

Středoškolská odborná činnost 2006/2007

Obor 07 – Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní
hospodářství

VLIV VYBRANÝCH LÁTEK NA ZÁVOJENKU PODTRNKU (*Entoloma clypeatum*)

Zuzana Egertová

Gymnázium F.X.Šaldy, Partyzánská 530, 460 11 Liberec 11, sexta

Zadavatel práce a konzultant :

RNDr. Milan Gryndler, CSc.,

Mikrobiologický ústav AV ČR Praha, Vídeňská 1083
142 20 Praha-Krč

Místo zpracování : Mikrobiologický ústav AV ČR Praha
Praha, 2006 – 2007

Liberecký kraj

Čestné prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem soutěžní práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Milana Gryndlera, CSc., a že jsem v seznamu literatury uvedla všechny zdroje informací.

V Jablonném v Podještědí dne 26. března 2007

Zuzana Egertová



Úvodní obr. Vegetativně řízkovaná rostlina in vitro inokulovaná závojenkou podtrnkou

Poděkování

Ráda bych poděkovala **RNDr. Milanu Gryndlerovi, CSc.**, z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze za námět práce a odborné rady při jejím zpracovávání. Taktéž mu děkuji za pomoc s pokusy, v nichž byly testovány látky, s nimiž jsem kvůli věku nesměla pracovat (např.fungicidy), za propůjčení odborné literatury, za plodnice závojenky podtrnky z lokalit v Litoměřicích a v Praze 4 a především za trpělivost a ochotu, s jakou se mi věnoval a stále věnuje.

Chtěla bych vyjádřit poděkování také **RNDr. Jiřímu Gabrielovi** z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Praze za přijetí do programu Otevřená věda a **Mgr. Jitce Šulcové** z Gymnázia F.X.Šaldy za pomoc se zapojením do tohoto projektu. Mé poděkování patří i **Janu Bártovi, Janu Borovičkovi, Vladimíru Pravdovi, Lence Štrosové** a **Slavomíru Valdovi**, kteří poskytli plodnice závojenky podtrnky z různých lokalit, jež jsou blíže rozepsány v části 2.1. **Mgr. Petru Hrůzovi** z Gymnázia F.X.Šaldy děkuji za korekci anglického textu.

Seznam použitých zkratk

EC - *Entoloma clypeatum*, závojenka podtrnka

FK - fulvokyseliny

GmbH - společnost s ručením omezeným (Gesellschaft mit beschränkter Haftung)

K – kontrolní varianta

MBÚ AV ČR – Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v.v.i.

mM – milimolární

mmol - milimol

MZLU – Mendelova zemědělská a lesnická univerzita

NCBI – National Center for Biotechnology Information

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PDA – potato dextrose agar = bramboro – glukózový agar

v.v.i. – veřejná vědecká instituce

Nejdůležitější termíny použité v této práci

Adaptabilita – schopnost přizpůsobit se změněným podmínkám prostředí

Amplifikace – namnožení konkrétního úseku DNA

Axenická kultura – čistá kultura, organismus je zde pěstován na nepřirozeném substrátu

Basidiomycety – stopkovýtrusé houby

Deionizovaná voda – voda zbavená iontů

Dekompozitor - rozkladač

Fulvokyseliny - ve vodě rozpustné, světle zbarvené vysokomolekulární sloučeniny, složka humusu

Fungicid – přípravek působící proti růstu hub

Huminové kyseliny - ve vodě nerozpustné vysokomolekulární sloučeniny, složka humusu

Inhibovat – omezovat růst

Inokulace – zaočkování

Inokulum - vzorek mycelia, který se použije k zaočkování nových agarových ploten

Intracelulární - vnitrobuněčný

Kontaminace – znehodnocení vzorku bakteriemi, kvasinkami, vláknitými houbami nebo roztoči

Kultivační box – místnost, kde se při teplotě 25°C nechávají růst zaočkované kultury

Lokalita – místo výskytu

Mycelium – podhoubí, jemná podzemní vlákénka rozrůstající se v podkladu

Mykorhiza – oboustranně prospěšné soužití hub s kořeny rostlin

Očkovací box – místnost určená k inokulaci kultur

Petriho miska – plochá kruhová miska s volně přiléhajícím víčkem

Pigment - zbarvení

Pseudoparenchym – pletivo hub tvořené kulovitými buňkami

Riboflavin – vitamin B2, starší název laktoflavin (vitamin G)

Stimulovat – podporovat růst

Thiamin – vitamin B1, starší název aneurin (antineuretický vitamin)

OBSAH

1. ÚVOD

1.1. Stopkovýtrusé houby a dřeviny	9
1.2. Závojenka podtrnka	
1.2.1. Typické znaky	10
1.2.2. Současný stav poznatků o závojence podtrnce	11
1.3. Cíle práce	12

2. MATERIÁL A METODY

2.1. Lokality	13
2.2. Přístupové kódy do genové banky	13
2.3. Použité chemikálie	
2.3.1. Roztoky	14
2.3.2. Sacharidy	14
2.3.3. Vitaminy	14
2.3.4. Složení Sonneveldova půdního roztoku	15
2.3.5. Fungicidy	15
2.3.6. Ostatní použité chemikálie	15
2.4. Použité přístroje	15
2.5. Provedené pokusy	
2.5.1. Vliv PDA na růst závojenky podtrnky	
2.5.1.1. Vliv PDA v koncentracích 0-24 g/l	16
2.5.1.2. Vliv PDA v koncentracích 0-6 g/l	16
2.5.2. Vliv vybraných fungicidů na růst závojenky podtrnky	17
2.5.3. Vliv vitamínů na růst závojenky podtrnky	
2.5.3.1. Thiamin	17
2.5.3.2. Riboflavin	17
2.5.4. Vliv sacharidů na růst závojenky podtrnky	18
2.5.5. Vliv různých zdrojů dusíku na růst závojenky podtrnky	18
2.5.6. Vliv různých zdrojů uhlíku na růst závojenky podtrnky	18
2.5.7. Pokus s humusovými látkami	19

2.5.8.	Vliv NaCl na růst závojenky podtrnky	19
2.5.9.	Pokus s pH	19
2.5.10.	Antibiotická aktivita závojenky podtrnky	20
2.5.11.	Médium bez PDA	20
2.5.12.	Pokus o detekci závojenky podtrnky v kořincích různotvarých dřevin	20
2.6.	Vytvoření agarových ploten v Petriho miskách	20
2.7.	Inokulace	21
2.8.	Měření rozměrů mycelia	21
2.9.	Vážení biomasy	21
3. VÝSLEDKY		
3.1.	Vliv PDA v koncentracích 0-24 g/l na růst závojenky podtrnky	22
3.2.	Vliv vitaminů na růst závojenky podtrnky	
3.2.1.	Thiamin	23
3.2.2.	Riboflavin	24
3.3.	Vliv různých druhů sacharidů na růst závojenky podtrnky	25
3.4.	Vliv různých zdrojů dusíku na růst závojenky podtrnky	26
3.5.	Vliv celobiosy na růst závojenky podtrnky	27
3.6.	Porovnání vlivu celobiosy a celulosy	27
3.7.	Pokus s humusovými látkami	28
3.8.	Vliv NaCl na růst závojenky podtrnky	29
3.9.	Pokus s pH	30
3.10.	Vliv vybraných fungicidů na růst závojenky podtrnky	31
3.11.	Pokus o detekci závojenky podtrnky v kořincích různotvarých dřevin	33
4.	ZÁVĚRY A DISKUSE	35
5.	SHRNUTÍ	37
6.	SUMMARY	39

7. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ	40
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
9. PŘÍLOHY	
9.1. Poděkování za spolupráci – článek z Mykologických listů	42
9.2. Ukázka z genové banky NCBI	42
9.3. Průběh polymerázové řetězové reakce	44

1. ÚVOD

1.1 STOPKOVÝTRUSÉ HOUBY A DŘEVINY

Vztah stopkovýtrusých hub k dřevinám zdaleka není jednobarevný. Na jedné straně lze nalézt basidiomycety, které pomáhají růstu malých semenáčků, na druhé straně ty, které na dřevinách parazitují.

Významná je schopnost některých stopkovýtrusých hub tvořit mykorhizu. Houba dřevině pomáhá s přísunem vody a minerálních látek a zajišťuje větší přísun fosforu¹ a dusíku. Nadto má funkci ochrannou - houbový pseudoparenchym na kořincích mechanicky zabraňuje vstupu parazita a v malé míře produkuje i antibiotické látky. Mykorhizní dřeviny jsou vitálnější a lépe a rychleji rostou. Mykorhiza umožňuje vyšší adaptabilitu dřeviny na extrémní podmínky. Strom houbovou oplátku zásobuje sacharidy a některými vitamíny (Klán, 1989).

Soužití houby a dřeviny ale není vždy tak idylické. Z parazitických hub je všeobecně známý zejména příklad václavky (*Armillaria*), která napadá smrkové monokultury a působí tak rozsáhlé škody v lesnictví.

Vztah některých hub k dřevinám není dosud zcela objasněn. Mezi ně patří i závojenka podtrnka (*Entoloma clypeatum*).

¹ Většina fosforu v půdě je v nerozpustné formě (fosforečnan vápenatý, organické fosfáty). Mykorhizní houby mohou pomocí fosfatázy rozkládat p-nitrofenylfosfát a fosfor pak vstřebávat do mycelia, kde bývá akumulován ve formě fosfátových zrněk a odtud podle potřeby transportován do rostliny. Účinnost takového způsobu je až 8x vyšší, než by byla rostlina schopná získat bez houby (Klán, 1989).

1.2 ZÁVOJENKA PODTRNKA

1.2.1 Typické znaky

Závojenka podtrnka (*Entoloma clypeatum*) je stopkovýtrusá houba, která od dubna do června vytváří plodnice poblíž různorodých dřevin, především třešní (*Prunus avium*), švestek (*Prunus domestica*) a hlohů (*Crateagus vulgaris*). Roste v lesích, ve křoví, ale i v zahradách nebo sadech. Často tvoří velké skupiny nebo tzv. čarodějné kruhy². Vyskytuje se běžně v celé Evropě (Noordelos, 1992).

Závojenka podtrnka má bílý (později šedavý nebo hnědavý), podélně vláknitý válcovitý třeň, který dosahuje rozměrů 40-150x4-20 mm. V mládí je plný, později vatovitě vycpaný. Často bývá zakřivený. Spodek třeně je ztenčený nebo rozšířený, někdy až bambulátý (Noordeloos, 1992). Hyfy mají hnědý intracelulární pigment (Hisayasu Kobayashi, Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada, 2003).

Průměr klobouku dosahuje 30-120 mm. V mládí bývá kuželovitý až kuželovitě vypuklý, s věkem se rozšiřuje a stává se vypuklým nebo ploskovypuklým. Často je zvlněný až laločnatý. Obvykle mívá nízký široký hrbolek (Noordeloos, 1992). Barva se pohybuje od světlé po tmavě hnědou, obvykle s šedým nebo olivovým zabarvením. Vzácně lze objevit i houby s nádechem dočervena. Za sucha je klobouk světlejší a má hedvábný lesk, za sucha je tmavší a slizký. Dužnina je zpravidla bílá.

Lupeny bývají relativně husté a vlnitě zubaté. Mívají bělavou nebo světle šedou barvu, která časem získává jemný růžový nádech. Bylo pozorováno mnoho vzorků s nepravidelným jednobarevným okrajem.

Lososově růžové spory mají 5 až 7 výrazných vrcholů (podle jiných autorů 5-8 vrcholů³).

Závojenka podtrnka se vyznačuje moučnou až žluklou chutí a vůní. Je možné zaměnit ji za druhy *Entoloma niphoides*, *Entoloma septum* nebo *Entoloma sericeoides*.

² Čarodějné kruhy (fairy rings) vznikají v důsledku růstu mycelia, které se šíří stejnou rychlostí do všech stran. Dříve lidé věřili, že označují místa, kde tančili zlí duchové, víly nebo lesní žínky.

³ Hisayasu Kobayashi, Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada.: Two new records of entolomatoid fungi associated with rosaceous plants from Japan. The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo 2003

1.2.2 Současný stav poznatků o závojence podtrnce

Dosavadní výzkum závojenky podtrnky značně ztěžovala její obtížná izolace z čisté kultury. V Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze je uložena její jediná skutečně potvrzená kultura na světě⁴.

Vliv závojenky podtrnky na ovocné dřeviny není objasněn. Podle výzkumu japonských vědců (Hisayasu Kobayashi, Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada, 2003) se jedná o houbu parazitickou. Naopak výsledky maďarských mykologů (E. Szücs a K. Véghelyi, 1998) poukazují na pozitivní vliv závojenky podtrnky. Během výzkumu v maďarských sadech zjistili, že danou houbou je kolonizováno 16-21% tamních stromů. Stromy, jejichž kořeny byly osídleny závojenkou podtrnkou, měly oproti stromům bez závojenky zelenější listy, o 50% méně hnilob a o 12% vyšší výnosy⁵.



Obr.1. Závojenka podtrnka (*Entoloma clypeatum*). Autorem fotografie je RNDr. Milan Gryndler, CSc.

⁴ Další izoláty jsou uloženy v kanadské sbírce. U nich však nebyla potvrzena totožnost s původní kulturou pomocí metod molekulární genetiky

⁵Szücs, E. - Véghelyi, K. (1998). Observation with *Entoloma clypeatum* mycorrhizal fungus in hungarian orchards. Acta Hort. (ISHS) 477:123-126

1.3 CÍLE PRÁCE

Cíle mé práce byly následující:

- **Sestavit chemicky definované médium, na němž by bylo možné kultivovat závojenku podtrnku**

V současnosti se používají k uchování závojenky podtrnky substráty s PDA, které není chemicky definované. PDA je zde v poloviční koncentraci oproti normálu.

- **Prozkoumat citlivost závojenky podtrnky k fungicidům**
- **Otestovat antibiotickou aktivitu houby**
- **Otestovat vliv různých sacharidů, zdrojů dusíku, vitaminů, humusových látek a NaCl**
- **Otestovat vliv pH**

Jednotlivé druhy hub se výrazně liší ve schopnosti tolerovat různé pH. Pro většinu hub je optimální pH 5 až 6,5. Obecně platí, že jsou houby velice citlivé na změnu pH. Z toho důvodu mohou například kyselá deště přispívat k vymizení určitých druhů hub z některých lokalit.

2. MATERIÁL A METODY

2.1 LOKALITY

Plodnice, z nichž byly získány izoláty použité ve výzkumu, pocházejí ze 7 různých lokalit. V tabulce je vždy uvedeno označení izolátu, lokalita, kde byla plodnice sebrána, jméno jejího nálezce a datum sběru.

Označení izolátu	Lokalita	Pravděpodobný hostitel	Nálezce	Datum sběru
EC 1	Soběnice	<i>Prunus domestica</i> L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 2	Soběnice	<i>Prunus domestica</i> L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 3	Soběnice	<i>Prunus domestica</i> L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 12	Sezimovo Ústí	<i>Malus domestica</i> Borkh	Vladimír Pravda	9.5.2006
EC 16	Vlašim	<i>Prunus armeniaca</i> L.	Jan Bárta	16.5.2006
EC 17	Vlašim	<i>Prunus armeniaca</i> L.	Jan Bárta	16.5.2006
EC 18	Praha - Novodvorská	<i>Prunus domestica</i> L.	Lenka Štrossová	21.5.2006
EC 19	Praha - Záběhllice	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Jan Borovička	22.5.2006
EC 20	Praha - Záběhllice	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Jan Borovička	22.5.2006
EC 21	Praha - Záběhllice	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Jan Borovička	22.5.2006
EC 22	Praha - Záběhllice	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Jan Borovička	22.5.2006
EC 23	Praha – Trnková	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 24	Praha – Trnková	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 25	Praha - Trnková	<i>Prunus avium</i> (L.) L.	Milan Gryndler	22.5.2006
EC 29	Kokořínsko	<i>Prunus spinosa</i> L.	Slavomír Valda	30.5.2006
EC 30	Kokořínsko	<i>Prunus spinosa</i> L.	Slavomír Valda	30.5.2006
EC 31	Kokořínsko	<i>Prunus spinosa</i> L.	Slavomír Valda	30.5.2006

Tab. I. Přehled informací o jednotlivých izolátech závojenky podtrnky

2.2. PŘÍSTUPOVÉ KÓDY DO GENOVÉ BANKY

Informace o genomech organismů jsou shromažďovány v tzv. genových bankách. Na adrese www.ncbi.nlm.nih.gov je možné najít informace o námi získaných izolátech druhu *Entoloma clypeatum*. Zde uvádím přístupové kódy k izolátům, které byly do genové banky zařazeny. Na získání sekvencí nukleotidů těchto izolátů jsem se podílela vykonáváním prací, které nepředstavují zdravotní riziko, zejména kultivací materiálu.

Izolát 1 – EF180038

Izolát 12 – EF 180039

Izolát 16 – EF 180040

Izolát 17 – EF 180041
 Izolát 18 – EF 180042
 Izolát 19 – EF 180043
 Izolát 20 – EF 180044
 Izolát 23 – EF 180045
 Izolát 25 – EF 180046
 Izolát 29 – EF 180047
 Izolát 30 – EF 180048

2.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

2.3.1 Roztoky

Označení roztoku	Obsažená látka	Množství
C	FeNa EDTA (Sigma E-6760)	800 mg
	Destilovaná voda	1 l
E	MnSO ₄ . 5 H ₂ O (Lachema, pro analýzu)	730 mg
	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (Lachema, pro analýzu)	260 mg
	H ₃ BO ₃ (Lachema, pro analýzu)	150 mg
	CuSO ₄ . 5 H ₂ O (Lachema, pro analýzu)	13 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O (Lachema, pro analýzu)	0,24 mg
	Destilovaná voda	1 l

Tab. II. Složení roztoků C a E

2.3.2 Sacharidy

Sacharosa (Lach-Ner. s.r.o.)

D – glukosa (Lachema Brno, a.s.),

D – galaktosa purris (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, NP Praha)

D(+) – trehalosa (Sigma – Chemical company, USA)

Myo – inositol (Sigma – Chemical company, USA)

D(+) – celobiosa (Fluka AG)

Škrob - (Lachema Brno, a.s.)

2.3.3 Vitaminy

riboflavin (Sigma R-4500)

thiamin (Sigma T-4625)

2.3.4 Půdní roztok dle Sonnevelda

Deionizovaná voda	1000 ml
KNO ₃	0,193 g
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	2,922 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,972 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O (nebo MgSO ₄ bezvodý)	1,957 g (0,956 g)
K ₂ HPO ₄	0,045 g
KH ₂ PO ₄	0,006 g
Na ₂ SO ₄ (nebo Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O)	0,704 g (1,595 g)
K ₂ SO ₄	0,384 g
NH ₄ NO ₃	0,025 g

Tab. III. Složení půdního roztoku dle Sonnevelda

2.3.5 Fungicidy

Benomyl (dodavatel: Sigma 381586)

Fundazol (Alchem s.r.o.)

Ridomil Gold MZ68 Wp (Syngenta Czech s.r.o.)

Karben Flo (Bayer, Cropscience GmbH)

Sumilex 50 WP (Crompton Europe B.V.)

2.3.6 Ostatní použité chemikálie

PDA (Sigma P-2182)

agar (Sigma A-9799)

Soil DNA Extraction Kit (MoBio)

primery NL1 – NL4 (O'Donnell 1993)

REDTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma R2523)

UltraCleanTM PCR Clean-up DNA Purification Kit (MoBio)

2.4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

autokláv – typ Falcon (LTE Scientific)

pH-metr – typ 59-45 (Cole-Parmer)

váhy analytické – typ AE240 (Mettler)

předvážky – typ PE3600 (Mettler)

termocyklér – typ T-Gradient Thermoblock (Biometra)

2.5 PROVEDENÉ POKUSY

2.5.1 Vliv PDA na růst závojenky podtrnky

2.5.1.1 Vliv PDA v koncentraci 0 – 24 g/l

Pokus byl založen 7.4.2006. 450 ml deionizované vody, 50 ml půdního roztoku dle Sonnevelda, 5 ml roztoku C, 5 ml roztoku D a 5 ml roztoku E jsem promíchala a rozdělila na stejné části do 5 baněk. Do každé baňky jsem přidala 1,2 g agarů – takovýto postup je přesnější, než kdyby byl agar přidán hned na začátku, neboť se tak zvětšuje pravděpodobnost, že bude ve všech vzorcích stejné množství, a tudíž že všechny zatvrdnou. Agar se totiž usazuje na dně nádob.

1 baňku jsem ponechala bez PDA jako kontrolu, do druhé jsem přidala PDA v koncentraci 3 g/l, do třetí v koncentraci 6g/l, do čtvrté 12 g/l a do páté 24 g/l. Celkem jsem tedy vytvořila 5 variant, každou ve 4 opakováních.

Poté jsem zaočkovala agarové plotny v Petriho miskách. Vyhodnocení pokusu jsem provedla 28.4., 12.5. a 19.5. 2006, kdy jsem změřila rozměry kolonií, a 8.6., kdy jsem zvažila biomasu narostlou v jednotlivých Petriho miskách.

2.5.1.2 Vliv PDA v koncentraci 0 – 6 g/l

Pokus jsem založila 12.5.2006. Důvodem k jeho založení byly průběžné výsledky pokusu popsaného v odstavci 2.3.1, z nichž plynulo, že mycelium houste s rostoucí koncentrací PDA. Protože kolonizace kořenů rostlin bývá snadnější v případě, že je mycelium řídké, sledovala jsem v tomto pokusu růst závojenky při koncentraci PDA 0-6 g/l, při níž houba v předešlém pokusu právě takové mycelium tvořila.

Smíchala jsem 720 ml deionizované vody a 80 ml půdního roztoku dle Sonnevelda a směs rozdělila na 8 částí o stejném objemu. Do každé jsem přidala 1 ml roztoku C, 1 ml roztoku D a 1 ml roztoku E, dále 1,2 g sušeného agarů (A 7002). Jednu část jsem ponechala jako kontrolu, do 2. části jsem přidala PDA v koncentraci 0,5 g/l, do 3. části 1 g/l, do 4. části 1,5 g/l, do 5. části 2 g/l, do 6. části 3 g/l, do 7. části 4,5 g/l a do 8. části 6 g/l. Celkem bylo tedy vytvořeno 8 variant ve 4 opakováních.

Petriho misky jsem zaočkovala dílky mycelia z izolátu č. 2, které měly tvar čtverce o straně 2 mm. Vyhodnocení pokusu proběhla 19.5., 16.6. a 23.6.2006.

2.5.2 Vliv vybraných fungicidů na růst závojenky podtrnky

Fungicidy jsou látky, které se používají především v zemědělství za účelem potlačení růstu hub. Sledovala jsem vliv celkem pěti fungicidů: Karbenu Flo, Ridomilu Gold MZ68 Wp, Sumilexu 50 WP, Fundazolu a Benomyly.

Pokus jsem založila 9.6.2006. 540 ml deionizované vody a 60 ml půdního roztoku dle Sonnevelda jsem smíchala a rozdělila na 6 částí o stejném objemu. Do každé jsem přidala 1,2 g agaru a 1,2 g PDA. Jednu část jsem ponechala jako kontrolu, do druhé jsem přidala 10 mg Karbenu Flo, do třetí 10 mg Ridomilu Gold MZ68 Wp, do čtvrté 10 mg Sumilexu 50 WP, do páté 10 mg Fundazolu a do šesté 10 mg Benomyly. Celkem bylo vytvořeno 6 variant, každá v 5 opakováních.

Petriho misky jsem zaočkovala dílky mycelia ze vzorků 6/3 a 6/2 z pokusu s PDA v koncentracích 0-6 g/l, tedy z izolátu č.2. Vyhodnocení jsem provedla 23.6 a 10.7.

2.5.3 Vliv vitamínů na růst závojenky podtrnky

2.5.3.1 Thiamin

Pokus jsem založila 19.května 2006. Základní médium jsem připravila smícháním 450 ml vody, 50 ml půdního roztoku podle Sonnevelda, 0,25 g PDA, 6 g glukosy a 5 g agaru. Rozdělila jsem jej na pět částí, z nichž jednu jsem ponechala bez thiaminu jako kontrolu. Do druhé části jsem přidala thiamin v koncentraci 100 mg/l, do třetí 30 mg/l, do čtvrté 10 mg/l a do páté 3 mg/l. Petriho misky jsem zaočkovala izolátem č.3. Vyhodnocení jsem provedla 9. a 16. června 2006.

2.5.3.2 Riboflavin

Pokus jsem založila 15.prosince 2006. Smíchala jsem 450 ml deionizované vody, 50 ml půdního roztoku podle Sonnevelda, 0,5 g PDA, 6 g glukosy, 5 g agaru, 5 ml roztoku C a 5 ml E. Směs jsem rozdělila na pět částí – jednu jsem ponechala jako kontrolu, do druhé jsem přidala riboflavin v koncentraci 10 mg/l, do třetí 3 mg/l, do čtvrté 1 mg/l a do páté 0,3 mg/l. Substráty jsem inokulovala myceliem z pokusu s celobiosou z 20.října 2006, tedy z izolátu č.1.

2.5.4 Vliv sacharidů na růst závojenky podtrnky

Tento pokus jsem založila 10.7.2006. 900 ml deionizované vody, 100 ml půdního roztoku dle Sonnevelda, 10 ml roztoku C a 10 ml roztoku E jsem smíchala a rozdělila na 8 částí o stejném objemu. Do každé části jsem ještě přidala 0,75 g agaru a 0,375 PDA. Jednu část jsem ponechala jako kontrolu, do dalších jsem vždy v koncentraci 6 g/l přidala tyto cukry : do první sacharosu, do druhé D – glukosu, do třetí D – galaktosu purris, do čtvrté D(+)- celobiosu, do páté D(+)- trehalosu, do šesté myo-INOSITOL a do sedmé škrob. Celkem jsem vytvořila 8 variant, každou v 5 opakováních. Vyhodnocení jsem provedla 21.8.2006, kdy jsem změřila rozměry mycelií a zvažila biomasu.

2.5.5 Vliv různých zdrojů dusíku na růst závojenky podtrnky

Pokus jsem založila 22.srpna 2006. Základní živnou půdu jsem vytvořila smícháním 900 ml deionizované vody, 100 ml roztoku podle Sonnevelda, 10 ml roztoku C, 10 ml roztoku E, 12 g agaru, 1 g PDA a 12 g glukosy. Směs jsem rozdělila na 10 stejných částí. Do 4 vzorků jsem přidala glycin, a to v následujících molárních koncentracích: 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM a 3 mM. Jeden vzorek jsem ponechala jako kontrolu. Do dalších 4 vzorků jsem přidala KNO_3 , opět v molárních koncentracích 0,1 mM, 0,3 mM, 1 mM a 3 mM. Od každé varianty jsem udělala 5 opakování.

Substráty jsem zaočkovala myceliem z izolátu 1.

2.5.6 Vliv různých zdrojů uhlíku na růst závojenky podtrnky

Pokus jsem založila 3.listopadu 2006. Základní médium jsem připravila smícháním 540 ml deionizované vody, 60 ml půdního roztoku podle Sonnevelda, 6 ml roztoku C, 6 ml roztoku E, 4 g agaru a 2 g PDA. Směs jsem rozdělila na pět stejných částí. Do první, která zároveň sloužila jako kontrola, jsem přidala 6 g glukosy, do druhé 6 g pektinu, do třetí 6 g celobiosy, do čtvrté 6 g celulosy a do páté 6 g glukosaminu. Celkem jsem vytvořila pět variant v šesti opakováních. Pokus jsem vyhodnotila 1.prosince 2006.

2.5.7 Pokus s humusovými látkami

Pokus byl založen 2.února 2007.

Materiály pro tento pokus připravil RNDr. Milan Gryndler. Ze 2 kg půdy bylo získáno 1540 ml rozpustných fulvokyselin, 132 ml nerozpustných fulvokyselin a 450 ml huminových kyselin. Z celkového objemu rozpustných fulvokyselin byla odebrána 1/10. Tento objem byl doplněn deionizovanou vodou na stejný objem, jaký měly nerozpustné fulvokyseliny. Stejný postup byl využit na huminové kyseliny. Ke každé variantě bylo přidáno 16,7 ml půdního roztoku dle Sonnevelda, 1,67 ml roztoku C, 1,67 ml roztoku E, 1 g agaru a 0,45 g PDA. Vyhodnocení pokusu jsem provedla 7.března 2007.

2.5.8 Vliv NaCl na růst závojenky podtrnky

Pokus jsem založila 8.prosince 2006. Základní médium jsem připravila smícháním 450 ml deionizované vody, 50 ml půdního roztoku podle Sonnevelda, 5 ml roztoku C, 5 ml roztoku E, 3 g agaru a 0,75 g PDA. Směs jsem rozdělila na pět částí - do první jsem dala NaCl v molární koncentraci 300 mM, do druhé 100 mM, do třetí 30 mM, do čtvrté 10 mM a pátou jsem ponechala bez NaCl jako kontrolu. Od každé varianty jsem připravila 6 opakování. Pokus byl zaočkován izolátem EC 1. Vyhodnocení bylo provedeno 12.ledna 2007.

2.5.9 Vliv pH

Pokus jsem založila 15.prosince 2006. Médium jsem připravila smícháním 450 ml deionizované vody, 50 ml půdního roztoku podle Sonnevelda, 5 ml roztoku C, 5 ml roztoku E, 1,5 g PDA a 3 g agaru. Do všech variant jsem přidala kyselý fosforečnan draselný v molární koncentraci 100 mM. Pomocí hydroxidu draselného jsem pH v jedné variantě docílila pH 6, v druhé variantě pH 7 a ve třetí pH 8.

Petriho misky jsem inokulovala myceliem z pokusu s celobiosou z 20.října 2006, tedy z izolátu č.1.

2.5.10 Antibiotická aktivita závojenky podtrnky

Pokus jsem založila 8.prosince 2006. Médium bylo připraveno z 450 ml deionizované vody, 50 ml Sonneveldova půdního roztoku, 5 ml roztoku C, 5 ml roztoku E, 3 g agaru a 0,75 g PDA. Nejprve jsem nechala dostatečně narůst mycelium závojenky podtrnky a po dvou týdnech jsem očkovací jehlou do Petriho misek nanasla *Agrobacterium*. Tato bakterie je patogenem různorodých rostlin. Sledovala jsem, zda závojenka na přítomnost *Agrobacteria* nějak reaguje.

2.5.11 Médium bez PDA

Pokus byl založen 22.prosince 2006. Médium tvořily tyto složky: 900 ml deionizované vody, 100 ml Sonneveldova půdního roztoku, 10 ml roztoku C, 10 ml roztoku E, 2,5 mg riboflavinu, 6 mg thiaminu, 12 g agaru a 6 mg glycinu. Tato směs byla rozdělena na tři části. Do jedné byly přidány 3 g glukosy, do druhé 3 g celulosy a do třetí 3 g celobiosy. Při vyhodnocování tohoto pokusu bylo podstatné, zda na substrátu mycelium roste, nebo ne – porovnávání rychlosti růstu mycelia na jednotlivých variantách v tomto případě nebylo podstatné

2.5.12 Pokus o detekci závojenky podtrnky v kořincích různorodých dřevin

Byly provedeny dva pokusy – jeden se vzorky z přírody a druhý se vzorky z axenické kultury. Celkem byly testovány čtyři vzorky z přírody - kořínky hlohu z Liberce, švestky z Jablonného v Podještědí, třešně z Prahy a švestky+jabloně z Prahy. Pomocí elektroforézy se tyto vzorky porovnály se závojenkou podtrnkou (EC 1) z kultury. Z axenické kultury byly vybrány tři rostliny. Testovala se přítomnost DNA závojenky podtrnky v kořincích různorodých dřevin a v okolním substrátu. Opět bylo využito PCR a elektroforézy.

2.6 VYTVOŘENÍ AGAROVÝCH PLOTEN V PETRIHO MISKÁCH

Připravené médium se zbaví mikrobů v autoklávu. Poté se přenesse do očkovacího boxu. Když dostatečně vychladne, je možné nalít jej v množství 20 – 25 ml do Petriho misek. V okamžiku, kdy zatuhne, přichází na řadu inokulace.

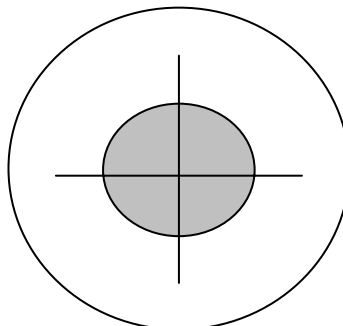
2.7 INOKULACE

Celý proces inokulace (zaočkování) probíhá v očkovacím boxu.

Skalpel se sterilizuje v plameni a posléze se ochladí ve vodě (horký by mohl poškodit houbu). Mycelium ze staršího vzorku se rozkrájí na přibližně stejně velké díly, z nichž je každý následně přenesen na agarovou plotnu do nových Petriho misek. Po několika hodinách se rozhraní mezi vrchním a spodním víčkem Petriho misky přelepí přibližně 1 cm tlustým pásem parafilmu. Nakonec se vzorky přenesou do kultivačního boxu, kde se nechají růst při teplotě 25°C.

2.8 MĚŘENÍ ROZMĚRŮ MYCELIA

Na spodní stranu Petriho misky jsem fixem nakreslila pomocný kříž, jehož střed procházel přibližně středem kolonie. Měřila jsem vzdálenosti mezi okraji kolonie, a to tím způsobem, že pravítko vždy kopírovalo ramena kříže. Konečná hodnota byla získána jako aritmetický průměr měřených vzdáleností.



Obr. 2. Schéma Petriho misky s myceliem a pomocným křížem

2.9 VÁŽENÍ BIOMASY

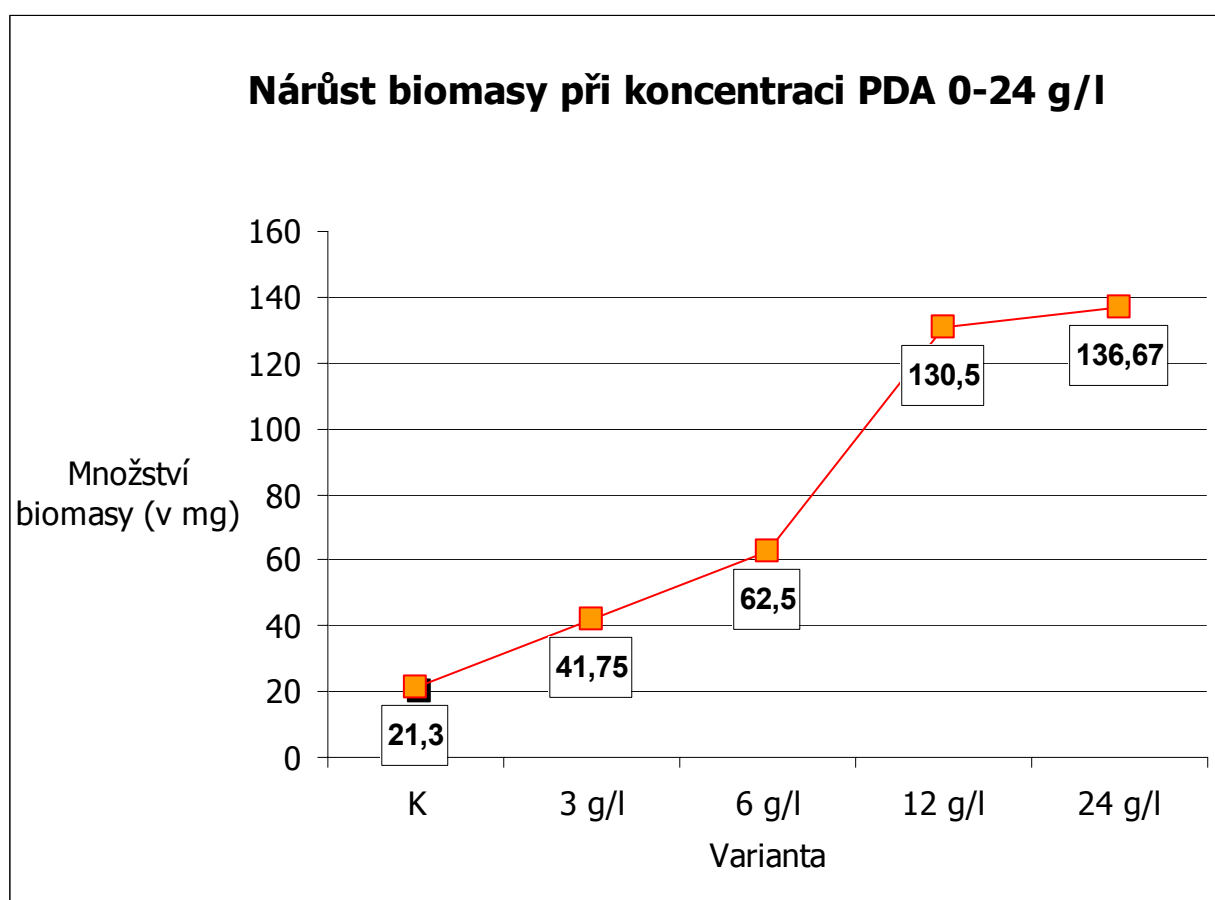
Z každé Petriho misky jsem vyřízla část porostlou myceliem. Po přenesení do baňky jsem ji pokapala 1 ml 1M NaOH a 10 ml vody. Poté jsem ji dala do mikrovlnné trouby, kde zůstala v závislosti na své velikosti při středně silném nebo silném zahřívání po dobu 3 až 10 minut. Po rozpuštění agarů jsem směs přelila zpátky do Petriho misky, kde jsem ji vymyla vodou. Získané mycelium jsem přenesla na filtrační papír, kde jsem ji nechala sušit. Na citlivých vahách jsem nejprve zvážila samotný filtrační papír. Znovu byl zvážen poté, co na něm uschlo mycelium. Konečný výsledek byl získán jako rozdíl druhé a první hodnoty.

3. VÝSLEDKY

3.1 VLIV PDA V KONCENTRACÍCH 0-24 G/L NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY

Množství PDA (g/l)	Průměr měřených rozměrů mycelia (mm)
0 (K)	10
3	11,25
6	12,19
12	12,38
24	9,69

Tab.IV. Nárůst mycelia při koncentraci PDA 0-24 g/l

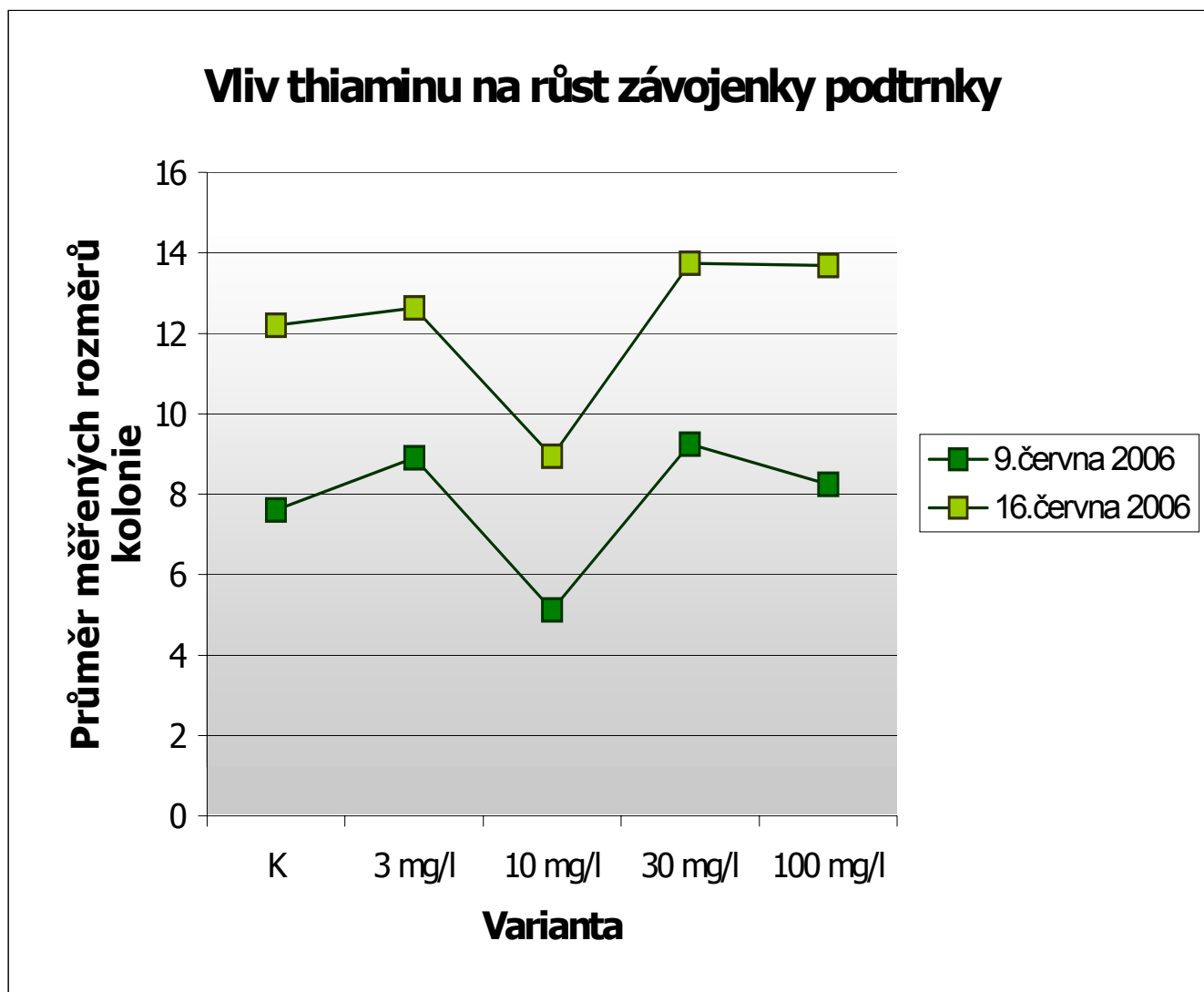


Graf 1. Nárůst biomasy při koncentraci PDA 0-24 g/l

Mycelium závojenky podtrnky (*Entoloma clypeatum*) dosahuje největší délky a šířky při koncentraci PDA (bramboro – glukózového agaru) 12 g/l, dále při koncentracích 6 g/l, 3 g/l, 0 g/l (kontrola), naopak nejmenších při koncentraci 24 g PDA/l. V substrátu bez agaru je mycelium velmi řídké, v substrátu s koncentrací 24 g PDA/l velmi husté.

3.2 VLIV VITAMINŮ NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY

3.2.1 Thiamin



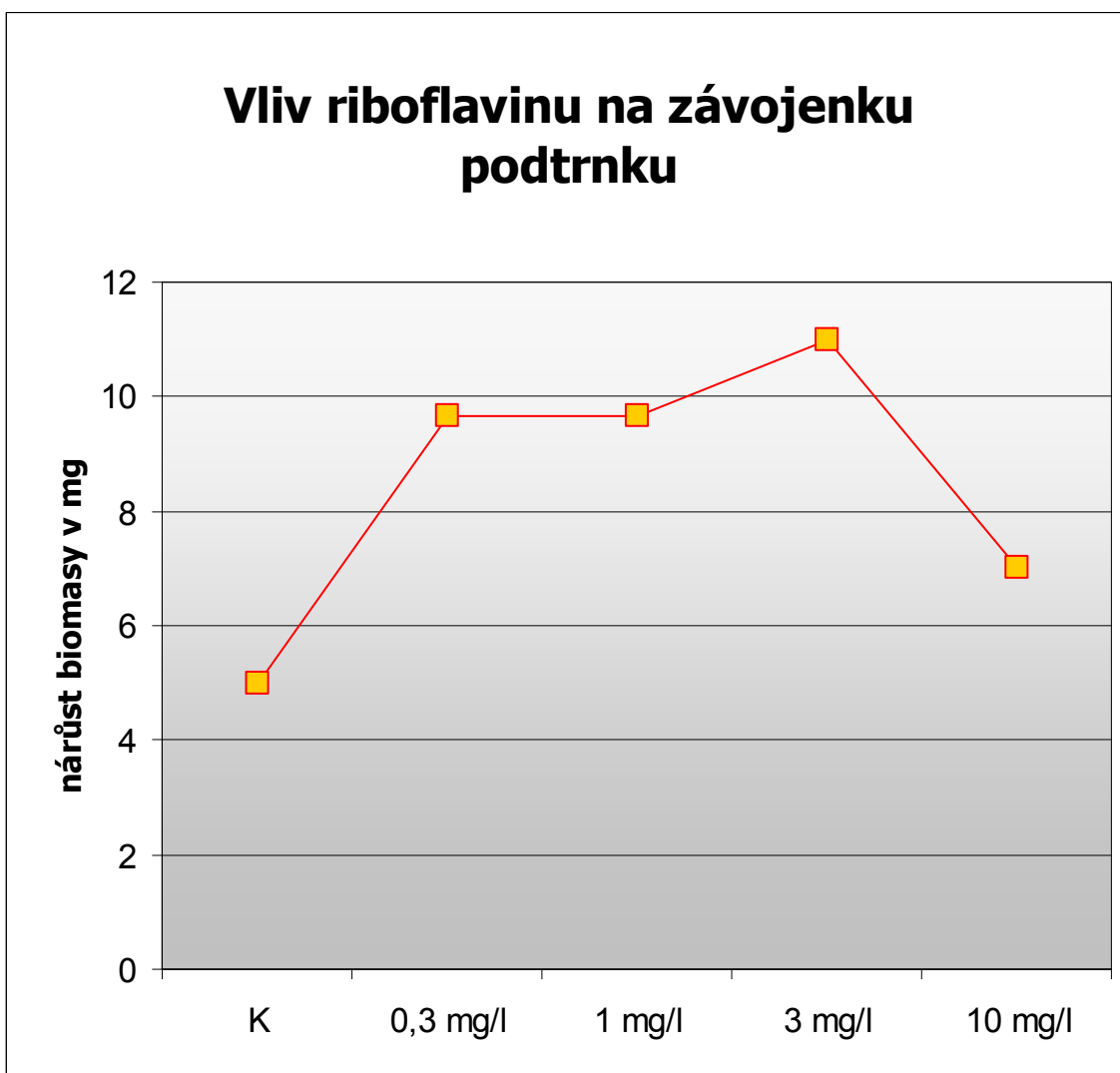
Graf 2. Vliv thiaminu na růst závojenky podtrnky

Varianta	9.června 2006	16.června 2006
K	7,6	12,19
3 mg/l	8,9	12,625
10 mg/l	5,125	8,94
30 mg/l	9,25	13,75
100 mg/l	8,25	13,69

Tabulka V: Vliv thiaminu na růst závojenky podtrnky – průměr měřených rozměrů mycelia

Na substrátech s koncentrací thiaminu 3 mg/l, 30 mg/l a 100 mg/l rostla závojenka podtrnka lépe než na kontrolních variantách, na substrátech s koncentrací thiaminu 10 mg/l hůře.

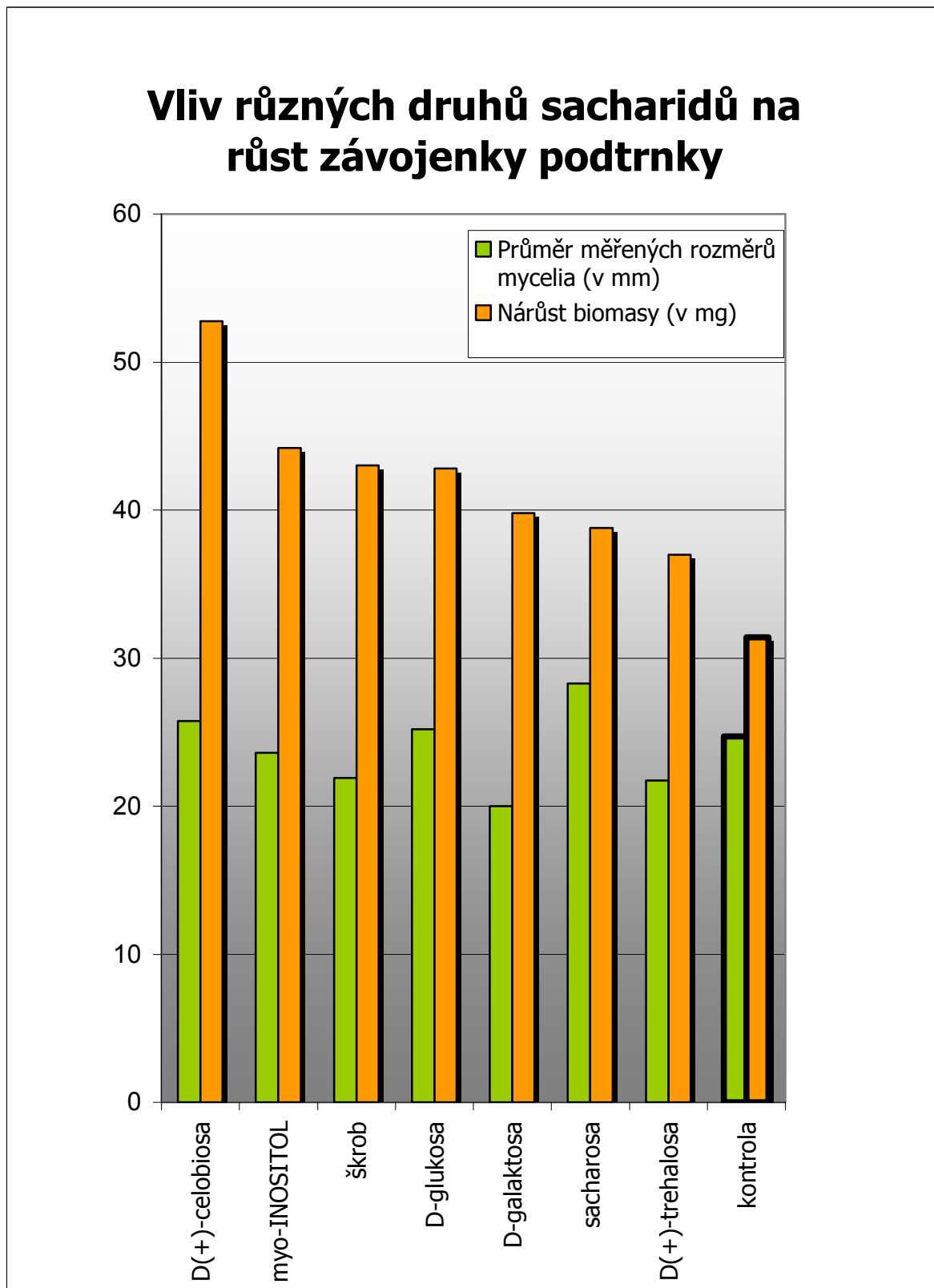
3.2.2 Riboflavin



Graf 3. Vliv riboflavinu na závojenku podtrnku

Na substrátech, v nichž je přítomen riboflavin, roste *Entoloma clypeatum* lépe než na kontrolních variantách.

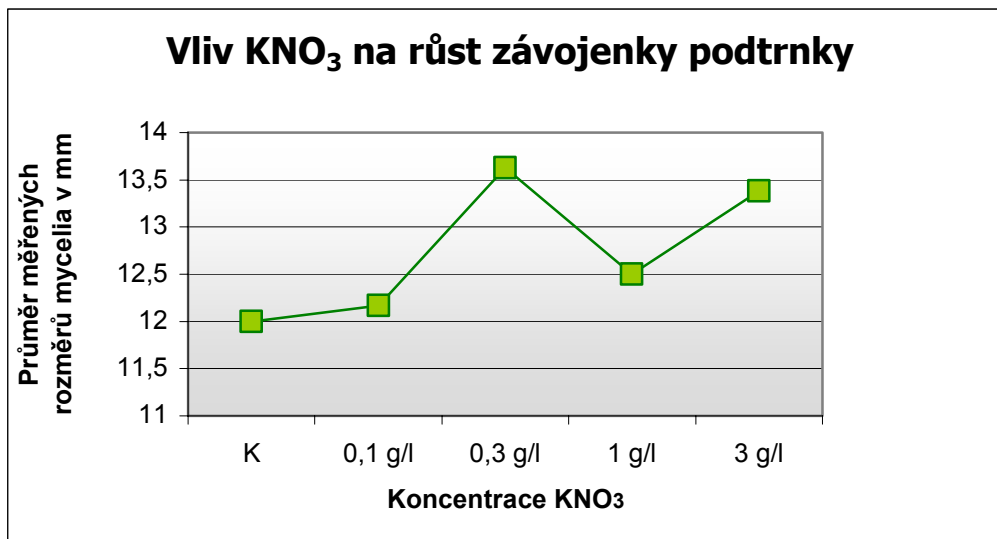
3.3 VLIV RŮZNÝCH DRUHŮ SACHARIDŮ NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY



Graf 4. Vliv různých druhů sacharidů na růst závojenky podtrnky

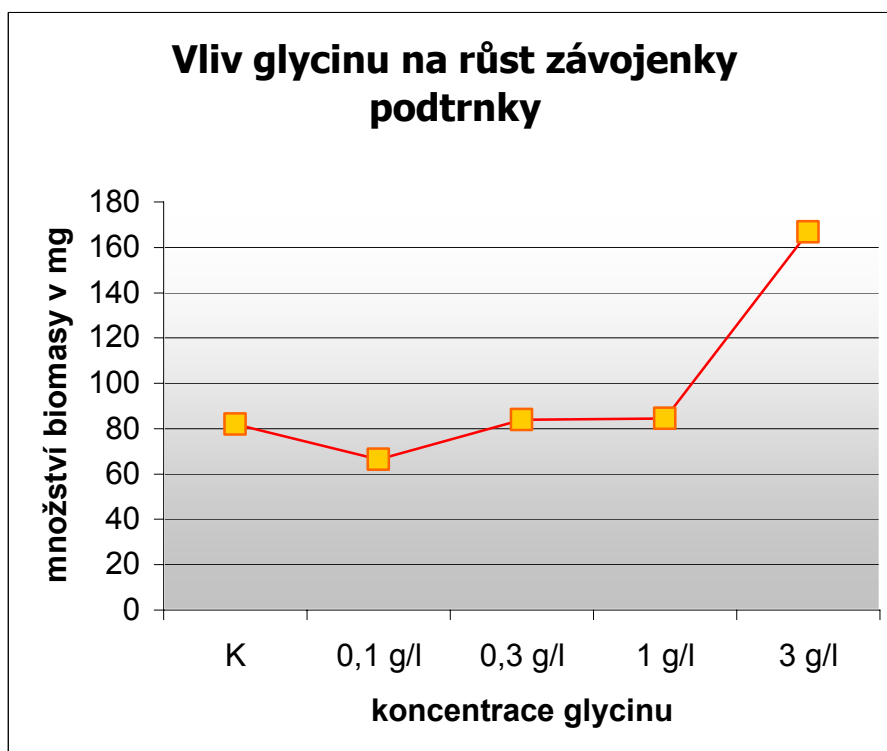
Závojenka podtrnka tvoří nejvíce biomasy na agarových plotnách s D(+) celobiosou, největších rozměrů mycelium dosahuje na substrátech se sacharosou.

3.4 VLIV RŮZNÝCH ZDROJŮ DUSÍKU NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY



Graf 5. Vliv KNO₃ na růst závojenky podtrnky

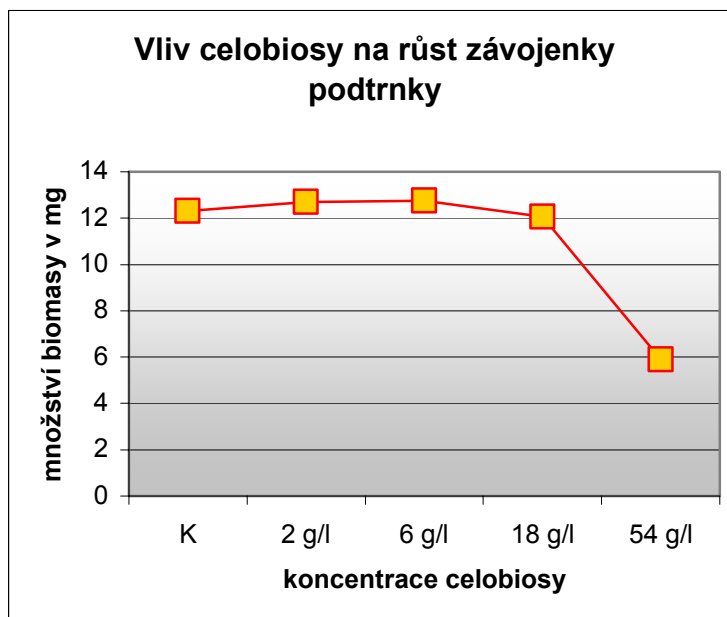
Na substrátech s KNO₃ roste závojenka podtrnka lépe než na kontrolních variantách. Hodnoty v grafu ovšem netvoří spojitou křivku.



Graf 6. Vliv glycinu na růst závojenky podtrnky

Entoloma clypeatum roste na substrátech s koncentrací glycinu 0,1 g/l o trochu hůře než na kontrolních variantách, na substrátech s koncentrací glycinu 0,3 g/l a 1 g/l o trochu lépe a na substrátech s koncentrací glycinu 3 g/l výrazně lépe.

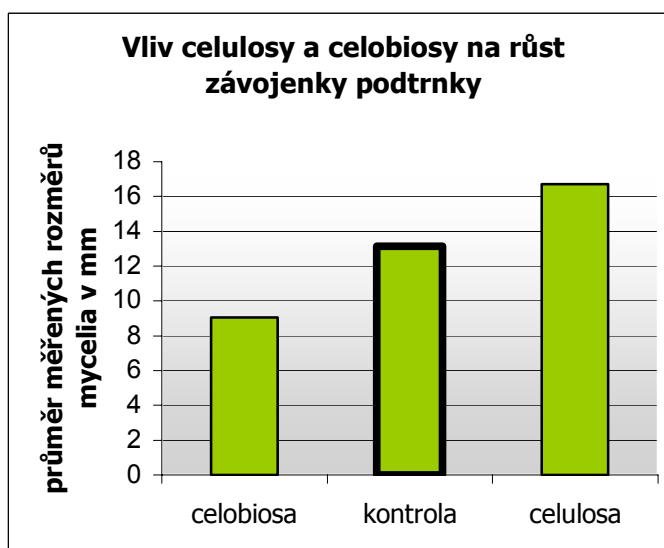
3.5 VLIV CELOBIOSY NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY



Graf 7. Vliv celobiosy na růst závojenky podtrnky

Na substrátech s koncentrací celobiosy 2 g/l, 6 g/l a 18 g/l roste závojenka podtrnka přibližně stejně jako na kontrolních variantách, zatímco na substrátech s koncentrací celobiosy 54 g/l méně.

3.6 POROVNÁNÍ VLIVU CELULOSY A CELOBIOSY NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY

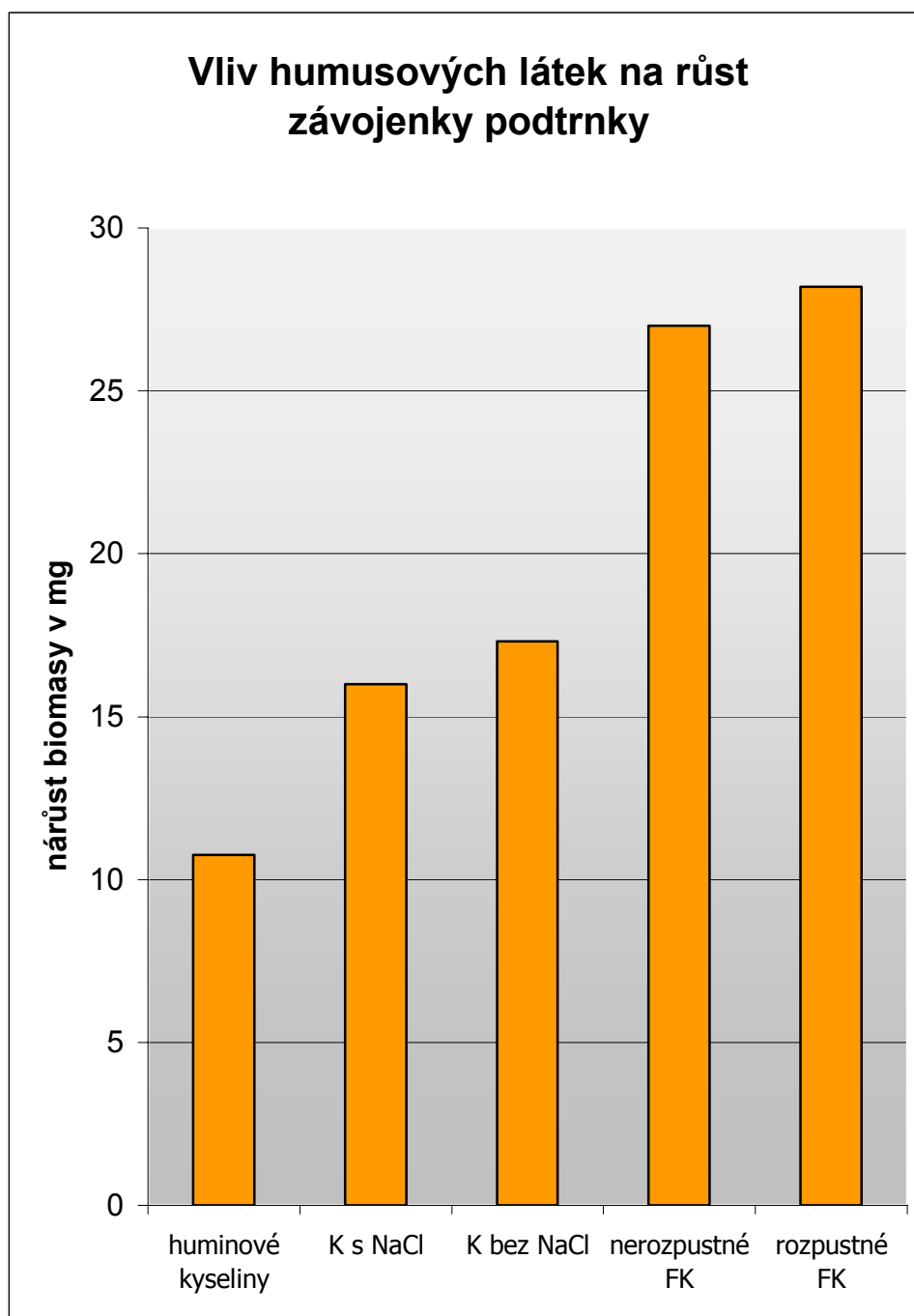


Graf 8. Vliv celulosy a celobiosy na růst závojenky podtrnky

Na substrátech s celulosou dosahuje mycelium závojenky podtrnky větších rozměrů než na substrátech s celobiosou.

Vyhodnocení ostatních variant (pektin, glykosamin) nebylo možné provést kvůli silné kontaminaci.

3.7 VLIV HUMUSOVÝCH LÁTEK NA ZÁVOJENKU PODTRNKU



Graf 9. Vliv humusových látek na závojenku podtrnku

K s NaCl ... kontrola s NaCl

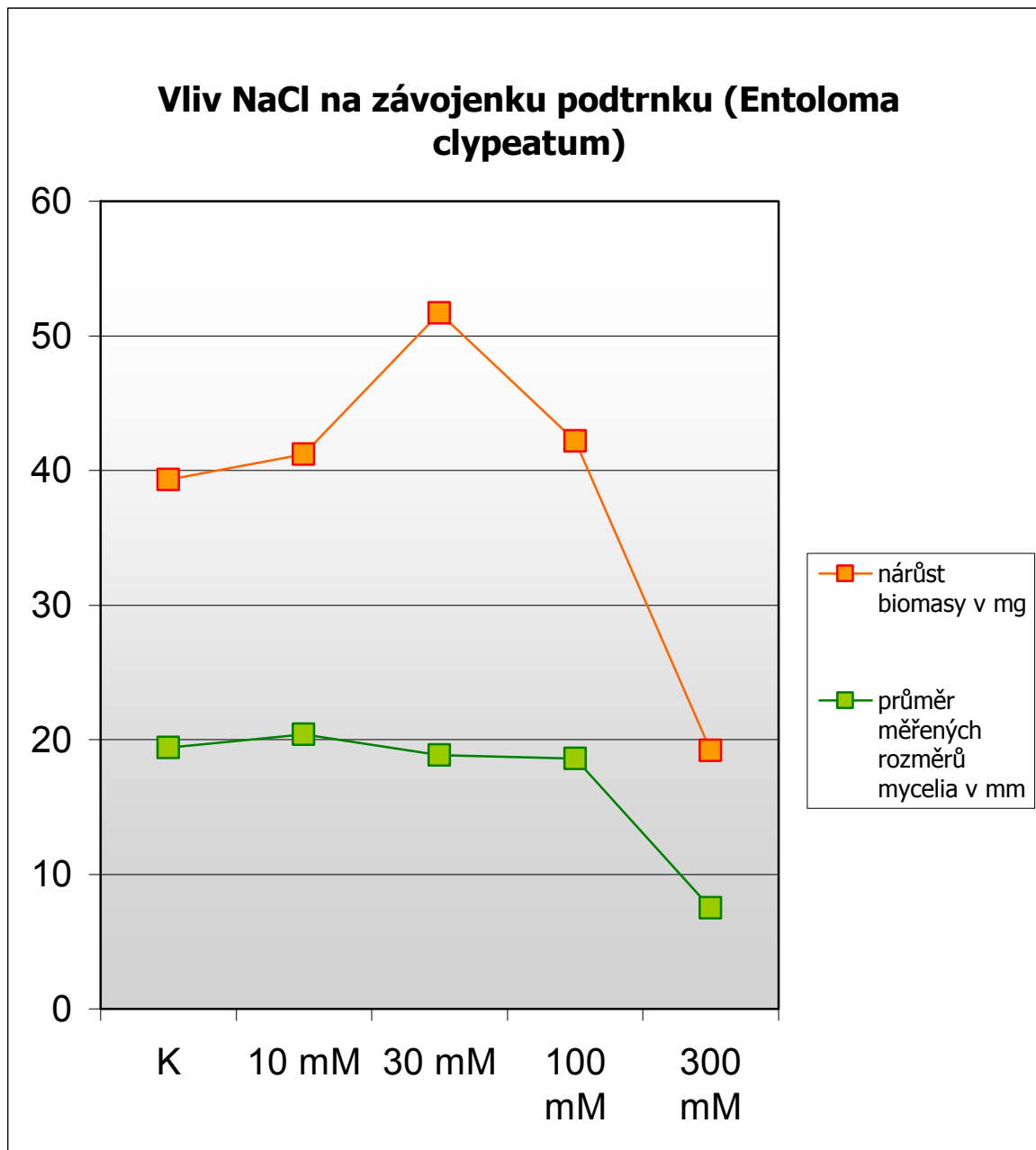
K bez NaCl ... kontrola bez NaCl

Nerozpustné FK ... nerozpustné fulvokyseliny

Rozpustné FK ... rozpustné fulvokyseliny

Závojenka podtrnka roste nejlépe na substrátech s rozpustnými fulvokyselinami.

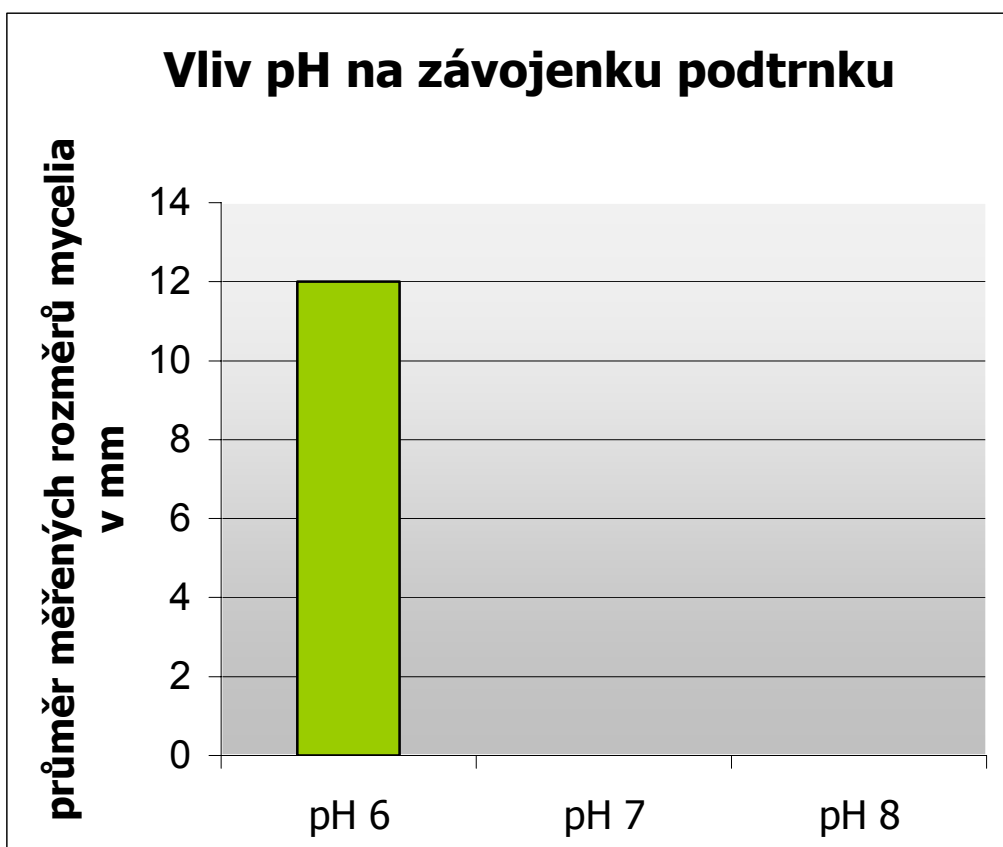
3.8 VLIV NaCl NA ZÁVOJENKU PODTRNKU



Graf 10. Vliv NaCl na růst závojenky podtrnky

Na substrátech s koncentrací NaCl 10 mmol/l, 30 mmol/l a 100 mmol/l tvoří závojenka více biomasy než na kontrolních variantách, na substrátech s koncentrací NaCl 300 mmol/l výrazně méně.

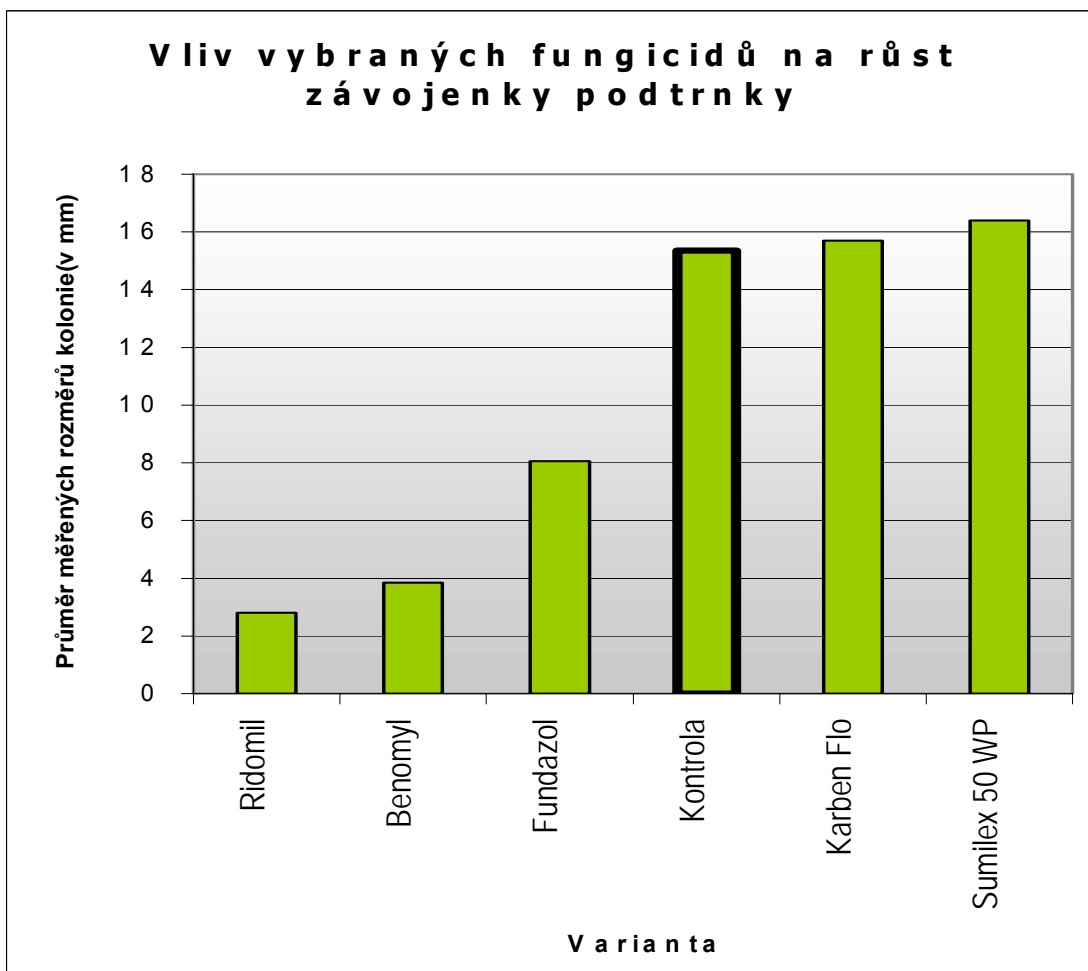
3.9 VLIV pH NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY



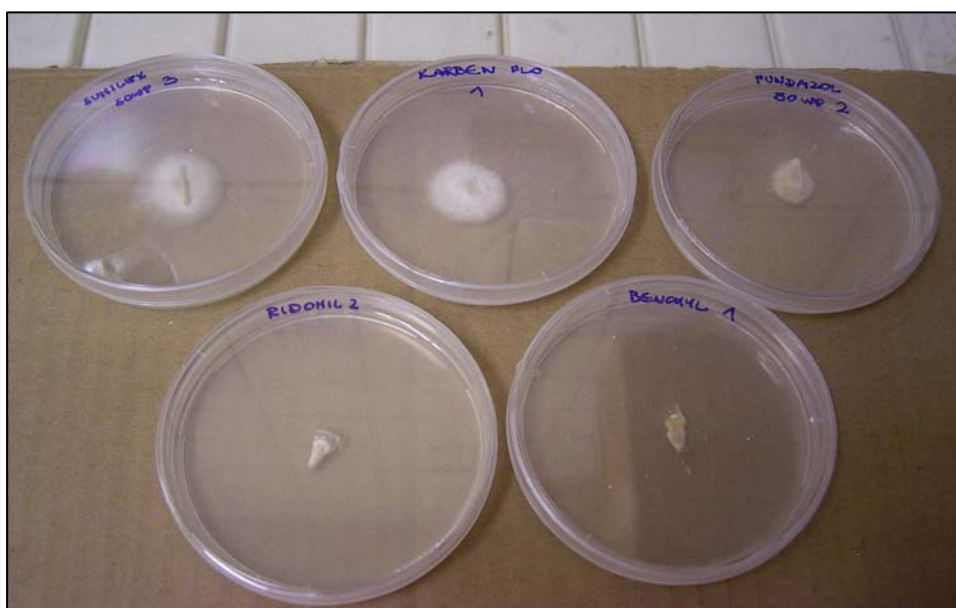
Graf 11. Vliv pH na růst závojenky podtrnky

Ve všech Petriho miskách, kde bylo pH substrátu 6, závojenka podtrnka bez problémů rostla. Nerostla však ani v jedné Petriho misce, kde bylo pH substrátu 7 nebo 8.

3.10 VLIV VYBRANÝCH FUNGICIDŮ NA RŮST ZÁVOJENKY PODTRNKY



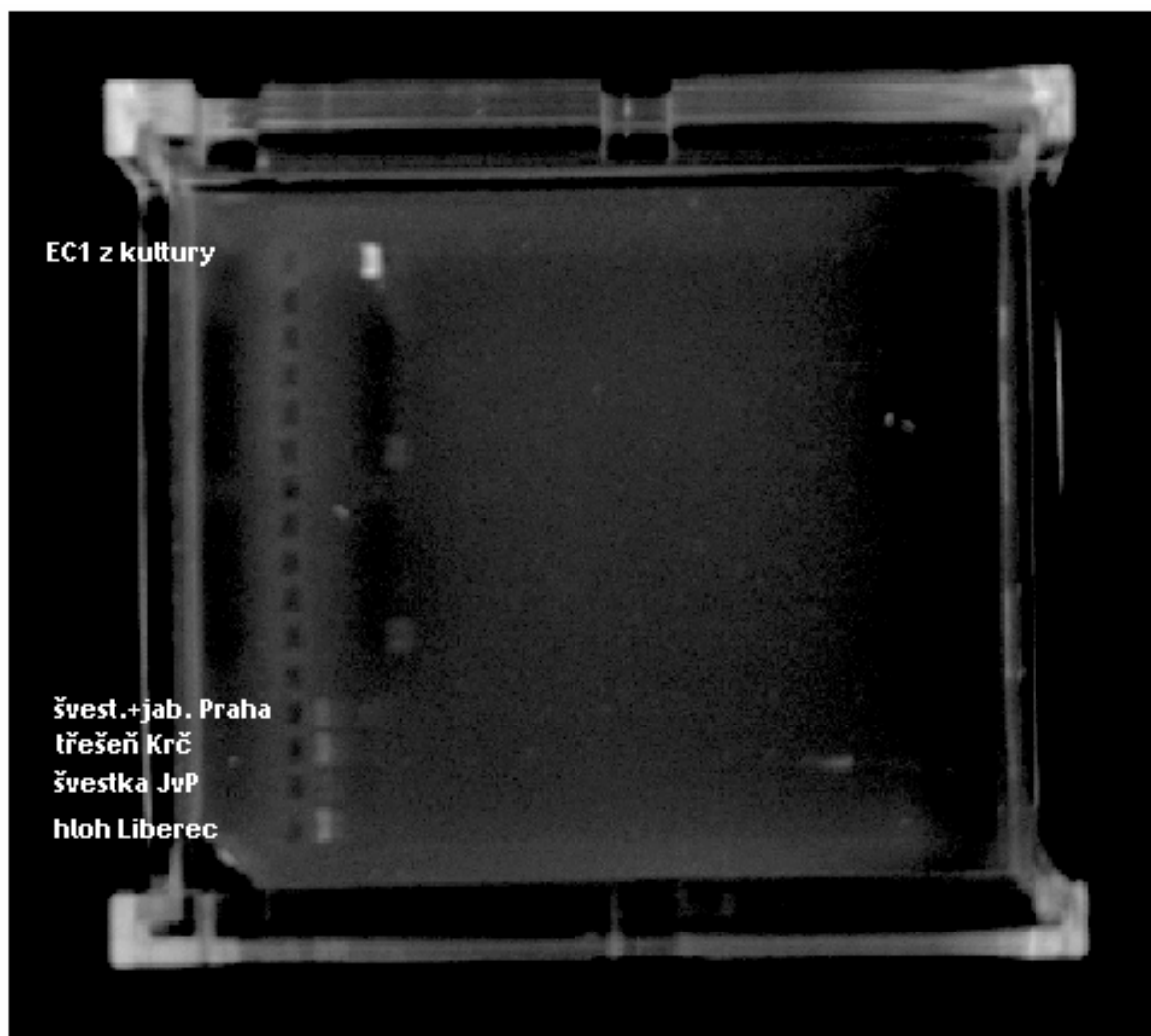
Graf 12. Vliv vybraných fungicidů na růst závojenky podtrnky



Obr.3. Horní řada zleva: Sumilex 50 WP, Karben Flo, Fundazol. Dolní řada zleva: Ridomil plus, Benomyl.

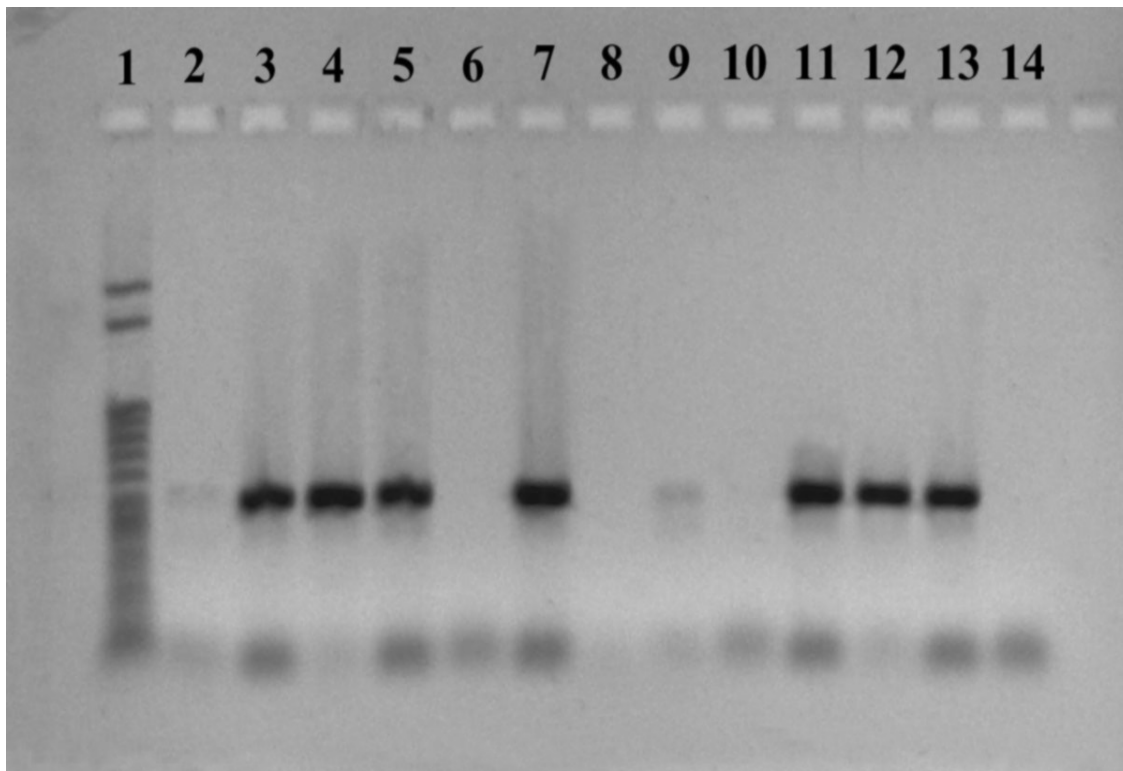
Testované fungicidy působí na růst závojenky podtrnky rozdílně. Ukázalo se, že Ridomil plus a Benomyl jej silně omezují, Fundazol jej omezuje také, ale již v menší míře, a Karben Flo a Sumilex 50 WP jej neomezují vůbec - na substrátech s dvěma naposled jmenovanými fungicidy kultura dosahuje dokonce o trochu větších rozměrů než kontrolní varianty.

3.11 POKUS O DETEKCI ZÁVOJENKY PODTRNKY V KOŘÍNCÍCH RŮŽOTVARÝCH DŘEVIN



Obr.4. Pokus o detekci závojenky podtrnky v kořincích různotvarých dřevin – elektroforéza

Závojenka podtrnka nebyla přítomna v žádném ze zkoumaných vzorků.



Obr.5. Detekce závojenky podtrnky v axenické kultuře klíčnicích rostlin švestky (*Prunus domestica*, viz Přílohy) inokulovaných izolátem EC1 a okolního substrátu za použití primerů NL1 a NL4EC (annealingová teplota 58,6°C)

Dráha 1 – žebříček délek DNA, dráha 2 – kořen rostliny č.1, dráha 3 – kořen rostliny č.1 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 4 – substrát z okolí rostliny č.1, dráha 5 – substrát z okolí rostliny č.1 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 6 – kořen rostliny č.2, dráha 7 – kořen rostliny č.2 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 8 – substrát z okolí rostliny č.2, dráha 9 – substrát z okolí rostliny č.2 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 10 – kořen rostliny č.3, dráha 11 – kořen rostliny č.3 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 12 – substrát z okolí rostliny č.3, dráha 13 – substrát z okolí rostliny č.3 s pozitivní kontrolní DNA, dráha 14 – negativní kontrola bez DNA. Velikost vzorků: 4 μ l

Závojenka podtrnka nebyla přítomna v kořeni žádné ze zkoumaných rostlin. Prorostla pouze substrát.

4. ZÁVĚRY A DISKUSE

- **Bylo sestaveno chemicky definované kultivační médium pro závojenku podtrnku.** Toto médium se připraví smícháním 900 ml deionizované vody, 100 ml půdního roztoku dle Sonnevelda, 10 ml roztoku C, 10 ml roztoku E, 9 g glukosy, 12 g agaru, 2,5 mg riboflavinu, 6 mg thiaminu, 3 g glycinu. Místo glukosy je možné přidat celobiosu. Rozdíl oproti dosud používanému médiu spočívá zejména v nulovém obsahu PDA, které není chemicky definované. Na vytvořeném médiu je možné uchovávat závojenku podtrnku ve sbírkách.
- **Otestovala jsem vliv sedmi různých sacharidů na růst závojenky podtrnky** (str.25: Graf 4). Pokus jsem vyhodnotila podle nárůstu biomasy a rozměrů narostlého mycelia. V množství biomasy bylo dosaženo nejlepších výsledků na substrátech s celobiosou, dále s myo-INOSITOLEm, se škrobem, s glukosou, s galaktosou, se sacharosou a s trehalosou. Největších rozměrů dosahovalo mycelium na plotnách se sacharosou, dále s celobiosou, s glukosou, s myo-INOSITOLEm, se škrobem, s trehalosou a s galaktosou. Rovněž jsem porovнала vliv celulosy a celobiosy: na substrátech s celulosou roste mycelium řidší, na substrátech s celobiosou hustší a dosahuje menších rozměrů.
- **Thiamin nemá na závojenku podtrnku stimulační účinky** (str.23: Graf 2).
- **Riboflavin je pro růst závojenky stimulačící, a to v množství 1 mg/l a 3 mg/l** (str. 24: Graf 3).
- **Testované fungicidy mají na závojenku podtrnku velmi rozdílné účinky** (str.31: Graf 12, Obr.3). Benomyl a Ridomil Gold MZ68 Wp růst houby silně potlačují, Fundazol jej potlačuje méně a Karben Flo a Sumilex 50 WP jej mírně podporují. Potvrdí-li se tedy v budoucnosti kladný vliv závojenky na růst růžotvarých dřevin, bude vhodné upřednostňovat používání Karbenu Flo a Sumilexu 50 WP – a naopak.
- **Závojenka podtrnka nejlépe roste na substrátech s rozpustnými fulvokyselinami** (str.28, Graf 9). Naopak na substrátech s huminovými kyselinami roste hůře než na kontrolních variantách.

- **Závojence podtrnce vyhovuje, je-li v prostředí určité množství NaCl** (str.29, Graf 10). Na substrátech, v nichž bylo malé množství soli (10 mM a 30 mM), rostla houba lépe než kontrolní varianty, zato příliš vysoká koncentrace NaCl (300 mM) její růst silně omezovala. Fakt, že je *Entoloma clypeatum* poměrně tolerantní ke koncentraci NaCl v prostředí, možná umožňuje její růst v alejích poblíž solených silnic.
- **Závojenka podtrnka není schopna potlačovat růst bakterie *Agrobacterium*.** Pravděpodobně tedy není schopna chránit růžotvaré rostliny před tímto patogenem.
- **Nebyla prokázána přítomnost závojenky podtrnky na kořincích vybraných rostlin řádu *Rosales*, a to ani u vzorků z přírody, ani u vzorků z axenické kultury** (str.33: Obr.4, str.34: Obr.5). Ze čtyř testovaných vzorků z přírody (kořínky hlohu z Liberce, švestky z Jablonného v Podještědí, třešně z Prahy 4 a jabloně+švestky z Prahy 4) se u žádného nepotvrdila přítomnost druhu *Entoloma clypeatum*. Z axenické kultury byly vybrány tři vegetativně řízkované rostliny in vitro inokulované závojenkou podtrnkou. Testována byla přítomnost houby na kořincích těchto rostlin a v okolním substrátu. Zatímco v okolním substrátu byla DNA závojenky podtrnky ve 2 ze 3 případů přítomna, v kořincích nebyla nikdy. Toto příliš nekoresponduje s výsledky Maďarů (⁵Szücs, E. - Véghelyi, K. 1998) – zatímco podle jejich výzkumu provedeného v maďarských sadech bylo závojenkou podtrnkou kolonizováno 16-21% ovocných stromů, z našich jí nebyl kolonizován žádný. Na jaře se s RNDr. Gryndlerem chystáme provést další podobný pokus – zjistit, zda kořínky stromů, poblíž nichž bude nalezena závojenka podtrnka, jsou houbou kolonizovány, nebo ne.
- **Závojenka podtrnka je citlivá na pH** (str.30: Graf 11). Zatímco na substrátech s pH 6 rostly všechny vzorky, na substrátech s pH 8 a s pH 9 nerostly žádné.

Poznámka: U pokusů, kde bylo sledováno větší množství vzorků, a u kterých tudíž inokula pocházela z více než jedné kultury, mohla sehrát roli rozdílná životaschopnost původních kultur.

5. SHRNUTÍ

Práce shrnuje poznatky získané na základě výzkumu závojenky podtrnky (*Entoloma clypeatum*). Výzkum jsem prováděla v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze pod vedením RNDr. Milana Gryndlera, CSc.

Závojenka podtrnka je po celé Evropě rozšířená stopkovýtrusá houba, která na jaře vytváří plodnice v blízkosti dřevin řádu *Rosales*, především švestek, jabloní, meruněk, třešní a hlohů. Její vztah k hostitelským rostlinám není jasný. Z experimentů některých mykologů (E. Szücs, K. Véghelyi) vyplývá, že stromy, jejichž kořeny jsou osídlené touto houbou, mají oproti nekolonizovaným stromům zelenější listy, vyšší výnosy a jsou méně náchylné k hnilobám. Naopak podle výzkumu japonských vědců (Hisayasu Kobayashi, Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada) jde o houbu parazitickou.

Cíle mé práce byly následující: sestavit chemicky definované kultivační médium, prozkoumat vliv humusových látek, vitaminů, sacharidů, zdrojů dusíku a uhlíku, prozkoumat vliv NaCl, otestovat antibiotickou aktivitu houby, zjistit, jak působí na daný druh různé pH a prozkoumat vliv fungicidů.

Z humusových látek rostla houba nejlépe na substrátech s rozpustnými fulvokyselinami. Z pokusů s vitaminy vyplynulo, že thiamin (vitamin B1) není stimulační, riboflavin (vitamin B2) ano (v množství 1 mg/l a 3 mg/l). Ze sacharidů houba tvoří nejvíce biomasy na plotnách s celobiosou, největších rozměrů mycelium dosahuje na substrátu se sacharosem. Bylo sestaveno chemicky definované médium, na němž bude možné uchovávat houbu ve sbírkách a pro další experimenty. Oproti dosud používanému médiu neobsahuje žádné PDA. Velmi se různí účinky zkoumaných fungicidů. Benomyl a Ridomil Gold MZ68 Wp růst houby silně potlačují, Fundazol jej potlačuje méně a Karben Flo a Sumilex Sowp jej vůbec neomezují, na substrátech s nimi závojenka podtrnka roste dokonce o trochu lépe než na kontrolách. Houbě vyhovuje, je-li v prostředí určité množství NaCl (10 mM a 30 mM), zato příliš vysoká koncentrace NaCl její růst znemožňuje (300 mM). Fakt, že je závojenka podtrnka poměrně tolerantní k obsahu NaCl v prostředí, patrně umožňuje její růst v alejích u solených silnic. Je pravděpodobně hodně citlivá na pH. Závojenka podtrnka není schopná potlačovat růst bakterie *Agrobacterium*, a pravděpodobně

tedy nemůže chránit různotvaré rostliny před tímto patogenem. Nebyla prokázána přítomnost závojenky podtrnky na kořincích různotvarých dřevin, a to ani u vzorků z přírody, ani u vzorků z axenické kultury.

5. SUMMARY

In this work I summarize the results I attained on the basis of the research of *Entoloma clypeatum*. I carried it out in the Institute of Microbiology in Prague under the leadership of RNDr. Milan Gryndler, CSc. *Entoloma clypeatum* is ranked among *Basidiomycetes*. In spring it grows near *Rosaceae* plants, especially *Crateagus*, *Malus*, *Prunus*. It is wide-spread and common all over Europe. Its relation to the host plants is not clear. Investigations of some mycologists (E. Szücs, K. Véghegyi) result in conclusion that *Entoloma clypeatum* helps the plants to have greener foliage, higher yields and less tree decay. On the contrary according to the research of Hisayasu Kobayashi, Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada *Entoloma clypeatum* is a paratrophic fungus.

I set these targets: to make a chemically definable culture medium in which *Entoloma clypeatum* could be preserved, to explore the influence of humic matters, vitamins, sugars, different sources of nitrogen and karbon and NaCl, to test the antibiotic activity of the fungus, so as to find out what effect different pH takes and to explore the influence of fungicides.

Concerning humic acids *Entoloma clypeatum* grows best on the substrates with soluble fulvoacids. Experiments with vitamins resulted in conclusion that thiamin is not stimulant while riboflavin is (in the concentration 1 mg/l and 3 mg/l). As for sugars the fungus creates the biggest quantity of biomass on the substrate with cellobiose, the mycelium had biggest proportions on the substrate with sucrose.

A chemically definable culture medium was made. In comparison with the medium which is used now this medium contains no PDA. I learnt that the fungicides take very different effects on *Entoloma clypeatum*. Benomyl and Ridomil plus hamper it strongly, Fundazol hampers it less and Karben flo and Sumilex Sowp don't hamper it at all. The fungus benefits from setting with a definit concentration of NaCl (10 mM and 30 mM), however, exceeding concentration of NaCl (300 mM) makes it impossible. *Entoloma clypeatum* is probably very sensitive to pH.

Entoloma clypeatum is not able to inhibit the growth of *Agrobacterium*. The presence of *Entoloma clypeatum* on the radicles of *Rosaceae* plants was not confirmed.

1. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ A OBRÁZKŮ

Úvodní obr.: Klíční rostlina inokulovaná závojenkou podtrnkou	2
Obr.1: Závojenka podtrnka (<i>Entoloma clypeatum</i>). Autorem fotografie je RNDr. Milan Gryndler, CSc.	11
Tabulka I. Přehled informací o jednotlivých izolátech závojenky podtrnky	13
Tabulka II: Sloen� roztoků C a E.....	14
Tabulka III: Nárůst mycelia při koncentraci PDA 0-24 g/l	15
Obr. 2: Schéma Petriho misky s myceliem	21
Tab.IV. Nárůst mycelia při koncentraci PDA 0-24 g/l	22
Graf 1: Nárůst biomasy při koncentraci PDA 0-24 g/l	22
Graf 2. Vliv thiaminu na růst závojenky podtrnky	23
Tabulka V: Vliv thiaminu na růst závojenky podtrnky – průměr m�řen�ch rozměrů mycelia	23
Graf 3. Vliv riboflavinu na závojenku podtrnku	24
Graf 4. Vliv různých druhů cukrů na růst závojenky podtrnky	25
Graf 5. Vliv KNO ₃ na růst závojenky podtrnky	26
Graf 6. Vliv glycinu na růst závojenky podtrnky	26
Graf 7. Vliv celobiosy na růst závojenky podtrnky	27
Graf 8. Vliv celulózy a celobiózy na růst závojenky podtrnky	27
Graf 9. Vliv humusových látek na závojenku podtrnku	28
Graf 10. Vliv NaCl na růst závojenky podtrnky	29
Graf 11. Vliv pH na růst závojenky podtrnky	30
Graf 12. Vliv vybraných fungicidů na růst závojenky podtrnky	31
Obr.3. Horní řada zleva: Sumilex 50 WP, Karben Flo, Fundazol. Dolní řada zleva: Ridomil plus, Benomyl.....	31
Obr.4. Pokus o detekci závojenky podtrnky v kořnc�ch růžotvarých dřevin: elektroforéza	33
Obr.5. Detekce závojenky podtrnky v axenick� kultuře klíčních rostlin ťvestky (<i>Prunus domestica</i> , viz P�ilohy) inokulovaných izolátem EC1 a okolního substrátu za pouit� primerů NL1 a NL4EC (annealingov� teplota 58,6�C)	34

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Egertová, Z., Gryndler, M. Poděkování za spolupráci. *Mykologické listy*, 2006, č. 98, s.33

Gryndler, M. a kol. *Mykorhizní symbióza – o soužití hub s kořeny rostlin*. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1240-0

Hisayasu Kobayashi , Yousuke Degawa, Akiyoshi Yamada. *Two new records of entolomatoid fungi associated with rosaceous plants from Japan*. The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag, Tokyo 2003

Klán, J. *Co víme o houbách*. 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. ISBN 80-04-21143-7

Noordeloos, ME. 1992 *Entoloma* s. l. In: Candusso (ed.). *Funghi Europaei*, vol. 5. Giovanna Biella, Saronno

Szücs, E. - Véghelyi, K. (1998). Observation with *Entoloma clypeatum* mycorrhizal fungus in hungarian orchards. *Acta Hort.* (ISHS) 477:123-126

Vodrážka, Z. *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody*. 1.vyd. Praha: Scientia, 1998. ISBN 80-7183-083-6

Na následujících internetových stránkách lze nalézt sekvence nukleotidů 28S rDNA závojenky podtrnky.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484327>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484326>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484325>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484324>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484323>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484322>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484321>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484320>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484319>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484318>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=121484317>

8. PŘÍLOHY

8.1 Článek z Mykologických listů

Poděkování za spolupráci

Na pracovním semináři „Houby a dřeviny“ pořádaném 8.4.2006 Českou vědeckou společností pro mykologii jsme požádali mykologickou obec o pomoc se sběrem plodnic závojenky podtrnky (*Entoloma clypeatum*). Rádi bychom poděkovali touto cestou všem přátelům mykologům, kteří na naši výzvu zareagovali : panu J.Bártovi (Vlašim), panu J.Borovičkovi (Praha), panu V.Pravdovi (Sezimovo Ústí), paní L.Štrossové (Praha) a panu S.Valdovi (Kokořínsko). Celkem bylo ze sebraných plodnic získáno 19 izolátů, které pocházejí ze 7 různých lokalit. Tyto izoláty slouží k fyziologickému studiu druhu *E.clypeatum*, který se vyznačuje výskytem pod různotvarými dřevinami a jehož význam pro tyto (snad hostitelské ?) rostliny dosud není objasněn. Pokud ze studia získaných izolátů vyplynou z mykologického hlediska zajímavé výsledky, budeme o nich samozřejmě dále informovat.

Zuzana Egertová, Gymnázium F.X.Šaldy, Liberec

Milan Gryndler, Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

8.2 Ukázka z genové banky NCBI

☐ 1: [EF180048](#). [Reports](#) *Entoloma clypeatu...*[gi:121484327] [Links](#)
LOCUS EF180048 613 bp DNA linear
PLN 13-JAN-2007
DEFINITION *Entoloma clypeatum* isolate EC30 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION EF180048
VERSION EF180048.1 GI:121484327
KEYWORDS .
SOURCE *Entoloma clypeatum*
ORGANISM [Entoloma clypeatum](#)
Eukaryota; Fungi; Basidiomycota; Hymenomyces;
Homobasidiomycetes; Agaricales; Entolomataceae; *Entoloma*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 613)
AUTHORS Gryndler, M., Egertova, Z. and Soukupova, L.
TITLE *Entoloma clypeatum*, a fungus associated with roots of rosaceous woody plants?
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 613)
AUTHORS Gryndler, M., Egertova, Z. and Soukupova, L.

TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-2006) Ecology, Institute of
Microbiology, CAS, Videnska 1083, Prague 4 CZ14220, Czech
Republic

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..613
/organism="Entoloma clypeatum"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="EC30"
/db_xref="taxon:[418785](#)"
[rRNA](#)
<1..>613
/product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 aggaaaagaa actaacaagg attcccctag taactgcgag tgaagcggga
aaagctcaaa
61 tttaaaatct ggtagtcctt ggctgcccga gttgtaatct agagaagtgt
tatccgcact
121 ggaccgtgta caagtctcct ggaatggagc gtcatagagg gtgagaatcc
cgtctttgac
181 acggactacc agggctttgt gatgcgctct caaagagtcg agttgtttgg
gaatgcagct
241 ctaaattgggt ggtaaattcc atctaaagct aaatattggc gagagaccga
tagtgaacaa
301 gtaccgtgag ggaaagatga aaagaacttt ggaaagagag ttaaacagta
cgtgaaattg
361 ttgaaagggg aacgcttgaa gtcagtcgtg ttggccaggg atcaaccttg
cttcttgctt
421 ggtgtacttt ctggttaatg ggtcagcatc aattttgacc agtggaaaaa
gactagggga
481 atgtggcatc ttcggatgtg ttatagccct tggttgcata cactggttgg
gattgaggaa
541 ctcagcacgc cgcaaggccg ggtttttacc acgttcgtgc ttaggatgct
ggcataatgg
601 ctttaatcga ccc

8.3 PRŮBĚH POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

Nejprve byl za použití primerů NL1 – NL4 (O'Donnell 1993) amplifikován fragment 28S rDNA. Směs pro PCR tvořily tyto složky: 25 μ l REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix sMgCl₂ (Sigma R2523), 1 μ l primeru NL1 (10 μ M), 1 μ l primeru NL4 (10 μ M), 1 μ l DNA a 22 μ l vody.

Směs byla nejprve zahřívána 5 minut při 94°C a následně podrobena 34 cyklům PCR, které probíhaly podle tohoto schématu: 60 sekund při 90°C, 60 sekund při 52°C a 120 sekund při 72°C. Nakonec byla ponechána 10 minut při 72°C. Amplifikované fragmenty byly vyčištěny pomocí UltraClean™ PCR Clean-up DNA Purification Kit (MoBio) a osekvenovány.

Poté, co byl vytvořen specifický primer NL1EC, byl za použití tohoto primeru společně s universálním primerem NL1 za naprosto stejných podmínek amplifikován fragment 28S rDNA z čisté kultury závojenky podtrnky.

Při amplifikaci vzorků DNA získaných z kořenů, substrátu z okolí rostlin nebo z půdy byly vždy stanoveny pozitivní kontroly, do nichž bylo přidáno 0.5 μ l kontrolní DNA. Tato kontrolní DNA (0.1 ng/ μ l) byla získána z kultury EC1 za použití primerů NL1 a NL4EC.

Produkty PCR byly vyhodnocovány pomocí elektroforézy v TBE/2% agaróze nebo v TBE/1% agaróze s obsahem 1 μ g/ml ethidium bromidu.