



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Jméno:

Datum:

Téma 08: Kultury nižších rostlin (kultivace dřevokazných hub)

- A. Udržování sbírky stálých kultur – přeočkování hub, podmínky minimálního růstu
- B. Využití metody suspenzní kultury pro přípravu inokula kryptogam

Metoda *in vitro* kultivace je použitelná i pro množení, skladování a distribuci kultur nižších rostlin. Příkladem jsou čisté kultury mycelia dřevokazných hub *Pleurotus ostreatus* a *Lentinus tigrinus*, které jsou pozůstatkem dřívějších rozsáhlých experimentů katedry fyziologie a anatomie rostlin Přírodovědecké fakulty MU v Brně. Kultury používáme jednak jako příklad udržování materiálu v minimálním růstu, jednak jako ukázkou typu kultivace suspenzní kultury v tekutém médiu při přípravě inokula.

Dřevokazné houby mají mnohem menší nároky na složení kultivačního média ve srovnání s rostlinnými explantáty. Houby jako heterotrofní organismy však vyžadují v substrátu organické sloučeniny uhlíku. Univerzálním, jednoduchým a osvědčeným médiem je maltózový (sladový) agar, nebo celulózový substrát (buničitá vata) nasycený pro rychlejší růst mycelia 3% sladovým roztokem.

Materiál: čisté kultury mycelia dřevokazných hub (viz Galádová a Nečesaný 1988):

Lentinus tigrinus (Bull. Ex Fr.) Fr.

Syn. *Panus tigrinus* (Bull ex Fr.) Sing.

30 Sběr: J. Špaček, určení: J. Špaček, izolace R. Radvan – květen 1950
Lokalita: Brno – Komárov, okres Brno – město, 200 m.n.m., kmen neidentifikovaného tvrdého dřeva, izolace ze substrátového mycelia

Pleurotus ostreatus (Jacq. Ex Fr.) Kumm.

13

221 Sběr: A. Černý, určení: A. Černý, izolace L. Scháněl – únor 1981
Lokalita: Brno – Olomučany, okres Blansko, 450 m.n.m., odumírající kmen *Fagus sylvatica*, izolace z plodnice

3200

Médium: 2,5 - 3% agar s přídavkem 3% sladového výtažku našikmený ve zkumavkách a v Petriho miskách, 3% sladový roztok v EM se skleněnými perlami a ve varných baňkách.

Pomůcky: Laminární box, zkumavky s našikmeným agar-sladem, očkovací klička, skalpel, kahan, Petriho misky s agar-sladem, Erlenmayerovy a varné baňky s 3% sladem, třepačka.

Postup:

A. Udržování stálé kultury hub. Přeočkování izolovaného mycelia

1. Příprav sterilní nástroje a zkumavky s čerstvým agar-sladovým médiem.
2. Přenes kultury mycelia hub z ledničky do sterilního laminárního boxu.
3. Kultivační nádoby otevři a ožehni hrdlo zkumavky plamenem.
4. Sterilní očkovací kličkou nebo skalpelem odeber segment vegetativního mycelia z centra kolonie a sterilně jej přenes do středu plochy agar-sladového média našikmeného ve zkumavce.
5. (Způsob, jakým přenášíme určitý kmen houby ze substrátu na substrát, se řídí povahou houby a experimentu, který provádíme. Pro přenášení vegetativních forem houby z pevné na jakoukoliv jinou půdu se hodí nejlépe Radvanova klička. Nejsou-li kolonie příliš tuhé, je možno využít i obyčejné bakteriologické kličky nebo skalpel.)
6. Opatrně ožehni hrdlo otevřené zkumavky, uzavři a popiš nově naočkované kultury.
7. Tyto kultury udržujeme v přísné čistotě, ve tmě na chladném, ne příliš suchém místě, v podmínkách minimálního růstu (tma, 6 - 8°C). Každý kmen kultury vedeme nejméně na 4 zkumavkách. Období mezi přeočkováním (subkultivační interval) nevolíme příliš dlouhá, protože při nedostatku potravy mohou houby ztrácet své fyziologické vlastnosti, zvláště schopnost produkovat některé hydrolytické enzymy.

B. Příprava inokulační suspenze mycelia dřevokazných hub

1. Příprav sterilní nástroje a Petriho misky s čerstvým agar-sladovým médiem.
2. Přenes kultury mycelia hub z ledničky do sterilního laminárního boxu.
3. Kultivační nádoby otevři a ožehni hrdlo zkumavky plamenem.
4. Sterilní očkovací kličkou nebo skalpelem odeber segment mycelia a sterilně jej přenes do středu plochy agar-sladového média v Petriho misce.
5. Opatrně ožehni hrdlo otevřené zkumavky a uzavři ji, popiš naočkovanou Petriho misku.
6. Kultivuj čistou kulturu vegetativního mycelia v Petriho misce v termostatu (tma, 25°C).
7. Po dostatečném nárůstu hmoty mycelia odeber nově narostlé mycelium a přenes jej do 100 ml Erlenmeyerovy baňky na povrch skleněných perel zalitých 3% roztokem sladu.
8. Inkubace kultur v termostatu (tma, 25°C) probíhá takovou dobu, než mycelium vytvoří přiměřenou vrstvu na povrchu skleněných perel. (Pokud je vrstva mycelia příliš tenká,

- je rychlost růstu inokula v další fázi množení příliš nízká. V případě mohutně narostlé vrstvy mycelia vznikají naopak problémy s dezintegrací mycelia na malé kousky).
9. Narostlé mycelium roztřepej prudkými pohyby baňky tak, aby došlo pohybujícími se skleněnými perlami k segmentování mycelia na malé části.
 10. Suspenzi sladového roztoku se segmenty mycelia přelij opatrně (bez skleněných perel) do varné baňky s čerstvým sladovým roztokem. Ožehni hrdlo varné baňky a uzavři alobalem.
 11. Kultivace suspenze probíhá asi 1 týden za kontinuálního třepání, při kterém rostoucí mycelium vytváří v tekutém médiu postupně hrudky.
 12. Taková inokulační suspenze se pak může použít pro naočkování substrátu, na kterém chceme vypěstovat plodnice. Lze použít například slámu nebo větvena palic kukuřice, či buničitou vatu. Pro urychlení růstu mycelia je možné takové substráty nasytit sladovým roztokem. Po dostatečném nárůstu mycelia se může indukovat tvorba plodnic umělým chladovým šokem nebo načasováním kultury do podzimního období.

Hodnocení:

V průběhu kultivace kontroluj kontaminace kultur.

Srovnej rychlost růstu mycelia obou kultur při různé teplotě kultivace.

Všimni si morfologických rozdílů mycelia obou kultur.

Literatura:

1. Tichý V. a Scháněl L. (1957): Cvičení v pěstování kryptogam. – SPN Praha, skriptum Přírodovědecké fakulty, Masarykovy univerzity v Brně.
2. Galádová M. a Nečesaný V. (1988): Sbíerka kultur dřevokazných húb (Culture Collection of Wood-Destroying Fungi), ŠDVÚ, Bratislava.
3. Carroad P.A. a Wilke C.R. (1977): Cell growth and catecholase production for *Polyporus versicolor* in submerged culture. – Appl. Environ. Microbiol. 33(4): 836-839.
4. Jennison M.W., Richberg C.G., Krikszens A.E. (1957): Physiology of Wood-rotting Basidiomycetes: II. Nutritive Composition of Mycelium Grown in Submerged Culture. – Appl. Microbiol. 5(2): 87-95.
5. Scheffer T.C. (1936): Relation of temperature and time to carbon dioxide production and growth in continuously aerated malt-agar cultures of *Polystictus versicolor*. - Plant Physiol. 11(3): 535-564.