

## **Mikroskopické houby - cvičení**

### **Obsah:**

- 1. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu**
- 2. Izolace mikroskopických hub - ředící metoda**
- 3. Izolace mikroskopických hub stěrem z prostředí**
- 4. Izolace vodních hyfomycet**
- 5. Izolace mikroskopických hub z osiva (seed born fungi)**
- 6. Příprava čisté kultury**
- 7. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)**
- 8. Identifikace vláknitých hub rodu *Aspergillus***
- 9. Identifikace vláknitých hub rodu *Penicillium***
- 10. Identifikace vláknitých hub rodu *Fusarium***
- 11. Identifikace vláknitých hub řádu *Mucorales***
- 12. Nativní preparát - mikroskopování**
- 13. Seznam médií používaných v mykologii**

## **1. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu**

**Materiál:** koření, bylinné čaje

**Pomůcky:** pinzeta, kultivační médium (MA2% – Malt Extrakt Agar s chloramfenikolem, DRBC), termostat na 25 °C

### **Pracovní postup:**

1. Vzorek rovnoměrně rozprostře po povrchu kultivačního média.
2. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 25 °C po dobu 7 dnů.
3. Mikroskopování, identifikace

### ***Úkoly:***

*Proveďte rodovou či druhovou identifikaci izolátů.*

## **2. Izolace a kvantifikace půdní mykoflóry ředící metodou**

**Princip:** Půdní vzorek určitého objemu roztřepeme ve standardním objemu sterilní vody a dále ředíme. V několika ředěních vyséváme na misky s agarovou půdou. Metoda vychází ze základního empiricky ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné buňky vyrůstá 1 kolonie. Životaschopné buňky vytvářejí na agarovém živném mediu viditelné makroskopické kolonie. V případě izolace a kvantifikace půdní mykoflóry se používá např. půdní agar s glukosou a bengálskou červení, která má antibakteriální účinek a snižuje rychlost růstu hub.

**Materiál:** půda

**Pomůcky:** zkumavky se sterilní vodou, špičky, automatické pipety, kultivační médium (SEA - Soil Extract Agar - Půdní agar s glukosou a bengálskou červení), L-klička, třepačka, termostat.

### **Pracovní postup:**

1. Připravíme výchozí suspenzi vzorku v 9 násobku sterilní dest. vody. Homogenizujeme ručně nebo na třepačce 10 – 20 min.
2. Pomocí pipety z výchozí suspenze přeneseme 1 ml do zkumavky s 9 ml ster. destilované vody. Dobře promícháme! Tento postup opakujeme až k dosažení ředění  $10^{-8}$ .
3. Z ředění  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  vykápneme pomocí pipety 100  $\mu$ l na povrch pevného média (obr. 1) a L-kličkou rozetřeme rovnoměrně po celém povrchu pevného média.
4. Kultivujeme při teplotě 25 °C po dobu 1 týdne.

5. K hodnocení vybereme nejvhodnější ředění (20 - 200 kolonií na misce) a spočítáme kolonie
6. Vypočítáme hodnotu CFU (Colony Forming Unit) v 1 g vzorku.

**Výpočet:**

Celkový počet kolonií vynásobíme ředěním a 10ti (pipetovali jsme 0,1ml na miskou).

Celkový počet mikroorganismů  $N$  na g vzorku se vypočte podle vztahu

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$\Sigma C$  součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách,

$V$  objem inokula aplikovaného na miskou v ml,

$n_1$  počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,

$n_2$  počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,

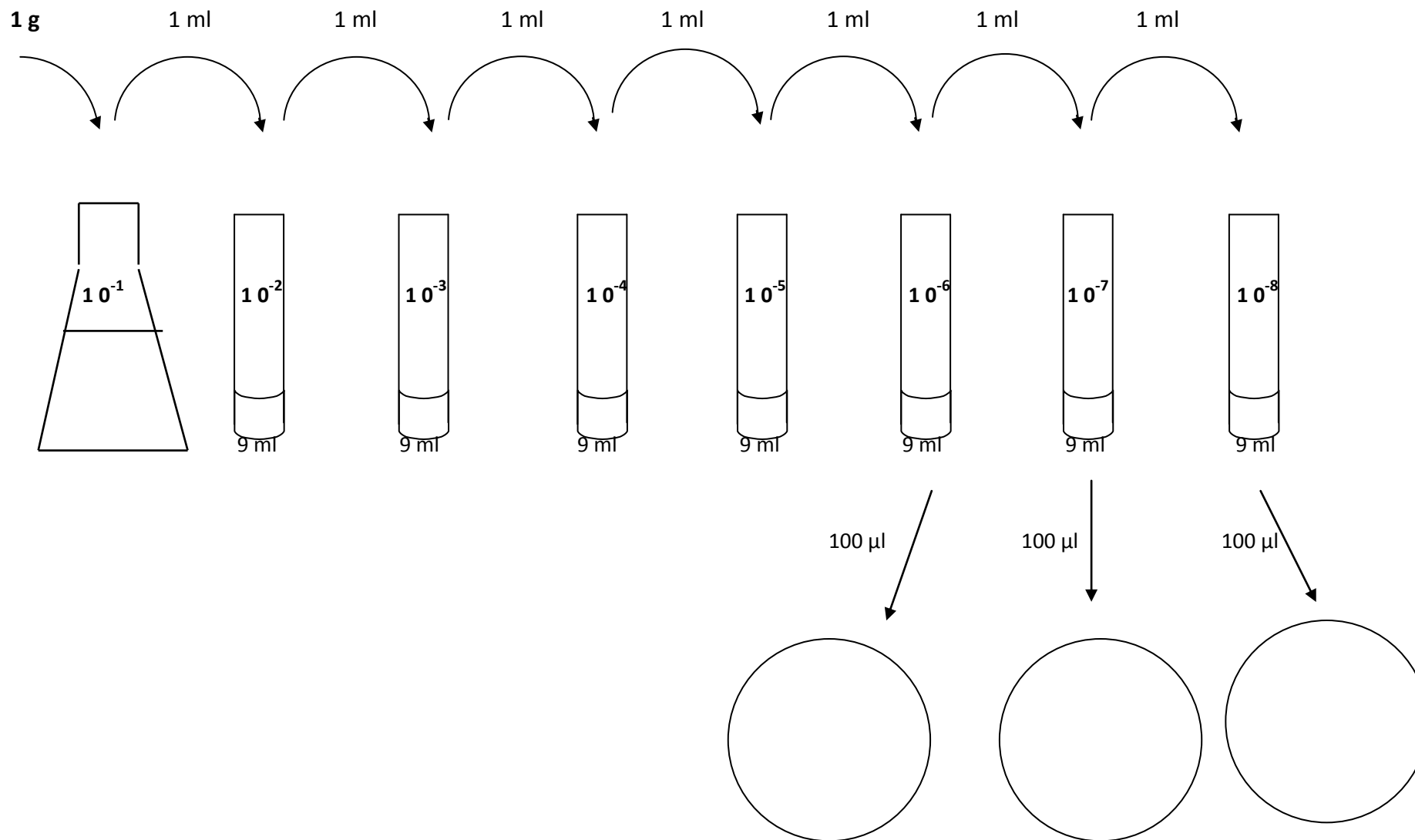
$d$  faktor prvního pro výpočet použitého ředění,

**Úkoly:**

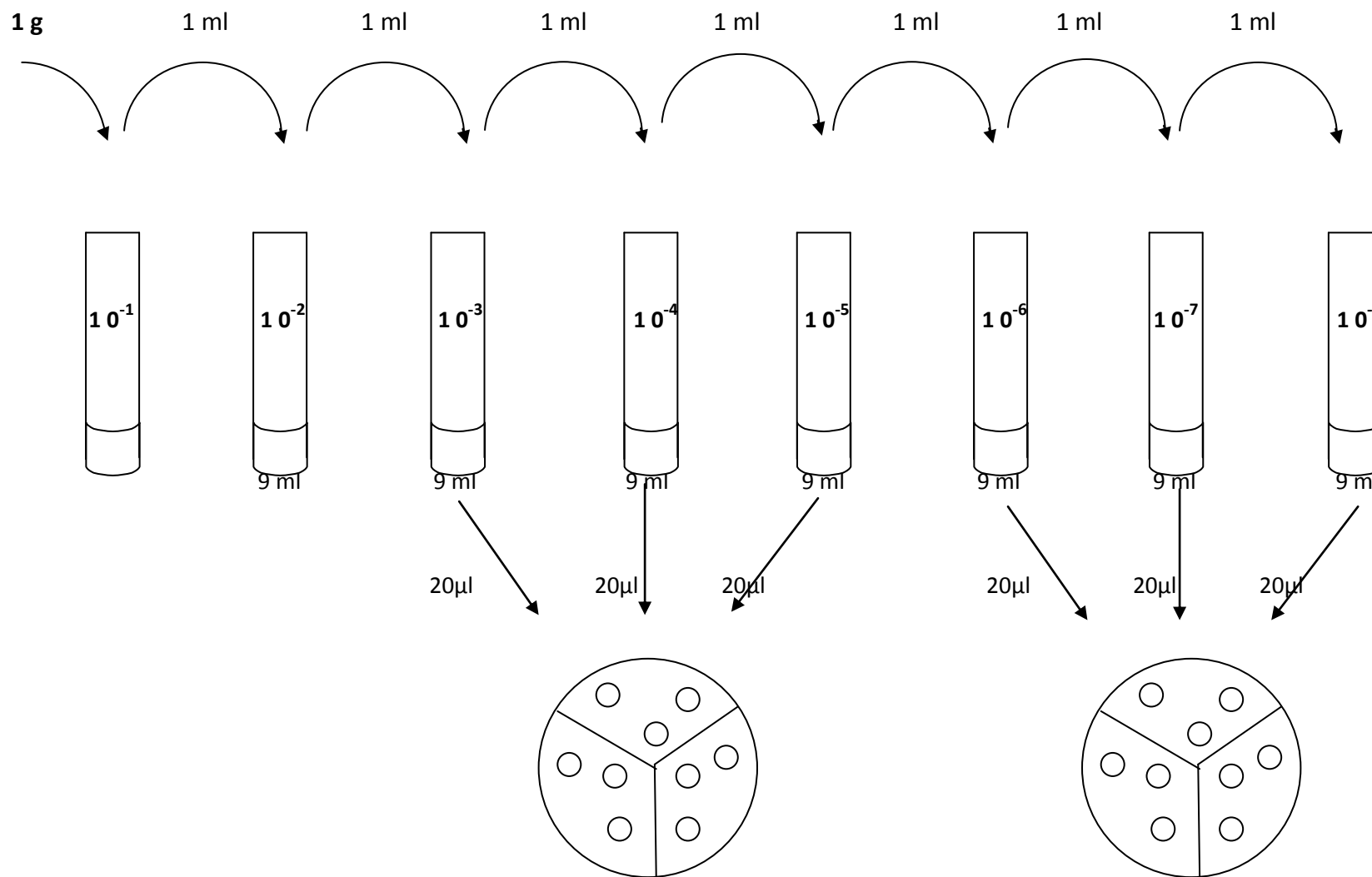
*Proveďte rodovou či druhovou identifikaci izolátů.*

*Vypočítejte hodnotu CFU.*

## Nepřímé stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - METODA ROZTĚREM NA PLOTNU



# Nepřímé stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - KAPKOVÁ METODA



### **3. Izolace mikroskopických hub stěrem z prostředí**

**Materiál:** stěr z prostředí (např. okenní rám, žaluzie, odpadkový koš, klávesnice počítače, aj.)

**Pomůcky:** 1x sterilní vatový tampon, 2x Petriho miska s MA 2% (agar se sladovým extraktem + chloramfenikol), termostat na 25 °C

**Pracovní postup:**

1. Sterilní vatový tampón zvlhčíme přetřením povrchu agaru.
2. Sterilním vatovým tampónem přetřeme odběrové místo.
3. Sterilním vatovým tampónem přetřeme celou plochu Petriho misky s agarem.
4. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.

**Úkoly:**

*Podle identifikačního klíče proveďte rodovou či druhovou identifikaci.*

### **4. Izolace vodních hyfomycet**

**Materiál:** rostlinný materiál (opadané listy, větvičky na vodní hladině) odebraný z vodního toku do plastového sáčku

**Pomůcky:** kádinka (zavařovací láhev), Petriho miska se sterilní dest. vodou, pinzeta, termostat na 15 °C

**Pracovní postup:**

1. Materiál necháme v laboratoři promývat 1 hod. pod tekoucí vodou.
2. Části rostlinného materiálu přemístíme do Petriho misky s destilovanou vodou.
3. Kultivujeme několik dní při 15 °C a pod mikroskopem kontrolujeme tvorbu konidií.
4. Provedeme identifikaci dle klíče

**Úkoly:**

*Podle identifikačního klíče proveďte rodovou či druhovou identifikaci.*

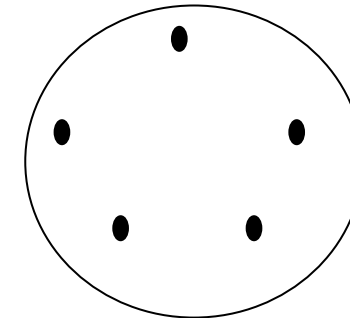
## 5. Izolace mikroskopických hub z osiva (seed born fungi)

**Materiál:** obilky pšenice

**Pomůcky:** 2% roztok dezinfekčního přípravku SAVO, minutky, sterilní destilovaná voda, sterilní pinzeta, sterilní Petriho miska s filtračním papírem nebo kultivační médium (PDA – potato dextrose agar)

### **Pracovní postup:**

1. Provedeme povrchovou dezinfekci vložением 5 obilek do 2% roztoku dezinfekčního přípravku SAVO (tj. 0,1 % NaClO) na dobu 10 minut.
2. Poté osivo třikrát opláchneme sterilní destilovanou vodou.
3. Sterilní pinzetou rozmístíme obilky na povrch PDA (viz. schéma).
4. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 25 °C po dobu deseti dnů.
5. Mikroskopické hodnocení



### **Úkoly:**

*Proveďte rodovou či druhovou identifikaci.*

## 6. Příprava čisté kultury

**Materiál:** Petriho misky se smíšenou kulturou

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s médiem, termostat na 25 °C

### **Pracovní postup:**

1. Vyžíhanou preparační jehlou přeneseme část mycelia nebo spor na agarovou plotnu nebo do sterilní vody ve zkumavce k získání suspenze, kterou můžeme dále ředit a poté vysévat na agarovou plotnu.
2. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.

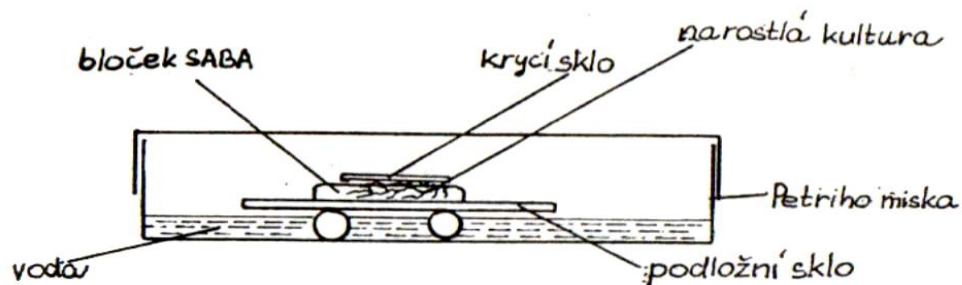
## 7. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)

**Materiál:** Petriho misky s kulturou vláknité houby

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s vhodným kultivačním médiem (Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar), sterilní pinzeta, sterilní destilovaná voda, sterilní krycí a podložní skla, sterilní Petriho miska (vlhká komůrka).

### **Pracovní postup:**

1. Z tenké vrstvy kultivačního média připravíme bloček o velikosti 1x1 cm.
2. Bloček přeneseme na sterilní podložní sklo umístěné ve vlhké komůrce.
3. Vpichem do čtyř stran naočkujeme kulturu a překryjeme krycím sklem.
4. Kultivujeme 2 – 5 dní při teplotě 25 °C.
5. Průběžně sledujeme růst suchým objektivem při zvětšení 60x – 450x.





## 8. Identifikace vláknitých hub rodu *Aspergillus*

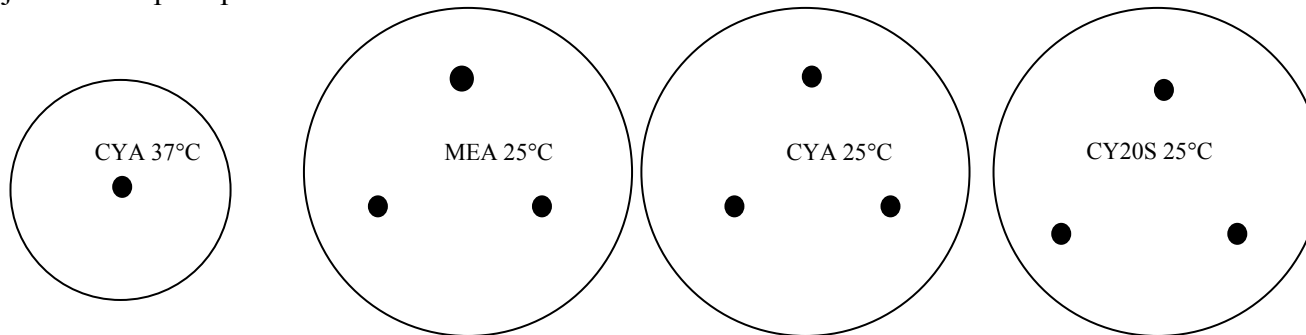
**Materiál:** Petriho misky s kulturou

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem), MEA (Agar se sladovým extraktem), CY20S (Czapkův agar s kvasničným extraktem a 20% sacharosu), termostat

### **Pracovní postup:**

7. Povrch příslušných médií inokulujeme konidii vláknité houby formou vpichu na třech místech tvořících vrcholy rovnostranného trojúhelníka (body mají být vzdáleny asi 3 cm od kraje misky). Aby se spory při očkování nerozptýlily po celé půdě, očkujeme misky zespod, otočené dnem vzhůru.
8. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 a 37 °C.

### **Schéma inokulace:**



### **Hodnocení:**

po 7 dnech kultivace provedeme vyhodnocení růstu vláknitých hub.

Sledujeme:

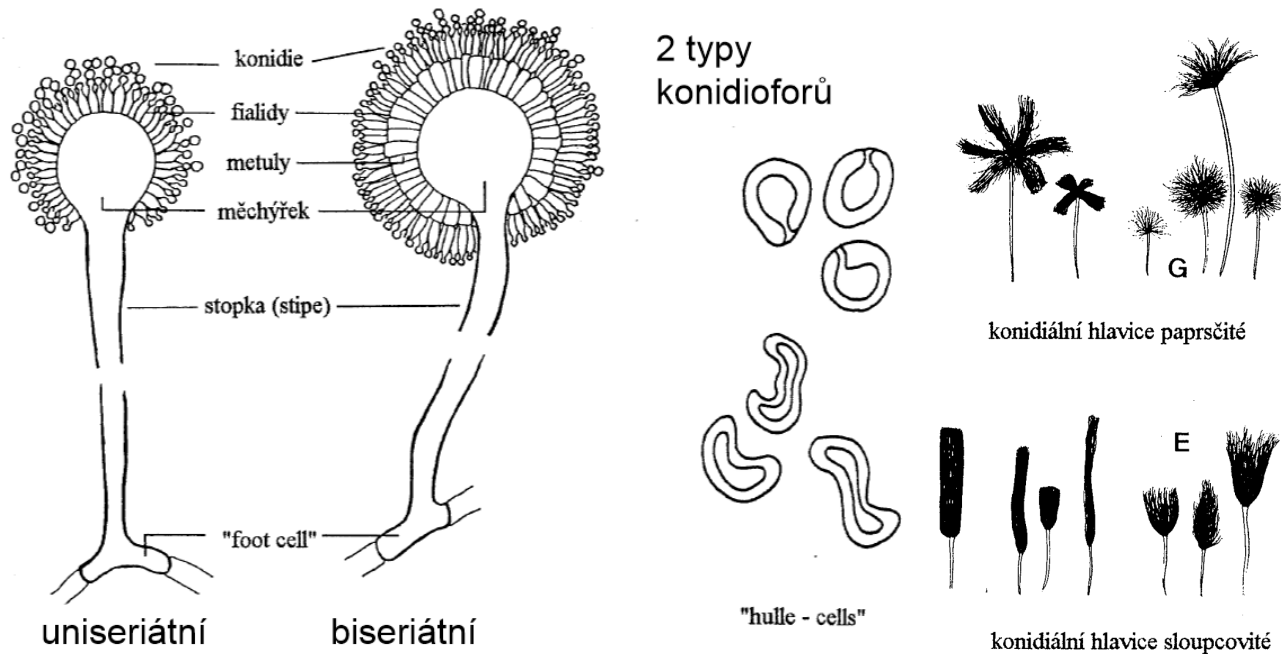
#### **znaky makroskopické**

- rychlost růstu
- charakter povrchu kolonií
- barvu kolonie
- barvu spodní strany kolonie
- přítomnost pigmentu difundujícího do agaru
- přítomnost a barvu výpotku (exudát)
- přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (plodničky, sklerocia, aj.)
- charakteristický zápach.

V hodnocení vždy uvedeme stáří kultury a použitou kultivační půdu, neboť různé půdy mnohdy modifikují a značně mění charakteristické znaky (jak makroskopické, tak mikroskopické). Čisté kultury připravujeme zpravidla na půdě, na které je popis rodu autorem uveden.

### znaky mikroskopické

Ke zjištění mikroskopických znaků nutných pro identifikaci vláknitých hub potřebujeme kromě mikroskopu i binokulární lupu. Pod lupou prohlédneme větší struktury (charakter mycelia, sklerocií, plodniček apod.), pro studium dalších struktur, na nichž je založena identifikace, připravíme mikroskopický preparát. Jeho příprava a správné posouzení a zhodnocení je mimořádně důležité, neboť morfologické znaky u vláknitých hub jsou základním diagnostickým kritériem při určování rodů a druhů. Identifikace do rodu či druhu na základě makroskopických a mikroskopických morfologických znaků se provádí podle klíčů vypracovaných pro určité taxonomické skupiny.

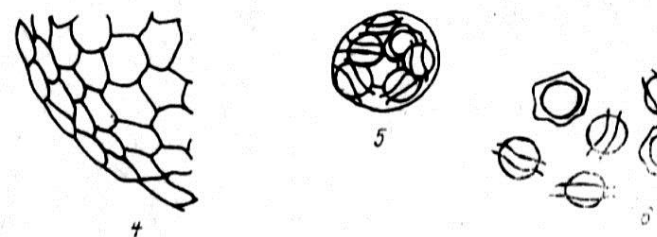
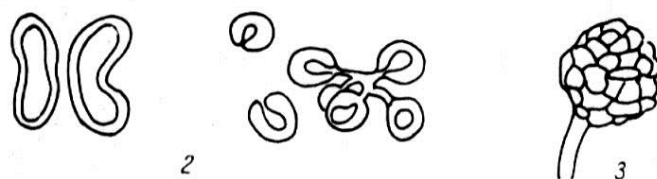
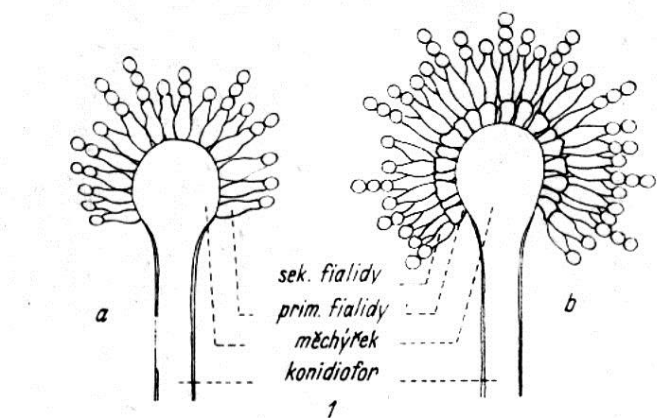


### Úkoly:

*Popište veškeré znaky do identifikačního protokolu*

*Podle identifikačního klíče proveďte druhovou identifikaci.*

Příloha VI **Aspergillus**



Obr. 1. Konidiofory u rodu *Aspergillus* (podle Rapera a Fennellové)  
*a* — ukončení konidioforu s jednou řadou fialid, *b* — ukončení konidioforu se dvěma řadami fialid  
 Obr. 2. „Hülle cells“ (prázdné buňky) u rodu *Aspergillus* (orig.)

Obr. 3. Mladá plodnička u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)  
 Obr. 4. Část povrchu zralé plodničky u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)  
 Obr. 5. Vřecko u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)  
 Obr. 6. Askospory u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)

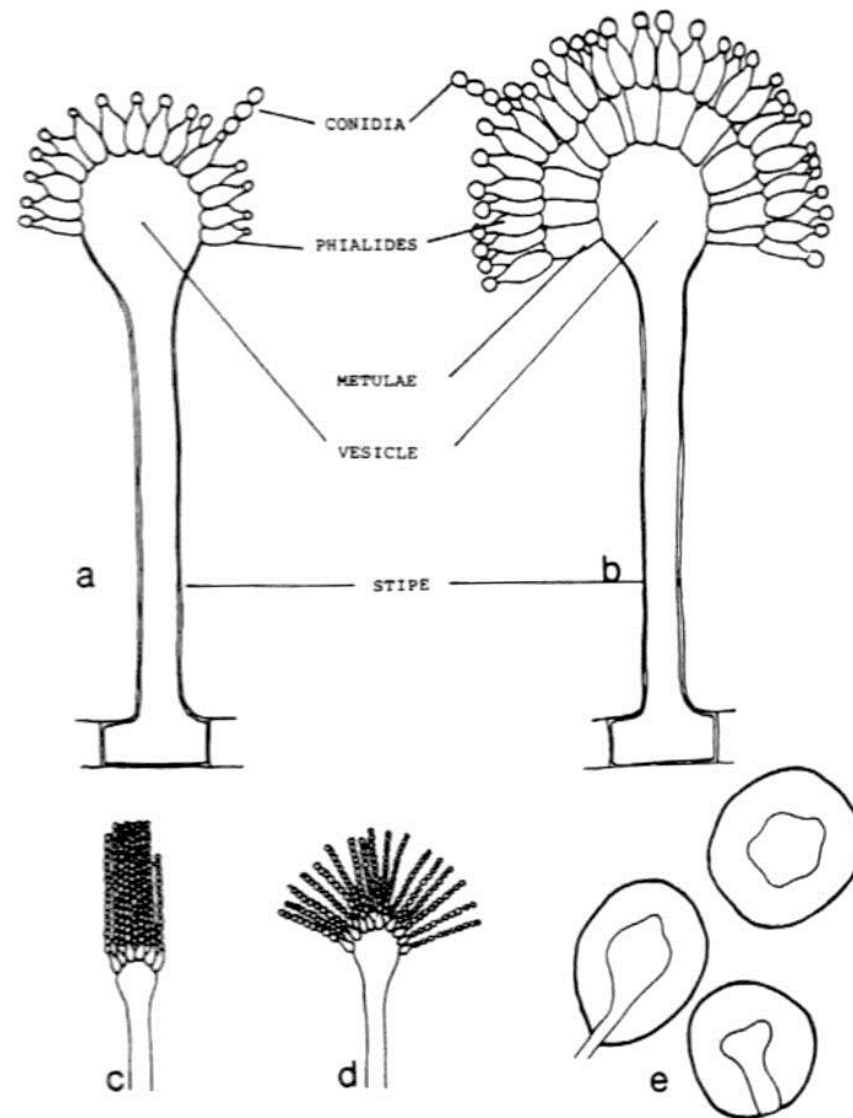


Fig. 67. Morphology of *Aspergillus*. *a*. uniseriate and *b*. biseriate conidiophores, *c*. columnar and *d*. radiating conidial chains, *e*. Hülle cells.

## 9. Identifikace vláknitých hub rodu *Penicillium*

**Materiál:** Petriho misky s kulturou

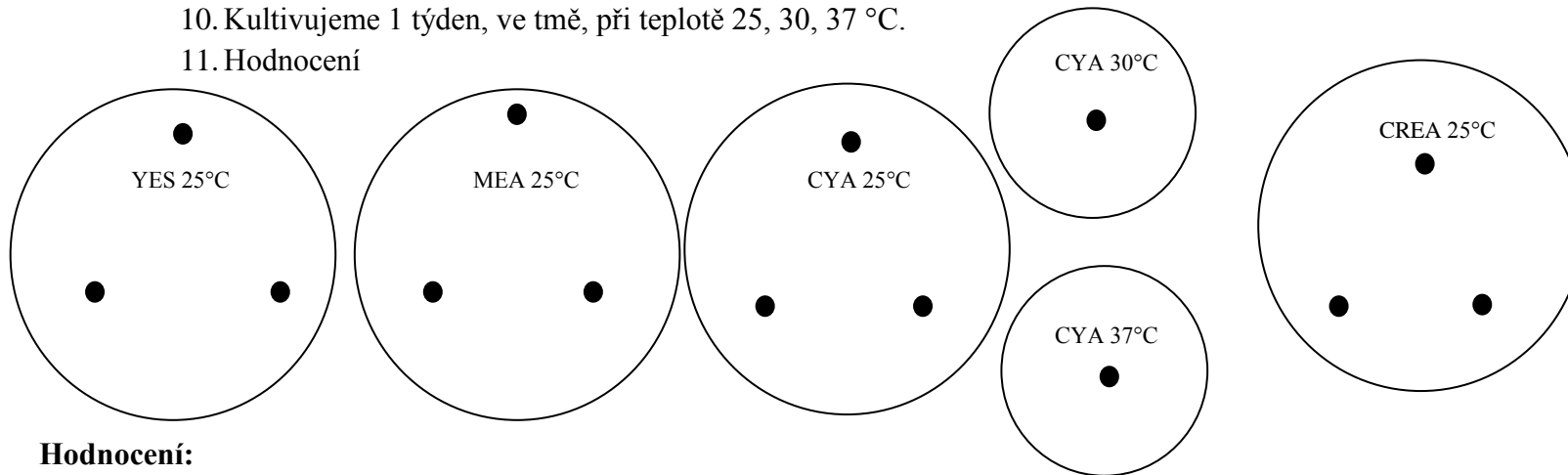
**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s CYA (Czapek Yeast Autolysate agar), MEA (Malt Extract Autolysate agar), YES (Yeast Extract Sucrose agar), CREA (agar s kreatinem a bromkresolovým purpurem), Ehrlichovo činidlo, termostat na 25, 30, 37 °C

### **Pracovní postup:**

9. Povrch příslušných médií inokulujeme konidii vláknité houby formou vpichu na třech místech tvořících vrcholy rovnoramenného trojúhelníka (body mají být vzdáleny asi 3 cm od kraje misky). Aby se spory při očkování nerozptýlily po celé půdě, očkujeme misky zespona, otočené dnem vzhůru.

10. Kultivujeme 1 týden, ve tmě, při teplotě 25, 30, 37 °C.

11. Hodnocení



### **Hodnocení:**

po 7 dnech kultivace provedeme vyhodnocení růstu vláknitých hub.

Na CYA, MEA a YES sledujeme:

### **Znaky makroskopické**

- rychlost růstu
- charakter povrchu kolonií
- barvu kolonie
- barvu spodní strany kolonie
- přítomnost pigmentu difundujícího do agaru
- přítomnost a barvu výpotku (exudát)
- přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (plodničky, sklerocia, aj.)

- hodnocení růstu a produkce kyselých a zásaditých látek na CREA
- hodnocení reakce s Ehrlichovým činidlem - ze středu kolonie rostoucí na CYA (staré 5-9 dní) vykrojíme blok agaru. Stranu s kolonií překryjeme čtvercem filtračního papíru o velikosti 1 cm<sup>2</sup> navlhčeného v Ehrlichově činidle. Pokud se po 2-6 min. objeví fialový prstenec, označíme reakci za pozitivní. Pokud se prstenec vytvoří po 10 min. označíme reakci za slabě pozitivní. Některé druhy produkující alkaloidy, které při reakci s Ehrlichovým činidlem vytvářejí růžový, červený nebo žlutý prstenec.

### **Hodnocení na CREA**

schopnost využívat kreatin jako zdroj N (růst kultury na agaru)

schopnost tvorby kyselých látek (žluté zbarvení agaru za 5-7 dnů kultivace)

schopnost tvorby zásaditých látek (fialové zbarvení agaru za 8-21 dnů kultivace)

### **Znaky mikroskopické**

#### **Nativní preparát z MEA:**

**Materiál:** kultura rodu *Penicillium*

**Pomůcky:** podložní a krycí skla, preparační jehly, kyselina mléčná, identifikační protokol

**Výsledky:** popíšeme makroskopické a mikroskopické morfologické znaky mikromycety. Zápis provedeme do přiloženého identifikačního protokolu.

**Závěr:** podle příslušného klíče provedeme identifikaci.

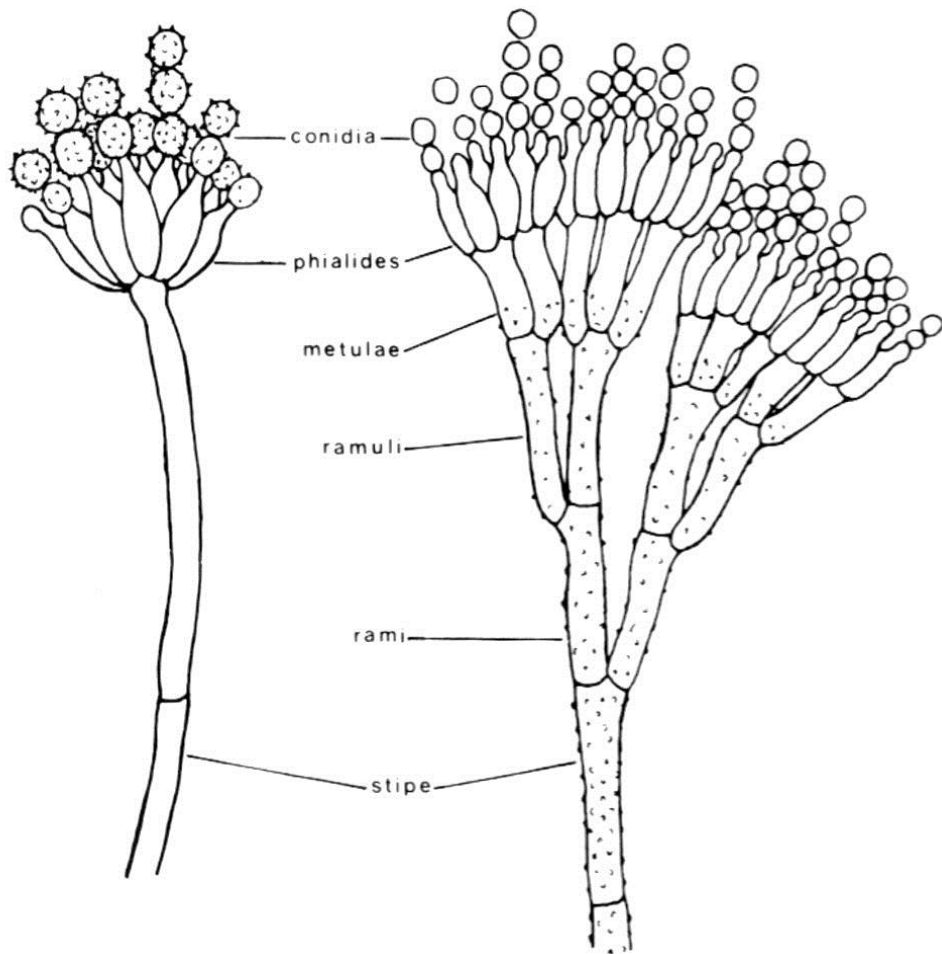
#### **Charakteristické znaky rodu *Penicillium***

Charakteristická pro tento rod je štětičkovitá stavba konidioforu (obr. 1). Mimo konidiální stádium (nepohlavní = anamorfa) se tvoří u některých druhů drobné kulovité plodničky s vřecy (asky) a askosporami (pohlavní stádium = teleomorfa), které patří do rodu *Eupenicillium* a *Talaromyces*. Pro rozlišení jednotlivých sekcí rodu *Penicillium* je určující stavba konidioforu (obr. 2) a uspořádání jeho částí (větví, metul, fialid).

#### ***Úkoly:***

*Popište veškeré znaky do identifikačního protokolu*

*Podle identifikačního klíče proveďte druhovou identifikaci.*



**Penicillium**

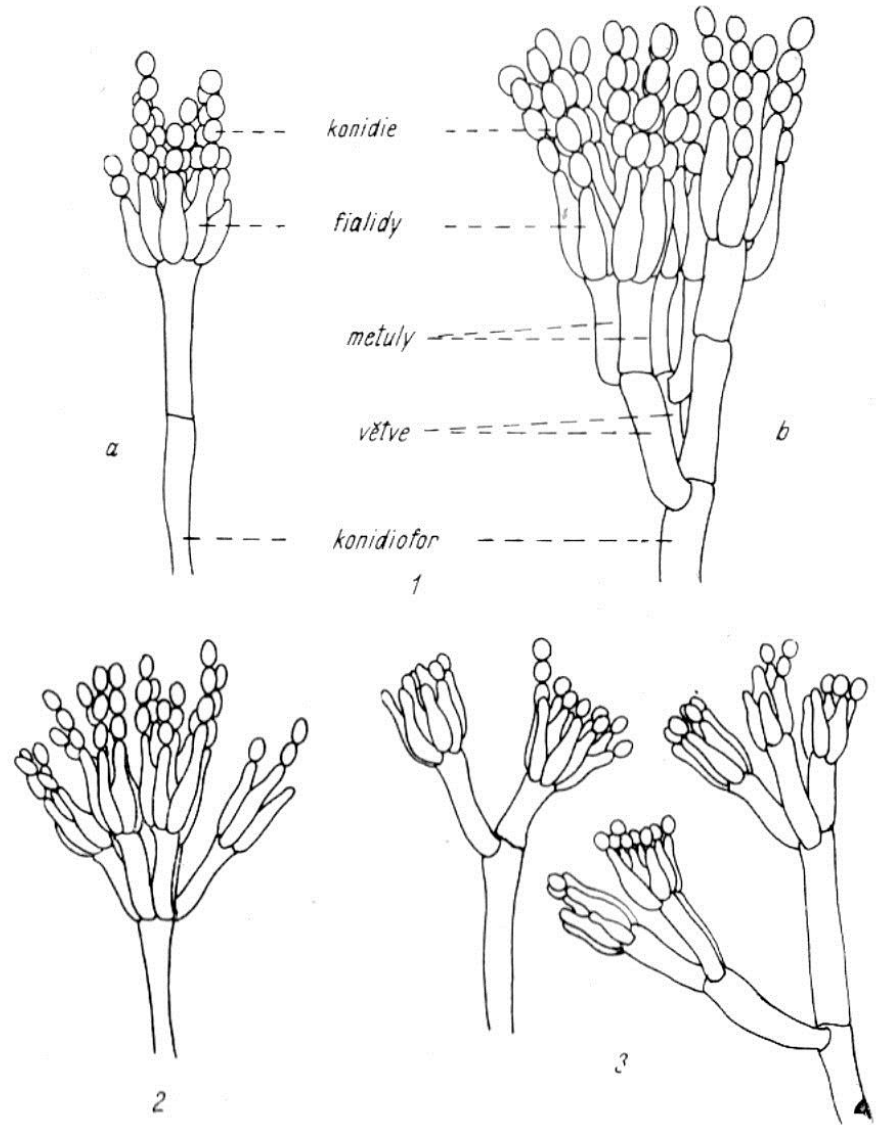
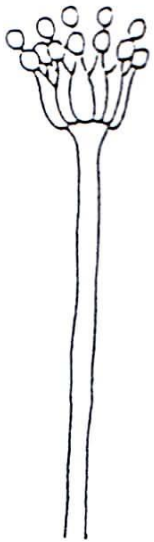
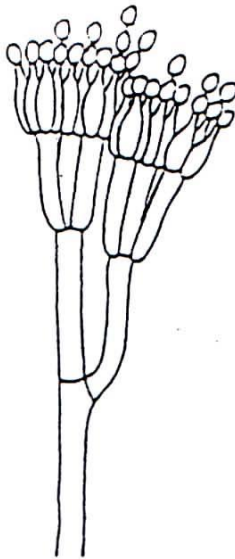


FIG. 5. Penicilli of the simplest and most complex types normally encountered in *Penicillium* species.

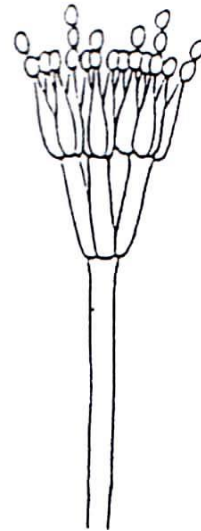
Obr. 1. Konidiofory u rodu *Penicillium* (podle Rapera a Thoma)  
*a* — Monoverticillata, *b* — Biverticillata  
 Obr. 2. Konidiofor u rodu *Penicillium* (Biverticillata Symmetrica) (podle Rapera a Thoma)  
 Obr. 3. Konidiofory u rodu *Penicillium* (Asymmetrica Divaricata) (podle Rapera a Thoma)



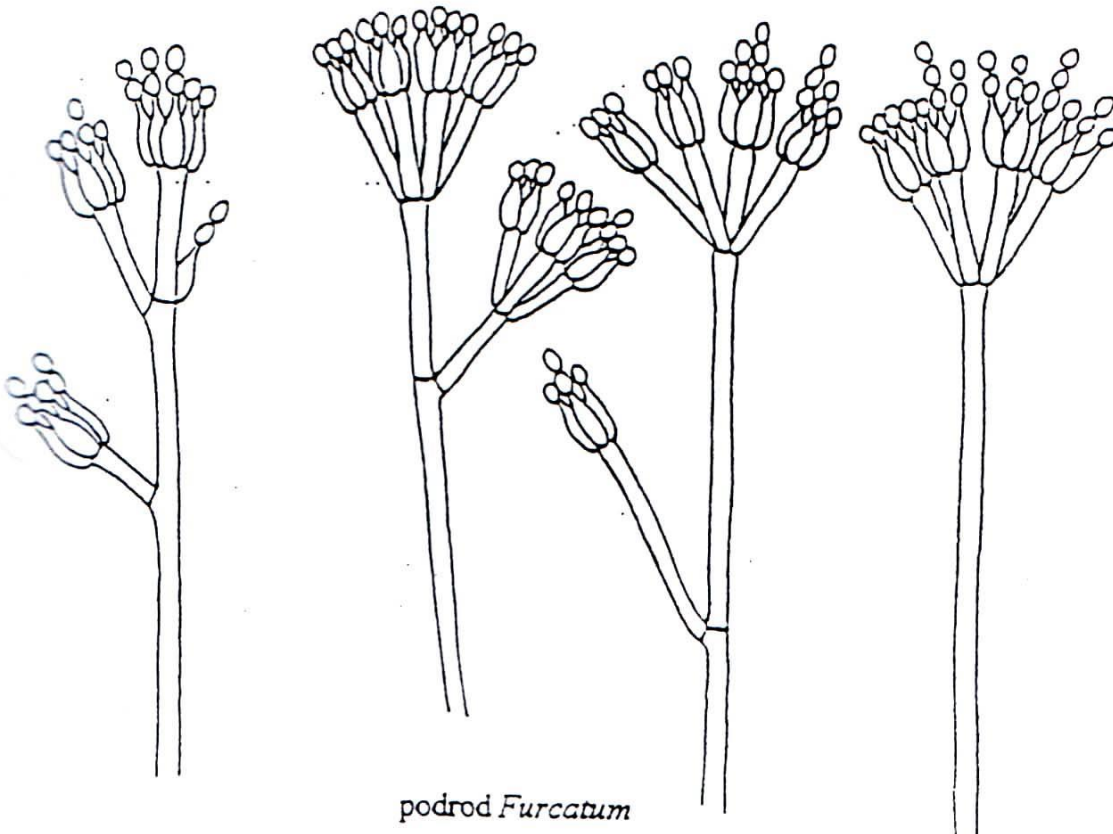
podrod *Aspergilloides*  
konidiofor monoverticilátní



podrod *Penicillium*  
konidiofor asymetricky větvený  
terverticilátní



podrod *Biverticillium*  
konidiofor biverticilátně  
symetrický



podrod *Furcatum*  
konidiofor divarikátní

Obr. 3 - Schematické znázornění typů konidioforů u rodu *Penicillium*

## 10. Identifikace vláknitých hub rodu *Fusarium*

**Materiál:** Petriho miska s kulturou na PDA (bramborodextrozový agar)

**Hodnocení:** po 10 dnech kultivace při 25 °C

### I. znaky makroskopické, které určíme z charakteru růstu

- rychlost růstu
- barvu kolonie
- barvu spodní strany kolonie
- přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (sporodochia, sklerocia)

### II. znaky mikroskopické, které zjistíme pomocí nativního preparátu

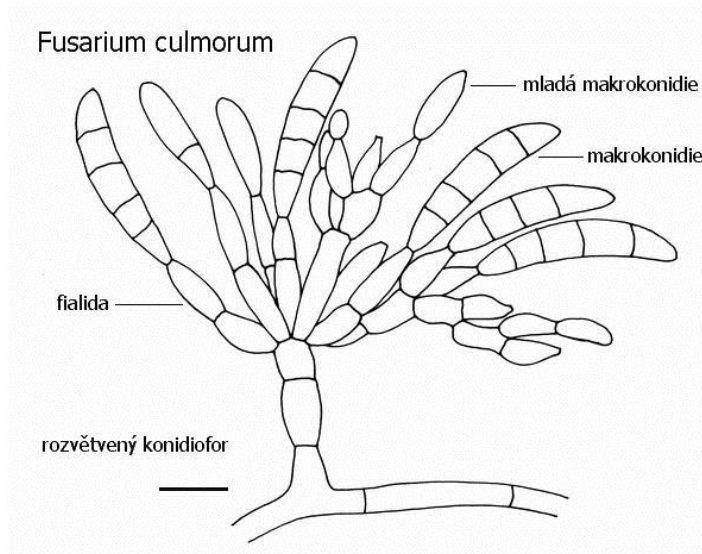
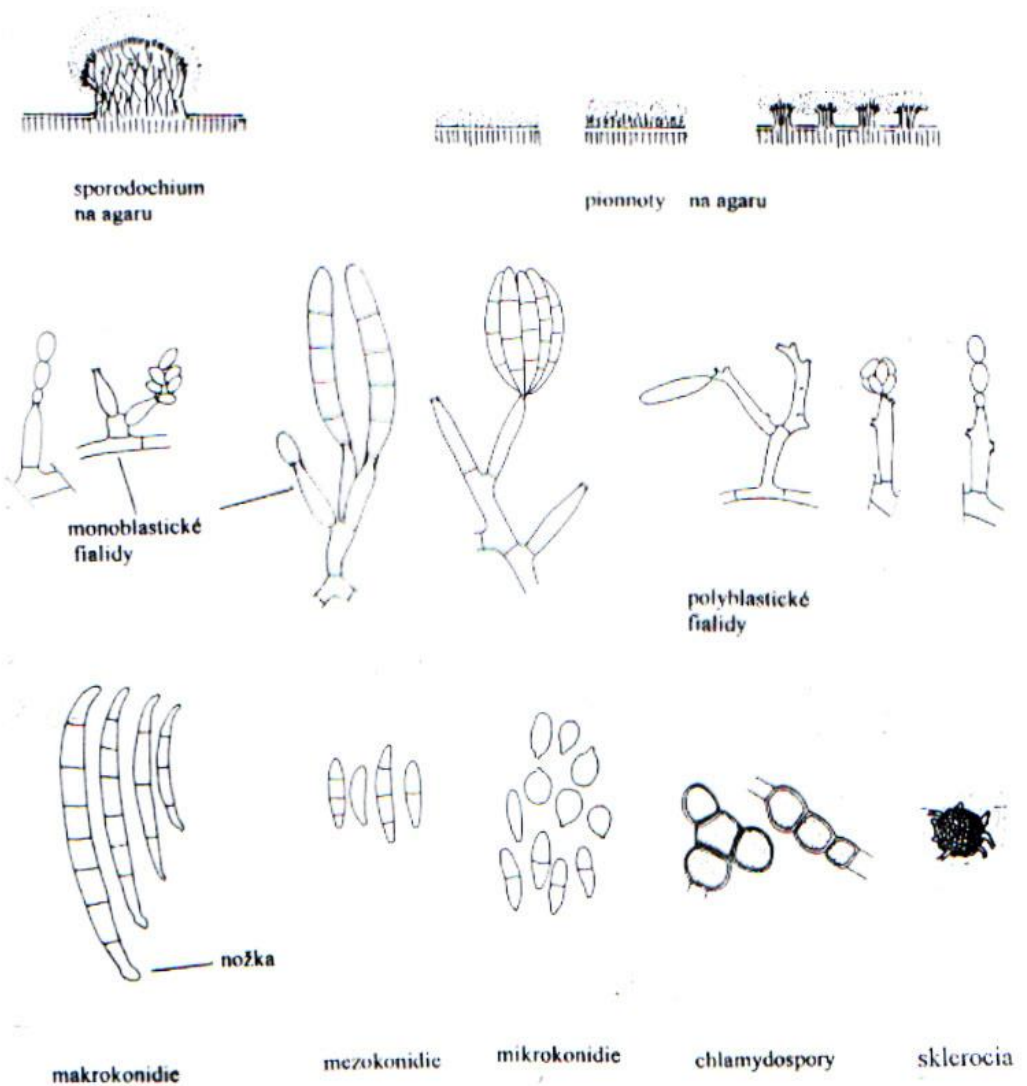
- makrokonidie - tvar bazální a apikální buňky, mikrokonidie, chlamydospory
- typ fialid (monofialidy, polyfialidy)

#### Úkoly:

*Popište veškeré znaky do identifikačního protokolu*

*Proveďte druhovou identifikaci.*

### MORFOLOGICKÉ STRUKTURY U RODU FUSARIUM





## **11. Identifikace vláknitých hub řádu Mucorales**

**Materiál:** Petriho miska s kulturou

**Hodnocení:**

- III. znaky makroskopické, které určíme z charakteru růstu
- IV. znaky mikroskopické, které zjistíme pomocí nativního preparátů

### ***Úkoly:***

*Popište veškeré mikroskopické znaky.*

*Proveďte identifikaci do rodu.*

### **Charakteristické znaky řádu *Mucorales***

Zástupci tohoto řádu vytváří řídké vatovité nebo plstnaté vzdušné mycelium velmi rychle rostoucí. Stélku těchto hub tvoří převážně mnohojaderné mycelium bez přehrádek a proto je zvláště u mladého mycelia dobře pozorovatelné proudění plazmy. Přepážky se vyskytují pravidelně pod rozmnožovacími orgány a ve stáří nepravidelně v průběhu mycelia. Pro rozlišení rodů a druhů řádu Mucorales se používají především znaky nepohlavního rozmnožování, které se uskutečňuje sporangiosporami vznikajícími ve sporangiích vyrůstajících na zvláštních vlákních – sporangioforech.

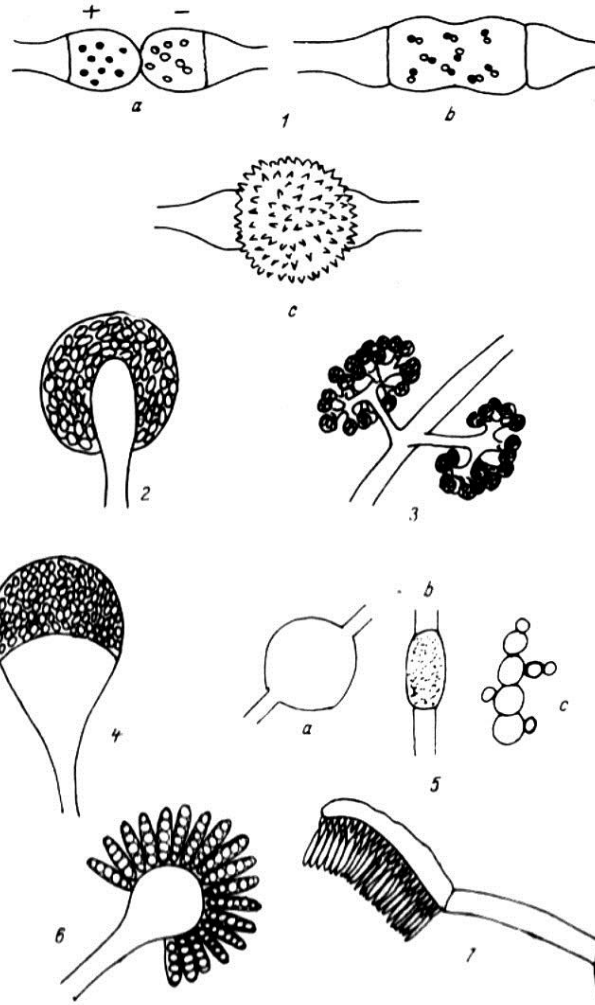
***Mucor*** - sporangiofory jsou ukončeny sporangii bez apofýzy, s kolumelou kulovitou, oválnou nebo hruškovitou.

***Rhizopus*** – sporangiofory se tvoří obvykle ve svazcích a nebývají větvené. Vznikají na výhoncích (stolonech), které tvoří velmi často na pevném podkladu rozvětvené, tmavě hnědé rhizoidy. Kolumela má vyvinutou apofýzu. Po prasknutí sporangiální stěny se kolumela s apofýzou kloboukovitě obrací.

***Rhizomucor*** - sporangiofory bývají větvené. Přítomny stolony a hnědé rhizoidy.

***Absidia*** – sporangiofory vyrůstají ve svazcích na výhoncích s rhizoidy. Kolumela kuželovitá, často má na vrcholu papilu nebo ostřejší výčnělek. Sporangiofor přechází do sporangia širokou apofýzou.

Příloha II Mucorales



Obr. 1. Tvorba zygosporu u Mucorales (orig.)

*a* — setkání konců plus a minus mycelií,  
*b* — zygota, *c* — zygospora

Obr. 2. Mnohosporické sporangium s kolumelou u r. *Mucor* (orig.)

Obr. 3. Část sporangioforu se sporangio-  
lami u rodu *Thamnidium* (podle Zychy)

Obr. 4. Sporangium s apofýzou a kolumelou u rodu *Absidia* (orig.)

Obr. 5. Různé formy vegetativních buněk u Mucorales (orig.)

*a* — obří buňka, *b* — gema, *c* — pučící buňky

Obr. 6. Rozšířený konec sporangioforu s merosporangii (orig.)

Obr. 7. Sporokladium s filidami a s konidii u Mucorales (podle Arxe)

## **12. Nativní preparát:**

**Princip:** mikroskopické morfologické znaky vláknitých hub sledujeme v nativním preparátu. Protože se však jejich vlákna špatně smáčejí a v preparátu často bývají vzduchové bubliny, je lépe použít místo vody 10 až 20% vodný roztok glycerolu, který nevysychá tak rychle. Místo glycerolu lze použít i roztok laktofenolu nebo kyseliny mléčné.

**Materiál:** kultury vláknitých hub

**Pomůcky:** podložní a krycí sklo, preparační jehla, kyselina mléčná

### **Pracovní postup:**

1. Na podložní sklo nanese kapku kyseliny mléčné.
2. Sterilní preparační jehlou přeneseme z kolonie mikromycety malé množství mycelia s fruktifikačními orgány do kapky kyseliny mléčné (nejlépe dvěma preparačními jehlami). U kultur silně sporulujících odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem, aby v preparátu nebylo příliš mnoho konidií. Mycelium neroztíráme, abychom nepoškodili fruktifikační orgány – pouze jehlami uvolníme jednotlivá vlákna do kapaliny.
3. Opatrně přikryjeme krycím sklem (nepřítiskujeme!) a přebytečnou kapalinu odsajeme ze strany filtračním papírem.
4. Preparát bez další úpravy prohlédneme suchým objektivem, nejprve slabým zvětšením (objektiv 10x), postupně pak silnějším zvětšením (objektiv 40x a 100x) u hyalinních mikromycet s fázovým kontrastem

### **Sledujeme:**

- charakter mycelia (šířku vláken, barvu a strukturu mycelia, přepážky (septa) – přítomnost a rozložení, způsob větvení)
- charakter, způsob tvoření (konidiogeneze) a uspořádání fruktifikačních orgánů (např. sporangiofory, konidiofory, sporangia, kolumela, fialidy, konidie, zygospory, askospory aj.)
- přítomnost a charakter jiných útvarů (chlamydospory).

## Mikroskopování

Říše: *FUNGI*

Oddělení: *MUCOROMYCOTA*

Pododdělení: *MUCOROMYCOTINA*

Třída: *MUCOROMYCETES*

Řád: *MUCORALES*

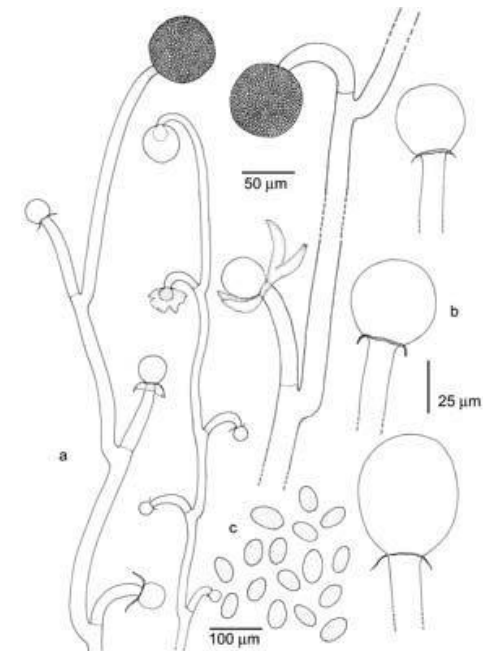
- mnohojaderné **coenocytické** mycelium, přehrádky se tvoří pro oddělení rozmnožovacích orgánů nebo ve starších myceliích
- **sporangia** vznikají na větvených či nevětvených **sporangioforech**, jsou většinou mnohosporová (až 1000 spor), u odvozenějších typů vznikají sporangia s malým počtem spor (až jednosporové - nesprávně označované za "konidii")
- **zygospora** vzniká při pohlavním rozmnožování splynutím dvou různých gametangií



### Rod *Mucor*

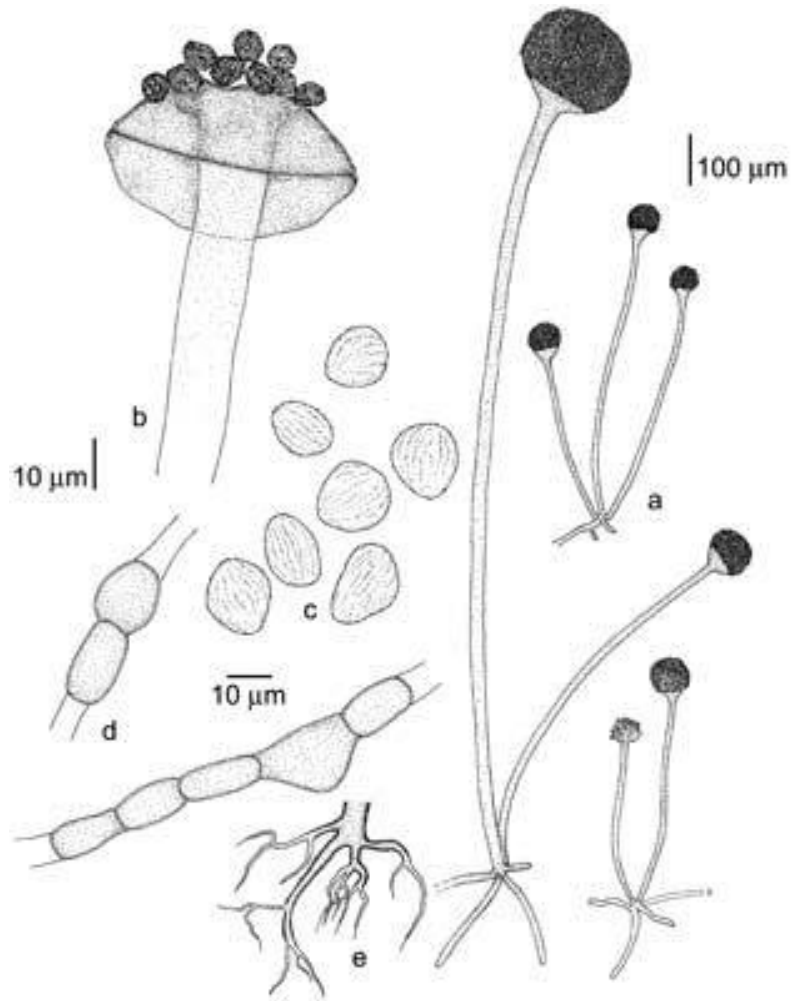
- sporangiofory větvené či nevětvené, bez rhizoidů a stolonů, ukončeny mnohosporovými sporangii bez apofýzy, s kolumelou kulovitou, oválnou nebo hruškovitou

- sympodiálně větvený circinátní sporangiofory
- kulovitá kolumela
- sporangiospory



## Rod *Rhizopus*

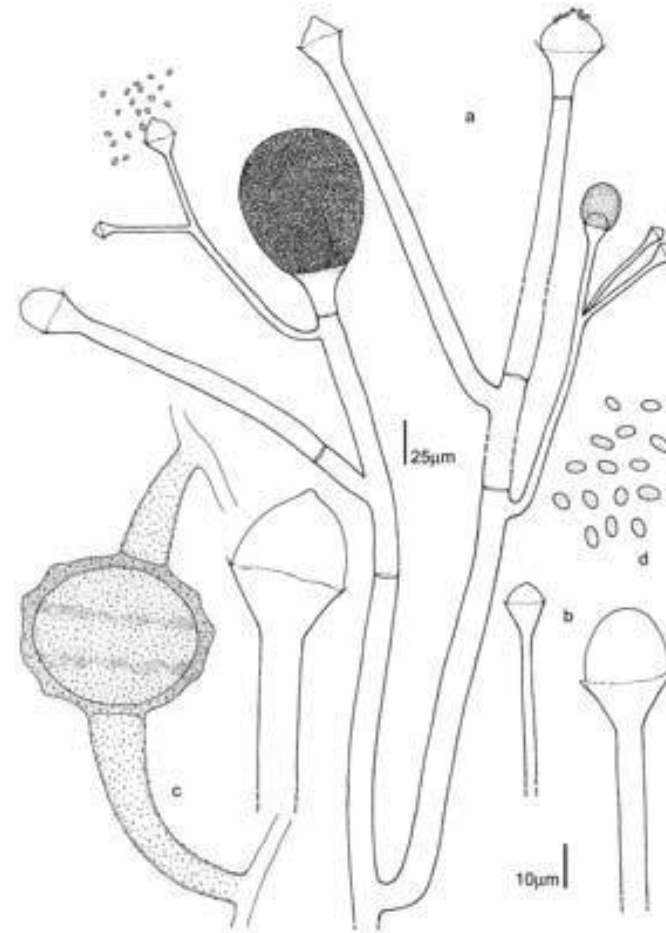
– sporangiofory se tvoří obvykle ve svazcích a nebývají větvené. Vznikají na stolonech (výhoncích), které tvoří velmi často na pevném podkladu rozvětvené, tmavě hnědé rhizoidy. Kolumela má vyvinutou apofýzu (nálevkovité rozšíření sporangioforu pod sporangiem). Po prasknutí sporangiální stěny se kolumela s apofýzou kloboukovitě obrací.



- a. nevětvené sporangiofory s rhizoidy
- b. kolumela s apofýzou
- c. sporangiospory
- d. chlamyospory
- e. rhizoidy

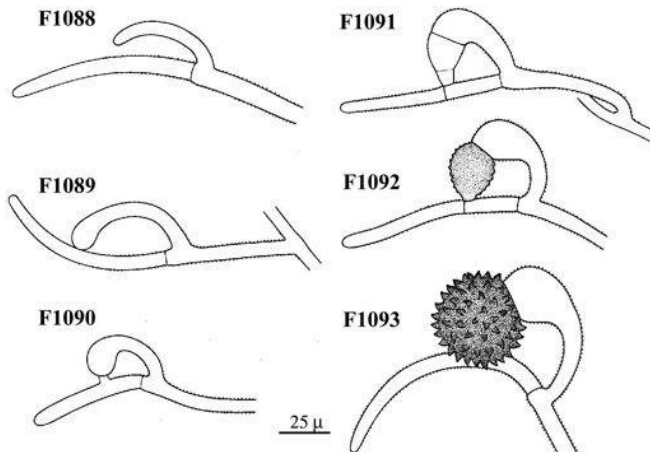
## Rod *Absidia*

- a. větvené sporangiofory
  - b. kolumela kuželovitá s 1 nebo několika výběžky a apofýzou
  - c. obří buňky
  - d. sporangiospory
- rhizoidy a stolony nezřetelné



## Rod *Zygorhynchus* - vznik zygospory

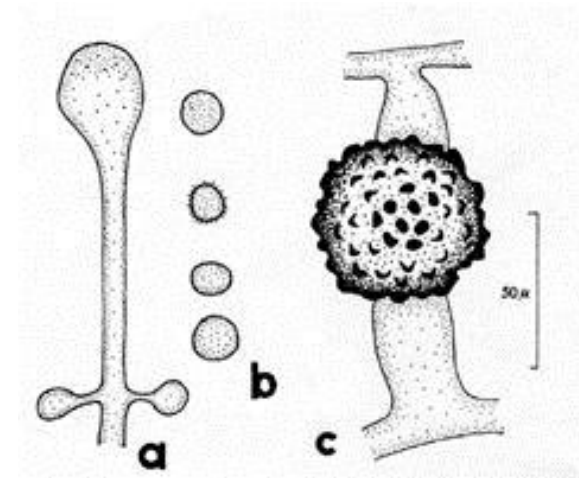
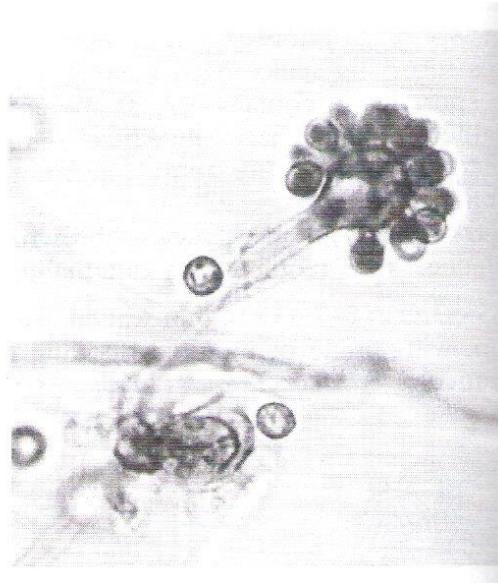
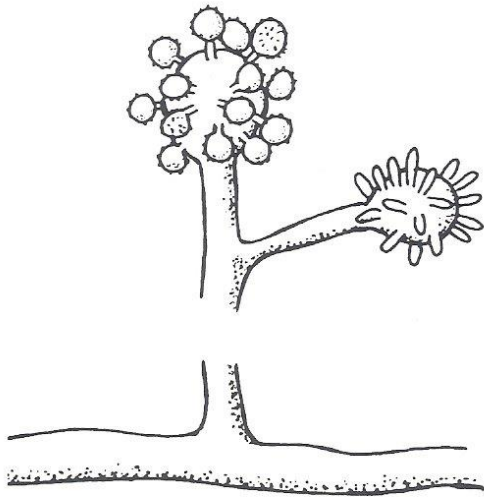
2-655 *Zygorhynchus moelleri*



## Rod *Cunninghamella*

- větvené sporangiofory ukončené jednosporovými sporangii (sporangioley), rhizoidy vyvinuté, stolony chybí

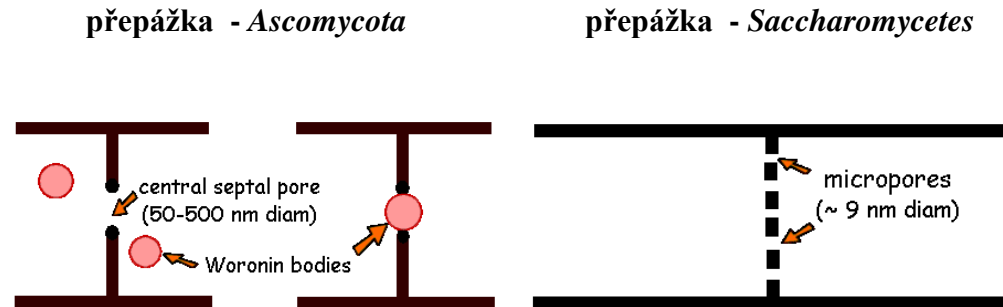
- a. větvený sporangiofor zakončený sporogenními hlavicemi
- b. sporangioley (jednosporová sporangia)
- c. zygospora



## Říše: *FUNGI*

### Oddělení: *ASCOMYCOTA*

- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium nebo pučivé buňky či pseudomycelium
- tvorba sept je centripetální, začíná u stěny hyf a pokračuje ke středu kde ponechá volný pór



**Rozmnožování:** pohlavní i nepohlavní nebo jen nepohlavní

- stádium, kdy houba vytváří nepohlavní **mitospory**, se nazývá stádium **imperfektní (anamorfa)**
- stádium, kdy houba vytváří pohlavní **meiospory**, se nazývá stádium **perfektní (teleomorfa)**

#### Nepohlavní rozmnožování

- nejjednodušším způsobem je fragmentace hyf
- buňky vznikající exogenně na specializovaných hyfách - **konidioforech** nazýváme **konidie**
- buňky, které dávají vznik konidiím nazýváme **konidiogenní buňky**

**Základní typy konidiogeneze (vzniku konidií):**

**1. Thalická:** již předem vytvořené buňky hyf se rozdělí přehrádkami a rozpadnou se na jednotlivé části. K formování definitivního tvaru dochází po oddělení.

**a) Thalicko - arthrická: arthrokonidie**

**b) Holothalická: thalokonidie** (thalokonidiemi jsou v jistém smyslu i **chlamydo-spory** - tlustostěnné přetrvávající buňky vznikající na myceliu)



2. **Blastická**: konidie se formuje dříve než je oddělena přepážkou od konidiogenní buňky

a) **Holoblastická** - účast všech vrstev buněčné stěny

a) synchronní - produkce více konidií na měchýřku

b) sympodiální - proliferace konidiogenní buňky

b) **Enteroblastická** - vnější stěna se protrhne, konidii utváří vnitřní vrstva

a) tretická - vznik **porokonidií**, často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce

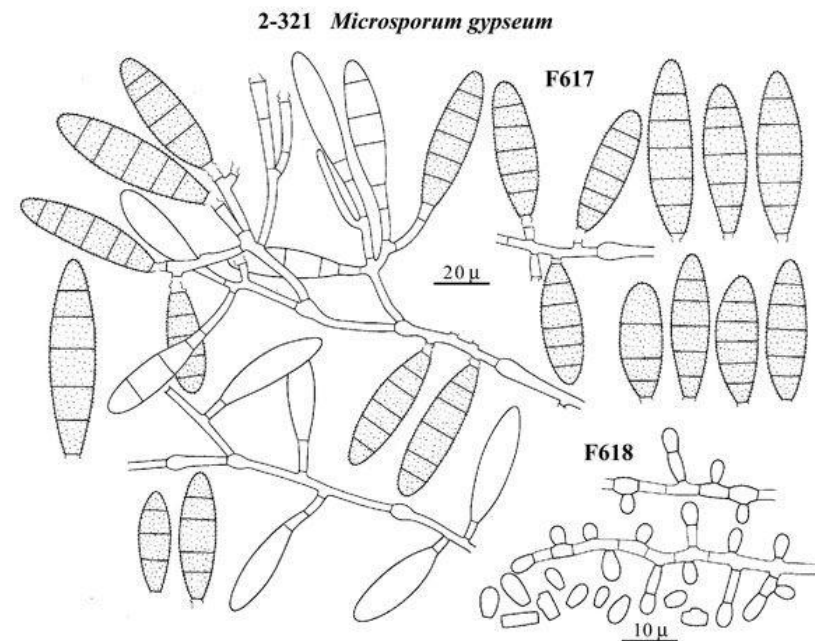
b) fialidická - konidiogenní buňky **fialidy**

c) anelidická - konidiogenní buňky **anelidy** (límeček)

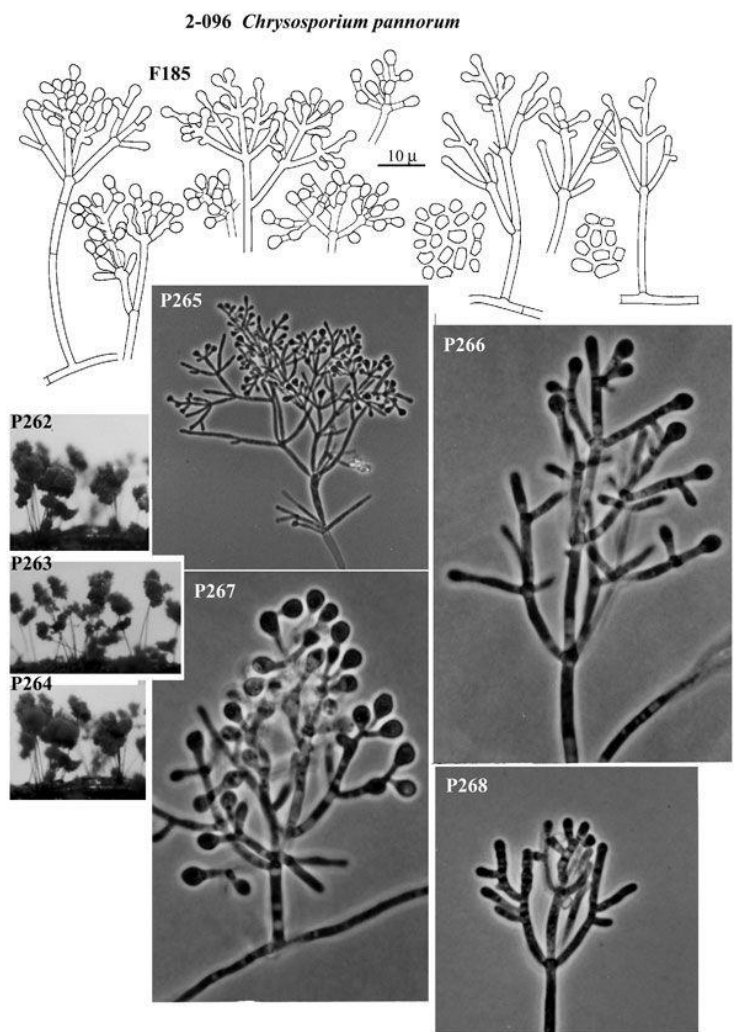
*Geotrichum candidum* – arthrokonidie v rozpadajících se řetězcích



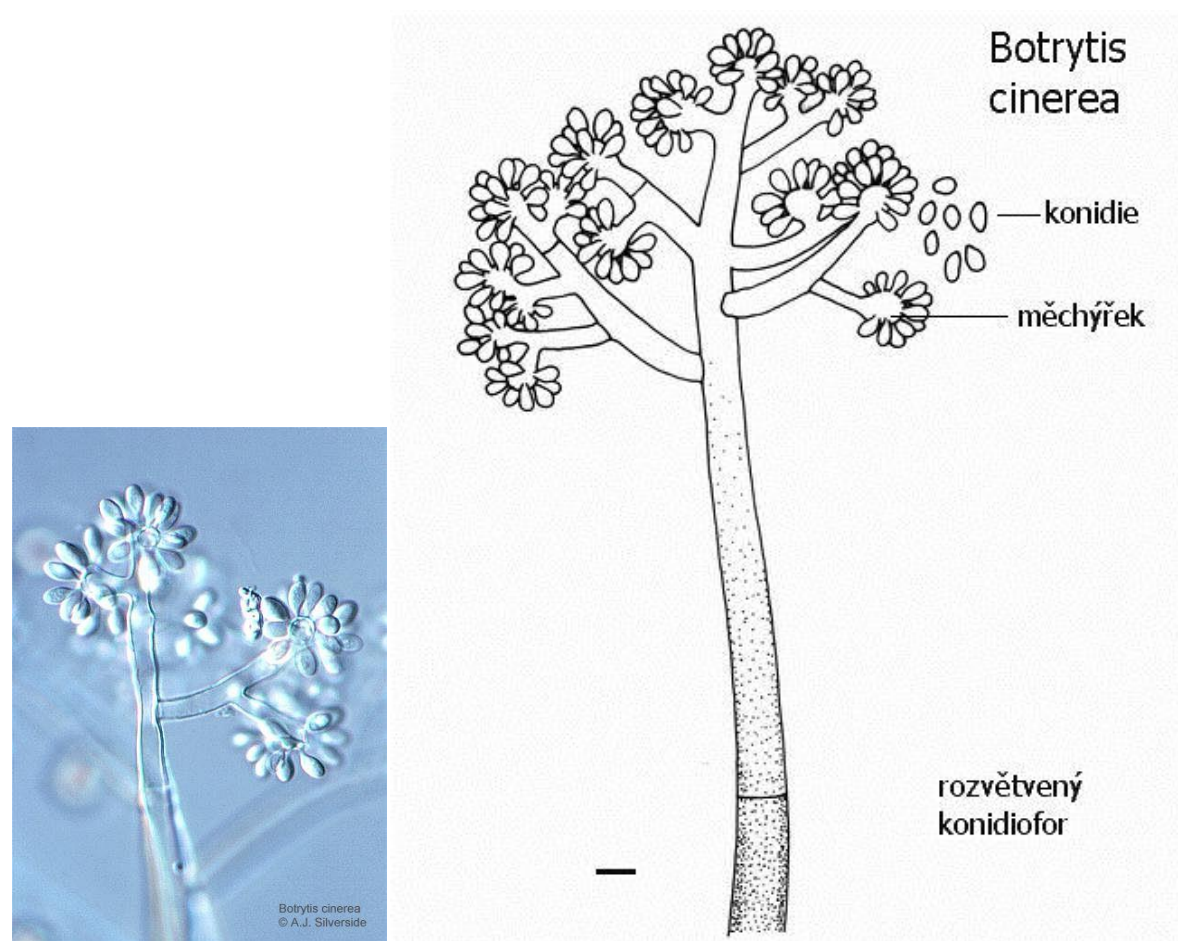
*Microsporium gypseum* – thalokonidie (makrokonidie a mikrokonidie)



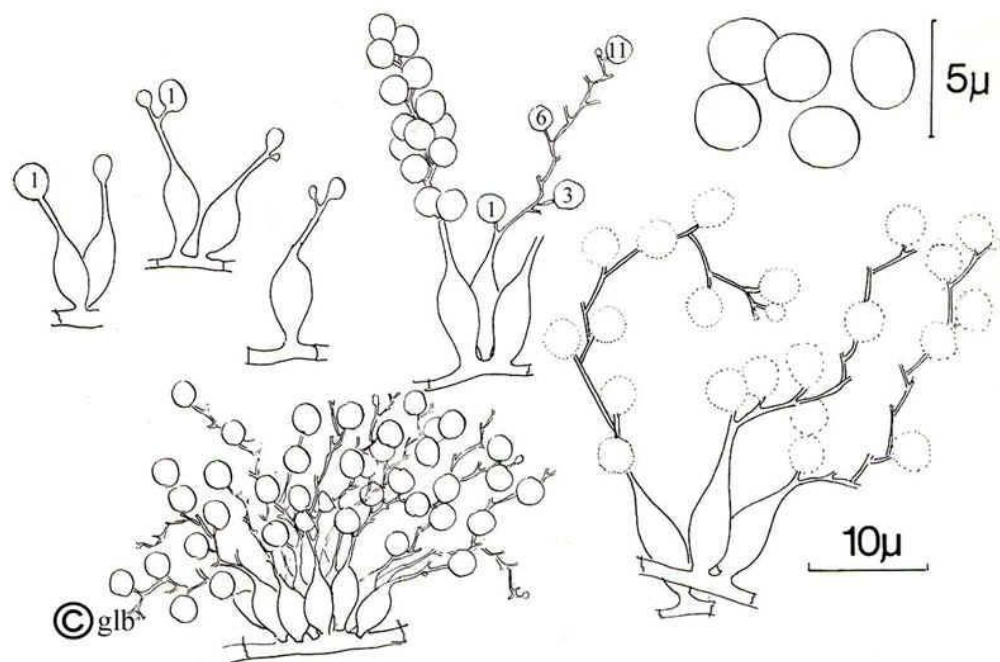
*Geomyces pannorum* – holothalická konidiogeneze



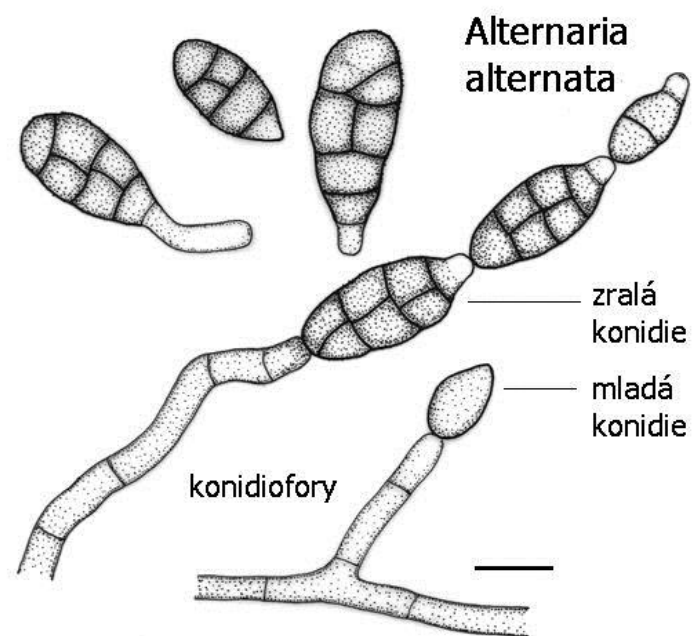
*Botrytis cinerea* – holoblastická, synchronní konidiogeneze



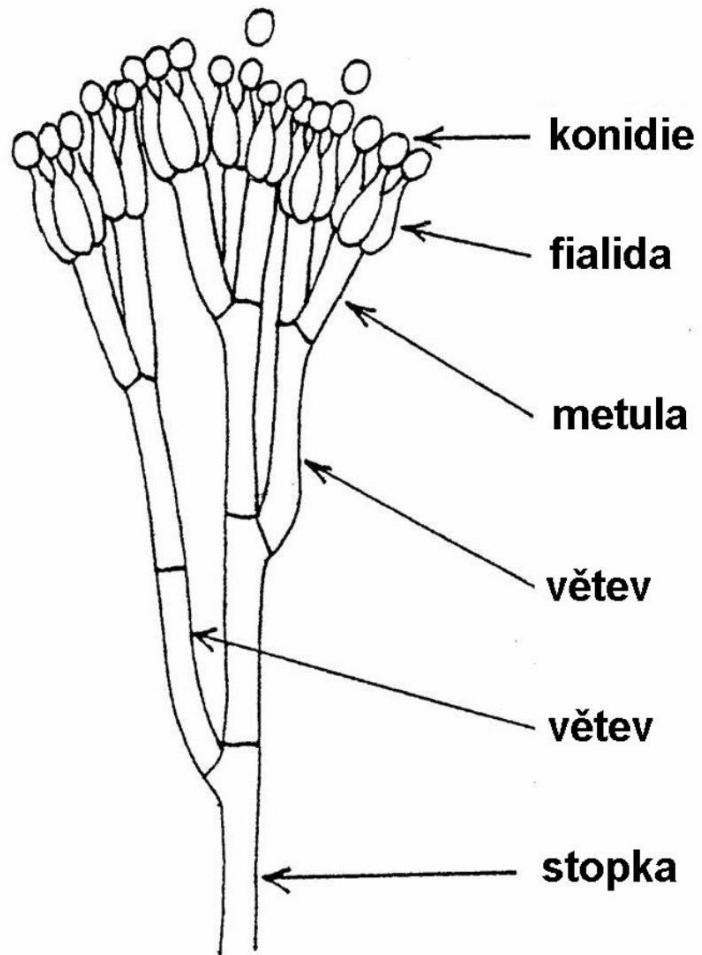
***Beauveria bassiana*** – holoblastická, sympodiální proliferace konidiogenní buňky



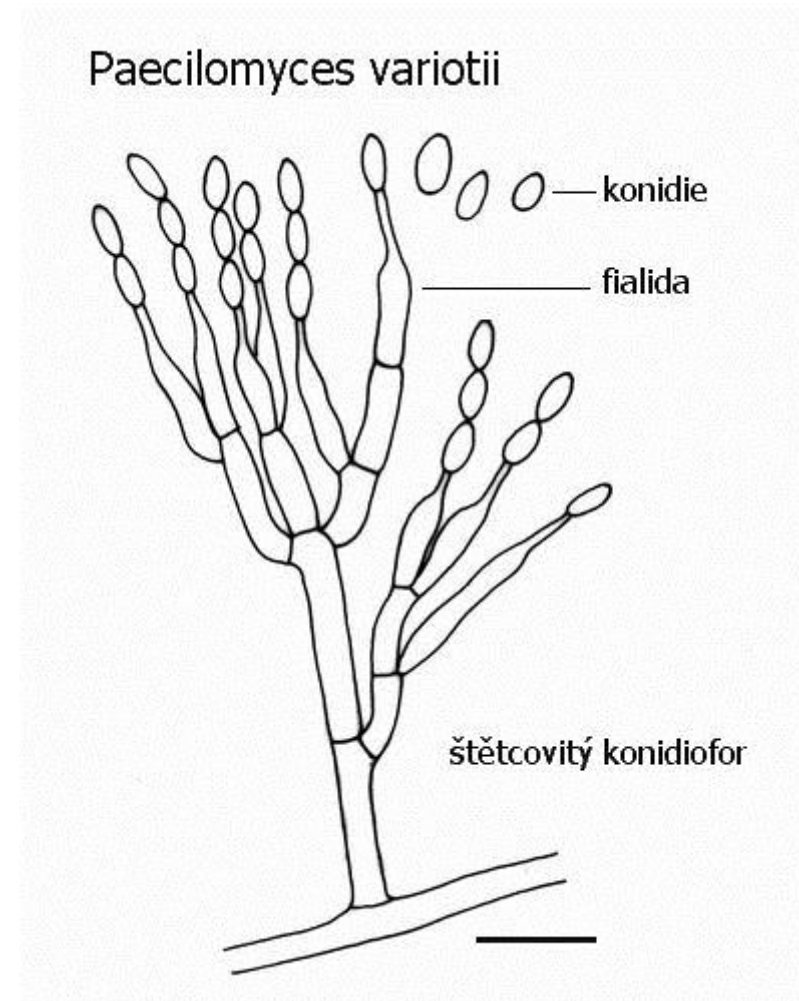
***Alternaria citri*** – enteroblastická, tretická konidiogeneze (porokonidie)



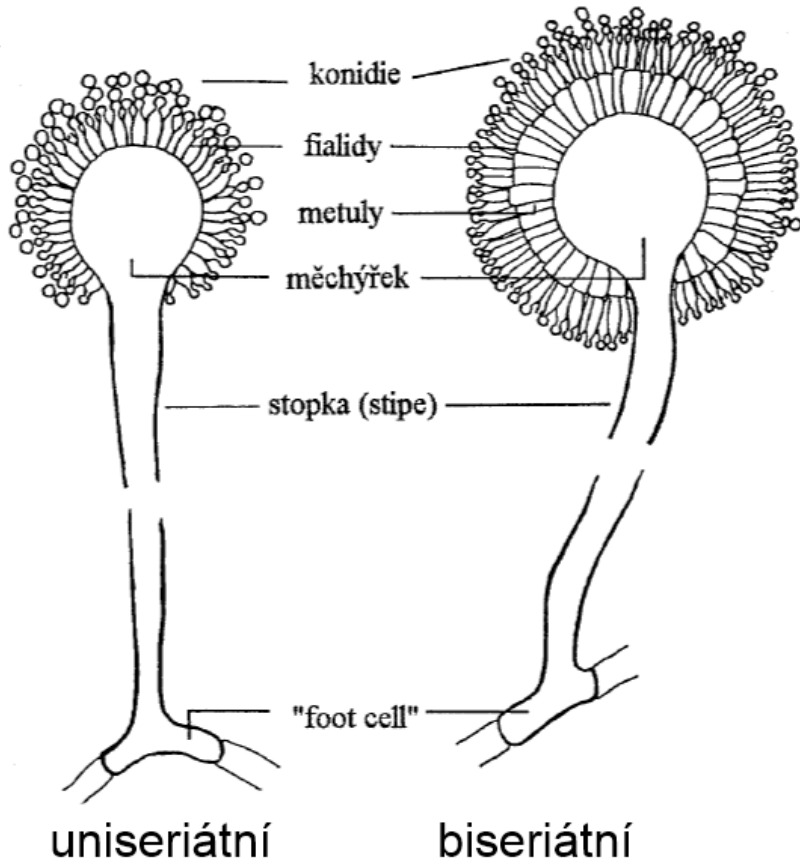
**Rod *Penicillium*** – enteroblastická, fialidická kon.



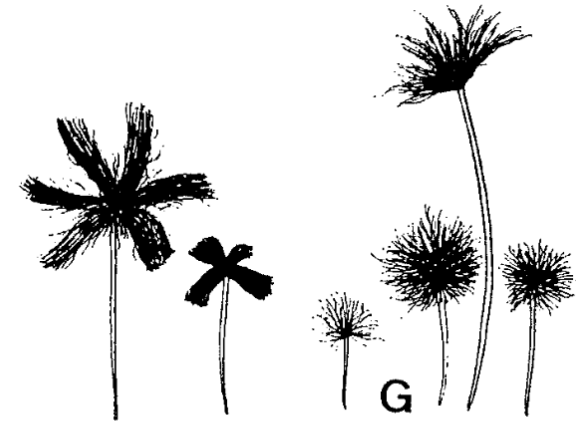
**Rod *Paecilomyces*** – konidiofory méně pravidelně větvené, fialidy protáhlé v dlouhý krček, konidie



Rod *Aspergillus* - enteroblastická, fialidická kon



2 typy konidioforů



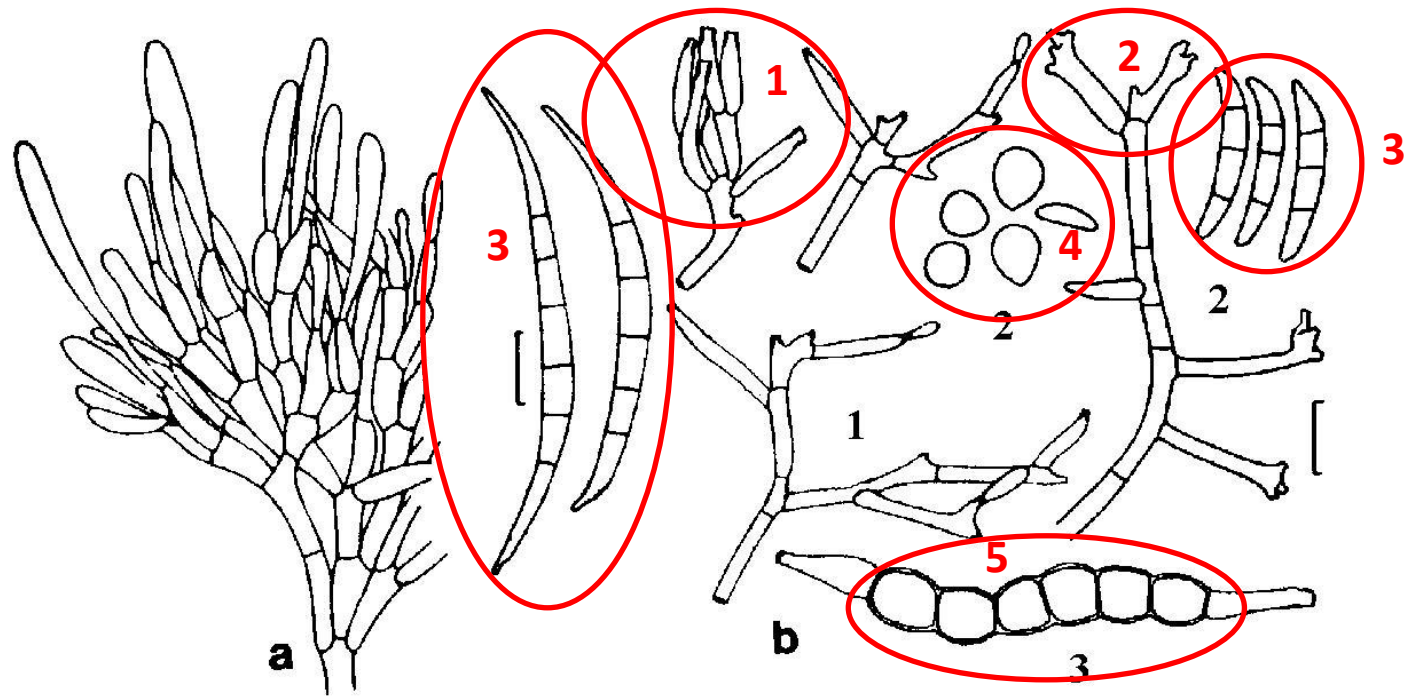
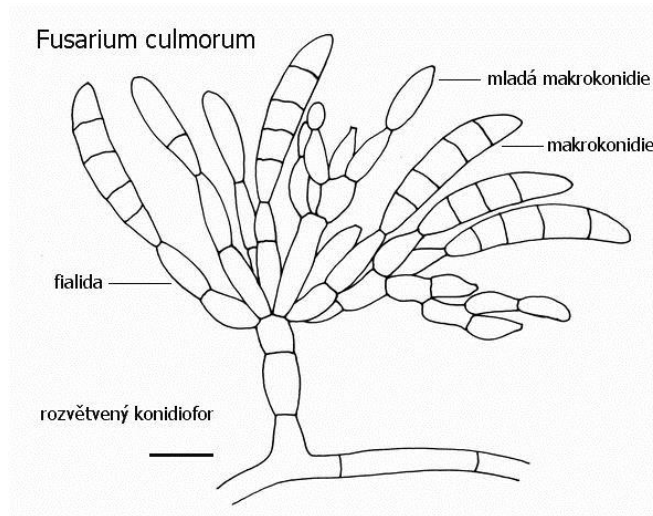
konidiální hlavice paprscité



konidiální hlavice sloupcovité

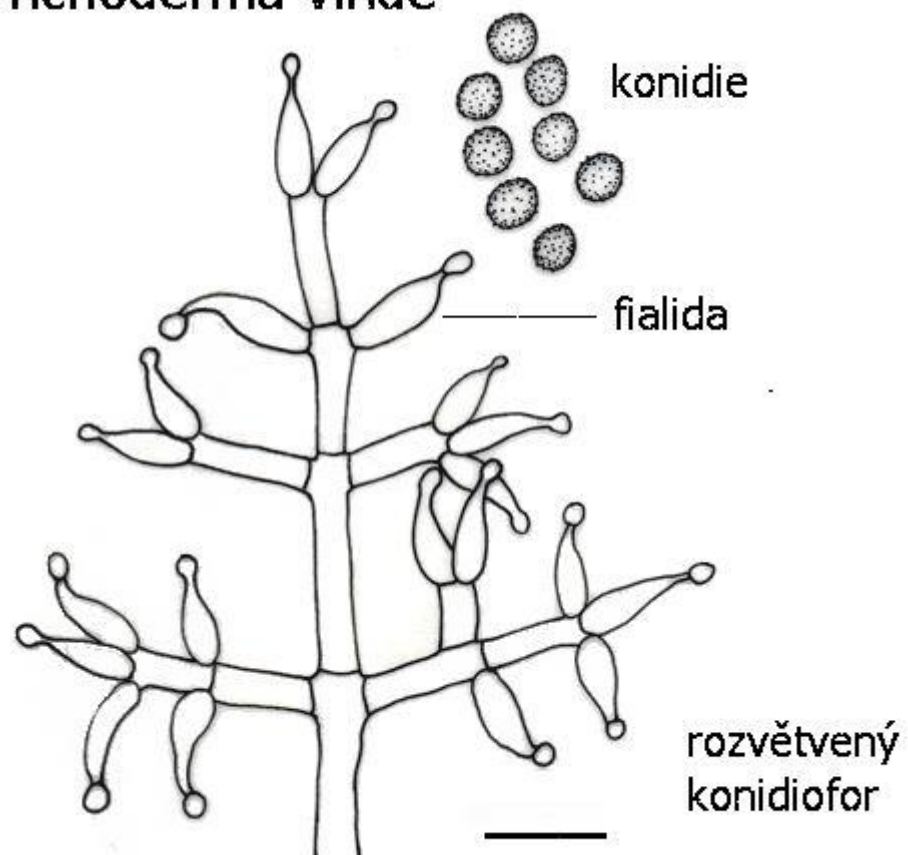
**Rod *Fusarium*** - enteroblastická, fialidická kon

1. monofialidy
2. polyfialidy
3. makrokonidie
4. mikrokonidie
5. chlamydospory
6. sporochium (palisáda konidioforů v ložisku na povrchu substrátu)

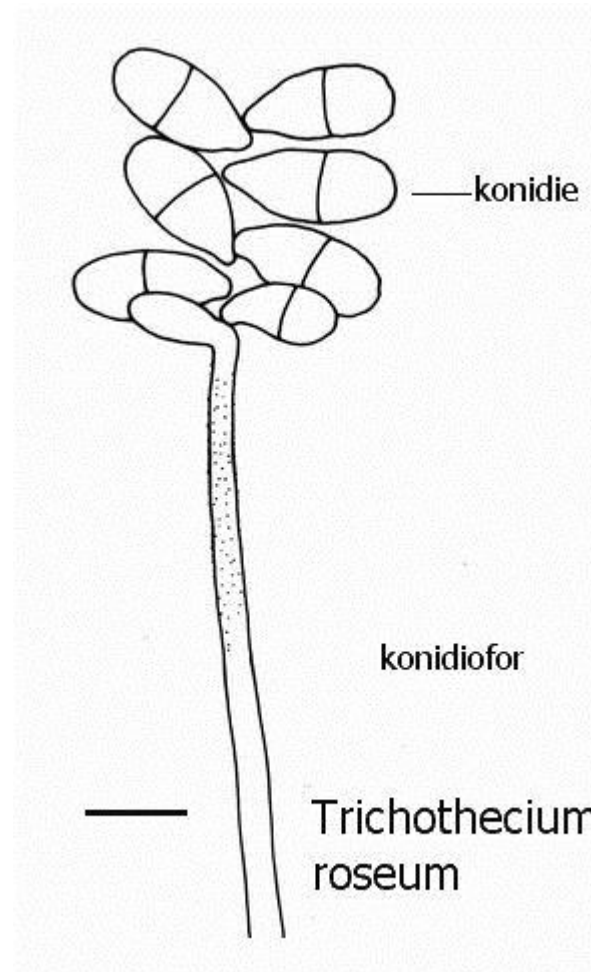


Rod *Trichoderma* - enteroblastická, fialidická kon.

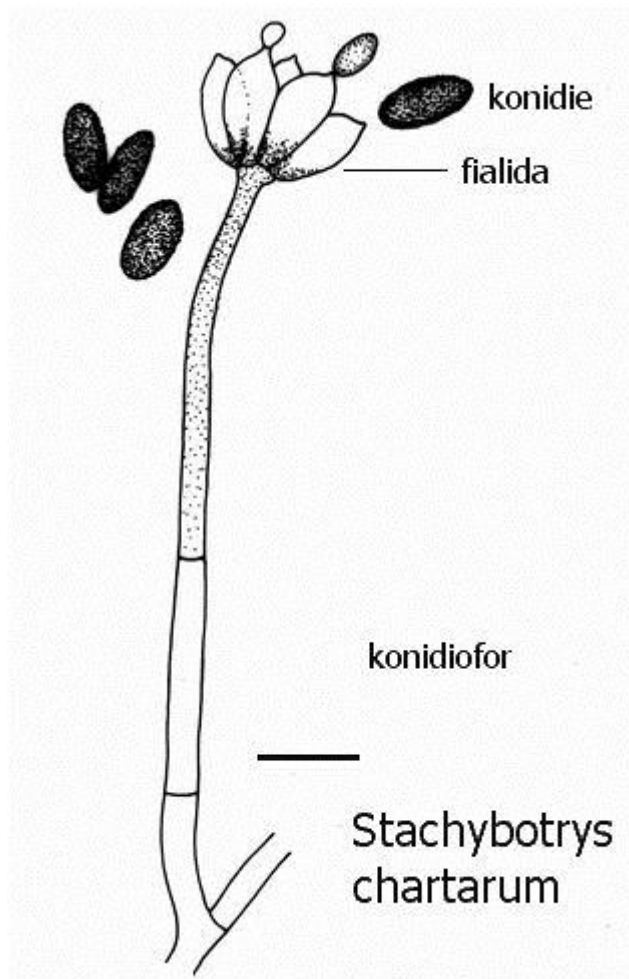
### Trichoderma viride



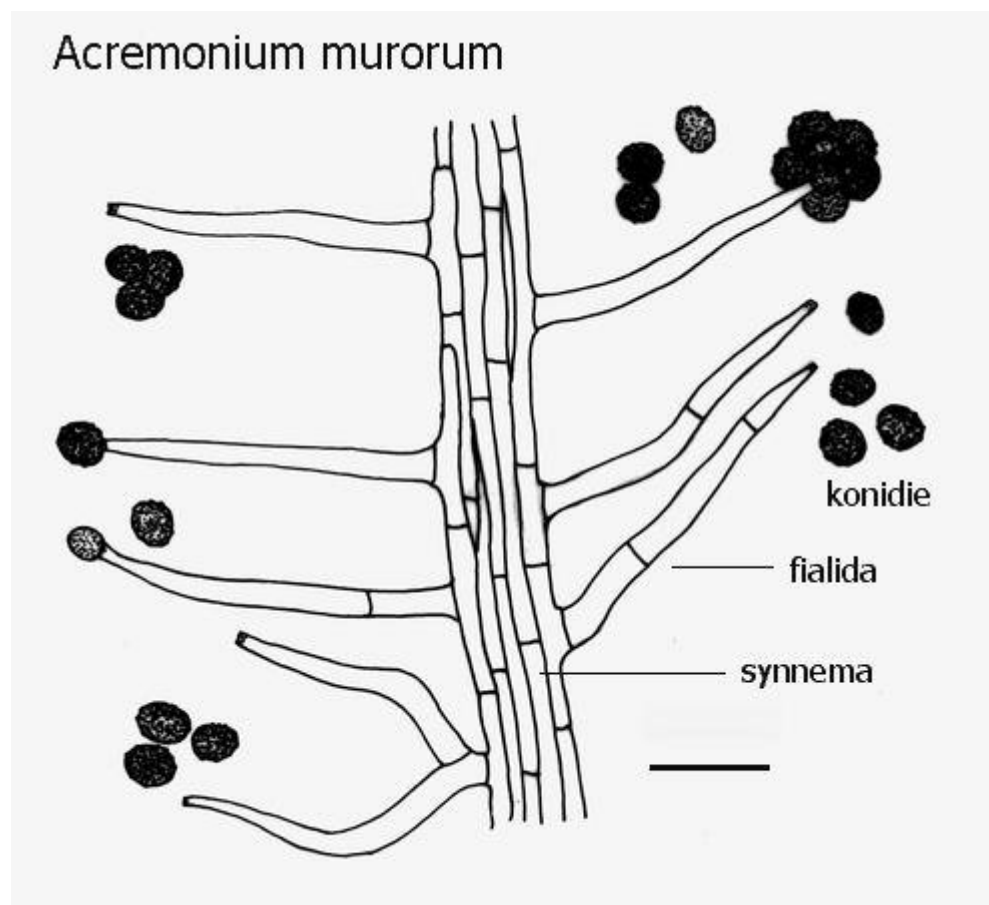
Rod *Trichothecium* - blastická, retrogresivní



**Rod *Stachybotrys*** - enteroblastická, fialidická kon.

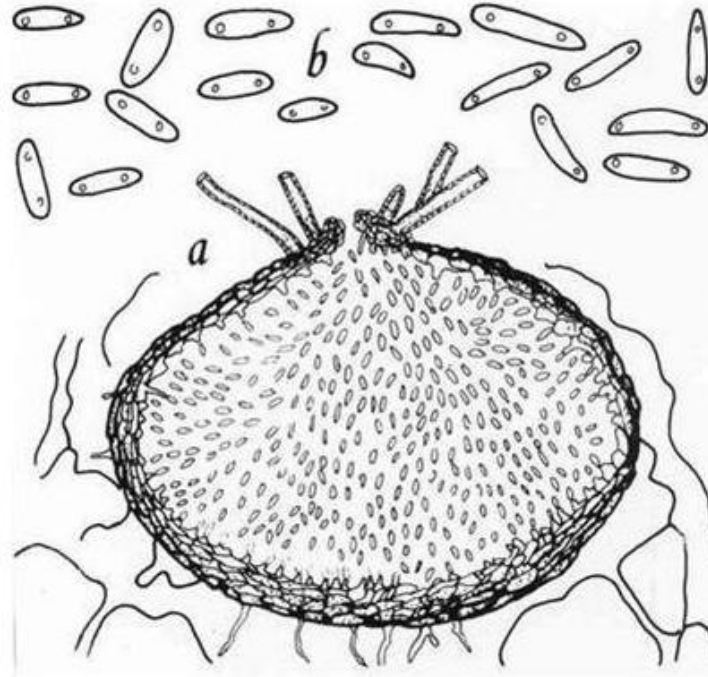
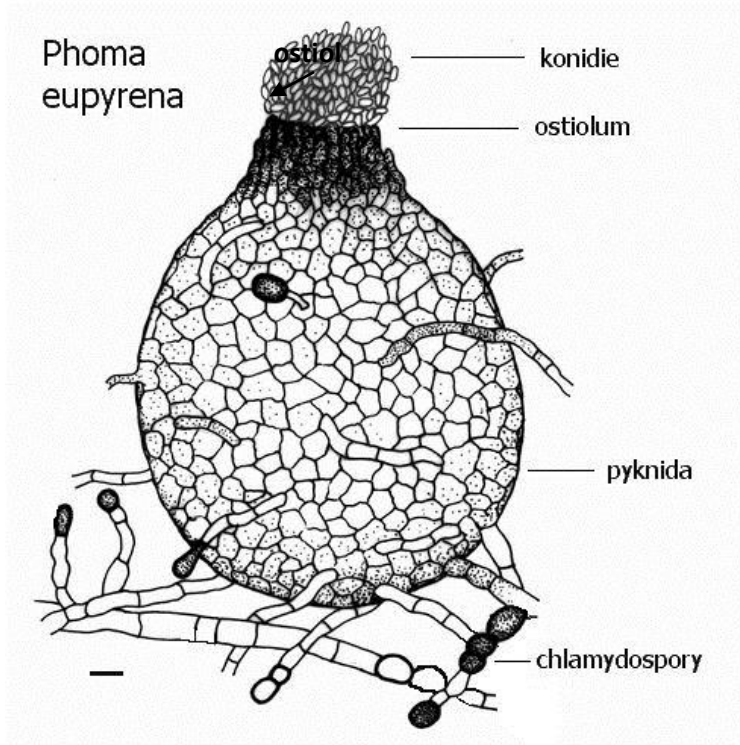


**Rod *Acremonium*** - enteroblastická, fialidická kon., tvorba synnemat, fialidy většinou jednotlivé, k vrcholu se zužující (jehlicovité), septum na bázi, konidie jednobuněčné, hladké, hyalinní v řetězcích či hlavicích.





**Phoma lingam** - pyknidy (kulovitý nebo lahvicovitý útvar s ostiolem, uvnitř vystlaný konidiofory, na nichž se tvoří konidie) - nepohlavní rozmnožování



### Pohlavní rozmnožování

- při pohlavním procesu vznikají **plodnice (askomata)** => v plodnicích pak dochází ke karyogamii v koncových buňkách tzv. **askogenních hyfách** - z nich vznikají vřečka

- spory (**askospory**) vznikají ve **vřecku** (latinsky **ascus**, množné číslo **asci**) obvykle v počtu 8 v jednom vřecku

## Typy plodnic:

### 1) Askohymeniální typ

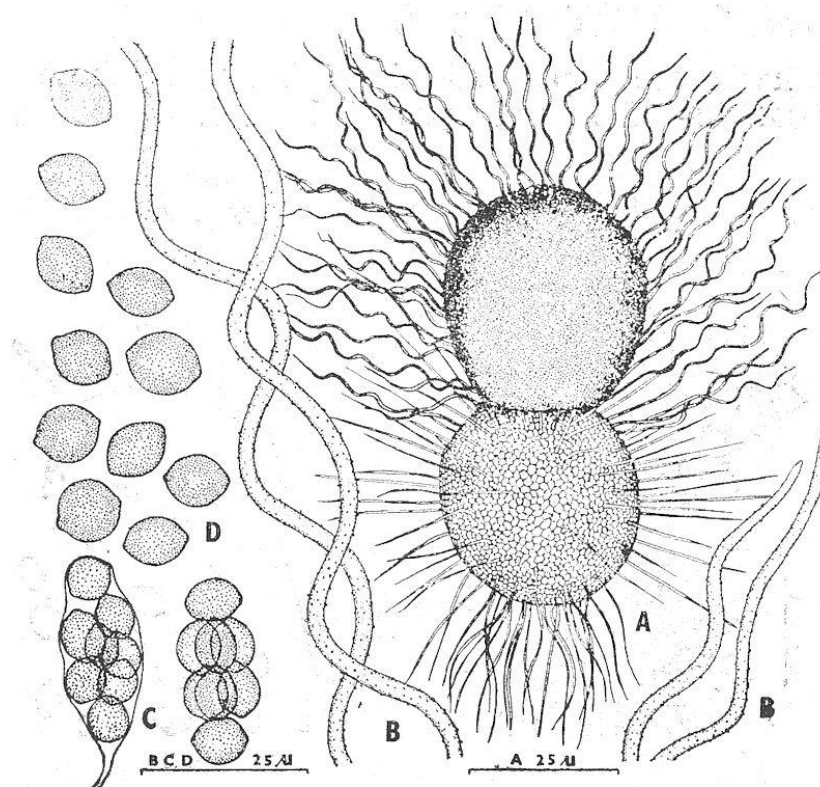
- **kleistothecium** je uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřecka nejsou nijak uspořádána (např. teleomorfa rodu *Aspergillus*)
- **perithecium** je kulovitá nebo protáhlá plodnice s úzkým ústím (ostiolem) vystlaným perifýzami, vřecka jsou uspořádána v hymeniu, mezi nimi se tvoří sterilní hyfová zakončení – parafýzy (např. *Chaetomium*)
- **apothecium** je miskovitá plodnice; vřecka jsou uspořádána v hymeniu na povrchu plodnice, parafýzy vytvořeny

### 2) Askolokulární typ

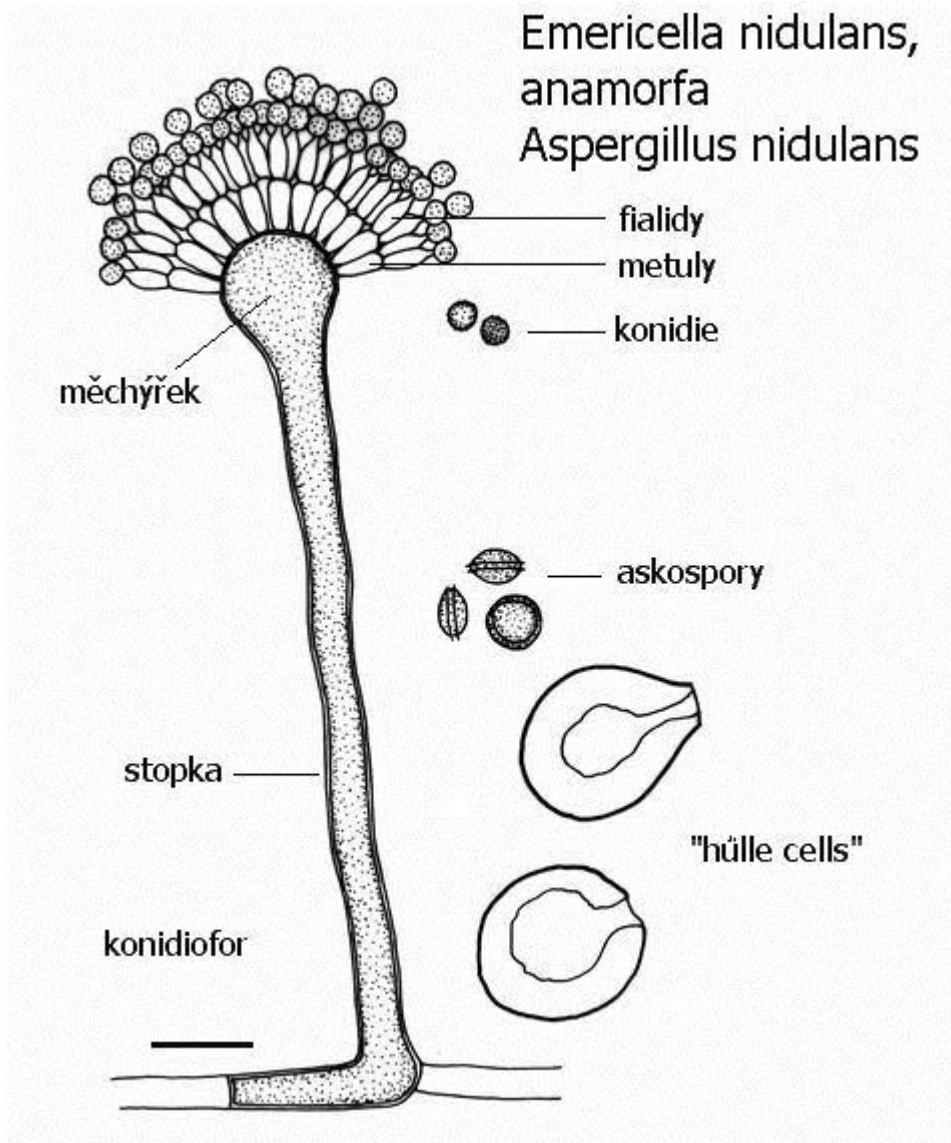
- **askostroma** - v pseudoparenchymatickém útvaru se diferencují pohlavní orgány, askogenní hyfy a vřecka vrůstají do sekundárně vytvořené lyzogenní dutiny (lokulu)

### *Chaetomium globosum*

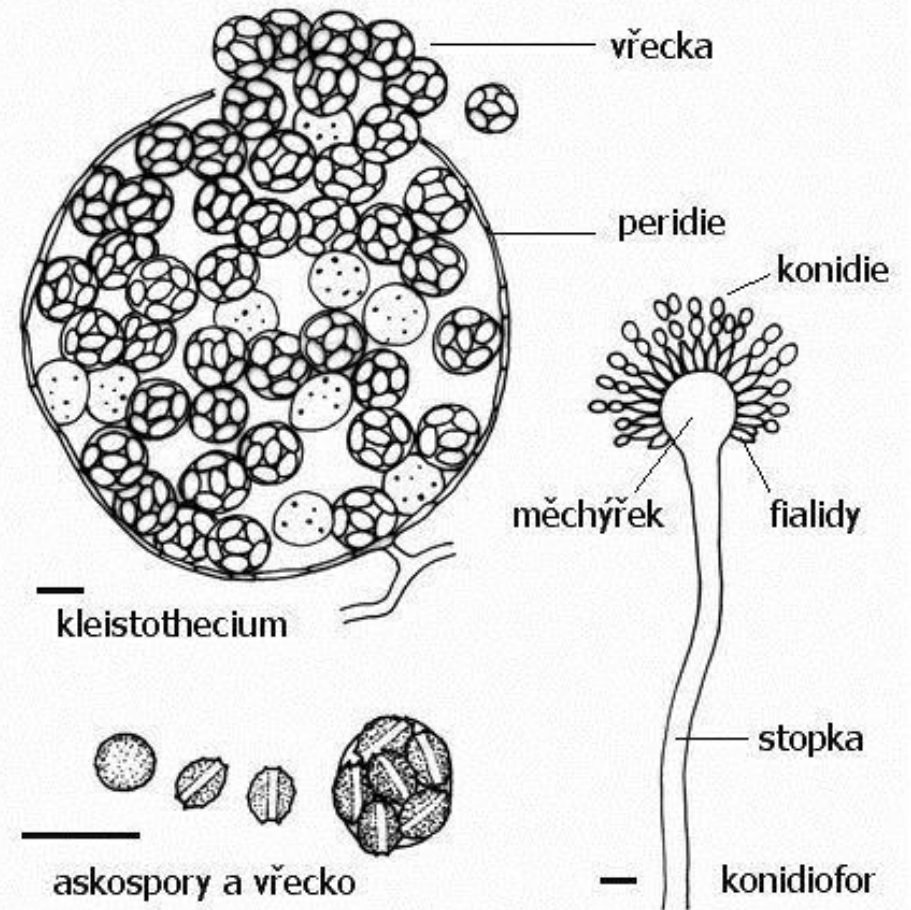
- A - perithecium
- B - zvlněná nětvená vlákna (trichomy)
- C - vřecko (ascus)
- D - askospory



Aspergillus nidulans – tvorba plodnic typu kleistothecium



*Eurotium amstelodami*  
anamorfa *Aspergillus vitis*



### **Použitá literatura:**

1. Váňa, J.: Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 1996.
2. MycoBank, <http://www.mycobank.org/>
3. De Hoog G.S.: et al.: Atlas of clinical fungi. Utrecht, Reus, 2000.
4. P.W. Crous, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, R.A. Samson. CBS Laboratory Manual Series 1, Fungal Biodiversity. CBS, Utrecht, 2009
5. [https://botany.natur.cuni.cz/sites/default/files/atlas-mikroskop-saprofytnich-hub/3.03\\_eurotiales-aspergillus.pdf](https://botany.natur.cuni.cz/sites/default/files/atlas-mikroskop-saprofytnich-hub/3.03_eurotiales-aspergillus.pdf)
6. <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/mikr.htm>

## **MEDIA**

### **SAB - Sabouraudův agar s glukózou**

glukóza 40 g/l  
pepton 10 g/l  
agar 15 g/l  
pH 6,9

### **MA 2% - agar se sladovým extraktem**

Malt extrakt 20,0 g/l  
agar 20,0 g/l  
pH 5.6

### **MA 0,5 % - agar se sladovým extraktem**

Malt extrakt 5,0 g/l  
agar 20,0 g/l  
pH 5.6

### **Vodní agar**

destilovaná voda 1000 ml  
agar 20,0 g/l

### **Půdní agar**

půdní extrakt 1000 ml  
agar 20,0 g/l

Půdní extrakt - 500 g půdy vařit 1 hodinu v 1200 ml vody, přefiltrovat přes filtrační papír a doplnit na 1000 ml. /pH 6-6,5/ pH 6,6 - 6,8.

### **OA- Ovesný Agar**

ovesné vločky 30 g/l  
agar 20 g/l

Ovesné vločky vařit pozvolna 2 hodiny v 1 l vody. Přefiltrovat přes gázu, doplnit do 1 litru. Přidat agar.

### **SEA – Půdní agar s glukosou a bengálskou červení**

půdní extrakt	1000 ml
glukóza	10,0g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0g/l
NaNO <sub>3</sub>	1,0g/l
agar	20 g/l
bengálská červeň	0,07 g/l

Půdní extrakt - 500 g půdy vařit 1 hodinu v 1200 ml vody, přefiltrovat přes filtrační papír a doplnit na 1000 ml. /pH 6-6,5/ pH 6,6 - 6,8.

### **DRBC (Agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem)**

pepton	5,0g/l
glukóza	10,0g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,5g/l
dichloran	0,002g/l
bengálská červeň	0,025g/l
agar	15,0g/l
pH 5.6 ± 0.2	

### **Media pro identifikace rodu *Aspergillus***

#### **CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem) Pitt, 1973**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
Czapkův koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	30 g/l
agar	15 g/l
pH 6 - 6,5	

\*Czapkùv koncentrát:

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

**MEA (Agar se sladovým extraktem) Blakeslee, 1915**

malt extrakt	20 g/l
pepton	1 g/l
glukóza	20g/l
agar	20 g/l

pH 5 - 5,5

**CY20S (Czapkùv agar s kvasničným extraktem a 20% sacharózy) Pitt et Hocking, 1985**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
Czapkùv koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	200 g/l
agar	20 g/l

pH 5,2

**Media pro identifikace rodu *Penicillium***

**MEA (Agar se sladovým extraktem) Raper et Thom, 1949**

malt extrakt	30 g/l
pepton	1 g/l
glukóza	20g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g/l
CuSO <sub>4</sub>	0,005 g/l
agar	20 g/l

pH 5 - 5,5

**CYA (Czapkův agar s kvasničním extraktem) Pitt, 1979**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
Czapkův koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	30 g/l
agar	15 g/l
pH	6,3 ± 0,2

**\*Czapkův koncentrát:**

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

**CYAS (Czapkův agar s 5% NaCl)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
NaCl	50g/l
Czapkův koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	30 g/l
agar	15 g/l
pH	6,3 ± 0,2

**YEA (Agar s kvasničním extraktem a sacharózou) Frisvad, 1989**

kvasniční extrakt	20 g/l
sacharóza	150 g/l
agar	20 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g/l
CuSO <sub>4</sub>	0,005 g/l



### **CREA (Kreatinový agar se sacharózou) Frisvad, 1985;1993**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,3 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
KCl	0,5 g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,01 g/l
CuSO <sub>4</sub>	0,005 g/l
kreatin	3 g/l
sacharóza	30 g/l
bromkresolový purpur	0,05 g/l
agar	15 g/l
pH 8,0 ± 0,2	

### **G25N (Glycerol nitrate agar) Pitt, 1973**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 g
Czapkův koncentrát*	7,5 ml
kvasniční extrakt	3,7 g
glycerol	250 g
agar	12 g
destilovaná voda	750 ml
pH 6,3 ± 0,2	

### **Ehrlichovo činidlo, Lund 1995 – pro testování přítomnosti mykotoxinů**

4-dimethylamino- benzaldehyd	2 g
ethanol	85 ml
10 N HCl	15 ml

4-dimethylaminobenzaldehyd přidat do ethanolu, poté přidat HCl.

### Media pro identifikace rodu *Fusarium*

#### **PDA (Bramboro-dextrózový agar) Burgess, Liddell et Summerell, 1988**

dextróza	20 g/l
brambory	250 g/l
agar	20 g/l

Oloupané brambory nakrájet na kostky a přilít 1 l vody, vařit 1 hodinu.

Rozmixovat, přefiltrovat, doplnit vyvařenou vodu na 1000ml.

#### **PSA (Bramboro-sacharózový agar) Burgess, Liddell et Summerell, 1988**

sacharóza	20 g/l
brambory	300 g/l
agar	15 g/l

Oloupané brambory nakrájet na kostky a přilít 1 l vody, vařit 1 hodinu.

Rozmixovat, přefiltrovat, doplnit vyvařenou vodu na 1000ml.

#### **SNA (Syntetické živné médium) Gerlach et Nirenberg, 1982**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
KNO <sub>3</sub>	1,0 g/l
KCl	0,5 g/l
sacharóza	0,2 g/l
glukóza	0,2 g/l
agar	15 g/l

Po ztuhnutí média v Petriho miskách položit na povrch agaru sterilní filtrační papír (cca 1 cm<sup>2</sup>).

#### **Stonek lupinu (Lupinus polyphyllus, vlčí bob mnoholistý)**

Zelené stonky lupinu se rozdělí na několik cm dlouhé části a vysterilizují v erlence s vodou. Sterilní kousky se přidají k ještě tekutému agarovému médiu v Petriho misce.