

DATUM:

JMÉNO:

TÉMA: **Kultury nižších rostlin (kultivace dřevokazných hub)**

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 PřF 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 nasycený pro rychlejší růst mycelia 3% sladových roztokem.

MATERIÁL: kultura mycelia dřevokazných hub *Pleurotus ostreatus* a *Lentinus tigrinus*
MÉDIUM 3% agar s přidavkem 3% sladového výtažku našikmený ve zkumavkách a v Petriho miskách, 3% sladový roztok v EM a varných baňkách.

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 flowboxu
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 našikmeného ve zkumavce.
5. Opatrně ožehni hrdlo otevřené zkumavky, uzavři a popiš.
6. Kultivuj čistou kulturu mycelia na šikmém agar-sladu (**tma, 4°C**), přeočkování stačí provádět 1x ročně.

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 flowboxu
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 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 roztrepej prudkými pohyby baňky tak, aby došlo pohybem skleněných perel 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 vřetena palic kukuřice. 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. Carroad P.A., Wilke C.R.: Cell growth and catecholase production for *Polyporus versicolor* in submerged culture. – Appl. Environ. Microbiol. 1977, 33(4): 836-839.
3. Jennison M.W., Richberg C.G., Krikszens A.E.: Physiology of Wood-rotting Basidiomycetes: II. Nutritive Composition of Mycelium Grown in Submerged Culture. – Appl. Microbiol. 1957, 5(2): 87-95.
4. Scheffer T.C.: Relation of temperature and time to carbon dioxide production and growth in continuously aerated malt-agar cultures of *Polystictus versicolor*. - Plant Physiol. 1936, 11(3): 535-564.