

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Bakalářská práce



Sekundární metabolity basidiomycetů
(se zaměřením na rod *Armillaria*)

Secondary metabolites of basidiomycetes
(focused on the *Armillaria* genus)

Tomáš Větrovský

vedoucí práce
RNDr. Jiří Gabriel, DrSc.

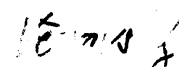
Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Gabriela, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

6.6.2007

Podpis:



Seznam použitých zkratk:

DMAPP - dimethylallyl difosfát

DMATS - dimethylallyl syntetáza

LSD - diethylamid kyseliny lysergové

CoA - koenzym A

PKS - polyketidová syntetáza

DNA - deoxyribonukleová kyselina

rDNA - ribosomální deoxyribonukleová kyselina

rRNA - ribosomální ribonukleová kyselina

PCR - polymerázová řetězová reakce

MeOH - metanol

BuOH - butanol

Seznam latinských a českých názvů hub:

- Agaricum officinale* - verpáník lékařský
Agaricus bisporus - žampion dvouvýtrusý
Amanita muscaria - muchomůrka červená
Armillaria borealis - václavka severní
Armillaria cepistipes - václavka drobná
Armillaria gallica - václavka hlízovitá
Armillaria mellea - václavka obecná
Armillaria novae-zelandiae - václavka novozélandská
Armillaria ostoyae - václavka smrková
Armillaria tabescens - václavka bezprstenná
Claviceps purpurea - paličkovice nachová
Collybia tuberosa - penízovka hlízkatá
Flammulina velutipes - penízovka sametonohá
Galerina paludosa - čepičatka močálová
Hirneola auricula-judae - boltcovitka bezová, syn. Jidášovo ucho
Langermannia gigantea - vatovec obrovský, syn. pýchavka obrovská
Lentinus edodes - houževnatec jedlý („šii-take“)
Lyophyllum palustre - penízovka rašeliníková
Oudemansiella mucida - slizečka slizká, syn. slizečka porcelánová
Piptoporus betulinus - březovník obecný
Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná
Psilocybe mexicana - lysohlávka mexická
Serpula lacrymans - dřevomorka domácí
Trametes versicolor - outkovka pestrá

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část	7
2.1. Cíl	7
2.2. Charakteristika basidiomycetů	7
2.2.1. Zařazení a obecná charakteristika	7
2.2.2. Životní cyklus	8
2.2.3. Ekologický a hospodářský význam basidiomycetů ..	10
2.3. Sekundární metabolismus hub	11
2.3.1. Hlavní dráhy sekundárního metabolismu hub	12
2.3.1.1. Šikimátová dráha	12
2.3.1.2. Mevalonátová dráha	14
2.3.1.3. Acetát-malonátová dráha (polyketidy)	15
2.3.1.4. Deriváty produktů primárního metabolismu ..	16
2.4. Charakteristika rodu <i>Armillaria</i>	16
2.4.1. Zařazení a obecná charakteristika	16
2.4.2. Význam	18
2.5. Sekundární metabolity rodu <i>Armillaria</i>	20
3. Experimentální část	31
3.1. Cíl	31
3.2. Materiál	31
3.2.1. Použité kmeny.....	31
3.2.2. Použité chemikálie	32
3.3. Metody	32
3.3.1. Stacionární kultivace na pevné půdě	32
3.3.2. Submersní kultivace v tekuté půdě	33
3.3.3. Tenkovrstvá chromatografie	35
3.4. Výsledky a diskuze	36
4. Závěr	37
5. Seznam použité literatury	38

1. Úvod

Sekundární metabolity tvoří významnou skupinu organických látek produkovaných hlavně rostlinami, bakteriemi a houbami. Tyto látky nacházejí uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti, zvláště pak v medicíně. Do současnosti bylo izolováno mnoho látek, které se dočkaly masového využití hlavně ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, a to zejména z řady zástupců říše hub. Především jde o třídu ascomycetů (vřeckovýtrusných hub), z nichž jde např. o rody *Penicillium* a *Aspergillus*.

U mnoha zástupců basidiomycetů (stopkovýtrusých hub) bylo také nalezeno velké množství sekundárních metabolitů se specifickou biologickou aktivitou, a to především u hub využívaných v oblasti lidové medicíny (např. *Agaricum officinale*, *Flammulina velutipes*). Proto mohou být mnohé z těchto látek využity jako základ nových účinných léků.

V mnohých případech jsou sekundární metabolity rodově, nebo druhově specifické. To umožňuje jejich využití v oblasti klasifikace, popř. identifikace, určitého organismu či skupiny organismů - můžeme je tedy v menší či větší míře použít i k taxonomii zástupců říše hub.

Studium sekundárních metabolitů hub může přinášet ale i další četné poznatky. Sekundární metabolity nejsou pro růst organismu nezbytné, a proto mají tyto látky pravděpodobně velký význam při vytváření optimálního prostředí pro růst houby, potlačení okolních patogenů či získání dostatečného životního prostoru. Jejich studiem lze tedy získat cenné informace o schopnostech hub přizpůsobovat se okolním podmínkám.

Cílem této bakalářské práce je především vytvoření rešerše dosud známých sekundárních metabolitů rodu *Armillaria* a dále pak ověření možného využití tenkovrstvé chromatografie k taxonomickému zařazení různých druhů rodu *Armillaria* srovnávací analýzou produktů sekundárního metabolismu.

2. Teoretická část

2.1. Cíl

Cílem teoretické části této práce je charakteristika třídy basidiomycetů a rodu *Armillaria* spadajícího do této třídy, dále úvod do problematiky sekundárního metabolismu hub a rešerše shrnující sekundární metabolity nalezené u rodu *Armillaria*.

2.2. Charakteristika basidiomycetů

2.2.1. Zařazení a obecná charakteristika

Basidiomycety (*Agaricomycetes*) jsou jednou z hlavních tříd oddělení *Basidiomycota* (stopkovýtrusných hub), další třídy jsou *Urediniomycetes* (rzi) a *Ustilaginomycetes* (sněti). Mezi basidiomycety řadíme přibližně 2000 druhů, což je téměř 70% známých Basidiomycot.

Většina zástupců této třídy tvoří plodnice (basidiomata, bazidiokarpy) s výjimkou řádu *Filobasidiales*. Do této třídy řadíme většinu mykorhizních hub (tzv. makromycetů). Plodnice jsou mnohobuněčné rozmnožovací útvary tvořené plektenchymem, nepravým pletivem tvořeným hyfami. Rozlišujeme dva typy plodnic: hymeniální a geastrální. U hymeniálních typů plodnic se basidie vyskytují ve výtrusorodé vrstvě (hymeniu) na povrchu plodnice. U geastrálních typů plodnic obaluje blána okrovka (peridie) teřich (glebu) tvořící výtrusorodé pletivo s basidiemi. V basidiích dochází ke splývání jader (karyogamii) v jediné diploidní jádro a k následné meióze. Basidie jsou oddělené od hyf příčnou přehrádkou a mohou být členěny na probasidie, kde probíhá karyogamie, a na metabasidie, v nichž probíhá meióza. Na basidiích se vytvářejí stopečky (sterigmata), na kterých se tvoří výtrusy. Těmi procházejí z basidií haploidní jádra, která se poté obklopí plazmou a buněčnou stěnou. Tak vznikají basidiospory, které se mohou lišit u jednotlivých rodů tvarem, velikostí, barvou či jinými znaky. Tyto znaky jsou však druhově stálé. Velikost basidiospor se většinou pohybuje v rozmezí od 3 do 30 μm a na jedné basidii jsou obvykle čtyři.

Plodnice mnoha basidiomycetů mají, zvláště u mladých hub, patrný obal. Tento obal se nazývá velum a může obalovat buď celý zárodek plodnice (primordium), pozůstatkem tohoto obalu je pak pochva na bázi třeně a bradavky na klobouku (např. *Amanita muscaria*), a nebo

obaluje jen část plodnice a zůstává po něm prsten na třeni nebo manžeta (armilla), či pavučina (kortina) mezi třeněm a okrajem klobouku.

Vegetativní stélka je u basidiomycetů tvořena vláknitým myceliem, které je zpravidla přehrádkované. Ve stěně přehrádek (sept) jsou tzv. dolipóry mající podobu pláště soudku, jejichž obě strany kryje obvykle polokulovitá membrána nebo měchýřky tvořená čepička (parentozom). Buněčná stěna je složena z několika tenkých vrstev a jako u většiny hub je tvořena převážně chitinem. U některých zástupců se vyskytují také pevné, tmavě zbarvené myceliální struktury rhizomorfy (myceliové provázky se zesílenou tmavou kůrou na špičce tvořené apikálním meristémem, např. rod *Armillaria*), nebo sklerocia (kulovité nebo elipsoidní útvary vzniklé stmelením hyf, obsahující zásobní látky, např. *Collybia tuberosa*).

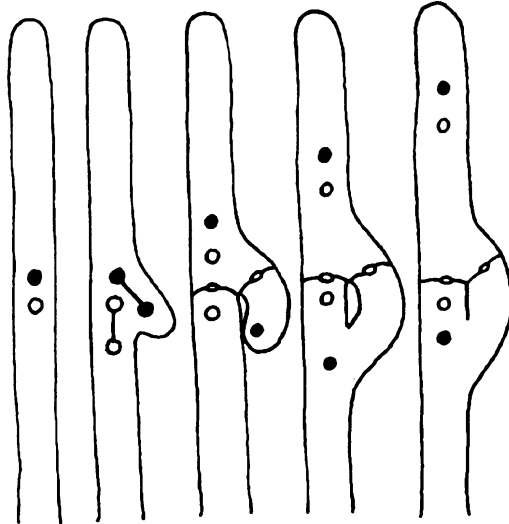
Basidiomycety se dále dělí, na základě odlišných přehrádek v metabasidii, v níž probíhá meióza, na dvě podtřídy: *Tremellomycetidae* a *Agaricomycetidae*. U podtřídy *Tremellomycetidae* má metabasidie vždy vytvořená tzv. primární septa (přehrádky mezi buňkami), u podtřídy *Agaricomycetidae* může být vzácně metabasidie dělená „adventními“ přehrádkami, většinou je však nedělená.

2.2.2. Životní cyklus

Klíčením basidiospory vzniká primární mycelium, které je jednojaderné. Díky rychlému dělení jader může být zpočátku primární mycelium i vícejaderné, brzy se však vytvoří přehrádky rozdělující mycelium na jednojaderné haploidní buňky. Primární mycelium přežívá pouze velice krátkou dobu a do této doby musí nastat kopulace dvou buněk primárního mycelia, která dává vzniknout sekundárnímu dikaryotickému myceliu.

Sekundární mycelium představuje převažující fázi životního cyklu. Mycelium je přehrádkované a vznikají zde přezky v důsledku konjugované mitózy (viz. obr. č. 1, str. 9). Dělení jader v koncové buňce hyfy využívá nazpět orientovaného výrůstku, do kterého přechází jedno dceřiné jádro a zbylá tři jádra zůstávají v hyfě. Po vytvoření buněčných stěn vzniká stádium tvořené třemi buňkami: buňkou koncovou obsahující dvě jádra, buňkou subterminální a buňkou vzniklou z výrůstku po jednom jádře. Po určitém čase dosáhne

výrůstek subterminální buňku, v místě dotyku se stěna rozpustí a jádro výrůstkové buňky doplní dikaryon. U některých basidiomycetů však k tvorbě přezek nedochází.



Obr. č. 1: tvorba přezky

(http://biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.htm?File_name=BASI010B&File_type=GIF)

Z dikaryotického mycelia vznikají plodnice, avšak jejich vznik není nijak podmíněn pohlavním procesem (sekundární mycelium může růst léta bez tvorby plodnic). K vytvoření plodnic je často třeba zajištění specifických podmínek (např. substrát, klima atd.). Jak již bylo zmíněno, plodnice obsahují basidie, ve kterých se tvoří basidiospory. Mladá basidie (probasidie) představuje jedinou diploidní buňku v celém životním cyklu basidiomycetů.

Nepohlavní rozmnožování probíhá u basidiomycetů pomocí fragmentace mycelia nebo pomocí konidií (nepohlavních výtrusů), které se obvykle tvoří na dikaryotickém myceliu. Anamorfy, stadia houbové stélky tvořící nepohlavní výtrusy, jsou u basidiomycetů nenápadné a téměř vždy spojené s pohlavně se rozmnožujícím stádiem (teleomorfou).

2.2.3 Ekologický a hospodářský význam basidiomycetů

Mezi basidiomycety patří z části saprotrofické typy žijící na zbytcích uhynulých organismů, které tvoří významnou složku půdní mikroflóry, z části obligátní nebo fakultativní parazité rostlin, ojediněle hmyzu a člověka. Dále sem patří symbionti žijící v ektomykorhize nebo endomykorhize s cévnatými rostlinami, výjimečně s jinými rostlinami či hmyzem (např. rod *Termitomyces*).

Mykorhiza je projev symbiosy zelené rostliny a houby. V přírodních ekosystémech má velký význam, její role je hlavně ve výživě obou partnerů a pravděpodobně se podílí na ochraně kořenového systému před patogeny. V praxi rozlišujeme dva hlavní typy mykorhizy: ekto a endo mykorhizu. Ektomykorhiza je patrná pouhým okem u nejjemnějších kořínků, které jsou obaleny hyfovým pláštěm, z něhož hyfy z části pronikají do buněk partnerské rostliny (např. rod *Boletus*). Endomykorhiza se projevuje vnikáním hyf do buněk bez tvorby hyfového pláště a je čtenější u bylin, nežli u stromů (např. rod *Thanatephorus*).¹

Řada basidiomycetů svou enzymatickou činností rozrušuje celulosy nebo lignin. Tyto houby nazýváme dřevokazné. Jde převážně o fakultativní parazity, které mohou za určitých podmínek napadat živé stromy, zvláště fyziologicky oslabené² a způsobovat tak hnilobu dřeva. Dřevokazné houby se v zásadě dělí na houby bílé hniloby (white-rot fungi) a na houby hnědé hniloby (brown-rot fungi). Mezi houby bílé hniloby, které rozkládají všechny složky buněčné stěny rostlin: celulosu, hemicelulosy a lignin, patří např. rody *Pleurotus*, *Armillaria*, *Trametes* či *Stereum*. Houby hnědé hniloby jsou charakteristické depolymerizací celulosy a hemicelulosy, lignin však nedegradují, nanejvýš jej modifikují. Odbouráváním dřevních polysacharidů získává dřevo tmavou, většinou hnědou, barvu.¹ Nejnebezpečnějším druhem hub hnědé hniloby působícím na opracovaném dřevě je *Serpula lacrymans* (dřevomorka domácí). Při vysychání napadeného dřeva dochází k jeho praskání a vznikají hnědé kubické bloky, které se drolí. Dřevokazné houby způsobují velké ekonomické škody v lesnictví. Napadené dřevo vykazuje estetické i strukturální vady a je nepoužitelné téměř ve všech odvětvích dřevozpracujícího průmyslu.²

Ojedinělí jsou parazité mechorostů, např. *Lyophyllum palustre*, nekrotrofní parazit na rašelinicích, nebo *Galerina paludosa*, jež je spíše biotrofním parazitem lišejníků. Patří sem

také parazité hub, jako např. některé druhy rodu *Tremella*. Z parazitů člověka sem patří druh *Filobasidiella neoformans*, jehož anamorfa *Cryptococcus neoformans* je původce nemoci kryptokokózy.¹

Jak již bylo řečeno, mezi basidiomycety patří většina makromycetů, které se průmyslově pěstují (zvláště *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* nebo *Lentinula edodes*).

Mnoho basidiomycetů se používá v lidové medicíně nebo k získávání účinných léčebných látek. Například *Hirneola auricula-judae*, neboli „Jidášovo ucho“, se používá ke snížení krevního tlaku, proti kornatění cév, při bolestech žaludku a hemeroidech. Extrakty z *Trametes versicolor* se používaly v Japonsku proti zhoubným nádorům, v Číně při léčbě rakoviny jater a žloutenky typu B a C. *Flammulina velutipes* je používána ke zvýšení odolnosti imunitního systému a proti nespavosti. Z houby *Oudemansiella mucida* bylo izolováno původní české antibiotikum „Mucidermin“, které se zevně používalo při různých kožních plísňových onemocněních.³

Celá řada látek izolovaných z basidiomycetů má cytostatické účinky, např. betulin z *Piptoporus betulinus*, letinan izolovaný z *Lentinus edodes*, flammulin z *Flammulina velutipes*, kalvacin z *Langermannia gigantea* atd.¹

K náboženským rituálům byly již od starověku používány houby obsahující látky s halucinogenními účinky, např. v Mexiku *Psilocybe mexicana* obsahující psilocin a psilocybin nebo *Amanita muscaria*, obsahující kyselinu iboteinovou a muscimol, která byla hojně využívána při šamanských rituálech v oblasti Sibíře a pod názvem „soma“ ve starověké Indii.⁴

2.3. Sekundární metabolismus hub

Pod pojem sekundární metabolismus je řazeno velké množství reakcí, při nichž vznikají produkty, které nejsou přímo nezbytné pro přirozený růst organismu. Dodnes byly popsány tisíce sekundárních metabolitů hub. Jde o velice různorodou skupinu látek, které přesto spojují určité znaky:

- Látky vzniklé z běžných meziproductů metabolismu, ale pomocí speciálních enzymatických cest kódovaných specifickými geny.
- Látky mající tendenci vznikat na konci exponenciálního růstu hub při kultivaci v tekutých půdách nebo při substrátově limitované kontinuální kultivaci.
- Látky, které nejsou nezbytné pro růst nebo normální metabolismus organismů.
- Látky, jejichž produkce je často rodově, druhově nebo kmenově specifická.

Zájem o výzkum látek patřící do této široké skupiny je především způsoben možností jejich případného komerčního využití. Mnohé z těchto sloučenin mají například antibiotické účinky. Penicilin z *Penicillium notatum* je průmyslově využíván už více než padesát let, podobně jako strukturně příbuzné cefalosporiny z *Penicillium griseofulvum*. Některé produkty sekundárního metabolismu hub jsou průmyslově využívány jako rostlinné hormony, například gibberelliny produkované parazitickou houbou *Gibberella fujikuroi*, parazitující na rýži. Dalším příkladem využívaných sekundárních metabolitů jsou aflatoxiny z *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* a námelové alkaloidy produkované např. *Claviceps purpurea*.⁵

Vzhledem k tomu, že sekundární metabolity nejsou pro růst organismu nezbytné, byly po dlouhou dobu považovány za odpadní látky. V dnešní době se spíše přikláníme k názoru, že tyto látky mají velký význam pro schopnost hub přizpůsobovat se životním podmínkám a někdy jsou dokonce nezbytné pro nalezení prostředků nutných k jejich přežití.⁶

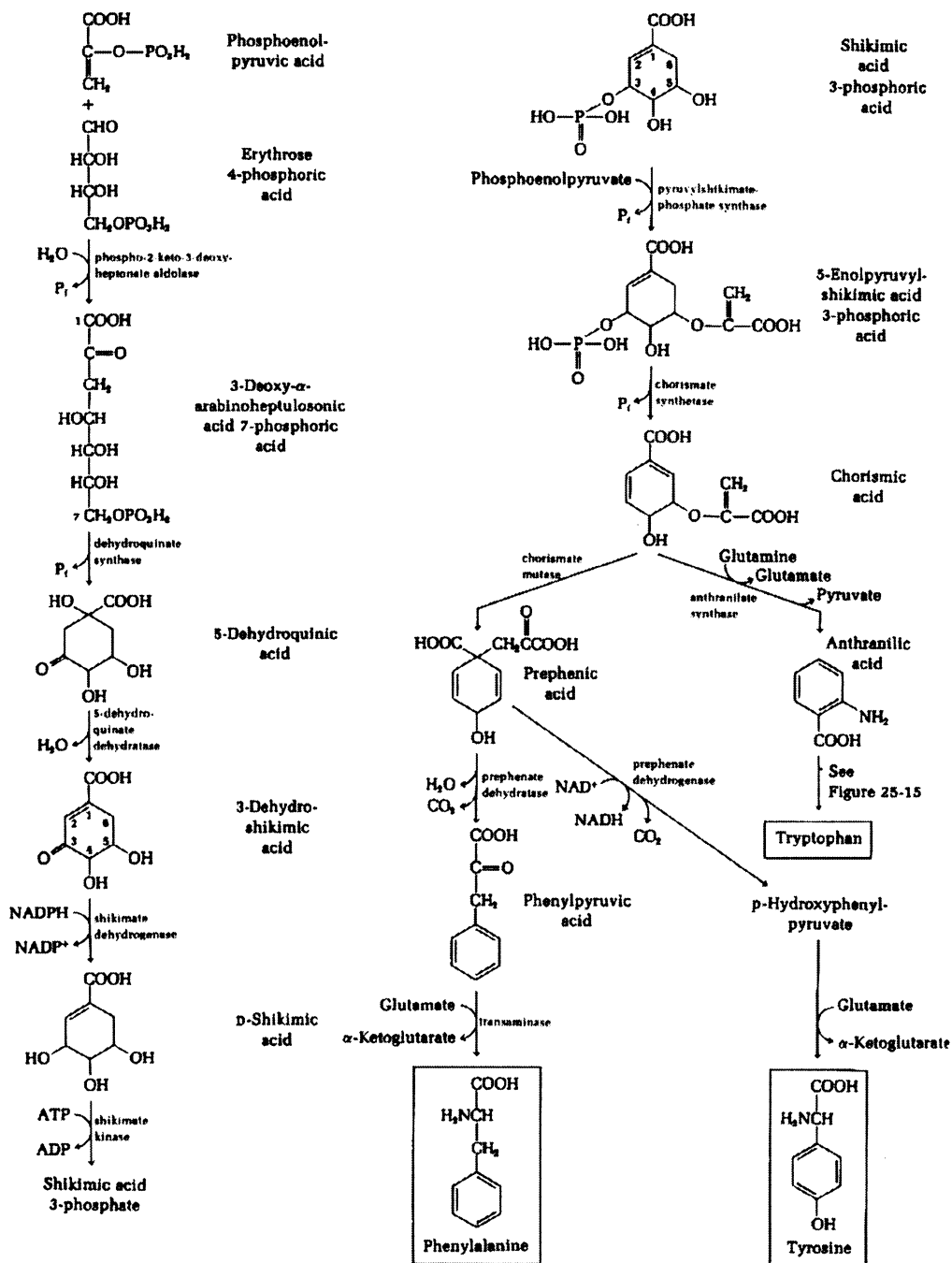
2.3.1. Hlavní metabolické dráhy sekundárního metabolismu

2.3.1.1. Šikimátová dráha

Jde o metabolickou cestu, při které dochází k syntéze aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu z šikimové kyseliny, která byla poprvé izolována v r. 1885 holandským badatelem J.F. Eijkmanem během jeho pobytu v Tokiu z badyániku posvátného (*Illicium religiosum*), s japonským názvem šikimi-no-ki.⁷ Šikimová kyselina vzniká reakcí D-erytróza-4-fosfátu a fosfoenol pyruvátu, jenž vede k tvorbě fosforylované sedmiuhlíkaté ketózy a následnou cyklizací na 5-dehydrochinovou kyselinu. Šikimová kyselina dále reaguje až na zmíněné aminokyseliny (viz. obr. č. 2, str. 13).⁸ Intermediáty této metabolické dráhy

jsou často výchozími látkami pro biosyntézu sekundárních metabolitů obsahujících aromatické jádro.

Figure 25-14
The biosynthetic pathway to tyrosine, phenylalanine, and tryptophan.

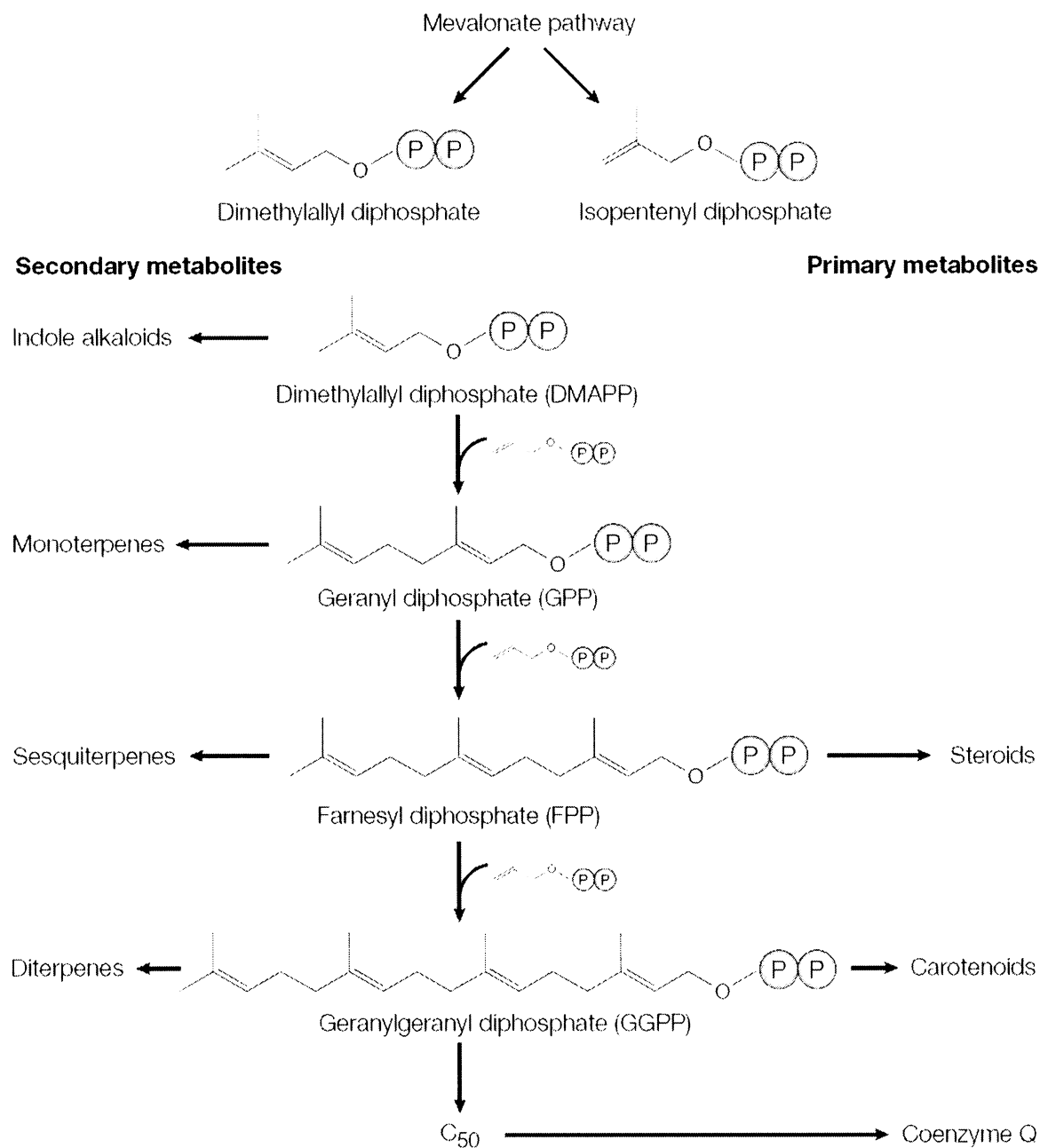


Obr. č. 2: Šikimátová dráha (převzato z A. L. Lehninger: Biochemistry, 2nd edition, 1975)

2.3.1.2 Mevalonátová dráha

Tato metabolická dráha je odpovědná za vznik terpenů. Největší množství terpenů je rostlinného původu, přesto je zde několik důležitých terpenů houbového původu, jako aristolocheny, gibberelliny, některé karotenoidy, idolové-diterpeny a trichotheceny. Všechny terpeny jsou složeny z isoprenových jednotek a mohou být lineární, cyklické, nasycené, nenasycené nebo jinak modifikované. Biosyntéza terpenů vychází z isopentenyl difosfátu a jeho isomeru dimethylallyl difosfátu (DMAPP). Skládáním isoprenových jednotek vznikají lineární polyprenyl difosfáty, které jsou prekurzory sterolů, karotenoidů a koenzymu Q u mnoha druhů hub. DMAPP a isoprenoidní intermediáty jsou časté výchozí látky pro velké množství sekundárních metabolitů. Nejdůležitější skupiny tvoří indolové alkaloidy, monoterpeny, seskviterpeny a diterpeny (viz. obr. č. 3, str. 15).⁹

Indolové alkaloidy jsou odvozeny nejčastěji od aminokyseliny tryptofanu a DMAPP. Nejlépe prozkoumaná je syntéza ergotaminu v *Claviceps purpurea*, kde pomocí dimethylallyl syntetázy (DMATS) vzniká nejprve dimethylallyl tryptofan, jenž je následně methylován a po sérii oxidačních kroků vzniká kyselina lysergová, ze které po aktivaci a kondenzaci s tripeptidem vzniká ergotamin.⁹ Poprvé byl ergotamin izolován v roce 1918 profesorem Stollem jako první alkaloid námele získaný v čisté podobě. Byl rychle zaveden na trh v podobě hemostatického léčiva v porodnictví a jako lék na migrénu. Později byla v roce 1938 při výzkumu námelových alkaloidů objevena Albertem Hofmannem v laboratořích Sandoz jedna z neúčinnějších semisyntetických halucinogenních látek - diethylamid kyseliny lysergové (LSD).¹⁰



Obr. č. 3: Mevalonátová dráha (převzato z Keller P., Turner G., Bennett J. W.: *Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics*, Nat. Rev. Microbiol. 3, 937-47, 2005)

2.3.1.3 Acetát-malonátová dráha (polyketidy)

Polyketidy jsou nejhojnější skupinou houbových metabolitů, jsou strukturně velice proměnlivou skupinou přírodních produktů, které mají často biologické účinky. Tyto látky

jsou odvozené od polymerace acetyl koenzymu A (acetyl CoA) a malonyl CoA procesem podobným jako u mastných kyselin.¹¹ Hlavní rozdíl mezi polyketidy a mastnými kyselinami spočívá v úplné redukci na β -uhlíku u mastných kyselin, který u polyketidů většinou nenastává.

Polyketidy houbového původu vznikají pomocí polyketidových syntetáz (PKS) typu I, což jsou multidoménové proteiny příbuzné eukaryotním syntetázám mastných kyselin. Na tomto proteinovém komplexu dochází k již zmíněné kondenzaci acetyl CoA a malonyl CoA na řetězce různých délek. Různorodost struktur houbových polyketidů je dána počtem iteračních reakcí, počtem redukčních reakcí a u aromatických polyketidů, cyklizací vznikajícího řetězce. Další variabilita plyne z mnohých post-syntetických kroků.⁹

Podle počtu acetátových jednotek se rozlišují polyketidy a oligoaketidy. Nejznámějšími oligoaketidy jsou tetracykliny a aflatoxiny.

2.3.1.4. Deriváty produktů primárního metabolismu

Tyto sekundární metabolity vznikají většinou bezprostřední přeměnou běžných primárních metabolitů, aminokyselin, sacharidů a organických kyselin syntetizovaných v rámci primárního metabolismu.⁷

2.4.1. Charakteristika rodu *Armillaria*

2.4.1.1. Zařazení, obecná charakteristika

Tabulka č. 1. taxonomické zařazení rodu *Armillaria*¹²

	latinský název	český název
Říše	<i>Fungi</i>	houby
Oddělení	<i>Basidiomycota</i>	stopkovýtrusné
Třída	<i>Basidiomycetes</i>	stopkovýtrusé
Podtřída	<i>Agaricomycetidae</i>	houby rouškaté
Řád	<i>Agaricales</i>	lupenotvaré
Čeleď	<i>Marasmiaceae</i>	špičkovité
Rod	<i>Armillaria</i>	václavky

Rod *Armillaria* poprvé pojmenoval Friedrich Staude ve své publikaci v roce 1857 a více než sto let byla nomenklatura a taxonomické aspekty tohoto rodu předmětem sporů předních biologů, přesto se k obecným závěrům, zvláště u evropských druhů, dospělo teprve v poslední době (Velenovský, 1986;¹³ Guillaumin a kol., 1985;¹⁴ Marxmüller, 1987;¹⁵ Roll-Hansen, 1985;¹⁶ Romagnesi a Marxmüller, 1983;¹⁷ Termorshuizen a Arnolds, 1987;¹⁸ Watling, 1987;¹⁹ Watling a kol., 1982²⁰). V některých publikacích můžeme nalézt pro rod *Armillaria* také synonymum *Armillariella*.²¹ Podrobnější rozbor nomenklatury a taxonomie zde nebude dále rozváděn.

Rod *Armillaria*, s českým názvem václavky, zahrnuje okolo 40 druhů, z nichž několik má omezený geografický výskyt nebo rostlinnou asociaci.²¹ Václavky jsou především známé jako patogenní a saprofytické basidiomycety způsobující velmi rozšířené onemocnění kořenů listnatých a jehličnatých stromů.²² Na našem území bylo do současné doby popsáno pět druhů václavek, jde o druhy *Armillaria ostoyae* (václavka smrková), *Armillaria gallica* (václavka hlízovitá), *Armillaria cepistipes* (václavka drobná), *Armillaria borealis* (václavka severní) a *Armillaria mellea* (václavka obecná).²

Václavky se od ostatních druhů hub liší v mnoha morfologických i jiných znacích. Zde jsou uvedeny ty nejvýraznější:

Klobouk: tupě kuželovitý, pak rozložený, masitý, ztenčující se ke kraji, medově žlutý, hnědý, žlutý až olivový, většinou jemně šupinatý

Lupeny: většinou bělavé, šedavé nebo smetanové

Třeň: bělavě vločkatý nebo vlnatý, bělavý až červenohnědý, centrální, vláknitý, masitý, s často výrazným límečkem žlutavé či bílé barvy

Výtrusový tisk: bílá až smetanová barva tmavnoucí mírně při sušení

Basidia: tvoří 4, někdy 2 výtrusy

Bazidiospory: elipsoidního tvaru, průhledné nažloutlé smetanové barvy, hladké nebo mírně bradavčité

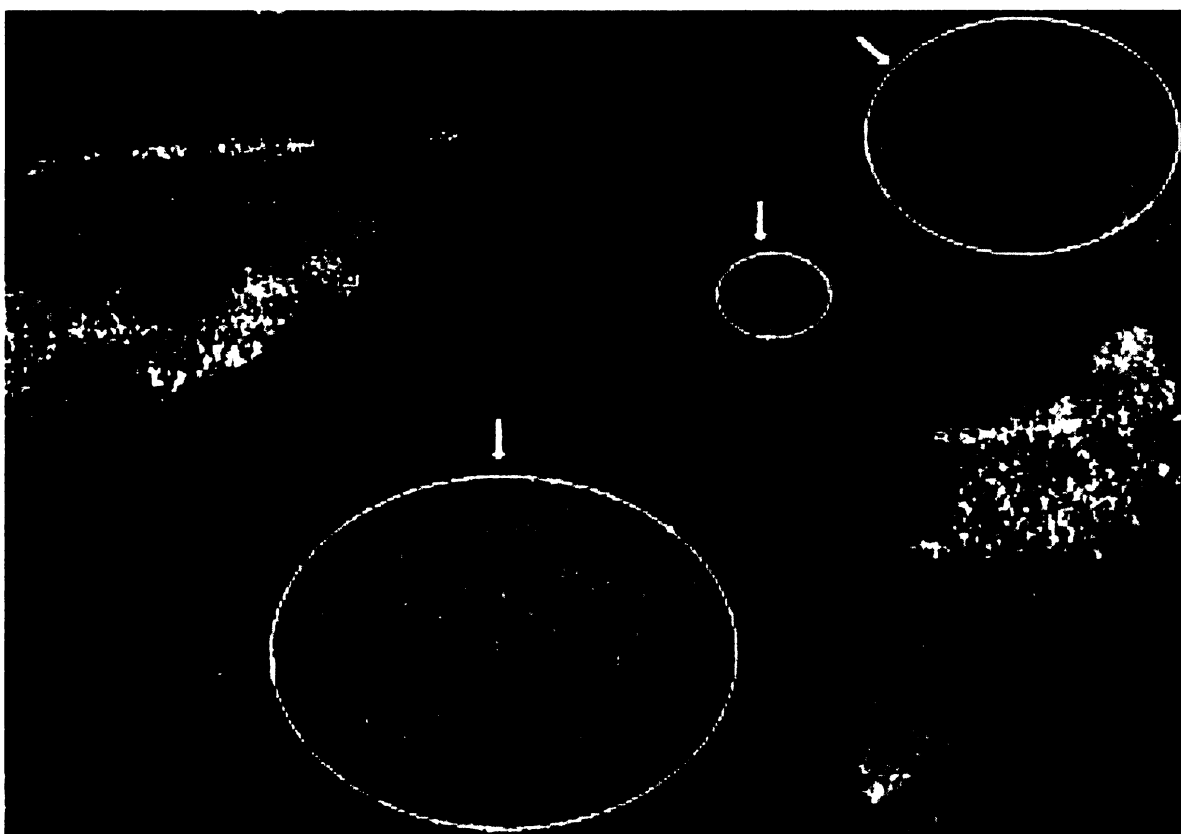
Rhizomorfy: myceliální provazce s nahromaděným melaninem ve vnější vrstvě a s bledým, apikálně rostoucím koncem²¹

Stejně jako u ostatních makromycetů jsou druhy václavek vymezené svojí morfologií. Rozlišení některých druhů pomocí morfologických znaků je však, stejně jako u mnoha jiných druhů hub, obtížné. Identifikace může vyžadovat množství makro a mikromorfologických rysů v kombinaci s biochemickými a ekologickými informacemi.²³ Výzkumem serologických odlišností mezi některými druhy václavek se zabýval například Lung-Escarmant a Dunět (1979, 1980). V dnešní době je nejpřesnější metodou k určení druhu analýza rDNA (tj. genů kódujících rRNA v ribosomech) pomocí PCR.²⁴

2.4.1.2. Význam

Václavky patří do skupiny dřevokazných hub, což jsou houby, které ke svému růstu a fruktifikaci v přirozeném prostředí vyžadují dřevní hmotu. Jak už bylo výše uvedeno, tyto houby můžeme rozdělit do dvou skupin: houby bílé hniloby (white-rot fungi), kam patří právě václavky, vyznačují se tím, že jsou schopny využívat lignin současně s celulózą a hemicelulóžami, a houby hnědé hniloby (brown-rot fungi), které využívají ke svému růstu celulózu a hemicelulózu, avšak lignin nejsou schopny degradovat.¹

Velice hojnou václavkou a zároveň velmi problematickou, zvláště z hlediska ochrany lesů na našem území, je *Armillaria ostoyae* (václavka smrková), která je značně rozšířená v jehličnatých lesích, kde působí značné škody především u smrků. Václavka smrková způsobuje rozklad dřeva spodní části kořenů a odtud se plamencově šíří do vnitřní pařezové části kmene. U napadeného dřeva lze na podélném řezu pozorovat tři fáze jeho rozkladu. Nejdříve je dřevo světle hnědo-oranžové a tvrdé. Směrem do zdravého dřeva je mycelium ohraničené tenkou černou vrstvou o tloušťce mezi 25 a 50 μm . Později je dřevo světle žluto-oranžovo-hnědé nebo žluto-bílé a měkké. V konečné fázi je dřevo značně rozrušené s výrazně zachovalými dřevnými paprsky.² Václavka smrková spolu s ostatními druhy václavek, především václavkou obecnou (*Armillaria mellea*), působí po celém světě velice rozsáhlé škody na lesních porostech. Rozsahy napadení václavkami mohou být velice různorodé, od několika stromů po rozsáhlé oblasti čítající až 400 ha.²⁵ Na obázku č. 4 (str. 19) je patrné šíření onemocnění z určitého bodu a obrovský rozsah individuálního organismu, který může dosahovat až desítky hektarů.



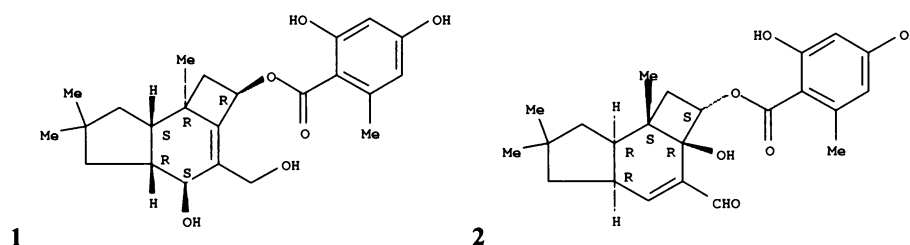
Obr. č. 4: oblast jehličnatého lesa v Montaně zasaženého václavkou. Největší ohraničená oblast ve spodní části obrázku má velikost téměř 8 hektarů (převzato z Raven Johnson, *Biology, Hardcover, 1996*)

Přestože největší zájem o václavky je způsoben právě parazitizmem na dřevinách, je tento rod také velice zajímavý z hlediska medicínského. Do dnešní doby bylo z václavek izolováno relativně velké množství látek s antibakteriální či antifungální aktivitou (viz. následující kapitola) a byly také popsány četné případy použití václavek v lidové medicíně. Například *Armillaria mellea* (václavka obecná) byla součástí medicíny již staré Číny, kde byla používána proti žaludečním chorobám a proti plicním nebo jaterním potížím. Užívání václavek působí také jako prevence proti pálení žáhy, zabraňuje vysušování pokožky, zmírňuje bolesti zad a pomáhá potlačovat příznaky epilepsie a rachitidy. Bývá také používána proti různým očním chorobám.³ Dřívější pokusy na myších prokázaly, že z *Armillaria mellea* byla získána látka označovaná jako peptidoglukanová frakce B, která je schopna potlačit růst sarkomu S180.²⁶

2.5. Sekundární metabolity rodu *Armillaria*

V této části jsou shrnuty sekundární metabolity izolované z kultur václavek.

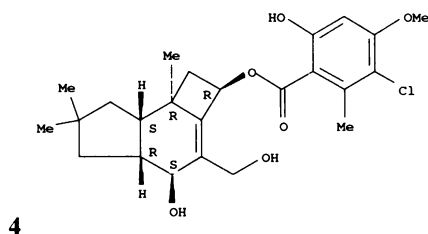
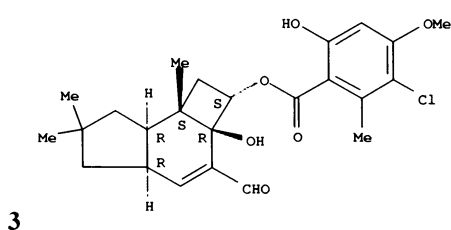
Největší skupinu látek, jež je produktem sekundárního metabolismu václavek, tvoří látky odvozené od seskviterpenů. Seskviterpeny patří do třídy terpenů skládajících se ze tří isoprenových jednotek. Z václavek bylo izolováno několik desítek různých seskviterpen aryl esterů, jež jsou odvozeny od dvou hlavních typů reprezentovaných armillyl orsellinátem [1] a melleolidem [2].²⁷ Velkou část těchto seskviterpen aryl esterů tvoří jejich chlorované deriváty.²⁸

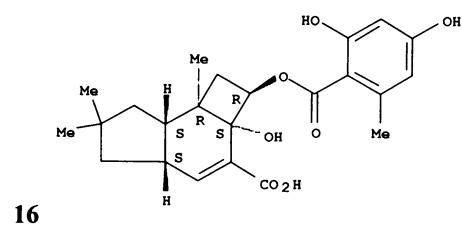
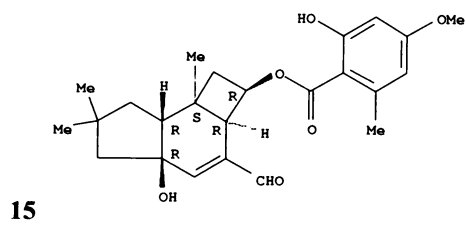
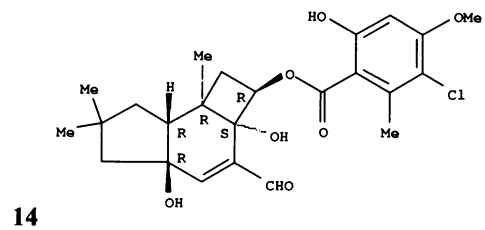
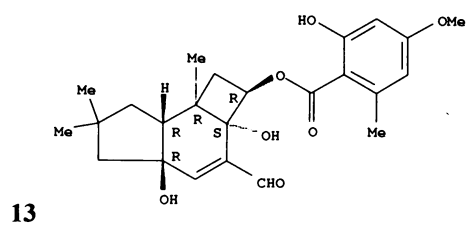
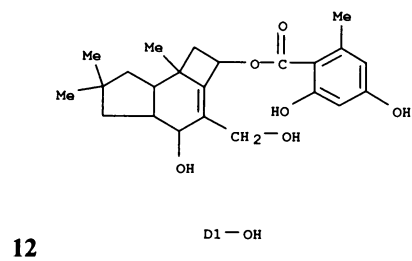
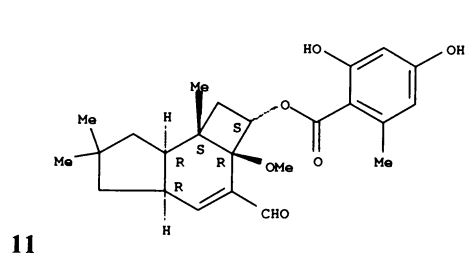
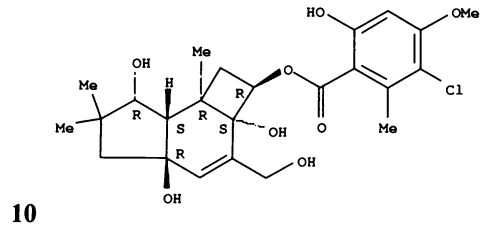
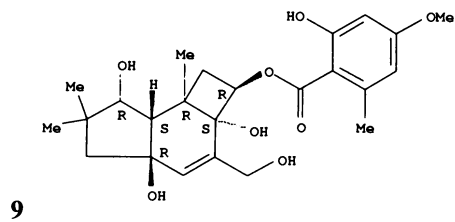
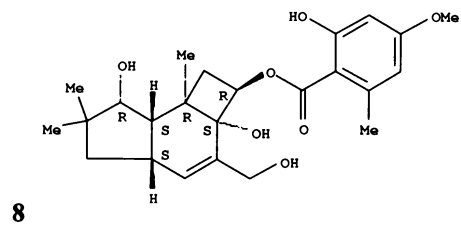
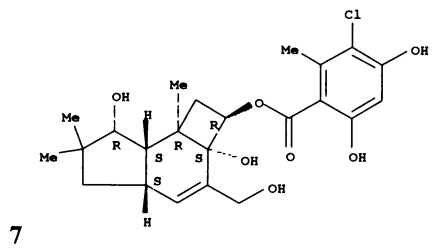
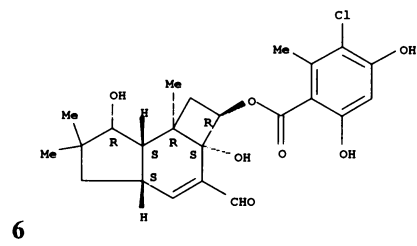
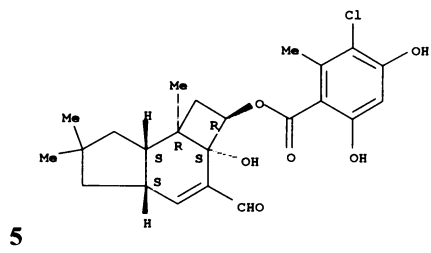


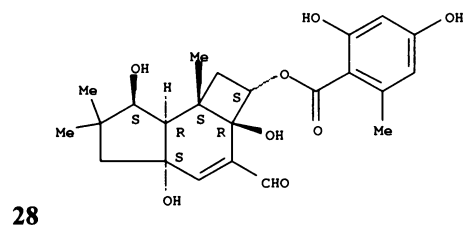
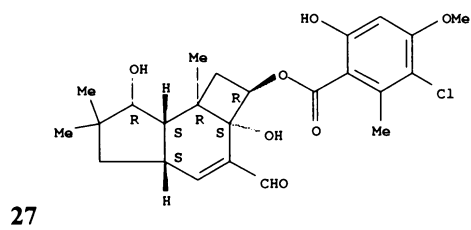
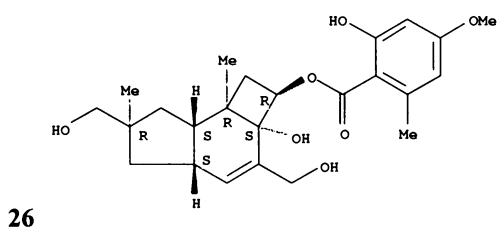
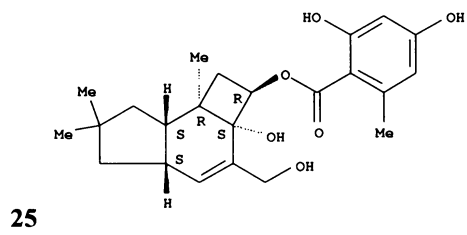
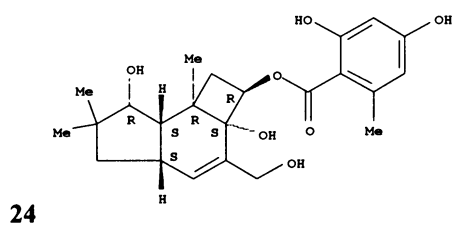
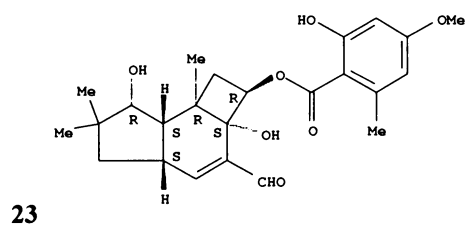
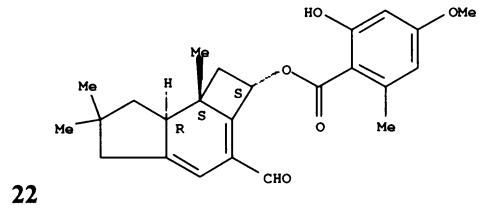
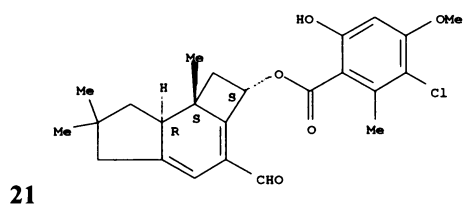
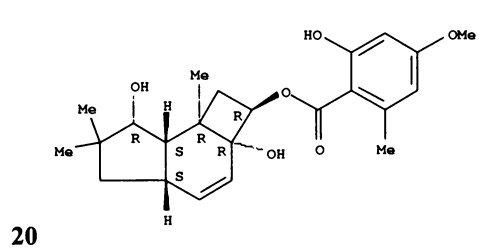
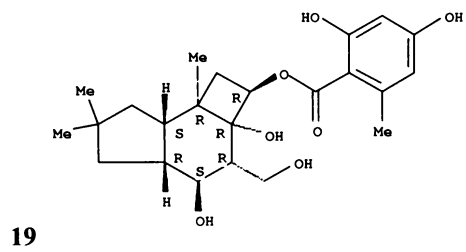
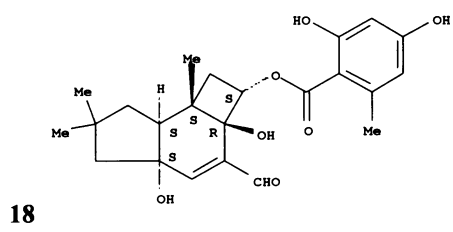
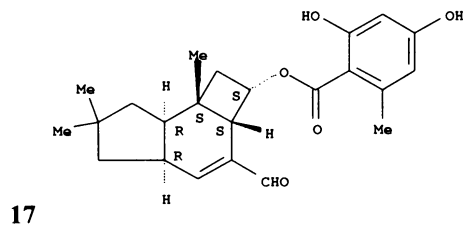
Nejvíce prozkoumaným druhem václavek z pohledu produkce sekundárních metabolitů je *Armillaria mellea* (václavka obecná), u které byla nalezena většina známých seskviterpen aryl esterů václavek. Například bylo popsáno, že václavka obecná produkuje v průměru kolem 70 mg chlorované látky armillaridinu [3] na jeden kilogram sušiny. Dalšími izolovanými látkami jsou: arnamiol [4], melleolidy K [5], L [6], M [7],²⁹ B [8], C [9] a D [10].³⁰ Mezi látky vykazující silnou antibakteriální aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím jsou 4-O-methylmelleolid [11] a judeol [12].³¹ Dále armillarilin [13], armillarinin [14],³² armillaripin [15]³³ a armillarová kyselina [16], u které byla zjištěna silná inhibiční aktivita proti gram-pozitivním bakteriím a kvasinkám.

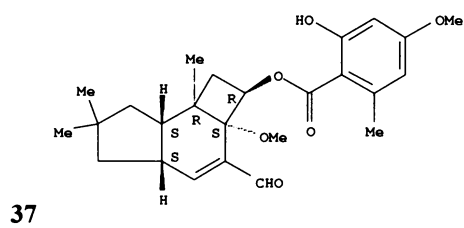
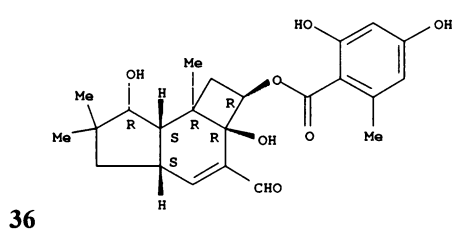
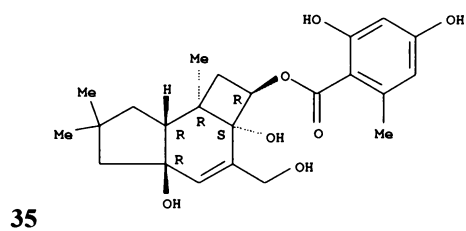
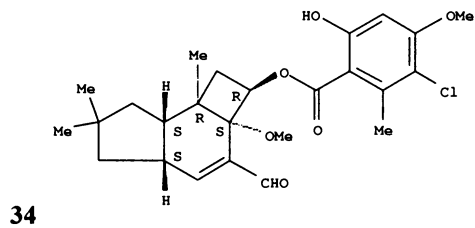
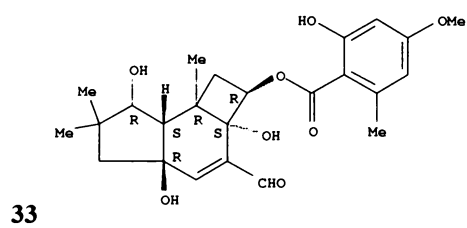
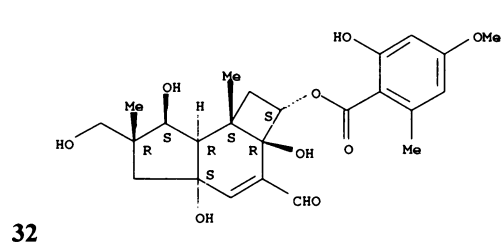
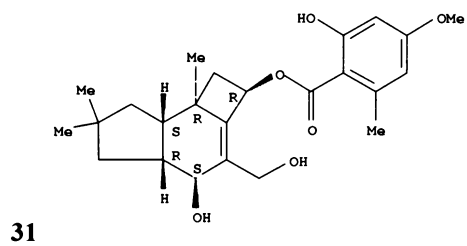
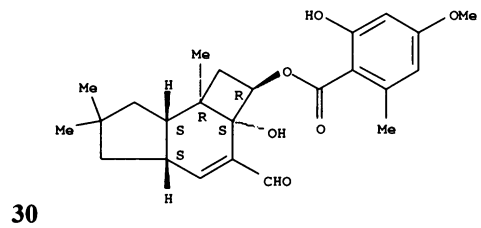
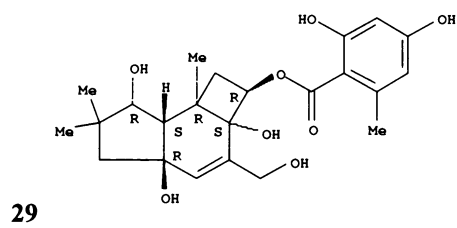
Další nalezené seskviterpen aryl estery jsou armillarivin [17], armillaritin [18],³⁴ armillan (armillarizin) [19],³⁵ armillarigin [20],³⁶ armillaricin [21], armillaribin [22],³⁷ melleolidy H [23], E [24], F [25], G [26]³⁸ a mellolid J (armillarikin) [27],³⁶ melledonal [28], melledonol [29],³⁹ armillyl orsellinát [1],⁴⁰ melleolid [2],³¹ armillarin [30].⁴¹ Mnoho izolovaných látek v současné době ještě nemá triviální název. Jde o tyto látky:

- [2R-(2 α ,4 α ,4 α ,7 α ,7b β)]-2,4,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoové [31]⁴⁰
- (2 α ,2a β ,4 α ,6 α ,7 β ,7 α ,7b β)-(+)-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,4a,7-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoové [32]
- [2R-(2 α ,2a β ,4 α ,7 β ,7 α ,7b β)]-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,4a,7-trihydroxy-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoové [33]⁴²
- [2R-(2 α ,2a β ,4 α ,7 α ,7b β)]-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a-methoxy-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 3-chloro-6-hydroxy-4-methoxy-2-methylbenzoové [34]⁴³
- [2R-(2 α ,2a β ,4 α ,7 α ,7b β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,4a-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoové [35]
- [2R-(2 α ,2a α ,4 α ,7 β ,7 α ,7b β)]-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,7-dihydroxy-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoové [36]
- [2R-(2 α ,2a β ,4 α ,7 α ,7b β)]-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a-methoxy-1,6,6-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoové [37]⁴⁰

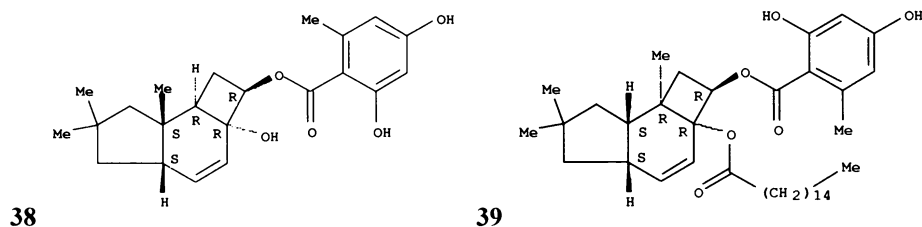




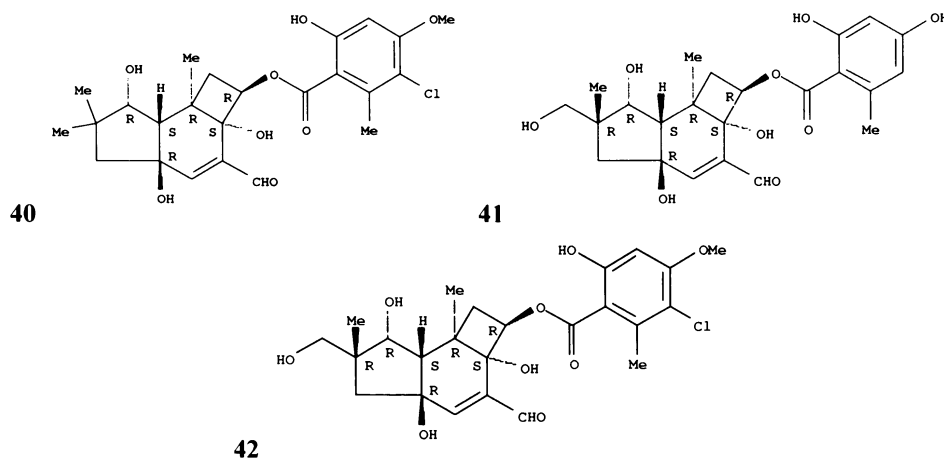




Dále byly u *Armillaria mellea* nalezeny dva norseskviterpenoidní estery: armillasin [38] a armillatin [39].⁴¹



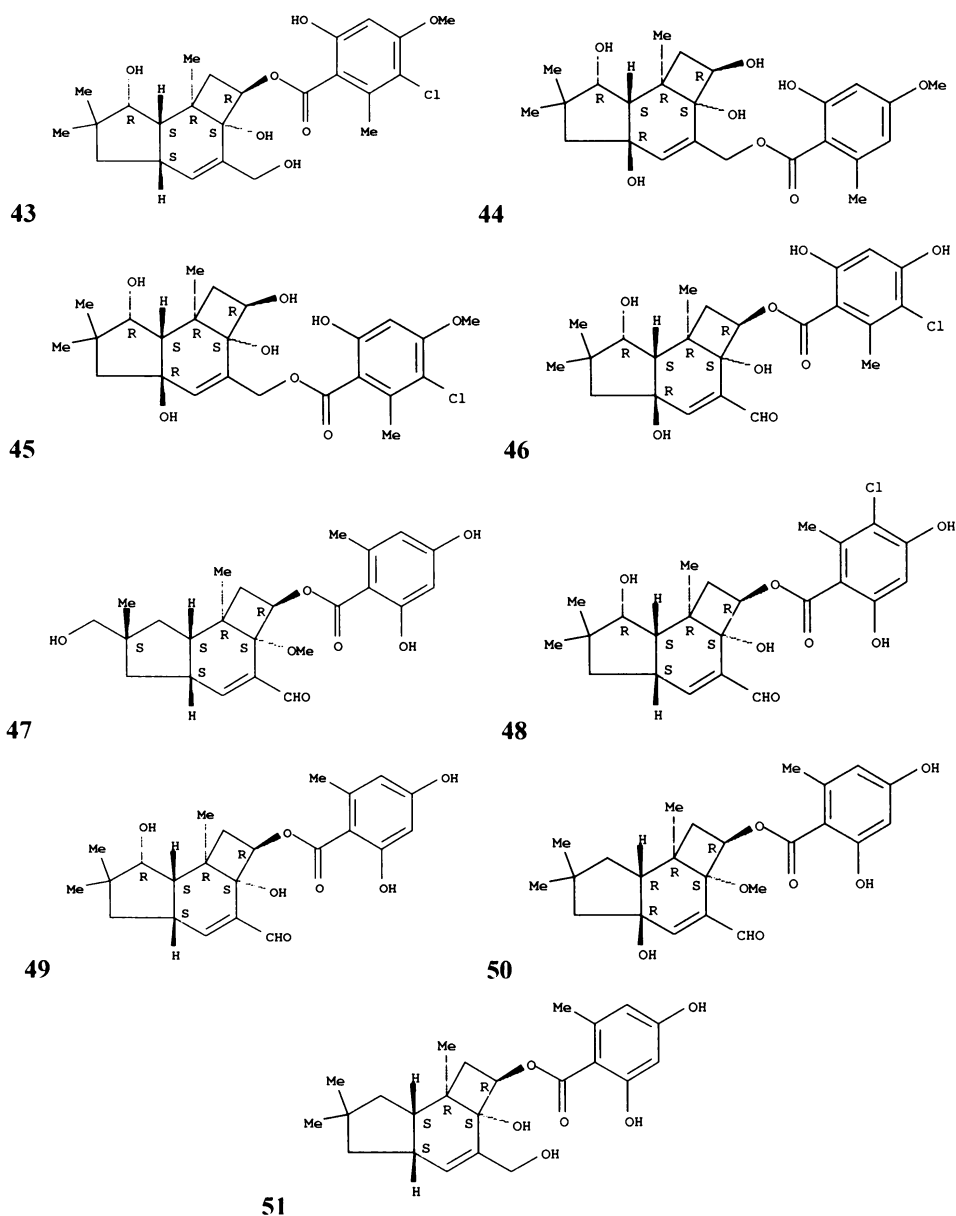
Arnamiol [4] byl také nalezen u dalších druhů václavek: *Armillaria ostoyae*, *Armillaria tabescens*, *Armillaria monadelphae*, *Armillaria gallica* a *Armillaria cepistipes*. V tekutých médiích po kultivaci *Armillaria ostoyae* byla zjištěna také přítomnost melledonalu C [40] a melleolidu D [10].²⁹ Jediný další rod, u kterého byla zaznamenána přítomnost chlorovaných seskviterpen aryl esterů, je rod *Clitocybe*, kde byl popsán mellelondal E [41] a D [42]³⁸ u *Clitocybe elegans*, který zatím nebyl detekován u rodu *Armillaria*.²⁹



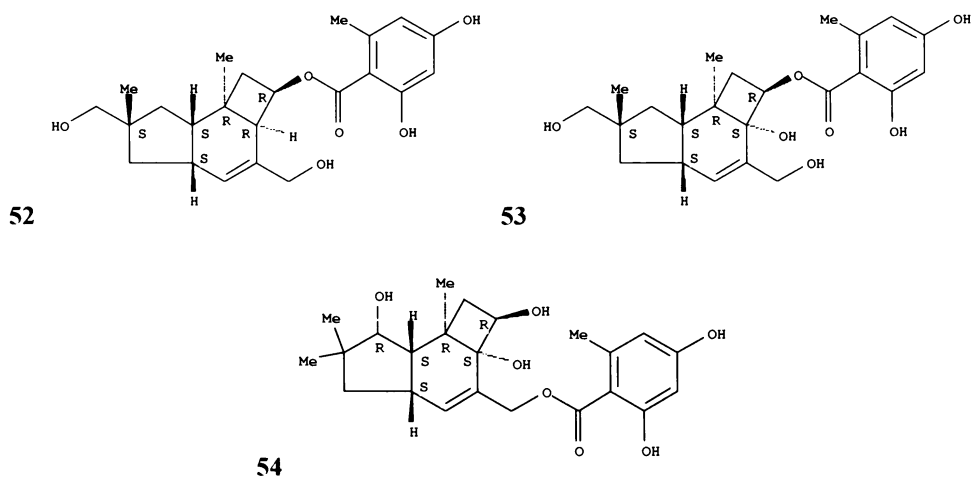
V kulturách *Armillaria novae-zelandiae* byly popsány: melleolid I [43], J [27] a armellidy A [44], B [45], dále melledonaly B [46] a C [40], 13-hydroxy-4-methoxymelleolid [47], 6'-chloro-10 α -hydroxymelleolid [48];²⁷ a dále pak následující sloučeniny:

- (2R,2aS,4aS,7R,7aS,7bR)-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,7-dihydroxy-6,6,7b-trimethyl-1H-cyklobut[e]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [49]

- (2R,2aS,4aR,7aR,7bR)-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-4a-hydroxy-2a-methoxy-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [50]
- (2R,2aS,4aS,7aS,7bR)-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [51]²⁷



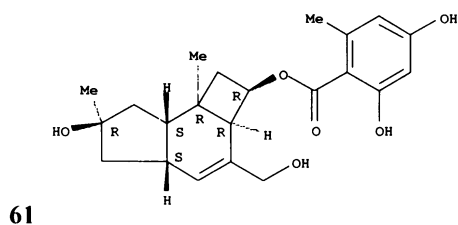
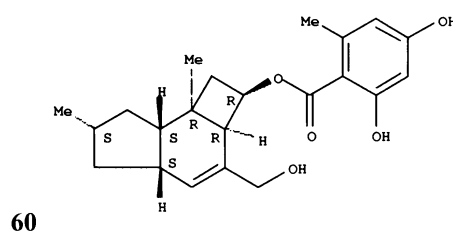
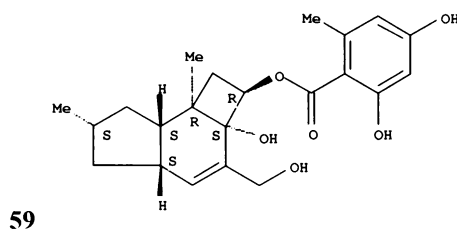
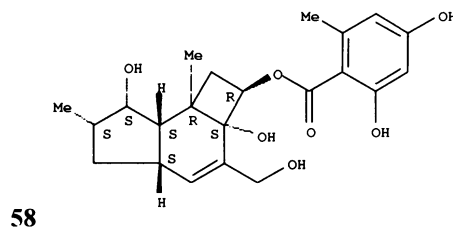
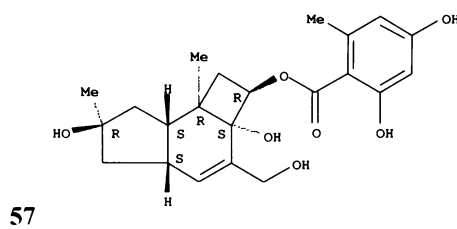
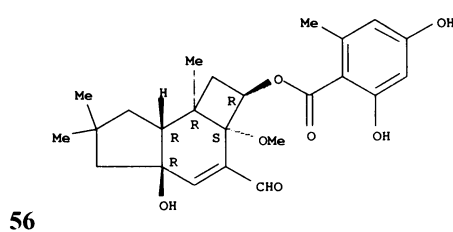
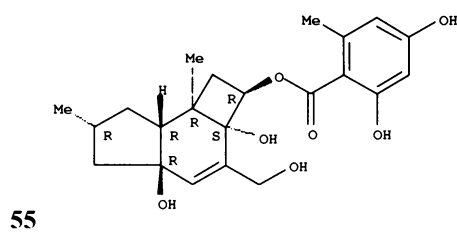
Další sekviterpen aryl estery byly nalezeny u *Armillaria tabescens*, kde byly kromě látek nalezených již u *Armillaria mellea* jako jsou např. armillyl orselinát [1], melleolid [2] a melleolid F [25], objeveny také 4-dehydro-14-hydroxydihydromelleolid [52], 14-hydroxydihydromelleolid [53], 13-hydroxy-4-methoxymelleolid [47] a 5 β ,10 α -dihydroxy-1-orsellinát-dihydromelleolid [54].⁴⁴



Mezi ostatní sekviterpen aryl estery václavek patří:

- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 β ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,4a-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [55]
- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,7 α ,7 β)]-3-formyl-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-4a-hydroxy-2a-methoxy-6,6,7b-trimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [56]
- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 α ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,6-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [57]
- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 β ,7 β ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a,7-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [58]

- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 β ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-2a-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [59]
- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 β ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [60]
- [2R-(2 α ,2 β ,4 α ,6 α ,7 α ,7 β)]-2,2a,4a,5,6,7,7a,7b-oktahydro-6-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-6,7b-dimethyl-1*H*-cyklobut[*e*]inden-2-yl ester kyseliny 2,4-dihydroxy-6-methyl-benzoové [61]⁴⁵



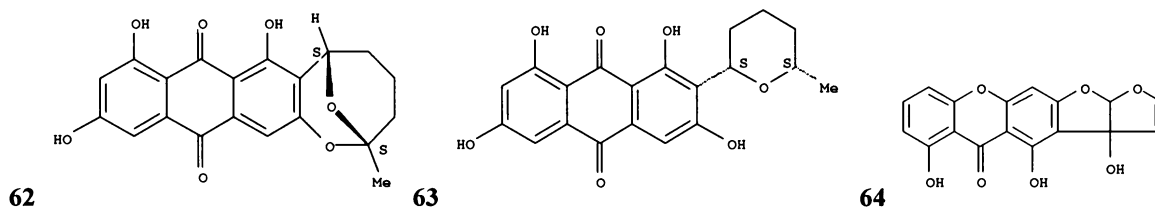
K syntéze některých specifických metabolitů u václavek dochází při kultivaci duálních kultur s jiným druhem basydiomycetů, kde vznikají toxické sekundární metabolity jako součást útočných či obranných mechanismů proti druhé kultuře. Při experimentech s duálními kulturami tří odlišných typů václavek (*A. gallica*, *A. borealis* a *A. cepistipes*) bylo popsáno zastavení syntézy metabolitů charakteristických pro monokulturu, například melleolid D [10], melledonal C [40] a melleolid J [27] s antibiotickými účinky. Naopak byla stimulována syntéza metabolitů bez antibiotické aktivity, jako například armillarín [30].⁴⁶

Jak již bylo zmíněno, velké množství izolovaných seskviterpen aryl esterů je biologicky aktivních. Antimikrobiální aktivita byla prokázána inhibicí růstu kolonií bakterií *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. Antifungální aktivita byla prokázána inhibicí růstu patogenní houby *Cladospodium cucumerinum*.

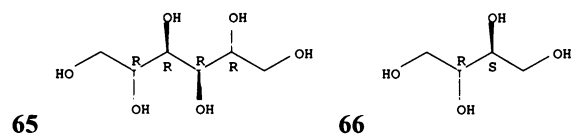
Antibakteriální účinky vůči gram-negativním bakteriím *Escherichia coli* vykazuje melleolid [2] při koncentraci v roztoku okolo 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Aktivita proti gram-positivním bakteriím *Bacillus subtilis* byla pozorována u melledonalu C [40] při koncentraci 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 6'-chloro-10 α -hydroxymelleolid [48] inhibuje růst jak *Bacillus subtilis* při koncentraci 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tak také růst *Escherichia coli* při koncentraci 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Antifungální aktivitu proti *Cladospodium cucumerinum* vykazují melleolid [2] a 6'-chloro-10 α -hydroxymelleolid [48].²⁷

U václavek byl popsán také výskyt látek antrachinonové povahy (antrachinony, tj. aromatické organické látky odvozené od antracenu). Jedná se o oranžové pigmenty averufin [62] a averufanin [63]. Dalším oranžovým pigmentem izolovaným z václavek je austocystin F [64], lineární xanthon, podobný aflatoxinům získaných z *Aspergillus ustus*.⁴⁷



U václavky obecné byly nalezeny také sacharidy D-mannitol [65] a phycitol [66].³⁴



3. Experimentální část

3.1. Cíl

Jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách, sekundární metabolity produkované houbovými organismy jsou často rodově, druhově nebo kmenově specifické. Tato vlastnost je často, kromě jiných metod, využívána k taxonomickému zařazení a identifikaci druhů hub jejichž morfologické znaky nejsou natolik výrazné, aby bylo možné odlišit jedince dvou různých druhů. U václavek nejsou tyto rozlišovací znaky vždy zřejmé, u mladých plodnic téměř nerozlišitelné, a proto se pro přesné určení používá molekulárně genetických metod, například pomocí tzv. nested PCR.²⁴ Tyto metody jsou velice přesné, ale mnohdy příliš časově a technicky náročné. Je potřeba specifických primerů, tj. krátkých useků DNA, které se používají k označení úseku DNA, jež má být pomnožena pomocí polymerázové řetězové reakce. V experimentální části této práce byly kultivovány tři různé druhy václavek (*A. gallica*: kmeny A4 a A7, *A. cepistipes*: kmeny A509 a A518, *A. ostoyae*: kmeny A560 a A580). Tekuté kultivační médium, obsahující produkty sekundárního metabolismu, bylo analyzováno metodou tenkovrstvé chromatografie. Na základě výsledků bylo vyhodnoceno možné využití této metody k taxonomickému zařazení.

3.2. Materiál

3.2.1. Použité kmeny

Použité kultury byly z části ze sbírky laboratoře biochemie dřevokazných hub MBÚ AV ČR (*A. gallica*: kmeny A4 a A7) a doplněny ze sbírky Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity (MZLU) v Brně laboratoře doc. Dr. Ing. Libora Jankovského (*A. cepistipes* kmeny A509 a A518, *A. ostoyae* kmeny A560 a A580), kde byly zároveň všechny použité kultury identifikovány molekulárně genetickými metodami.⁴⁸

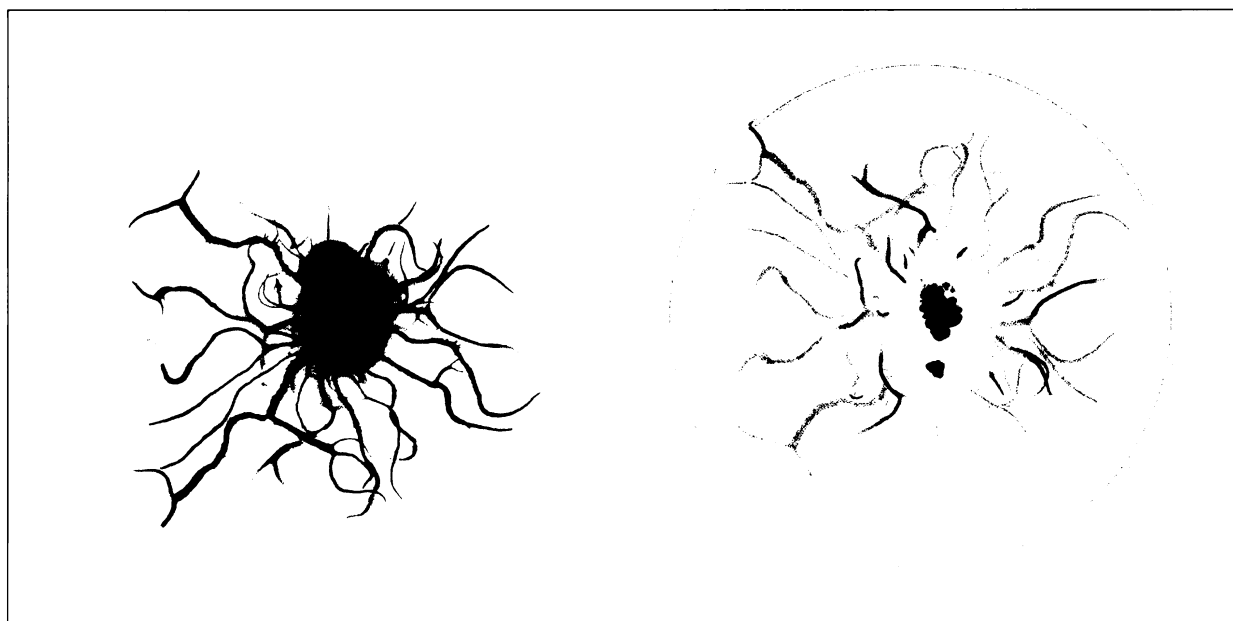
3.2.2. Použité chemikálie

Aceton p.a. (Lachema, ČR)
Agar (Fluka Biochemika)
Butanol p.a. (Lachema, ČR)
Ethylacetát p.a. (Lachema, ČR)
Hexan pro UV (Lachema, ČR)
Chloroform p.a. (Lachema, ČR)
Isopropyl alkohol p.a. (Lachema, ČR)
Malt extrakt (Fluka Biochemika)
Metanol p.a. (Lach-Ner s.r.o., ČR)
n-Amyl alkohol p.a. (Lachema, ČR)
n-Propyl alkohol p.a. (Lachema, ČR)
Toluen p.a. (Lachema, ČR)

3.3. Metody

3.3.1. Stacionární kultivace na pevné půdě

Do 1 l Erlenmeyerovy baňky bylo připraveno 500 ml 2 % roztoku malt extraktu o pH 5,00. Po přidavku 12,5 g agaru byla směs autoklávována. Za horka byl tento roztok nalit do 18 připravených misek. Po zchladnutí byl vždy do tří misek zaočkován jeden z uvedených kmenů. Misky byly očkované kmeny z již narostlých pevných půd tak, že do středu nové misky byl sterilně přenesen vždy jeden kousek mycelia vyříznutý sterilním skalpelem. Po inokulaci byly zaočkované misky zajištěny parafilmem a kultivovány při teplotě 25 °C po dobu 20 dní, dokud nebyly dostatečně prorostlé myceliem, jak můžeme pozorovat na obr. č. 5 na následující straně, kde jsou patrné vytvářející se rhizomorfy, jež jsou pro václavky charakteristické.

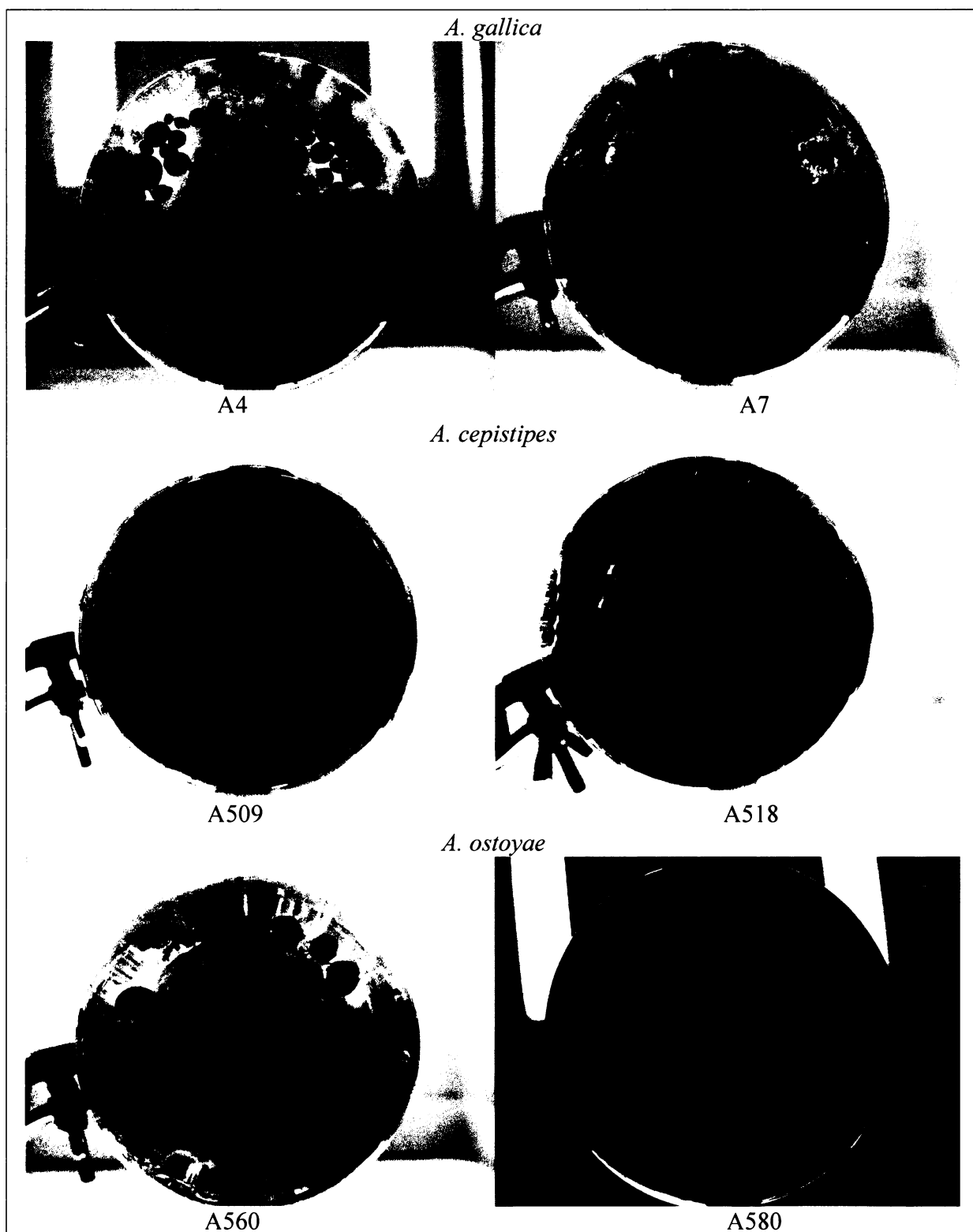


Obr. č. 5: *A. cepistipes* – kmen A518 (foto P. Břicháček MBÚ AV ČR)

3. 3.2. Submersní kultivace v tekuté půdě

Do 18 kultivačních baňek o objemu 100 ml bylo odměřeno vždy 25 ml 2 % roztoku malt extraktu o pH 5,00 a baňky byly zajištěny molitanovou zátkou. Poté byly kultivační baňky s tekutou půdou autoklávovány. Kultury byly inokulovány kousky agaru prorostlého myceliem a vyříznutého sterilním skalpelem z okrajů dobře narostlé agarové misky po předchozí stacionární kultivaci. Do jedné baňky byly vloženy vždy dva kousky inokula. Baňky s kulturami byly po inokulaci umístěny do reciproké třepačky (100 cyklů/min), kde byla teplota udržována na konstantní výši 25 °C. V těchto podmínkách mycelium rostlo 25 dní, v jejichž průběhu se začalo uvolňovat dostatečné množství barevných produktů sekundárního metabolismu, jak je patrné na fotografiích (obr. č. 6, str. 33). Dále tu lze pozorovat mezidruhové rozdíly ve tvaru myceliálních pelet a v množství uvolněného barevného produktu.

Médium po submersní kultivaci v tekuté půdě bylo zfiltrováno přes papírový filtr a získaný filtrát byl lyofilizován. Lyofilizáty byly uchovávány při teplotě -80 °C a použity při chromatografických analýzách.



Obr. č. 6: submersní kultury po 25 dnech kultivace
(pohled na spodní část kultivačních baněk)

3.3.3. Tenkovrstvá chromatografie

U tenkovrstvé chromatografie dochází k chromatografickému dělení vzorku při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je nejčastěji zafixován na hliníkové fólii či skleněné desce. Vzorek se nanese na start a po odpaření rozpouštědla vzorku se deska uloží do chromatografické vaně s mobilní fází na dně. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne potřebné vzdálenosti, chromatogram vyjmeme, necháme odpařit rozpouštědlo a provedeme detekci. Dané látky odpovídá její poloha na chromatogramu vyjádřená hodnotou R_F (tzv. retenční faktor, tj. poměr vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu). Dělení látek probíhá různými mechanismy, podle použitého materiálu tenké vrstvy (adsorbce, výměna iontů atd.) a odpovídající mobilní fáze.⁴⁹

Pro dělení lyofilizátů produktů václavek bylo použito dvou druhů desek Merck 60 F₂₅₄ a T-1154 RP-18.

Postup:

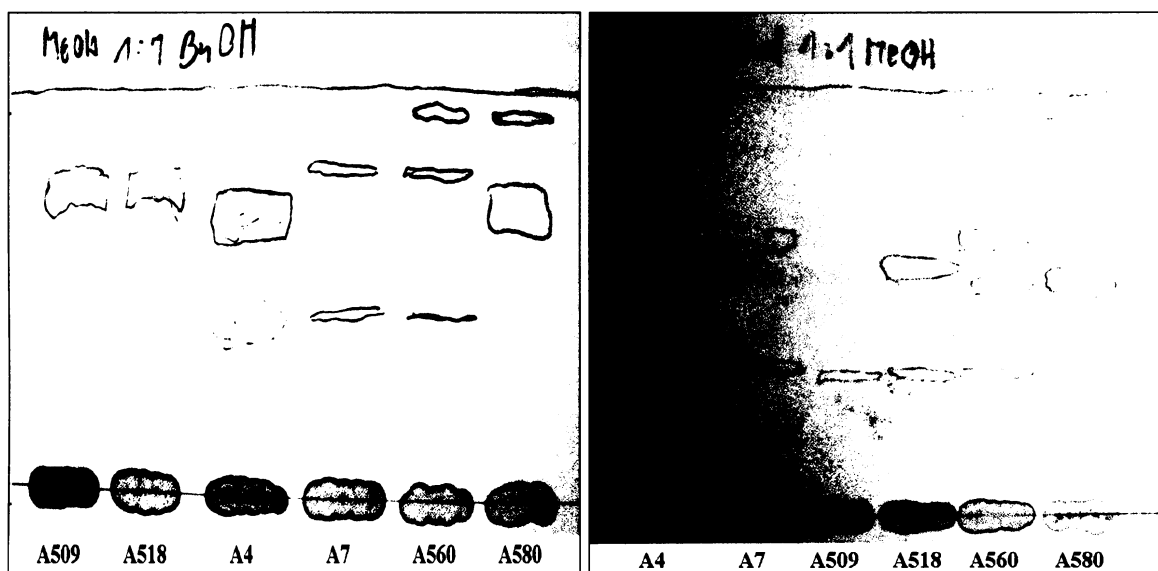
Malé množství lyofilizátu barevných produktů václavek bylo rozpuštěno v 0,5 ml destilované vody. Vzorky o objemu 5 μ l byly nanášeny na desky a vyvíjeny v různých systémech rozpouštědel. Na deskách Merck 60 F₂₅₄ byly vzorky vyvíjeny v systémech: MeOH, BuOH, CHCl₃ - MeOH (1:10), toluen - MeOH (1:10), MeOH - BuOH (2:1), MeOH - BuOH(1:1), *n*-amylalkohol - MeOH (1:1), *n*-amylalkohol - MeOH (3:1), MeOH - toluen (10:1), *n*-propylalkohol - MeOH(1:1), *n*-propylalkohol - MeOH (5:3), *n*-amylalkohol - MeOH (3:1), isopropylalkohol - MeOH (1:1), ethylacetát-MeOH (1:1) a samotný ethylacetát.

Na deskách T-1154 RP-18 v systémech rozpouštědel: MeOH, MeOH - H₂O (9:1), MeOH - H₂O (99:1), MeOH - BuOH (2:1), hexan, aceton.

Použité chromatografické desky byly vizualizovány pomocí UV záření o vlnové délce 250 nm.

3.4. Výsledky a diskuze

K nejlepšímu dělení vzorků produktů václavěk pomocí tenkovrstvé chromatografie došlo na deskách Merck 60 F₂₅₄, a to v systému MeOH - BuOH (1:1) a *n*-amylalkohol - MeOH (1:1).



Obr. č. 7: chromatogramy vyvinuté v systému rozpouštědel MeOH - BuOH (1:1) a *n*-amylalkohol - MeOH (1:1)

Jak je patrné z fotografií chromatogramů (obr. č. 7), látky produkované jednotlivými kulturami se velice liší nejen na úrovni mezidruhové, ale i mezi kmeny stejného druhu. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben velkou proměnlivostí genů zodpovědných za vznik charakteristických metabolitů.

4. Závěr

Byl vypracován přehled dosud známých sekundárních metabolitů nalezených u rodu *Armillaria*.

Podářilo se rozdělit látky produkované třemi odlišnými druhy václavek metodou tenkovrstvé chromatografie. Nepodařilo se však prokázat, že použití tenkovrstvé chromatografie ve výše popsaném provedení je vhodnou metodou k jednoznačnému rozlišení těchto druhů václavek: *Armillaria gallica*, *Armillaria cepistipes* a *Armillaria ostoyae*.

K přesné identifikaci by bylo výhodné sledovat určitý metabolit vyskytující se právě jen u jednoho druhu, avšak takové provedení by bylo pravděpodobně technicky i časově příliš náročné.

5. Seznam použité literatury

- 1) Kalina T., Váňa J.: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, Karolinum, Praha (2005)
- 2) Černý A.: Parazitické dřevokazné houby, Státní zemědělské nakladatelství (1989)
- 3) Váňa P.: Léčivé houby podle bylináře Pavla, Eminent, Praha (2003)
- 4) Alberts A., Mullen P.: Psychoaktivní rostliny houby a živočichové, Svojtka & Co., Praha (2002)
- 5) Deacon W.: Fungal Biology, 4rd edition, Blackwell Publishing (2005)
- 6) Klán J.: Co víme o houbách, SPN, Praha (1989)
- 7) Gabriel J. a kol.: Úvod do experimentální mykologie, texty k přednášce, Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha (1994)
- 8) Lehninger A.: Biochemistry, 2nd edition, Worth Publishers, Inc., New York (1975)
- 9) Keller P., Turner G., Bennett J. W.: Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics, Nat. Rev. Microbiol. 3, 937-47 (2005)
- 10) Hofmann A.: LSD, my problem child, McGraw-Hill, New York (1980)
- 11) <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyketide> (23.5.2007)
- 12) <http://indexfungorum.org> (23.5.2007)
- 13) Velenovský A.: Studies in annulate species of *Armillaria* - I Study of type-specimens of *Armillaria cepistipes*, Česká Mykol. 40, 38-40 (1986)
- 14) Guillaumin J.J., Lung-escarmant B., Romagnesi H., Marxmüller H., Lamoure D., Durrieu G., Berthelay S., Mohammed C.: Systématique des Armillaires du groupe mellea. Conséquences phytopathologiques, Eur. J. For. Path. 5, 288-293 (1985)
- 15) Marxmüller H.: Quelques remarques complémentaires sur les armillaires annelées, Bull. Soc. Mycol. Fr. 103, 137-156 (1987)
- 16) Roll-Hansen F.: The *Armillaria* species in Europe: a literature review, Europ. J. For. Pathol. 15, 22-31 (1985)
- 17) Romagnesi H. Marxmüller H.: Etude complémentaire sur les armillaires annelées. Bull. Soc. Mycol. Fr. 99, 301-321 (1983)
- 18) Termorshuizen A. J., Arnolds E. J. M.: On the nomenclature of the European species of the *Armillaria mellea* group, Mycotaxon 30, 101-116 (1987)

- 19) Watling R.: The occurrence of annulate *Armillaria* species in Northern Britain, Notes from The Royal Botanic Garden of Edinburgh 44, 459-484 (1987)
- 20) Watling R., Kile G. A., Gregory N. M.: The genus *Armillaria* – nomenclature, typification and the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation, Trans. Brit. Mycol. Soc. 78, 271-285 (1982)
- 21) Watling, R., Kile G., Burdsall H.H.: Nomenclature, Taxonomy and Identification in Armillaria Root Disease, Agriculture Handbook 691, 1-9 (1991)
- 22) Kile G. A., Guillaumin J. J., Mohammed C., Watling R.: Biogeography and pathology of *Armillaria*. In Proceedings of the 8th international conference on root and butt rots, 1993, eds. Johansson M., Stenlid J., Uppsala, 411-36 (1994)
- 23) Watling R., Kile G.A., Gregory N.M.: The genus *Armillaria* - Nomenclature, Typification, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation, Trans. British Mycol. Soc. 78, 271-285 (1982)
- 24) Lochman J., Sery O., Mikes V.: The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR, FEMS Microbiol. Lett. 237, 105–110 (2004)
- 25) Williams R.E., Shaw C.G., Wargo P.M., Sites W.H.: Armillaria Root Disease, Forest Insect & Disease Leaflet 78, U.S. Department of Agriculture Forest Service (1986)
- 26) Semerdžieva M., Veselský J.: Léčivé houby dřívě a nyní, Academia, Praha (1986)
- 27) Cremin P., Guiry P. J., Wolfender J.-L., Hostettmann K, Donnelly D. M. X.: A liquid chromatography–thermospray ionisation–mass spectrometry guided isolation of a new sesquiterpene aryl ester from *Armillaria novae-zelandiae*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2325-2329 (2000)
- 28) Gribble G. W.: Natural Chlorine Updates – No.7, Department of Chemistry, Dartmouth College, USA (1998)
- 29) De Jong E., Field J. A.: Sulfur tuft and turkey tail: Biosynthesis and Biodegradation of organohalogens by Basidiomycetes, Ann. Rev. Microbiol. 51, 375–414 (1997)
- 30) Arnone A., Cardillo R., Nasini G.: Structures of melleolides B-D, three antibacterial sesquiterpenoids from *Armillaria mellea*, Phytochemistry 25, 471-474 (1986)
- 31) Donnelly D. M. X., Abe T., Coveney D. N. L., Fukuda N., O'Reilly J.: Antibacterial sesquiterpene aryl esters from *Armillaria mellea*, J. Nat. Prod. 48, 10-16 (1985)
- 32) Yang J. S., Su Y. L., Wang Y. L., Feng X. Z., Yu D. Q., Liang X. T.: Studies on the chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. V. Isolation and characterization of armillarilin and armillarinin, Acta Pharm. Sin. 25, 24-8 (1990)
- 33) Yang, J. S.; Su, Y. L.; Wang, Y. L.; Feng, X. Z.; Yu, D. Q.; Liang, X. T.; He, C. H.; Zheng, Q. T.; Yang, J. J.; Yang, J.: Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. VI. Isolation and structure of armillaripin, Yaoxue Xuebao 25, 353-6 (1990)

- 34) Yang, J. S., Su Y. L., Wang, Y. L., Feng X. Z., Yu D. Q., Liang, X. T.: Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. VII. Isolation and characterization of chemical constituents of the acetone extract, *Yaoxue Xuebao* 26, 117-22 (1991)
- 35) Yang J., Su Y., Wang Y., Feng X., Yu D., Liang X.: The structure of armillarizin, a new protoilludane sesquiterpenoid aromatic ester from *Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr) Quel., *Chin. Chem. Lett.* 1, 173-4 (1990)
- 36) Yang J. S., Su Y. L., Wang Y. L., Feng X. Z., Yu D. Q., Cong P. Z., Tamai M., Obuchi T., Kondoh H., Liang X. T.: Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium. Part IV. Isolation and structures of two new sesquiterpenoid aromatic esters: armillarigin and armillarikin, *Planta Med.* 55, 479-81 (1989)
- 37) Yang J., Cong P.: Mass spectrometric studies on the sesquiterpenol aromatic esters from the mycelium of *Armillaria mellea*, *Huaxue Xuebao* 46, 1093-100 (1988)
- 38) Arnone A., Cardillo R., Di Modugno V., Nasini G.: Secondary mold metabolites. XXII. Isolation and structure elucidation of melledonals D and E and melleolides E-H, novel sesquiterpenoid aryl esters from *Clitocybe elegans* and *Armillaria mellea*, *Gazz. Chim. Ital.* 118, 517-21 (1988)
- 39) Donnelly D. M. X., Coveney D. J., Polonsky J.: Melledonal and melledonol, sesquiterpene esters from *Armillaria mellea*, *Tetrahedron Lett.* 26, 5343-4 (1985)
- 40) Donnelly D. M. X., Hutchinson R. M., Coveney D., Yonemitsu M.: Sesquiterpene aryl esters from *Armillaria mellea*, *Phytochemistry* 29, 2569-72 (1990)
- 41) Yang J., Su Y., Yu D., Liang X.: Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some protoilludane sesquiterpenoid aromatic esters from *Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quel., *J. Chin. Pharm. Sci.* 2, 11-17 (1993)
- 42) Donnelly D. M. X., Quigley P. F., Coveney D. J., Polonsky J.: Two new sesquiterpene esters from *Armillaria mellea*, *Phytochemistry* 26, 3075-7 (1987)
- 43) Donnelly D. M. X., Hutchinson R. M.: Armillane, a saturated sesquiterpene ester from *Armillaria mellea*, *Phytochemistry* 29, 179-82 (1990)
- 44) Donnelly D. M. X., Konishi T., Dunne O., Cremin P.: Sesquiterpene aryl esters from *Armillaria tabescens*, *Phytochemistry* 44, 1473-1478 (1997)
- 45) Cremin P., Donnelly D. M. X., Wolfender J.-L., Hostettmann K.: Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of sesquiterpenes of *Armillaria* (Eumycota: Basidiomycotina) species, *J. Chrom.* 710, 273-85 (1995)
- 46) Sonnenbichler J., Gullaumin J.-J., Peipp H., Schwarz D.: Secondary metabolites from dual cultures of genetically different *Armillaria* isolates, *Eur. J. For. Path.* 27, 241-249 (1997)

- 47) Ayer W. A., Macaulay J. B.: Metabolites of the honey mushroom, *Armillaria mellea*, Can. J. Chem./Rev. Can. Chim. 65, 7-14 (1987)
- 48) Lochman J., Serý O., Jankovský L., Mikes V.: Variations in rDNA ITS of Czech *Armillaria* species determined by PCR and HPLC, Mycol. Res. 108, 1153–1161 (2004)
- 49) Macek K. (Ed) : Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatography, Elsevier publishing company, Amsterdam, London, New York (1972)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení, adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
--------------------------	----------	-----------------	----------