



# OBEČNÁ MYKOLOGIE

(místy se zvláštním zřetelem k makromycetům)

- Vymezení pojmů „houby“ a „mykologie“ • Historický výskyt a teorie o původu hub
- Stavba houbové buňky (cytoplazma, organely, jádro a bun. cyklus, bun. stěna)
  - Výživa a obsahové látky hub • Vegetativní stélka hub (nemyceliální houby, hyfy, hyfové útvary, pletivné útvary, stélka lišejníků, růst houbové stélky)
    - Rozmnožování hub (vegetativní, nepohlavní, pohlavní) • Genetika hub
    - Plodnice hub (sporokarpy, askokarpy, bazidiokarpy, anatomie plodnic, hymenofor, hymeniální elementy) • Spory hub (typy a stavba, šíření a klíčení)
  - Nomenklatura hub • **Sběr, určování a konzervace hub**

# SBĚR, URČOVÁNÍ A KONZERVACE HUB

## SBĚR A DETERMINACE HUB

Pro sběr hub za účelem studia, jakož i pro pořizování dokladového materiálu, je základem je umět objekty studia **najít, sebrat a nepoškodit**. Důležité je taktéž zjistit, v jakém je materiál stavu ve vztahu k plodnosti a zejména určitelnosti => do herbářů je záhodno ukládat jen houby **určitelné** (nemusí být určené! – např. položku určenou jen do rodu může později dourčit specialista při revizi, ale bez splnění podmínky určitelnosti ani sebelepší mykolog nic nezmůže), pročež je potřeba, aby položky byly dostatečně reprezentativní (určitý minimální počet kusů, různá vývojová stadia). Parazitické houby je záhodno sbírat sporulující.

Metodika **sběru makromycetů** (stručně v několika bodech):

- v terénu balení do novin, na drobné a křehké plodnice vhodné krabičky od filmů, ampulky od léků aj. (u hygroskopických hub, které rychle vysychají, je vhodné je pro transport obalit např. rašeliníkem);
- vždy balit plodnice jednoho druhu odděleně od jiných, ne více druhů dohromady! (zachycení spor na plodnicích jiných druhů může ztížit determinaci);
- záznam (to bude podobné jako u vyšších rostlin): datum, topografické údaje, zápis o substrátu a stanovišti;
- zejména u masitých plodnic, které neurčíme na místě, pořídit popis plodnice za čerstva (pro pozdější určení po vyschnutí či ztrátě barev);
- dobrými znaky pro určení houby (záhodno zjistit a zaznamenat v popisu) bývají též její vůně a chuť;
- co nejrychleji sebrané plodnice usušit (nejlépe ještě týž den) za přiměřené teploty – ideální jsou např. sušičky na ovoce (příliš rychlé usušení při vysoké teplotě některé plodnice takřkajíc "usmaží" => nejsou pak ani určitelné, ani použitelné jako dokladový materiál).

**Mikroskopické studium** je nezbytným krokem k určení druhů, které nelze přesně určit pouze s využitím makroskopických znaků. Základní mikroskopická **pozorovací média** jsou:

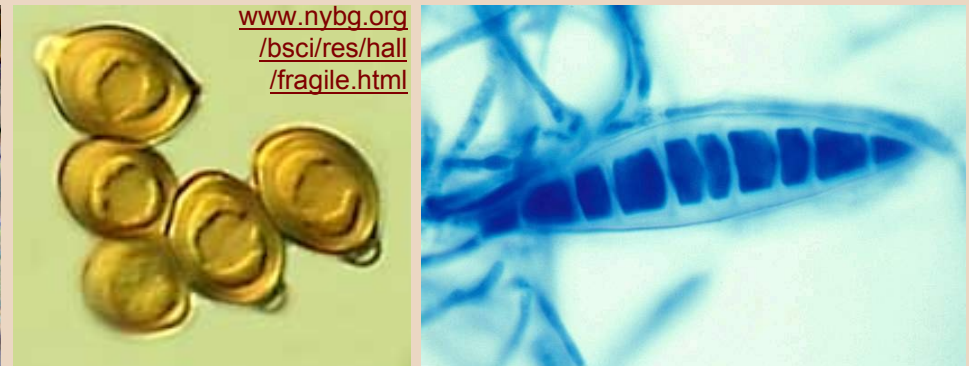
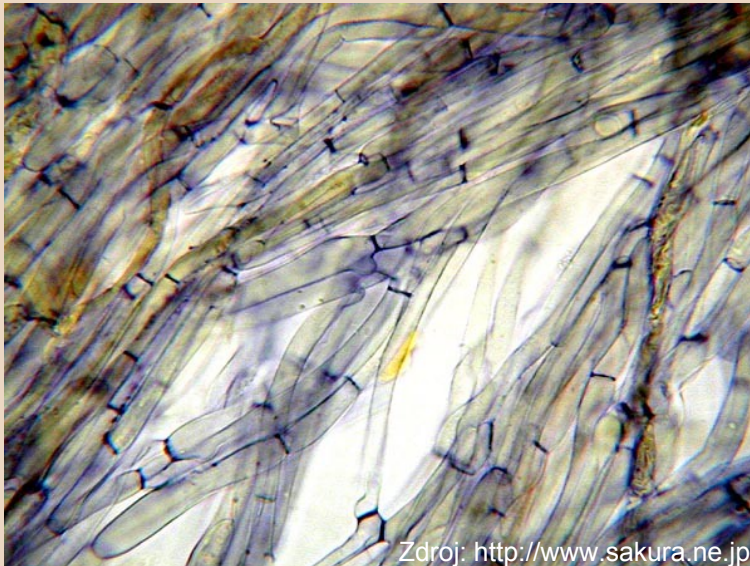
- kongo-červeň (roztok ve vodě) – barví stěny hyf, nejpoužívanější médium pro přípravu nativních preparátů;
- laktofenol – preparát projasňuje; preparáty v laktofenolu vydrží pár dní, ale nejsou trvalé;
- trvalé preparáty (spíše polotrvalé, vydrží pár let) se dělají v polyvinylalkoholu, případně ve speciálně vyráběných médiích;
- druhá možnost pro trvalé uchování preparátu – zalití do média na bázi kyseliny mléčné (tedy např. laktofenol) a nepropustné orámování (různé laky).

Pro barvení konkrétních struktur jsou používána speciální **barviva** (i zde jde o krátký výběr):

- již zmíněná **kongo-červeň**;
- **Lugolův roztok** – roztok KJ a jódu ve vodě; přidáním chloralhydrátu dostaneme Melzerovo činidlo;
- **pikronigrosin** – barvení klíčních pórů, apikálních papil spor;
- **genciánová violet'** (roztok ve vodě) – specifické barvivo pro *Zygomycota*;
- používá se i mikrobiologické barvivo **Sudan III** pro barvení tukových elementů.

Determinaci na druhové i vyšší úrovni mohou napomoci **chemické reakce**:

- **amyloidní reakce** – modrání stěn orgánů obsahujících škrob v látkách obsahujících jód (Melzerovo činidlo);
- **dextrinoidní** (pseudoamyloidní) **reakce** – žlutohnědorezavé zbarvení struktur taktéž působením jódového činidla;
- **cyanofilní reakce** – modrání chitinózních struktur v roztoku bavlnové modři;



Vlevo amyloidní stěny hyf ze třeně *Boletus calopus*, uprostřed dextrinoidní reakce spor *Leucocoprinus fragilissimus*, vpravo cyanofilní zbarvení na příkladu makrokonidie *Microsporium* sp.

Výše jsou základní reakce s širokým využitím v mykologii; více specifické jsou:

- karminofilní reakce – barvení obsahu bazidií některých hub barvivou obsahujícími železitý acetokarmín;
- reakce na celulózu – modré zbarvení celulózních stěn v chlorzinkjódu.

**Studium hub** (jejich vlastností, autekologie i synekologie) a případné experimenty je možno provádět:

- **in vivo** – houby jsou pozorovány, resp. pokusy prováděny v jejich přirozeném prostředí (příklad: Mycorrhizal seedlings inoculated with the pathogens showed greater shoot and root development than nonmycorrhizal chestnut plants. All the fungi tested reduced the negative effect of the ink disease pathogens on the plant host **in vivo**.);
- **in vitro** – pozorování, resp. pokusy probíhají v laboratorních podmínkách (příklad: Wild honey was diluted with sterile distilled water and tested **in vitro** for inhibition of the plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Stemphylium solani*.);
- **in situ** – houby jsou pozorovány, resp. pokusy prováděny v místě jejich přirozeného výskytu (příklad: The occurrence of large amounts of polysaccharides including chitin points to an important **in situ** production of soil organic matter by fungi and/or arthropods.);
- **ex situ** – pozorování, resp. pokusy probíhají například ve sbírkách, kde jsou konkrétní druhy (kmeny) uchovávány, může jít též o umělé formování symbiotických vztahů (typicky mykorhiz, příklad: An innovative **ex situ** fungal baiting method using soil collected from field sites allows the simultaneous detection of mycorrhizal fungi for multiple terrestrial orchids.).

## KONZERVACE A KULTIVACE HUB

Pro uchovávání vzorků hub a dokladového materiálu existují dvě základní cesty konzervace – suchá a mokrá.

**Sušení** je způsobem běžně používaným pro plodnice makromycetů a parazitické houby (usuší se i s hostitelem). Dají se sušit i mikromycety (usušení agarové kultury) a dokonce i hlenky, ale vzorky těchto organismů uchovávané v sušené podobě vypadají občas dost hrozně...

Pro uchovávání sušeného materiálu jsou používány herbářové obálky, do kterých jsou houby vloženy podobně jako lišejníky nebo mechorosty; způsob zakládání je zde odlišný od "klasického" nalepování lisovaných rostlin, používaného v botanice.

Materiál v herbáři musí být dobře usušený, vydezinfikovaný (aspoň jednou za pár let, houby podléhají hmyzu mnohem více než cévnaté rostliny) a vybavený jasnou etiketou (jako u vyšších rostlin...).

**Mokrá cesta** znamená uchovávání v konzervačních tekutinách – základními používanými tekutinami jsou formaldehyd, kyselina octová a glycerol. Výhodou oproti sušení je, že takto "naložené" plodnice drží tvar; nevýhodou "skleněných konzerv" je náročnost na prostor a váhu, stejně jako jejich obtížný transport.

V posledních desetiletích se užívá **lyofilizace** – vymražování za vakua do amorfního ledu (při rychlém zmražení ve vakuu se nestihnou vytvořit krystalky ledu, které jsou příčinou trhání buněk při "normálním" zmrznutí).

Pro **studium mikroskopických hub** je potřebná izolace a kultivace.

V přírodě se houby vyskytují ve směsi – kromě mycelií jde zejména o množství spor (v gramu půdy jsou přítomny až miliony spor desítek různých druhů) => pro získání čistých kultur se nabízejí různé možnosti **izolace**:

- opakovaným přidáním vody "zředit" získaný vzorek substrátu (např. z půdy, povrchu stěn nebo rostlinných těl) => nechat vyklíčit na Petriho misce (prosadí se obvykle houby zastoupené větším množstvím spor anebo rychle klíčící) => vyrostou kultury více druhů => z těch pak vybírat pro přeočkování a další kultivaci (materiál pro čisté kultury nejlépe získat z konečků hyf);
- dát na agar drobnou částičku půdy a sledovat vyrůstající konce hyf, případně pinzetou odebrat a dát na živnou půdu fragmenty hyf přímo z půdy nebo povrchu kořenů => je možné odebrat pro kultivaci druhy přítomné v půdě v hyfové podobě, které naopak nezískáme ředěním vzorku;
- epifyty je možné získat spláchnutím z povrchu listů nebo přitisknutím listu na agar, endofyty nařezáním rostlinného pletiva na drobné částičky a následným propláchnutím na agar;
- vzorky hub ze vzduchu (spory, konidie) lze získat vystavením agarové plotny na vzduch => co se "nachytá", to vyroste => dále obdobně jako v případě ředění vzorku substrátu ve vodě; alternativou je probublávání vzduchu vodou => spláchnutí spor na agar a dále stejně;



- chceme-li selektivně získat konkrétní druhy, lze použít selektivní média, prospívající některým druhům a inhibující růst jejich konkurentů (toho se dá dosahovat různou dostupností vody, různým poměrem živin, změnou pH, antibiotiky, ...).

Je důležité, zda je houba přítomna v určitém odběru ve vegetativní formě nebo pouze ve formě diaspor (nemusí jít jen o spory, ale třeba o fragmenty mycelia). Pro konkrétní prostředí nebo substrát je záhodno pracovat pouze s ekologickou skupinou hub, které jsou na daný habitat životně vázány – například z vodních hub můžeme vyloučit hyfomycety, jejichž spory bývají ve vodě napadány (*Aspergillus*, *Penicillium*), nebo diskomycety na listech či větvičkách do vody spadlých (např. *Scutellinia*).

Vzhledem k tomu, že voda, povrch půdy, stěn, rostlin atd. není sterilní prostředí, lze jednoduchou kultivací snáze vypěstovat oportunní houby a R-stratégy (viz [strategie hub](#)), případně houby snázející disturbance, než druhy charakteristické pro vodní, půdní či fyloplánní společenstva.

Pro pěstování houbových kultur jsou důležité **živné půdy**.

Substráty přirozené: typicky dřevo pro "klackomycety", ale třeba i kousek chleba ve vlhku nebo rajčata a ovesné vločky...

Substráty umělé: ponejvíce agarové půdy; na agaru se využívá jen svrchní plocha, protože houby potřebují vzduch. Agarové půdy jsou směsí vody, agaru (opakovačka: z jakých řas se získává? :o), sacharidů + různých příměsí pro různé druhy půd (brambory, rajčata aj. zelenina, maltóza, exkrement, půda, ... – viz [recepty](#)).

Každá skupina hub má určité nároky na teplotu a vlhkost, na chemické složení – jde hlavně o biogenní prvky, ale pro zvlášť specializované skupiny hub je potřeba přidat např. vitamíny, pro houby z mořského prostředí (nejen typicky vodní houby, časté jsou např. pyrenomycety) je třeba imitovat slanost vody (klíčí jen při vyšších osmotických tlacích) a podobně.

Pro eliminaci bakterií se přidávají antibiotika (až po "uvaření" půdy, vysoká teplota je rozkládá), abychom vůbec vypěstovali houby. :o)

Snadná je **kultivace** saprofytů a fakultativních parazitů, zatímco obligátní parazity lze kultivovat pouze na hostitelských rostlinách (celou řadu biotrofních rostlin se nikdy nepodařilo kultivovat).

Velmi problematická je kultivace mykorhizních hub, případně je možné zjistit jejich přítomnost, ale obtížné je dlouhodobě udržovat v kultuře. Arbuskulární houby lze pěstovat z chlamydospor (u těchto hub obsahují až tisíce jader různého genotypu, což ztěžuje identifikaci) nebo malých fragmentů hyf, vysetých do půdy v blízkosti kořenů rostlinného symbionta => vyklíčí, resp. vyrostou do kontaktu s kořenem a kolonizují je. Problematické je získání čistého vzorku, protože na povrchu kořenů a v půdě okolo se obvykle vyskytuje řada druhů => je zapotřebí nesnadná a zdlouhavá selekce pěstováním na různých půdách a s různými rostlinami (odebrat fragmenty kořene nebo vzorek proseté půdy => přenést do sterilní půdy, kde roste jeden druh rostliny => větší jistota, že spory zde vytvořené patří houbě tvořící mykorhizu s konkrétní rostlinou) => ze spor vyrostlé hyfy kolonizující kořeny po čase vybrat a přenést na čerstvé médium => šance získat čistou kulturu (ale kromě toho, kolik času celý proces zabere, je tu po celou dobu hrozba kontaminace...). Houby tvořící orchideovou mykorhizu je možné zjistit pouze v případě odebrání hyf prorůstajících mezi buňkami korové vrstvy kořene.

## Kultivace makroskopických hub:

Materiál je potřeba sebrat v době, kdy je plodnice akorát zralá pro fruktifikaci – již má zralé (ale ne přezrálé) bazidie (typicky jde o *Basidiomycota*) => zabalit klobouk do vysterilizovaného staniolu => kultivovat nejlépe týž den (max. po 2–3 dnech v lednici).

Průběh přípravy: opláchnout plodnici vodovodní vodou, pak destilkou, vysterilizovat 70% etanolem nebo 4% persterylem => vyříznout (sterilním skalpelem) bloček asi 0,5 cm<sup>3</sup> a dát na sladínový agar nebo jinou živnou půdu (ideálně s přidáním antibiotik proti bakteriím a třeba i proti plísním z oddělení *Zygomycota*).

U některých hub je možno "vypěstovat" hyfy z myceliálních provazců, sklerocií, stromat i plodnic – musí jít o životaschopné generativní hyfy, které jsou schopné se "vrátit" do stavu vegetativního mycelia; zabráníme-li kontaminaci, lze takto získat čistý izolát.

Z malých plodnic je lépe vzít celý klobouk a přilepit na horní miskou Petriho misky => spory vypadají na půdu ve spodní misce.

Jednodušší je příprava kultury dřevokazné houby – ke kultivaci není potřeba plodnice, stačí nakažené dřevo => vyříznout z něj asi 1 cm<sup>3</sup>, ten pak po dezinfekci rozříznout skalpelem napůl a řeznou plochou položit na médium.