....	40
NOVÁKOVÁ, A.: Microscopic fungi in indoor air in reconstructed and unreconstructed houses in České Budějovice.....	45
NOVÁKOVÁ, A., LUPTAČÍK, P., KOVÁČ, L., LUKEŠOVÁ, A., ŠUSTR, V.: Microscopic fungi as food of cave invertebrate animals – a laboratory food preference experiment.....	52
NOVÁKOVÁ, A.: Interesting records of microscopic fungi.....	58
NOVOTNÝ, D., KRÁTKÁ, J. – The characteristic of <i>Colletotrichum acutatum</i> strains isolated in the Czech Republic.....	63
PIOVARČIOVÁ, Z., TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., FELŠÖCIOVÁ, S.: Rare micromycetes genera on wheat grain of Slovak origin.....	69
PRÁŠIL, K.: Some results from the study of anamorph genus <i>Cladosporium</i> Link presented in journal Studies in Mycology vol. 58 (2007).....	77
PRÁŠIL, K., SUCHÁNKOVÁ, Z.: A study of saprophagous lignicolous ascomycetes diversity in NP Libický luh.....	78
PRENEROVÁ, E., ZEMEK, R., WEYDA, F. - The first records of entomopathogenic fungi <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Isaria fumosorosea</i> (syn. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>) on the hibernating pupae of the horse chestnut leaf-miner <i>Cameraria ohridella</i> (Lepidoptera: Gracillariidae).....	79
SAVICKÁ, D., PAZLAROVÁ, J., RŮŽIČKOVÁ, H., DEMNEROVÁ, K. – Isolation and identification of yeasts from food samples.....	80
SEDLÁŘOVÁ, M., STOJASPAL, K., LEBEDA, A.: Biology, distribution and pathogenicity of <i>Plasmopara halstedii</i> in the Czech Republic.....	82
ŠIMONOVICHOVÁ, A., PANGALLO, D., CHOVANOVÁ, K., DE LEO, F., URZI, C.: Microscopic fungi on St. Ladislav fresco in church of St. Catharine in Velká Lomnica village.....	87
TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S.: Interesting findings of fungi from Slovak wheat.....	92
VOŽENÍLKOVÁ, B., KLIMEŠ, F., KOBES, M.: The influence of harvest to occurrence of fungi diseases on grasses in mountain meadows.....	98
VOŽENÍLKOVÁ, B., MOUDRÝ, J., PETERKA, J., ČERMÁK, B.: The occurrence of <i>Fusarium</i> fungi in dependence on cultivar.....	101
seznam účastníků.....	105

Program workshopu

úterý 2.9.			
10:30		ZAHÁJENÍ WORKSHOPU	
10:35	10:50	Alena Nováková	Fytofágní roztoči - noční můra mykologických laboratoří
10:55	11:05	Zdeněk Landa	představení pracoviště
11:05	11:30	Zdeněk Landa	Informace o projektu <i>Beauveria bassiana</i> versus lýkožrout smrkový (<i>Ips typographus</i> L.)
11:30	11:55	Zdeněk Landa a Andrea Bohatá	Monitoring výskytu a cílené využívání entomopatogenních hub přirozeně asociovaných s populacemi lýkožrouta smrkového <i>Ips typographus</i> L. (Coleoptera: Scolytidae) ve smrčinách NP a CHKO Šumava
11:55	12:15	Zdeněk Landa – diskusní fórum	Jaká je definice kmenu mikroskopických hub?
12:30	13:00	OBĚD	
13:00	13:30	PŘESTÁVKA NA KÁVU	
13:30	14:35	POSTER SESSION	
14:35	15:00	Dana Tančinová a kol.	Zaujímavé nálezy mikromycét na pšenici slovenského pôvodu
15:00	15:25	Soňa Felšöciová a kol.	Výskyt <i>Penicillium</i> spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2007
15:25	15:50	Zuzana Piovarčiová a kol.	Zriedkavé rody mikromycét na pšenici slovenského pôvodu
15:50	16:15	Mária Dovičičová, Dana Tančinová, Zuzana Piovarčiová	Štúdium vlastností rodu <i>Eurotium</i> zo pšenice slovenského pôvodu
16:15	17:00	PŘESTÁVKA NA KÁVU, POSTER SESSION	
17:00	17:25	Alexandra Šimonovičová	Mikroskopické huby izolované z fresky o sv. Ladislavovi v kostole sv. Kataríny vo Veľkej Lomnici
17:25	17:50	Alena Nováková	Mikroskopické houby v ovzduší bytů v rekonstruovaných a v nerekonstruovaných domech v Českých Budějovicích
17:50	18:15	Karel Prášil	koncepce MICROMYCO - diskuse
19:00		SPOLEČNÁ VEČEŘE – GRILOVÁNÍ	

středa 3.9.			
8:30	8:40	Ondřej Koukol	představení pracovní skupiny
8:40	9:05	Zuzana Kolářová	Diverzita a funkce saprotrofních mikroskopických hub na opadu <i>Picea abies</i>
9:05	9:30	Kristýna Černá	Vliv pancířníků na sporulaci druhů <i>Sympodiella acicola</i> a <i>Fusicladium pini</i>
9:30	9:55	Ondřej Koukol	Diverzita a interakce mikroskopických hub v opadu jehličnatých dřevin
9:55	10:20	Alena Nováková a kol.	Mikroskopické houby jako potrava jeskynních bezobratlých živočichů - laboratorní pokus potravní preference
10:20	10:45	PŘESTÁVKA NA KÁVU	
10:45	11:15	Alena Kubátová	Nové poznatky v taxonomii rodu <i>Aspergillus</i>
11:15	11:45	Karel Prášil	Co přinesly nové studie anamorfního dematiového rodu <i>Cladosporium</i> ? (review)
11:45	12:10	Karel Prášil a Zuzana Suchánková	Příspěvek k poznání diverzity saprotrofních lignikolních askomycetů PR Libický luh
12:10	12:25		diskuse
12:30	13:00	OBĚD	
13:05	13:30	Michaela Sedlářová	Plíseň slunečnicová v ČR
13:30	13:55	David Novotný, Jiřina Krátká	Charakteristika kmenů <i>Colletotrichum acutatum</i> izolovaných v České republice
13:55	14:15	Alena Nováková	Zajímavé nálezy mikromycetů
14:15	15:00	KÁVA, VŠEOBECNÁ DISKUSE	
15:00		UKONČENÍ WORKSHOPU	

POSTERY

Markéta Hejná, Miroslav Kolařík, Jaroslava Marková	Travní rzi s aecii na <i>Ranunculus</i> a <i>Ficaria</i> – bude upřesněno
Dana Savická a kol.	Izolace a identifikace kvasinek z potravinářských vzorků
Martina Hujšlová a kol.	Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in National Natural reserve Soos, Czech Republic
Bohumila Voženílková, B. Moudrý, J. Peterka	Výskyt hub rodu <i>Fusarium</i> na amarantu v závislosti na odrůdě
Bohumila Voženílková, F. Klimeš, M. Kobes	Vliv sklizně na výskyt houbových chorob u trav v horských loukách
Eva Prenerová, R. Zemek, F. Weyda	Nález entomopatogenních deuteromycet <i>Beauveria bassiana</i> a <i>Isaria fumosorosea</i> (syn. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>) na přezimujících kuklách klíněnky jírovcové <i>Cameraria ohridella</i> (Lepidoptera : Gracillariidae)

Vliv pancířníků na sporulaci druhů *Sympodiella acicola* a *Fusicladium pini*

KRISTÝNA ČERNÁ, K., ONDŘEJ KOUKOL, JAN MOUREK, ZDENĚK JANKOVSKÝ

ČERNÁ, K., KOUKOL, O., MOUREK, J., JANKOVSKÝ, Z. : The effect of oribatid mites on the sporulation of *Sympodiella acicola* and *Fusicladium pini* species.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 3. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Interakce mezi pancířníky a saprotrófními houbami jsou již dlouho studovány, avšak ne zcela objasněny. Pancířníci konzumují především tmavé anamorfní askomycety a zároveň na svém povrchu i uvnitř trávícího traktu rozšiřují jejich spory. V pokusu *in vitro* jsme nechali borovicové jehlice rovnoměrně porůst modelovými druhy hub a sledovali, jaký vliv má okus pancířníků na jejich sporulaci. Jako modelové druhy pancířníků byly vybrány *Spatiodamaeus verticillipes* a *Porobelba spinosa*, což jsou běžné druhy v opadu. Použité modelové druhy hub *Sympodiella acicola* a *Fusicladium pini* jsou houby rostoucí na povrchu borovicových jehlic v opadu, tudíž jsou nejvíce vystaveny okusu pancířníků. Vliv pancířníků byl stanoven pomocí výsevu suspenze po otřepání jehlic ve sterilní vodě na sladidlové médium. Počty CFU z okusovaných jehlic byly srovnány s počty z kontrolních jehlic. Okus hub pancířníky neměl v průběhu pokusu (3 týdny) pozitivní vliv na počet CFU a tudíž na sporulaci hub. Naopak, intenzivní spásání hub pancířníky způsobilo pokles počtu spor v čase. Na druhou stranu, vzrostl počet CFU z různých druhů hub přinesených na povrchu pancířníků. Je tedy patrné, že konzumace hub a rozšiřování jejich spor ovlivňuje prostorovou distribuci hub v půdě. Do budoucnosti zbývá objasnit, zda snížení počtu pancířníků v pokusu může mít pozitivní vliv na sporulaci.

The interactions between oribatid mites and saprotrophic fungi have been studied for a long time, however there are still many questions to elucidate. Oribatid mites consume dark anamorphic fungi and spread fungal spores. In our test *in vitro* the pine needles were precolonized by model fungal species *Sympodiella acicola* and *Fusicladium pini* colonizing the surface of pine litter needles and thus exposed to consummation by oribatid mites. Needles were then offered to oribatid mites *Spatiodamaeus verticillipes* and *Porobelba spinosa* (common species from forest litter) in Petri dishes. Then we determined the number of CFU after needle were shaken in sterile water and the suspension of spores was inoculated on the malt agar medium. The effect of oribatid mites on sporulation of the model fungi was compared with control without mites. The model oribatid mites were *Spatiodamaeus verticillipes* and *Porobelba spinosa*, which are. Intensive consummation by mites caused a decrease of CFU. On the other hand, CFU of allochthonous fungi originating from mite surface increased. It seems that dispersion and consummation of spores by oribatids influence the space distribution of fungi in the soil. Further experiment will show whether lower number of mites may have positive effect.

Keywords: oribatid mites, *Sympodiella acicola*, *Fusicladium pini*

Kristýna Černá, K., Ondřej Koukol, Zdeněk Jankovský, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 43 Praha 2. E-mail: o.koukol@seznam.cz
Jan Mourek, Department of Zoology, Faculty of Sciences, Charles University, Viničná 7, 128 43 Praha 2, Charles University, Faculty of Education, Department of Biology and Environmental Education, M. D. Rettigové 4, 116 39 Praha 1

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Štúdium druhov skupiny *Eurotium herbariorum* izolovaných zo pšenice slovenského pôvodu

MÁRIA DOVIČIČOVÁ, DANA TANČINOVÁ, ROMAN LABUDA, ZUZANA PIOVARČIOVÁ, SOŇA FELŠÖCIOVÁ

DOVIČIČOVÁ, M., TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S.: A study of species of *Eurotium herbariorum* group isolated from wheat of Slovak origin.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 4-12. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

In this experiment, supportive cultivation characteristics for identification of species in *Eurotium herbariorum* group were assessed. A total of 24 *Eurotium* isolates previously assigned to *E. herbariorum* sensu lato was cultivated on Czapek yeast extract agar (CYA) supplemented with sucrose (up to 20 and 40 %) and sodium chloride (5 and 20 %) at three different temperatures in darkness. Macroscopic characteristics were monitored on the 7th and the 14th day of cultivation and isolates were grouped into 4 groups. The group 1 with total of 13 isolates was assigned to *E. repens* and the group 2 with total of 7 isolates to *E. rubrum*. A total of 3 isolates from the group 3 were not determined to species level. The single isolate from the group 4 was *E. c.f. cristatum*. Parallel cultivation on CYA with 20 % sucrose at 25 and 30 °C with recording of characteristics on the 7th and the 14th day seemed to give certain distinguishing characteristics for eurotia in *E. herbariorum* group.

Keywords: *Eurotium herbariorum* group, wheat grain, Slovakia

Mária Dovičičová, Dana Tančinová, Zuzana Piovarčiová, 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: maria.dovicicova@uniag.sk;

Roman Labuda, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic and Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Eurotium repens de Bary a *E. rubrum* König, Spieckermann & Bremer patria medzi najbežnejšie sa vyskytujúce druhy rodu *Eurotium* Link : Fr. (PITT et HOCKING, 1999). Spolu s *E. herbariorum* Link sú blízko príbuzné (PITT et HOCKING, 1999; KLICH, 2002) a navzájom podobné. Označujú sa aj ako skupina *E. herbariorum* sensu lato (Butinar et al., 2005). Ich samostatná identita bola v minulosti niektorými autormi - napr. DOMSCH et al. (1980) - negovaná (KLICH, 2002; BLASER, 1974/75). V súčasnosti sú akceptované ako tri samostatné druhy (<http://www.indexfungorum.org>), čo potvrdzujú aj molekulárne štúdie napr. GHERBAWY (2001). Druhovú identifikáciu *E. repens*, *E. rubrum* a *E. herbariorum* na základe morfológických vlastností môže byť obtiažna (KUBÁTOVÁ et al., 2000). S týmto problémom sa stretávajú aj autori pri mykologických vyšetreniach zrna potravinárskej pšenice, ktoré ako komodita s nízkou vodnou aktivitou predstavuje substrát prirodzene osídľovaný xerofilnými euróciami. V nadväznosti na uvedené bolo hlavným cieľom prezentovaného pokusu nájsť pomocný kultivačný znak na odlíšenie druhov *Eurotium repens*, *E. rubrum* a *E. herbariorum*.

Materiál a metodika

Vybrané izoláty rodu *Eurotium* Link : Fr. boli získané ako súčasť endogénnej mykocenózy povrchovo vysterilizovaného zrna pšenice* dopestovanej na Slovensku, zistenej

počas mikrobiologického vyšetrenia vzoriek odobraných zo skladov. Charakterizované izoláty sú uchovávané ako kmene v zbierke vláknitých mikroskopických húb na Katedre mikrobiológie Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre; Tab. 1.

*izolácia podľa HOCKING et al. (2006); izolačné médiá: DRBC agar s dichloranom, chloramfenikolom a Bengálskou červenou (Merck, Nemecko) a DYSG agar s dichloranom, chloramfenikolom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom (LUND et FRISVAD, 2003).

Tab. 1. Pôvod študovaných izolátov rodu *Eurotium* Link:Fr., v súčasnosti evidovaných ako kmene v zbierke vláknitých mikroskopických húb na Katedre mikrobiológie FBP SPU v Nitre.

Kmeň	Druh pšenice, odroda resp. označenie, lokalita, rok žatvy, spôsob hospodárenia
MD 13	<i>Triticum aestivum</i> L., 10/NR/06, 2006, tzv. ekologické
MD 86	<i>Triticum aestivum</i> L., Axis, Oponice, 2007, tzv. konvenčné
MD 119	<i>Triticum aestivum</i> L., Ilias, Martin, 2007, tzv. konvenčné, bezfungicídne
MD 123	<i>Triticum aestivum</i> L., Karolinum I, Veľké Lovce, 2007, tzv. konvenčné
MD 142	<i>Triticum aestivum</i> L., Axis, Oponice, 2007, tzv. konvenčné
MD 154	<i>Triticum aestivum</i> L., MV Vekni, Martin, 2007, tzv. konvenčné, bezfungicídne
MD 182	<i>Triticum aestivum</i> L., Bosorka, Martin, 2007, tzv. konvenčné, bezfungicídne
MD 196	<i>Triticum aestivum</i> L., Bosorka, Martin, 2007, tzv. konvenčné, bezfungicídne
MD 199	<i>Triticum aestivum</i> L., Bosorka, Martin, 2007, tzv. konvenčné, bezfungicídne
MD 214	<i>Triticum aestivum</i> L., 10/NR/07, Martin, 2007, tzv. ekologické
MD 225	<i>Triticum aestivum</i> L., 10/NR/07, Martin, 2007, tzv. ekologické
MD 235	<i>Triticum aestivum</i> L., MV Suveges, Komárno, 2007, tzv. ekologické
MD 242	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 247	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 250	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 258	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 277	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 283	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 285	<i>Triticum spelta</i> L., Ceralio, Stará Ľubovňa, 2007, tzv. ekologické
MD 395	<i>Triticum aestivum</i> L., 10/NR/07, Martin, 2007, tzv. ekologické
MD 399	<i>Triticum aestivum</i> L., 10/NR/07, Martin, 2007, tzv. ekologické
MD 401	<i>Triticum aestivum</i> L., Banquet, Oponice, 2007, tzv. konvenčné
MD 415	<i>Triticum aestivum</i> L., 9/NR/07, Nitra, 2007, tzv. ekologické
MD 416	<i>Triticum aestivum</i> L., 9/NR/07, Nitra, 2007, tzv. ekologické

Celkovo 22 izolátov prvotne zaradených do skupiny *Eurotium herbariorum* sensu lato a 2 singulárne kmene *E. repens* (MD 86) a *E. rubrum* (MD 123) boli trojbodovo naočkované a kultivované v 90 mm plastových Petriho miskách v tme 14 dní. Ako kultivačné médium bol použitý Czapek agar s kvasničným extraktom (CYA, KLICH (2002)), v ktorom bola vodná aktivita znížená prídavkom sacharózy (20 a 40 %) a chloridu sodného (5 a 20 %). Výber kultivačných médií a teplôt (obr. 1) s výnimkou média CYAS20 bol urobený na základe výsledkov kultivácie druhov rodu *Eurotium* podľa schémy navrhutej prof. Frisvadom (FRISVAD, osobná komunikácia). CYAS20 bolo zaradené pokusne.

Kultivačné médium	Kultivačná teplota		
	25 °C	30 °C	37 °C
CY20S (CYA ¹ s 20 % sacharózy)	●	●	
CY40S (CYA ¹ so 40 % sacharózy)			●
CYAS ² (CYA ¹ + 5 % NaCl ³)	●		
CYAS20 (CYA ¹ + 20 % NaCl ³)	●	●	●

¹ Czapkov agar s kvasničným extraktom; KLICH (2002)

² FRISVAD et SAMSON (2004)

³ chlorid sodný

● použitá kombinácia

Obr. 1. Schéma použitých kombinácií kultivačných médií a teplôt.

Výsledky a diskusia

Izoláty boli po 7 dňoch kultivácie na základe makroskopicky pozorovanej podobnosti (veľkosť kolónie, intenzita sporulácie, výsledné zafarbenie) na CY20S pri 25 a 30 °C zoskupené do štyroch skupín. **Skupinu 1** tvorilo 13 izolátov vrátane kmeňa *E. repens* (MD 86). Rast a sporulácia na CY20S boli porovnateľne intenzívne pri oboch teplotách. Kolónie pokrývali takmer celý povrch 90 mm Petriho misiek. Farba kolónií bola po 14 dňoch kultivácie tmavo zelená, na miestach s plodnicami svetlo žltá (Tab. 2, Obr. 2). Predbežne sú izoláty skupiny 1 považované za druh *E. repens*.

Tab. 2. Charakteristiky izolátov zaradených do skupiny 1, predpokladaný druh *Eurotium repens*.

kultivačné podmienky	CY20S 25° 7d	CY20S 30° 7d	CYAS20 25° 7d	CYAS20 30° 7d	CYAS20 37° 7d	CY40S 37° 10d	CYAS 25° 14d
kmeň / znak	priemer kolónie [mm]					rast	pigment
MD 86	CM	44	13	17	13	-	-
MD 142	CM	38	13	15	12	-	-
MD 182	CM	35	6	19	14	-	-
MD 196	CM	43	7	20	0	-	-
MD 199	CM	29	14	20	13	-	-
MD 214	○	○	9	13	11	-	-
MD 225	CM	23	11	10	12	-	-
MD 242	41	○	14	12	12	-	-
MD 277	46	○	12	14	12	-	-
MD 285	47	41	12	17	14	-	-
MD 401	42	42	13	19	11	-	-
MD 415	CM	25	8	14	13	-	-
MD 416	○	○	10	13	12	-	-

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom (CYA, KLICH (2002)) a 20 % sacharózy

CYAS20- CYA + 20 % NaCl

CY40S- CYA so 40 % sacharózy

CYAS- CYA + 5 % NaCl

d- deň

CM- kolónie rozrastené po celom povrchu 90 mm Petriho misiek

○- priemer nezistený kvôli nedefinovanému rastu kolónií

- - neprítomnosť sledovaného znaku

Skupinu 2 tvorilo 7 izolátov vrátane kmeňa *E. rubrum* (MD 123). Rast a sporulácia na CY20S boli pri sledovaných teplotách rozdielne. Pri teplote 25 °C bol rast v porovnaní so skupinou 1 slabší, kolónie boli menšie, sporulácia dobrá. Pri teplote 30 °C rástli izoláty skupiny 2 veľmi slabo, veľkosť kolónií bola menšia ako 1 cm a sporulácia bola pozorovaná len v strede kolónií. Kolónie 4 izolátov z tejto skupiny (MD 123, MD 51, MD 258 a MD 283) boli po 14 dňoch kultivácie zafarbené na červeno. Kolónie ďalších troch izolátov boli po 14 dňoch bez prítomnosti červených plôch (Tab. 3, Obr. 3). Predbežne sú izoláty skupiny 2 považované za druh *E. rubrum*.

Tab. 3. Charakteristiky izolátov zaradených do skupiny 2, predpokladaný druh *Eurotium rubrum*.

kultivačné podmienky	CY20S 25° 7d	CY20S 30° 7d	CYAS20 25° 7d	CYAS20 30° 7d	CYAS20 37° 7d	CY40S 37° 10d	CYAS 25° 14d
kmeň / znak	priemer kolónie [mm]					rast	pigment
MD 123	26	○	12	12	0	-	-
MD 235	○	○	10	10	0	-	-
MD 247	28	6	10	13	0	-	-
MD 250	○	○	11	11	0	-	-
MD 258	○	○	13	14	0	-	-
MD 283	○	9	13	13	0	-	-
MD 395	○	9	10	19	0	-	-

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom (CYA, KLICH (2002)) a 20 % sacharózy

CYAS20- CYA + 20 % NaCl

CY40S- CYA so 40 % sacharózy

CYAS- CYA + 5 % NaCl

d- deň

○- priemer nezistený kvôli neusporiadanému rastu kolónií

- neprítomnosť sledovaného znaku

Skupinu 3 tvorili 3 izoláty, ktoré pri kultivačnej teplote 25 °C vytvárali po 7 dňoch stredne veľké a dobre vysporulované kolónie. Pri teplote 30 °C boli kolónie o niečo menšie, ale intenzívne vysporulované. Po 14 dňoch mali kolónie hnedooranžové a hnedočervené plochy. Tieto 3 izoláty boli ponechané ako neurčený druh *Eurotium* sp. (Tab. 4, Obr. 4).

Tab. 4. Charakteristiky izolátov zaradených do skupiny 3, neurčený druh (*Eurotium* sp.).

kultivačné podmienky	CY20S 25° 7d	CY20S 30° 7d	CYAS20 25° 7d	CYAS20 30° 7d	CYAS20 37° 7d	CY40S 37° 10d	CYAS 25° 14d
kmeň / znak	priemer kolónie [mm]					rast	pigment
MD 119	35	○	6	15	2	-	-
MD 154	33	28	8	16	0	-	-
MD 399	○	○	10	14	7	-	-

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom (CYA, KLICH (2002)) a 20 % sacharózy

CYAS20- CYA + 20 % NaCl

CY40S- CYA so 40 % sacharózy

CYAS- CYA + 5 % NaCl

d- deň

○- priemer nezistený kvôli neusporiadanému rastu kolónií

- neprítomnosť sledovaného znaku

Skupinu 4 predstavoval jediný izolát, ktorý intenzitou rastu a sporulácie pripomínal skupinu 3, ale farba kolónií bola svetlejšia, žltohnedá (Tab. 5, Obr. 5). Izolát sa mikroskopicky podobá na *E. cristatum*.

Tab. 5. Charakteristiky izolátu zaradeného do skupiny 4, *Eurotium c.f. cristatum*¹.

kultivačné podmienky	CY20S 25° 7d	CY20S 30° 7d	CYAS20 25° 7d	CYAS20 30° 7d	CYAS20 37° 7d	CY40S 37° 10d	CYAS 25° 14d
kmeň / znak	priemer kolónie [mm]					rast	pigment
MD 13	29	31	9	14	5	-	-

¹ Pitt [11]

CY20S- Czapkov agar s kvasničným extraktom (CYA, KLICH (2002)) a 20 % sacharózy

CYAS20- CYA + 20 % NaCl

CY40S- CYA so 40 % sacharózy

CYAS- CYA + 5 % NaCl

d- deň

- neprítomnosť sledovaného znaku

Ani jeden zo sledovaných izolátov nerástol pri teplote 37 °C na Czapkovom agare s kvasničným extraktom a 40 % sacharózy, čo je v súlade s literatúrou (Butinar et al., 2005). Rovnako nebola pozorovaná tvorba svetlo purpurového pigmentu na CYAS. Na skúšanom kultivačnom médiu s prídavkom 20 % NaCl vytvárali izoláty vo všeobecnosti veľmi nepravidelné kolónie. Pri teplote 25 °C bola sporulácia veľmi slabá, rast a sporulácia boli vo všetkých skupinách najlepšie pri teplote 30 °C a pri teplote 37 °C nerástli izoláty skupiny 2 a izoláty MD 196 a MD 154 (Tab. 2 až 5).

Záver

Na štúdium makroskopických charakteristík eurócií zo skupiny *E. herbariorum* sa na základe získaných výsledkov javí ako najvhodnejšie živné médium CY20S pri paralelnom použití kultivačných teplôt 25 a 30 °C so sledovaním charakteru rastu a sporulácie na 7. a 14. deň. V prezentovanom pokuse bolo z celkového počtu 24 predpokladaných izolátov skupiny *Eurotium herbariorum* na základe makroskopických charakteristík 13 izolátov predbežne určených ako *E. repens*, 7 ako *E. rubrum*, 3 izoláty ostali ako neurčený druh a jeden izolát ako *Eurotium c. f. cristatum*. V ďalšom období budeme pokračovať v sledovaní rastu a sporulácie izolátov *E. herbariorum* sensu lato na uvedenom kultivačnom médiu paralelne pri teplotách 25 a 30 °C, pričom budú sledované aj mikroskopické charakteristiky.

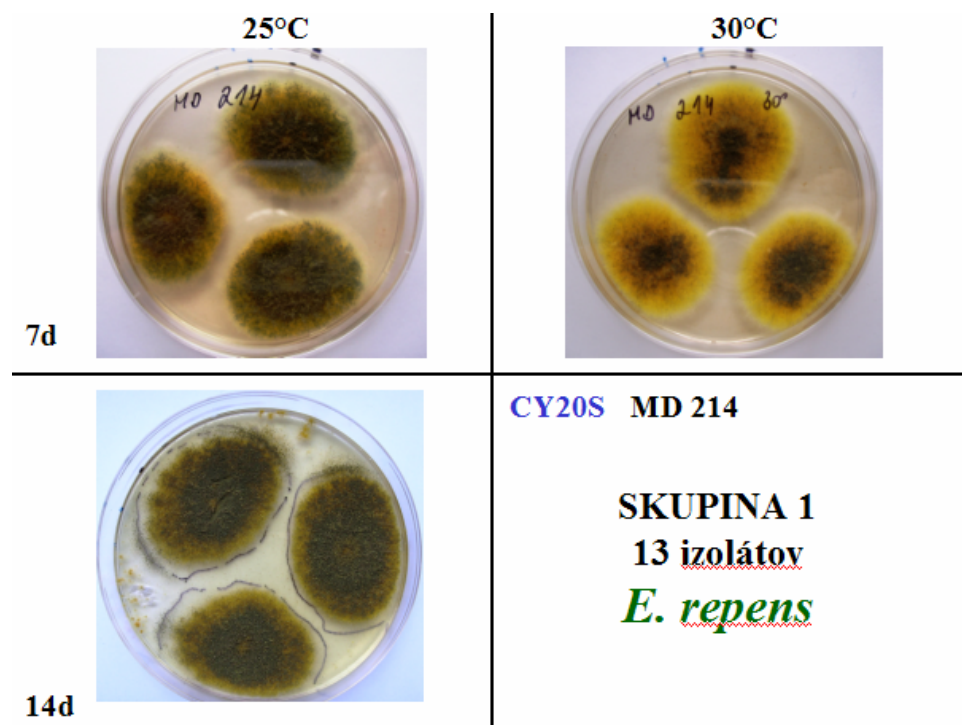
PodĎakovanie

Príspevok vznikol s finančnou podporou projektov VEGA č. 1/3456/2006 a KEGA č. 3/2080/07. Naša vďaka patrí prof. J. C. Frisvadovi (Obr. 6) za cenné rady pri štúdiu eurócií.

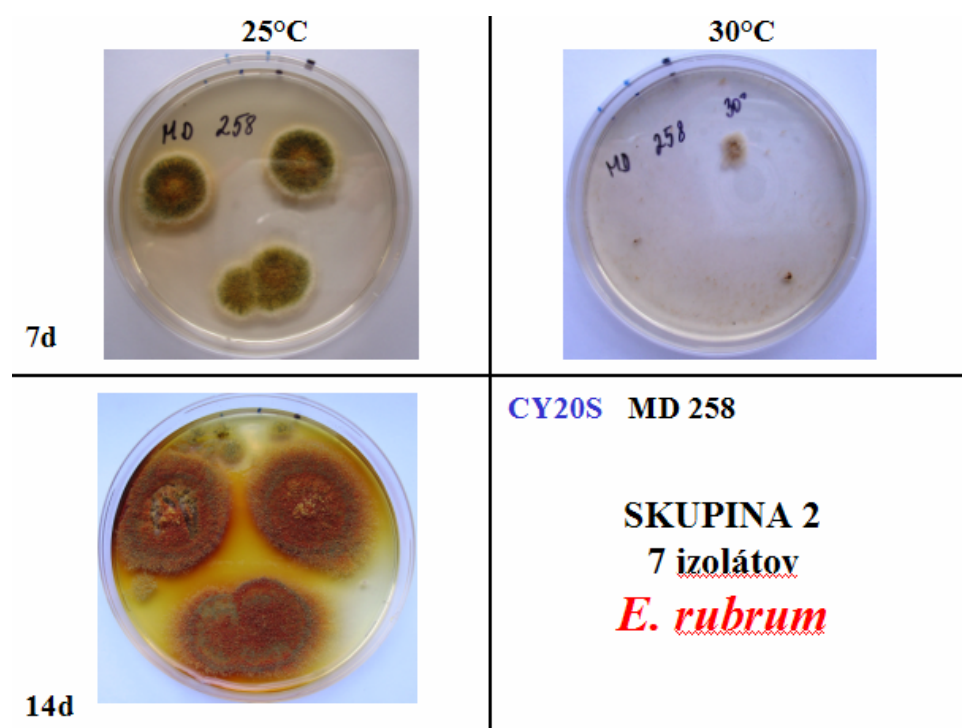
Prehľad použitej literatúry

- BLASER, P., 1974/75. Taxonomische und physiologische Untersuchungen über die Gattung *Eurotium* Link ex Fries. Sydowia 28: 1-49.
- BUTINAR, L., ZALAR, P., FRISVAD, J.C., GUNDE-CIMERMAN, N., 2005. The genus *Eurotium*-members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. FEMS Microbiol. Ecol. 51: 155-166.
- FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Stud. Mycol. 49: 1-173.
- GHERBAWY, Y.A.M.H., 2001. Use of RAPD-PCR to characterise *Eurotium* strains isolated from date fruits. Cytologia 66: 394-356.
- HOCKING, A.D., PITT, J.I., SAMSON, R.A., THRANE, U., 2006. Advances in Food Mycology, vol. 571. Springer, Berlin. 378 p.
- KLICH, M.A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 116 p.
- KUBÁTOVÁ, A., VÁŇOVÁ, M., PRÁŠIL, K., FASSATIOVÁ, O., 2000. Microfungi contaminating foods with low water content. Novit. Bot. Univ. Carol. 13: 13-25.
- LUND, F., FRISVAD, J.C. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. J. Appl. Microbiol. 95: 117-123.
- PITT, J.I., 1985. Nomenclatorial and taxonomic problems in the genus *Eurotium*. In: SAMSON, R.A., PITT, J.I. (Eds.), Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics. Plenum Press, New York and London, pp. 383-396.
- PITT, J.I., HOCKING, A.D., 1999. Fungi and Food Spoilage. An Aspen Publication, Maryland, 593 p.
- <http://www.indexfungorum.org> [cit. 2008-10-10]

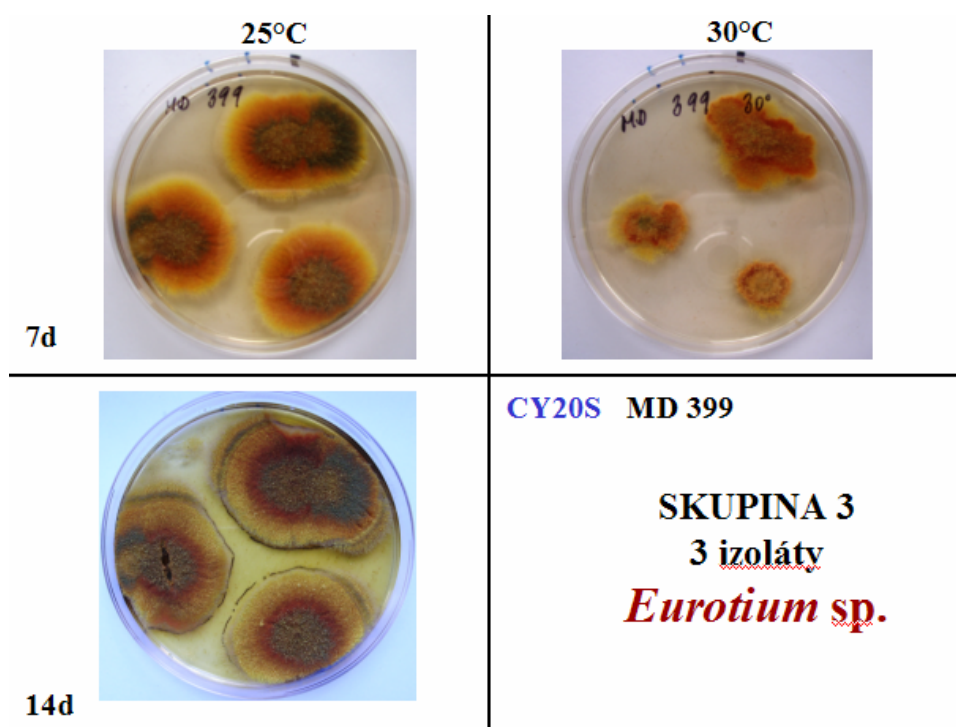
Prílohy



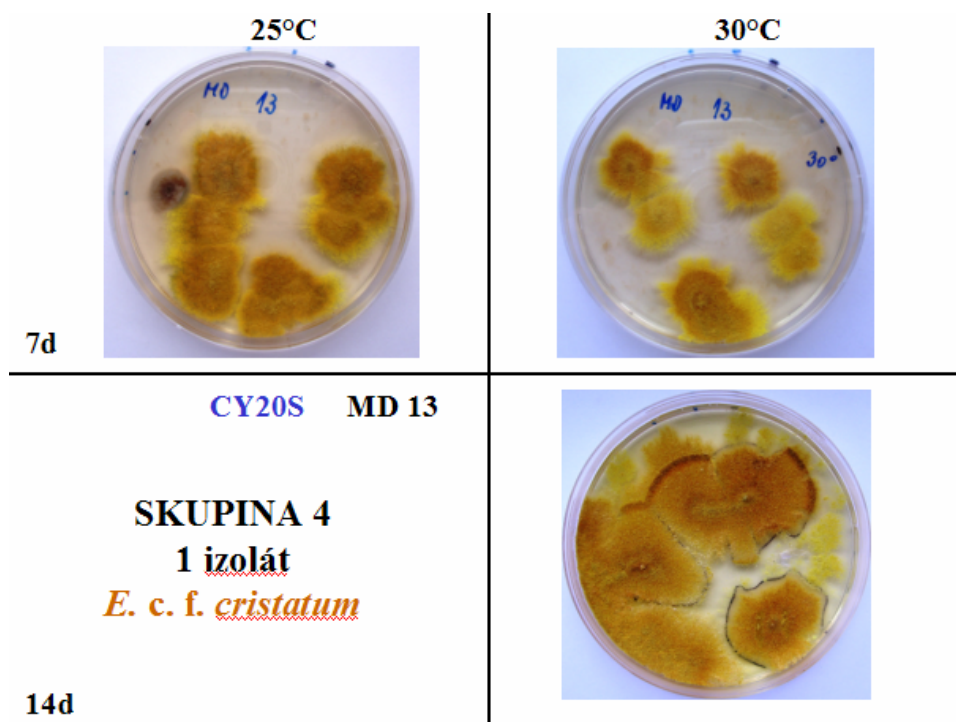
Obr. 2. Skupina 1, predpokladaný druh *Eurotium repens*.



Obr. 3. Skupina 2, predpokladaný druh *Eurotium rubrum*.



Obr. 4. Skupina 3, neurčený druh.



Obr. 5. Skupina 4, *Eurotium c. f. cristatum*.



Obr. 6. (zľava) Jens Christian Frisvad, Mária Dovičíčová, Ulf Thrane, Birgitte Andersen, Ib Søndergaard. BioCentrum DTU, december 2007.

Výskyt *Penicillium* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2007

SOŇA FELŠÖCIOVÁ, ROMAN LABUDA, DANA TANČINOVÁ, ZUZANA PIOVARČIOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ

FELŠÖCIOVÁ, S., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., PIOVARČIOVÁ, Z., DOVIČIČOVÁ, M. – The occurrence of *Penicillium* spp. on wheat grains harvested in Slovakia during the season 2007.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 13-23. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Species of the genus *Penicillium* were surveyed on the wheat samples grown under conditions of conventional agriculture, conventional without fungicide protection and ecological agriculture in the area of the west and the middle Slovakia during the season 2007. Fungal contamination of the grains was analysed in the following ways, as endomycobiota (after surface sterilization), rinsed grains, and meal. The penicillia were recovered from wheat samples by using all isolation procedures. *Penicillium* species from endomycobiota of conventional (9 species of 12) and conventional agriculture without fungicide protection (11 of 18) outnumbered those recovered from rinsed grains and meal. The presence of some mycotoxin producing penicillia (e.g. citrinin, cyclopiazonic acid, griseofulvin, patulin, penitrem A and roquefortin C) was tested by thin layer chromatography *in vitro* condition. Out of 97 isolates screened 93 (97 %) produced at least one mycotoxin.

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

Soňa Felšöciová, Dana Tančinová, Zuzana Piovarčiová, Mária Dovičičová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: sona.felsociova@uniag.sk

Roman Labuda, Katedra mikrobiológie, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Kvalita zrna po žatve je ovplyvnená širokou škálou abiotických a biotických faktorov a študuje sa ako ekosystém uskladneného zrna. Dôležitými faktormi ovplyvňujúcimi kvalitu zrna sú: kontaminácia mikroskopickými hubami, hmyzom, roztočmi a z enviromentálnych faktorov najmä vodná aktivita a teplota. Interakcie medzi týmito faktormi vplývajú na dominanciu húb, obzvlášť mykotoxinogénnych druhov (MAGAN et al., 2003). Klimatické zmeny prebiehajúce za posledné desaťročia vplývajú ako aj na poľné huby, tak aj na skladové huby (REYNERI, 2006). Priaznivé poveternostné podmienky, ako sú výdatné dažde a mierna teplota pred žatvou, môžu prispieť k osídľovaniu saprotrofných alebo oportunistických húb, vrátane toxinogénnych druhov penicilií. Skladové huby, kam patria aj peniciliá, rastú na uskladnenom zrne, ktoré nemá optimálnu vlhkosť pre konzervovanie (LOGRIECO et al., 2003).

Cieľom tejto štúdie, bolo zhodnotiť výskyt izolátov penicilií a frekvenciu ich výskytu v potravinárskej pšenici z konvenčného poľnohospodárstva, z konvenčného poľnohospodárstva bez fungicídnej ochrany a ekologického poľnohospodárstva a izoláty potenciálne toxinogénnych druhov testovať na schopnosť produkovať príslušné mykotoxíny metódou tenkovrstvovej chromatografie.

Materiál a metodika

Vzorky

Analyzované vzorky pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) boli zberané v roku 2007. Celkovo bolo mykologicky vyšetrených 23 vzoriek, pričom 8 pochádzalo z konvenčného poľnohospodárstva, 5 z konvenčného poľnohospodárstva bez fungicídnej ochrany a 10 z ekologického poľnohospodárstva. Vzorky boli dopestované na rôznych lokalitách západného a stredného Slovenska.

Izolácia

Pri zisťovaní povrchovej mykocenózy celého zrna (oplach) a mykocenózy šrotovaného zrna bola použitá platňova zried'ovacia metóda. Očkovali sme povrchovo riedeniami 10^{-2} až 10^{-4} , resp. 10^{-1} až 10^{-3} v trojnásobnom opakovaní na DRBC (agar s dichlóranom, bengálskou červeňou a chloramfenikolom) a MEA (agar so sladínovým extraktom) s prídavkom 100 mg chloramfenikolu. Endogénna mykocenóza bola detegovaná po povrchovej sterilizácii zŕn NaOCl (0,4 %) metódou priameho ukladania pšeničných zŕn na agarové platne DRBC a DYSG (agar s dichlóranom, kvasničným extraktom, sacharózou a glycerolom).

Kultivácia pri všetkých troch formách izolácie prebehla pri 25 ± 1 °C, po dobu 5 – 7 dní v tme.

Identifikácia

Izoláty patriace do podrodu *Penicillium* boli preočkované na identifikačné médiá - CYA (Czapkov agar s kvasničným extraktom), MEA, 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 ± 1 °C, 5 - 7 dní v tme (SAMSON et al., 2002b).

Na identifikáciu boli použité kľúče: PITT et HOCKING (1997); SAMSON et al. (2002); SAMSON et FRISVAD (2004).

Stanovenie toxigenity

Schopnosť vybraných izolátov produkovať citrinín (C), cyklopiazónovú kyselinu (CPA), grizeofulvín (G), patulín (P), penitrém A (PA) a roquefortín C (RC) bola stanovená v podmienkach *in vitro* tenkovrstvovou chromatografiou (TLC). Tri agarové výseky s plochou približne 5 x 5 mm z CYA (pre intracelulárne mykotoxíny: CPA, PA, RC) alebo z YES (pre extracelulárne mykotoxíny: C, G, P) boli zmiešané s 500 µl extrakčným činidlom chlorofom metanol (2 : 1). Toxíny boli extrahované na Vortexe (G-560E, Scientific Industries, Bohemia) cca 3 min. Na štart chromatografickej platne (Alugram sil G Macherem-Nagel, Nemecko) boli nanosené extrakty v množstve 30 µl a štandardy skrínovaných mykotoxínov 10 µl (Sigma, Nemecko). Po vysušení boli mykotoxíny vyvíjané v chromatografickej sústave TEF (toluén, etylacetát, kyselina mravčia 5 : 4 : 1) a po opätovnom vysušení detegované na základe fluorescencie a retenčných hodnôt použitých štandard. Vizualizácia citrinínu (žltozelená škvrna s chvostom) a grizeofulvínu (modrá škvrna) bola priamo viditeľná pod UV svetlom 365 nm. Pri dennom svetle boli vizualizované cyklopiazónová kyselina – po nanosení Erlichovho činidla (fialová škvrna s chvostom), patulín – po nanosení 0,5 % MBTH (3-metyl-2-benzotiazolióňhydrazón hydrochlorid) v metanole, zahriatí pri 130 °C, 8 min. (žltoranžová škvrna); penitrém A – po nanosení 20 %

AlCl_3 v 60 % etanole a zahriatí pri 130 °C, 8 min (tmavozelená až čierna škvrna); roquefortín C – po nanesení $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – oranžová škvrna.

Výsledky a diskusia

Cereálne zrná patria k najčastejšej kontaminovanej komodite mikroskopickými hubami (REYNERI, 2006). Práve kontaminácia obilnín sa stáva záujmom mykológov a toxikológov, pretože sú to práve obilniny, ktoré prostredníctvom výrobkov (chlieb, pečivo a pod.) tvoria základ našej každodennej stravy. Z konvenčného poľnohospodárstva z 8 vzoriek pšenice (endomykota, oplach, šrot) bolo vyizolovaných 25 druhov penicilií (Tab. 1), pričom až 16 pochádzalo z endogénnej mykocenózy: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. cf. miczynskii*, *P. palitans*, *P. raistrickii*, *P. scabrosum*, *P. soppii*, *P. thomii* a *P. sp.* Najvyššou frekvenciou výskytu (62 %) sa vyznačovali *P. griseofulvum* a *P. brevicompactum*. Ich prítomnosť bola zaznamenaná v piatich z 8 vzoriek. Ako uvádzajú FELŠÖCIOVÁ et al, 2007, zo 6 vzoriek pšenice z endocenózy z konvenčného poľnohospodárstva zo sezóny roku 2006 nevyizolovali ani jeden druh penicilií. Z oplachu izolovali len tri druhy: *P. crustosum*, *P. griseofulvum* a *P. raistrickii*, pričom až 67 % frekvencia výskytu sa úvádzala pri druhu *P. raistrickii*. Z povrchovej mykocenózy zo sezóny roku 2007 bolo zachytených 11 druhov: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. fellutanum*, *P. griseofulvum*, *P. manginii*, *P. polonicum*, *P. raistrickii* a *P. steckii*, pričom opäť v piatich vzorkách pšenice bol prítomný druh *P. brevicompactum* so 62 % frekvenciou výskytu. Zo šrotovaného zrna bolo diagnostikovaných 10 druhov: *P. aurantiogriseum*, *P. bilaiae*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. glabrum*, *P. hordei*, *P. purpurogenum*, *P. viridicatum* a *P. sp.* Aj v tomto prípade bola najvyššia 62 % frekvencia výskytu, ale tentoraz pri druhu *P. citrinum*. Zo šrotu v sezóne 2006 bol vyizolovaný len jeden druh *P. griseofulvum* s 33 % frekvenciou výskytu (FELŠÖCIOVÁ et al, 2007).

Z celkového počtu izolátov 131 najvyšší percentuálny podiel predstavoval toxikologicky významný druh *P. griseofulvum* (21 %), nasledoval *P. brevicompactum* (17 %), *P. raistrickii* spolu s *P. citrinum* (12 %). V sezóne 2006 vysoký percentuálny podiel izolátov z celkového počtu 9 predstavoval druh *P. raistrickii* (56 %) a *P. griseofulvum* (33 %) (FELŠÖCIOVÁ et al, 2007). Je však zrejmé, že ak sa niektoré typicky pôdne druhy z podrodu *Furcatum* (FRISVAD et al., 2000), ako sú napr. *P. raistrickii* nachádzajú v potravinách, krmivách alebo surovinách na ich výrobu, môžu byť zvyčajne považované za indikátory kontaminácie daného substrátu pôdou (FRISVAD et FILTENBORG, 1990). Z 25 druhov penicilií len 3 boli prítomné vo všetkých 3 formách izolácie (endogénna, oplach, šrot): *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum* a *P. citrinum*.

Z konvenčného poľnohospodárstva bez fungicídnej ochrany z 5 vzoriek potravinárskej pšenice bolo vyizolovaných 12 druhov penicilií (Tab. 2). Najvyššia diverzita bola zaznamenaná rovnako ako v predchádzajúcich vzorkách z vnútra zrna, išlo o 9 druhov, ktoré boli terverticilátne: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. solitum*, *P. viridicatum* a *P. sp.* Na veľkú významnosť podrodu *Penicillium*, jednak pre ich široký výskyt v potravinách či krmivách ale i ich schopnosť produkovať niekoľko potencionálnych mykotoxínov, poukazujú vo svojej práci FRISVAD et FILTENBORG, 1989. Vo všetkých piatich vzorkách bol zachytený druh *P. aurantiogriseum* (100 % frekvencia výskytu) s celkovým počtom izolátov 33. Nasledoval oplach (8 druhov): *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. griseofulvum*, *P. rugulosum* a *P. sp.* a 4 druhy pochádzali zo šrotu: *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum* a *P. crustosum*. Dva izoláty vyizolované

z endogénnej mykobioty sú diagnostikované aj z oplachu a šrotu: *P. aurantiogriseum* a *P. crustosum*. Z celkového počtu izolátov 83, najvyššie percentuálne podiely predstavovali: *P. aurantiogriseum* (47 %) a *P. crustosum* (10 %).

Tab. 1. Frekvencia výskytu a počet izolátov vyizolovaných druhov rodu *Penicillium* zo vzoriek pšenice (8) z konvenčného poľnohospodárstva na Slovensku v sezóne 2007.

Druh	Endogénna mykobiota			Oplach			Šrot			Celkový počet izolátov	% podiel
	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov		
<i>P. aurant.</i>	4	50	7	2	25	3	2	25	3	13	10
<i>P. bilaiae</i>	-	-	-	-	-	-	1	12	1	1	1
<i>P. brevic.</i>	5	62	15	5	62	6	1	12	1	22	17
<i>P. canes.</i>	-	-	-	1	12	1	-	-	-	1	1
<i>P. citrinum</i>	3	37	5	3	37	3	5	62	8	16	12
<i>P. coprop.</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. corylop.</i>	-	-	-	-	-	-	2	25	2	2	1
<i>P. crustos.</i>	1	12	1	1	12	1	-	-	-	2	1
<i>P. expans.</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. fellutan.</i>	-	-	-	1	12	1	-	-	-	1	1
<i>P. glabrum</i>	1	12	1	-	-	-	1	12	1	2	1
<i>P. griseof.</i>	5	62	25	3	37	3	-	-	-	28	21
<i>P. hordei</i>	1	12	3	-	-	-	1	12	1	4	3
<i>P. manginii</i>	-	-	-	1	12	1	-	-	-	1	1
<i>P. miczyns.</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. palitans</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. polonic.</i>	-	-	-	2	25	2	-	-	-	2	1
<i>P. purpur.</i>	-	-	-	-	-	-	1	12	2	2	1
<i>P. raistric.</i>	3	37	12	3	37	4	-	-	-	16	12
<i>P. scabros.</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. soppii</i>	2	25	2	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>P. steckii</i>	-	-	-	2	25	5	-	-	-	5	4
<i>P. thomii</i>	1	12	1	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>P. viridic.</i>	-	-	-	-	-	-	2	25	2	2	1
<i>P. sp.</i>	2	25	2	-	-	-	1	12	1	3	2

Σ 131

P. aurantiogriseum, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. coprophilum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. griseofulvum*, *P. c.f. miczynskii.*, *P. polonicum*, *P. purpurogenum*, *P. raistrickii*, *P. scabrosum*, *P. viridicatum*, *P. species*;

Tab. 2. Frekvencia výskytu a počet izolátov vyizolovaných druhov rodu *Penicillium* zo vzoriek pšenice (5) z konvenčného poľnohospodárstva bez fungicídnej ochrany na Slovensku v sezóne 2007.

Druh	Endogénna mykobiota			Oplach			Šrot			Celkový počet izolátov	% podiel
	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov	Pozitív. vzorky	Frekven. %	Počet izolátov		
<i>P. aurant.</i>	5	100	33	1	20	4	2	40	2	39	47
<i>P. brevic.</i>	2	40	4	2	40	2	-	-	-	6	7
<i>P. chrysog.</i>	1	20	4	1	20	2	-	-	-	6	7
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	1	20	2	1	20	2	4	5
<i>P. corylop.</i>	-	-	-	-	-	-	1	20	1	1	1
<i>P. crustos.</i>	1	20	3	2	40	4	1	20	1	8	10
<i>P. expans.</i>	1	20	2	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>P. griseof.</i>	2	40	2	1	20	4	-	-	-	6	7
<i>P. rugulos.</i>	-	-	-	1	20	1	-	-	-	1	1
<i>P. solitum</i>	2	40	2	-	-	-	-	-	-	2	2
<i>P. viridic.</i>	2	40	3	-	-	-	-	-	-	3	4
<i>P. sp.</i>	2	40	4	1	20	1	-	-	-	5	6

Σ 83

P. aurantiogriseum, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. rugulosum*, *P. viridicatum*, *P. species*;

Z desiatich vzoriek pšenice pochádzajúcich z ekologického poľnohospodárstva bolo detegovaných 18 druhov penicilií (Tab. 3), pričom počty druhov boli vyrovnané – oplach, šrot 12, endomykota 11. Zaujímavé je porovnanie s výsledkami z roku 2006, kde bolo identifikovaných len 7 druhov z 12 vzoriek ekologickej pšenice, pričom z endomykoty rovnako ako z roku 2007 aj v roku 2006 boli zachytené *P. chrysogenum* a *P. griseofulvum* + *P. crustosum*, z oplachu: *P. crustosum* a *P. chrysogenum*, rovnako ako z roku 2006, pričom tri druhy neboli v sezóne 2007 vyizolované vôbec: *P. melanoconidium*, *P. carneum/paneum* a toxikologicky významný druh vyskytujúci sa na obilninách *P. verrucosum*. Tri druhy detegované zo šrotu boli prítomné vo vzorkách aj z minuloročnej sezóny: *P. citrinum*, *P. crustosum* a *P. chrysogenum* (FELŠÖCIOVÁ et al., 2007)

Zo 197 izolátov, rovnako ako v konvenčnom poľnohospodárstve bez použitia fungicídnej ochrany, najvyšší percentuálny podiel predstavovali *P. aurantiogriseum* (27 %) a *P. raistrickii* (20 %), ktoré mali aj najvyššiu frekvenciu výskytu vo všetkých troch formách izolácie.

Z ekologického poľnohospodárstva až 6 druhov bolo prítomných vo všetkých troch formách izolácie: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum* a *P. raistrickii*.

Tab. 3. Frekvencia výskytu a počet izolátov vyizolovaných druhov rodu *Penicillium* zo vzoriek pšenice (10) z ekologického poľnohospodárstva na Slovensku v sezóne 2007.

Druh	Endogénna mykobiota			Oplach			Šrot			celkový počet izolátov	% podiel
	Pozitív	Frekvencia (%)	Počet	Pozitív	Frekvencia (%)	Počet	Pozitív	Frekvencia (%)	Počet		
	vzorky		izolátov	vzorky		izolátov	vzorky		izolátov		
<i>P. aurant.</i>	2	20	30	3	30	11	2	20	12	53	27
<i>P. bilaiae</i>	-	-	-	-	-	-	1	10	6	6	3
<i>P. brevic.</i>	1	10	1	1	10	3	1	10	1	5	2
<i>P. canes.</i>	2	20	8	1	10	2	1	10	1	11	6
<i>P. citrinum</i>	-	-	-	2	20	2	3	30	3	5	2
<i>P. corylop.</i>	-	-	-	1	10	2	-	-	-	2	1
<i>P. crustos.</i>	-	-	-	3	30	9	1	10	1	10	5
<i>P. digitat.</i>	1	10	1	-	-	-	1	10	1	2	1
<i>P. expans.</i>	2	20	2	-	-	-	-	-	-	2	1
<i>P. fellutan.</i>	-	-	-	1	10	1	-	-	-	1	0,5
<i>P. griseof.</i>	2	20	4	2	20	2	3	30	7	13	7
<i>P. hordei</i>	-	-	-	-	-	-	1	10	1	1	0,5
<i>P. chrysog.</i>	2	20	11	4	40	6	4	40	6	23	12
<i>P.manginii</i>	-	-	-	2	20	2	-	-	-	2	1
<i>P. polonic.</i>	1	10	1	-	-	-	-	-	-	1	0,5
<i>P. raistric.</i>	3	30	8	4	40	12	4	40	20	40	20
<i>P. viridic.</i>	1	10	1	-	-	-	-	-	-	1	0,5
<i>P. sp.</i>	2	20	6	4	40	9	3	30	4	19	10

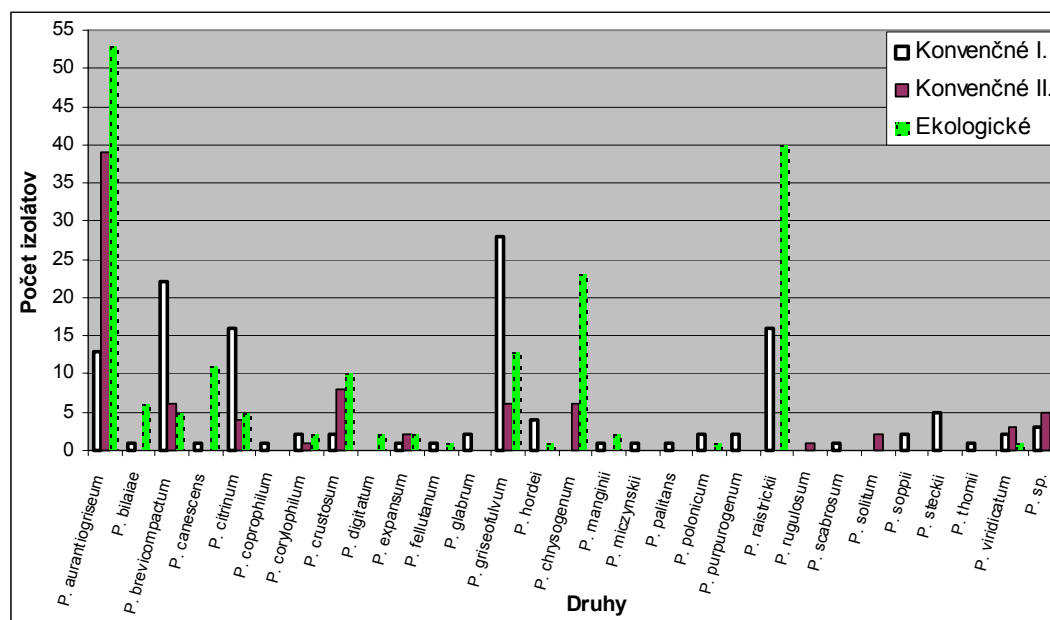
Σ 197

P. aurantiogriseum, *P. brevicompactum*, *P. canescens*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. griseofulvum*, *P. chrysogenum*, *P. polonicum*, *P. raistrickii*, *P. viridicatum*, *P. species*;

Porovnanie celkového počtu izolátov penicilií vyizolovaných zo vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva, z konvenčného bez použitia fungicídnej ochrany a ekologického poľnohospodárstva udáva graf 1. Z 29 vyizolovaných a identifikovaných druhov z lokalít západného a stredného Slovenska sa najčastejšie vyskytovali: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum* a *P. sp.* JIMÉNEZ et MATEO (2001) zo vzoriek cereálnych zŕn z celého Španielska popisovali široký výskyt toxinogénnych druhov penicilií, pričom išlo rovnako ako v našich vzorkách o *P. griseofulvum* a *P. chrysogenum*. Ostatné najčastejšie vyizolované druhy *P. variable*, *P. islandicum*, *P. purpurogenum* a *P. capsulatum* v našich vzorkách neboli zachytené. TANČINOVÁ et LABUDA (2006) sledovali mykotickú kontamináciu pšenice odobranú z veľkokapacitných skladov zo zberov v rokoch 2003 a 2004. Až na *P. carneum* a *P. verrucosum* boli vyizolované rovnaké druhy penicilií ako v našom pokuse z roku 2007: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. citrinum*, *P. chrysogenum*, *P.*

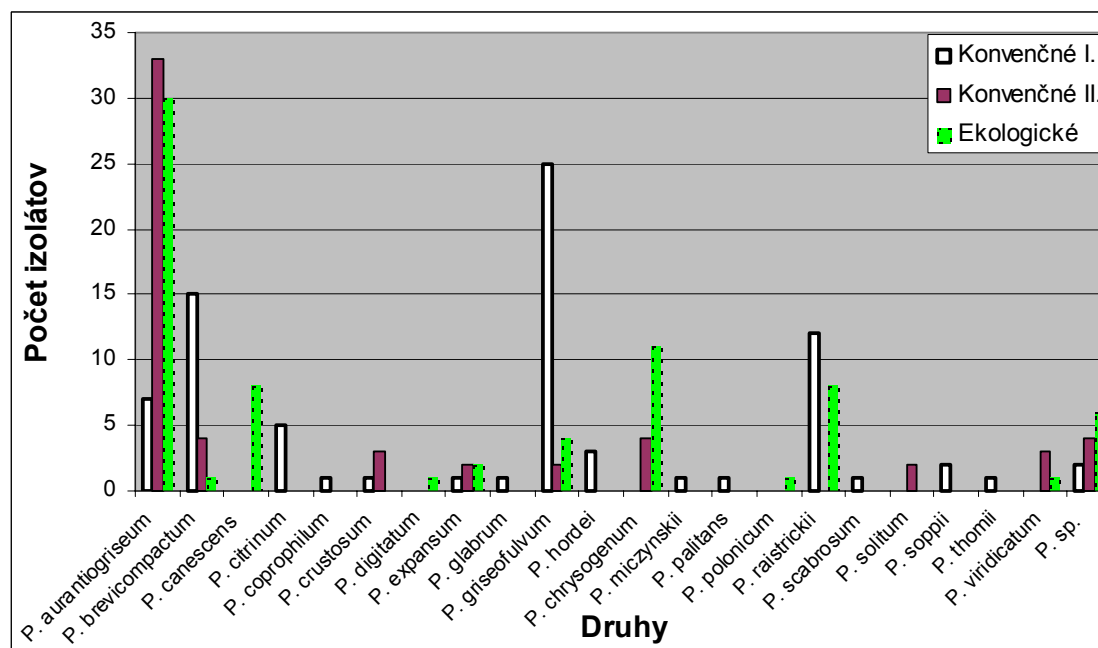
crustosum, *P. expansum*, *P. glabrum*, *P. griseofulvum*, *P. polonicum*, *P. raistrickii* a *P. viridicatum*.

Graf 1. Celkový počet izolátov vyizolovaných druhov penicilii z pšenice z konvenčného, konvenčného bez fungicídnej ochrany a ekologického poľnohospodárstva na Slovensku v sezóne 2007.



Legenda: Konvenčné I.- konvenčné poľnohospodárstvo, Konvenčné II. - konvenčné poľnohospodárstvo bez použitia fungicídnej ochrany

Graf 2. Celkový počet izolátov penicilii z endomykobioty pšenice z konvenčného, konvenčného bez fungicídnej ochrany a ekologického poľnohospodárstva na Slovensku v sezóne 2007.



Legenda: Konvenčné I.- konvenčné poľnohospodárstvo, Konvenčné II. - konvenčné poľnohospodárstvo bez použitia fungicídnej ochrany

Graf 2 udáva celkovú diverzitu penicilií z jednotlivých pšeničných zŕn vypestovaných z troch rôznych spôsoboch obhospodarovania pôdy. Celkovo bolo diagnostikovaných 22 druhov, pričom 4 sa vyskytovali pri všetkých spôsoboch obhospodarovania: *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. expansum* a *P. griseofulvum*.

Invázia obilných zŕn mikroskopickými hubami je často spájaná so závažným rizikom kontaminácie mykotoxínmi. Avšak predpovedať prítomnosť mykotoxínov v zrne nie je možné, a preto je potrebné určiť ich výskyt v rámci prieskumu a experimentálnych štúdií (AYALEW et al., 2006). Výskyt mykotoxínov v zrnách je objektom mnohých výskumov po celom svete (JELINEK et al., 1989, PLACINTA et al., 1999 atď.). Podľa PITT et LEISTNER (1991) medzi najdôležitejšie mykotoxíny produkované druhmi rodu *Penicillium* patria ochratoxín A, patulín a citrinín. Prevažne terverticilátne peniciliá sú známe produkciou mykotoxínov vyskytujúcich sa v potravinách (FRISVAD et FILTENBORG, 1989).

Z ôsmich vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva bolo testovaných 54 kmeňov desiatich potencióálne toxinogénnych druhov penicilií (Tab. 4). *P. expansum* z endomykobioty produkoval patulín aj roquefortín C, produkcia citrinínu nebola potvrdená ani pri ňom ani pri *P. cf. miczynskii*. Jeden kmeň *P. raistrickii* z desiatich neprodukoval griseofulvín a jeden kmeň *P. griseofulvum* z troch z oplachu neprodukoval patulín, ostatné sledované toxíny - kyselina cyklopiazónová, griseofulvín a roquefortín C produkovali všetky testované kmene. Schopnosť produkovať sledované mykotoxíny v podmienkach *in vitro* bola potvrdená pri všetkých ďalších testovaných druhov.

Tab. 4. Testované kmene rodu *Penicillium* vyizolované z endomykoty, oplachu a šrotu pšenice na schopnosť produkovať mykotoxíny v podmienkach *in vitro* z konvenčného poľnohospodárstva.

Testovaný druh	Endogénna mykobiota						Oplach						Šrot
	C	CPA	G	P	PA	RC	C	CPA	G	P	PA	RC	C
<i>P.canescens</i>									1.I				
<i>P.citrinum</i>	5.V						2.II						8.VIII
<i>P.coprophilum</i>			1*/1**			1.I							
<i>P. crustosum.</i>					1.I	1.I					3.III	3.III	
<i>P. expansum</i>	0/1			1.I		1.I							
<i>P.griseofulvum</i>		16/16	16/16	16/16		16/16		3.III	3.III	2.III		3.III	
<i>P hordei</i>						1.I							
<i>P.c.f.miczynskii</i>	0/1												
<i>P.c.f.palitans</i>		1.I											
<i>P. raistrickii</i>			9.X										

* - počet pozitívnych izolátor; ** - počet testovaných izolátorov

C – citrinín, CPA – cyklopiazónová kyselina, G – griseofulvín, P – patulín, PA – penitrém A, RC – roquefortín C

Z piatich vzoriek pšenice z konvenčného poľnohospodárstva bez použitia fungicídnej ochrany (endogénna izolácia a oplach) bolo screeningovaných 8 kmeňov štyroch potencióálne toxinogénnych druhov penicilií (Tab. 5). Žiaden z dvoch kmeňov *P. expansum* z endomykobioty neprodukoval citrinín, jeden kmeň produkoval roquefortín C, produkcia patulínu bola zaznamenaná pri obidvoch kmeňoch. Z oplachu bola potvrdená toxinogénnosť

piatich kmeňov 3 druhov na sledované mykotoxíny s výnimkou *P. crustosum*, pri ktorom nebola zaznamenaná produkcia roquefortínu C ani pri jednom z troch testovaných kmeňov. V cereáliách tieto dva druhy nepatria k častým izolátom, ich výskyt je typickejší pre ovocie, zeleninu a pôdu (FRISVAD et FILTENBORG, 1989).

Z desiatich vzoriek pšenice z ekologického poľnohospodárstva (všetky formy izolácie) bolo testovaných 34 kmeňov 7 druhov - potenciálnych producentov mykotoxínov (Tab. 6). Citrinín, známy ako nefrotoxín, ani v tomto prípade nebol potvrdený TLC metódou pri obidvoch kmeňoch *P. expansum* z endomykoty a patulín produkoval len jeden kmeň. Z oplachu 2 kmene *P. crustosum* z piatich neprodukovali penitrém A a jeden kmeň roquefortín C. Pri ostatných sledovaných druhoch bola toxínogenosť 100 % - ná.

Tab. 5. Testované kmene rodu *Penicillium* vyizolované z endomykoty a oplachu pšenice na schopnosť produkovať mykotoxíny v podmienkach *in vitro* z konvenčného poľnohospodárstva bez použitia fungicídnej ochrany.

Testovaný druh	Endogénna mykobiota					Oplach					
	C	CPA	G	P	RC	C	CPA	G	P	PA	RC
<i>P. citrinum</i>						1/1					
<i>P. crustosum</i>										3/3	0/3
<i>P. expansum</i>	0/2			2/2	1/2						
<i>P. griseofulvum</i>		1*/1**	1/1	1/1	1/1		1/1	1/1	1/1		1/1

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

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

Tab. 6. Testované kmene rodu *Penicillium* vyizolované z endomykoty, oplachu a šrotu pšenice na schopnosť produkovať mykotoxíny v podmienkach *in vitro* z ekologického poľnohospodárstva.

Testovaný druh	Endogénna mykobiota						Oplach						Šrot				
	C	CPA	G	P	PA	RC	C	CPA	G	P	PA	RC	CPA	G	P	PA	RC
<i>P. canesc.</i>			6*/6**		6.VI				2.II		2.II			1.I		1.I	
<i>P. citrinum</i>							1.I										
<i>P. crustos.</i>											3.V	4.V				1.I	1.I
<i>P. expan.</i>	0/2			1.II		2.II											
<i>P. griseof.</i>		3.III	3.III	3.III		3.III		2.II	2.II	2.II		2.II	5.V	5.V	5.V		5.V
<i>P. hordei</i>																	1.I
<i>P. raistrickii</i>			1.I						3.III					1.I			

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

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

P. canescens, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. raistrickii*

Záver

Z analyzovaných vzoriek potravinárskej pšenice z konvenčného poľnohospodárstva (8), konvenčného bez fungicídnej ochrany (5) a ekologického poľnohospodárstva (10) zo Slovenska v sezóne 2007 bolo vyizolovaných 29 druhov penicilií, z čoho izoláty 10 druhov (*P. canescens*, *P.*

citrinum, *P. coprophilum*, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. hordei*, *P. c.f. miczynskii*, *P. c.f. palitans* a *P. raistrickii*.) boli testované na schopnosť produkovať vybrané mykotoxíny v podmienkach *in vitro*. Tenkovrstvovou chromatografiou v podmienkach *in vitro* bola potvrdená produkcia citrinínu, kyseliny cyklopiazónovej, grizeofulvínu, patulínu, penitrému A a roquefortínu C. Z 96 testovaných kmeňov 93, t.j. 97 % kmeňov produkovalo minimálne 1 mykotoxín. Bez ohľadu na spôsob obhospodarovania pôdy najvyššia diverzita penicilií bola detegovaná v endogénnej mykobiocenóze pšeničných zŕn.

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

Použitá literatúra

- AYALEW, A., FEHRMANN, H., LEPSCHY, J., BECK, R., ABATE, D., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiop. Mycopathol. 162: 57-63.
- FELŠÖCIOVÁ, S., LABUDA, R., TANČINOVÁ, D., 2007. Výskyt *Penicillium* spp. na zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006. In: Nováková, A. (Ed.), Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007, September 4.-5., 2007, Ústav půdní biologie BC AV ČR, České Budějovice, pp. 9-15.
- FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 1989. Terverticillate *Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia 81: 837-861.
- FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 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.
- JELINEK, C.F., POHLAND, A.E., WOOD, G.E., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update. J. Assoc. Anal. Chem. 72: 223-230.
- JIMÉNEZ, M., MATEO, R., 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in agricultural commodities in Spain. In: LOGRIECO, A. (Ed.), 2001. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, pp. 173-190.
- LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., MULÉ, G., MORETTI, A., PERRONE, G., 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European J. Plant Pathol. 109: 645-667.
- 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., HOCKING, A.D., 1997. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London etc., 593 p.
- 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.
- PLACINTA, C.M., D'MELLO, J.P.F., MACDONALD, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim. Feed Sci. Technol. 78: 21-37.
- REYNERI, A., 2006. The Role of Climatic Condition on Mycotoxin Production in Cereal. Vet. Res. Comm. 30: 87-92.
- SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O., 2002a. Introduction to food- and airborne fungi. CBS, Utrecht, 389 p. ISBN 90-70351-42-0.

- 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. ISBN 90-70351-42-0.
- SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. In: Studies in Mycology, 49, CBS, Utrecht, The Netherlands, pp. 1-173.

Travní druhy rzí s aecii na *Ranunculus* a *Ficaria* – molekulární analýza

MARKÉTA HEJNÁ, MIROSLAV KOLAŘÍK, JAROSLAVA MARKOVÁ

HEJNÁ, M., KOLAŘÍK, M., MARKOVÁ, J.: Molecular analysis of grass rust fungi having aecia on *Ranunculus* and *Ficaria*.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 24. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Byla úspěšně izolována DNA z čerstvých aecií, uredií i telií a také z několika položek herbářových. Získaná DNA byla použitelná pro PCR amplifikaci rDNA oblastí i další PCR metody. Byly amplifikovány ITS a LSU oblasti rDNA. Celkem byly získány ITS sekvence 42 vzorků a LSU sekvence 30 vzorků.

Na základě analýzy ITS sekvencí byly vzorky aecií na *Ranunculus* a *Ficaria* rozčleněny do skupin a srovnáním se sekvencemi z materiálu teliálního přiřazeny k jednotlivým druhům. Velmi výrazně se od ostatních odčlenil druh *P. magnusiana*. Ostatní vzorky si byly více příbuzné, přesto se s vysokou bootstrapovou podporou rozčlenily do druhů *P. perplexans*, *U. dactylidis* a *U. poae*. Všechny vzorky aecií z *Ficaria verna* byly na základě sekvencí přiřazeny k druhu *U. poae* a všechny vzorky z *Ranunculus acris* byly přiřazeny k druhu *P. perplexans*. Aecia z *Ranunculus repens* byla přiřazena buď k *U. poae*, *P. magnusiana*, nebo zůstala nepřirazená.

Sekvence ITS oblastí studovaných druhů byly porovnány s publikovanými sekvencemi blízké příbuzných druhů. Potvrdilo se, že druhy *U. dactylidis*, *U. poae* a *P. perplexans* patří do skupiny hnědých rzí. *P. magnusiana* není zbylým druhům příbuzná, což odpovídá dosavadnímu taxonomickému hodnocení. Sekvence LSU oblastí byly využity pro podporu rozdělení vzorků pomocí ITS. Také byly použity k ověření příbuznosti druhů *U. poae* a *U. ficariae* (teorie tzv. *correlated species*). Bylo potvrzeno, že druhy nejsou blízké příbuzné.

V morfologii aeciospor byly nalezeny určité morfologické odlišnosti ve velikosti. Od ostatních se odlišovaly zejména aeciospory druhu *U. poae*, které byly menší. V ornamentice povrchu aeciospor nebyla nalezena žádná charakteristická mezidruhovná odlišnost.

Keywords: ITS analysis, *Puccinia perplexans*, *P. magnusiana*, *Uromyces dactylidis*, *U. poae*

Markéta Hejná, Miroslav Kolařík, Jaroslava Marková, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Czech Republic. E-mail: marketahejna@seznam.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Diversita houbových společenstev zasolených a kyselých půd Národní přírodní rezervace Soos

MARTINA HUJSLOVÁ, MIROSLAV KOLAŘÍK, ALENA KUBÁTOVÁ, MILADA CHUDÍČKOVÁ

HUJSLOVÁ, M., KOLAŘÍK, M., KUBÁTOVÁ, A., CHUDÍČKOVÁ, M.: Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in National Natural Reserve Soos, Czech Republic.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 25-26. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

During 2003-2005 the diversity of soil culturable filamentous microfungi in saline and acidic soils of National Natural Reserve Soos (Czech Republic) was studied and the growth response of the selected strains to different salinities and pH values was determined. Altogether 28 soil samples were obtained from four sampling sites. Two different cultivation methods and isolation media and, three incubation temperatures were used. Taxonomic identification of fungal isolates was based on morphological characteristics. In addition three rDNA regions and b-tubulin gene were used to characterize the selected morphologically undeterminable strains. Altogether 92 taxa, representing 38 genera were obtained from 28 soil samples. The prevailing genus was *Penicillium* (18 species). The majority of species were recorded scarcely. Only one species *Penicillium* sp. 1 was found at a frequency exceeding 50 % of all samples. Several taxa belong to fungal groups known from similar sites worldwide, however the observed fungal spectrum is rather unique, in comparison to similar studies. Comparing four sampling sites, their fungal communities differ considerably. The results of the growth tests indicate high adaptability of all tested species to the extreme conditions of the studied substrate.

Keywords: filamentous microfungi, saline and acid soils, NNR Soos

Martina Hujsová, Alena Kubátová, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, 128 01 Praha 2, Czech Republic. E-mail: pinkponk@seznam.cz, kubatova@natur.cuni.cz

Miroslav Kolařík, Milada Chudíčková, Institute of Microbiology CAS, 142 20 Praha 4, Czech Republic. E-mail: mkolarik@biomed.cas.cz, chudickova@seznam.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Národní přírodní rezervace Soos je unikátní lokalitou, která v našich klimatických podmínkách nemá obdobu. Půdy vyskytující se na území rezervace jsou charakteristické výrazným zasolením a místy extrémně nízkými hodnotami pH (1-2). V letech 2003 – 2005 byla v substrátu NPR Soos zkoumána diverzita saprotrfních mikroskopických půdních hub. Pro izolaci hub byly použity dvě izolační metody (přímá inokulace, zředovací metoda), dvě kultivační media (SL2, SEA) a tři inkubační teploty (5, 24 a 37°C). Získané izoláty byly determinovány na základě morfologických znaků. V případě morfologicky obtížně určitelných kmenů byly navíc použity molekulárně taxonomické metody (charakterizace pomocí r-DNA (ITS, SSU a LSU) a genu pro β -tubulin). Součástí studie bylo rovněž srovnání houbových společenstev čtyř studovaných odběrových ploch lišících se množstvím rostlinného pokryvu, zasolením substrátu, hodnotami pH a půdní vlhkostí. U vybraných dominantních a případných nových druhů byl v souvislosti se specifickými půdními podmínkami studovaného substrátu testován jejich růst na médiích (MEA) o různém pH (1-8) a různé salinitě (0M, 0,25M, 0,5M Na₂SO₄).

Z celkového počtu 28 půdních vzorků bylo izolováno celkem 799 kmenů, z nichž bylo získáno 92 taxonů půdních mikromycetů patřících do 38 určených rodů. Celkem 150 izolátů bylo typováno pomocí RAPD a 67 z nich dále charakterizováno sekvencemi r-DNA a β -tubulinu. Největší počet zástupců patřil do rodu *Penicillium* (18 druhů). Převážná většina druhů byla zaznamenána vzácně (s frekvencí výskytu nepřesahující 12,5 % všech vzorků) a nelze ji tedy se studovaným substrátem přímo spojovat. V případě několika málo druhů izolovaných s vyšší frekvencí výskytu se naopak dá předpokládat, že tvoří základ houbového

společenstva tohoto specifického substrátu. Mezi druhy izolovanými z NPR Soos bylo několik zástupců uváděných z podobných typů substrátů, nicméně v převážné většině se jednalo spíše o druhy odlišné a houbové společenstvo se jeví jako velmi unikátní. Společenstva mikroskopických hub izolovaná z jednotlivých odběrových ploch se ukázala být značně odlišná. Žádný druh nebyl izolován ze všech čtyř odběrových ploch. Více než polovina druhů (52 druhů) byla zaznamenána pouze z jedné z ploch. Odlišnost odběrových ploch byla podpořena rovněž výsledky statistické analýzy, které ukázaly, že faktorem plochy lze vysvětlit největší procento variability souboru. Statisticky významný byl rovněž vliv použitých metodických postupů, což ukazuje na fakt, že všechny použité metody přispěly k rozšíření druhového spektra izolovaných hub. Výsledky růstových pokusů ukázaly, v případě všech testovaných druhů, na výraznou schopnost adaptace na specifické podmínky studovaného substrátu. Všechny druhy prokázaly schopnost růstu na mediích se zvýšeným obsahem soli a lze je tedy považovat za halotolerantní. Převážná většina druhů byla schopna růst v rozmezí pH 3 – 8, v případě šesti zástupců byl dokonce zjištěn růst na mediu s extrémně nízkými hodnotami pH (1, 2). Všechny lze tedy považovat za acidotolerantní, druh *Sporothrix* sp. dokonce za acidofilní.

Diverzita a funkce mikroskopických hub v opadu *Picea abies*

ZUZANA KOLÁŘOVÁ

KOLÁŘOVÁ, Z.: Diversity and function of microscopic fungi in *Picea abies* litter.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 27. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Microfungi have a considerable effect on the decomposition of litter in coniferous forests. Their diversity is wide and relatively well known. However, there is very sparse information about function of particular species in the decomposition and in the cycling of nutrients. Linking biodiversity and function of individual species is a key issue in a forthcoming project aimed at microbial processes in the spruces forest soil in the Šumava National Park. So far, litter and trash needles of *Picea abies* were sampled, surface sterilised and cultivated on malt agar medium as a preliminary study in May 2008. In total, we recorded 180 operational taxonomic units based on their morphology and growth rate of colonies and partly also microscopic features. Only four OTU occurred with a frequency over 10%. There were less sterile needles in the litter (16%). The most common isolates were tested for production of enzyme laccase on medium with ABTS. The enzymatic activity of three most frequently species was moderate, suggesting their limited role in the decomposition.

Mikroskopické houby významně ovlivňují dekompozici opadu v jehličnatých lesích. Jejich diverzita je široká a poměrně známá. Méně se ví o funkci konkrétních druhů v dekompozici a koloběhu živin. Propojení našich znalostí diverzity a funkce těchto hub bude součástí dlouhodobého projektu zaměřeného na mikrobiální procesy v půdě smrkových lesů v NP Šumava. V rámci pilotního pokusu tohoto projektu byly odebrány vzorky jehlic z kletí a opadu *Picea abies* (květen 2008) a po povrchové sterilizaci vysety na sladinné agarové médium. Celkem bylo zaznamenáno 180 morfologicky odlišných operačně taxonomických jednotek (morfologie kolonie, rychlost růstu, částečně i mikroskopické znaky). Pouze čtyři OTU se vyskytovaly s četností nad 10%. Sterilních jehlic bylo méně v opadu než v kletí (tj. 16% vs.). Nejčastější izoláty hub jsme testovali na produkci enzymu lakáza na médiu s ABTS. Tři nejčastější OTU produkovali lakázu pouze se střední intenzitou, což naznačuje jejich omezenou roli v dekompozici.

Keywords: microscopic fungi, *Picea abies*, litter

Zuzana Kolářová, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 43 Praha 2.
E-mail: Zuzana.Kolarova@seznam.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Diverzita a interakce mikroskopických hub v opadu jehličnatých dřevin

ONDŘEJ KOUKOL

KOUKOL, O.: Microfungal diversity and interactions in needle-leaved litter.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 28. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Ke studiu diverzity hub je v současnosti možné využívat i přístupy založené na izolaci, amplifikaci a sekvenování vybraných úseků DNA a to jak z jednotlivých izolovaných kmenů hub, tak z environmentální DNA. Tyto přístupy mohou pomoci při studiu houbových společenstev, např. mikroskopických hub v opadu smrku *Picea abies* nebo k determinaci a následnému studiu rozšíření vybraných druhů hub (např. *Scleroconidioma sphagnicola*). Spolu se znalostmi o spektru druhů na daném substrátu je dalšími klíčovými oblastmi studia jejich funkce a interakcí s ostatními organizmy kolonizujícími stejný ekosystém. V tomto směru se jeví jako velmi nadějně a perspektivní studium interakcí s pancířníky (*Oribatida*) a krytenkami (*Arecellinida* a *Euglyphida*). V prvním případě dochází i po mnoha studiích k upřesňování potravních preferencí a dalších vztahů mezi houbami a pancířníky. Ve druhém případě se ukazuje, že doposud značně přehlížené trofické vztahy mezi erikoidně mykorhizními houbami a protisty mohou mít velký význam jak pro oba partnery, tak pro další asociované organizmy (další druhy hub, mykorhizní rostliny).

Up-to-date methods such as isolation of DNA (including environmental DNA), amplification and sequencing of particular regions are currently adopted for studies of fungal diversity. These approaches may be used for studies of microscopic fungi in litter of *Picea abies* as well as for identification and distribution of particular fungal species (e.g. *Scleroconidioma sphagnicola*). Other areas deserving further studies include function and interactions of these fungi with other organisms sharing the same ecosystem. Studies of interactions with oribatid mites (*Oribatida*) and testate amoebae (*Arecellinida* and *Euglyphida*) seem to be very promising. Preferences of particular oribatid species for fungi and their relationship are still unclear though being intensively studied. Trophic interactions between ericoid mycorrhizal fungi and amoebae that have been mostly neglected seem to be very important not only for both partners, but for other organisms associated as well (other microscopic fungi, mycorrhizal plants).

Keywords: microscopic fungi, litter, *Picea abies*, trophic interactions

Ondřej Koukol, Department of Botany, Faculty of Sciences, Charles University, Benátská 2, 128 43 Praha 2. E-mail: o.koukol@seznam.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Nejnovější poznatky v taxonomii rodu *Aspergillus* (minireview zaměřené na rostoucí druhovou diversitu)

ALENA KUBÁTOVÁ

KUBÁTOVÁ, A.: News in the taxonomy of *Aspergillus* (minireview dealing with increasing species diversity).

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 29-38. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Our knowledge about taxonomy of *Aspergillus* achieved a new level, mainly due to extensive using of molecular analyses in mycological laboratories. Many new *Aspergillus* species yielded from these studies in recent years. Now, ca 260 *Aspergillus* species is known. In this minireview, the new species in the sections *Circumdati*, *Nigri*, *Fumigati*, *Candidi*, *Usti*, *Flavi*, and *Ochraceorosei* described in the ten last years are briefly presented.

Keywords: *Aspergillus*, new species, minireview

Alena Kubátová, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. E-mail: kubatova@natur.cuni.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Rod *Aspergillus* (*Ascomycota*, *Eurotiales*) patří mezi dobře známé, hojně rozšířené a také ekonomicky významné houby. Potenciálně toxinogenní druhy (*A. flavus*, *A. parasiticus* aj.) mají negativní význam v potravinářství, oportunní patogeni (*A. fumigatus* aj.) mohou být původci mykotických onemocnění, konidie aspergilů patří mezi alergenní faktory; na druhé straně se některé druhy využívají k produkci organických kyselin, enzymů aj. látek či k přípravě potravinářských specialit (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*). Mykologové věnují tomuto rodu pozornost velmi dlouho, *Aspergillus* rozpoznal již roku 1729 Ital Pier Antonio Micheli. Nejrozsáhlejší monografií rodu byla po dlouhá léta využívaná práce Rapera a Fennellové (RAPER et FENNELL, 1965), obsahující 132 druhů a 18 variet (celkem 150 taxonů). Do roku 2000 bylo známo téměř 220 druhů (PITT et al., 2000, SAMSON, 2000). GEISER et al. (2007) uvádějí, že počet druhů rodu *Aspergillus* čítá kolem 250. Dnes, v roce 2008, je jich známo již přes 260 a jejich počet zcela jistě poroste s rozvojem studia molekulárních znaků zástupců tohoto rodu a s upřesňováním druhového pojetí v řadě skupin. Dokládá to i rozsáhlá fylogenetická studie Petersona (PETERSON, 2008), kde autor avizuje existenci více než 20 dosud nepopsaných druhů.

K největšímu rozvoji studia rodu *Aspergillus* došlo v posledních deseti letech právě v souvislosti s využíváním molekulárních metod a jejich zavádění do běžné praxe mykologických laboratoří. Toto úsilí nakonec vyústilo v publikaci řady menších a několika rozsáhlejších prací o aspergilech: např. FRISVAD et al. (2004) studovali ochratoxinogenní druhy sekce *Circumdati*, SAMSON et al. (2004) publikovali nové poznatky o ochratoxinogenních a sklerociálních druzích sekce *Nigri* (obě práce ve *Studies in Mycology* jsou volně přístupné na internetu). Sekci *Fumigati* se věnovali HONG et al. (2005) a BALAJEE et al. (2005). SAMSON et VARGA (2007) se stali editory významné publikace, zahrnující též taxonomické studie sekcí *Candidi*, *Clavati*, *Usti*, *Nigri* a *Fumigati* (*Studies in Mycology*, volně přístupné na internetu). Stejní autoři (SAMSON et VARGA, 2008) shrnuli poznatky ze

studia rodu *Aspergillus* v knize „*Aspergillus in the genomic era*“. PETERSON (2008) publikoval nový pohled na fylogenetické členění rodu na úrovni podrodů, sekcí i druhů.

Hlavním cílem tohoto příspěvku je představit nové druhy rodu *Aspergillus* popsané v posledních deseti letech a upozornit na jejich možný výskyt u nás.

Sekce *Circumdati* (FRISVAD et al. 2004)

Nejznámějším druhem sekce je okrově zbarvený *A. ochraceus*. V současné době sekce zahrnuje 20 druhů, většinou se žlutě a okrově zbarvenými koloniemi (podobné zbarvení však můžeme najít i u druhů sekce *Flavi*, *Wentii*, výjimečně i *Candidi*). Zástupci sekce *Circumdati* produkují tři základní skupiny mykotoxinů: ochratoxiny (produkuje je 50-70 % druhů), penicillové kyseliny (85 % druhů) a xanthomegniny (85 % druhů). U většiny izolátů je produkce extrolitů velmi stálá (výjimkou jsou druhy *A. ochraceus* a *A. sclerotiorum*). Druhy sekce *Circumdati* byly popsány jako původci mykotoxikóz myši a prasat.

Po stránce taxonomické tvoří současných 20 druhů této sekce velmi homogenní skupinu (poté co byly tři druhy přearženy do sekce *Flavi*: *Petromyces alliaceus*, *P. albertensis* a *A. lanosus*, a jeden druh umístěný do sekce *Candidi*: *A. campestris*). Výjimkou je pouze druh *A. robustus* charakteristický černými sklerocii a fototropními konidioforů, jehož umístění v sekci je nejisté. ZOTTI et MONTEMARTINI CORTE (2002) a později FRISVAD et al. (2004) na základě polyfázového přístupu (tj. kombinace studia morfologických, fyziologických a biochemických znaků a ekologických a molekulárních dat) popsali osm nových druhů. Jejich krátká charakteristika je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1. Nové druhy sekce *Circumdati* (ZOTTI et MONTEMARTINI CORTE, 2002, FRISVAD et al., 2004).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt
<i>A. cretensis</i> Frisvad & Samson 2004	dlouhé konidiofory (4 mm), velká diskovitá sklerocia (1 mm), konidie jasně žluté, široce elipsoidní; neroste při 37 °C	původ typové kultury: půda v soutěsce Samaria na Krétě, vzácný druh
<i>A. flocculosus</i> Frisvad & Samson 2004	silně flokózní kolonie na CYA, konidie hnědé až hnědožluté, relativně malé (2-2,5 µm); roste při 37 °C	původ typové kultury: solivar, Slovinsko
<i>A. neobridgeri</i> Frisvad & Samson 2004	protáhlé měchýřky konidioforů; rychlý růst při 37 °C,	původ typové kultury: půda, Nebraska
<i>A. persii</i> A. Montemartini Corte & M. Zotti 2002	konidiální hlavice a měchýřky poměrně malé (srovnatelné s <i>A. flavipes</i>), mycelium s kyjovitými buňkami, červenohnědý nebo oranžovohnědý revers kolonií	původ typové kultury: onychomykóza, Itálie
<i>A. pseudoelegans</i> Frisvad & Samson 2004	hnědošedá sklerocia na CYA, konidie světle hnědé až žlutohnědé, relativně malé	původ typové kultury: půda, Kostarika
<i>A. roseoglobulosus</i> Frisvad & Samson 2004	růžově červené mycelium, růžovočervený revers na CYA; roste dobře při 37 °C	původ typové kultury: Bahamy, zetlelý list; vzácný druh
<i>A. steynii</i> Frisvad & Samson 2004	původně určený jako <i>A. ochraceus</i> , avšak konidie široce elipsoidní, na MEA v mase světle žluté; neroste při 37 °C	celosvětový (Evropa ?); původ typové kultury: zelená kávová zrna, Indie; velmi silný producent ochratoxinu A
<i>A. westerdijkiae</i> Frisvad & Samson 2004	morfologické znaky podobné druhu <i>A. ochraceus</i> (izoláty byly původně určené jako <i>A. ochraceus</i>); neroste při 37 °C (x <i>A. ochraceus</i> roste); bílá až krémová sklerocia (x <i>A. ochraceus</i> růžová až vínová sklerocia)	výskyt celosvětový: zelená kávová zrna, solivary, rýže; typová kultura je izolát, u něhož byla poprvé zjištěna produkce ochratoxinu; druh patří mezi nejsilnější producenty ochratoxinu A

Závěr: Z toxikologického hlediska patří mezi nejvýznamnější druhy sekce *Circumdati* druhy *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* a *A. steynii*; všechny tři jsou velmi hojně rozšířené (káva, rýže, nápoje aj. potravinářské produkty) a kromě druhu *A. ochraceus* stabilně produkují velká množství toxinů. Druhy *A. westerdijkiae* a *A. ochraceus* jsou navíc zajímavé tím, že produkují také aspergamidy (avrainvillamidy, stephacidiny), látky s protirakovinnými účinky. Molekulární studium odhalilo, že je přínosné studovat více částí genomu. U aspergilů se osvědčila analýza sekvencí pro beta-tubulin, ale částečně i studium ITS sekvencí, mitochondriální DNA a využití RAPD analýz. FRISVAD et al. (2004) uvádějí, že dalším krokem ve studiu skupiny je i vytvoření určovacího klíče. Lze předpokládat, že toxinogenní druhy *A. westerdijkiae* a *A. steynii*, které byly dosud určovány jako *A. ochraceus*, by se mohly vyskytovat i na našem území.

Sekce Nigri (SAMSON et al. 2004, DE VRIES et al. 2005, SERRA et al. 2006, SAMSON et al. 2007, NOONIM et al. 2008, PERRONE et al. 2008)

Nejznámějším druhem sekce je *A. niger*. Sekce zahrnuje uniseriální i biseriální druhy, většinou s tmavě nebo černě zbarvenými koloniemi. Druhy sekce *Nigri* jsou velmi hojné v prostředí (u nás spíše na potravinářských produktech, v teplejších oblastech i v půdě). Druhy této skupiny mají význam v potravinářství (kontaminace hroznů, rozinek, kávy, kakaa, černého pepře, čaje aj.), v lékařství (oportunní patogeni), i v biotechnologiích (produkce enzymů a organických kyselin). Po stránce toxikologické byly druhy sekce *Nigri* dlouho považovány za obecně bezpečné houby. Avšak, jak uvádějí SAMSON et al. (2004), v roce 1991 byly poprvé publikovány údaje o produkci ochratoxinu A u jednoho z černých aspergilů. Dnes je známa produkce ochratoxinu A u druhů *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. niger* a *A. sclerotium*. V minulém roce byla publikována překvapivá zpráva o produkci fumonisinu B₂ izoláty druhu *Aspergillus niger* (FRISVAD et al. 2007). Dosud byl tento mykotoxin znám pouze jako produkt fuzárií.

Sekce *Nigri* zahrnuje v současné době 19 druhů, 11 z nich bylo popsáno v posledních deseti letech (viz Tab. 2).

Tab. 2. Nové druhy sekce Nigri (SAMSON et al. 2004, DE VRIES et al. 2005, SERRA et al. 2006, SAMSON et al. 2007, NOONIM et al. 2008, PERRONE et al. 2008).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt
<i>A. aculeatinus</i> Noonim, Frisvad, Varga & Samson 2008	kolonie světle hnědé, uniseriální, konidie malé (2-5 µm), tvorba sklerocií, produkce sekalonové kyseliny D, F aj.	Původ: kávová zrna, Thajsko Výskyt: zelená kávová zrna, půda, Thajsko, Japonsko
<i>A. brasiliensis</i> Varga, Frisvad & Samson 2007	neprodukuje ochratoxiny, biseriální	Původ: půda, Brazílie Výskyt: Brazílie, Austrálie, USA, Evropa
<i>A. costaricensis</i> Samson & Frisvad 2004	růžová až šedožlutá sklerocia, velké měchýřky a metuly	Původ: půda, Kostarika Výskyt: vzácnější druh
<i>A. homomorphus</i> Steiman, Guiraud, Sage et Seigle-Mur. ex Samson & Frisvad 2004	produkce sekalonové kyseliny D, velké konidie	Původ: půda u Mrtvého moře, Izrael Výskyt: vzácnější druh
<i>A. ibericus</i> Serra, Cabañes & Perrone	biseriální, větší konidie (5-7 µm), nápadně ježaté, neprodukuje ochratoxiny	Původ: hroznové víno, Portugalsko Výskyt: Evropa (Pyrenejský = Iberský poloostrov)
<i>A. lacticoffeatus</i> Frisvad & Samson 2004	hnědé kolonie, biseriální hlavice, velké měchýřky, konidie hladké až velmi jemně bradavčité	Původ: zelená kávová zrna, Indonézie Výskyt: vzácnější druh (Venezuela, Indonézie)

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt
<i>A. piperis</i> Samson & Frisvad 2004	žlutá až růžově hnědá sklerocia, konidie subglobózní až široce elipsoidní, výrazně bradavčité, poměrně malé (2,8-3,6 µm)	Původ: černý pepř tropického původu, Dánsko Výskyt: vzácnější druh
<i>A. sclerotii carbonarius</i> Noonim, Frisvad, Varga & Samson 2008	žlutooranžová sklerocia, jasně žlutý revers na YES, velké konidie, neroste při 37 °C	Původ a výskyt: kávová zrna, Thajsko
<i>A. sclerotium niger</i> Samson & Frisvad 2004	žluté mycelium, žlutá až oranžová či červenohnědá sklerocia, žluté spikulární hyfy na YES agaru, velké konidie, ochratoxiny	Původ: zelená kávová zrna, Indie Výskyt: vzácnější druh
<i>A. uvarum</i> Perrone, Varga & Kozak. 2008	uniseriální, tmavě hnědá až černá sklerocia, produkce sekalonové kyseliny D	původ: bobule hroznového vína výskyt: Evropa
<i>A. vadensis</i> Samson, de Vries, Frisvad & Visser 2005	biseriální, kolonie světle hnědé až olivově hnědé, konidie poměrně malé (3-4 µm), slabý růst na glycerolu a galakturonátu, neprodukuje ochratoxiny; blízký druhům <i>A. niger</i> , <i>A. foetidus</i> a <i>A. tubingensis</i>	původ: ovzduší, Egypt
<i>A. aculeatinus</i> Noonim, Frisvad, Varga & Samson 2008	uniseriální, tvorba sklerocií, produkce sekalonové kyseliny D	původ: kávová zrna, Thajsko
<i>A. brasiliensis</i> Varga, Frisvad & Samson 2007	neprodukuje ochratoxiny, biseriální	původ: půda, Brazílie; výskyt: Brazílie, Austrálie, USA, Evropa
<i>A. costaricaensis</i> Samson & Frisvad 2004	růžová až šedožlutá sklerocia, velké měchýřky a metuly	původ: půda, Kostarika; výskyt: vzácnější druh
<i>A. homomorphus</i> Steiman, Guiraud, Sage et Seigle-Mur. ex Samson & Frisvad 2004	produkce sekalonové kyseliny D, velké konidie	původ: půda u Mrtvého moře, Izrael výskyt: vzácnější druh
<i>A. ibericus</i> Serra, Cabañes & Perrone	biseriální, větší konidie (5-7 µm), nápadně ježaté, neprodukuje ochratoxiny	původ: hroznové víno, Portugalsko; výskyt: Evropa (Pyrenejský = Iberský poloostrov)
<i>A. lacticoffeatus</i> Frisvad & Samson 2004	hnědé kolonie, biseriální hlavice, velké měchýřky, konidie hladké až velmi jemně bradavčité	původ: zelená kávová zrna, Indonésie; výskyt: vzácnější druh (Venezuela, Indonésie)
<i>A. piperis</i> Samson & Frisvad 2004	žlutá až růžově hnědá sklerocia, konidie subglobózní až široce elipsoidní, výrazně bradavčité, poměrně malé (2,8-3,6 µm)	původ: černý pepř tropického původu, Dánsko; výskyt: vzácnější druh
<i>A. sclerotii carbonarius</i> Noonim, Frisvad, Varga & Samson 2008	žlutooranžová sklerocia, jasně žlutý revers na YES, velké konidie	původ: kávová zrna, Thajsko
<i>A. sclerotium niger</i> Samson & Frisvad 2004	žluté mycelium, žlutá až oranžová či červenohnědá sklerocia, žluté spikulární hyfy na YES agaru, velké konidie, ochratoxiny	původ: zelená kávová zrna, Indie; výskyt: vzácnější druh
<i>A. uvarum</i> Perrone, Varga & Kozak. 2008	uniseriální, tmavě hnědá až černá sklerocia, produkce sekalonové kyseliny D	původ: bobule hroznového vína výskyt: Evropa
<i>A. vadensis</i> Samson, de Vries, Frisvad & Visser 2005	biseriální, kolonie světle hnědé až olivově hnědé, konidie poměrně malé (3-4 µm), slabý růst na glycerolu a galakturonátu, neprodukuje ochratoxiny; blízký druhům <i>A. niger</i> , <i>A. foetidus</i> a <i>A. tubingensis</i>	původ: ovzduší, Egypt

Závěr: SAMSON et al. (2004) vytvořili synoptický klíč k odlišení 15 tehdy známých druhů na základě morfologických znaků a produkce extrolitů. Zdůraznili, že identifikace druhů pouze na základě fenotypu je v některých případech obtížná, např. ve skupině druhů *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus* a *A. vadensis*. Tyto druhy lze odlišit pomocí DNA sekvencí pro gen cytochromu b, ITS, beta-tubulin, RFLP aj. Všechny druhy sekce *Nigri* jsou zcela rozlišitelné

svými profily extrolitů. Všechny druhy sekce *Nigri* jsou také zcela odlišitelné srovnáním sekvencí pro calmodulin, většina druhů se liší sekvencemi pro beta-tubulin. Pro identifikaci některých druhů je možné využít pomocné testy: Ehrlichův test, kultivace na CREA a Boscalid agar, kultivace při 30 °C, 33 °C, 36 °C a 40 °C. Nově popsané druhy patří většinou mezi vzácnější, na naše území by se však mohly dostat s potravinami dováženými z teplejších oblastí, např. s nepraženou kávou.

Sekce *Fumigati* a rod *Neosartorya* (HORIE et al., 1993, HONG et al., 2005, Balajee et al., 2005, SAMSON et al., 2007)

Nejznámějším zástupcem sekce je druh *Aspergillus fumigatus*, významný patogen člověka. Pro sekci jsou charakteristické druhy s uniseriálními konidiofory se sloupcovitými konidiálními hlavicemi. Kolonie jsou zeleně zbarvené. Sekce v současné době obsahuje 33 taxonů: 10 anamorfních druhů (z toho 4 nové druhy, viz Tab. 3) a 23 druhů rodu *Neosartorya* (9 nově popsaných druhů – ty však nejsou zahrnuty v tomto příspěvku). Rod *Neosartorya* i anamorfní zástupci sekce *Fumigati* patří mezi důležité patogeny člověka, mnohé druhy jsou též termorezistentní a způsobují deterioraci nevhodně tepelně opracovaných potravin. Zástupci sekce *Fumigati* produkují řadu charakteristických extrolitů, včetně mykotoxinů: gliotoxin, fumitremorginy, fumigaklaviny aj., *A. lentulus* je schopen produkovat i kyselinu cyklopiazonovou, známou jako metabolit aspergilů sekce Flavi či některých penicilií. Některé z extrolitů mají i vlastnosti potenciálně využitelné člověkem: fiskaliny, pyripyropeny, restriktociny, ribotoxiny, fumagillin (SAMSON et al. 2007).

Tab. 3. Nové druhy sekce *Fumigati* (HORIE et al., 1993, HONG et al., 2005, Balajee et al., 2005, SAMSON et al., 2007).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt a význam
<i>A. fumigati</i> affinis S. B. Hong, Frisvad & Samson 2005	subglobózní měchýřky, roste při 10 °C (<i>A. fumigatus</i> neroste při 10 °C), neroste při 50 °C (<i>A. fumigatus</i> roste při 50 °C)	Rozšíření: USA, Španělsko Substrát: krysy, půda, člověk Význam: patogen člověka (Alcazar-Fuoli et al. 2007)
<i>A. lentulus</i> S. A. Balajee & K. A. Marr 2005	slabá tvorba konidií, flokózní kolonie, hlavičky krátce sloupcovité, měchýřek kulovitý, roste při 10 °C, neroste při 50 °C	Rozšíření: Korea, USA, Japonsko, Austrálie, Holandsko, Španělsko Substrát: půda, člověk, delfin Význam: patogen člověka (Balajee et al. 2005, Alcazar-Fuoli et al. 2007 etc.)
<i>A. novofumigatus</i> S. B. Hong, Frisvad & Samson 2005	měchýřky lahvovité, relativně velké, roste při 10 °C, neroste při 50 °C	Rozšíření: Galapágy, Ekvádor Substrát: půda Patogenicita zatím nezjištěna
<i>A. turcosus</i> S. B. Hong, Frisvad & Samson 2008	kolonie šedomodré, revers na CYA a MEA žlutooranžový, roste při 10 °C i 50 °C	Rozšíření: Jižní Korea Substrát: klimatizace Patogenicita zatím nezjištěna

Závěr: U druhů sekce *Fumigati* je třeba si všimnout tvaru měchýřku (některé nově popsané druhy mají téměř kulovitý měchýřek, důležitým fyziologickým znakem je též schopnost růstu při 10 °C a 50 °C. Lze předpokládat, že i u nás dojde časem k odhalení některých nově popsaných druhů zvláště mezi izoláty z klinického materiálu.

Sekce *Candidi* (VARGA et al., 2007)

Sekce původně zahrnovala pouze jediný druh: *A. candidus*, bíle sporulující, tvořící hlavičky dvojího typu (velké biseriální a malé uniseriální), s hladkými konidiemi. Jde o druh velmi

hojný ve skladech obilovin a často izolovaný i z produktů z obilovin. Je schopen produkovat široké spektrum toxických extrolitů. Některé metabolity jako terphenylové sloučeniny a terpeniny navíc ovlivňují imunitu. V oblasti lékařské mykologie je *A. candidus* významným patogenem člověka (invazivní aspergilózy, otomykózy, granulom mozku, onychomykózy). V oblasti biotechnologií má rovněž určitý význam: enzymy této houby jsou využívány k produkci galakto-oligosacharidů a D-mannitolu. Některé metabolity jako terphenylliny mají antioxidační vlastnosti. V masném průmyslu se *A. candidus* využívá pro zrání klobás.

VARGA et al. (2007) do sekce *Candidi* zahrnuli další tři druhy (nikoliv nově popsané) na základě polyfázového studia: *A. campestris* (původně v sekci *Circumdati*), *A. taichungensis* (původně v sekci *Versicolores*, *Terrei*, případně i *Flavipedes*) a *A. tritici* (viz Tab. 4). Naopak druh *A. implicatus*, popsáný roku 1994 a dočasně umístěný v sekci *Candidi* byl přearažen do sekce *Sparsi*.

Tab. 4. Druhy nově zařazené do sekce *Candidi* (VARGA et al., 2007).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt a význam
A. campestris Christensen 1976	sírově žluté kolonie omezeného růstu, hladké elipsoidní konidie, kulovité měchýřky, neroste při 37 °C, netvoří sklerocia	Původ: prerijská půda, Severní Dakota Rozšíření: USA, Kanada Substrát: půda Význam: producent řady extrolitů, patogenita nebyla dosud zaznamenána
A. taichungensis Yaguchi, Someya & Udagawa 1995	kolonie krémové, měchýřky relativně malé, konidie drobně bradavčité, relativně velké (3-5 µm), roste při 37 °C, sklerocia tmavě hnědá	Původ: půda, Taiwan Rozšíření: Taiwan, Brazílie, Německo Substrát: půda, ovzduší Význam: producent řady extrolitů, patogenita nebyla dosud zaznamenána
A. tritici Mehrotra & Basu 1976	kolonie pomalu rostoucí, žlutavé více než u <i>A. candidus</i> , revers světle hnědý, konidiofory septátní, měchýřky podlouhlé, roste při 37 °C, sklerocia purpurová až černá	Původ: zrno pšenice, Indie Rozšíření: Indie, Afrika, Evropa Substrát: pšenice, půda Význam: producent řady extrolitů, patogenita nebyla dosud zaznamenána

Závěr: V rámci této malé sekce lze snadno odlišit žlutě zbarvený *A. campestris*. U ostatních druhů je dalším využitelným identifikačním znakem tvar měchýřky (kulovitý x protáhlý) a schopnost růstu při 37 °C (*A. candidus* neroste, *A. taichungensis* a *A. tritici* rostou). Z toho důvodu není vyloučeno, že druhy *A. taichungensis* a *A. tritici* by se mohly vyskytovat i mezi izoláty z klinického materiálu.

Sekce *Usti* (HOUBRAKEN et al., 2007, VARGA et al., 2008)

Tato sekce patří mezi početně menší skupiny, zahrnuje 7 anamorfních druhů (z toho 2 nově popsané a 1 nově zrevidovaný, viz Tab. 5) a 1 teleomorfní druh (*Emericella heterothallica*). Nejznámější zástupce, *A. ustus*, se vyskytuje na celé řadě substrátů (potraviny, půda, vnitřní prostředí budov). Tento druh byl také uváděn jako častý původce aspergilóz člověka.

Zástupce sekce lze podle produkce extrolitů rozdělit do tří skupin:

- producenti ustové kys. aj.: *A. ustus*, *A. granulatus*, *A. puniceus*,
- producenti drimanů aj.: *A. pseudodeflectus*, *A. calidoustus*, *A. insuetus*, *A. keveii*,
- producenti emethallicinů aj.: *E. heterothallica*.

Tab. 5. Nově popsané a nově revidované druhy sekce Usti (HOUBRAKEN et al., 2007, VARGA et al., 2008).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt a význam
A. calidoustus Varga, Houbraeken & Samson 2008	roste dobře při 37 °C, konidie hrubě bradavčité až echinulární, Ehrlichova reakce fialová	Původ: bronchoalveolární laváž pacienta, Holandsko Rozšíření: USA, Turecko, Finsko, Německo, Holandsko Substrát: ovzduší, guma, stavební materiály, člověk Význam: patogen člověka, producent extrolitů
A. insuetus (Bainier) Thom & Church 1929	neroste při 37 °C, omezený růst na YES, konidie hrubě bradavčité až echinulární, Ehrlichova reakce fialová, blízký druhu <i>A. kevei</i>	Původ: Jižní Afrika Rozšíření: Jižní Afrika, Španělsko Substrát: půda (?), člověk Význam: původce subkutánního onemocnění, producent extrolitů
A. kevei Varga, Frisvad & Samson 2007	neroste při 37 °C, roste dobře na CREA a YES, konidie hrubě bradavčité až echinulární, Ehrlichova reakce fialová	Původ: půda, Las Palmas, Kanárské ostrovy Rozšíření: Španělsko, USA, Turecko, Finsko, Německo, Holandsko Substrát: ovzduší, guma, stavební materiály, člověk Význam: producent extrolitů

Závěr: Pro identifikaci druhů této sekce lze využít schopnost růstu na CYA při 37 °C (*A. ustus*, *A. puniceus*, *A. insuetus* a *A. kevei* nerostou, ostatní rostou), dále růst a zbarvení na CREA (*A. ustus*, *A. insuetus* a *A. kevei* rostou dobře) a Ehrlichův test (negativní u *A. ustus*, *A. puniceus*, *A. pseudodeflectus* a *E. heterothallica*). Oprávněnost zařazení osmi druhů do této sekce potvrdily fylogenetické analýzy sekvencí pro beta-tubulin, calmodulin, aktin a ITS sekvencí. Na základě těchto analýz byl též od druhu *A. ustus* oddělen a nově popsán druh *A. calidoustus*, představovaný hlavně izoláty z klinického materiálu (VARGA et al. 2008). Je velmi pravděpodobné, že i u našich pacientů bude nový druh *A. calidoustus* zaznamenán.

Sekce Flavi (PETERSON et al., 2001, ITO et al., 2001, FRISVAD et al., 2005, PETERSON, 2008, PILDAIN et al., 2008)

Zástupci sekce *Flavi* tvoří charakteristické žlutozelené až hnědavé kolonie a uni- i biseriální konidiofory. Sekce zahrnuje v současné době minimálně 22 druhů (*A. arachidicola*, *A. avenaceus*, *A. bombycis*, *A. caelatus*, *A. coremiiformis*, *A. flavofurcatis*, *A. flavus*, *A. lanosus*, *A. leporis*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii*, *A. sojae*, *A. subolivaceus*, *A. tamarii*, *A. terricola* a *A. toxicarius*, teleomorfní druhy *Petromyces alliaceus* a *P. albertensis*). Z nich pět druhů bylo popsáno nově v posledních letech (viz Tab. 6). Oprávněné zařazení mnohých druhů v této sekci bylo potvrzeno ve studii PETERSONA (2008). Zařazení dalších druhů, např. *A. beijingensis* a *A. quizutongii* (LI et al. 1998) zatím nebylo potvrzeno.

Z hlediska potravinářské mykologie jde o nejvýznamnější sekci rodu *Aspergillus*. U devíti druhů byla prokázána schopnost produkovat aflatoxiny: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudotamarii* a *A. toxicarius*. Značný význam mají někteří zástupci této sekce i v oblasti lékařské, neboť patří k oportunním patogenům (viz např. HEDAYATI et al. 2007).

Tab. 6. Nové druhy sekce Flavi (PETERSON et al., 2001, ITO et al., 2001, FRISVAD et al., 2005, PETERSON, 2008, PILDAIN et al., 2008).

Druh	Charakteristické znaky	Výskyt a význam
A. arachidicola Pildain, Frisvad & Samson 2008	produkce aflatoxinů B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ a parasiticolidu, blízký druhu <i>A. parasiticus</i> , kolonie jsou však světlejší	Původ: listy a semena <i>Arachis hypogea</i> a <i>A. glabrata</i> , Argentina Význam: produkce aflatoxinů
A. bombycis S. W. Peterson, Y. Ito, B. W. Horn & T. Goto 2001	konidiofory hladké, konidie bradavčité (4-7 µm), roste omezeně při 37 °C, neroste při 42 °C, produkce aflatoxinů B a G, blízký druhu <i>A. nomius</i>	Původ: chovy bource morušového (<i>Bombyx mori</i>) v Japonsku Rozšíření: Japonsko, Indonézie Substrát: výměty bourců Význam: producent aflatoxinů
A. minisclerotigenes Vaamonde, Frisvad & Samson 2008	produkce aflatoxinů B ₁ , B ₂ a G ₁ , G ₂ + další metabolity odlišné od <i>A. arachidicola</i> , podobný druhům <i>A. flavus</i> a <i>A. parvisclerotigenus</i> , tvoří malá sklerocia	Původ: listy a semena <i>Arachis hypogea</i> a <i>A. glabrata</i> , Argentina Rozšíření: Argentina, Austrálie, Nigérie, USA Substrát: půda, burské oříšky Význam: producent aflatoxinů
A. parvisclerotigenus (Mich. Saito & Tsuruta) Frisvad & Samson 2005	R. 1993 popsán jako mikrosklerociální varieta <i>A. flavus</i> , tvoří malá sklerocia, charakteristický profil extrolitů (včetně aflatoxinu B a kys. cyklopiazonové)	Původ: semena <i>Arachis hypogea</i> , Argentina Význam: producent aflatoxinů
A. pseudotamarii Y. Ito, S. W. Peterson, Wicklow & T. Goto 2001	produkce aflatoxinů B (x blízké druhy <i>A. caelatus</i> a <i>A. tamarii</i> neprodukují), roste při 37 °C, neroste při 42 °C (x <i>A. tamarii</i> roste jak při 37 °C tak při 42 °C)	Původ: půda pole s čajovníkem, Japonsko Rozšíření: Japonsko, Argentina

Závěr: Ačkoliv sekce *Flavi* patří mezi nejintenzivněji studované skupiny rodu *Aspergillus*, v posledních letech o ní nebyla publikována souhrnná práce takového typu jako u výše uvedených sekcí. Srovnání mikroskopických znaků některých druhů je možno nalézt v práci autorů HEDAYATI et al. (2007). Nejaktuálnější studií je práce PETERSONA (2008), který provedl fylogenetickou analýzu sekvencí čtyř úseků DNA u cca 460 izolátů pokrývajících všechny sekce rodu *Aspergillus*, včetně sekce *Flavi*. Tato práce potvrdila jeho dřívější názor, že sekce *Wentii* je nadbytečná; část druhů je nejpríbuznější právě zástupcům sekce *Flavi*, samotný *A. wentii* je příbuzný druhům sekce *Cremeri*.

Sekce *Ochraceorosei* (FRISVAD et al., 2005)

Tato sekce rodu *Aspergillus* byla popsána teprve roku 2005. Obsahuje pouze dva druhy: *A. ochraceoroseus* a roku 2005 popsáný druh *A. rambellii* Frisvad & Samson (půda, Pobřeží Slonoviny), jehož konidie jsou šedožlutě zbarvené. Oba druhy produkují sterigmatocystin a aflatoxin B₁.

Souhrn

Průvodním znakem rychlého vývoje ve studiu rodu *Aspergillus* je absence určovacího dichotomického klíče všech dosud známých druhů, založeného na klasických fenotypových znacích. Je však pravděpodobné, že sestavit takový klíč již ani nebude možné. Ačkoliv některé druhy lze odlišit snadno, existují celé skupiny druhů, kde žádná jednotlivě použitá metoda (platí to zvláště pro studium morfologických znaků) neumožňuje bezchybné rozpoznání druhů.

Pro druhovou identifikaci a popis nových druhů se proto doporučuje komplexní využití všech dostupných metod (tj. studium znaků morfologických, fyziologických, biochemických

a molekulárních), tzv. polyfázový přístup (včetně multigenového přístupu v molekulárním studiu). Pokud jde o molekulární analýzy, pro rozlišení druhů v rodu *Aspergillus* se osvědčilo zvláště porovnání sekvencí pro beta-tubulin a calmodulin.

Cílem současného taxonomického studia rodu *Aspergillus* ve světě je vytvoření systému, který odráží morfologické, fyziologické, ekologické a fylogenetické vztahy (viz PETERSON 2008).

Poděkování

Děkuji za podporu institucionálnímu záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (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*. Eukaryotic Cell 4(3): 625-532.
- GEISER, D.M., KLICH, M.A., FRISVAD, J.C., PETERSON, S.W., VARGA, J., SAMSON, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud. Mycol. 59: 1-10.
- FRISVAD, J.C., MICK FRANK, J., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., SAMSON, R.A., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. Stud. Mycol. 50: 23-43.
- FRISVAD, J.C., SKOUBOE, P., SAMSON, R.A., 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient sproducer of aflatoxin 1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 28(5): 442-453.
- FRISVAD, J.C., SKOUBOE, P., SAMSON, R.A., 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii*, sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 28(5): 442-453.
- FRISVAD, J.C., SMEDSGAARD, J., SAMSON, R.A., LARSEN, T.O., THRANE, U., 2007. Fuminisin B₂ production by *Aspergillus niger*. J. Agric. Food Chem. 55: 9727-9732.
- HEDAYATI, M.T., PASQUALOTTO, A.C., WARN, P.A., BOWYER, P., DENNING, D.W., 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology 153: 1677-1692.
- 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.
- HONG, S.-B., SHIN, H.-D., HONG, J.-B., FRISVAD, J.C., NIELSEN, P.V., VARGA, J., SAMSON, R.A., 2008. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. Ant. Leeuwenhoek 93(1-2): 87-98.
- HOUBRAKEN, J., DUE, M., VARGA, J., MEIJER, M., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. Stud. Mycol. 59: 107-128.
- ITO, Y., PETERSON, S.W., WICKLOW, D.T., GOTO, T., 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycol. Res. 103(2): 233-239.
- LI, D.M., HORIE, Y., WANG, Y., LI, R., 1998. Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis. Mycoscience 39: 299-305.
- NOONIM, P., MAHAKARNCHANAKUL, W., VARGA, J., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A., 2008. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1727-1734.

- PERRONE, G., VARGA, J., SUSCA, A., FRISVAD, J. C., STEA, G., KOCSUBÉ, S., TÓTH, B., KOZAKIEWICZ, Z., SAMSON, R.A., 2008. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1032-1039.
- PETERSON, S.W., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100(2): 205-226.
- PETERSON, S.W., ITO, Y., HORN, B.W., GOTO, T., 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93(4): 689-703.
- PILDAIN, M.B., FRISVAD, J.C., VAAMONDE, G., CABRAL, D., VARGA, J., SAMSON, R.A., 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 725-735.
- PITT, J.I., SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C., 2000. List of accepted species and their teleomorphs in the family *Trichocomaceae*. In: SAMSON, R.A., PITT, J.I. (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*, Harwood Academic Publishers, p. 9-47.
- RAPER, K.B., FENNELL D., 1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 686 p.
- SAMSON, R.A., 2000: List of names of Trichocomaceae published between 1992 and 1999. In: SAMSON, R.A., PITT, J.I. (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus*, Harwood Academic Publishers, p. 73-79.
- SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.A.M.P., KUIJPERS, A.F.A., MICK FRANK, J., FRISVAD, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 50: 45-61.
- SAMSON, R.A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C., VARGA, J., 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 59: 129-145.
- SAMSON, R.A., VARGA, J. (Eds.), 2007. *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Stud. Mycol.* 59: 1-206.
- SERRA, R., CABAÑES, F.J., PERRONE, G., CASTELLÁ, G., VENÂNCIO, A., MULÈ, G., KOZAKIEWICZ, Z., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98(2): 295-306.
- VARGA, J., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud. Mycol.* 59: 75-88.
- VARGA, J., HOUBRAKEN, J., VAN DER LEE, H.A.L., VERWEIJ, P.E., SAMSON, R.A., 2008. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryotic Cell* 7(4): 630-638.
- VARGA, J., KOCSUBÉ, S., TÓTH, B., FRISVAD, J.C., PERRONE, G., SUSCA, A., MEIJER, M., SAMSON, R.A., 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1925-1932.
- VARGA, J., SAMSON, R.A., 2008. *Aspergillus* in the Genomic Era. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 334 p.
- DE VRIES, R.P., FRISVAD, J.C., VAN DE VONDERVOORT, P.J.I., BURGERS, K., KUIJPERS, A.F.A., SAMSON, R.A., VISSER, J., 2005. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. *Ant. Leeuwenhoek* 87: 195-203.
- ZOTTI, M., MONTEMARTINI CORTE, A., 2002. *Aspergillus persii*: A new species in section *Circumdati*. *Mycotaxon* 83: 269-278.

Monitoring výskytu entomopatogenních hub přirozeně asociovaných s populacemi lýkožrouta smrkového *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) ve smrčinách NP a CHKO Šumava

ZDENĚK LANDA, ANDREA BOHATÁ, JANA ŠIMKOVÁ

LANDA, Z., BOHATÁ, A., ŠIMKOVÁ, J.: Monitoring of entomopathogenic fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) at National Park and Protected Landscape Area Šumava.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 39. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

V období duben - září 2008 byl realizován plošný monitoring přirozeného výskytu mitosporických entomopatogenních hub asociovaných s různými vývojovými stádii lýkožrouta smrkového *I. typographus* včetně, sledování přítomnosti těchto hub v nikách výskytu tohoto škůdce (např. v kůře a v půdách). Monitoring výskytu entomopatogenních hub byl primárně zaměřen na cílené vyhledávání zjevně infikovaných imág (= růst patogena na povrchu kutikuly infikovaného jedince). V případě, že na dané lokalitě nebyl přímo nalezen infikovaný dospělec, byly odebírány vzorky kůr, přičemž byly vzorky přednostně odebírány z partií, ve kterých prokazatelně proběhl vývoj tohoto škůdce (degradace lýkové části). V těchto případech byly spolu se vzorky kůr odebírány i půdní vzorky z podstromů, resp. z blízkého okolí stromů, ze kterých byly současně odebrány i vzorky kůr. Monitoring byl realizován na více než 60 lokalitách NP Šumava, kdy výběr lokalit probíhal na základě konzultací s pracovníky Správy NP. V rámci monitoringu bylo doposud zachyceno ve všech vzorcích 124 kmenů entomopatogenních hub, z toho byly nejčastěji zachyceny druhy *Beauveria bassiana* (53 kmenů), *Isaria fumosorosea* (24 kmenů) a *B. brongniartii* (15 kmenů). Entomopatogenní houba *B. bassiana* byla nejčastěji izolována z dospělců lýkožrouta *I. typographus* (35 kmenů). V kůře bylo doposud nalezeno 16 kmenů a v půdě byla *B. bassiana* zastoupena jen 2 kmeny. Výhradně z dospělců byla izolována houba *B. brongniartii* (15 kmenů). Houba *Isaria fumosorosea* byla nejčastěji zachycena v kůře (19 kmenů). Pouze 4 kmeny byly odizolovány přímo z dospělců lýkožrouta. Při analýze půdních vzorků byla zachycena i houba *Metarhizium anisopliae* (5 kmenů). Výsledky pilotního monitoringu a situace z letošního roku naznačují, že entomopatogenní houby představují nejen obecně diverzní a významnou složku v biocenózách smrčin, ale i významný potenciál využitelný v rámci programů ekologie obnovy a managementu ekosystémů.

Studie monitoringu není doposud dokončena, proto budou výsledky publikovány až po jejím ukončení.

Keywords: entomopathogenic fungi, spruce bark beetle, NP and Protected Landscape Area Šumava
Zdeněk Landa, Andrea Bohatá, Jana Šimková, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studentská 13, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: zlanda@zf.jcu.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Fytofágní roztoči - noční můra mykologických laboratoří

ALENA NOVÁKOVÁ

NOVÁKOVÁ, A.: Phytophagous mites – a danger for mycological laboratories.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 40-44. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Phytophagous mites represent a danger for mycological laboratories in point of view of damaged cultures and of a contamination with fungal spores transported on mite surfaces. Causes of mites widespread, methods of their liquidation and protection of microfungal strains are presented in this article.

Keywords: mites, *Tyrophagus putrescentiae*, microscopic fungi, microfungal collections

Alena Nováková, Institute of Soil Biology, Biology Centre AS CR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice. E-mail: alena@upb.cas.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Fytofágní roztoči představují neustálou hrozbu pro živé kultury různých mikroorganismů včetně mikroskopických hub (DUEK et al., 2000, ONIONS, 1989, SMITH et ONIONS, 1983). Vyskytují se v půdě, na rostlinném materiálu, ale i na rostlinách a v skladovaných rostlinných produktech, krmivech a potravinách, přičemž kultury mikroskopických hub představují pro tyto bezobratlé živočichy velice atraktivní potravu. Přestože se neustále snažíme snížit riziko výskytu roztočů v mykologických laboratořích snížit na minimum a používáme různé metody pro ochranu kultur, každá laboratoř čas od času zaznamená výskyt roztočů. Mezi nejčastěji se vyskytující roztoče v laboratořích patří *Tyrophagus putrescentiae* (Obr. 1), známý skladištní škůdce.



Obr. 1. Fytofágní roztoč *Tyrophagus putrescentiae*.

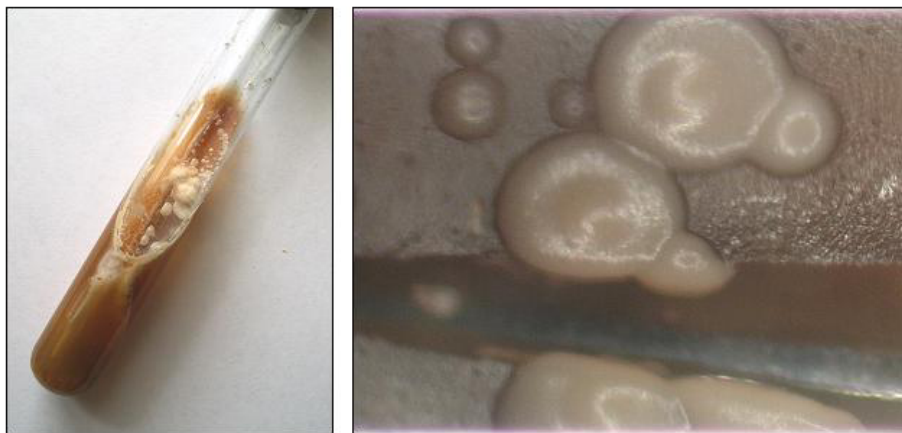
Ne vždy se nám podaří zaznamenat roztoče v kulturách na samém počátku napadení kultur. Nejméně chráněné jsou kultury mikromycetů na Petriho miskách. Roztoči se do Petriho misek dostávají poměrně snadno, v první fázi napadení jsou pouhým okem většinou nezjistitelné a proto se mohou v klidu naklást vajíčka. V miskách se dostatečně namnoží a postupně mohou napadat další kultury mikromycetů v jiných Petriho miskách, ale prolézají přes zátky z buničiny i do zkumavek. Velkým nebezpečím jejich výskytu v laboratoři je nejen případné zničení kultury při velkém napadení a následná likvidace kultur, ale jejich rychlé namnožení a migrace mezi Petriho miskami či zkumavkami. Protože se na povrchu jejich těla vyskytuje velké množství trichomů, migrující roztoči přenášejí na svém povrchu ulpívající konidie a přispívají tak ke znečištění čistých kultur mikromycetů.

Výskyt roztočů v kulturách na Petriho miskách někdy zaznamenáme až při zhotovení mikroskopického preparátu, aniž bychom na rostoucí kolonii zaznamenali nějaké viditelné změny. Většinou nás na výskyt roztočů upozorní výskyt drobných kolonií při okrajích Petriho misky nebo viditelné „cestičky“ tvořené koloniemi bakterií (Obr. 2) v místech kudy se roztoči pohybovali po agarové plotně a v některých případech zaznamenáme změny na povrchu kolonií mikromycetů (spásání okrajových částí kolonií). Obdobně je možné zaznamenat kolonie kvasinek i na šikmých půdách ve zkumavkách (Obr. 3), mnohdy však zaznamenáme výskyt na kulturách ve zkumavkách až velmi pozdě, kdy přemnožení roztočů v podstatě kompletně kulturu mikromycetů kompletně zdevastují (Obr. 4). Velmi nepříjemným faktem je i to, že roztoči nejenže napadnou pro ně atraktivní kmeny a vlastně je zcela zničí (nebo donutí nás z preventivních důvodů napadené kmeny okamžitě zlikvidovat), ale velkým nebezpečím je i postupné „stěhování“ těchto roztočů do dalších Petriho misek a zkumavek s kulturami. Tímto způsobem může docházet k postupné devastaci všech kultur mikromycetů v laboratoři, případně pokud tento atak nezachytíme včas, i ke zničení sbírkových kmenů, ať už mohutným přemnožením vedoucím k úplné likvidaci kultur, nebo ke znečištění kmenů sporami jiných mikromycetů, které roztoči přinášejí s sebou na svých tělech (Obr. 5). Za vhodných teplotních podmínek můžeme ve velmi krátkém čase vidět v napadených zkumavkách nebo Petriho miskách masový výskyt různých vývojových stadií včetně nakladených vajíček (Obr. 6), v některých případech zaznamenáme přítomnost roztočů až při prohlížení mikroskopických preparátů pod mikroskopem (Obr. 7).



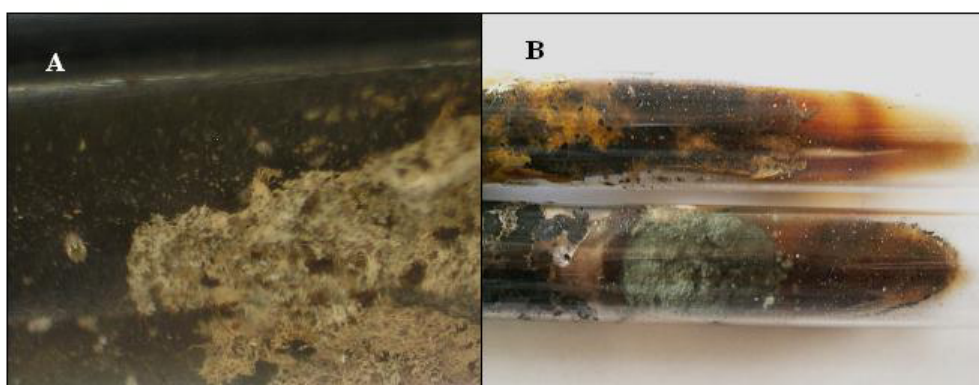
Obr. 2. Napadené kolonie mikroskopických hub na Petriho miskách – na povrchu agaru jsou patrné „cestičky“ vytvořené narostlými koloniemi mikromycetů a kvasinek v místech, kde se pohybovali roztoči.

Otázkou je, jak se proti napadení kultur mikromycetů v mykologických laboratořích chránit. Odpověď je snadná – dodržovat základní pravidla práce v mykologických laboratořích. To znamená dodržovat naprostou čistotu místností, používat čisté pracovní oblečení a obuv, vyloučit přítomnost materiálu, který by mohl představovat případný zdroj roztočů (květiny, vzorky půdy a rostlinného materiálu, zbytky potravin), pravidelné vysvícení místnosti UV zářením a používání dezinfekčních prostředků na omývání pracovních stolů, apod.). Kultury mikromycetů ve zkumavkách ochraňujeme např. napouštěním zátek z buničiny akaricidním roztokem. Přes dodržování těchto základních pravidel se čas od času v každé laboratoři nějaký roztoč objeví, ale ve většině případů se takový výskyt roztočů podaří rychle a hlavně úspěšně zlikvidovat.



Obr. 3. Napadené kolonie mikroskopických hub na šikmém agaru ve zkumavkách, vlevo – na povrchu agaru jsou kolonie kvasinek, vpravo – kolonie kvasinek, detail.

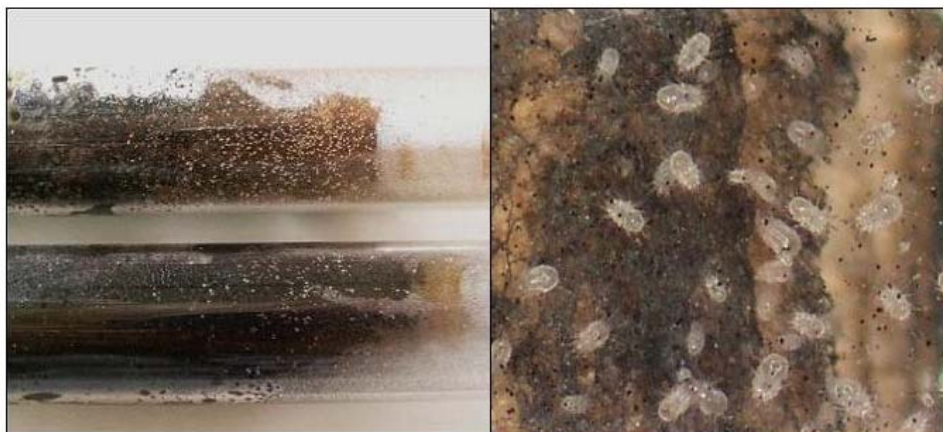
Jinak je tomu u nenadálých a většinou vynucených změn v pracovním režimu laboratoří, jako např. rekonstrukce laboratoří, umývání laboratorního skla nebo jejich havárií, výměna oken, malování apod. Všechny tyto situace společně s novým laboratorním vybavením (nový dřevěný nábytek) vedou ke zvýšenému výskytu roztočů v laboratořích.



Obr. 4. Napadené kolonie mikroskopických hub na šikmém agaru ve zkumavkách, A – zcela zdevastovaná kultura, B – sekundární znečištění původní kultury přenesením spor na těle roztočů.

V naší laboratoři se snažíme o zachování co nejlepších podmínek pro provoz mykologické laboratoře včetně pravidelného úklidu, zachování bezprašného prostředí, pravidelné sterilizace ovzduší místnosti UV zářením (germicidní lampa je zapínána během jednoho dne

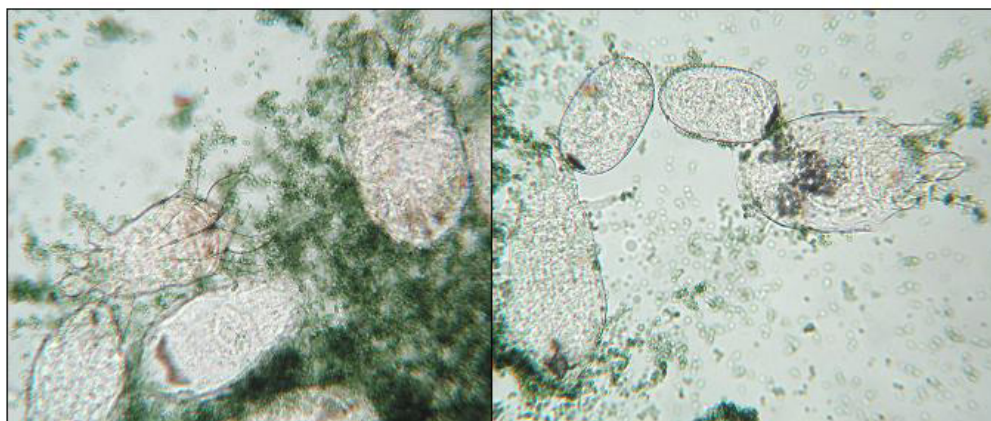
několikrát), uchovávání izolovaných kmenů mikromycetů v chladničkách a používání akaricidních roztoků pro napouštění zátek z buničiny u všech izolátů – a to okamžitě po přeočkování kultur mikromycetů na šikmé půdy do zkumavek. Přesto ani tato opatření nejsou vždy dostatečná - letošní rok byl pro naši laboratoř přímo katastrofický a kvůli masivnímu výskytu roztočů jsme museli zlikvidovat téměř všechny dosud neurčené izoláty mikromycetů. Tato situace nastala souhrou několika významných faktorů – poslední roky probíhala v sousedních místnostech celková rekonstrukce, během 48 hodin jsme přišli o dvě velké skříňové chladničky a tím i o prostor, kam uložit kmeny ve zkumavkách, v červenci začala výměna oken v budově a po mírné zimě následovalo od samého jara poměrně teplé počasí.



Obr. 5. Masivní napadení kultur ve zkumavkách, vpravo jsou vidět roztoči a jejich exkrementy.



Obr. 6. V napadených kulturách jsou vidět různá vývojová stádia i nakladená vajíčka roztočů.



Obr. 7. V mikroskopických preparátech připravených z napadených kultur je možné pozorovat různá vývojová stádia roztočů včetně jejich vajíček.

Čerstvě izolované kmeny mikromycetů, které byly rovněž napadeny roztoči, byly přednostně uloženy do chladniček, aby se tak zabránilo dalšímu množení roztočů, a postupně byly po dobu jednoho týdne ukládány do mrazničky. Při teplotě - 18 °C dochází k totálnímu zničení jak živých roztočů, tak i jejich vajíček, a mikroskopické houby lze znovu přeočkovat na nové médium. Tento pracný a časově náročný postup je možné uplatnit pouze u čerstvě napadených kmenů, u kterých nedošlo k příliš velkému poškození či případnému narušení konidií.

Závěrem je možné ještě jednou připomenout nezbytná pravidla provozování mykologických laboratoří (ONIONS, 1989) - čistota, úklid, dezinfekce, UV záření - ale také nezbytnost neustálé kontroly případné přítomnosti roztočů v kulturách mikromycetů a jejich urychlené likvidace. Nezbytná je i pravidelná likvidace všech vyřazených kultur hub v autoklávu – zvláště zapomenuté Petriho misky nebo zkumavky mohou sloužit pro nepozorované přemnožení roztočů v laboratoři. V neposlední řadě je nezbytné zabezpečit před roztoči sbírkové kmeny a samozřejmě i dosud nedeterminované kmeny. Metody ochrany sbírek před roztoči jsou podrobně popsány v pracích ONIONS (1989) a SMITH et ONIONS (1983). Jak se ale ukazuje, ani používání akaricidních látek nemusí být vždy účinné a proto v první řadě je třeba věnovat neustálou pozornost kontrole kmenů a vyloučit případný výskyt roztočů v laboratoři co nejdříve a předejít tak jejich masovému rozšíření..

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB BC AV ČR, v.v.i. – AV0Z60660521.

Přehled použité literatury

- DUEK, L., KAUFMAN, G., PALEVSKY, E., BERDICEVSKY, I., 2000. Mites in fungal cultures. *Mycoses* 44: 390-394.
- SMITH, D., ONIONS, A.H.S., 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. CMI, Kew, 51 p.
- ONIONS, A.H.S., 1989. Prevention of mites in cultures. In: <http://www.cbs.knaw.nl/publications/mites.aspx>, 2008.

Mikroskopické houby v ovzduší bytů v rekonstruovaných a v nerekonstruovaných domech v Českých Budějovicích

ALENA NOVÁKOVÁ

NOVÁKOVÁ, A.: Microscopic fungi in indoor air in reconstructed and unreconstructed houses in České Budějovice.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 45-51. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

The occurrence of micromycete spores in indoor air were compared in two flats which were situated in completely reconstructed and unreconstructed prefab houses. No significant differences were found between these flats, CFU counts per m³ of air were found higher in flat from reconstructed prefab house, but this situation correspond to the type of the airing and general living régime.

Keywords:

Alena Nováková, Institute of Soil Biology, Biology Centre AS CR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice. E-mail: alena@upb.cas.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Výskyt spor mikroskopických hub v ovzduší bytů je ovlivňováno celou řadou faktorů – od typu bytu včetně teploty a vlhkosti vzduchu až po počet obyvatel bytu a způsobu jeho užívání (způsob větrání, typ topení, sušení prádla, vaření, přítomnost květin v květináčích a domácích mazlíčků apod.). Výsledky studia ovzduší bytů z hlediska výskytu spor a „zaplísnění“ bytů v různých městech Slovenska (PIECKOVÁ et al., 2007) ukázaly ovlivnění výskytu mikroskopických hub v bytech jak teplotně-vlhkostními poměry, ale i dalšími faktory. Otázkou zůstává, jak je přítomnost mikroskopických hub v bytech ovlivněna celkovou rekonstrukcí panelových domů (zateplení domů, výměna starých oken za plastové). Vzhledem k neustále šířeným názorům, že po zateplení bytů a výměně oken dochází k mohutnému zaplísnění všech bytů v rekonstruovaném domě, rozhodla jsem se využít možnosti porovnat situaci v naprosto stejných bytech v zrekonstruovaném a nerekonstruovaném panelovém domě v Českých Budějovicích.

Materiál a metodika

Byly vybrány dva zcela identické byty 3 + 1 v Krčínově ulici na sídlišti Vltava v Českých Budějovicích, oba ve 2. patře panelového domu a se stejnou orientací ke světovým stranám. Domy jsou umístěny přímo proti sobě ve vzdálenosti 20 m. Jeden byt (K6) se nachází v kompletně zrekonstruovaném domě (Obr. 1a) a druhý (K4) v panelovém domě bez jakýchkoliv oprav (Obr. 1b). Součástí studie byl i dotazník podchycující různé údaje o provozu, bytu a jeho obyvatelích (Tab. 1). Výskyt spor v ovzduší bytů byl sledován v různých místnostech (kuchyně, koupelna, hala, dětský pokoj, obývací pokoj a ložnice).

Izolace mikroskopických hub z ovzduší sledovaných bytů a současně i z venkovního ovzduší byla uskutečněna jednorázově 12.9. 2007. Pro izolaci byla použita sedimentační metoda (the gravity settling culture plate method, BUTTNER et STETZENBACH, 1991), doba expozice 30 min. a jako izolační medium byl použit Sabouraudův agar s bengálskou červení, chloramfenikolem a streptomycinem (KREISEL et SCHAUER, 1987 FASSATIOVÁ, 1979). Izolace probíhala na 5 Petriho miskách, které byly kultivovány 7 dní při teplotě 25 °C. Narostlé kolonie mikroskopických hub byly odečteny a přepočteny na objem 1 m³ vzduchu.



Obr. 1. Pohled na panelové domy, ve kterých se nacházely sledované byty. A – Krčínova 6, B – Krčínova 4.

		byt 3+1, 2. patro, Krčínova 4	byt 3+1, 2. patro, Krčínova 6
počet osob v bytě		4	4
domácí mazlíček		ne	ne
květiny v bytě celkem		5 květináčů	75 květináčů
sušení prádla v bytě		ne	ano (koupelna)
vyrážení odpadků	každodenně	ne	ne
	když je koš plný	ano	ano
otevřené okno v kuchyni při vaření		ano	ano
vyskytla se někdy v bytě plíseň?		ne	ne
větrání:			
pravidelné každodenní	dlouhodobě	ložnice a dětský pokoj – celou noc	celoročně ložnice a dětský pokoj – celou noc
	krátkodobě	ne	celoročně ve všech místnostech
občasné	dlouhodobě	ne	přes léto ve všech místnostech
	krátkodobě	v kuchyni a v obývacím pokoji	

Tab.1. Charakteristika uživatelského režimu sledovaných bytů .

Výsledky a diskuse

Spektrum mikroskopických hub i počet narostlých kolonií (Obr. 2) z venkovního ovzduší bylo podle předpokladu vyšší než v případě vnitřního ovzduší ve sledovaných bytech. Ve venkovním ovzduší se vyskytovaly hojně kolonie tmavě pigmentovaných hub rodu *Cladosporium* a *Epicoccum*, ale i bílé kolonie, druhy rodu *Penicillium* byly zastoupeny ojediněle a druhy rodu *Aspergillus* nebyly vůbec zaznamenány. Hodnoty CFU v m³ vzduchu byly zjištěny přes 12 000 (Graf. 1). Jiná situace byla ve sledovaných bytech (Obr. 3, 4, 5, 6, 7 a 8, Graf 1). Počty byly zjištěny převážně pod hranici 200 jednotek v m³ a nepřesáhly hodnotu 400 jednotek v m³ vzduchu. I v případě vnitřního ovzduší nebyl vůbec zaznamenán výskyt kolonií rodu *Aspergillus*, kolonie rodu *Penicillium* se vyskytovaly hojněji, ale také v omezené míře.

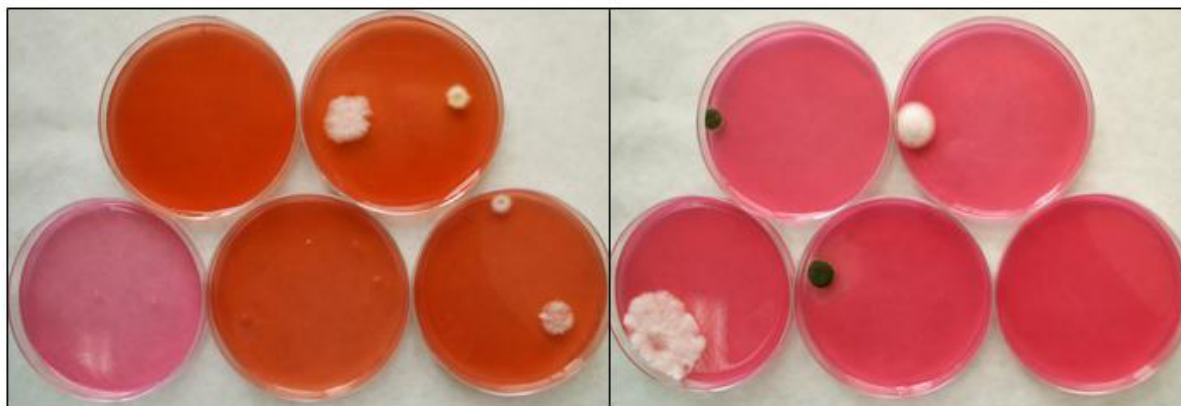


Obr. 2. Mikroskopické houby izolované z venkovního ovzduší.

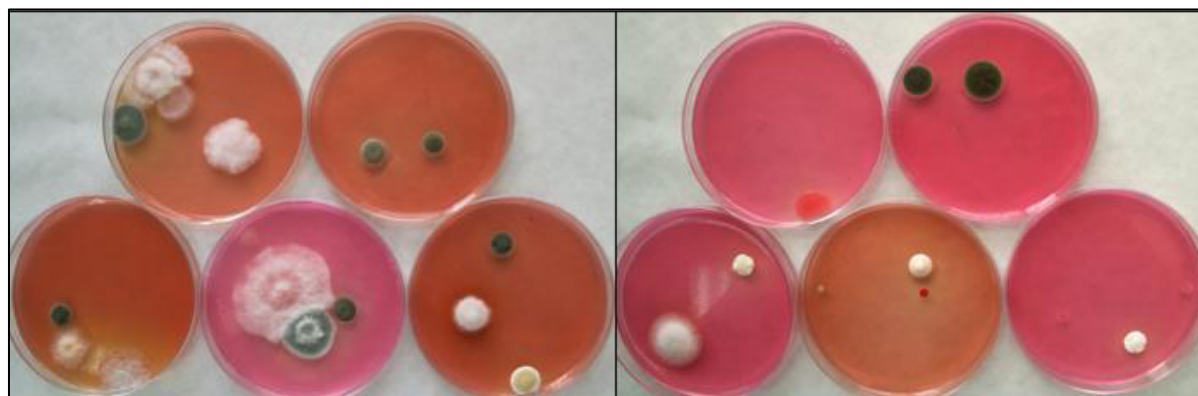
Porovnání výskytu spor v ovzduší sledovaných bytů jednoznačně ukázalo mnohem nižší hodnoty v bytě K4 (tj. v nerekonstruované domě). Při porovnání údajů, které nám poskytli obyvatelé tohoto bytu, a také známých skutečností o užívání tohoto bytu – např. uzavřená okna během víkendu (pobyt v rekreačním objektu každý víkend), občasné větrání bytu, malé množství květin v květináčích, jsou tyto výsledky vysvětlitelné. Naopak byt K6 je trvale obýván 4člennou rodinou, rodina pravidelně větrá ve všech místnostech, v bytě se nachází celkem 75 květináčů a během letního období uplatňuje dlouhodobé větrání. Výsledkem trvale otevřeného okna v ložnici tohoto bytu je nejen nejvyšší zaznamenaná hodnota počtu spor v m³, ale také spektrum izolovaných mikromycetů je obdobné jako ve venkovním ovzduší.

Přesto i v tomto případě je hodnota CFU nižší než přípouští norma (tj. 500 CFU. m³ – PIECKOVÁ, ústní sdělení).

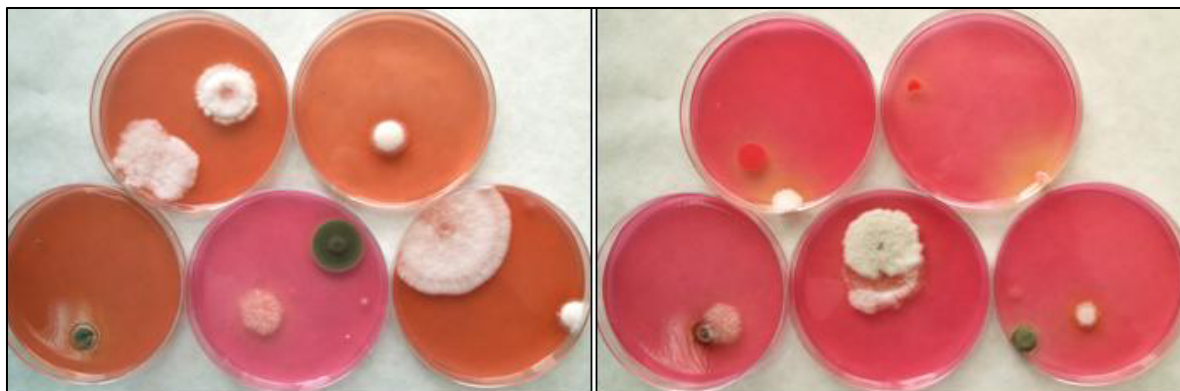
V každém případě je možné na základě těchto výsledků vyvrátit fámy o zaplesnivělých bytech v rekonstruovaných domech s plastovými okny, samozřejmě za předpokladu, že je dodržován vhodný režim, tj. pravidelné větrání zvláště v kuchyni při vaření, ale i v ostatních místnostech. Přestože v bytě K6 je pravidelně v koupelně sušeno prádlo, neprojevil se tento fakt na zvýšení počtů mikromycetů ani v této místnosti, ani v ostatních místnostech, ale ani na výskytu plísní na stěnách. Samozřejmě tato studie byla uskutečněna jednorázově na konci letního období a pro konečné závěry by bylo potřebné dlouhodobější sledování a to zvláště během topné sezóny, kdy je dodržování správného režimu větrání velice důležité a právě tento fakt může i výrazně ovlivnit (spolu s režimem v bytě, sušením prádla, pravidelným vařením, způsobem likvidace odpadků) i výskyt spor v ovzduší.



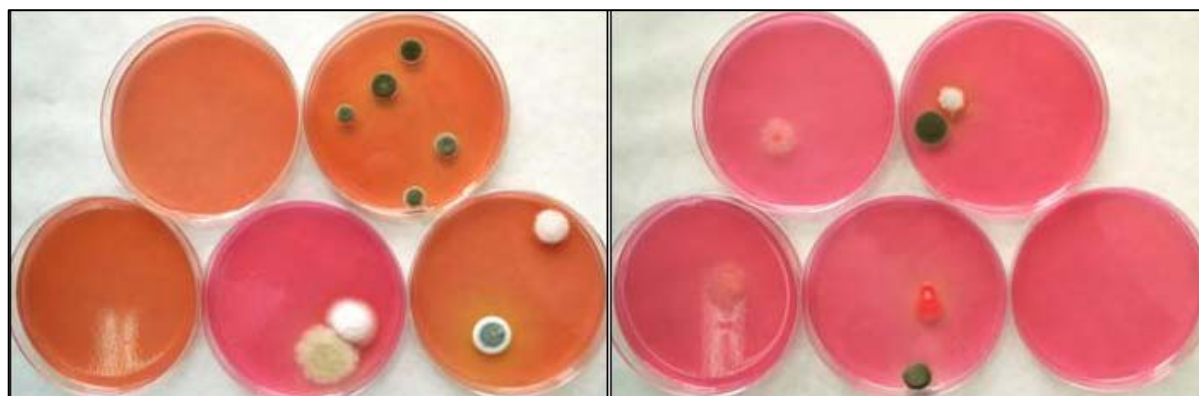
Obr. 3. Mikroskopické houby izolované z ovzduší koupelny, vlevo byt K6, vpravo byt K4.



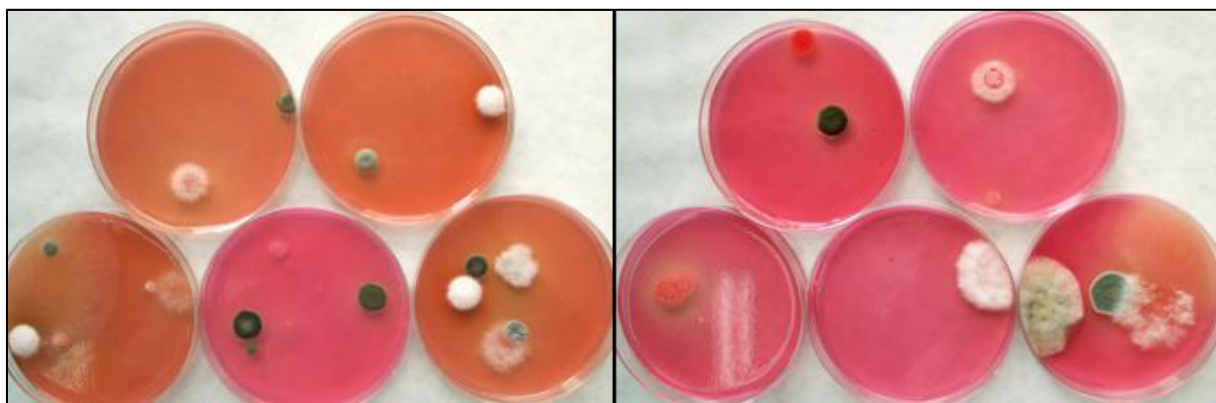
Obr. 4. Mikroskopické houby izolované z ovzduší haly, vlevo byt K6, vpravo byt K4.



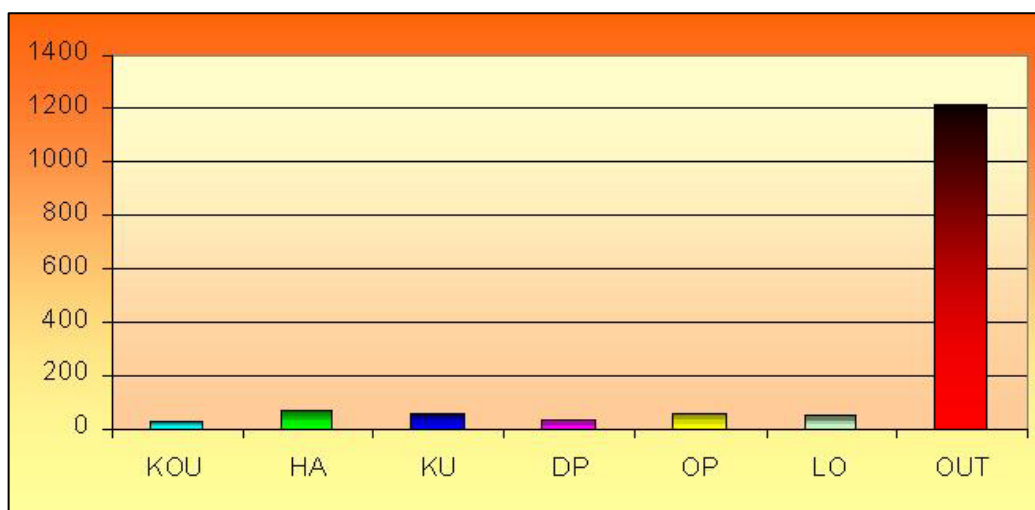
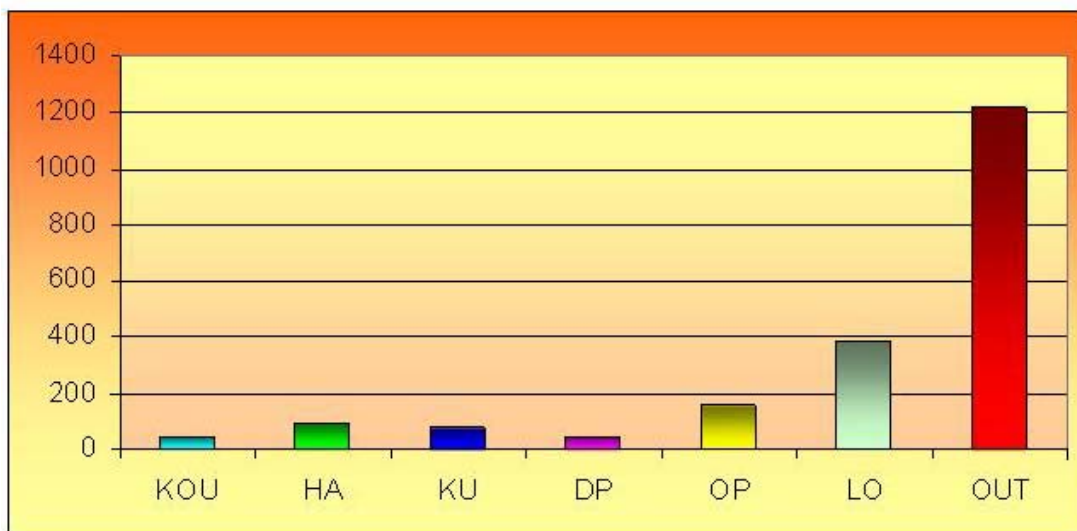
Obr. 5. Mikroskopické houby izolované z ovzduší kuchyně, vlevo byt K6, vpravo byt K4.



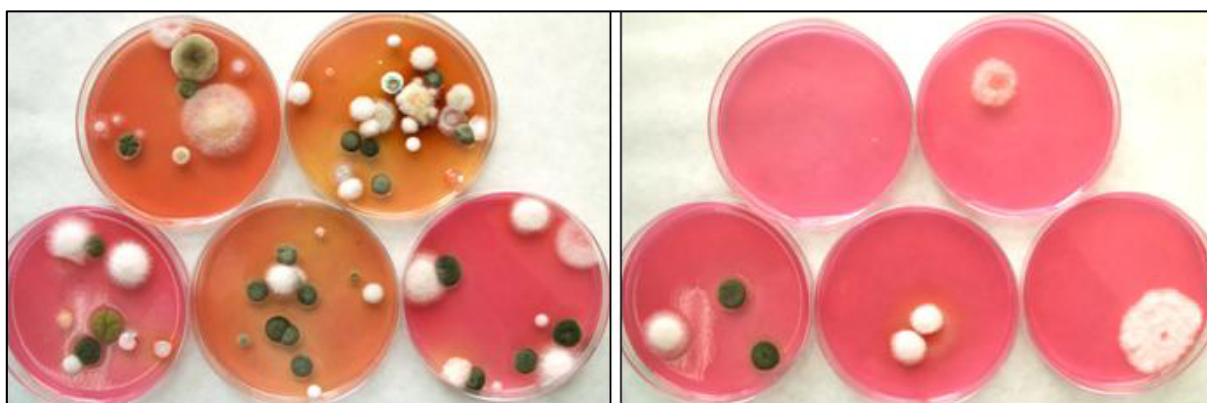
Obr. 6. Mikroskopické houby izolované z ovzduší dětského pokoje, vlevo byt K6, vpravo byt K4.



Obr. 7. Mikroskopické houby izolované z ovzduší obývacího pokoje, vlevo byt K6, vpravo byt K4.



Graf 1. Počty spor mikroskopických hub přepočtené na m³ vzduchu. Nahoře byt K6, dole byt K4 (KOU – koupelna, HA – hala, KU – kuchyně, DP – dětský pokoj, OP – obývací pokoj, LO – ložnice, OUT – venkovní ovzduší).



Obr. 8. Mikroskopické houby izolované z ovzduší ložnice, vlevo byt K6, vpravo byt K4.

Závěrem je možné konstatovat, že na základě tohoto sledování nebyly zjištěny ve výskytu mikroskopických hub v ovzduší žádné významné rozdíly mezi byty v rekonstruovaném a v nerekonstruovaném panelovém domě.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB BC AV ČR, v.v.i. – AV0Z60660521.

Přehled použité literatury

- BUTTNER, M. P., STETZENBACH, L.D., 1991. Evaluation of 4 aerobiological sampling methods for the retrieval of aerosolized *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microb. 57: 1268-1270.
- KREISEL, H., SCHAUER, F., 1987. Methoden des mykologischen Laboratoriums. Jena, 181 p.
- FASSATIOVÁ, O., 1979. Plísně a vláknité houby v technické mikrobiologii. SNTL, Praha, 211 p.
- PIECKOVÁ, E., KOLLÁRIKOVÁ, Z., STERNOVÁ, Z., BENDŽALOVÁ, J., 2007. Vyšetrenie vonkajšej, viditeľnej a skrytej vnútornej mykoflóry obytných budov v rôznych oblastiach SR. In: NOVÁKOVÁ, A. (Ed.), Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007, ÚPB AV ČR, České Budějovice, pp. 102-118.

Mikroskopické houby jako potrava jeskynních bezobratlých živočichů – laboratorní pokus potravní preference

ALENA NOVÁKOVÁ, PETER ĽUPTÁČIK, ĽUBOMÍR KOVÁČ, ALENA LUKEŠOVÁ, VLADIMÍR ŠUSTR

NOVÁKOVÁ, A., ĽUPTÁČIK, P., KOVÁČ, Ľ., LUKEŠOVÁ, A., ŠUSTR, V.: **Microscopic fungi as food of cave invertebrate animals – a laboratory food preference experiment.**

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 52-57. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

The aim was to improve the methodology of the multi-choice food preference tests as a tool for investigation of feeding preference of cave invertebrates. Fungi and algae isolated from cave sediments of the Domica Cave systém (NP Slovak Karst) were offered in cafeteria tests as a food to springtail *Folsomia candida*, mites *Pantelozetes cavatica* and *Scheloribates pallidulus*, and isopod *Mesoniscus graniger*. *M. graniger* preferred some species of algae, all offered fungi were rejected. Mainly algae and *Mucor* spp. from microscopic fungi are preferred by *S. pallidulus*. Preference of *Mucor* spp. was observed by cave mite *P. cavatica* and cave population of *F. candida* too. All cave animals showed low preference for offered food and have tendency to stay rather on clay cave sediment than on the food.

Keywords: cave, microscopic fungi, algae, cyanobacteria, food preference, mites, springtails, isopods

Alena Nováková, Alena Lukešová, Vladimír Šustr, Institute of Soil Biology, BC AS CR, v.v.i., České Budějovice, Na Sádkách 7, CZ-370 05, Czech Republic. E-mail: alena@upb.cas.cz
Ľubomír Kováč, Institute of Zoology, SAS, Löfflerova 10, 040 01 Košice and Faculty of Sciences, P.J. Šafárik University, Moysesova 10, 041 67 Košice, Slovakia.

Peter Ľuptáčík, Faculty of Sciences, P.J. Šafárik University, Moysesova 11, 047 61 Košice, Slovakia.

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, September 2-3, 2008.

Úvod

Většina jeskyní představuje prostředí chudé na organickou hmotu, a to zvláště při srovnání s povrchovými stanovišti. Přesto v oligotrofním prostředí jeskyní žije celá řada bezobratlých živočichů, o jejichž potravních nárocích dosud máme velmi málo informací. Podle potravní specializace patří např. mezi detritivorní, bakteriofágní, fytofágní nebo mykofágní druhy. Při nedostatku organické hmoty v jeskynním prostředí představují různé jeskynní mikroorganismy (mikroskopické houby, bakterie, řasy a sinice) případný zdroj živin pro bezobratlé živočichy. Z jeskynních sedimentů bylo v minulosti izolováno široké spektrum mikroskopických hub (NOVÁKOVÁ, 2008). Otázkou je, zda mikroskopické houby skutečně představují pro tyto živočichy vhodnou potravu. O potravních preferencích jeskynních bezobratlých existuje málo údajů. Byly zjištěny rozdíly v potravních preferencích troglobiontů a povrchových druhů u některých druhů členovců (KILBERTUS et VANNIER, 1981).

Potravní preference bezobratlých je možné zkoumat kombinací různých metodických přístupů včetně analýzy střevního obsahu (MCMILLAN, 1975), stanovení aktivity trávicích enzymů (SIEPEL et DERUITER-DIJKMAN, 1993), využití stabilních izotopů (SCHNEIDER et al., 2004), nebo porovnáním parametrů fitness na různých potravách (SCHEU et SIMMERLING, 2004). Další doplňkovou metodou mohou být laboratorní potravně preferenční testy, buď párové (JØRGENSEN et al., 2003) nebo s vícenásobnou nabídkou (multiple-choice tests neboli „kafetérie“, ROA, 1992).

Cílem této práce bylo předběžně otestovat některé metodické aspekty laboratorních preferenčních testů typu „kafetérie“ a jejich použitelnost pro studium potravních nároků různých skupin jeskynních bezobratlých.

Materiál a metodika

Jeskynní mikroorganismy izolované z jeskyně Domica ve Slovenském krasu byly kultivovány na Petriho miskách (mikroskopické houby 7 dní na sladinném agaru) a nabízeny na vyříznutém kousku agaru jako potrava v laboratorních preferenčních testech typu „kafetérie“. Testy byly zřízeny v Petriho miskách se sádrou pokrytou filtračním papírem (roztoči) nebo jeskynním sedimentem (stejnonožci a chvostoskoci). Jednotlivé potraviny byly uspořádány do kruhu po obvodu Petriho misky. Na jedné misce bylo nabízeno 8 (chvostoskoci a roztoči) nebo 10 (stejnonožci) druhů jeskynních mikroskopických hub a řas. Misky byly rozděleny na stejně velké sektory s potravinami a středový kruhový sektor o známé ploše. Pokusy byly založeny ve dvou variantách nabídek. Jedna obsahovala mikroskopické houby (varianta A), druhá (varianta B) směs mikroskopických hub (*Paecilium lilacinum* - Pl, *Clonostachys rosea* f. *rosea* - C, *Mucor* spp. - M, *Penicillium expansum* - Pe, *Penicillium variabile* - Pv, *Isaria farinosa* - If, *Doratomyces stemonitis* - Ds, *Talaromyces flavus* - Tf, *Trichoderma polysporum* - Tp, *Penicillium glandicola* - Pg.), řas a sinic (*Scotiellopsis terrestris* - St, *Botrydiopsis intercedens* - B, *Spongiochloris irregularis* - Si, *Chlamydomonas* sp. - Ch, *Pseudoeudoclonium printzii* - Pp, *Xanthonema debile* - Xd, *Stichococcus bacillaris* - Sb, *Heterococcus* sp. - H, *Protosiphon botryoides* - Pb, *Nostoc* sp. - N). Byly založeny tři misky pro každou z experimentálních variant.

Testování byli jeskynní živočichové – chvostoskok *Folsomia candida*, roztoč *Pantelozetes cavatica* a stejnonožec *Mesoniscus graniger* – a jeden půdní roztoč *Scheloribates pallidulus*. 20 jedinců roztočů *P. cavatica* a *S. pallidulus*, 10 jedinců *Folsomia candida* a *Mesoniscus graniger* bylo na začátku pokusu umístěno do středu experimentálních misek. Přítomnost živočichů na potravinách byla desetkrát odečítána v intervalu 24 hodin a součty počtů živočichů v jednotlivých sektorech byly porovnávány s teoretickým předpokladem rovnoměrného rozložení živočichů po celé ploše experimentální misky včetně středového kruhu a s předpokladem stejného počtu zvířat v jednotlivých sektorech s potravou (X^2 test pozorovaných a očekávaných četností, STATISTIKA v 6.0) v každém z deseti odečtů zvlášť.

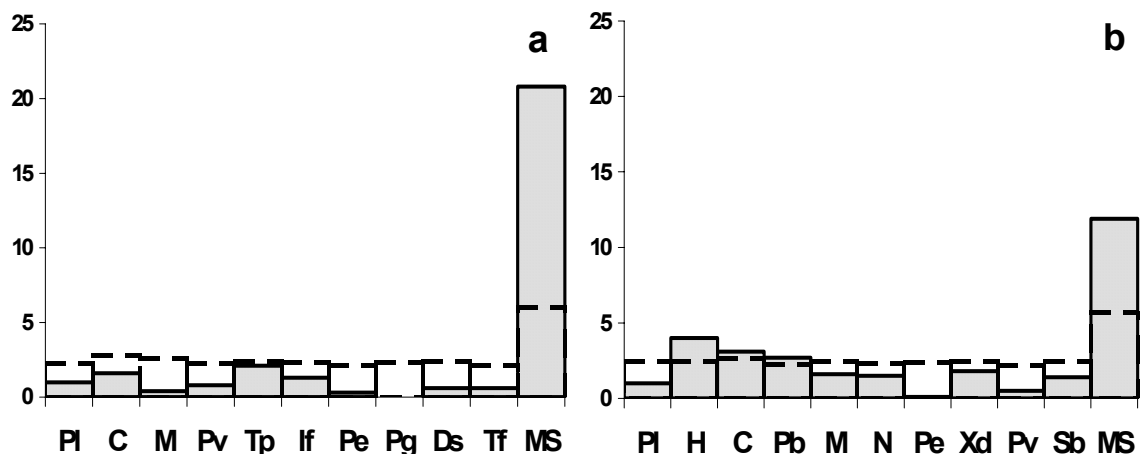
Výsledky

Mesoniscus graniger

Žádná z mikroskopických hub nabízených ve variantě A stejnonožcům mimo *T. polysporum* nedosáhla návštěvnosti odpovídající náhodnému rozložení zvířat po celé ploše misky (Graf 1a). Většina jedinců se zdržovala na jeskynním sedimentu ve středu Petriho misek. Všechny 10 odečtů vykazovalo signifikantní rozdíl pozorovaných četností výskytu od náhodného rozložení, ale rozdíl spočíval v přesunu jedinců do středového kruhu bez potravy. Jen u jednoho odečtu byla signifikantní také odchylka od stejných počtů jedinců na potravinách.

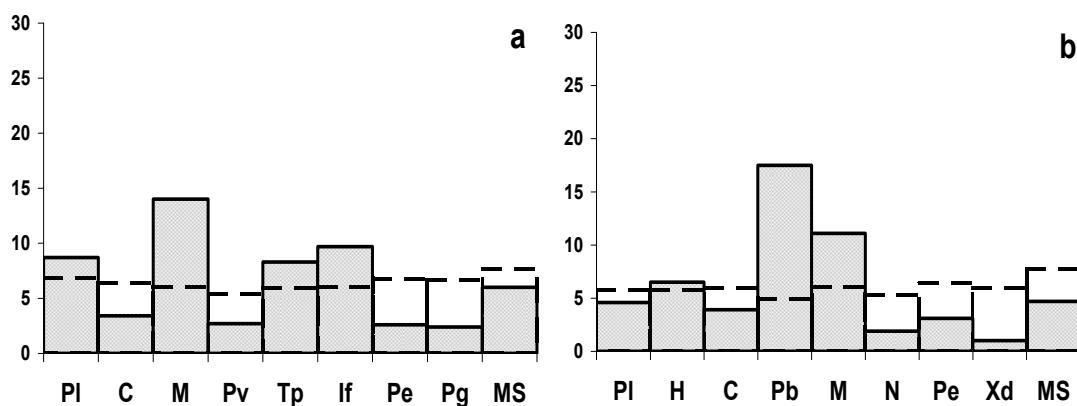
Ve směsné variantě byla většina testovaných jedinců také ve středu misky (Graf 1b). Nad teoretickými počty podle plochy leží pouze *C. rosea* f. *rosea* a řasy *Heterococcus* sp. a *P. botryoides*. Signifikantní odchylku od rovnoměrného rozložení po ploše vykazuje 7 z 10

odečtů. Z toho je ve dvou případech nesignifikantní srovnání mezi potravinami. V jednom případě je signifikantní pouze srovnání mezi potravinami, ale podle plochy ne.



Graf 1. Součty počtů jedinců *M. graniger* na jednotlivých potravinách (šedé sloupce) ve srovnání s teoretickým náhodným rozložením (čárkované sloupce). a – houby, b – směs. MS – mimo sektory s potravou.

Scheloribates pallidulus

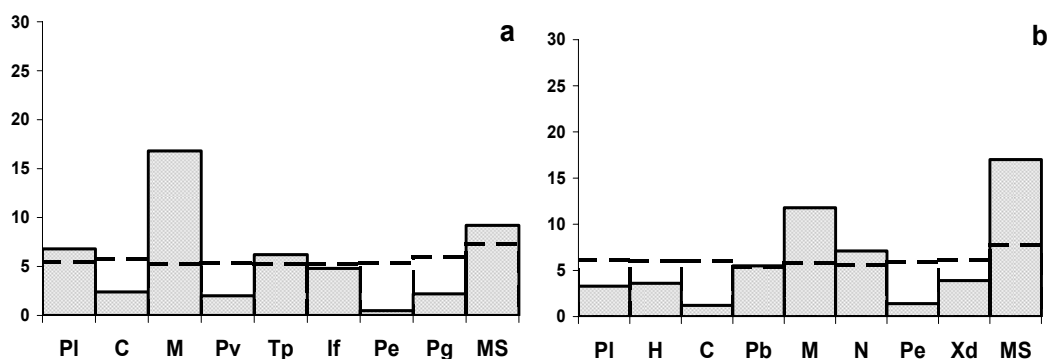


Graf 2. Součty počtů jedinců *S. pallidulus* na jednotlivých potravinách (šedé sloupce) ve srovnání s teoretickým náhodným rozložením (čárkované sloupce). a – houby, b – směs. MS – mimo sektory s potravou.

Půdní roztoč *S. pallidulus* preferoval z nabídky mikroskopických hub několik testovaných druhů mikroskopických hub - *Mucor* spp., *I. farinosa*, *T. polysporum* a *P. lilacinum* (Graf 2a). Opomíjené byly *C. rosea* f. *rosea*, *P. expansum*, *P. glandicola* a *P. variabile*. Ve směsné variantě (Graf 2b) byla nad očekáváním návštěvnost řas *P. botryoides* a možná i *Heterococcus* sp., z hub *Mucor* spp. Více jedinců se zdržovalo na potravinách než mimo ně (MS). Podle poměrů počtů v sektorech navštěvovali roztoči více kultury řas než mikroskopických hub, v přímém srovnání ve směsi převažuje řasa (*P. botryoides*) nad houbou (*Mucor* spp.).

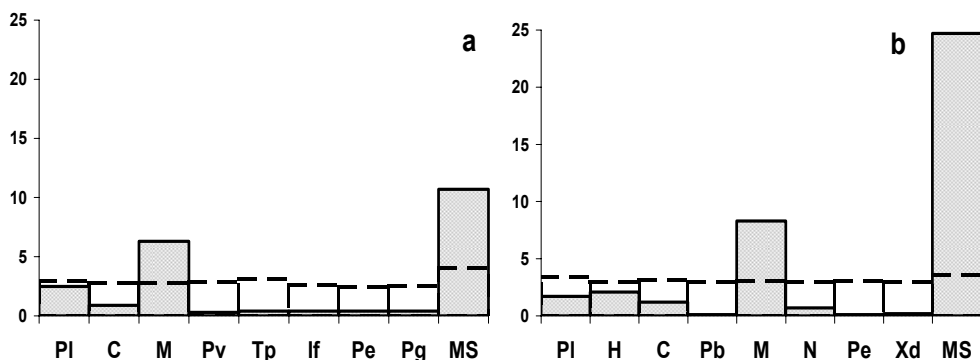
Pantelozetes cavaticus

Z mikroskopických hub (Graf 3a) byl preferovaný *Mucor* spp., spíše opomíjené byly *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. variabile* a *Clonostachys rosea* f. *rosea*. Ve směsi (Graf 3b) byl často navštěvovaný opět *Mucor* spp., ostatní potraviny kromě sinice *Nostoc* sp. byly spíše opomíjené, hlavně *Clonostachys rosea* f. *rosea* a *P. expansum*. V přímém srovnání převažuje houba (M) nad řasami. Na rozdíl od *S. pallidulus* bylo zaznamenáno více jedinců mimo sektory s potravou.



Graf 3. Součty počtů jedinců *P. cavaticus* na jednotlivých potravinách (šedé sloupce) ve srovnání s teoretickým náhodným rozložením (čárkované sloupce). **a** – houby, **b** – směs. MS – mimo sektory s potravou.

Folsomia candida



Graf 4. Součty počtů jedinců *F. candida* na jednotlivých potravinách (šedé sloupce) ve srovnání s teoretickým náhodným rozložením (čárkované sloupce). **a** – houby, **b** – směs. MS – mimo sektory s potravou.

Na miskách, kde byly chvostoskokům nabízeny houby (Graf 4a), nad očekávanými počty vypočtenými z náhodného rozdělení po ploše vyčníval pouze *Mucor* spp., všechny ostatní potraviny s výjimkou *P. lilacinum*, vykazovaly menší návštěvnost než odpovídá náhodnému rozložení (spíše chvostoskoky odpuzovaly). Signifikantní byly všechny testované odečty, z toho dva vykazovaly signifikantní odchylky od náhodného rozložení po ploše, i když bylo srovnání četností na potravinách nesignifikantní. Z toho plyne, že nebyla signifikantní pouze preference *Mucor* spp., ale i vyšší počty chvostoskoků ve středu misky na jeskynním

sedimentu než na potravách. Ze všech potrav ve směsné variantě (Graf 4b) pouze *Mucor* spp. vykazoval vyšší návštěvnost než bylo očekáváno. Signifikantní byly všechny odečty při srovnání podle plochy stejně jako při srovnání četností na potravách. Všude byl velký převis počtů jedinců zdržujících se ve středu mimo potravu nad počty v sektorech s potravou.

Diskuse a závěry

Výsledky experimentu ukázaly, že na rozdíl od předchozích předběžných testů (ŠUSTR et al., 2005) preferoval testovaný jeskynní stejnonožec *M. graniger* pouze některé řasy a nabízené kultury mikroskopických hub tyto živočichy spíše odpuzovaly. Obecně se ale všichni jedinci zdržovali většinou na jeskynním sedimentu, který požírali. Také chvostoskoci *F. candida* výrazně preferovali jeskynní sediment nad většinou potrav. Jeskynní sediment a v něm se vyskytující mikroorganismy mohou být dalším možným zdrojem nebo doplňkem potravy (KILBERTUS et VANNIER, 1981). U jeskynních chvostoskoků chovaných na jílových sedimentech bez potravy byly zaznamenány velmi dlouhé doby přežití (THIBAUD, 1981; CHRISTIANSEN, 1970), i když bakterie obsažené v tomto substrátu nejsou považovány za dostatečný zdroj potravy pro dlouhodobé přežívání a reprodukci (HOPKIN, 1997). Selektivní bakteriofágie v laboratorních preferenčních párových testech a různá stravitelnost bakteriálních kmenů je u *Folsomia candida* potvrzena (THIMM et al., 1998). *F. candida* se v přírodních podmínkách zdá být omnivorní a velmi adaptabilní k rozličným potravním zdrojům. Požírá kromě mrtvé organické hmoty a houbového mycelia i hlístice a bakterie (TEBBE et al., 2006).

Ze dvou srovnávaných druhů roztočů vykazoval výrazné preference některých potrav pouze půdní druh *S. pallidulus*. Ten preferoval spíše řasy, z mikroskopických hub pak hlavně *Mucor* spp. Rod *Scheloribates* bývá řazen mezi panfytofágy (LUXTON 1972) a fungivorní „grazers“ (SIEPEL et DERUITER-DIJKMAN, 1993). Preferenční testy s *Scheloribates laevigatus* ukázaly, že tento druh konzumoval kromě mikroskopických hub (HUBERT et al., 1999) i půdní řasy (HUBERT et LUKEŠOVÁ, 2001).

Jeskynní druh *P. cavaticus* se zdržoval spíše mimo potrav než na potravách, i když v tomto případě byl místo jeskynního substrátu použit jako podklad filtrační papír položený na sádku. To může souviset s často diskutovanou větší odolností jeskynních bezobratlých k hladovění (HOPKIN, 1997). I tento druh by podle svého systematického postavení mohl být panfytofágní (LUXTON, 1971) a patřit podle enzymatického vybavení do některé z fungivorních skupin trávících přinejmenším buněčný obsah hub. Zatím byla u něho předběžně prokázána přítomnost trehalázy, výskyt celulózy a chitinázy je sporný (NOVÁKOVÁ et al., nepublikováno). Ze všech potrav lze mluvit o nějakých preferencích pouze u *Mucor* spp. Tato houba má vyšší preferenci i ve srovnání s řasami ve směsi. Není však jisté do jaké míry je *Mucor* spp. zdrojem potravy a do jaké míry slouží jako úkryt nebo jako překážka, do které se roztoči zamotávají. Podobné preference kultur *Mucor* spp. vykazují i chvostoskoci *F. candida* – v našich předchozích testech jedinci tohoto druhu výrazně vyhledávali kolonie této houby, v jiných testech preferovali např. *Mucor hiemalis* (SCHEU et SIMMERLING, 2004). Ale předběžná stanovení rozpustných cukrů a bílkovin naznačují, že *Mucor* spp. nepatří mezi druhy s nejvyšší koncentrací snadno dostupných živin (NOVÁKOVÁ et al., nepublikováno).

Výsledky jednotlivých opakování jsou velmi variabilní. Do budoucna bude třeba přehodnotit experimentální design, hlavně použití jeskynního sedimentu jako podkladu (vyloučení doplňkové potravy), zvýšit počet opakování a modifikovat nabídku mikroorganismů.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB BC AV ČR, v.v.i. – AV0Z60660521.

Přehled použité literatury

- HOPKIN, S.P., 1997. Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford Univ. Press, Oxford, N.Y., Tokyo, 330 p.
- HUBERT, J., LUKEŠOVÁ, A., 2001. Feeding of the panphytophagous oribatid mite *Scheloribates laevigatus* (Acari: Oribatida) on cyanobacterial and algal diets in laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 16: 77–83.
- HUBERT, J., ŠUSTR, V., SMRŽ, J., 1999. Feeding of the oribatid mite *Scheloribates laevigatus* (Acari: Oribatida) in laboratory experiments. Pedobiologia 43: 328–339.
- CHRISTIANSEN, K., 1970. Survival of Collembola on clay substrates with and without food added. Ann. Spéléol. 25: 244–273.
- JØRGENSEN, H.B., ELMHOLT, S., PETERSEN, H., 2003. Collembolan dietary specialisation on soil grown fungi. Biol. Fertil. Soils (2003) 39: 9–15.
- KILBERTUS, G., VANNIER, G., 1981. Relations microflore-microfaune dans la grotte de Sainte-Catharine (Pyrénées ariégeoises) II. – Le régime alimentaire de *Tomocerus minor* (Lubbock) et *Tomocerus problematicus* Cassagnau (Insects Collembolles). Rev. Écol. Biol. Sol 18: 319–338.
- LUXTON, M., 1972. Studies on the oribatid mites of a Danish beech wood soil. I. Nutritional biology. Pedobiologia 12: 434–463.
- NOVÁKOVÁ, A., 2008. Mikroskopické houby v jeskynních sedimentech a hieroglyfech – úvodní studie. In: ĎUGOVÁ, O. (Eds.) Život v půdě IX, zborník referátov z medzinárodnej konferencie 30.-31.1.2008, Bratislava, CD-ROM, pp. 48–59.
- MCMILLAN, J.H., 1975. Interspecific and seasonal analysis of the gut contents of three Collembola (family Onychiuridae). Rev. Écol. Biol. Sol 12: 449–457.
- ROA, R., 1992. Design and analysis of multiple-choice feeding-preference experiments. Oecologia 89: 509–515.
- SCHEU, S., SIMMERLING, F., 2004 Growth and reproduction of fungal feeding Collembola as affected by fungal species, melanin and mixed diets. Oecologia 139: 347–353.
- SCHNEIDER, K., MIGGE, S., NORTON, R.A., SCHEU, S., LANGEL, R., REINEKING, A., MARAUN, M., 2004. Trophic niche differentiation in soil microarthropods (Oribatida, Acari): evidence from stable isotope ratios ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). Soil Biol. Biochem. 36: 1769–1774.
- SIEPEL H., DE RUITER-DIJKMAN E.M., 1993. Feeding guilds of oribatid mites based on their carbohydrase activities. Soil Biol. Biochem. 25: 1491–1497.
- ŠUSTR, V., ELHOTTOVÁ, D., KRIŠTŮFEK, V., LUKEŠOVÁ, A., NOVÁKOVÁ, A., TAJOVSKÝ, K., TRÍSKA, J., 2005. Some aspects of ecophysiology of cave isopod *Mesoniscus graniger* (Frivaldszky, 1865). Eur. J. Soil Biol. 41: 3–4, 69–75.
- TEBBE, C.C., CZARNETZKI, A.B., THIMM, T., 2006. Collembola as a habitat for microorganisms. In: KÖNIG H., VARMA A. (Eds.) Soil Biology, Vol. 6. Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates, Springer, Berlin etc., pp. 133–153.
- THIBAUD, J.M., 1981. Limite temporelle de résistance au jeûne partiel chez les insectes Collembolles cavernicoles. Rev. Écol Biol. Sol 18: 391–396.
- THIMM, T., HOFFMANN, A., BORKOTT, H., MUNCH, J.C., TEBBE, C.C., 1998. The gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola) is a frequently changeable but selective habitat and a vector for microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2660–2669.

Zajímavé nálezy mikromycetů

ALENA NOVÁKOVÁ

NOVÁKOVÁ, A.: Interesting records of microscopic fungi.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 58-62. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Six saprotrophic microfungi were presented in this paper – they were isolated during the study of micromycetes from cave systems of the Czech Republic, Slovakia and Romania and from soils of post-mining areas in the U.S.A. Their occurrence and morphology were compared with literature records.

Keywords: microscopic fungi, soil, caves, bat guano, excrements

Alena Nováková, Institute of Soil Biology, Biology Centre AS CR, v.v.i., Na Sádkách 7, 370 05 České Budějovice. E-mail: alena@upb.cas.cz

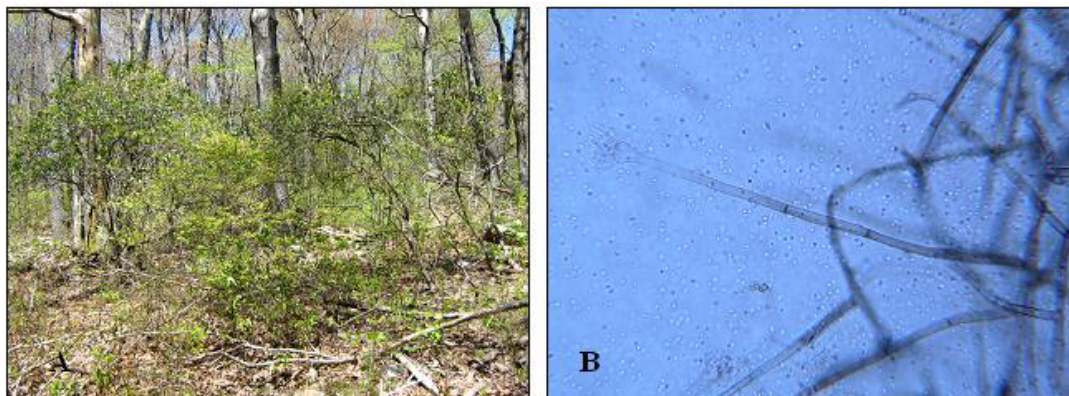
* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

V průběhu studia mikroskopických hub v různých substrátech (půda, jeskynní ovzduší a sediment, exkrementy živočichů, kosterní ostatky, apod.) byly izolovány některé druhy zajímavé typem substrátu, ze kterého byly izolovány, nebo svou morfologií, apod. Údaje o jejich místě výskytu, morfologii a porovnání s literárními údaji jsou uvedeny v této práci.

Goidanichiella barronii Gams, Steiman & Seigle-Murandi (Obr. 1)

Tento druh byl izolován v roce 2008 z půdy přirozeného lesního porostu v Tennessee, USA (*Liriodendron tulipifera*, *Quercus ruber*, *Acer* sp., stálezelené keře) pomocí zředovací metody izolace. Rod *Goidanichiella* obsahoval jen tento druh, ale nedávno byly popsány ještě další dva druhy – *G. fusiforma* K.D Hyde, Yanna, A. Pinnoi & E.B.G. Jones z palmových listů v Bruneu a Thajsku (HYDE et al., 2002) a *G. cylindrospora* D.W. Li & G.H. Zhao z dubové kůry v Connecticutu v USA (LI et ZHAO, 2007)

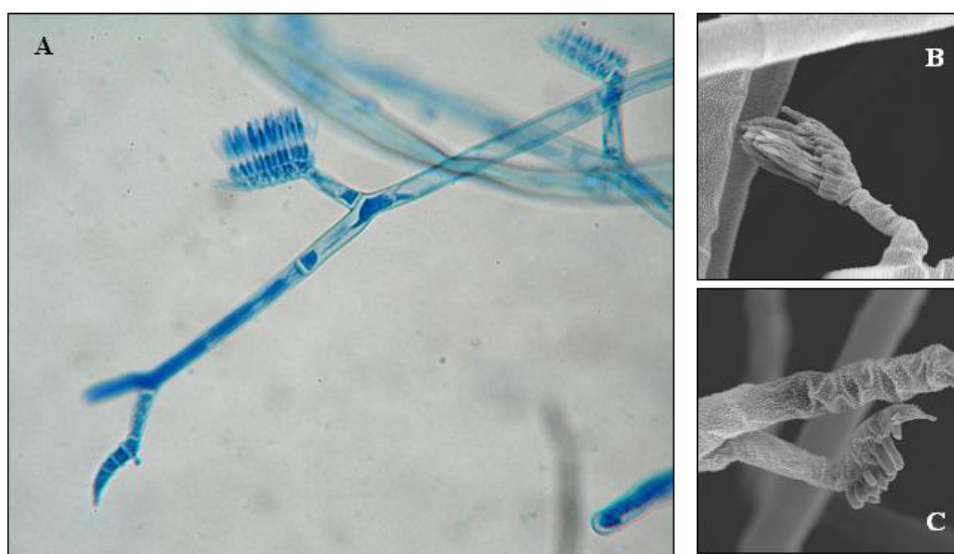
G. barronii patří mezi řídce izolované druhy – v CBS je uloženo 5 kmenů izolovaných z Německa, Francie a Canady. Z naší republiky byl tento druh izolován z půdy v blízkosti Studené hory na území NP Šumava (NOVÁKOVÁ, 2007).



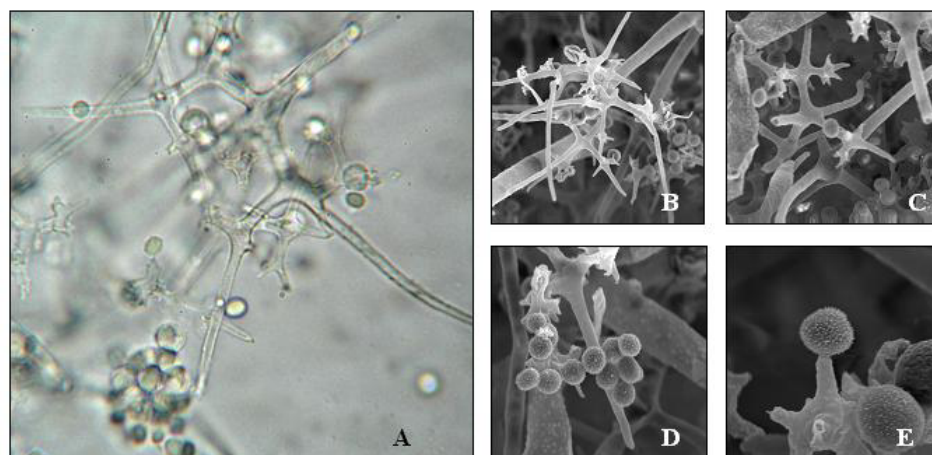
Obr. 1. A - přirozený listnatý porost v Tennessee, USA, foto K. Tajovský, B – *Goidanichiella barronii*, konidiofór a konidie.

***Coemansia aciculifera* Lindner (Obr. 2)**

Tento zástupce třídy Zygomycetes (Kickxellaceae) byl již v roce 2005 zaznamenán ve formě makroskopických kolonií na čerstvém netopýřím guánu v jeskyni Domica (NOVÁKOVÁ, 2007), ale vzhledem k neúspěšné izolaci a možnosti pozorovat tuto houbu jen pomocí mikroskopického preparátu zhotoveného z odebraného materiálu, nebyla možná determinace až na druhovou úroveň. Vazba této houby na netopýří guáno je známa i z literatury, např. KENDRICK (2002), údaje o výskytu na našem území i ve světě uvádí NOVÁKOVÁ (2007). Na podzim v roce 2007 se podařilo tuto houbu izolovat z jeskynního sedimentu odebraného v Dlhé chodbě v jeskynním systému Domica – Baradla. V letošním roce byly kolonie *C. aciculifera* opakovaně pozorovány na jeskynním sedimentu v mikrokosmech pro laboratorní chov chvostoskoků *Folsomia candida*.



Obr. 2. *Coemansia aciculifera*, A - sporangiofór s mnohobuněčnými sporokládii (12,5 x 40), B,C – sporokládia s pseudofialidami a merosporangiemi (SEM).



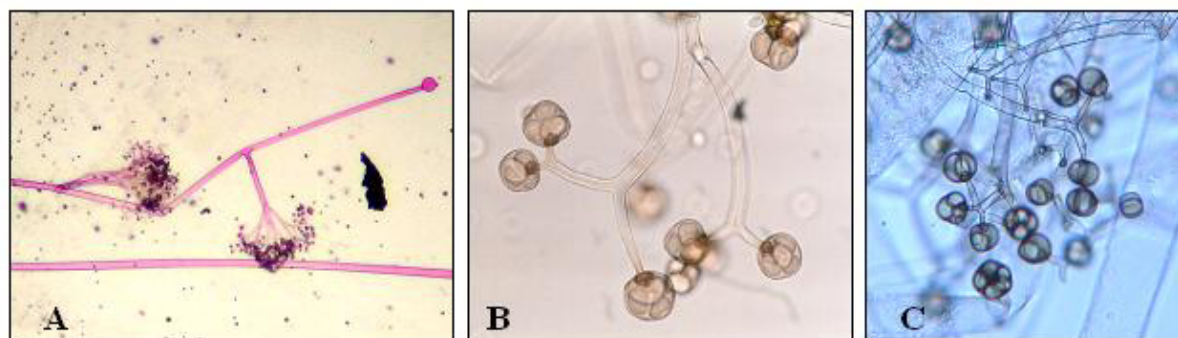
Obr. 3. *Chaetocladium brefeldii*, A – část sporangiofóru s monosporickými sporangii, B,C – části sporangiofóru s monosporickými sporangii (SEM), D – sterilní spine a sporangia (SEM), E – detailní pohled na monosporické sporangium vyrůstající na pedicelu (SEM).

***Chaetocladium brefeldii* Tiegh. & G. Le Mon. (Obr. 3)**

Tento koprofilní druh čeledi Thamnidiaceae (Zygomycetes, Mucorales) byl izolován pomocí zředovací metody z kuního sedimentu odebraného v Ardovské jeskyni (NP Slovenský kras, Slovensko). Z České a Slovenské republiky zřejmě zatím nebyl ještě izolován. BENNY (2008) řadí *C. brefeldii* mezi fakultativní parazity jiných mukorovitých hub.

***Thamnidium elegans* Link (Obr. 4)**

T. elegans bylo izolováno v roce 2006 pomocí sedimentační metody izolace z ovzduší Ardovské jeskyně (NP Slovenský kras) a další kmen byl izolován na jaře 2008 zředovací metodou z netopýřího guána odebraného v jeskyni Fânațe v pohoří Bihor (Západní Karpaty, Rumunsko). Tento v současné době jediný platný druh rodu *Thamnidium* (čeleď Thamnidiaceae, Zygomycetes) (DOMSCH et al., 2007) patří mezi chladnomilné druhy mikroskopických hub. V CCF jsou uloženy 2 kmeny tohoto druhu izolované z hovězího masa a ze skladovaných pomerančů (KUBÁTOVÁ et al., 2002).



Obr. 4. *Thamnidium elegans*, A – hlavní sporangiofór a dichotomicky větvené boční větve (12 x 6), foto M. Devetter, B, C – sporangioles.

***Botryosporium longibrachiatum* (Oudem.) Maire (Obr. 5)**

V jeskynním systému Domica – Baradla byly v minulosti několikrát nalezeny kostry mrtvých žab s bílými porosty mikroskopických hub. Opakované izolace z odebraného materiálu (přímá i zředovací izolace) byly dlouho neúspěšné a pouze v jednom případě se podařilo tento druh izolovat. Tento druh je často nacházen ve sklenících na mrtvých listech (KENDRICK, 2002). V CCF je uložen kmen izolovaný z prachu bytu (KUBÁTOVÁ et al., 2002).

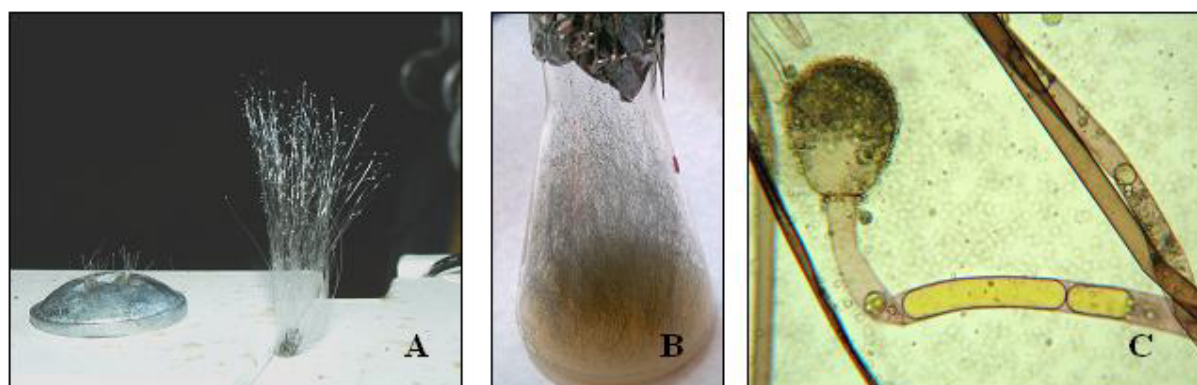
***Phycomyces nitens* Kunze (Obr. 6)**

Netopýří exkrementy jsou v jeskyních nacházeny nejen v místech, kde se nacházejí netopýří kolonie během jejich denního odpočinku, ale také všude tam kudy netopýři létají jsou patrné jednotlivé dropinky, ať s nárostlými koloniemi mikroskopických hub nebo bez viditelných kolonií. Nápadné kolonie jsou zvláště kolonie mukorovitých hub a z těchto kolonií byly v minulosti izolovány převážně různé druhy rodu *Mucor*, případně řidčeji druhy rodu *Absidia*. Na podzim 2007 byly v Gombasecké jeskyni (NP Slovenský kras) nalezeny na

několika místech dropinky s naprosto stejně vyhlížející koloniemi (Obr. 5a), ze kterých byl v několika případech velice překvapivě izolován *P. nitens*.



Obr. 5. *Botryosporium longibrachiatum*, A – kostra žaby s bílými koloniemi *B. longibrachiatum*, B – část konidioforu a konidie (zvětšení 12,5 x 40).



Obr. 6. *Phycomyces nitens*, A – kolonie *P. nitens* narostlá na dropince (Gombasecká jeskyně), B – 5 dnů stará kolonie na sladinném agaru, C – kolumela (12,5 x 20).

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Výzkumným záměrem ÚPB BC AV ČR, v.v.i. – AV0Z60660521 a smlouvou KONTAKT ME08019. Pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie PaÚ BC AV ČR, v.v.i. děkuji za přípravu preparátů pro SEM a pomoc při mikroskopování.

Přehled použité literatury

BENNY, G.L., 2008. Zygomycetes. <http://zygomycetes.org/index.php>

- DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 2007. Compendium of Soil Fungi. 2nd ed. IHW-Verlag, Eching, 672 p.
- GAMS, W., STEIMAN, R., SEIGLE-MURANDI, F. 1990. The hyphomycete genus *Goidanichiella*. Mycotaxon 38:149–159.
- HYDE, K.D., YANNA, PINNOI, A., JONES, E.B.G., 2002. *Goidanichiella fusiforma* sp. nov. from palm fronds in Brunei and Thailand. Fung Divers 11:119–122.
- KUBÁTOVÁ, A., VÁŇOVÁ, M., PRÁŠIL, K., 2003. CCF Catalogue of filamentous fungi. 5th ed. Nov. Bot. Univ. Carol. 16: 1-137.
- KENDRICK, B., 2002. The Fifth Kingdom. <http://www.mycolog.com/fifthtoc.html>
- NOVÁKOVÁ, A., 2007. Zajímavé nálezy hub z České a Slovenské republiky. In: NOVÁKOVÁ, A. (Ed.), Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007, ÚPB AV ČR, České Budějovice, pp. 81-84.
- ŠIMONOVICHOVÁ, A., 2008. Soil microscopic fungi of Slovakia I. a II. Phytopedon (v tisku).
- ZHANG, T.-Y., KENDRICK, B., 1990. A reassessment of *Botryosporium* (Hyphomycetes). Acta Mycol. Sin. 9: 31-40.

Charakteristika kmenů *Colletotrichum acutatum* izolovaných v České republice.

DAVID NOVOTNÝ, JIŘINA KRÁTKÁ

NOVOTNÝ, D., KRÁTKÁ, J. – The characteristic of *Colletotrichum acutatum* strains isolated in the Czech Republic.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 63-68. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

The micromorphology, some physiological (growth on the selected agar media) a biochemical (activities of the selected extracellular enzymes) features of selected strains of *Colletotrichum acutatum*, which were isolated mainly from strawberry from the Czech Republic were investigated. The growth rate of *C. acutatum* on potato-dextrose agar produced by different companies was compared.

Kmeny *Colletotrichum acutatum* izolované především z jahodníku na různých lokalitách České republiky byly charakterizovány vybranými morfologickými, fyziologickými a biochemickými vlastnostmi. Bylo provedeno srovnání rychlosti růstu mycelia *C. acutatum* na bramborovo-dextrózovém agaru vyrobeném různými výrobci.

David Novotný, Jiřina Krátká, Crop Research Institute, Division of Plant Medicine, Department of Mycology, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, E-mail: novotny@vurv.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Jedním z velmi rozšířených mikroskopických hub, které žijí v koexistenci s mnoha kulturními i planě rostoucími rostlinami je anamorfní rod *Colletotrichum*, do něhož se v současné době řadí okolo 60 druhů. Teleomorfoou je rod *Glomerella* (Ascomycota, Ascomycetes, Sordariomycetidae, Glomerellaceae) (KIRK et al., 2008). Jedním z nejznámějších fytopatogenů je *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, jehož anamorfoou je *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Je znám jako původce chorob různých druhů rostlin, např. jabloní, u kterých způsobuje hořkou hnilobu jablek (JONES et ALDWINCKLE, 1990).

V současnosti nejvíce sledovaným druhem rodu *Colletotrichum* je *C. acutatum* J.H. Simmond, který je nepohlavním stadiem *Glomerella acutata* J.C. Gerber & J.C. Correll. *C. acutatum* je patogenem na různých druzích rostlin a to jak bylin, tak dřevin. Jako původce hniloby jahodníku řadila EPPO (Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin) tohoto fytopatogena mezi druhy karanténní, ale nyní je již řazen pouze mezi druhy sledované (KRÁTKÁ et al. 2006).

C. acutatum je možné detekovat v základu trojím způsobem a to:

- reizolací ze vzorku a následnou identifikací na základě morfologie, přesněji velikosti kolonií rostoucích na bramborovo-dextrózovém agaru při teplotě 25 °C po 5 dnech kultivace a tvaru konců konidií,
- pomocí imunodiagnostických metod (PTA-ELISA),
- pomocí PCR s *C. acutatum*-specifickými primery ITS4 a CaInt2 (TALHINHAS et al., 2002, ANONYMUS, 2004).

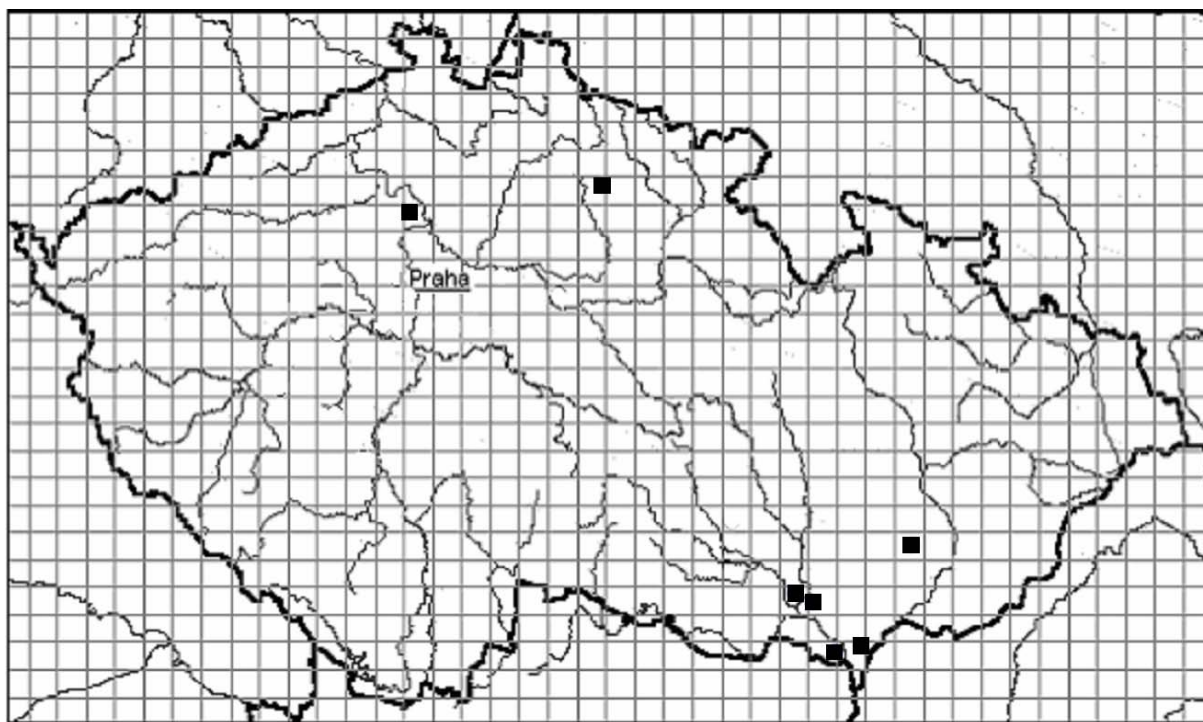
Cílem práce bylo charakterizovat získané kmeny hub nejen po stránce morfologické a fyziologické, ale i z biochemické, a to konkrétně zjištění výskytu a aktivity některých

enzymů, které se mohou podílet na degradaci buněčné stěny hostitele nebo mohou využívat některé jeho metabolity. Předložený článek podává první výsledky.

Materiál a metodika

Bylo hodnoceno 11 kmenů druhu *C. acutatum* ze Sbírky fytopatogenních hub (akronym CPPF), Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.. Jedná se o kmeny CPPF 260, CPPF 261, CPPF 262, CPPF 263, CPPF 264, CPPF 265, CPPF 266, které byly izolovány jahodníku z různých lokalit v České republice, o kmen CPPF 103, který byl izolován z višně z Východních Čech, o kmeny CPPF 305 a CPPF 306, které byly izolovány z požerku klíněnky jírovce v listu jírovce maďalu na jižní Moravě a kmen CPPF 246 izolovaný z lupiny na střední Moravě.

Mapa 1. Zaznamenaný výskyt *C. acutatum* v ČR.



U každého kmene byly hodnoceny diagnosticky významné mikromorfologické znaky u 50 konidií (délka konidií, šířka konidií, poměr délky a šířky konidií, podíl zašpičatělých a zaoblených konců konidií) a makromorfologické znaky při teplotě 25°C (velikost kolonie na sedmi různých agarových médiích (bramborovo-mrkvový agar, bramborovo-dextrózový agar od fy Oxoid, bramborovo-dextrózový agar z čerstvých brambor, ovesný agar, 2% malt extrakt agar, 0,1 % malt extrakt agar se stéblem lupiny a V8 agar) po 5, 7, 10 a 14 dnech, tvorba sporodochií na těchto médiích po 7, 10, 14, 21 a 28 dnech, a charakter kolonií na těchto kultivačních médiích).

Bylo prováděno srovnání rychlosti růstu kmenů *C. acutatum* na bramborovo-dextrósovém agaru od firmy Oxoid, od firmy Himedia a z čerstvých brambor. Velikost kolonií byla měřena po 5 dnech a následně z této hodnoty byl vypočítáván přírůstek za 1 den.

Byla hodnocena aktivita následujících enzymů: amyláza, pektindepolymeráza (PP), pektintranselimináza (PE), celulózy a ureázy.

V případě aktivita amylázy byl jako standard použit kmen *Trametes versicolor* ze sbírky CCBAS. Jak kmeny *C. acutatum*, tak *Trametes versicolor* byly pěstovány na Czapek-Doxově tekutém mediu při 22 °C jako třepané kultury, přičemž zdrojem organického uhlíku byl škrob. Měření bylo provedeno po 8 dnech růstu jednotlivých izolátů a aktivita enzymu byla vyjádřena jako µg glukózy ve filtrátu /µg proteinů po inkubaci 30 min. při 24 °C. Aktivita enzymu byla stanovena spektrofotometricky při 650 nm.

Pro stanovení aktivity celuláz byly kmeny *C. acutatum* pěstovány na tekutém Czapek-Dox mediu, zdrojem organického uhlíku byla buď krystalická celulóza (Avicel) nebo karboxymetylcelulóza (CMC). Aktivita byla stanovována v supernatantu spektrofotometricky při 650 nm. Měření bylo provedeno po 8 dnech růstu jednotlivých izolátů a aktivita enzymu byla vyjádřena jako µg glukózy ve filtrátu /µg proteinů po inkubaci 30 min. při 24 °C. Jako standard na byl použit kmen *Trametes versicolor* ze sbírky CCBAS.

Pro zjištění aktivity ureázy byly kmeny *C. acutatum* pěstovány na tekutém Czapek-Doxově mediu, kde sacharóza byla nahrazena močovinou. Aktivita ureázy byla stanovována v supernatantu kolorimetricky při 540 nm. Jako standardní producent ureázy pro porovnání byl použit kmen druhu *Cladosporium herbarum*.

Aktivita PP a PE byla sledována podle metodiky UNTERTAINER et MALLOCH (1999) a to na agarových plotnách na mediu dle HANKIN et AAGNOSTAKIS (1975). Substrátem byl pektin a pro stanovení aktivity pektindepolymerázy bylo medium adjustováno na pH 5, pro stanovení aktivity pektintranseliminázy bylo médium adjustováno na pH 7. Jako standard na byl použit kmen *Trametes versicolor* ze sbírky CCBAS. Kmeny *C. acutatum* i standard byly pěstovány v termostatu při 22°C. Pro hodnocení bylo použito 6 opakování u každé varianty. Aktivita enzymu byla vyjádřena v mm vytvořených průsvitných zón po inkubaci 1 hod při 22 °C, pro vyvolání vytvořených zón použit 1% vodný roztok HDTAB (hexadecyltrimethylamonium bromid).

Výsledky a diskuse

Konidie pozorovaných kmenů *C. acutatum* byly válcovité, (11,3-) 12,76-18,45 (-23) µm dlouhé, (3,6-) 3,92-5,14 (-5,5) µm široké, poměr jejich šířky a délky byl (2,47-) 2,65-4,19 (-4,63) µm. Mezi změřenými konidii u jednotlivých kmenů bylo 0-8 % konidií s oběmi oblými konci, 16-48% konidií s jedním oblým a jedním špičatým koncem a 44-78% konidií s oběmi špičatými konci.

Tab. 1. Srovnání velikosti kolonií *C. acutatum* na vybraných agarových médiích (uvedeno v mm).

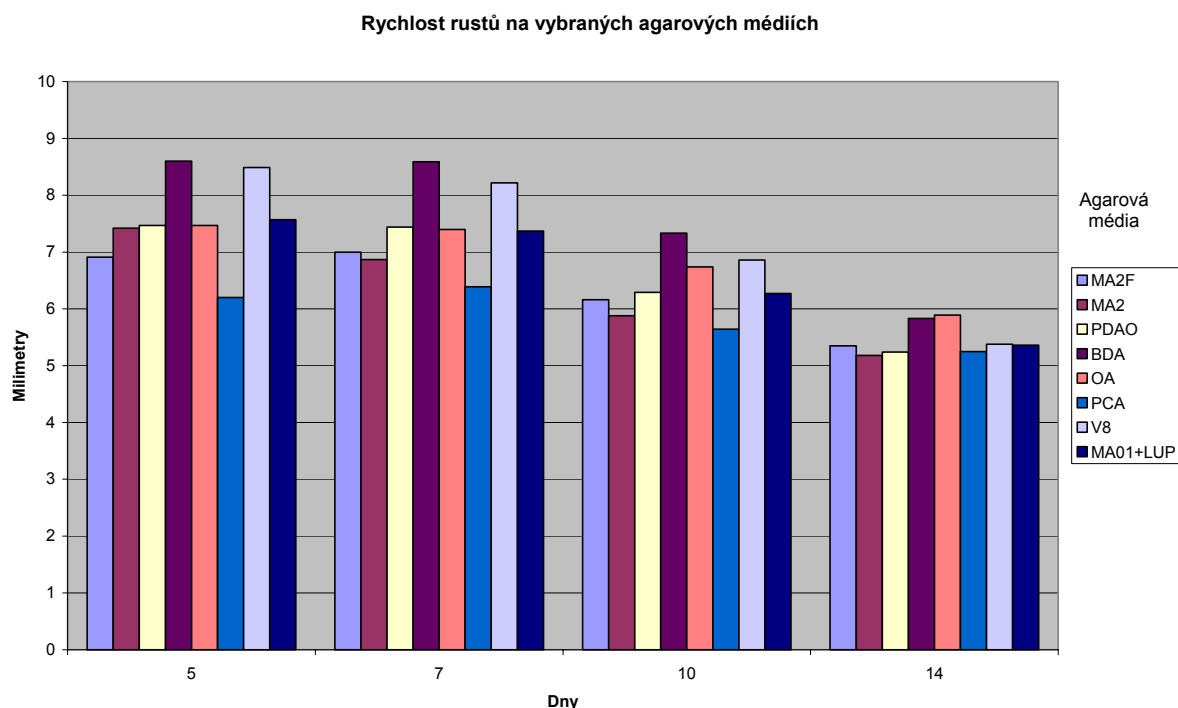
Médium/ dny	5	7	10	14
MA2F	34,55	49,03	61,61	74,94
PDAO	37,34	52,08	62,85	73,41
BDA	42,99	60,13	73,27	81,64
OA	37,36	51,81	67,39	82,53
PCA	31,02	44,75	56,39	73,45
V8	42,43	57,54	68,64	75,31
MA01+LUP	37,83	51,59	62,72	75,08

Testované kmeny *C. acutatum* při teplotě 25 °C, která je udávána jako diagnostická, nejrychleji rostly na bramboro-dextrózovém agaru z čerstvých brambor (BDA). Průměrné velikosti kolonií na BDA v jednotlivých termínech odečtu byly následující: po 5 dnech – 42,99 mm, po 7 dnech – 60,13 mm, po 10 dnech – 73,27 mm, po 14 dnech – 81,64 mm. Nejpomalejší růst byl pozorován na bramborovo-mrkvovém agaru (PCA). Průměrné velikosti kolonií na PCA v jednotlivých termínech odečtu byly následující: po 5 dnech – 31,02 mm, po 7 dnech – 44,75 mm, po 10 dnech – 56,39 mm, po 14 dnech – 73,45 mm (Tab. 1 a 2, Graf 1).

Tab. 2. Srovnání rychlosti růstu kolonií *C. acutatum* na vybraných agarových médiích (uvedeno v mm) po určitém počtu dní kultivace.

Médium/dny	5	7	10	14
MA2F	6,91	7	6,16	5,35
PDAO	7,47	7,44	6,29	5,24
BDA	8,6	8,59	7,33	5,83
OA	7,47	7,4	6,74	5,89
PCA	6,2	6,39	5,64	5,25
V8	8,49	8,22	6,86	5,38
MA01+LUP	7,57	7,37	6,27	5,36

Graf č. 1. Srovnání rychlosti růstu kolonií *C. acutatum* na vybraných agarových médiích (uvedeno v mm) po určitém počtu dní kultivace.



Sporodochia se vytvářela na jednotlivých kultivačních médiích s rozdílnou četností a byl zjištěn rozdíl mezi jednotlivými testovanými kmeny. Nejvíce se sporodochia vytvářela na ovesném agaru a malt extrakt agar 0,1% - Fluka se stonkem lupiny. Po 7 dnech se na ovesném agaru a malt extrakt agar 0,1% - Fluka se stonkem lupiny vytvořila sporodochia na 75% a 70

% Petriho misek, respektive. Po 28 dnech se na ovesném agaru a malt extrakt agar 0,1% - Fluka se stonkem lupiny vytvořili sporodochia na 75% a 85 % Petriho misek, respektive. Zvyšovala se nejen pouhá přítomnost na jednotlivých miskách, ale i jejich četnost v rámci jednotlivých misek. Naopak nejméně se sporodochia vytvářela po 7 dnech na 2% malt extrakt agaru – Fluka a bramboro-dextrózovém agaru – Oxoid a to na 2,5% misek. Po 28 dnech sporodochia vznikla na bramboro-mrkvovém agaru a to na 25% misek.

Srovnání růstu na bramborovo-dextrózovém agaru od tří výrobců

Růst *C. acutatum* byl testován při teplotě 25°C růst na bramborovo-dextrózovém agaru Oxoid, bramborovo-dextrózovém agaru Himedia a bramborovo-dextrózovém agaru z čerstvých brambor. Hodnoceny byly vyrostlé kultury po 5 dnech. Byl zjištěn velký rozdíl ve velikosti kolonií při použití jednotlivých medií. Nejvíce rostly kultury na mediu z čerstvých brambor a nejhůře rostly na mediu od firmy Himedia. Na agaru z čerstvých brambor rostly v poměru k agaru od firmy Oxoid v průměru o 20% rychleji a v poměru k agaru od firmy Oxoid o 71% rychleji. Z toho plyne, že nelze bramborovo-dextrózový agar od firmy Himedia použít pro testování růstových rychlostí hub z důvodu pomalejšího růstu.

Při hodnocení aktivity amylázy se zjistilo, že všechny testované kmeny *C. acutatum* produkují amylázu. Byly zjištěny rozdíly v aktivitě tohoto enzymu mezi jednotlivými izoláty. V případě použitého standardu *Trametes versicolor* byla aktivita amylázy v porovnání s izoláty *C. acutatum* v některých případech nižší (Tab. 3).

Tab. 3. Aktivita amylázy u testovaných kmenů *C. acutatum*.

Kmeny	absorbance	μg glukózy /ml	μg proteinů /ml	aktivita enzymu
103	0,29	20	241,2	4,8
260	0,56	38	225	8,5
263	0,156	11	262,8	2,9
261	0,064	5	190,2	0,951
262	0,15	10	259	2,26
265	1,53	106	285	30,2
264	1,33	90	280,3	25,22
266	0,198	14	252,3	3,5
305	0,354	25	260	6,5
306	0,281	18	248,3	4,5
246	1,011	68	266	15,4
Trametes	0,58	39	224	8,4

Zjistili jsme, že všechny testované kmeny *C. acutatum* produkují celulázy v případě, že substrátem v mediu byl Avicel. Aktivita enzymu byla u všech izolátů vyšší než u použitého standardu, byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými izoláty. Pokud v mediu jako substrát byla CMC, nebyla aktivita celuláz zjištěna.

U žádného ze sledovaných kmenů kmenů *C. acutatum* nebyla zjištěna aktivita ureázy.

Při hodnocení aktivity PP a PE jsme zjistili, že všechny zkoumané izoláty *C. acutatum* produkují oba pektinolytické enzymy, aktivita sledovaných enzymů je u jednotlivých kmenů rozdílná. Kmen 246 neprodukoval PP (Tab. 5), aktivita PE byla nejnižší ve srovnání s dalšími kmeny (Tab. 4).

Tab. 4. Aktivita PE.

Kmeny	Aktivita (mm)
103	103
260	260
263	263
261	261
262	262
265	265
264	264
266	266
305	305
306	306
246	246
Trametes	30,5

Tab. 5. Aktivita PP.

Kmeny	Aktivita (mm)
103	36,7
260	45,7
263	45,3
261	47,3
262	43,7
265	26,7
264	65
266	59,3
305	47,7
306	47,3
246	0
Trametes	42,5

Poděkování

Výzkum byl podpořen projektem MZe 0002270603.

Přehled použité literatury

- ANONYMUS, 2004. EPPO Standards: Diagnostic protocols for regulated pests OEPP/EPPO Bulletin 34: 155-157.
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- JONES, A.L., ALDWINCKLE, H.S. (Eds.), 1990. Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press, St. Paul, 125 p.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W., STALPERS, J.A. (Eds.), 2008. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. CABI, Wallingford, 771 p.
- KRÁTKÁ, J., NOVOTNÝ, D., KŘÍŽKOVÁ-KUDLÍKOVÁ, I., 2006. Antraknóza jahodníku. *Rostlinolékař* 17(6): 24.
- TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, J., OLIVEIRA, H., 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92: 986-996.
- UNTERTAINER, W.A., MALLOCH, D., 1999. Patterns of substrate utilization in species of *Capronia* and allied black yeasts: ecological and taxonomic implications. *Mycologia* 91: 417-427.

Zriedkavé rody mikromycét na pšenici slovenského pôvodu

ZUZANA PIOVARČIOVÁ, DANA TANČINOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ, SOŇA FELŠÖCIOVÁ

PIOVARČIOVÁ, Z., TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., FELŠÖCIOVÁ, S.: Rare micromycetes genera on wheat grain of Slovak origin.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 69-76. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

A total of 48 samples of wheat (*Triticum aestivum* L.) obtained from various regions of Slovakia in period 2006 – 2008 were analyzed for presence of microscopic fungi. Besides common occurring fungi were also isolated strains, which are very unique in Slovak wheat. They are *Chaetomium globosum*, *Chaetomium indicum/funicola*, *Chaetomium* cf. *spinosum*, *Harzia atra*, *Phialophora* sp., and *Torula herbarum*. This study deals with these infrequent but very interesting isolates.

Keywords: *Chaetomium globosum*, *Chaetomium indicum*, *Chaetomium funicola*, *Chaetomium spinosum*, *Harzia atra*, *Phialophora* sp., *Torula herbarum*

Zuzana Piovarčiová, Dana Tančinová, Mária Dovičičová, Soňa Felšöciová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: zuzana.piovarciova@uniag.sk

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

V pokusných rokoch 2006 až 2008 bolo sledované zloženie endogénnej a exogénnej mykobioty potravinárskej pšenice slovenského pôvodu. Cieľom práce bolo zistiť kontamináciu týchto substrátov mikroskopickými hubami z kvantitatívneho hľadiska a z hľadiska výskytu jednotlivých rodov, resp. druhov mikroskopických húb. Táto štúdia preukázala najvyššiu frekvenciu výskytu mikromycét rodov *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Arthrimum* a *Epicoccum*. Uvedenými rodmi sa zaoberá niekoľko prác tohto pracovného tímu (TANČINOVÁ et al., 2008; TANČINOVÁ et al., 2007). Počas štúdie bolo izolovaných aj niekoľko izolátov mikromycét, ktoré na pšenici slovenského pôvodu nie sú bežné, resp. vyskytli sa len v ojedinelých prípadoch, ale i napriek tomu sú zaujímavé a stoja za zmienku. Medzi ne patria niektoré druhy rodov *Chaetomium*, *Harzia*, *Phialophora* a *Torula*, o ktorých pojednáva táto práca.

Materiál a metodika

Z rôznych lokalít Slovenska bolo v čase po uskladnení postupne odobraných celkom 48 vzoriek pšenice. Následne po odobratí boli vykonané mykologické analýzy, pri ktorých bola využitá metóda priameho ukladania povrchovo vysterilizovaných pšeničných zŕn na agarové platne (endogénna mykobiota) a platňová zried'ovacia metóda (exogénna mykobiota). Sterilizácia zŕn bola vykonaná pomocou roztoku chlóraminu (0,4 % roztok) po dobu 2 minút a následne boli pšeničné zrná 3 razy prepláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Na kultiváciu boli využité živné médiá DRBC (agar s dichlóranom bengálskou červeňou a chloramfenikolom, SAMSON et al., 2002) a sladínový agar (IMUNA, Šarišské Michaľany).

Na identifikáciu boli tieto zriedkavé rody mikromycét kultivované na živných pôdach MEA (sladinový agar, SAMSON et al., 2002), OA (agar z ovsených vločiek, SAMSON et al., 2002), PDA (zemiakovo-dextrózový agar, SAMSON et al., 2002) a V-8 (agar z 8 druhov zeleniny, SAMSON et al., 2002). Kultivácia prebiehala pri teplote 25 °C v tme po dobu 7 a 14 dní. Na 7. a 14. deň kultivácie bol zmeraný priemer jednotlivých kolónií a bola urobená identifikácia na základe makromorfologických a mikromorfologických znakov.

Identifikácia mikromycét do príslušných druhov prebiehala podľa kľúčov ELLIS (1971), MALONE et MUSKETT (1997), DOMSCH et al. (1980), DE HOOG et al. (2000), SAMSON (2002) a HOWARD (2003).

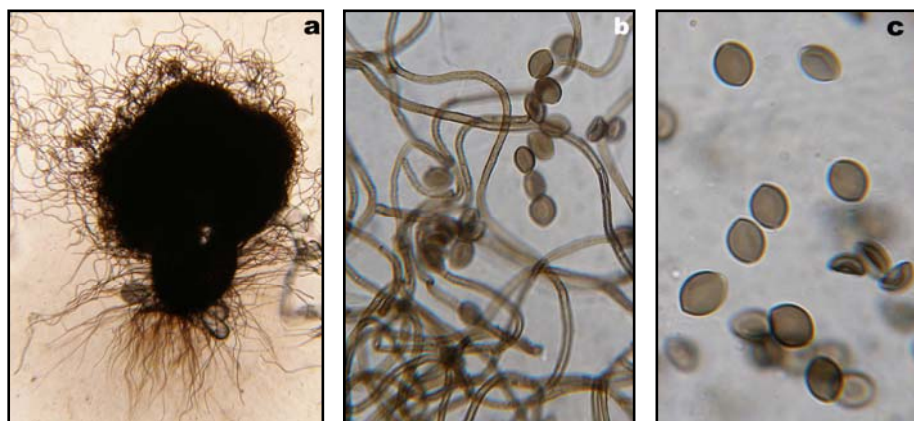
Výsledky a diskusia

Chaetomium globosum

Chaetomium globosum je popisované (DOMSCH et al., 1980) ako najrozšírenejší a najznámejší druh rodu *Chaetomium* vyskytujúci sa na rastlinných zvyškoch, semenách, kompostoch, pôde, papieri a iných celulózových substrátoch, avšak v sledovaných vzorkách pšenice slovenského pôvodu bol zaznamenaný len jeden izolát tohto druhu. Pochádzal zo vzorky pšenice z tzv. ekologického poľnohospodárstva. Jeho kolónie sú rýchlo rastúce, na 7. deň kultivácie pokrývajú celý povrch v Petriho miske a tvoria malé vzdušné mycélium s hustou vrstvou peritécií tmavo hnedej až čiernej farby. K substrátu sú pripútané tmavými rizoidmi. Na ich povrchu sa nachádzajú točité laterálne vlasy tmavo hnedej farby s bledšími koncami, úsporne septované a jemne zdrsené. Terminálne vlasy sú početné, vlnité, alebo niekoľkokrát skrútené a nie sú septované (DOMSCH et al., 1980; MALONE et MUSKETT, 1997). Sporulácia prebieha lepšie v tme ako na svetle. Vytvorené spóry majú jemne červenkastú farbu, ktorá sa postupne mení na tmavú olivovo hnedú. Vyznačujú sa citrónovitým tvarom, sú bilaterálne sploštené so zašpicatými koncami (DOMSCH et al., 1980; MALONE et MUSKETT, 1997; DE HOOG et al., 2000). Podľa DOMSCH et al. (1980) sú askospóry schopné za suchých podmienok prežiť viac ako 10 rokov.

Tento druh môže byť nebezpečný z hľadiska produkcie toxických metabolitov, ako sú chaetoglobozíny a chaetomín (HOWARD, 2003) a môže spôsobovať onychomykózy a kožné ochorenia (DE HOOG et al., 2000).

Obr. 1. *Chaetomium globosum*: **a** – peritécium s laterálnymi a terminálnymi vlasmi, zv. 200x, **b** – hnedé a jemne zdrsené vlasy, zv. 1000x, **c** – citrónovité askospóry, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).



Chaetomium indicum/funicola

Izolát pochádza zo vzorky pšenice z tzv. ekologického poľnohospodárstva a bol získaný z vnútornej mykobioty zrna. Jeho kolónie tvoria len veľmi jemné vzdušné mycélium, v ktorom dominuje hustá vrstva tmavo hnedých až čiernych peritécií. MALONE et MUSKETT (1997) uvádzajú, že nie je jednoduché rozlíšiť *Chaetomium indicum* a *Chaetomium funicola*, a to z dôvodu prítomnosti mnohých podobných znakov. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené drobné odlišnosti, na základe ktorých by bolo možné tieto dva druhy odlíšiť, i keď v niektorých prípadoch je to veľmi ťažké.

Tab. 1. Mikroskopické odlišnosti druhov *Chaetomium indicum* a *Chaetomium funicola* a substráty, na ktorých boli doposiaľ zaznamenané.

Znak	<i>Chaetomium indicum</i> (MALONE et MUSKETT, 1997)	<i>Chaetomium funicola</i> (DOMSCH et al., 1980; ELLIS, 1971)
terminálne vlasy	dichotomicky vetvené, zriedkavo alebo vôbec sa nevyskytujú nevetvené	2 typy: dichotomicky vetvené a nevetvené
dĺžka terminálnych vlasov	ak sú prítomné nevetvené, tak sú kratšie ako vetvené	nevetvené vlasy sú dlhšie ako vetvené
uhol vetvenia	pravý uhol	tupý uhol
tvar askospór	oválne až ovoidné, niekedy sploštené do jednej strany	oválne až ovoidné, citrónikovitité
farba askospór	spočiatku hyalínne, neskôr olivovo hnedé	svetlo olivovo zelené, svetlo hnedé
substráty	kultivované pôdy (aj pod pšenice), korene pšenice, borovicové ihlice, plesnivé travy, skladovaný chmeľ, papier, kravský hnoj, jačmeň, ovos, cirok, ryža,...	papier, rastlinné zvyšky, lesné pôdy, kakaové, kokosové a tabakové rastliny, semená rastlín, hniezda vtákov, kompóty, ovos,...

Tab. 2. Priemer kolónií kmeňa *Chaetomium indicum/funicola* izolovaného zo pšenice slovenského pôvodu.

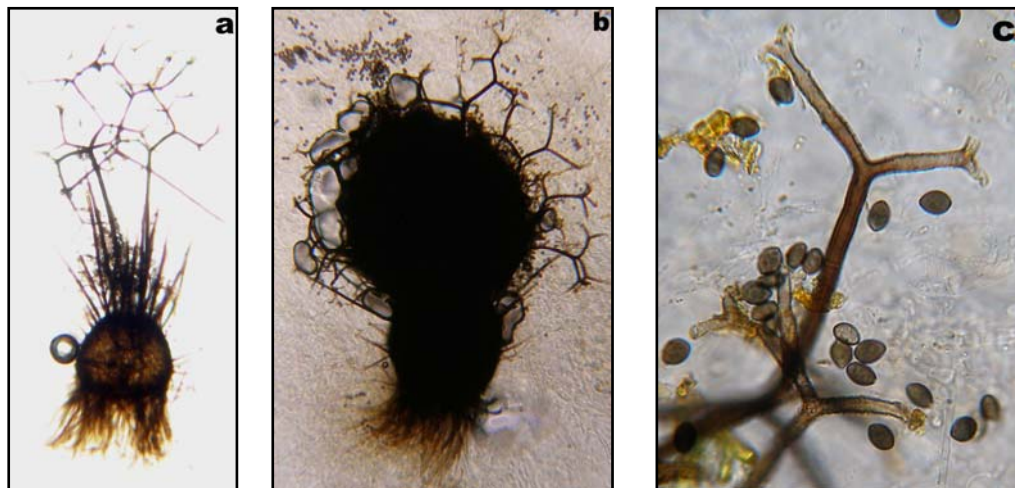
Deň kultivácie	Živné médium			
	MEA	OA	PDA	V8
7. deň	Ø 53 mm	Ø 62 mm	Ø 55 mm	<
14. deň	Ø 63 mm	<	Ø 54 mm	<

< - porastený celý povrch v Petriho miske

Izolovaný kmeň vytvára riedke, tmavo hnedé laterálne vlasy. U mladých peritécií sú viditeľné nevetvené terminálne vlasy, nad ktorými však prevažujú spravidla vo vyššej polovici dichotomicky vetvené vlasy s vetvami väčšinou v pravých uhloch, jemne zdrsnené.

Nevetvené vlasy sú obyčajne kratšie ako tie vetvené a u starších peritécií nie sú viditeľné. To nás vedie k možnosti, že spočiatku nevetvené vlasy u mladých peritécií sú len budúce vetviace sa vlasy. MALONE et MUSKETT (1997) uvádzajú, že hlavným rozpoznávacím znakom sú práve uvedené nevetvené terminálne vlasy. Askospóry majú svetlo hnedú farbu a sú oválne až ovoidné, v niektorých prípadoch je viditeľný sploštený jeden koniec.

Obr. 2. *Chaetomium indicum/funicola*: **a** – mladé peritécium s krátkymi nevetvenými terminálnymi vlasmi, zv. 200x, **b** – staršie peritécium s vetvenými terminálnymi vlasmi, zv. 200x, **c** – dichotomicky vetvené terminálne vlasy a askospóry, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).



Chaetomium cf. spinosum

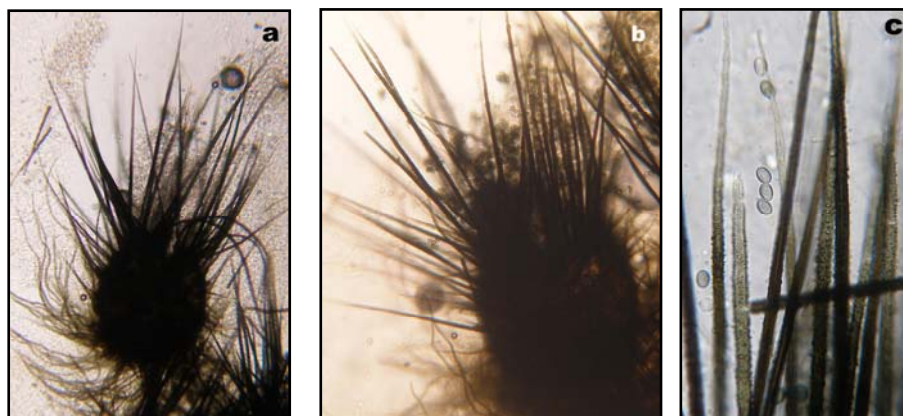
Chaetomium spinosum je veľmi zriedkavý druh tohto rodu, ktorý bol popísaný len v niekoľkých prípadoch na semenách ovsa (MALONE et MUSKETT, 1997). Na slovenskej pšenici bol izolovaný len jeden kmeň, a to z endogénnej mykobioty. Vytvára čierne subglobózne až vajcovité peritéciá so zašpicatenou bázou. Laterálne vlasy sú rovné, čierne, nevetvené, jemne zdrsnené a zužujúce sa ku hyalínemu koncu. Terminálne vlasy sú podobné laterálnym, ale neskôr sa môžu jemne vetviť. Sú septované a svetlejšie. Klavátne vrecká obsahujú 8 spór svetlo hnedej farby a sú nápadne ovoidného tvaru (MALONE et MUSKETT, 1997). Tento znak spolu s „naježeným vzhľadom“ výrazne odlišuje *Chaetomium spinosum* od ostatných druhov tohto rodu.

Tab. 3. Priemer kolónií izolátu *Chaetomium cf. spinosum* izolovaného zo pšenice slovenského pôvodu.

Deň kultivácie	Živné médium		
	OA	PDA	V8
7. deň	Ø 57 mm	Ø 59 mm	Ø 61 mm
14. deň	<	<	Ø 67 mm

< - porastený celý povrch v Petriho miske

Obr. 3. *Chaetomium* cf. *spinosum*: **a, b** – peritéciá s rovnými terminálnymi vlasmi, zv. 400x, **c** – rovné teminálne vlasy, drsný povrch, typické vajčkovité askospóry, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).

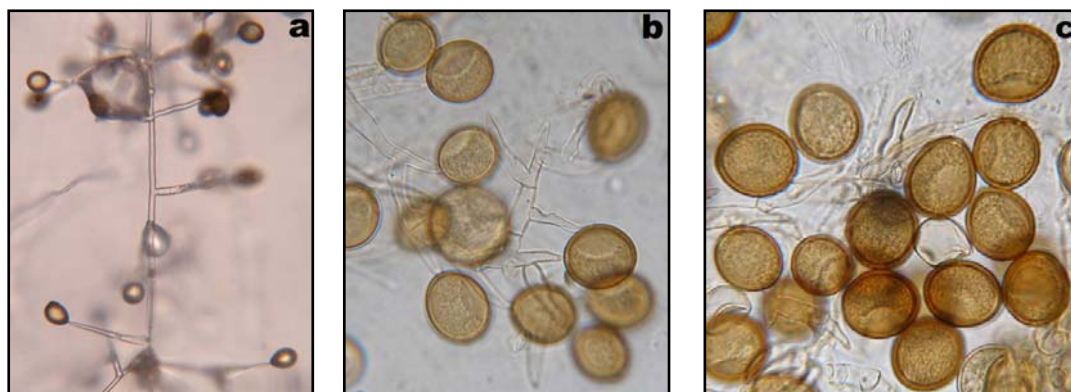


Harzia atra

Harzia atra bola získaná z endogénnej mykobioty jednej vzorky pšenice. Z tejto vzorky bolo metódou priameho ukladania pšeničných zŕn na agarové platne izolovaných 8 izolátov tohto druhu, ktorý bol určený podľa kľúčov MALONE et MUSKETT (1997) a ELLIS (1971). Mycélium tejto mikromycéty je pavučinovité, spočiatku bezfarebné a neskôr hnedé až škoricové. Je to rýchlorastúca mikroskopická huba, ktorej kolónia už na 7. deň kultivácie porastá celý povrch živného média v Petriho miske. Konidiofory sú hyalínne, jednoduché alebo voľne vetvené v pravých uhloch a ku koncom sa zužujú. Typické konídie vyrastajú samostatne na koncoch konidiofórov, majú vajčkovitý až subglobóznny tvar a hnedé až škoricové zafarbenie. Ich povrch je hladký s dvojitou stenou. Vnútrná stena je hrubá s pórom na báze (MALONE et MUSKETT, 1997; ELLIS, 1971). Podľa ELLIS (1971) môže mať *Harzia atra* i fialidické štádiu, ktoré však u našich izolátov nebolo spozorované.

Prítomnosť tejto huby bola popísaná na rôznych rastlinách ako sú bambus, jačmeň, fazuľa, mrkva, kukurica, ovos, olivy, cibuľa, hrach, zemiaky, ryža a bola izolovaná aj zo vzduchu, hnoja a pôdy (ELLIS, 1971). MALONE ET MUSKETT (1997) popisujú, že jej rast je mohutnejší za prítomnosti húb *Alternaria tenuis*, *Fusarium moniliforme*, *Cephalosporium acremonium*. V uvedenej vzorke bol predovšetkým vysoký počet druhov rodov *Alternaria* a *Fusarium*.

Obr. 4. *Harzia atra*: **a** – konidiofory a konídie, zv. 400x, **b** – konidiofory a konídie, zv. 1000x, **c** – konídie vajcovitého a subglobózneho tvaru, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).



Phialophora sp.

Kmeň rodu *Phialophora* sp. bol izolovaný zo vzorky pšenice pochádzajúcej z tzv. ekologického poľnohospodárstva ako súčasť endogénnej mykobioty. Jeho kolónie sú pomaly rastúce, sivej, olivovej až takmer čiernej farby so sivým až čiernym reverzom. Fialidy vyrastajú samostatne z vegetatívnych hýf alebo na rozvetvených konidioforoch, často v zhlukoch. Majú typický fľaštičkovitý až cylindrický tvar s golierikom (DE HOOG et al., 2000; DOMSCH et al., 1980). Konídie sú jednobunkové, globózne, hyalínne a zhlukujú sa v slizovitých hlavičkách (DOMSCH et al., 1980).

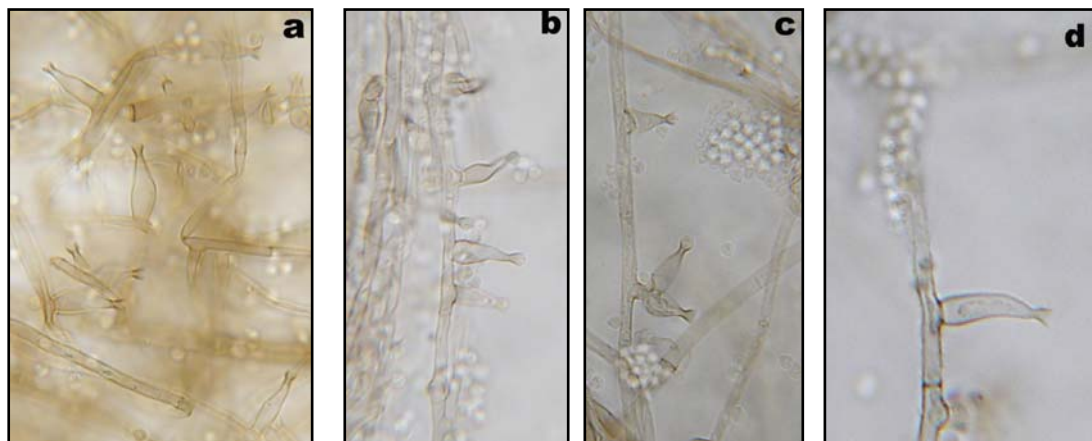
Druhy rodu *Phialophora* boli izolované z kaziaceho sa dreva, masla, margarínu, jablák a pôdy. Niektoré druhy môžu byť parazity alebo saprotrofy rastlinného materiálu a môžu spôsobovať ochorenia ľudských alebo zvieracích tkanív (SAMSON et al., 2002).

V niektorých prípadoch je veľmi ťažké určiť presný druh tejto mikroskopickej huby a DOMSCH (1980) uvádza, že niektoré druhy by sa mali skôr označovať ako skupiny, než čisto definované taxy.

Tab. 4. Priemer kolónií kmeňa rodu *Phialophora* sp. izolovaného zo pšenice slovenského pôvodu.

Deň kultivácie	Živné médium	
	OA	V8
7. deň	Ø 29 mm	Ø 27 mm
14. deň	Ø 53 mm	Ø 54 mm

Obr. 5. *Phialophora* sp.: a, b, c, d – fialidy s golierikmi a globózne konídie, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).



Torula herbarum

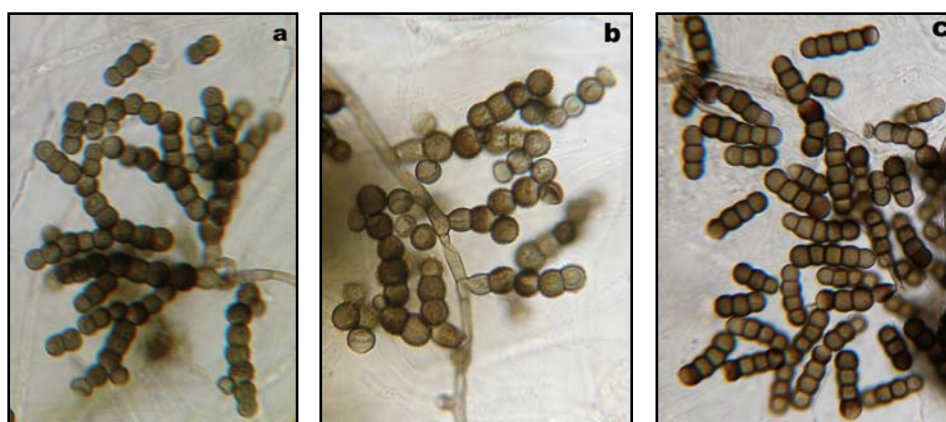
Tento druh sa často vyskytuje na rastlinných zvyškoch, príležitostne na listoch, dreve, starej vrecovine a bol tiež izolovaný zo vzduchu a z pôdy (ELLIS, 1971). V nami testovaných vzorkách pšenice bola *Torula herbarum* izolovaná po prvý krát a jedná sa o jediný izolát tohto druhu. Jej pôvodný názov bol *Monilia herbarum*. Na semenách vytvára malé, kompaktné, olivovo zelené kolónie, ktoré sa môžu zlučovať a staršie nadobúdajú hnednú farbu. Tvoria ich jednoduché alebo rozvetvené reťazce buniek, ktoré vyrastajú laterálne, alebo z vrcholov hýf. Tieto reťazce sa ľahko rozdeľujú na spóry, ktoré sa skladajú najčastejšie z 3 – 5 buniek. Spóry majú hnedú farbu, cylindrický až súdkovitý tvar a krajné bunky sú zaoblené. Vetvenie

reťazcov sa uskutočňuje na guľovitých bunkách, ktoré sú tmavšie ako MALONE et MUSKETT, 1997). Druh bol určený podľa kľúčov ELLIS (1971) a MALONE et MUSKETT (1997).

Tab. 5. Priemer kolónií izolátu *Torula herbarum* izolovaného zo pšenice slovenského pôvodu.

Deň kultivácie	Živné médium			
	MEA	OA	PDA	V8
7. deň	Ø 20 mm	Ø 27 mm	Ø 29 mm	Ø 27 mm
14. deň	Ø 27 mm	Ø 43 mm	Ø 54 mm	Ø 47 mm

Obr. 6. *Torula herbarum*: **a, b** – rozvetvené reťazce buniek, zv. 1000x, **c** – 3 až 5-bunkové spóry, zv. 1000x (Foto: Z. Piovarčiová).



Pod'akovanie

Štúdia vznikla za finančnej podpory projektmi VEGA 1/3456/06 a KEGA 3/2080/07.

Prehľad použitej literatúry

- DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London, 857 p.
- ELLIS, M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Surrey, 608 p.
- DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Virgili, 1126 p.
- HOWARD, D.H., 2003. Pathogenic Fungi in Humans and Animals. UCLA School of Medicine, Los Angeles, 790 p.
- MALONE, J.P., MUSKETT, A.E., 1997. Seed-borne Description of 77 Fungus Species. The International Seed Testing Association, Zurich, 191 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.
- TANČINOVÁ, D., DOVIČIOVÁ, M., LABUDA, R., FELŠÖCIOVÁ, S., PIOVARČIOVÁ, Z., 2008. Povrchová kontaminácia pšenice (*Triticum aestivum* L.). In: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín, SPU, Nitra, pp. 543 – 550.

TANČINOVÁ, D., LABUDA, R., FELŠÖCIOVÁ, S., PIOVARČIOVÁ, Z., DOVIČIČOVÁ, M., 2007. Endogénna kontaminácia v zrnách potravinárskej pšenice dopestovanej na Slovensku v sezóne 2006. In: Sborník příspěvků z workshopu MICROMYCO 2007, 4. – 5. září 2007, České Budějovice, Ústav půdní biologie BC AV ČR, České Budějovice, pp. 169 – 175.

Některé výsledky studia anamorfního rodu *Cladosporium* Link, prezentované v časopise *Studies in Mycology* vol. 58 (2007).

KAREL PRÁŠIL

PRÁŠIL, K.: Some results from the study of anamorph genus *Cladosporium* Link presented in journal *Studies in Mycology* vol. 58 (2007).

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 77. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Studium anamorfního rodu *Cladosporium* a příslušné teleomorfy rodu *Mycosphaerella* a má v CBS Baarn/Utrecht dlouhou tradici, kterou dokumentují jména de Vries, von Arx a P. Crous. Zatím nejucelenější přehled poznatků o rodu *Cladosporium* a jemu podobných hyfomycetech představuje uvedené číslo nizozemského časopisu *Studies in Mycology*.

Jedná se o celkem 9 příspěvků, z nichž dva úvodní jsou věnované rodům *Mycosphaerella* a *Cladosporium* a následujících sedm uvádí „case studies“, zaměřené na problematiku některých skupin druhů rodu *Cladosporium* a příbuzných anamorfních rodů. Každý příspěvek je vybaven popisem a dichotomickým klíčem k uváděným taxonům, přehledem „taxonomic novelties“ a excelentními mikrofotografiemi. Úvodní studie podává nové vymezení čeledi *Mycosphaerellaceae*, definici nových čeledí *Davidiellaceae* a *Teratosphaeriaceae* a především přesun celého komplexu do řádu *Capnodiales* (*Dothideomycetes*) na základě molekulárně genetických studií. Jádro prezentovaného příspěvku představovaly určovací klíče k rodům blízkým teleomorfnímu rodu *Mycosphaerella* a dále určovací klíče ke komplexům druhů *Cladosporium herbarum* a *C. sphaerospermum*. Komentované překlady těchto klíčů pro širokou uživatelskou veřejnost budou zveřejněny v periodiku ČVSM Mykologické listy v roce 2009.

Keywords: *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, taxonomy

Karel Prášil, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. E-mail: prasil@natur.cuni.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Studium diversity saprotrfních lignikolních askomycetů NPR Libický luh

KAREL PRÁŠIL, ZUZANA SUCHÁNKOVÁ

PRÁŠIL, K., SUCHÁNKOVÁ, Z.: A study of saprophagous lignicolic ascomycetes diversity in NP Libický luh.
Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 78. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

NPR Libický luh u Velkého Oseka má celkovou rozlohu přes 400 ha a představuje přirozený a polopřirozený lužní les s dominantními dřevinami *Quercus robur*, *Ulmus laevis*, *U. minor* (tzv. tvrdý luh) a *Salix alba*, *Fraxinus excelsior*, *Populus nigra* a *Alnus glutinosa* (tzv. měkký luh). Mykologický průzkum Libického luhu byl dosud minimální a omezil se na studium půdních hub a makromycetů. V současné době probíhá na této lokalitě studium endofytických hub jilmu. V této souvislosti se ukazuje potřeba srovnání spektra endofytických hub s celkovou diversitou saprotrfních askomycetů a jejich anamorf na dané lokalitě a dále za použití kultivačních a molekulárních technik zjistit, které saprotrfní druhy jsou shodné s identifikovanými i neidentifikovanými endofytickými houbami jilmu. V současné době je získáno přes 300 herbářových položek a izolováno kolem 90 kmenů askomycetů a probíhá determinace materiálu klasickými i molekulárními metodami. V obrazové části příspěvku jsou uvedeny některé zajímavější nálezy na přírodním substrátu, výsledky kultivací a jejich případná souvislost s dosud zjištěnými endofytickými houbami jilmu. Jako saprotrf na mrtvém jilmovém dřevě a současně endofyt v živém jilmovém dřevě byl zjištěn apendikulátní coelomycet *Seiridium intermedium* (Sacc.) B. Sutton. Mezi další izolované druhy náleží *Harzia acremonioides* (Corda) Sacc., *Periconia minutissima* Corda, *Monodictys castanea* (Wallr.) S. Huges, *Cheiromycella* cf. *microscopica* (Karst.) S. Huges, *Helicoon* cf. *richonis* (Boud.) Linder a *Pleurothecium recurvatum* (Morgan) Höhn. Pouze z přírodního materiálu jsou dokumentovány druhy *Helminthosporium velutinum* Link, *Chaetosphaerella fusca* (Fuckel) E. Müll. & C. Booth a její anamorfa *Oedemium didymum* (J.C. Schmidt) S. Hughes, *Hypoxylon rubiginosum* (Pers.) Fr. a dále zajímavý nález houby, náležející pravděpodobně do rodu *Oedocephalum* Preuss. Studie probíhá za podpory záměru MŠMT číslo 0021620828.

Keywords: lignicolic ascomycetes, NPLibický luh, species diversity

Karel Prášil, Zuzana Suchánková, Department of Botany, Faculty of Science, Charles University in Prague, Benátská 2, 128 01 Prague 2, Czech Republic. E-mail: prasil@natur.cuni.cz, wanahcawin@centrum.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

The first records of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on the hibernating pupae of the horse chestnut leaf-miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae)

EVA PRENEROVÁ, ROSTISLAV ZEMEK, FRANTIŠEK WEYDA

PRENEROVÁ, E., ZEMEK, R., WEYDA, F. - The first records of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on the hibernating pupae of the horse chestnut leaf-miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae)

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): p. 79. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Cameraria ohridella Deschka & Dimic, 1986 (Lepidoptera, Gracillariidae) is an important invasive pest in Europe attacking mainly a horse chestnut, *Aesculus hippocastanum*. Since its first record in Macedonia in 1985 it rapidly spread and colonised major parts of Europe including Denmark, south of Sweden, Belorussia and Ukraine. The larvae feed on leaf parenchyma and at high population density the damages can result in the tree growth reduction. Present methods of its control are based on application of non-selective insecticides and composting or burning of leaf litter. Since these methods also kill beneficial organisms including natural enemies of *C. ohridella*, new environment-friendly approaches need to be developed. While most studies published so far have focused on parasitoids and predators like beetles, spiders and birds attacking leaf-mining larvae and pupae, our project is aimed at entomopathogenic fungi as potential candidates for biological control of this pest. In the present work we report the first records of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Isaria fumosorosea* Wize (Deuteromycetes) as entomopathogenic fungi of *C. ohridella*. Both species were found and isolated from hibernating pupae of *C. ohridella*. Samples of the horse chestnut leaves with diapausing *C. ohridella* pupae were collected in autumn at České Budějovice, South Bohemia, the Czech Republic (49 °N). The leaves were dissected and the pupae were individually placed into the 23°C and 95% R.H. Development of mycosis on pupae was frequently observed but most were saprophytic species. Only a few pupae were covered by mycelia with conidiophores and conidia of entomopathogenic fungi. The strains *B. bassiana* and *I. fumosorosea* were isolated from individual infected pupae and deposited in CCEFO (Culture Collection of Entomopathogenic Fungi Olesna) in the Czech Republic. The virulence of these strains is being evaluated.

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports (grant No. 2B06005).

Keywords: horse chestnut leaf-miner, *Cameraria ohridella*, entomopathogenic fungi, biological control, mycoinsecticide, *Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, Deuteromycetes.

Eva Prenerová, Laboratory of Plant Protection Olešna, Olešna 87, Bernartice u Milevska, Czech Republic. E-mail: eva.prenerova@seznam.cz

Rostislav Zemek, František Weyda, Institute of Entomology, Biology Centre AS CR, Branišovska 31, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: rosta@entu.cas.cz, weyda@entu.cas.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Izolace a identifikace kvasinek z potravinářských vzorků

DANA SAVICKÁ, JARMILA PAZLAROVÁ, HELENA RŮŽIČKOVÁ, KATEŘINA DEMNEROVÁ

SAVICKÁ, D., PAZLAROVÁ, J., RŮŽIČKOVÁ, H., DEMNEROVÁ, K. – Isolation and identification of yeasts from food samples.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 80-81. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

Basics of identification system was in evaluation of G-code and S-code (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990). Other supplementary tests were applied according to The Yeasts – Taxonomic Study (KURTZMAN et FELL, 2000). In some cases the key for identification of yeasts (DEÁK, 1991; DEÁK et al., 1987) and the simplified key according to Fungi and Food Spoilage (PITT et HOCKING, 1999) were used.

Keywords: yeasts, isolation, identification

Dana Savická, Jarmila Pazlarová, Helena Růžičková, Kateřina Demnerová, Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague 6, Czech Republic. E-mail: dana.savicka@vscht.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Základ identifikačního postupu spočíval ve vyhodnocení znaků G-kódu a S-kódu (KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, 1990). Na základě těchto výsledků byla provedena řada doplňkových testů podle monografie KURTZMAN et FELL (2000). Souběžně byl v některých případech aplikován klíč k identifikaci kvasinek (DEÁK, 1991, DEÁK et BEUCHAT, 1987) a rovněž velmi zjednodušený klíč podle PITT et HOCKING (1999).

Rodový kód (G-kód) zahrnuje především morfologické znaky, ale i tři fyziologické testy (zkvašování glukosy, produkce ureasy a produkce karotenoidů). Druhový kód (S-kód) třídí kvasinky na základě jejich fyziologických vlastností, především kvašení a asimilace sacharidů. Doplňkové testy zahrnovaly růst při 37° nebo 40°C, růst v přítomnosti vyššího množství NaCl nebo glukosy, růst na minimálním médiu bez vitamínů, v některých případech růst v médiu s cykloheximidem či kvašení dalších sacharidů aj.

Základní testy:

Produkce ureasy:

Tento test poskytuje základní orientaci, zda se jedná o askomycetní nebo basidiomycetní kvasinku (ureasa – askomycety, ureasa + basidiomycety). Je to orientační rozdělení, existují i některé výjimky. K odečtení byly použity diagnostické disky (ITEST plus s.r.o.). Principem testu je detekce amoniaku, který vzniká při hydrolyse močoviny působením ureasy.

Sporulace:

Kultura byla nejprve naočkována na sladidinový agar (plnohodnotné médium). Po 24 hod byla z nárůstu připravena velmi hustá suspence v destilované vodě a rozetřena na povrch Fowellova sporulačního agaru (JANDEROVÁ et BENDOVI, 1999). Za 3 až 10 dnů (někdy i déle) provedeme kontrolu sporulace. Sledujeme tvar asků, počet a tvar askospor, případně jejich povrch.

Asimilace nitrátu:

Pro stanovení schopnosti kvasinek využívat nitráty jako jediný zdroj dusíku bylo použito médium Yeast Carbon Base (Difco), do kterého bylo přidáno 1% KNO₃.

Asimilační testy uhlikatých sloučenin:

Pro odečet těchto znaků byl použit komerční set AUXACOLOR (BIO-RAD). Schopnost využívat rozpustný škrob a inulín byla testována na médiu bez zdroje uhlíku s přidáním škrobem nebo inulínem v množství 2%.

Kvasné testy:

Schopnost zkvašovat sacharidy byla testována v 1 % kvasničném autolyzátu se 2% testovaného cukru. Roztok byl plněn do speciálních kvasných trubiček. V případě pozitivní reakce se v zahnuté části trubičky vytváří bublina CO₂.

Pozn.: Další testy, přesný postup stanovení i odečtu výsledků, složení médií atd. viz KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ (1990) a KURTZMAN et FELL (2000).

V průběhu roku 2007 a na začátku roku 2008 byly izolovány a identifikovány např. tyto kvasinky:

Saccharomyces cerevisiae (Coca-cola, Mattoni grepová)

Cryptococcus albidus (Mattoni citrónová)

Zygosaccharomyces sp. (majonéza Neli, krabicové víno, sirup s citrónovou příchutí)

Candida magnoliae/C. sorbosivorans (doplňky pro sportovce)

Candida parapsilosis (Pepsi-čaj) aj.

Přehled použité literatury

DEÁK, T., BEUCHAT, L.R., 1987. Identification of Foodborne Yeasts. J. Food Protect. 50(3): 243-264.

DEÁK, T., 1991. Foodborne Yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 36: 179- 278.

JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ, O., 1999. Úvod do biologie kvasinek. Karolinum, Praha, 96 p.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., 1990. Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Alfa, Bratislava, pp.66-118.

KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. (Eds.), 2000. The Yeasts – a Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam, pp.77-110.

PITT, J.I., HOCKING, A.D., 1999: Fungi and Food Spoilage. Gaithersburg, Aspen, pp. 439-468.

Biologie, rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii* v České republice

MICHAELA SEDLÁŘOVÁ, KAREL STOJASPAL, ALEŠ LEBEDA

SEDLÁŘOVÁ, M., STOJASPAL, K., LEBEDA, A.: **Biology, distribution and pathogenicity of *Plasmopara halstedii* in the Czech Republic.**

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 82-86. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

V posledním desetiletí byl na území ČR zaznamenán opakovaný výskyt plísnovitosti slunečnice (dříve uváděna jako plíseň slunečnicová), jejímž původcem je *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni. Tento biotrofní parazit zástupců čeledi Asteraceae (rody *Helianthus*, *Ageratum*, *Ambrosia*, *Artemisia*, *Iva*, *Xanthium*) je v rámci „downy mildews“ (Peronosporaceae, Oomycota, Chromista) jedinečný tím, že způsobuje systémovou infekci klíčnic i dospělých rostlin. Tlustostěnné oospory, jež se vytvářejí v rostlinných pletivech na konci vegetační sezóny, zamořují půdu a mohou v ní dlouhodobě přežívat (6–10 let). *P. halstedii* pochází ze Severní Ameriky, kde je i známa největší diverzita ras patogenu. V současné době je však rozšířena celosvětově a vyskytuje se ve všech oblastech pěstování slunečnice. Ochrana proti tomuto patogenu je primárně založena na používání fungicidních přípravků. Jedná se zejména o přípravky na bázi metalaxylu, což však vedlo k selekci kmenů *P. halstedii* odolných vůči této skupině látek. Díky této skutečnosti dnes neexistuje spolehlivá chemická ochrana. Rovněž patogenní variabilita *P. halstedii* je velmi rozsáhlá (dosud bylo popsáno 36 ras), přičemž nejrozšířenějšími evropskými rasami jsou rasy 710, 703, 100 a 304. Od roku 2002 je plísnovitost slunečnice zařazena v České republice mezi karanténní choroby a její výskyt je přísně monitorován SRS, přestože je zatím lokální. Podle předběžných testů fenotypu virulence na diferenciacním souboru slunečnice lze předpokládat, že u izolátů získaných v roce 2007 z přirozeně infikované okrasné slunečnice v Olomouci-Holici, se jedná o rasu 700. V roce 2008 byl výskyt příznaků choroby a sporulace patogenu potvrzeny v Brně, Olomouci a Kroměříži. Testování virulence izolátů z těchto lokalit je předmětem dalšího studia Fytopatologické laboratoře KB PřF UP v Olomouci.

During the last decade occurrence of *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni, cause of sunflower downy mildew, has been reported from the Czech Republic several times. This biotrophic parasite of plants ranked in family Asteraceae (*Helianthus*, *Ageratum*, *Ambrosia*, *Artemisia*, *Iva*, *Xanthium* spp.) is unique among the other downy mildews (Peronosporaceae, Oomycota, Chromista) by a systemic infection of seedlings and adult plants. Oospores with thick cell wall, formed in plant tissues by the end of vegetation period, accumulate in soil as they can sustain vital for a long period (6-10 years). *P. halstedii* originates in North America, where the biggest diversity of pathogen races can be found. Nowadays, the distribution *P. halstedii* is worldwide threatening all the main growing areas of sunflower. Protection of the crop had been initially based on fungicide treatment, mostly with metalaxyl as the effective compound, which unfortunately led to selection of resistant *P. halstedii* races. Due to this fact, no reliable and efficient chemical prevention to sunflower downy mildew is available recently. Pathogenic variability of *P. halstedii* is extensive (36 races has already been reported) with races 710, 703, 100 and 304 most spread in European countries. From 2002 the downy mildew of sunflower is treated as a quarantine disease in the Czech Republic and its occurrence is monitored by State Phytosanitary Administration. Preliminary tests of *P. halstedii* isolates, collected from naturally infected ornamental sunflower grown in Olomouc-Holice in 2007, based on phenotypic response of the set of differential sunflower genotypes identified the race 700. In 2008 sunflower downy mildew symptoms and *P. halstedii* sporulation were confirmed on host plants from three habitats in the eastern part of the Czech Republic (Brno, Olomouc and Kroměříž). Identification of pathogen races will be carried out in the Laboratory of Phytopathology, Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc.

Keywords: *Plasmopara halstedii*, distribution, pathogenic variability

Michaela Sedlářová, Karel Stojaspal, Aleš Lebeda, Department of Botany, Faculty of Sciences, Palacký University, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc – Holice, Czech Republic. E-mail: michaela.sedlarova@upol.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Biologie *Plasmopara halstedii*

P. halstedii je přenosná půdou (oospory působí primární infekci klíčících rostlin), větrem (zoosporangia jako sekundární inokulum, v monokultuře působí epidemie) a osivem (infikované nažky se tvoří v plodenstvích slaběji napadených rostlin a mycelium přežívá pod osemením). Tato peronospora napadá za vhodných vlhkostních a teplotních podmínek rostliny po celou dobu vegetace, od fáze děložních listů až do kvetení (ORELLANA, 1970). Pohlavně vzniklé oospory díky tlusté buněčné stěně zůstávají životné v půdě až 10 let, což je celosvětovou hrozbou pro pěstitele slunečnice. Oospory jsou v půdním prostředí rozšiřovány tekoucí vodou a klíčí zoosporangii, ze kterých je uvolňován variabilní počet dvoubíčíkatých zoospor. Pohyblivé zoospory představují primární inokulum pro infekci semenáčků, do kterých pronikají kořeny v zóně kořenového vlášení. Infekce postupuje vzhůru, hypokotyl a stonek prorůstají mezibuněčným myceliem s haustorií a za vhodných podmínek dochází k systémové infekci. Rostliny jsou k ní náchylné jen v průběhu období 2–3 týdnů po vyklíčení, ale i v závislosti na půdní teplotě a vlhkosti. Za vlhka se objevuje sporulace jako masivní povlak sporangioforů s nepohlavními zoosporangii na svrchní i spodní straně děložních i pravých listů, případně i na stoncích. Zoosporangia jsou větrem roznášena na listy dalších rostlin, na kterých se za vlhka uvolňují zoospory, které po encystaci penetrují hostitelská pletiva. Cénocytické vláknité mycelium opět prorůstá mezibuněčné prostory, haustorii čerpá živiny z okolních buněk a na kolonizovaných listech produkuje za vlhka další zoosporangia (BOUTERIGE et al., 2003). Tento nepohlavní proces trvá za optimálních podmínek 1–2 týdny a v porostu náchylné plodiny může vést k epidemii. Koncem vegetačního období dochází v infikovaných pletivech k pohlavnímu procesu, při kterém splývá samčí anteridium se samičím oogoniem, což následně vede k tvorbě tlustostěnných zoospor. *P. halstedii* je homothalický druh, tj. k pohlavnímu procesu není potřeba setkání dvou fyziologicky odlišných mycelií, a oospory se vytvářejí ve velkém množství. S opadem rostlinných zbytků a jejich zapracováním do půdy pak dochází k jejímu zamoření. Pro ověření přítomnosti *P. halstedii* byly vypracovány různé metody detekce: 1/ oospor v půdě vyšetím náchylných genotypů (Gulya); 2/ mycelia v semenech slunečnice na základě PCR (IOOS et al., 2007), nebo 3/ na základě použití monoklonálních protilátek a ELISA (BOUTERIGE et al., 2000).

Rozšíření a patogenita *Plasmopara halstedii*

Tento patogen byl poprvé nalezen W.S. Halstedem v Severní Americe na *Eupatorium purpureum* L. („Sweetscented Joe Pye Weed“, sadec červený) a v roce 1882 pojmenován W.G. Farlowem jako *Peronospora halstedii* Farl. V roce 1888 byl tento druh přejmenován P.A. Saccardem na *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & De Toni. V 50. a 60. letech 20. století bylo užíváno i vědeckého označení *Plasmopara helianthi* Novot. pro izoláty infikující slunečnici a NOVOTELNOVA (1962) dokonce rozlišovala 3 formae speciales (f. *helianthi*, f. *perennis*, f. *patens*) na základě fyziologické a morfologické odlišnosti. Tento koncept však nebyl vědeckou komunitou všeobecně přijat. V 70. letech se v Evropě a Severní Americe začala rozsáhle a intenzivně pěstovat slunečnice, hned od počátku však byla problémem *P. halstedii* (ORELLANA, 1970). Již tehdy byla potvrzena existence fyziologických ras plísně. Podle jejich původu byly rozlišeny dvě rasy označované čísly: 1 (100) nebo „Evropská rasa“, a rasa 2 (300) nebo „Red River Valley rasa“ (z USA). Rozlišení ras bylo založeno na schopnosti infikovat linie slunečnice s genem rezistence PI1, který zajišťoval odolnost k rase 1 (100). Postupně byly zjišťovány nové rasy, jednak na počátku 80. let v centrální oblasti S. Ameriky, od 90. let pak i v evropských zemích. V počátcích studia ras byly problémy nejen s jejich identifikací (nejednotné diferenciacní soubory), ale i s jejich označením resp. popisem. Až v roce 1998 se fytopatologové na mezinárodní úrovni shodli na jednotném

diferenciačním souboru devíti genotypů slunečnice, ale i na metodě hodnocení jejich reakce po inokulaci *P. halstedii*, včetně popisu ras patogenu pomocí trojčíselného kódovacího systému (GULYA, 2007).

V roce 2006 byl sestaven seznam všech známých ras z hlavních zemí produkujících slunečnici (USA, Kanada, Francie, Španělsko, Rusko, Maďarsko atd.). V současné době je choroba celosvětově rozšířena (www.eppo.org) a dosud bylo popsáno 36 ras *P. halstedii* (GULYA, 2007). Z literatury vyplývají značné rozdíly v četnosti výskytu jednotlivých ras a jejich virulenci. V Asii a J. Americe bylo identifikováno 5 ras, v Africe 10, v Evropě bylo zaznamenáno 21 ras a v S. Americe 24. Z dosavadních výzkumů je rovněž patrné, že rasy 100 a 300 (1 a 2) byly v minulosti převažující, ovšem po roce 1988 začaly převládat rasy 700 a 730 (3 a 4). V současnosti nebyly izolovány starší a méně patogenní rasy 100 a 300, a je pravděpodobné, že vymizely nebo jsou maskovány přítomností více patogenních ras. Vzhledem k neustálému vývoji virulence v populacích patogenu a globalizaci, která usnadňuje rychlé šíření na velké vzdálenosti, je poměrně složité sledovat geografické rozšiřování a výskyt ras tohoto patogenu ve světě (www.eppo.org). Lokální výzkumy však ukazují, že v různých zemích převažují různé rasy *P. halstedii*. Některé rasy se vyskytují pouze lokálně, naopak jiné (např. 100, 300, 330, 700, 703, 710, 730 a 770) mají celosvětové rozšíření. Od roku 2006 patří mezi dominantní zejména rasy 700, 710, 730 a 770 (GULYA, 2007).

Na území bývalého Československa (jižní Morava /okresy Brno-venkov a Zlín/, jižní Slovensko /okresy Bratislava a Nitra/) byla *P. halstedii* poprvé popsána v polovině 50. let 20. století BOJŇANSKÝM (1956, 1957). V rámci České republiky byla infekce *P. halstedii* opětovně zaznamenána v roce 1999 a to na provokačním pozemku MZLU v Brně (VEVERKA et KŘÍŽKOVÁ, 2006). Od r. 2002 je plísnovitost slunečnice zařazena mezi karanténní choroby, byly zavedeny rostlinolékařské pasy a je možno pěstovat pouze certifikované osivo. V současné době je výskyt *P. halstedii* na území České republiky považován za „spíše vzácný“ (KOKEŠ et MÜLLER, 2004), přičemž naše pozorování realizovaná v letech 2007 a 2008 tuto skutečnost potvrzují. Nicméně někteří autoři upozorňují na její možné další šíření a potenciální nebezpečnost (HÝSEK, 2006).

Z hlediska odrůdové odolnosti slunečnice vůči *P. halstedii* lze konstatovat, že v posledním desetiletí byly uvedeny na český trh hybridy slunečnice s rezistencí k evropským rasám plísně, tzv. RM hybridy, a to od firmy Rustica. Cílevědomý a intenzivní výzkum rozšíření této choroby a fyziologických ras *P. halstedii* byl zahájen až v roce 2007 na našem pracovišti. V roce 2007 byly vzorky *P. halstedii* získány pouze z pozemku v rámci areálu Biocentra PřF UP v Olomouci-Holici. V roce 2008 se v rámci rozsáhlého monitoringu na území České republiky podařilo získat vzorky plísně z několika lokalit (areál Biocentra PřF UP v Olomouci-Holici, provokační pole odrůdové zkušebny ÚZKUZ v Brně-Chrlicích a porosty slunečnice na pozemcích VÚZ v Kroměříži). Identifikace ras z těchto lokalit bude realizována v podzimním období roku 2008.

Kultivace *P. halstedii*

Interakce slunečnice-*Plasmopara halstedii* je na našem pracovišti studována nejen z hlediska rozšíření choroby, identifikace a výskytu jednotlivých ras patogenu, ale i histopatologických změn rostlin v průběhu patogeneze. K těmto účelům bylo třeba ověřit a modifikovat metody pěstování patogenu v podmínkách *in vivo*, testování a stanovení fenotypu virulence na diferenciačním souboru genotypů slunečnice. Fytopatologická laboratoř KB PřF UP v Olomouci má v současné době k dispozici úplnou sadu diferenciačních genotypů slunečnice, které byly získány z USA a Maďarska. Rovněž byly z Maďarska získány některé referenční izoláty resp. rasy patogenu. Nové izoláty jsou získávány na základě monitorování

porostů slunečnice na území České republiky a terénními sběry infikovaných rostlin. Izoláty jsou udržovány na pletivech náchylné odrůdy slunečnice „Peredovik“. V laboratorních podmínkách je virulence *P. halstedii* testována na souboru diferenciacních genotypů, přičemž je používána metoda listových disků, jež jsou odvozeny z děložních nebo prvních pravých listů slunečnice (SACKSTON et VIMARD, 1988). Příznivé klimatické podmínky pro rozvoj choroby v roce 2008 umožnily také provést orientační polní pokus na zamořeném pozemku v areálu Biocentra PřF UP v Olomouci-Holici, jehož výsledky budou doplněny a upřesněny laboratorními testy.

Závěr

V posledních dvou letech (2007 a 2008) se podařilo Fytopatologické laboratoři KB PřF UP v Olomouci rozpracovat výzkum některých otázek týkajících se původce plísnovitosti slunečnice (*P. halstedii*). Výsledky dvouletého monitorování rozšíření na území České republiky ukazují, že *P. halstedii* není běžně se vyskytujícím patogenem slunečnice. Rovněž jeho škodlivost nelze dosud považovat za významnou a vážnou z hlediska zdravotního stavu a výnosů porostů slunečnice. Rovněž byly rozpracovány experimentální přístupy práce s tímto patogenem, včetně jeho izolace a dlouhodobého uchovávání, metod testování virulence, detekce ras a testování odrůdové odolnosti. Základem tohoto přístupu bylo získání úplného diferenciacního souboru genotypů slunečnice a základní kolekce izolátů *P. halstedii*. V příštích letech se naše práce bude soustřeďovat nejen na získání úplnějších dat o rozšíření a škodlivosti patogenu na území České republiky, ale i na podrobný výzkum jeho rasového spektra a odrůdové odolnosti vůči lokálně se vyskytujícím rasám *P. halstedii*.

Poděkování

Poděkování autorů patří paní D. Vondrákové za technickou pomoc; pracovníkům ÚKZÚZ Brno-Chrlice a VÚZ Kroměříž za poskytnutí informací a vzorků *P. halstedii*. Projekt byl podpořen granty NAZV (QH 71254) a MŠMT ČR (MSM 6198959215).

Přehled použité literatury

- BOJŇANSKÝ, V., 1956. Peronospora slunečnicová (*Plasmopara halstedii*) Farlow (Berl. Et de Toni) v ČSR. Pôľnohospodárstvo 3: 397-401.
- BOJŇANSKÝ, V., 1957. Bude peronospora slunečnicová i u nás vážnou chorobou? Za vysokou úrodu 6: 19.
- BOUTERIGE, S., ROBERT, R., BOUCHARA, J.-P., MAROT-LEBLOND, A., MOLINÉRO, V., SENET, J.M., 2000. Production and characterization of two monoclonal antibodies specific for *Plasmopara halstedii*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3277–3282.
- BOUTERIGE, S., TRONCHIN, G., LESOURD, M., MAROT-LEBLOND, A., MOLINÉRO, V., BOUCHARA, J.-P., AND ROBERT, R., 2003. Ultrastructural and immunochemical changes during the in vitro development of *Plasmopara halstedii*. Phytopathology 93: 1023-1030.
- GULYA, T.J., 2007. Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. In: LEBEDA A., SPENCER-PHILLIPS P.T.N. (Eds.), Advances in Downy Mildew Research, Vol. 3. Proceedings of The 2nd International Downy Mildews Symposium. UP in Olomouc and JOLA, Kostelec na Hane, Czech Republic, pp. 121-134.
- HÝSEK, J., 2006. Plíseň slunečnicová (*Plasmopara halstedii*) – její šíření a nebezpečnost v posledních letech. Agro – ochrana, výživa, odrůdy 11 (5): 30-32.

- IOOS, R., LAUGUSTIN, L., ROSE, S., TOURVIEILLE, J., TOURVIEILLE DE LABROUHE, D., 2007. Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathol.* 56: 209-218.
- KOKEŠ, P., MÜLLER, J., 2004. Checklist of downy mildews, rusts and smuts of Moravia and Silesia. *Czech Mycol.* 56: 121-148.
- NOVOTELNOVA, N.S., 1962. *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. Et de Toni as a conspecies. *Bot. J. Acad. Sci. USSR* 47: 970-981.
- ORELLANA, R.G., 1970. Resistance and susceptibility to downy mildew and variability in *Plasmopara halstedii*. *Bull. Torrey Bot. Club* 97: 91-97.
- SACKSTON, W.E., VIMARD, B., 1988. Leaf disc immersion (LDI) inoculation of sunflower with *Plasmopara halstedii* for in vitro determination of host-pathogen relationships. *Plant Disease* 72: 227-229.
- VEVERKA, K., KŘÍŽKOVÁ-KUDLÍKOVÁ, I., 2006. Problematika testování odolnosti hybridů slunečnice vůči houbovým chorobám na provokačním pozemku. In: XVII. česká a slovenská konference o ochraně rostlin, 12.-14. září 2006, ČZU Praha, (Sborník abstraktů), pp. 287-288.
- www.eppo.org

Mikroskopické huby izolované z fresky o Sv. Ladislavovi v kostole Sv. Kataríny vo Veľkej Lomnici

ALEXANDRA ŠIMONOVÍČOVÁ, DOMENICO PANGALLO, KATARÍNA CHOVANOVÁ, FILOMENA DE LEO, CLARA URZI

ŠIMONOVÍČOVÁ, A., PANGALLO, D., CHOVANOVÁ, K., DE LEO, F., URZI, C.: **Microscopic fungi on St. Ladislav fresco in church of St. Catharine in Veľká Lomnica village.**

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 87-91. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

The aim of the present work was to study the mycological analyses responsible for unaesthetic patinas on the St. Ladislav fresco surface (beginning of 14th Century) in the church of St. Catharine in Veľká Lomnica village. Mycological analyses and indoor fungi from sacristy of the church, where is the fresco located, is very poor but with massive occurrence of the species of genera *Cladosporium* and *Aspergillus*. From the indoor air the species of genera *Alternaria*, *Arthrinium*, *Botrytis*, *Botryotinia*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Scytalidium* were isolated. During the sampling the temperature of 15.8 °C and 93 % of relative humidity were recorded.

Keywords: microscopic fungi, St. Ladislav fresco, indoor air, church of St. Catharine

Alexandra Šimonovičová, Department of Pedology, Faculty of Sciences, Komenský University, Mlynská dolina B2, 842 15 Bratislava, Slovakia. E-mail: asimonovicova@fns.uniba.sk

Katarína Chovanová, Institute of Molecular Biology SAS, Dúbravská cesta 21, Bratislava, Slovakia;

Domenico Pangallo, Filomena De Leo, Clara Urzi, Department Of Life Science, University of Messina, Salita Sperone 31, Messina, Italy

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Tradičia tvorby nástennej maľby je veľmi stará a datuje sa až do prehistorického obdobia (GARG et al., 1995). Pod nástennou maľbou dnes rozumieme farebnú dekoráciu steny alebo klenby vytvorenú do suchej omietky „al secco“, do čerstvej omietky „al fresco“ alebo zmiešanou technikou „frescosecco“. Za nástennú maľbu sa niekedy tiež považujú tzv. sgrafito a mozaika. Sgrafito predstavuje vyškrabávanie do viacvrstvovej hladenej omietky, čím sa odkrýva spodná vrstva a vzniká určitý motív. Mozaika je ornamentálna alebo figurálna plošná výzdoba z drobných kociek (kameň, sklo a pod.) zasadených do mäkkej omietky alebo tmelu.

Výskyt mikroorganizmov na rôznych historických objektoch v podobe biofilmu predstavuje vážny problém, ktorý veľmi často úzko súvisí so zmenami vlhkosti (nad 60 % relatívnej vlhkosti) a teploty (v rozmedzí od 10-30 °C). Tento miniatúrny mikrobiálny ekosystém je vysoko špecializovaný a zahŕňa baktérie, aktinomycéty, mikroskopické huby a riasy. Svojim výskytom mikroorganizmy indukujú fyzikálne a chemické zmeny substrátu (GORBUSHINA, 2007; NUGARI et al., 1993). Následkom biodeteriorácie substrátu je jeho postupná biodegradácia. V prípade farebnej dekorácie môže dochádzať až k jej mechanickému poškodeniu, ako je napr. olupovanie, ktoré je spôsobené vytláčaním jednotlivých farebných vrstiev. Tieto farebné vrstvy sú vytláčané buď mycéliom rastúcich mikroskopických húb alebo tvorbou fruktifikačných orgánov, ktoré vznikajú pod nimi (GARG et al., 1995). Výsledkom fyziologických prejavov jednotlivých skupín mikroorganizmov

môžu byť tiež farebné zmeny spôsobené tvorbou pigmentu, produkciou extracelulárnych enzýmov a pod. (ŠIMONOVICHOVÁ, 2007). Z mikroorganizmov pritom dominujú mikroskopické huby, ktoré sú považované za hlavnú zložku spoločenstva podieľajúceho sa na biodegradácii (MORTON et SURNAM, 1994).

Materiál a metódy

Freska o Sv. Ladislavovi sa nachádza v sakristii neskororománskeho kostola Sv. Kataríny Alexandrijskej z r. 1257 vo Veľkej Lomnici. Freska predstavuje legendu o víťazstve uhorského kráľa Sv. Ladislava v r. 1093 nad Kumánmi. Cyklus namaľoval neznámy umelec v rokoch 1310-1320. V druhej polovici 16. stor., v období reformácie, obyvatelia konvertovali na protestantskú vieru a nástenné maľby, vrátane fresky, boli prekryté hlinenou omietkou. V 18. stor. protestanti postavili nový kostol a kostol Sv. Kataríny sa vrátil pod správu katolíckej cirkvi. Stredoveká freska o Sv. Ladislavovi, ktorá patrí k najvzácnejším na Slovensku, bola objavená až v r. 1957. V r. 1964 bola freska reštaurovaná. V priebehu opätovného reštaurovania v júly 2007 sme odoberali vzorky na mikrobiologickú analýzu.

Priamo z fresky sme odoberali vzorky zo 6-tich miest pomocou lepiacej pásky (MAT), vždy v dvojnásobnom opakovaní. Lepiacu pásku sme pritlačili na miesto odberu, následne na sterilné podložné sklíčko a uložili do prepravného kontajnera. V laboratóriu sme pásku prezreli pod mikroskopom v kvapke destilovanej vody alebo v 0,1 %-nom roztoku akridínovej oranže. Následne sme pásku postrihali na malé kúsky 5 x 5 mm, ktoré sme nechali kultivovať na živnom médiu DRBC (Oxoid) pri 28 °C 20 dní (GARG et al., 1995; URZI et DE LEO, 2001). Narastané kolónie mikroskopických húb sme preočkovali na šikmý SAB agar (Himedia, Bombay) a identifikovali podľa diagnostickej literatúry.

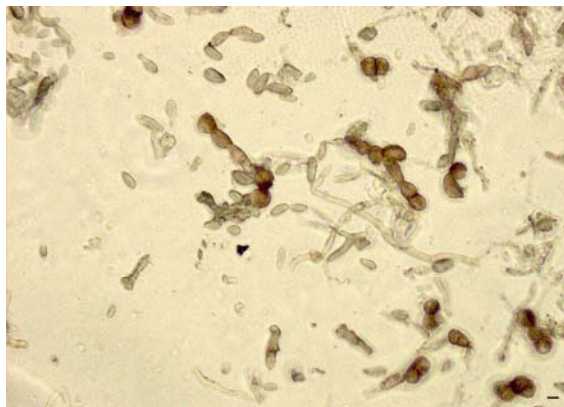
Na odber vzduchu sme použili vzorkovač vzduchu aeroskop Mas 100 Eco (Merck, Nemecko), ktorý je založený na princípe prúdiaceho vzduchu priamo cez kultivačné médium (DRBC Oxoid) v Petriho miske. Vzduch sme odoberali z dvoch rôznych miest a v dvojnásobnom opakovaní.

Bakteriologická analýza fresky a vnútorných priestorov dopĺňa analýzu výskytu mikroskopických húb (PANGALLO et al., 2008).

Výsledky a diskusia

V júly 2007 sme metódou odtlačkov pomocou MAT pásky priamo z fresky izolovali a identifikovali iba 4 druhy mikroskopických húb, čo je pomerne málo, ale s masívnym

Obr. 1. Úlomky mycélia a konídie u *Cladosporium* sp. Mierka 10 µm.



výskytom druhov rodu *Cladosporium* (*C. herbarum*, *C. macrocarpum*). Napriek tomu, že tieto druhy boli veľmi časté, pozorovali sme ich iba v preparátoch z lepiacej pásky (Obr. 1). Na kultivačnom DRBC médiu vôbec nerástli. Z toho možno usudzovať, že na freske sa nachádzali v neaktívnom stave ako súčasť stagnujúceho mikrobiálneho spoločenstva (GORBUSHINA et al., 2004).

Tab. 1. Mikroskopické huby izolované z fresky a zo vzduchu.

Mikroskopické huby	Freska						Vzduch	
	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	V 1	V 2
<i>Alternaria tenuissima</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Arthrimum phaeospermum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>A. nidulans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>A. versicolor</i>	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Botryotinia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Chaetomium</i> sp.	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+	+
<i>Cladosporium macrocarpum</i> / <i>C. herbarum</i>	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+ ^{MAT}	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Scytalidium</i> sp.	-	-	-	+	-	-	-	-
Spolu: 14	5	3	4	4	2	2	10	10

+^{MAT} - druhy rodu *Cladosporium* pozorované priamo na MAT páske.

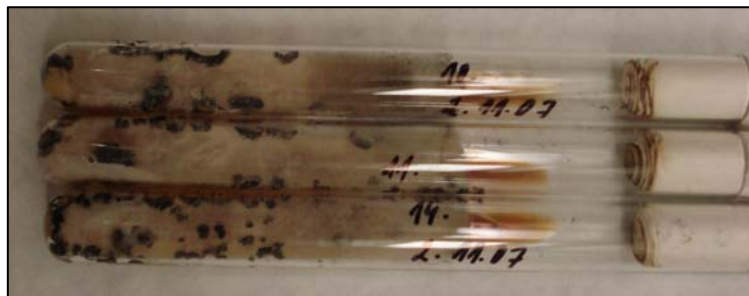
Druhým veľmi častým bol rod *Aspergillus* s druhmi *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. versicolor*. Výskyt druhov rodu *Aspergillus* a *Cladosporium* je na freskách veľmi častý (GARG et al., 1995; GORBUSHINA et al., 2004; GUGKIELMINETTI et al., 1994; NUGARI et al., 1993; ŠIMONVIČOVÁ, 2007). Ojedinele sme zaznamenali zástupcov rodu *Chaetomium* a *Scytalidium* (Tab. 1).

Oligotrofné mikroskopické huby veľmi dobre prežívajú na farebnom povrchu, vrátane fresiek, kde im postačuje minimálne množstvo organického materiálu, napr. vzdušný prach (MORTON et SURNAM, 1994) alebo organický materiál z pôvodnej farby. V minulosti sa napr. do červenej farby pridával pigment (karmín / kermeš) vyrábaný z určitého druhu červca v Strednej Ázii. Po roku 1549 ho vyrábali z hmyzu *Coccus cacti*, ktorý žije v kaktusoch v Strednej Amerike a nazvali ho košenila (ŠIMONVIČOVÁ, 2007). Mycélium húb sa môže rovnako stať zdrojom výživy mikroskopickým artropódam a tie následne entomofágnym hubám (GORBUSHINA et PETERSEN, 2000).

Kontaminácia vnútorných priestorov sakristie mikroskopickými hubami je v porovnaní s freskou oveľa bohatšia (Tab. 1). Okrem dominujúcich druhov rodu *Cladosporium* a *Aspergillus* sme identifikovali tiež zástupcov rodu *Alternaria*, *Arthrimum*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Botryotinia* a *Scytalidium*. Druhy rodu *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* patria medzi veľmi často izolované z vnútorných priestorov rôznych historických objektov (GNIADK et al., 2005; MEDRELA-KUDER, 2002;

ŠIMONVIČOVÁ, 2007). Druhy rodu *Botrytis* /*Botryotinia* patria medzi fytopatogénne druhy a menej časté, resp. zo vzduchu izolované doteraz iba v anamorfnnej forme ako *Botrytis cinerea* (PIECKOVÁ et WILKINS, 2004; ŠIMONVIČOVÁ, 2007).

Obr. 2. Druh *Botrytis cinerea* / *Botryotinia fuckeliana* izolovaný zo vzduchu.



Teleomorfné štádium *Botryotinia fuckeliana* (Obr. 2) sa do vnútorných priestorov pravdepodobne dostalo v podobe sklerócií na odeve ľudí, pretože sa jedná o oblasť s aktívnym využívaním pôdy na poľnohospodárske a záhradkárské účely a odber vzoriek sme realizovali v júly.

V čase odberu vzoriek sme v sakristii zistili teplotu 15,8 °C a 93%-nú relatívnu vlhkosť vzduchu. Sú to veľmi vhodné podmienky na rozvoj mikroskopických húb a to predovšetkým druhov rodu *Cladosporium*, čo potvrdila najmä analýza vnútorného prostredia. V prípade, že nedôjde k zmene podmienok v priestoroch sakristie, resp. k ich vhodnej úprave a to najmä znížením relatívnej vlhkosti vzduchu a jeho dostatočnej cirkulácii, môžeme predpokladať, že kontaminácia fresky mikroskopickými hubami nebude po reštaurovaní objektu odstránená.

Záver

Napriek tomu, že freska o Sv. Ladislavovi patrí k najvzácnejším na Slovensku, priestor, kde sa nachádza je veľmi vlhký a nevyhovujúci. V prípade, že sa nezmenia vnútorné podmienky v sakristii, tak aj napriek úspešnému reštaurovaní fresky sa na nej môžu neskôr znova objaviť mikroskopické huby a ich biodegradačná činnosť bude pokračovať i naďalej.

Príspevok je súčasťou grantovej úlohy VEGA 2/0117/08.

Prehľad použitej literatúry

- GARG, K.L., JAIN, K.K., MISHRA, A.K., 1995. Role of fungi in the deterioration of wall paintings. Sci. Total Environ. 167, 255-271.
- GNIADEK, A., MACURA A.B., OKSIEJZUK, E., KRAJEWSKA-KUŁAK, E., ŁUKASZUK, C., 2005. Fungi in the air of selected social welfare homes in the Małopolskie and Podlaskie provinces - a comparative study. Int. Biodet. Biodegr. 55, 58-91.
- GORBUSHINA, A., 2007. Life on the rocks. Environ. Microbiol. 9, 7, 1613-1631.
- GORBUSHINA, A., PETERSEN, K., 2000. Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements. Int. Biodet. Biodegr. 46, 277-284.

- GORBUSHINA, A., HEYRMAN, J., DORNIEDEN, T., GONZALEZ-DELVALLE, M., KRUMBEIN, W.E., LAIZ, L., PETERSEN, K., SAIZ-JIMENEZ, C., SWINGS, J., 2004. Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int. Biodet. Biodegr.* 53, 1, 13-24.
- GUGLIELMINETTI, M., DE GUILI MORGHEN, C., RADAELLI, A., BISTONI, F., CARRUBA, G., SPERA, G., GARETTA, G., 1994. Mycological and ultrastructural studies to evaluate biodeterioration of mural paintings. Detection of fungi and mites in frescos of the monastery of St. Damian in Assisi. *Int. Biodet. Biodegr.* 34 (3-4): 269-283.
- MADRELA-KUDER, E., 2002. Seasonal variation in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Cracow. *Int. Biodet. Biodegr.* 52, 203-205.
- MORTON, L.H.G., SURNAM, S.B., 1994. Biofilms in biodeterioration - a review. *Int. Biodet. Biodegr.* 34(3-4): 203-221.
- NUGARI, M.P., REALINI, M., ROCCARDI, A., 1993. Contamination of mural paintings by indoor airborne fungal spores. *Aerobiologia* 9, 2-3, 131-139.
- PANGALLO, D., CHOVANOVÁ, K., ŠIMONOVÍČOVÁ, A., DE LEO, F., URZI, C., 2008. Assessment of the biodeterioration risk of the Ladislav legend fresco in Veľka Lomnica (Sk) through non-invasive methods. In: LUKASZEWICZ, J. W. et NIEMCEWICZ, P. (Eds): *Proceeding of 11th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. 15-20 September 2008, Torun, Poland. Vol. I., 457-464.
- PIECKOVÁ, E., WILKINS, K., 2004. Airway toxicity of house dust and its fungal composition. *Ann. Agr. Environ. Med.* 11, 67-73.
- ŠIMONOVÍČOVÁ, A., 2007. Mykologická analýza interiérov historických budov. *Acta Environ. Univ. Comen. (Bratislava)* 15, 2, 99-107.
- URZI, C., DE LEO, F., 2001. Sampling with adhesive tape strips: an easy and rapid method to monitor microbial colonization on monuments surfaces. *J. Microbiol. Meth.* 44, 1-11.

Zaujímavé nálezy mikromycét na pšenici slovenského pôvodu

DANA TANČINOVÁ, MÁRIA DOVIČIČOVÁ, ROMAN LABUDA, ZUZANA PIOVARČIOVÁ, SOŇA FELŠÖCIOVÁ

TANČINOVÁ, D. DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R., PIOVARČIOVÁ, Z., FELŠÖCIOVÁ, S.: Interesting findings of fungi from slovak wheat.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 92-97. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

In this paper, first findings of *Nigrospora oryzae* and *Dichotomophthora lutea* on the wheat of Slovak origin are presented. At the same time, they are the first reported isolates of these species from the area of Slovakia.

Key words: *Nigrospora oryzae*, *Dichotomophthora lutea*, wheat, Slovak Republic

Dana Tančinová, Mária Dovičičová, Zuzana Piovarčiová, Soňa Felšöciiová, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia. E-mail: Dana.Tancinova@uniag.sk

Roman Labuda, Katedra mikrobiológie, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Biopure Referenzsubstanzen GmbH, Technopark 1, A-3430 Tulln, Austria

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Pri štúdiu vláknitých mikroskopických húb nachádzajúcich sa v resp. na pšenici slovenského pôvodu sme vyizolovali a identifikovali zaujímavé druhy mikromycét. Ide o prvé nálezy týchto druhov z územia Slovenskej republiky.

Materiál a metódy

Vzorky a spracovanie vzoriek na mykologickú analýzu:

pšenica:

rok zberu 2003

- veľkokapacitné sklady, 8 vzoriek

rok zberu 2004

- veľkokapacitné sklady, 10 vzoriek

rok zberu 2006

- sklady, 18 vzoriek (6 vzoriek pšenice dopestovanej konvenčným spôsobom obhospodarovania pôdy, 12 vzoriek z fariem s certifikátom ekologická farma)

rok zberu 2007

- sklady, 30 vzoriek (15 vzoriek pšenice dopestovanej konvenčným spôsobom obhospodarovania pôdy, 5 vzoriek pšenice dopestovanej konvenčným spôsobom obhospodarovania pôdy, bez fungicídnej ochrany, 10 vzoriek z fariem s certifikátom ekologická farma)

Vzorky	Úprava vzorky pred rozborom	Metóda rozboru	Živné pôdy
Pšenica zber 2003 a 2004	homogenizácia (laboratórny mlynček)	platňová zried'ovacia	GKCH, MEA, DRBC
Pšenica zber 2006 a 2007	homogenizácia (laboratórny mlynček)	platňová zried'ovacia	MEA, DRBC
	oplach endogénna kontaminácia (po povrchovej sterilizácii 0,4 % chloramínom)	ukladanie 100 zŕn na agarové platne	DRBC

Použité skratky: GKCH - glukózový agar s kvasničným extraktom, a chloramfenikolom; DRBC - agar s dichlóranom, bengálskou červeňou a chloramfenikolom; MEA - agar so sladínovým extraktom

Použité mykologické kľúče: DOMSCH et al., 1980; ELLIS, 1971; DE HOOG et OORSCHOT, 1983, DE HOOG et al., 2000; WATANABE, 2002.

Výsledky a diskusia

Nigrospora

Rod *Nigrospora* Zimmerm. podľa ELLISA (1971) zahŕňa 4 druhy. Hlavným identifikačným znakom je veľkosť konídií. Dĺžka spór nami meraných izolátov bola od 12,75 µm do 14,88 µm (Ø 13,5 µm), čo zodpovedá druhu *Nigrospora oryzae*. Kolónie na MEA (Obr. 1) a OA (Obr. 2) sú spočiatku biele vatovité počas sporulácie tmavnú do hneda až sivočierna a podobajú sa na kolónie rodu *Mucor*. Konidiogénna bunka je zdurená, hyalínna, ampuliformná a tvorí jednu globóznú až subglobóznú čiernu spóru.

Nigrospora oryzae (Berk. & Br.) Petch teleomorfa *Khuskia oryzae* Hudson – druh sme prvý krát izolovali z pšenice zberanej v roku 2003 1 izolát (homogenizovaná vzorka, DRBC) – odberové miesto Šaľa, následne v pšenici zberanej v roku 2004 2 izoláty z jednej vzorky (homogenizovaná vzorka, GKCH) – odberové miesto Rybany. Od roku 2006 sme začali pri mykologických analýzach pšenice používať okrem zhomogenizovania vzorky na laboratórnom mlynčeku aj metódu priameho ukladania povrchovo vysterilizovaných zŕn na agarové platne resp. na sledovanie povrchovej mykocenózy sme použili metódu analýzy oplachu pšeničných zŕn.

Z troch uvedených spôsobov izolácie sme získali nasledovné výsledky:

Zber 2006

- Oplach: 1 izolát (MEA).
- Endogénna kontaminácia (DRBC): 24 izolátov z toho
 - 14 izolátov z konvenčného poľnohospodárstva (83 % pozitívnych vzoriek),
 - 10 izolátov z ekologického poľnohospodárstva (33 % pozitívnych vzoriek).
- Šrot: 0 izolátov.

Zber 2007

- Oplach: 5 izolátov (3 MEA, 2 DRBC) (13 % pozitívnych vzoriek).
- Endogénna kontaminácia (DRBC): 149 izolátov z toho
 - 127 izolátov z konvenčného poľnohospodárstva (80 % pozitívnych vzoriek),
 - 2 izoláty z konvenčného poľnohospodárstva bez fungicídov (20 % pozitívnych vzoriek),
 - 20 izolátov z ekologického poľnohospodárstva (50 % pozitívnych vzoriek).
- Šrot: 0 izolátov.

Nigrospora oryzae je druh, ktorý sa veľmi často vyskytuje v tropických krajinách a zriedkavo býva zaznamenaný z krajín s miernejšou teplotou. Vyskytuje sa na rozmanitých druhoch rastlín, obzvlášť na ryži, vo vzduchu a pôde (ELLIS, 1971). Infikované zrná ryže sú sfarbené niekedy čierne, biela farba je spôsobená narastenou masou mycélia. Kontaminácia sa môže vyskytovať pred zberom, počas zberu i počas spracovania ryže (SEMPERE et SANTAMATINA, 2008). Ani u jednej nami analyzovanej vzorky sme nepozorovali zmeny na zrnách. Počet izolátov a frekvencia výskytu v našich vzorkách bola výrazne ovplyvnená spôsobom mykologického vyšetrenia vzorky. Najviac izolátov sme detegovali z endogénne mykocénózy povrchovo vysterilizovaných zŕn pšenice. Počas sledovaného obdobia sme zaznamenali nárast endogénne kontaminovaných zŕn druhom *Nigrospora oryzae* z 1,3 % pozitívnych zŕn v úrode zberanej v roku 2006 (1 785 analyzovaných zŕn) na 4,9 % v úrode z roku 2007 (3 000 analyzovaných zŕn). CLEAR et PATRICK (1993) uvádzajú, že rod *Nigrospora* kontaminuje každoročne viac ako 1 percento zŕn pšenice v Ontáriu. Na Slovensku druh *Nigrospora oryzae* doposiaľ nebol identifikovaný. FRANKOVÁ et al. (2002) izolovali zástupcu rodu *Nigrospora* – *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) z vodárenskej nádrže Nová Bystrica a z drevenej plastiky pochádzajúcej z Afriky.

Dichotomophthora

Z rodu *Dichotomophthora* sme izolovali len jeden izolát zo zošrotovanej vzorky pšenice na živnej pôde MEA.

DE HOOG et al. (1983) uvádzajú dva druhy patriace do rodu *Dichotomophthora*. Na základe identifikačných znakov makro a mikromorfologických sme náš izolát identifikovali ako ***Dichotomophthora lutea***. Na OA pri teplote 25 ± 1 °C po siedmych dňoch sú kolónie s priemerom 20 – 30 mm, plstnaté, trochu nadýchané, s šedým fertilným vzdušným mycéliom vysokým 1 – 2 mm, s čiernastými skleróciami napoly ponorenými do média, kolónie produkujú difundujúci exudát, ktorý spočiatku farbí agar na bledožlté, neskôr svetlo oranžovo; okraje nedefinované a nepravidelné; reverz čiernastý s oranžovými škvrkami (Obr. 5). Hýfy spočiatku hyalínne, čoskoro bledohnedé, septované. Konidiofory (Obr. 6) vzpriamené, červenkasto hnedé, tmavšie blízko apikálneho konca, hrubostenné, jednoducho alebo nepravidelne vetvené, merajú do 850 µm po konidiálnu hlavicu, ktorá je zvyčajne rozdelená dva až tri krát, s početnými apikálnymi okrúhlymi alebo jemne hranatými lalokmi, každý nesie jednotlivú apikálnu konídiu, po odpadnutí zanechávajúcu malú, subhyalínnu, plochú jazvu. Konídie spočiatku subhyalínne, čoskoro červenkasto hnedé, s 1 – 5 pseudoseptami, hladké a hrubostenné, elipsovité až cylindrické s okrúhlou bázou a vrcholom alebo takmer vajcovité, zriedkavo jemne zakrivené, okolo 30 – 115 x 10 – 20 µm náš izolát mal konídie od 23,4 – 64,7 x 8,95 – 12,85 µm. Skleróciá (Obr. 7) pripomínajú nedozreté peritéciá, sú subglobózne až globózne, tmavo hnedé až takmer čierne.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol s podporou projektov VEGA 1/3456/06 a KEGA 3/2080/07.

Literatúra

- CLEAR, R.M., PATRICK, S.K., 1993. Prevalence of some seed-borne fungi on soft white winter-wheat seed from Ontario, Canada. Can. Plant Dis. Sur. 73 (2): 143-149.
- DE HOOG, G.S., VAN OORSCHOT, A.N., 1983. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. I. Notes on the genus *Dichotomophthora*. Mycology 86 (1): 55-60.

- DE HOOG, G.S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M.J., 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000, 1126 p.
- DOMSH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.-H., 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol. 1. Academic Press, London etc., 859 p.
- ELLIS, M.B., 1971. Dematiaceous hyphomycetes. CAB, England, 608 p.
- FRANKOVÁ, E., TÓTHOVÁ, L., ŠIMONOVICHOVÁ, A., GÓDYOVÁ, M., 2002. Zriedkavé pôdne mikromycéty v atypických biotopoch. In: Život v pôde, 19.1. 2002, Československá spoločnosť mikrobiologická, Ústav krajinej ekológie SAV, Bratislava, pp. 27-29.
- SEMPERE, F., SANTAMARINA, M.P., 2008. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. Int. J. Food Mycol. 122, 35-43.
- WATANABE, T., 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key species. 2. ed. CRS PRESS, Boca Raton etc., 486 p.

Prílohy



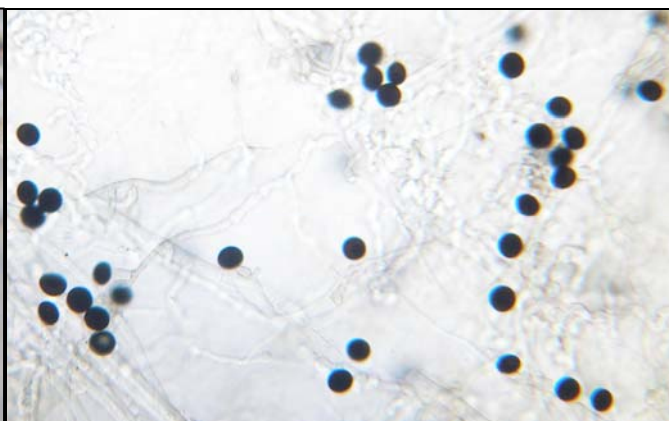
Obr. 1. *Nigrospora oryzae* na MEA (agar so sladínovým extraktom), 7. deň, 25±1 °C.



Obr.2. *Nigrospora oryzae* na OA (ovsený agar), 7. deň, 30±1 °C.



Obr. 3. *Nigrospora oryzae* (1000x).



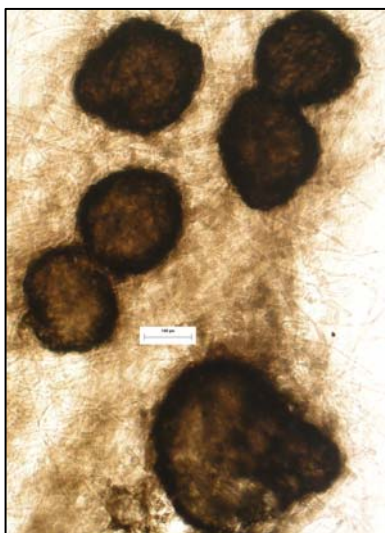
Obr. 4. *Nigrospora oryzae* (400x).



Obr. 5. *Dichotomophthora lutea* na OA (ovsený agar), 7. deň, 25±1 °C.



Obr. 6. *Dichotomophthora lutea* (400x).



Obr.7. *Dichotomophthora lutea* – skleróciá.

Vliv sklizně na výskyt houbových chorob u trav v horských loukách

BOHUMILA VOŽENÍLKOVÁ, FRANTIŠEK KLIMEŠ, MILAN KOBES

VOŽENÍLKOVÁ, B. KLIMEŠ, F., KOBES, M.: The influence of harvest to occurrence of fungi diseases on grasses in mountain meadows.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 98-100. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

The phytopathological investigation accomplished in the autumn of the year 1999 showed more frequent occurrence of rusts, namely the summer stages, urediospores, in perennial grass stands (experimental site – Zhůří enclave). The rust on meadow foxtail (*Alopecurus pratensis* L.) was identified by J. Marková (Department of Botany, Faculty of Natural Sciences of Charles University), as *Puccinia perplexans* Plow.

Three methods of cultivation were evaluated at the experimental site: 1) Mulched stands (one mulching), (2) Unmanaged (fallow) stands and (3) Mown stands (one mowing). The evaluation of the health state of the plants was carried out in September and October, at three particular times. Our investigation showed that the most considerable development of urediospores occurred on meadow foxtail, *Alopecurus pratensis* L., in the mown stand. Smaller infestation by urediospores was found in the mulched stand. The least infestation was found in the unmanaged stand. The source of the spread of rust on *Alopecurus pratensis* L. in the observed perennial growths proved to be *Puccinia perplexans* Plow.

Při fytopatologickém šetření, které jsme prováděli v podzimním období roku 1999 jsme zaznamenali na sledovaných trvalých travních porostech (pokusná plocha - lokalita Zhůří) větší výskyt rzi a to letních stadií urediospor. Vlastní determinace hodnocené rzi na psárce luční (*Alopecurus pratensis* L.) byla určena RNDr. J. Markovou, CSc. (Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy), kde se jednalo o napadení rzi psárkovou (*Puccinia perplexans* Plow.).

V zájmovém území byly posuzovány tři varianty: 1) Mulčované porosty (mulčované 1x), (2) Nesklizené porosty (ležící ladem) a (3) Kosené porosty (jedenosečné). Hodnocení zdravotního stavu rostlin proběhlo během měsíce září a října a to ve třech termínech. Na základě našeho šetření u sledované psárky luční (*Alopecurus pratensis* L.) byl zaznamenán největší rozvoj urediospor u porostu koseného. Menší infekční tlak urediospor se vyskytl u mulčovaného porostu. Naopak nejmenší napadení bylo zjištěno u porostu nesklizeného. Původcem rozvoje rzi na psárce luční ve sledovaných trvalých porostech byla určena rez psárková – *Puccinia perplexans*.

Keywords: mulched stands; unharvested stands; mown stands; *Alopecurus pratensis* L.; *Puccinia perplexans* Plow.

Bohumila Voženílková, František Klimeš, Milan Kobes, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: vozenil@zf.jcu.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

Podle MÜLLERA (1958) patří rez psárková - *Puccinia perplexans* Plow. do třídy *Basidiomycetes*, řádu *Uredinales* a jedná se o rez dvoubytnou. Spermogonie a aecia se tvoří na pryskyřníku prudkém (*Ranunculus acer* L.), uredia a telia na psárce luční (*Alopecurus pratensis* L.) a psárce rolní (*Alopecurus agrestis* L. = *Alopecurus myosuroides* Huds.).

V jarním období roku 2000 - 2007 byly nalezeny na pokusné ploše v měsíci květnu na pryskyřníku prudkém (*R. acer*) jarní stadia aeciospor, které určila J. Marková jako samičí pohlavní buňky rzi psárkové (*P. perplexans*) a tak byla potvrzena správná diagnostika rzi psárkové z podzimního období roku 1999.

Materiál a metodika

Vlastní šetření psárky luční (*Alopecurus pratensis* L.) bylo uskutečněno na podzim v roce 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 a 2007 v přesných maloparcelkových pokusech. Na jaře roku 2000 - 2007 byl kontrolován mezihostitel rzi psárkové, pryskyřník prudký (*Ranunculus acer*). Výběr pokusného místa (Zhůří - lokalita v blízkosti Horské Kvildy na Šumavě) byl situován tak, aby zahrnoval zájmovou oblast nacházející se 1050 – 1080 m nad mořem. Pokusná plocha travních porostů byla rozdělena na tři obdélníky (varianty) o velikostech 100 x 50 m, kde jedna varianta byla udržována mulčováním, druhá byla ponechána ladem a třetí byla kosena. V rámci těchto ploch byla každá varianta ještě členěna na 5 metrových čtverců v horní části obdélníka a 5 v dolní (celkem 10 čtverců), v nichž probíhalo makroskopické hodnocení rostlin. Mezi jednotlivými čtverci byly ze všech stran metrové mezery.

Hodnocení psárky luční (*A. pratensis*) s příznaky napadení kupiček rezavých letních výtrusů – urediospor jsme prováděli v roce 1999 v měsíci září a říjnu a v roce 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 a 2007 jsme hodnotili trvalé travní porosty ještě v listopadu. V tomto pokusu byla použita metoda pro hodnocení projevu symptomů rostlin podle DIXONA et DOODSONA (1971). Použitou metodu jsme si upravili pro naše podmínky sledování.

Výsledky a diskuse

V podzimním období roku 1999 byl zjištěn na listech větší výskyt rezavých kupiček (urediospor) u hodnocených trvalých travních porostů. V našem sledování jsme se zaměřili na příznaky tohoto onemocnění u psárky luční (*A. pratensis*), kde v časovém období měsíce září, října a listopadu bylo hodnoceno napadení a rozvoj rzi na pokusné lokalitě. Největší rozvoj letních výtrusů - urediospor jsme zaznamenali 8. 10. 1999 a to při třetí bonitaci (Tab. 1).

Na pokusné lokalitě v jarním období roku 2000 byly objeveny v měsíci květnu (31. 5.) na pryskyřníku prudkém (*R. acer*) jarní stadia aeciospor, které určila J. Marková jako samičí pohlavní buňky rzi psárkové (*P. perplexans*). Podle MARKOVÉ (1997) se aecia objevují ve druhé polovině dubna a s ohledem na nadmořskou výšku se dají nalézt i v červenci.

Ve sledovaném podzimním období (září, říjen, listopad) roku 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 a 2007 se nám nepodařilo zjistit na psárce luční (*A. pratensis*) urediové stadium rzi psárkové - *P. perplexans*.

Tab. 1. The extent of the fungus *Puccinia perplexans* on *Alopecurus pratensis* (%).

Variant	M-mulched			K-mown			L-unmanaged		
Date of Assessment	2.9.	14.9.	8.10.	2.9.	14.9.	8.10.	2.9.	14.9.	8.10.
<i>Alopecurus pratensis</i>	0	0	14,1	0	0	24,3	0	0	1,1

Poděkování

Příspěvek byl zpracován za podpory výzkumného záměru MSM 6007665806, QF 3018.

Přehled použité literatury

- DIXON, G.R., DOODSON, J. K., 1971. Assessment keys for some diseases of vegetable, fodder and herbage crops. J. Natn. Instit. Agric. Bot. 12: 299 – 307.
- MARKOVÁ, J., URBAN, Z., 1997. The Rust Fungi, of Grasses in Europe. 6. *Puccinia persistens* Plow., *P. perplexans* Plow., and *P. elymi* Westend. Acta Univ. Carol. Biol. 41:3 29 – 402.
- MÜLLER, J., 1958. Rzi.. In: Zemědělská fytopatologie 2, ČSAZV a SZN Praha, pp. 709-710. (in Czech).

Výskyt hub rodu *Fusarium* na amarantu v závislosti na odrůdě

BOHUMILA VOŽENÍLKOVÁ, JAN MOUDRÝ, JIŘÍ PETERKA, BOHUSLAV ČERMÁK

VOŽENÍLKOVÁ, B., MOUDRÝ, J., PETERKA, J., ČERMÁK, B.: The occurrence of *Fusarium* fungi in dependence on cultivar.

Proceedings from the MICROMYCO 2008, Nováková, A. (Ed.): pp. 101-104. ISB BC AS CR, v.v.i., 2008. ISBN 978-80-86525-12-9

In the years 1998 – 2005 we established small-plot experiments with amaranth as a marginal grain crop in the experimental site in České Budějovice (the property of the Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia). The following cultivars of amaranth were seeded into the soil infested naturally with *Fusarium* fungi: K 432 *Amaranthus hybrid*, K 433 *Amaranthus hybrid*, Koniz *Amaranthus hypochondriacus*, Dakota *Amaranthus cruentus*, No 1008 *Amaranthus hypochondriacus*, A 200 D *Amaranthus cruentus* and Amar RR 150 *Amaranthus cruentus*, Olpir *Amaranthus cruentus*.

Considering pathogenic fungi involved in the problems of amaranth seeds storing, we focused on parasitic fungi of the genus *Fusarium* and *Penicillium* which were not determined as to their species. Considering the attack by *Fusarium* and *Penicillium* fungi, the cultivar K 432 *Amaranthus hybrid* proved to be the most resistant.

V letech 1998 - 2005 probíhaly maloparcelkové pokusy s okrajovou obilninou amarant na stanovišti v Českých Budějovicích (školní pozemek katedry rostlinné výroby, JU ZF). Do půdy přirozeně zamořené houbami rodu *Fusarium* se vysely odrůdy amarantu, kde se během vegetační sezóny sledoval zdravotní stav rostlin. Ve sledovaném období byly použity následující odrůdy: K 432 *Amaranthus hybrid*, K 433 *Amaranthus hybrid*, Koniz *Amaranthus hypochondriacus*, Dakota *Amaranthus cruentus*, No 1008 *Amaranthus hypochondriacus*, A 200 D *Amaranthus cruentus*, Amar RR 150 *Amaranthus cruentus* a Olpir *Amaranthus cruentus*.

Z patogenních hub podílejících se na problematice skladování semen amarantu jsme se soustředili na parazitické houby rodu *Fusarium* a *Penicillium*, které druhově determinovány nebyly.

Z hlediska napadení houbami rodu *Fusarium* a *Penicillium* lze jako nejvhodnější k pěstování doporučit odrůdu K 432 *Amaranthus hybrid*. Tato odrůda je v porovnání s nejvíce napadenými odrůdami nízkého vzrůstu a má nejdelší vegetační dobu.

Keywords: *Amaranthus* L.; cultivars; *Fusarium* spp.; *Penicillium* spp., yield

Bohumila Voženílková, Jan Moudrý, Jiří Peterka, Bohuslav Čermák, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. E-mail: vozenil@zf.jcu.cz

* Presented at workshop MICROMYCO 2008, České Budějovice, Czech Republic, September 2-3, 2008.

Úvod

V roce 1998 - 2005 probíhaly maloparcelkové pokusy s okrajovou obilninou amarant na stanovišti v Českých Budějovicích (školní pozemek katedry rostlinné výroby, ZF JU). Do půdy přirozeně zamořené houbami rodu *Fusarium* se vysely následující odrůdy: K 432 *Amaranthus hybrid*, K 433 *Amaranthus hybrid*, Koniz *Amaranthus hypochondriacus*, Dakota *Amaranthus cruentus*, No 1008 *Amaranthus hypochondriacus*, A 200 D *Amaranthus cruentus*, Amar RR 150 *Amaranthus cruentus* a Olpir *Amaranthus cruentus*. Během vegetace nebyly rostliny ošetřeny fungicidy. Po sklizni byly lichoklasy uloženy ve skladovacích podmínkách při teplotě 18 - 20° C a 12 - 13 % vlhkosti semen.

Materiál a metodika

Z patogenních hub podílejících se na problematice vzcháživosti a nemoci mladých rostlin jsme se soustředili na parazitické houby rodu *Fusarium*, které však nebyly determinovány druhově.

K fytopatologické analýze jsme během vegetace ve dvou termínech (první dekáda v červenci a druhá dekáda v srpnu) odebrali průměrný vzorek rostlin z posuzovaného porostu jednotlivých odrůd amarantu. Z plochy 3 x 1 m jsme vyryli rostliny i s kořeny a ostrým nožem jsme provedli 1 cm pod kořenovým krčkem příčný řez kořenem a podle histologických symptomů určili stupeň onemocnění podle metodiky, kterou vypracoval KŮDELA (1970, 1989).

V podmínkách in vitro probíhal vlastní test na monitorování výskytu a rozšíření hub rodu *Fusarium*, parazitujících na sledovaných odrůdách amarantu během vegetačního období. Hodnocené hlavní kořeny byly očištěny, podélně rozříznuty a uloženy v Petriho miskách na pevné živné půdě (2 % bramboro - glukózový agar) při regulovaných podmínkách (teplota 10 - 12 °C). Po sedmi dnech kultivace byla u každého vzorku prohlédnuta pletiva a mikroskopicky vyšetřena přítomnost spor hub, patřících do rodu *Fusarium*.

Z patogenních hub podílejících se na problematice skladování semen amarantu jsme se soustředili na parazitické houby rodu *Fusarium* a *Penicillium*, které druhově determinovány nebyly.

V podmínkách in vitro jsme k fytopatologické analýze během měsíce října a listopadu v roce 1998 a 1999 a rovněž během měsíce března a dubna v letech 1999 a 2000) odebírali průměrný vzorek o velikosti 20 g semen z posuzovaných skladovaných lichoklasů odrůd amarantu (K 432 *Amaranthus hybrid*, K 433 *Amaranthus hybrid*, Koniz *Amaranthus hypochondriacus*, Dakota *Amaranthus cruentus*, No 1008 *Amaranthus hypochondriacus*, A 200 D *Amaranthus cruentus*, Amar RR 150 *Amaranthus cruentus* a Olpir *Amaranthus cruentus*).

Kultivace semen probíhala v plastických Petriho miskách (o průměru 85 mm) na pevné živné půdě (2 % bramboro-glukózový agar) ve tmě při teplotě 22 - 24 °C po dobu 7 - 14 dní. Sledování probíhalo ve třech opakování.

Výsledky a diskuse

Nejlepší zdravotní stav rostlin amarantu z hlediska napadení hub rodu *Fusarium*, během vegetační sezóny jsme zaznamenali v letech 1998 - 2005 u odrůdy No 1008, kde jsme na sledovaných rostlinách nezjistili při prvním (první dekáda v červenci) a druhém (druhá dekáda v srpnu) odběru houby rodu *Fusarium*. Největší rozvoj patogena nastal u odrůdy K 433 (Graf 1).

Rovněž jsme hodnotili výnos semen ($t \cdot ha^{-1}$) u jednotlivých odrůd amarantu v závislosti na infekčním tlaku hub rodu *Fusarium*. V pokusném období let 1998 - 2005 vykazovaly odrůdy Koniz ($0,45 t \cdot ha^{-1}$) a K 433 ($0,69 t \cdot ha^{-1}$) nejnížší výnos semen a rovněž u odrůdy K 433 jsme při prvních bonitacích (první dekáda v červenci) zjistili nejvyšší procentické napadení rostlin houbami rodu *Fusarium*, v porovnání s dalšími sledovanými odrůdami. JAROŠOVÁ (1997) ve svých pokusech, které uskutečnila v letech 1994 - 1996 uvádí výnos u odrůdy Koniz $2,6 t \cdot ha^{-1}$.

V pokusném období let 1998 - 2005 jsme zaznamenali poškození na polních maloparcelkových pokusech s rostlinami amarantu a to ve formě požerků, které způsobil slimáček polní (*Deroceras agreste*).

V roce 1998 jsme zaznamenali na našich maloparcelkových pokusech větší výskyt dřepčíka rdesnového (*Chaetocnema concinna*) a následné poškození listů požerky rostlin amarantu.

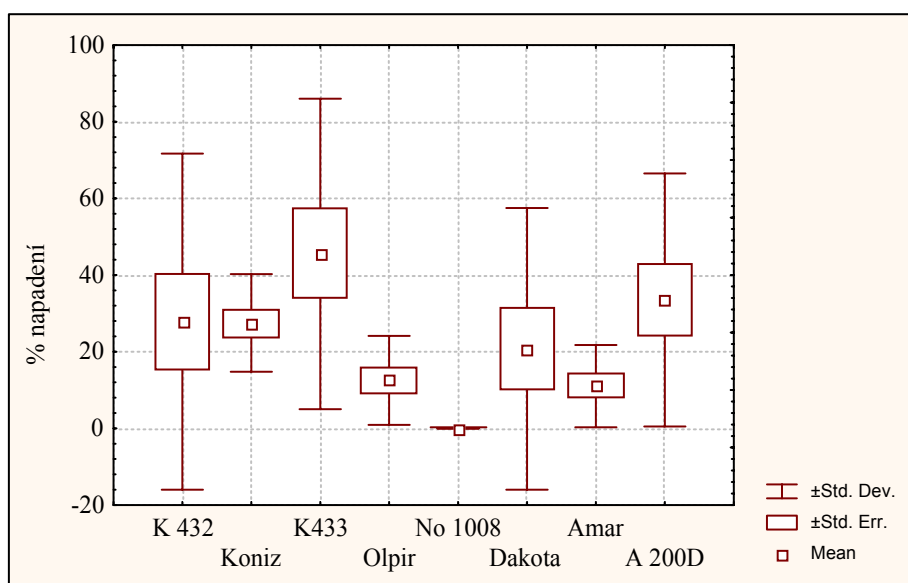
V našem sledování v období let 1998 – 20005jsme zjistili, že k napadení odrůd amarantu houbami rodu *Fusarium* dochází nejčastěji po vzcházení rostlin (fáze 10), až do větvení stonků (fáze 39).

Vysoká statistická průkaznost u hodnocených odrůd amarantu nám vyšla u prvého termínu hodnocení napadených rostlin houbami rodu *Fusarium* a to v první dekádě července.

V našich polních maloparcelkových pokusech jsme se rovněž zaměřili na porovnání jednotlivých odrůd amarantu, které byly hnojeny N a bez aplikovaného N a na průběh onemocnění *Fusarium* spp.

Výsledkem našich pokusů byla skutečnost, že nebyla dokázána statistická průkaznost u jednotlivých variant v závislosti na hnojení a výskytem sledovaných hub rodu *Fusarium*.

Graf 1. Rozvoj hub rodu *Fusarium* v závislosti na odrůdě.



Tab. 1. Vliv termínu a odrůdy na výskyt sledovaných rodů hub ve skladištních podmínkách (analýza rozptylu).

Houba	Termín ¹	Odrůda ²
<i>Fusarium</i>	0,34	0,00**
<i>Penicillium</i>	0,00**	0,32

**p<0,01

¹Date ²Variety

Mikrobiální analýzy skladovaných semen jednotlivých odrůd amarantu byly vyhodnoceny mikroskopicky a pozornost byla soustředěna na houby rodu *Penicillium* a *Fusarium*.

U rodu *Penicillium* bylo největší napadení semen zaznamenáno v prvním termínu hodnocení (říjen 1998 a říjen 1999). Vliv termínu hodnocení byl statisticky vysoce průkazný (Tab. 1).

U rodu *Fusarium* se frekvence výskytu během skladování neměnila. Největší výskyt byl zaznamenán u odrůdy Amar RR 150 a naopak nejmenší u odrůdy K 432. Vliv odrůdy byl statisticky vysoce průkazný (Tab. 1).

Poděkování

Příspěvek byl zpracován za podpory výzkumného záměru MSM 6007665806.

Přehled použité literatury

JAROŠOVÁ, J., 1997. Jak pěstovat amarant. Úroda 7: 19-23.

KŮDELA, V., 1970. A way to evaluate the resistance of lucerne varieties to vascular wilt. Rost. Výroba 16 (9): 1041-1050.

KŮDELA, V., BARTOŠ, P., ČAČA, Z., DIRLBK, J., FRIČ, F., LEBEDA, A., ŠEBESTA, J., ULRYCHOVÁ, M., VALÁŠKOVÁ, E., VESELÝ, D., 1989. Obecná fytopatologie. Academia, Praha, pp. 348-356.

Seznam účastníků:

Andrea Bohatá, ZF JČU České Budějovice
Kristýna Černá, Př.f. UK Praha
Mária Dovičicová, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra
Soňa Felšöciová, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra
Petr Hořava, KVS České Budějovice
Martina Hujšlová, Př.f. UK Praha
Božena Jandová, BIO Plus, s.r.o. Brno
Dana Jurčová, OKMI, Uherskohradištská nemocnice, Uherské Hradiště
Ondřej Koukol, Př.f. UK Praha
Miroslav Kolařík, Př.f. UK a MBÚ AV ČR, v.v.i. Praha
Zuzana Kolářová, Př.f. UK Praha
Tereza Konvalinková, Př.f. UK Praha
Alena Kubátová, Př.f. UK Praha
Zděněk Landa, ZF JČU České Budějovice
Blanka Lašťovičková, Klinlab, s.r.o. Praha
Jaroslava Marková, Př.f. UK Praha
Alena Nováková, ÚPB BC AV ČR, v.v.i. České Budějovice
David Novotný, VURV, v.v.i. Praha
Zuzana Piovarčiová, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra
Karel Prášil, Př.f. UK Praha
Eva Prenerová, Laboratoř ochrany rostlin Olešná
Dana Savická, VŠCHT Praha
Michaela Sedlářová, Př.f. PU Olomouc
Jana Šimková, ZF JČU České Budějovice
Alexandra Šimonovičová, Pr.f. KU Bratislava
Dana Tančinová, Slovenská poľnohospodárska univerzita Nitra
Bohumila Voženílková, ZF JČU České Budějovice