

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Učitelství biologie a chemie pro střední školy



**Bc. Barbora Koudelková**

**Vliv sekundárních metabolitů (esenciálních olejů) na endofytické  
houby kolonizující listy *Rhododendron tomentosum***

The effect of secondary metabolites (essential oils) on endophytic fungi from leaves  
of *Rhododendron tomentosum*

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. 5. 2014

.....

Barbora Koudelková

## Poděkování

Na prvním místě patří poděkování samozřejmě mému školiteli, Mgr. Ondřeji Koukolovi, Ph.D. za nespočetné množství rad, trpělivost a pomoc s praktickou částí práce i za časté konzultace a doporučení literatury pro úspěšné zpracování části teoretické.

Dále bych chtěla poděkovat členům Katedry analytické chemie RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za návrh metodiky extrakce esenciálního oleje a Mgr. Romaně Jarošové za realizaci extrakce a analýzy esenciálního oleje.

Na chemické sekci patří dík za cenné rady také RNDr. Simoně Hybelbauerové, Ph.D. a Doc. RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D.

Děkuji také Mgr. Martinu Weiserovi za přínosné konzultace ohledně statistického zpracování výsledků.

V neposlední řadě děkuji Mgr. Zuzce Haňáčkové za rady a praktickou pomoc.

A nakonec bych samozřejmě chtěla poděkovat členům rodiny za společnost při objíždění lokalit s rojovníkem, za pomoc při nesnázích s prací na počítači a za veškerou další podporu během celého zpracovávání této práce.

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Poděkování</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>Abstrakt</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1 Úvod a cíle práce</b> .....  | <b>6</b>  |
| <b>2 Literární přehled</b> .....  | <b>7</b>  |
| 2.1 <i>Rhododendron tomentosum</i> .....  | 7         |
| 2.2 Sekundární metabolity z <i>R. tomentosum</i> .....  | 8         |
| 2.2.1 Obsah a složení esenciálního oleje .....  | 8         |
| 2.2.2 Využití a účinky esenciálního oleje .....   | 9         |
| 2.3 Endofytické houby z <i>R. tomentosum</i> .....  | 10        |
| 2.4 Růst endofytických hub v prostředí esenciálních olejů .....                                       | 11        |
| <b>3 Metodika</b> .....   | <b>13</b> |
| 3.1 Izolace a určování endofytů z listů <i>R. tomentosum</i> .....                                    | 13        |
| 3.1.1 Sběr materiálu a popis lokalit sběru .....  | 13        |
| 3.1.2 Sterilizace a izolace hub .....   | 14        |
| 3.1.3 Analýza DNA a určování hub .....  | 15        |
| 3.2 Extrakce a analýza esenciálních olejů .....   | 15        |
| 3.3 Růst hub na médiích se sloučeninami z <i>R. tomentosum</i> .....                                  | 15        |
| 3.3.1 Růst hub na médiu s listy <i>R. tomentosum</i> a se slámou .....                                | 15        |
| 3.3.2 Výběr chemických látek z <i>R. tomentosum</i> pro další testování .....                         | 16        |
| 3.3.3 Výpočet koncentrací chemických látek v agarovém médiu .....                                     | 17        |
| 3.3.4 Růst hub na PDA s přidanými chemickými látkami .....  | 18        |
| 3.3.5 Statistické vyhodnocení dat .....   | 19        |
| <b>4 Výsledky</b> .....   | <b>21</b> |
| 4.1 Druhy endofytických hub z <i>R. tomentosum</i> .....  | 21        |
| 4.2 Vliv chemických látek na vybrané kmeny hub .....  | 24        |
| 4.2.1 Chemické látky z <i>R. tomentosum</i> .....   | 24        |
| 4.2.2 Růstové testy na médiu s <i>R. tomentosum</i> a se slámou .....                                 | 25        |
| 4.2.3 Růstové testy na médiu s přidanými chemickými látkami .....                                     | 25        |
| <b>5 Diskuse</b> .....  | <b>32</b> |
| 5.1 Endofytické houby izolované z <i>R. tomentosum</i> .....  | 32        |
| 5.1.1 Druhy izolované s vysokou četností .....  | 32        |
| 5.1.2 Druhy izolované s nižší četností .....  | 33        |
| 5.1.3 Neurčené kmeny .....  | 34        |
| 5.2 Chemické látky extrahované z listů <i>R. tomentosum</i> .....                                     | 34        |
| 5.3 Růst kmenů hub z <i>R. tomentosum</i> a z jiných substrátů na médiu<br>s chemickými látkami ..... | 35        |
| <b>6 Závěr</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>7 Seznam literatury</b> .....  | <b>38</b> |
| <b>8 Přílohy: Primární data</b> .....   | <b>43</b> |

## Abstrakt

*Rhododendron tomentosum* je stálezelený keř, který je typický svým obsahem sekundárních metabolitů, především esenciálního oleje s antimikrobiálními účinky. Diverzita endofytických hub v tomto druhu a jejich případná adaptace na růst v prostředí esenciálního oleje je velmi málo prozkoumána.

Prvním cílem této práce tedy bylo zmapovat diverzitu endofytických hub kolonizujících listy druhu *R. tomentosum* na sedmi lokalitách v ČR a jedné v Estonsku. Z listů *R. tomentosum* jsem izolovala a pomocí srovnání úseků ITS1 a ITS2 rDNA se sekvencemi z GenBank a morfologických znaků určila 37 druhů endofytických hub. Dominantní byly druhy široce rozšířené a vyskytující se jako endofyty v zástupcích většiny rostlin.

Druhým cílem mé práce bylo zjistit, zda esenciální olej z *R. tomentosum* má vliv na jeho endofytické houby. Předpokladem bylo, že kmeny endofytických hub získané z *R. tomentosum* budou růstu v prostředí esenciálního oleje přizpůsobené a na médiích s přidanými různými koncentracemi těchto chemických látek tedy porostou lépe v porovnání s kmeny stejných druhů získaných z jiných substrátů. U čtyř ze sedmi testovaných druhů rostly kmeny získané z *R. tomentosum* rychleji, ale i na médiu bez chemických sloučenin. Většinu kmenů (z *R. tomentosum* i z jiných substrátů) také výrazněji inhibovala až nejvyšší koncentrace chemických látek přidaných do média. Počáteční předpoklad jsem potvrdila pouze u druhu *Desmazierella acicola*, kdy na médiu bez chemických látek rostly oba kmeny srovnatelně a na přidané chemické sloučeniny reagoval citlivěji kmen z jiného substrátu než *R. tomentosum*.

**Klíčová slova:** *Rhododendron tomentosum*, p-cymen,  $\alpha$ -terpinylacetát, myrtenal, antifungální účinky, inhibice, endofytické houby, diverzita, Xylariales

## Abstract

*Rhododendron tomentosum* is an evergreen shrub with a high content of secondary metabolites, particularly essential oils with antimicrobial effects. Diversity of endophytic fungi in this species and their possible adaptation to growth in the essential oil environment is not much explored.

Therefore, the first aim of this thesis was to reveal the diversity of endophytic fungi colonising leaves of *R. tomentosum* on seven localities in the Czech Republic and one in Estonia. I isolated and determined (using comparison of ITS1 and ITS2 rDNA with the sequences from GenBank and morphological signs) 37 species of endophytic fungi. Among them the ubiquitous species colonising the most of the plants as endophytes were dominant.

The second aim of my thesis was to explore whether the essential oil from *R. tomentosum* influences its endophytic fungi. The hypothesis that the strains obtained from *R. tomentosum* would be adapted to growth in the environment of the essential oil was postulated. I supposed that they would grow better on mediums with different concentrations of these chemical compounds added, in comparison with strains of the same species obtained from different substrates. Within four of seven species tested, the strains obtained from *R. tomentosum* grew better, but also on the medium without the chemical compounds. The most of the strains tested (from *R. tomentosum* and also from different substrates) were markedly inhibited only by the highest concentration of chemical compounds added into the medium. I confirmed the initial assumption only for *Desmazierella acicola*. Within this species, both of the strains grew comparably on the medium without the chemical compounds and the strain not obtained from *R. tomentosum* was more susceptible to chemical compounds added.

**Key words:** *Rhododendron tomentosum*, p-cymene,  $\alpha$ -terpinyl-acetate, myrtenal, antifungal effects, inhibition, endophytic fungi, diversity, Xylariales

# 1 Úvod a cíle práce

*Rhododendron tomentosum* (Ericaceae) je stálezelený keř rostoucí na kyselých půdách s rozšířením ve střední a severní Evropě, Severní Americe a Asii. Tento druh je typický svým obsahem sekundárních metabolitů, z nichž největší pozornost je v literatuře věnována esenciálnímu oleji, který vykazuje antioxidační, antifungální a antibakteriální účinky (Dampc a Luczkiewicz, 2013). Diverzita endofytických hub přímo v druhu *R. tomentosum* je poměrně neprozkoumanou oblastí. Pokud se některé studie zabývaly kolonizací zástupců čeledi Ericaceae houbami, šlo především o práce zabývající se erikoidní mykorhizou a kořenovými endofyty daných rostlin (Cairney a Ashford, 2002). Několik málo studií se zabývalo také diverzitou endofytických hub v nadzemních částech zástupců z této čeledi, většina informací je však rozptýlena v podobě pouhých zmínek v různých informačních zdrojích. Prvním z cílů mé diplomové práce tedy bylo:

## 1. Zjištění dominantních druhů endofytických hub v listech *R. tomentosum*.

V listech ze sedmi lokalit v ČR a jedné v Estonsku jsem stanovila diverzitu endofytů. Endofyty jsem izolovala z povrchově sterilizovaných listů na agarové médium a následně určovala srovnáním úseků ITS1 a ITS2 rDNA se sekvencemi z GenBank a podle morfologických znaků.

Endofytické houby se mohou vyskytovat jak uvnitř buněk rostlin (Stone 1988), tak v mezibuněčných prostorech (Boyle et al., 2001). Esenciální oleje jsou syntetizovány právě do mezibuněčných prostor a pod kutikulu listů rostlin (Fahn, 1988; Gersbach, 2002), je tedy pravděpodobné, že s nimi endofytické houby přijdou do kontaktu minimálně při infekci rostliny, ke které dochází právě zvenku, skrze kutikulu, nějakým narušením či zraněním na povrchu listu (Arnold a Herre, 2003). Druhým z cílů mé práce proto bylo:

## 2. Zjistit vliv sekundárních metabolitů (esenciálního oleje) z *R. tomentosum* na jeho endofytické houby.

Předpokládala jsem, že kmeny endofytických hub získané z *R. tomentosum* budou růstu v tomto prostředí přizpůsobené a na médiu s jeho sekundárními metabolity tedy porostou lépe než kmeny stejných druhů hub získané z jiných substrátů. K výběru chemických sloučenin z *R. tomentosum* pro testování růstu jsem použila orientační analýzu esenciálního oleje z listů přímo z daných lokalit a relevantní informace z literatury. Růst vybraných kmenů z *R. tomentosum* a jejich ekvivalentů z jiných substrátů jsem potom testovala na médiu s přidanými danými chemickými sloučeninami v různých koncentracích.

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Rhododendron tomentosum*

Druh *R. tomentosum* (synonymum *Ledum paluste*, česky rojovník bahenní, anglicky wild rosemary, marsh tea, Labrador tea) je stálezelený keř z čeledi Ericaceae dorůstající do výšky 50 až 150 cm s mladými větvemi rezavě žláznatě chlupatými. Má úzké tuhé listy s podvinutými okraji 25 až 35 mm dlouhé a 3 až 5 mm široké, na spodní



Obrázek 1: *Rhododendron tomentosum* na lokalitě Široký kámen

straně pokryté rezavými chloupky, na svrchní straně lesklé, tmavě zelené. Květenstvím je vrcholový okolík, květy jsou bílé, pětičetné, kvete od května do června. Roste na vlhkých kyselých půdách, preferuje spíše stinná stanoviště. Typicky se vyskytuje na rašeliništích, vřesovištích, v borových lesích a pískovcových skalách (Obrázek 1). *R. tomentosum* je rozšířený v severní a střední Evropě, Severní Americe a na severu Asie (Dampc a Luczkiewicz, 2013). V České republice je nejvíce rozšířený na Třeboňsku a v Českém Švýcarsku, dále vzácně na Šumavě, v Krušných horách, Novohradských horách, Českém lese, Adršpašsko-Teplických skalách či v Podkrkonoší (Hejný a Slavík, 2003).

Kron a Judd (1990) ukázali, že druhy dříve řazené do rodu *Ledum* jsou ve skutečnosti podskupinou rodu *Rhododendron*. Další studie však neprokázaly, zda rod *Rhododendron* společně s rodem *Ledum* tvoří monofyletickou skupinu. V současnosti podle Integrovaného taxonomického informačního systému (Integrated Taxonomic Information System on-line database, ITIS) druh *R. tomentosum* zahrnuje mimo jiné také druh *Ledum palustre*.

Díky vysokému obsahu sekundárních metabolitů byl *R. tomentosum* hojně využíván v lidovém léčitelství v Evropě, Asii a Severní Americe. První zmínky v literatuře o jeho použití pocházejí z 16. století, pravděpodobně však byl využíván už mnohem dříve. Dnes jsou sekundární metabolity z *R. tomentosum* předměty mnoha výzkumů, které se zabývají především jejich antimikrobiálními a antioxidačními, ale například i protirakovinnými účinky. (Dampc a Luczkiewicz, 2013)



## 2.2 Sekundární metabolity z *R. tomentosum*

*R. tomentosum* produkuje velké množství různých sekundárních metabolitů, mezi kterými převažuje esenciální olej a dále flavonoidy, hydroxyderiváty kyseliny skořicové, kumarin a další sloučeniny. Většina studií se zabývá především esenciálním olejem právě díky jeho antimikrobiálním účinkům. Ze stejných důvodů se i já v mé práci budu dále zabývat pouze esenciálním olejem. Hlavními složkami esenciálního oleje jsou především kyslíkaté seskviterpeny, kyslíkaté monoterpeny a alifatické monoterpeny. Důležitými konkrétními sloučeninami jsou ledol, palustrol, cyklocolorenon, myrcen, p-cymen a limonen (Dampc a Luczkiewicz, 2013).

### 2.2.1 Obsah a složení esenciálního oleje

Obsah a složení esenciálního oleje v *R. tomentosum* může záviset na několika faktorech. Složení esenciálního oleje závisí na lokalitě výskytu, na dané části rostliny (listy, kmeny), na stáří rostliny a na vegetační fázi.

Různým obsahem esenciálního oleje v závislosti na stáří rostliny se zabývali Butkienė et al. (2008). Mladé výhonky *R. tomentosum*<sup>1</sup> syntetizovaly třikrát až čtyřikrát více celkového množství esenciálního oleje než výhonky staré. Také složení oleje se odlišovalo, staré výhonky obsahovaly více palustrolu než mladé. V další práci se Butkienė a Mockutė (2011) zabývali složením esenciálního oleje v průběhu vegetačních období. Esenciální olej opět obsahoval nejvíce ledolu a palustrolu, a to především v dubnu, květnu a v říjnu. V květnu obsahoval esenciální olej ještě významné množství myrcenu. Dále byly v esenciálním oleji ve významném množství zastoupené monoterpenoidy odvozené od furanu a cyklocolorenony.

Obsah a složení oleje v různých částech rostliny zkoumali Gretšušnikova et al. (2010), kteří extrahovali a analyzovali esenciální olej z lokalit v Estonsku. Obsah oleje ve výhoncích a listech byl třikrát až čtyřikrát větší než v kmenech a také složení oleje se lišilo. V listech a výhoncích převažoval ledol, palustrol, p-cymen a poměrně velké množství  $\gamma$ -terpineolu, zatímco v kmenech bylo nejvíce  $\beta$ -myrcenu a poté ledolu a palustrolu. V další práci zabývající se složením esenciálního oleje v Estonsku získali Raal et al. (2014) podobné výsledky. Hlavními sloučeninami byly opět ledol, palustrol, p-cymen,  $\gamma$ -terpineol a cyklocolorenony. V práci Judzentiene et al. (2012) zkoumali složení esenciálního oleje v semenech. Mezi sloučeninami dominovaly opět ledol a palustrol, objevily se ale i některé sloučeniny specifické pouze pro semena jako  $\beta$ -pinen oxid, isomenthyl acetát, cadalen a guaiazulen.

---

<sup>1</sup> V následujících studiích většinou ještě pod jménem *Ledum palustre*.

V závislosti na lokalitě se složení esenciálního oleje lišilo téměř ve všech studiích. Esenciální oleje na lokalitách v Estonsku a Litvě obsahovaly především palustrol a ledol. Na estonských lokalitách byl navíc velký obsah  $\gamma$ -terpineolu, p-cymenu, lepalolu a isoascaridolu. Olej na litevských lokalitách obsahoval ještě myrcen a limonen. Složení oleje se navíc od sebe lišilo i na dvou různých lokalitách v Litvě (Butkienė et al., 2008; Gretšušnikova et al., 2010). Odlišné složení měl také esenciální olej z lokalit v Koreji, který obsahoval především monoterpeny a kyslíkaté monoterpeny, nikoliv však ledol a palustrol (Kim a Nam, 2006).

### 2.2.2 Využití a účinky esenciálního oleje

Esenciální olej z *R. tomentosum* byl tradičně využíván v lidovém léčitelství proti artróze, revmatismu, onemocněním dýchacích cest, nachlazení, při onemocnění ledvin, bolestech hlavy, zubů, břicha, proti různým vyrážkám včetně poštípání hmyzem a také jako repelent proti blechám či molům. V Německu se v minulosti dokonce *R. tomentosum* přidával do piva, aby bylo opojnější, to však bylo po čase zakázáno, protože takto upravené pivo údajně způsobovalo agresivní chování. Na široké spektrum využití v minulosti navázalo mnoho studií, které se snažily účinnost různých použití *R. tomentosum* prokázat vědecky (Dampc a Luczkiewicz, 2013).

Některé studie se zabývají antioxidační, antifungální a antimikrobiální aktivitou esenciálních olejů z *R. tomentosum*. Belousova et al. (1989) testovali aktivitu mono- a seskviterpenoidů proti *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton mentagrophytes*. Zmíněné sloučeniny vykazovaly mírnou antifungální aktivitu.

Kim a Nam (2006) extrahovali esenciální olej z listů *R. tomentosum* a testovali jeho antioxidační a antimikrobiální účinky. Ve vodě rozpustná část esenciálního oleje vykazovala aktivitu proti bakterii *Clostridium perfringens* a některým kvasinkám. Ve vodě nerozpustná část chemických sloučenin antibakteriální aktivitu nevykazovala. Celý esenciální olej působil inhibičně ještě proti dalším druhům bakterií. Na antioxidační účinky byla testována ve vodě rozpustná část chemických sloučenin a to porovnáváním s dobře známými oxidanty jako je např. kyselina askorbová. Tato část esenciálního oleje vykazovala silné antioxidační schopnosti.

Kromě antioxidační, antifungální a antimikrobiální aktivity bylo vědecky potvrzeno mnoho dalších účinků jako protizánětlivé, analgetické, či insekticidní. Některé studie zkoumaly dokonce protirakovinnou aktivitu *R. tomentosum* či jeho antiradiační účinky (Dampc a Luczkiewicz, 2013).

### 2.3 Endofytické houby z *R. tomentosum*

Diverzitě endofytických hub v druhu *R. tomentosum* se cíleně věnovalo velmi málo studií. V několika pracích byly houby na družích dříve řazených do rodu *Ledum* pouze zmíněné a informace jsou rozptýlené spíše jako krátké zmínky v různých literárních zdrojích. Studie, které se zabývaly diverzitou hub v jiných zástupcích čeledi Ericaceae, se věnovaly především kořenovým endofytům a houbám tvořícím erikoidní mykorhizu, která pomáhá mnoha rostlinám z této čeledi přežít na kyselých stanovištích (Mitchell a Gibson, 2006).

Několik prací se zabývalo endofytickými houbami v nadzemních pletivech rostlin z čeledi Ericaceae. Petrini et al. (1982) se věnovali diverzitě endofytických hub na dvou zástupcích čeledi Ericaceae v Oregonu, ze kterých izolovali 24 druhů hub. Některé druhy (*Acremonium* sp., *Nodulisporium* sp., *Xylaria* sp.) izolované z těchto zástupců se vyskytují běžně jako endofyty mnoha různých rostlin. V této práci byly také diskutovány další faktory, které mohou diverzitu hub ovlivňovat jako např. hustota porostu. Rostliny rostoucí na více otevřených stanovištích byly endofyty kolonizovány méně.

V další studii se Petrini (1984) zabýval diverzitou endofytických hub v šesti zástupcích čeledi Ericaceae ve Velké Británii. Z daných rostlin izoloval 58 druhů hub, z nichž některé (*Pezizula myrtillina*, *Phyllosticta pyrolae*) byly z čeledi Ericaceae známy již z dřívějších studií, některé naopak byly z daných hostitelů izolovány poprvé (*Helicodendron luteoalbum*, *Daldinia* sp., *Xylaria* sp.).

V některých pracích se kromě diverzity endofytů věnovali také produkci různých antibakteriálních a antifungálních látek endofyty. Fisher et al. (1984) izolovali 13 druhů hub z pěti zástupců čeledi Ericaceae, přičemž šest druhů endofytů vykazovalo antibakteriální nebo antifungální aktivitu.

V dalších pracích byly už zmíněny endofytické houby také na některých zástupcích rodu *Rhododendron*. Okane et al. (1998) se zabývali endofytickými houbami na japonských zástupcích čeledi Ericaceae, mezi nimi také na šesti družích rodu *Rhododendron*. Mezi izolovanými houbami bylo opět několik zástupců vyskytujících se hojně ve většině druhů rostlin. V této studii kromě druhů rodu *Rhododendron* izolovali endofyty také z druhu *Pieris japonica*, který, podobně jako *R. tomentosum*, produkuje různé sekundární metabolity, například některé toxické diterpeny. V této studii byly některé endofytické houby (např. *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia* sp.) z druhu *P. japonica* izolovány s menší četností než z ostatních zkoumaných rostlin.

Houby z druhu *Rhododendron groenlandicum*<sup>2</sup> zmiňuje práce U'Ren et al. (2012). V této práci se zabývali diverzitou endofytických hub z velkého množství hostitelů a lokalit v závislosti na různých biotických abiotických faktorech. Druh *R. groenlandicum* je v této práci zmíněn na dvou lokalitách na Aljašce, v subalpínské tundře a v jehličnatém lese. Na první lokalitě z tohoto druhu získali 19 askomycetů a na druhé lokalitě 31 askomycetů.

Našla jsem pouze jednu studii, která se zabývala endofytickými houbami přímo v druhu *R. tomentosum*. Tejesvi et al. (2011) izolovali endofytické houby z *R. tomentosum* ve Finsku a zabývali se jejich antibakteriálními a antifungálními účinky. Z 87 izolovaných druhů byly dominantní druhy rodu *Fusarium* a dále typické endofytické druhy rodů vyskytujících se v rostlinách po celém světě jako *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aureobasidium*, *Lecythophora*, *Sordaria*, *Phoma* a *Xylaria*.

Někteří autoři také zmínili saprotrofní houby na družících dřívě náležejících do rodu *Ledum*. Například Sutton (1969) se zabýval druhy hub na listech z opadu druhu *Rhododendron groenlandicum*. Na těchto listech popsal nový druh houby *Ampulliferina persimplex*, který kolonizoval povrch listů společně s druhy *Lophodermium sphaerioides* a *Griphosphaeria corticola*. Tyto druhy byly nejčastější na tlejících listech *R. groenlandicum* v Kanadě. Saprotrofní druh houby zmínila také Barr (1970) na *Rhododendron decumbens*<sup>3</sup>. Jednalo se o druh *Physalospora hyperborea*. Také ve výše zmíněné práci Okane et al. (1998) našli několik druhů hub vyskytujících se buď v živých listech i v opadu druhů rodu *Rhododendron*, nebo pouze jako saprotrofové v listech z opadu (např. *Epicoccum purpurascens*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium* spp.).

## 2.4 Růst endofytických hub v prostředí esenciálních olejů

Několik prací se věnovalo přímo růstu endofytických hub v prostředí esenciálních olejů z dané rostliny. Espinosa-Garcia a Langenheim (1991a) se věnovali vlivu esenciálních olejů ze *Sequoia sempervirens* na jeho příležitostné patogeny *Pestalotiopsis funerea*, *Phomopsis occulta*, *Seiridium juniperi* a *Cryptosporiopsis abietina* a endofytický druh *Meria parkeri*, který ze *S. sempervirens* ještě izolován nebyl. Vliv esenciálních olejů na druhy hub byl obecně inhibiční, jeho působení se ale lišilo intenzitou mezi jednotlivými druhy hub i mezi kmeny jednoho druhu. Nejnáchylnější k působení esenciálního oleje byl endofytický druh *M. parkeri*. V další práci Espinosa-Garcia a Langenheim (1991b) zkoumali vliv konkrétních sloučenin z esenciálního oleje ze *S. sempervirens*, sabinenu a  $\gamma$ -terpinenu,

<sup>2</sup> V této a dalších pracích ještě pod jménem *Ledum groenlandicum*, já používám název dle ITIS.

<sup>3</sup> V této práci ještě pod jménem *Ledum decumbens*, já používám název dle ITIS.

v různých poměrech na endofytické houby (*Botrytis cinerea*, *Cryptosporiopsis abietina*, *Pestalotiopsis funerea*, *Phomopsis occulta*, *Pleuroplaconema* sp. a *Seiridium juniperi*) ze *S. sempervirens*. Obě sloučeniny působily na růst endofytů inhibičně, účinky se lišily u různých druhů endofytů. Nejvíce náchylný k působení monoterpenů byl mutualistický druh *Pleuroplaconema* sp., naopak nejméně náchylné byly patogenní druhy *P. funerea* a *S. juniperi*. Ve třetí studii se Espinosa-Garcia a Langenheim (1991c) zabývali opět vlivem esenciálních olejů z různých konkrétních stromů *S. sempervirens* na kmeny jeho běžného endofytického druhu *Pleuroplacomema* sp. Esenciální oleje z různých stromů měly různý vliv na růst endofytů. Autoři dále předpokládali, že růst endofytů izolovaných z konkrétního stromu bude různě ovlivněn esenciálními oleji získanými z jiných stromů než kmeny *Pleuroplaconema* sp. Tento předpoklad se však nepodařilo potvrdit.

Jurc et al. (1999) zkoumali interakci terpenů tří poddruhů *Pinus nigra* z různých lokalit s endofyty z *P. nigra*. Výzkum prováděli se třemi druhy, latentním patogenem *Cenangium ferruginosum*, fakultativním patogenem *Sphaeropsis sapinea* a saprotrofem *Phialophora hoffmannii*. Všechny tři druhy se vyskytují jako endofyté v *P. nigra*. Dané terpeny neinhibovaly růst endofytů, naopak terpeny z poddruhu *P. nigra* ssp. *austriaca* (charakteristické větším obsahem  $\alpha$ -pinenu a germacrenu-d) podporovaly růst *C. ferruginosum*.

V práci Ganley a Newcombe (2006) se sice nevěnovali přímo interakci endofytů s esenciálními oleji, ale zabývali se jiným faktorem limitujícím jejich růst. Porovnávali růst endofytů z jehlic a semen *Pinus monticola* na médiu s limitujícím množstvím dusíku. Endofytické houby z jehlic (zástupci čeledi Rhytismataceae) téměř nebyly schopné růst na médiu obsahujícím pouze 0,17 % dusíku (rostl pouze jeden ze 17 kmenů), zatímco endofytické houby ze semen (zástupci jiných čeledí) na tomto limitujícím médiu rostly lépe (25 z 31 endofytů bylo schopno růstu). Kmeny z jehlic tedy pravděpodobně nekolonizovaly mezibuněčné prostory, kde je množství dusíku také limitující, zatímco kmeny ze semen byly prostředí s malým množstvím dusíku přizpůsobené a proto v něm byly schopny růstu.

## 3 Metodika

### 3.1 Izolace a určování endofytů z listů *R. tomentosum*

#### 3.1.1 Sběr materiálu a popis lokalit sběru

Při prvotním odběru pro optimalizaci metodiky jsem použila listy *R. tomentosum* z Botanické zahrady PřF UK<sup>4</sup> sebrané na jaře 2012. Použila jsem jednu větvičku s jednoletými a dvouletými listy.

Listy *R. tomentosum* pro hlavní pokus jsem získala v průběhu října a listopadu 2012 z osmi lokalit: PR<sup>5</sup> Černá jezírka, PP<sup>6</sup> Široký kámen, PR Konvalinkový vrch, PR Babylon, Pryskyřičný důl, PR Podkovák, Botanická zahrada PřF UK, PR Endla v Estonsku. V ideálním případě jsem použila pět větvíček z každé lokality, přičemž každá větvička pocházela z jiné rostliny. Z každé větvičky jsem použila dva jednoleté listy, celkem tedy 80 listů.

PR Černá jezírka je součástí čtyř rašelinišť na náhorní plošině Jizerských hor (kolem 900 m. n. m.). Jedná se o rašeliniště, která obklopují podmáčené smrčiny (*Picea* spp.) poškozené imisemi. Vyskytuje se zde typická flóra horských vrchovišť: *Pinus mugo*, *Eriophorum vaginatum*, *Lycopodium annotinum*, *Andromeda polifolia*, *Empetrum nigrum*, *Sphagnum* sp., nebo *Drosera rotundifolia*. *R. tomentosum* zde roste přímo na břehu jednoho z jezírek.

PP Široký kámen na území Ralské pahorkatiny u obce Hamr na Jezeře je pískovcová stolová hora (430 m. n. m.) s plochým vrcholem a strmými stěnami. Dominuje zde borový les (*Pinus sylvestris*), dále se ve stromovém patře vyskytuje *Sorbus aria*. V podrostu zvláště na slunném jižním svahu převažuje *Calluna vulgaris* a dále *Vaccinium myrtillus*. *R. tomentosum* zde roste pouze na stinném severním svahu.

PP Konvalinkový vrch u obce Doksy je pískovcový útvar (290 m. n. m.) pokrytý opět borovým lesem (*P. sylvestris*), v jehož podrostu dominuje *C. vulgaris* (spíše na slunných stráních) či *V. myrtillus*. Pod Konvalinkovým vrchem se nacházejí slatinné louky (PR Slunečný dvůr) s výskytem několika orchidejí (*Dactylorhiza majalis*, *Dactylorhiza bohemica*, *Epipactis palustris*). Druh *R. tomentosum* se vyskytuje pouze na chladnější severní straně.

PR Babylon u obce Vysoká Lípa je nyní součástí národního parku České Švýcarsko. Nachází se zde pískovcová skalní města a opět borový les (*P. sylvestris*) s příměsí smrků (*Picea* spp.) a s podrostem *V. myrtillus*. Nadmořská výška se pohybuje okolo 250 m. n. m.

---

<sup>4</sup> Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

<sup>5</sup> Přírodní rezervace

<sup>6</sup> Přírodní památka

Pryskyřičný důl, také v Českém Švýcarsku nedaleko obce Doubice, je dlouhé rašeliniště nacházející se na dně skalní rokly (400 m. n. m.). V rokli se nachází borový les (*P. sylvestris*) s podrostem *V. myrtillus* a v rašeliništi také *Sphagnum* sp.

PR Podkovák v Českém lese se nachází u obce Lesná. Rezervace leží v nadmořské výšce přibližně 708 m. n. m. v plochem sedle, kde pramení Lesní potok. Jedná se o rašeliniště s typickou flórou. Nachází se zde blatkový bor (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*) s občasným výskytem smrku (*Picea* spp.). V podrostu se nachází *Vaccinium uliginosum*, *V. myrtillus*, *E. vaginatum*, *A. polifolia* nebo *E. nigrum*. V okolí rašelinných jezírek roste právě také *R. tomentosum*.

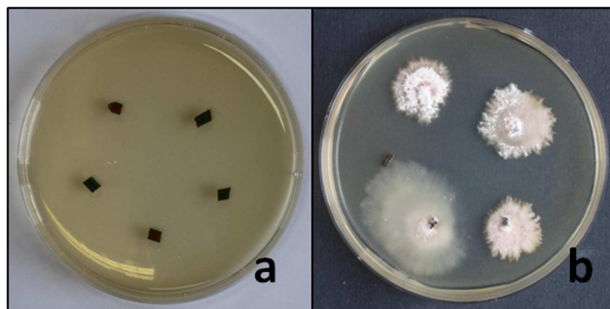
V Botanické zahradě PřF UK v Praze roste *R. tomentosum* jako zástupce expozice rašeliništních vřesovcovitých rostlin.

PR Endla (Endla looduskaitseala) se nachází v Estonsku u města Jõgeva. Jedná se o rozsáhlý systém rašelinišť, podmáčených luk a lesů, kde dominuje porost *P. sylvestris*.

### 3.1.2 Sterilizace a izolace hub

V prvotním pokusu s listy z Botanické zahrady PřF UK jsem použila nejprve metodu povrchové sterilizace listů 30% peroxidem vodíku (Kinkel a Andrews, 1988). Takto sterilizované listy jsem umístila na 2° sladinový agar (2°SL, konečný obsah sacharózy 2 % měřeno Ballingovým cukroměrem, agar 18 g/l; Fassatiová, 1986). Avšak žádné houby z listů nevyrostaly, koncentrovaný peroxid vodíku pravděpodobně pronikl dovnitř pletiv a zahubil houby i uvnitř listů.

Listy pro hlavní pokus jsem proto povrchově sterilizovala 10 s v 95% etanolu, 20 s v 0,5% chlornanu sodném (Savo), 10 s v etanolu a opláchla ve sterilní destilované



Obrázek 2: Rozstříhaný list umístěný na 2°SL (a), vyrůstající kolonie hub (b)

vodě (Fisher et al., 1984; Okane et al., 1998; Schulz et al., 1993). Po sterilizaci jsem každý list nastříhala na pět částí, umístila na 2°SL a ponechala při pokojové teplotě (Obrázek 2a). Celkem jsem tedy měla 400 částí listů na 80 miskách.

Jednotlivé vyrůstající kolonie (Obrázek 2b) jsem nejprve rozlišovala podle morfotypů a dále jsem stanovila četnost jednotlivých morfotypů (tj. z kolika ústřížků listů daný morfotyp vyrůstal). Reprezentativní kmene jsem následně přeočkovala do čistých kultur pro určení a označila kódy BK1 až BK47.

### 3.1.3 Analýza DNA a určování hub

Z reprezentativních izolátů jsem izolovala DNA pomocí Zymo Research Fungal/Bacterial DNA Extraction Kit (Zymo Research, USA). Postupovala jsem podle návodu, pouze v posledním kroku jsem použila 30 µl elučního pufru přehřátého na teplotu 65 °C. Následovala PCR úseku ITS1 + 5,8S + ITS2 + 28S rDNA pomocí primerů ITS1F a NL4 (White et al., 1990) Jako reakční směs jsem použila 5PRIME MasterMix (5Prime, USA). Dále jsem provedla purifikaci DNA za použití Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan). Opět jsem postupovala podle návodu, pouze v posledním kroku jsem použila 25 µl elučního pufru přehřátého na teplotu 65 °C. Jako poslední proběhla příprava na sekvenaci, při níž jsem použila 1 µl primeru (ITS1F) a 7 µl produktu. Sekvence proběhla v Servisní laboratoři DNA na PřF UK. Sekvence úseků ITS1, ITS2 a částečně 28S rDNA jsem srovnala se sekvencemi z GenBank za pomoci algoritmu BLAST (Altschul et al., 1990). Za určení do druhu jsem považovala shodu 99 – 100 %. Následovalo dourčení některých hub podle morfologických znaků a relevantní taxonomické literatury. Řídila jsem se současnými jmény hub uvedenými na webu Index Fungorum. Určené druhy jsem následně deponovala do sbírky kultur hub (CCF, Culture Collection of Fungi, Univerzita Karlova v Praze).

## 3.2 Extrakce a analýza esenciálních olejů

Extrakce a analýza esenciálních olejů probíhaly na Katedře analytické chemie PřF UK a byly provedeny zvlášť pro každou z osmi lokalit.

Esenciální oleje z listů *R. tomentosum* byly získány pomocí mikroextrakce na pevnou fázi (SPME, solid phase microextraction). Pro SPME bylo použito vlákno polydimethylsiloxan/carboxen/divinylbenzen (PDMS/CX/DVB; Čabala, R., osobní sdělení). Pro extrakci oleje bylo použito přibližně 0,15 g čerstvých listů z každé lokality. Esenciální oleje byly analyzovány pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS).

## 3.3 Růst hub na médiích se sloučeninami z *R. tomentosum*

### 3.3.1 Růst hub na médiu s listy *R. tomentosum* a se slámou

Pro prvotní zjištění reakce hub na médium se sekundárními metabolity jsem provedla testování růstu vybraných druhů (zatím pouze kmeny izolované z *R. tomentosum*) na médiu s přidanými listy *R. tomentosum*. Jako ekvivalentní médium s přidaným rostlinným materiálem, ovšem bez sekundárních metabolitů, jsem zvolila médium se slámou.



Přibližně 15 g listů *R. tomentosum* jsem rozmixovala v 1 l destilované vody, přidala 18 g agaru a sterilizovala v autoklávu, pH média bylo 5,8. Dále jsem 15 g rozstříhané slámy a 18 g agaru přidala do 1 l vody a sterilizovala v autoklávu, pH slámového média bylo 6,1. Do půlených misek jsem na jednu polovinu nalila médium s listy *R. tomentosum* a na druhou polovinu médium se slámou. Na půlící přepážku jsem umístila korkovrtem vyříznuté inokulum vybraných kmenů hub (Tabulka 1) narostlých na 2°SL. Misky jsem ponechala při pokojové teplotě a měřila jsem poloměr kolonií na slámovém médiu a na médiu s listy *R. tomentosum* po jednom a dvou týdnech. Stejně jsem provedla kontrolu, kdy byl v obou polovinách misky agar se slámou. Pro každý druh houby jsem toto testování provedla ve třech opakováních (celkem i s kontrolami tedy 78 misek).

Tabulka 1: Kmeny hub použité při prvotním testování růstu na médiu s *R. tomentosum* a na médiu se slámou

|       |                              |
|-------|------------------------------|
| BK 17 | <i>Hypoxylon howeanum</i>    |
| BK 19 | <i>Khuskia oryzae</i>        |
| BK 20 | <i>Sordariomycetes</i> sp. 1 |
| BK 22 | <i>Chaetomium globosum</i>   |
| BK 23 | <i>Diaporthe eres</i>        |
| BK 26 | <i>Epicoccum nigrum</i>      |
| BK 27 | <i>Bulgaria inquinans</i>    |
| BK 29 | <i>Desmazierella acicola</i> |
| BK 30 | <i>Apiospora montagnei</i>   |
| BK 31 | <i>Lecytophora</i> sp.       |
| BK 32 | <i>Sordaria</i> sp.          |
| BK 40 | <i>Bjerkandera adusta</i>    |
| BK 43 | <i>Physalospora vaccinii</i> |

### 3.3.2 Výběr chemických látek z *R. tomentosum* pro další testování

V listech *R. tomentosum* z každé lokality byly analyzovány desítky chemických sloučenin. Pomocí procentuálního obsahu plochy píku dané sloučeniny lze velmi přibližně určit její procentuální množství v celkovém objemu esenciálního oleje v listech. Takto jsem vybrala šest nejzastoupenějších chemických látek v listech: p-cymen (na sedmi lokalitách, průměrně 24,93 %), alfa-terpinylacetát (na sedmi lokalitách, 12,64 %), piperiton-oxid (na šesti lokalitách, 3,16 %), myrtenal (na šesti lokalitách, 1,63 %),  $\beta$ -pinen (na osmi lokalitách, 1,04 %), ledol (pouze v Estonsku, 17,81 %). Do dalších pokusů jsem na základě dostupnosti použila tyto sloučeniny: p-cymen (čistota 99 % hmot.),  $\alpha$ -terpinylacetát (čistota 96 % hmot.), myrtenal (čistota 98 % hmot; Sigma – Aldrich, ČR).

### 3.3.3 Výpočet koncentrací chemických látek v agarovém médiu

Obsah esenciálního oleje v listech *R. tomentosum* nebyl při chemické analýze stanoven, proto jsem tuto informaci vypočítala z údajů v literatuře. V práci Butkienė et al. (2008) byl obsah esenciálního oleje 0,45 až 0,55 % ze suché váhy listů. V práci Gretšušnikova et al. (2010) tvořil obsah esenciálního oleje v listech 0,92 % suché váhy. V práci Kim a Nam (2006) byl obsah oleje v listech 0,6 % jejich suché váhy. Z těchto tří údajů jsem spočítala aritmetický průměr 0,69 %.

Poměr čerstvé a suché hmotnosti jsem určila tak, že jsem zvážila čerstvé listy *R. tomentosum*, následně jsem je vysušila při 60 °C až do konstantní hmotnosti a znovu zvážila. Suchá hmotnost listů tvořila přibližně 50 % z čerstvé hmotnosti. Živé listy tedy obsahovaly přibližně 0,35 % (hmot.) esenciálního oleje. Na jeden litr média tedy vycházelo 3,5 ml esenciálního oleje, z toho 25 %, tedy 0,875 ml p-cymenu, 12,5 %, tedy 0,438 ml alfa-terpinylacetátu a 1,6 %, tedy 0,056 ml myrtenalu na litr média. Toto jsem určila jako nejvyšší koncentrace, následovaly dvě, vždy o řád nižší koncentrace (Tabulka 2).

Tabulka 2: Koncentrace látek z *R. tomentosum* v PDA určeném pro růstové testy (v ml/l)

|                           | C1      | C2     | C3    |
|---------------------------|---------|--------|-------|
| p-cymen                   | 0,00875 | 0,0875 | 0,875 |
| $\alpha$ -terpinyl acetát | 0,00438 | 0,0438 | 0,438 |
| myrtenal                  | 0,00056 | 0,0056 | 0,056 |
| celková koncentrace       | 0,01369 | 0,1369 | 1,369 |

Jako médium jsem použila potato dextrose agar (PDA; HiMedia Laboratories, Indie). PDA používali například Chang et al. (1999) nebo Verma et al. (2011), kteří testovali antifungální účinky rostlinných sekundárních metabolitů.

Dané chemikálie jsem před přidáním do média rozpustila v koncentrovaném metanolu (Hybelbauerová, S., osobní sdělení; Krause-Baranowska et al., 2002) vždy tak, aby hmotnostní koncentrace metanolu ve výsledném médiu byla 1%. Tato koncentrace by neměla negativně ovlivňovat růst hub (Žabka, M., osobní sdělení).

Jako rozpouštědlo daných chemikálií jsem na kmenu BK19 (*Khuskia oryzae*) testovala také 1% dimethylsulfoxid (DMSO). Jeho celková koncentrace v médiu byla 0,01 % (Chuang et al., 2007; Verma et al., 2011). Některé chemikálie se v něm však rozpouštěly špatně. Tvořily viditelnou fázi na povrchu agaru, která pravděpodobně úplně inhibovala růst hub (Tabulka 3).

Tabulka 3: Výsledky růstového testu kmenu BK19 (*Khuskia oryzae*) za použití DMSO jako rozpouštědla sekundárních metabolitů

| Dny               | Poloměr kolonie v mm (průměr z pěti měření) ve 2. až 5. dnu |      |      |      |
|-------------------|---|------|------|------|
|                   | 2.  | 3.   | 4.   | 5.   |
| PDA+DMSO+C1       | 19,2  | 38   | 40   | 40   |
| PDA+DMSO+C2       | 17,8  | 36,2 | 40   | 40   |
| PDA+DMSO+C3       | 0   | 0    | 0    | 0    |
| Kontrola PDA      | 16,2  | 35,8 | 40,0 | 40,0 |
| Kontrola PDA+DMSO | 18,0  | 35,2 | 39,2 | 39,2 |

Při přidání koncentrace C3 se pravděpodobně vytvořila fáze nerozpuštěných sekundárních metabolitů na povrchu celé misky a úplně inhibovala růst hub. Při koncentracích C2 a C1 sekundární metabolity vytvořily v PDA jen malou kapku, která naopak růst neovlivňovala vůbec. Z kontroly je patrné, že růst hub mohl také nepatrně inhibovat samotný DMSO.

### 3.3.4 Růst hub na PDA s přidáními chemickými látkami

Růst vybraných endofytů na PDA s chemickými sloučeninami z *R. tomentosum* jsem srovnávala s kmeny hub stejných druhů získaných z jiných substrátů.

Kmeny hub vybrané do testování jsem před zahájením pokusu nechala narůst na agar s přidáními rozmixovanými listy *R. tomentosum* (Kapitola 3.3.1). Houby, které byly delší dobu pěstované v kultuře, mohly totiž postupně ztratit některé specifické vlastnosti z přírodního prostředí (Kolařík, M., osobní sdělení). Agar s listy *R. tomentosum* by měl tedy toto přírodní prostředí simulovat.

Kmeny do testování (Tabulka 4) jsem vybírala podle četnosti, se kterou jsem je izolovala z *R. tomentosum* a podle dostupnosti ekvivalentních kmenů ve sbírce CCF a Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holandsko).

Na misky s danými koncentracemi chemických sloučenin (každá v pěti opakováních) jsem umístila korkovrtem vyříznutá inokula vybraných kmenů hub o průměru tři mm a ponechala při pokojové teplotě. Poloměr kolonií od okraje inokula jsem měřila každý den po dobu jednoho týdne. Jako kontrolu jsem použila jak samotný PDA, tak PDA s rozpouštědlem – metanolem. Celkem tedy měření probíhalo na 350 miskách, 50 misek na jeden kmen.

Tabulka 4: Kmeny izolované z *R. tomentosum* a jejich ekvivalenty z jiných substrátů vybrané pro růstové testy

| Kmen z <i>R. tomentosum</i> |                              | Ekvivalent z jiného substrátu |                                | Substrát                           |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| BK17                        | <i>Hypoxylon howeanum</i>    | CBS143.73                     | <i>Hypoxylon howeanum</i>      | větvička <i>Fraxinus excelsior</i> |
| BK19                        | <i>Khuskia oryzae</i>        | CCF3756                       | <i>Nigrospora oryzae</i>       | větev <i>Ulmus laevis</i>          |
| BK22                        | <i>Chaetomium globosum</i>   | CCF3429                       | <i>Chaetomium globosum</i>     | obilky kukuřice                    |
| BK23                        | <i>Diaporthe eres</i>        | CCF3927                       | <i>Diaporthe eres</i>          | větev <i>Ulmus laevis</i>          |
| BK27                        | <i>Bulgaria inquinans</i>    |                               | <i>Bulgaria inquinans</i>      | padlý kmen <i>Fagus sylvatica</i>  |
| BK29                        | <i>Desmazierella acicola</i> | CCF3739                       | <i>Verticicladium trifidum</i> | opad <i>Pinus sylvestris</i>       |
| BK30                        | <i>Apiospora montagnei</i>   | CCF1436                       | <i>Apiospora montagnei</i>     | infekce ze vzduchu                 |

### 3.3.5 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat jsem prováděla v programu PAST (Hammer et al., 2001). Pro vyhodnocení růstu hub na médiích s přidaným *R. tomentosum* a se slámou jsem použila párový t test. Použila jsem dvojice hodnot, vždy poloměr kolonie v mm (průměrná hodnota ze tří opakování) na médiu s *R. tomentosum* a poloměr kolonie na médiu se slámou pro daný kmen houby. Pro párový t test je podmínkou vzájemná nezávislost mezi dvojicemi (kmeny hub) a naopak závislost uvnitř dvojic (jeden kmen houby na půlené misce s médiem s *R. tomentosum* a se slámou). Stejný test jsem použila pro kontroly, tam potom jednu dvojici tvořila jedna a druhá polovina misky se slámovým médiem.

K vyhodnocování růstových testů na médiu s přidanými sloučeninami z *R. tomentosum* jsem použila dvě metody. Dvoucestnou analýzu rozptylu (two way analysis of variance, ANOVA) jsem použila pro zjištění rozdílu růstu hub na kontrolách: na samotném PDA a na PDA s metanolem. Zjišťovala jsem, zda se liší růst kmenů z *R. tomentosum* a z jiných substrátů na těchto kontrolních médiích a také, zda je růst hub nějak ovlivněn přidaným metanolem. První nezávisle proměnná tedy určovala, zda se jedná o kmen z *R. tomentosum* nebo z jiného substrátu, druhá nezávisle proměnná určovala, zda jde o růst na PDA nebo PDA s metanolem. Jako závisle proměnnou jsem zadala poloměr kolonie v mm první den, kdy rychlejší ze dvou kmenů houby dorostl k okraji misky. Pokud kmen k okraji za sedm měřených dní nedorostl, zadala jsem poloměr kolonie v mm poslední den měření. U kmenů *Chaetomium globosum* jsem použila hodnoty naměřené čtvrtý den, protože další dny došlo ke kontaminaci misek.

Analýzu kovariance (one way analysis of covariance, ANCOVA) jsem použila k zjištění, jak se liší růst kmenů z *R. tomentosum* a z jiných substrátů s různými koncentracemi chemických sloučenin přidaných do média. Dvě skupiny v této analýze tvořily kmeny z *R. tomentosum* a kmeny z jiných substrátů. Nezávisle proměnnou byla celková koncentrace chemických sloučenin v médiu (Tabulka 2, Kapitola 3.3.3). Nulová koncentrace představovala PDA s metanolem. Jako závisle proměnnou jsem zadala opět poloměr kolonie v mm první den, kdy rychlejší ze dvou kmenů houby dorostl k okraji misky. Pokud kmen k okraji za sedm měřených dní nedorostl, zadala jsem růst v mm poslední den měření. U kmenů *C. globosum* jsem použila hodnoty naměřené čtvrtý den, protože další dny došlo ke kontaminaci misek.

Grafy zobrazující časový průběh růstu jsem vytvářela v programu Excel 2007. Pro konstrukci těchto grafů jsem pro každý den použila vždy průměrnou hodnotu (aritmetický průměr) z pěti prováděných opakování.

## 4 Výsledky

### 4.1 Druhy endofytických hub z *R. tomentosum*

V předpokusu s listy z Botanické zahrady PřF UK na jaře 2012 jsem izolovala a na základě podobnosti ITS rDNA se sekvencemi z GenBank určila 10 druhů hub (Tabulka 5).

Tabulka 5: Druhy endofytů izolované z *R. tomentosum* z Botanické zahrady PřF UK (četnost udává, z kolika ústřížků daný druh vyrůstal)

| Kód  | 1-leté listy                        | Četnost | 2-leté listy                     | Četnost |
|------|-------------------------------------|---------|----------------------------------|---------|
| BK1  | <i>Lewia</i> sp.                    | 3       |                                  |         |
| BK2  | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 3       |                                  |         |
| BK3  | <i>Hypoxylon fragiforme</i>         | 1       |                                  |         |
| BK4  | <i>Lecytophora fasciculata</i>      | 1       | <i>Lecytophora fasciculata</i>   | 1       |
| BK5  |                                     |         | <i>Khuskia oryzae</i>            | 1       |
| BK6  |                                     |         | <i>Chaetomium bostrychodes</i>   | 1       |
| BK7  |                                     |         | <i>Peyronellaea glomerata</i>    | 1       |
| BK8  |                                     |         | <i>Hypoxylon howeanum</i>        | 1       |
| BK9  | <i>Alternaria</i> sp.               | 1       |                                  |         |
| BK15 |                                     |         | <i>Annulohypoxylon cohaerens</i> | 1       |

Použila jsem jednoleté i dvouleté listy, v četnosti endofytů jsem ale nezaznamenala rozdíl. To však mohlo být způsobeno velmi malým studovaným vzorkem, protože literatura uvádí vyšší četnost a diverzitu endofytů ve starších listech (Arnold a Herre, 2003).

Z listů *R. tomentosum* ze sedmi lokalit v ČR a jedné v Estonsku jsem na podzim 2013 (sběr listů proběhl na podzim právě díky výše zmíněnému stáří listů) izolovala a na základě podobnosti ITS rDNA se sekvencemi v GenBank určila 30 druhů hub z celkem 400 částí listů (Tabulka 6).

Nejčetnější druh (*Hypoxylon howeanum*) se také vyskytoval na největším počtu lokalit spolu s druhem *Khuskia oryzae*. Oba dva zmíněné druhy chyběly pouze na estonské lokalitě, druh *H. howeanum* se nevyskytoval ještě v PR Babylon v Českém Švýcarsku. Na čtyřech lokalitách se nacházely druhy *Desmazierella acicola*, *Apiospora montagnei* a *Bulgaria inquinans*. Více než polovina izolovaných druhů (celkem 17) se vyskytovala pouze na jedné lokalitě.

Tabulka 6: Druhy endofytů izolované z listů *R. tomentosum* a jejich taxonomické zařazení (četnost udává, z kolika ústřížků daný druh vyrůstal)

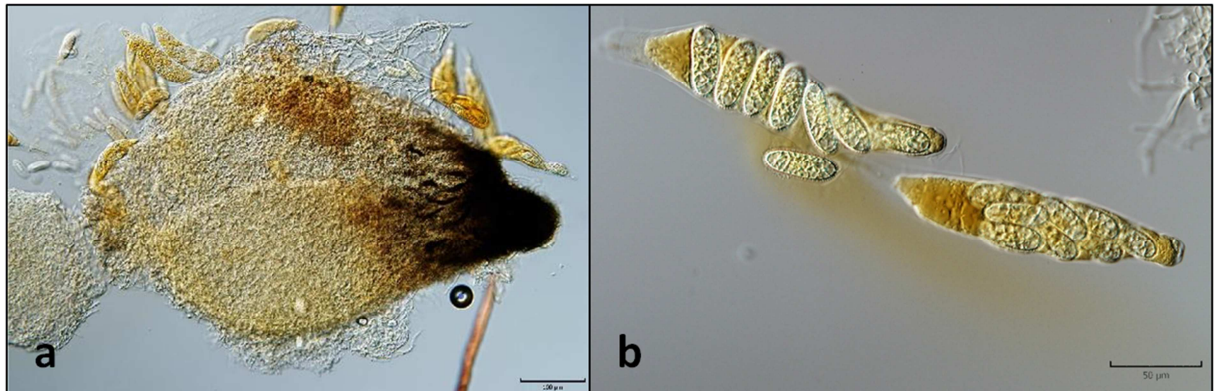
| Kód  | Kód CCF | Název                        | Řád               | Četnost    | Počet lokalit |
|------|---------|------------------------------|-------------------|------------|---------------|
| BK17 | 4627    | <i>Hypoxylon howeanum</i>    | Xylariales        | 39         | 6             |
| BK20 | 4629    | <i>Sordariomycetes</i> sp. 1 |                   | 21         | 2             |
| BK18 |         | <i>Hypoxylon fragiforme</i>  | Xylariales        | 16         | 3             |
| BK21 | 4630    | <i>Sordariomycetes</i> sp. 2 |                   | 14         | 2             |
| BK19 | 4628    | <i>Khuskia oryzae</i>        | Trichosphaeriales | 13         | 7             |
| BK29 |         | <i>Desmazierella acicola</i> | Pezizales         | 7          | 4             |
| BK30 | 4634    | <i>Apiospora montagnei</i>   | Incertae sedis    | 7          | 4             |
| BK25 |         | <i>Alternaria</i> sp.        | Pleosporales      | 6          | 3             |
| BK31 |         | <i>Lecythophora</i> sp.      | Coniochaetales    | 6          | 1             |
| BK35 | 4637    | <i>Sordariomycetes</i> sp. 3 |                   | 5          | 2             |
| BK22 | 4631    | <i>Chaetomium globosum</i>   | Sordariales       | 4          | 2             |
| BK27 | 4633    | <i>Bulgaria inquinans</i>    | Leotiales         | 4          | 4             |
| BK28 |         | <i>Cladosporium</i> sp.      | Capnodiales       | 3          | 1             |
| BK32 | 4635    | <i>Sordaria</i> sp.          | Sordariales       | 3          | 3             |
| BK45 |         | <i>Clonostachys rosea</i>    | Hypocreales       | 3          | 1             |
| BK46 |         | <i>Nigrospora</i> sp. 2      | Trichosphaeriales | 3          | 2             |
| BK36 | 4638    | <i>Anthostomella pinea</i>   | Xylariales        | 2          | 1             |
| BK42 | 4641    | <i>Hypoxylon rubiginosum</i> | Xylariales        | 2          | 1             |
| BK43 | 4642    | <i>Physalospora vaccinii</i> | Xylariales        | 2          | 1             |
| BK47 |         | <i>Phoma herbarum</i>        | Pleosporales      | 2          | 1             |
| BK23 | 4632    | <i>Diaporthe eres</i>        | Diaporthales      | 1          | 1             |
| BK24 |         | <i>Fusarium poae</i>         | Hypocreales       | 1          | 1             |
| BK26 |         | <i>Epicoccum nigrum</i>      | Pleosporales      | 1          | 1             |
| BK33 | 4636    | <i>Chaetomium</i> sp. 2      | Sordariales       | 1          | 1             |
| BK34 |         | <i>Fusarium</i> sp.          | Hypocreales       | 1          | 1             |
| BK37 | 4639    | <i>Nigrospora</i> sp. 1      | Trichosphaeriales | 1          | 1             |
| BK39 |         | <i>Sordariomycetes</i> sp. 4 |                   | 1          | 1             |
| BK40 |         | <i>Bjerkandera adusta</i>    | Polyporales       | 1          | 1             |
| BK41 |         | Xylariaceae sp. 1            | Xylariales        | 1          | 1             |
| BK44 |         | <i>Sordariomycetes</i> sp. 5 |                   | 1          | 1             |
|      |         | <b>Celkem kolonií</b>        |                   | <b>172</b> |               |

Do skupiny askomycetů patří 29 izolovaných druhů, v listech se vyskytoval pouze jeden bazidiomycet (*Bjerkandera adusta*). Nejvíce zastoupené byly druhy z řádu Xylariales a dále z řádů Trichosphaeriales, Pleosporales, Hypocreales a Sordariales.

Některé druhy jsem určila podle morfologických znaků a určení potvrdila i DNA (např. *D. acicola*; Obrázek 3 a *A. montagnei*), naopak některé druhy jsem určila pouze morfologicky, protože se nepodařilo amplifikovat úseky rDNA (např. *Physalospora vaccinii*; Obrázek 4). Pět druhů se nepodařilo určit ani do řádů, protože shoda sekvencí s GenBank nebyla průkazná, mycelia byla sterilní a nepodařilo se je tedy určit ani podle morfologie.



Obrázek 3: *Desmazierella acicola*



Obrázek 4: *Physalospora vaccinii*; perithecium (a), vřečka (b); foto Mgr. Ondřej Koukol, Ph.D.



## 4.2 Vliv chemických látek na vybrané kmeny hub

### 4.2.1 Chemické látky z *R. tomentosum*

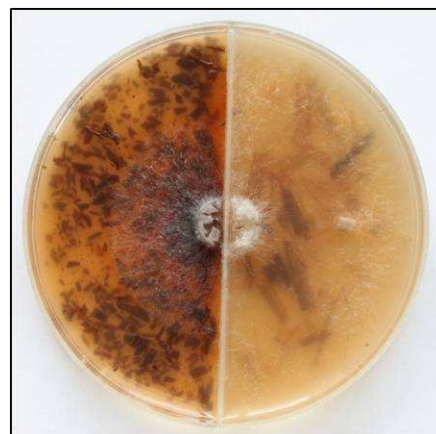
Z listů *R. tomentosum* byly z každé lokality extrahovány a analyzovány desítky sloučenin, jednalo se většinou o různé terpeny. Sloučeniny, které byly extrahovány z nejvíce lokalit a sloučeniny, kterých bylo v listech procentuálně nejvíce, shrnuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Nejčastější sloučeniny extrahované z listů *R. tomentosum*

| Sloučenina                        | Obsah sloučenin v esenciálním oleji na dané lokalitě (% hmot.) |                   |               |             |                   |                 |                |              |
|-----------------------------------|--|-------------------|---------------|-------------|-------------------|-----------------|----------------|--------------|
|                                   | Babylon  | Botanická zahrada | Černá jezírka | Endla (EST) | Konvalinkový vrch | Pryskyřičný důl | Slavkovský les | Široký kámen |
| $\beta$ -pinen                    | 0,83   | 1,45              | 0,44          | 1,80        | 0,91              | 0,37            | 1,11           | 1,44         |
| p-cymen                           | 30,58  | 29,38             | 12,80         |             | 24,74             | 24,07           | 24,70          | 28,21        |
| $\alpha$ -terpinylacetát          | 8,99   | 12,44             | 21,95         |             | 11,42             | 12,55           | 10,52          | 10,59        |
| piperiton oxid                    | 2,73   | 4,47              | 4,88          |             |                   | 2,74            | 4,52           |              |
| myrtenal                          | 0,63   | 2,25              | 0,23          |             | 2,10              | 2,67            |                | 1,90         |
| $\alpha$ -pinen                   | 0,57   | 1,02              |               |             | 0,61              |                 | 0,83           | 1,05         |
| shyobunon                         | 0,39   | 0,16              | 0,58          |             | 0,07              | 0,52            |                |              |
| ledol                             |  |                   |               | 17,81       |                   | 0,14            |                | 0,16         |
| l-pinocarveol                     | 0,84   | 0,55              | 0,50          |             |                   |                 |                |              |
| N-[4-bromo-n-butyl]-2-piperidinon |  | 31,62             | 26,62         |             |                   |                 | 25,18          |              |
| $\beta$ -phellandren              |  |                   |               |             | 0,52              |                 |                | 1,13         |
| pinen-3-ol                        |  |                   |               |             | 0,60              | 0,60            |                |              |
| camphen                           |  |                   |               |             | 0,30              |                 |                | 0,57         |
| $\alpha$ -thujenal                |  |                   |               |             |                   | 0,34            |                | 0,06         |

#### 4.2.2 Růstové testy na médiu s *R. tomentosum* a se slámou

V párovém t testu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi růstem hub na médiu s *R. tomentosum* a na médiu se slámou ( $p = 5,29 \cdot 10^{-2}$ ). *R. tomentosum* přidaný do média nezpůsobil změnu střední hodnoty poloměru kolonií testovaných hub oproti poloměru kolonií na médiu se slámou. U kontrolních misek pouze se slámou byl růst hub srovnatelný na obou polovinách ( $p = 3,75$ ).



Obrázek 5: Růst druhu *Chaetomium globosum* na médiu s *R. tomentosum* (vlevo) a se slámou (vpravo)

Nicméně šest druhů hub ze 13 testovaných (Tabulka 1, Kapitola 3.3.1) mělo tendenci růst rychleji na médiu se slámou než na médiu s *R. tomentosum*. Zvláště patrný byl rozdíl u druhů *C. globosum* (Obrázek 5) a *A. montagnei*. Naproti tomu některé druhy rostly rychleji na médiu s *R. tomentosum*. Jednalo se o druhy *P. vaccinii* a *Sordariomycetes* sp. 1. Tady ale rozdíl v růstu na obou médiích nebyl příliš výrazný.

Jednalo se ovšem pouze o předpokus, množství vzorků bylo pro statistické vyhodnocování velmi malé. Výsledky tohoto předpokusu jsem proto použila spíše pro výběr vhodných kmenů do hlavního pokusu.

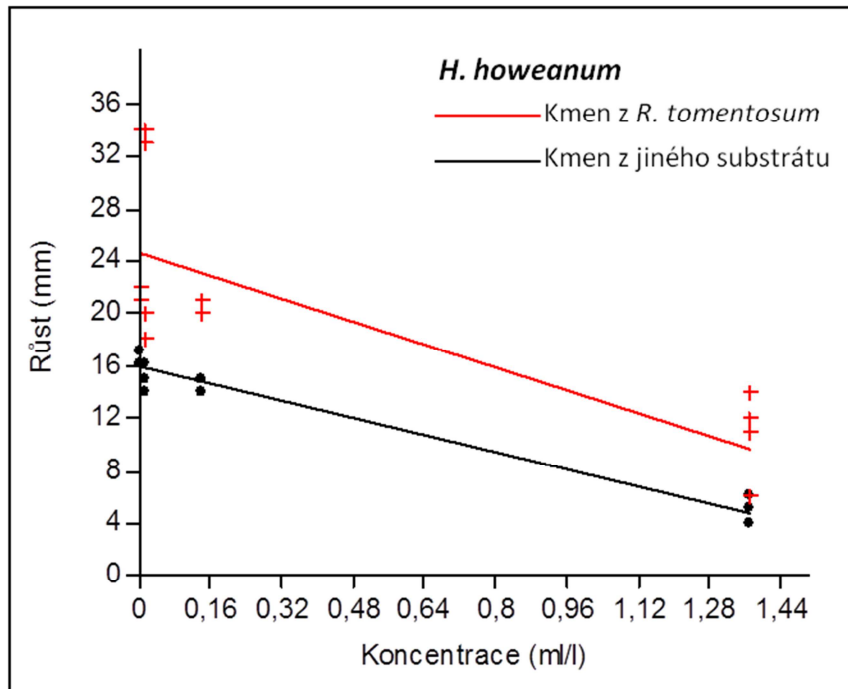
#### 4.2.3 Růstové testy na médiu s přidanými chemickými látkami

U dvou druhů hub se vůbec neprojevil signifikantní rozdíl v růstu na různých koncentracích chemických látek mezi dvěma kmeny z jiných substrátů. Jednalo se o druh *H. howeanum* ( $p = 0,201$ ; Graf 1), kdy kmen z *R. tomentosum* rostl obecně rychleji než kmen z jiného substrátu, ale v reakci na chemické látky nebyl mezi oběma kmeny signifikantní rozdíl. Kmeny druhu *K. oryzae* rostly oba velmi rychle (vůbec nejrychleji ze všech testovaných kmenů hub) a na chemické sloučeniny reagovaly téměř stejně ( $p = 0,258$ ; Graf 2).

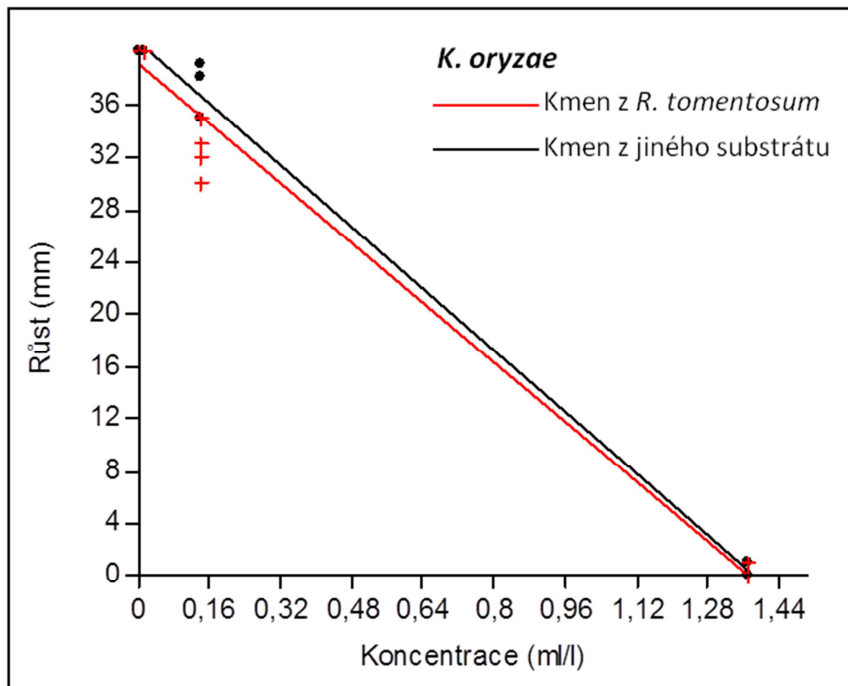
Kmeny druhu *C. globosum* rostly srovnatelně na kontrolních miskách, mezi růstem na přidaných chemických látkách vyšel signifikantní rozdíl ( $p = 5,60 \cdot 10^{-4}$ ; Graf 3), ale na přidané sloučeniny reagoval citlivěji kmen izolovaný z *R. tomentosum*.

U dalších tří druhů vyšel sice signifikantní rozdíl v růstu mezi jednotlivými kmeny, ale přidané chemické sloučeniny více ovlivňovaly kmeny získané z *R. tomentosum* než kmeny z jiných substrátů. Jednalo se o druhy *Diaporthe eres* ( $p = 2,81 \cdot 10^{-5}$ ; Graf 4), *B. inquinans* ( $p = 3,61 \cdot 10^{-3}$ ; Graf 5) a *A. montagnei* ( $p = 6,26 \cdot 10^{-5}$ ; Graf 6). Kmeny druhu *B. inquinans* navíc rostly oba velmi pomalu ve srovnání s ostatními druhy hub.

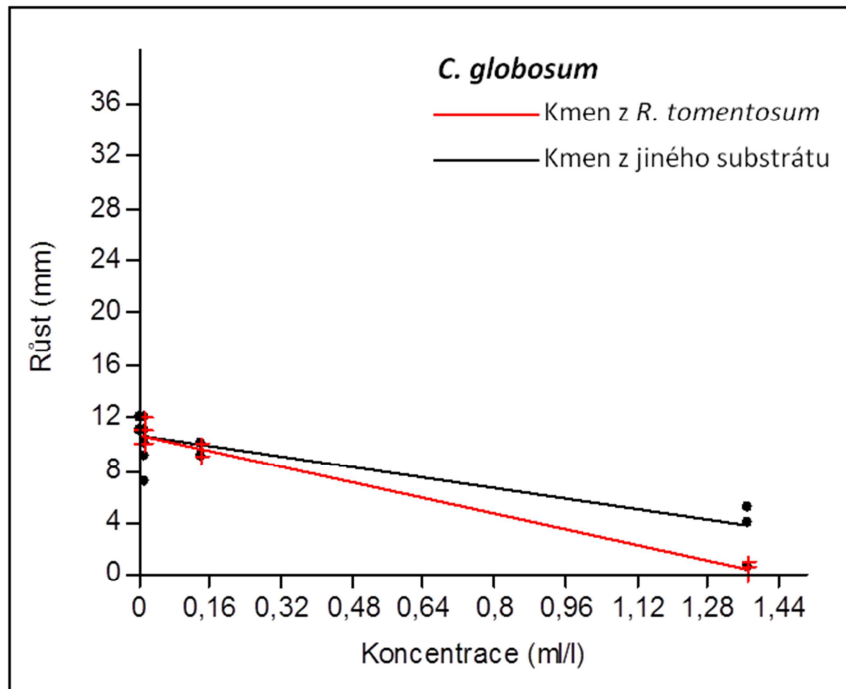
Graf 1: Růst kmenů *Hypoxylon howeanum* v závislosti na různých koncentracích chemických látek



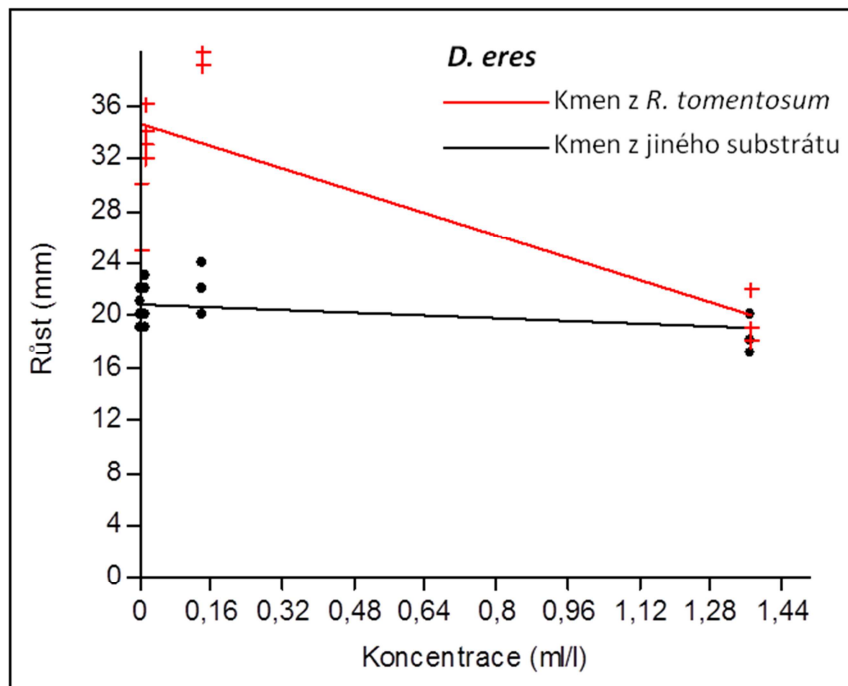
Graf 2: Růst kmenů *Khuskia oryzae* v závislosti na různých koncentracích chemických látek



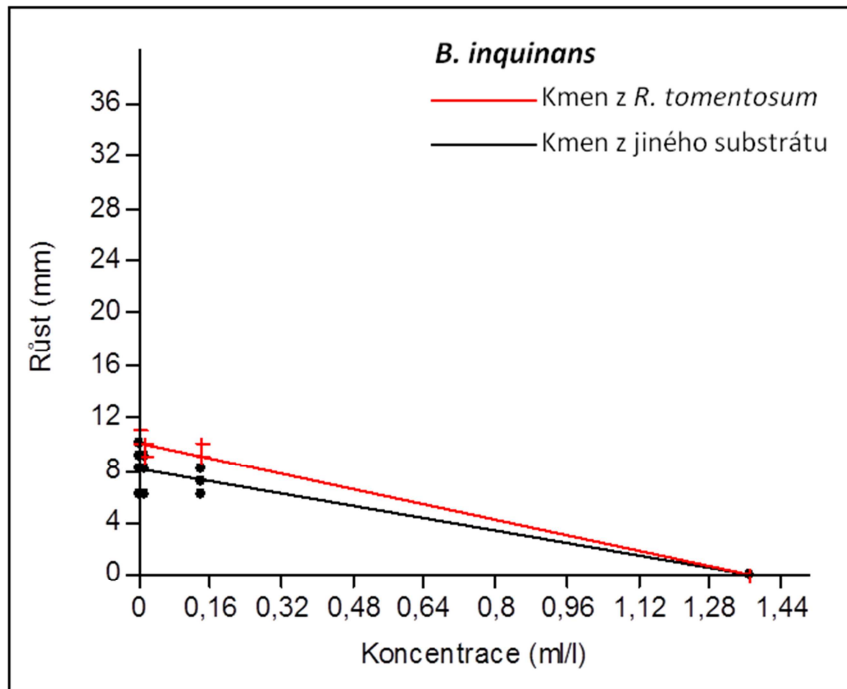
Graf 3: Růst kmenů *Chaetomium globosum* v závislosti na různých koncentracích chemických látek



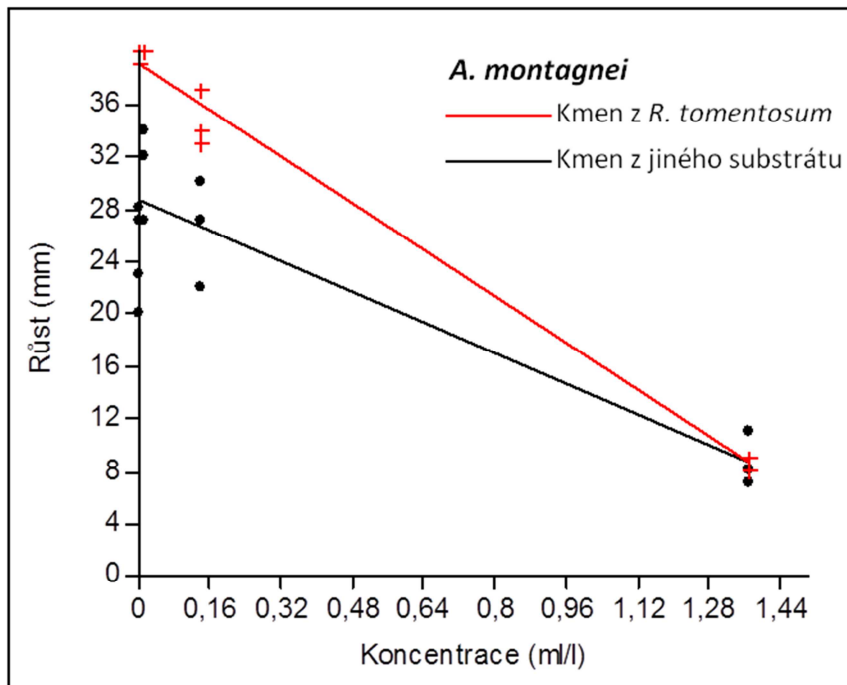
Graf 4: Růst kmenů *Diaporthe eres* v závislosti na různých koncentracích chemických látek



Graf 5: Růst kmenů *Bulgaria inquinans* v závislosti na různých koncentracích chemických látek

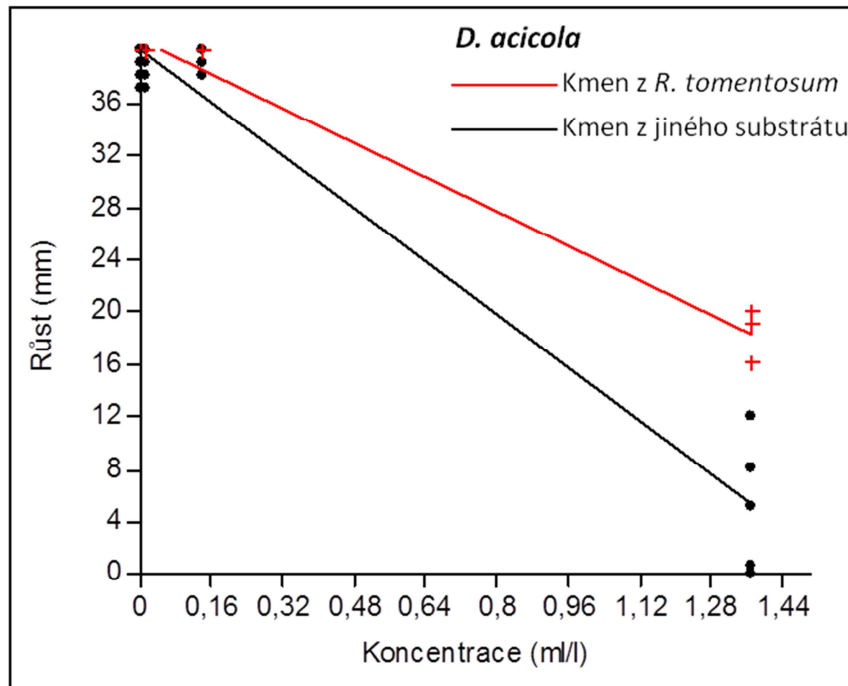


Graf 6: Růst kmenů *Apiospora montagnei* v závislosti na různých koncentracích chemických látek



Jediným druhem, u kterého se potvrdil počáteční předpoklad rychlejšího růstu kmene z *R. tomentosum* na médiích s chemickými sloučeninami, byl druh *D. acicola*. Oba kmeny tohoto druhu rostly srovnatelně na kontrolních miskách s PDA a s PDA s metanolem, na stoupající koncentraci chemických látek potom více reagoval kmen z jiného substrátu než *R. tomentosum* ( $p = 3,97 \cdot 10^{-8}$ ; Graf 7, Obrázky 6 a 7). Počáteční hypotézu jsem tedy potvrdila pouze u jednoho ze sedmi testovaných druhů.

Graf 7: Růst kmenů *Desmazierella acicola* v závislosti na koncentraci chemických látek



Obrázek 6: Růst kmene *Desmazierella acicola* získaného z *R. tomentosum* na různých koncentracích chemických látek



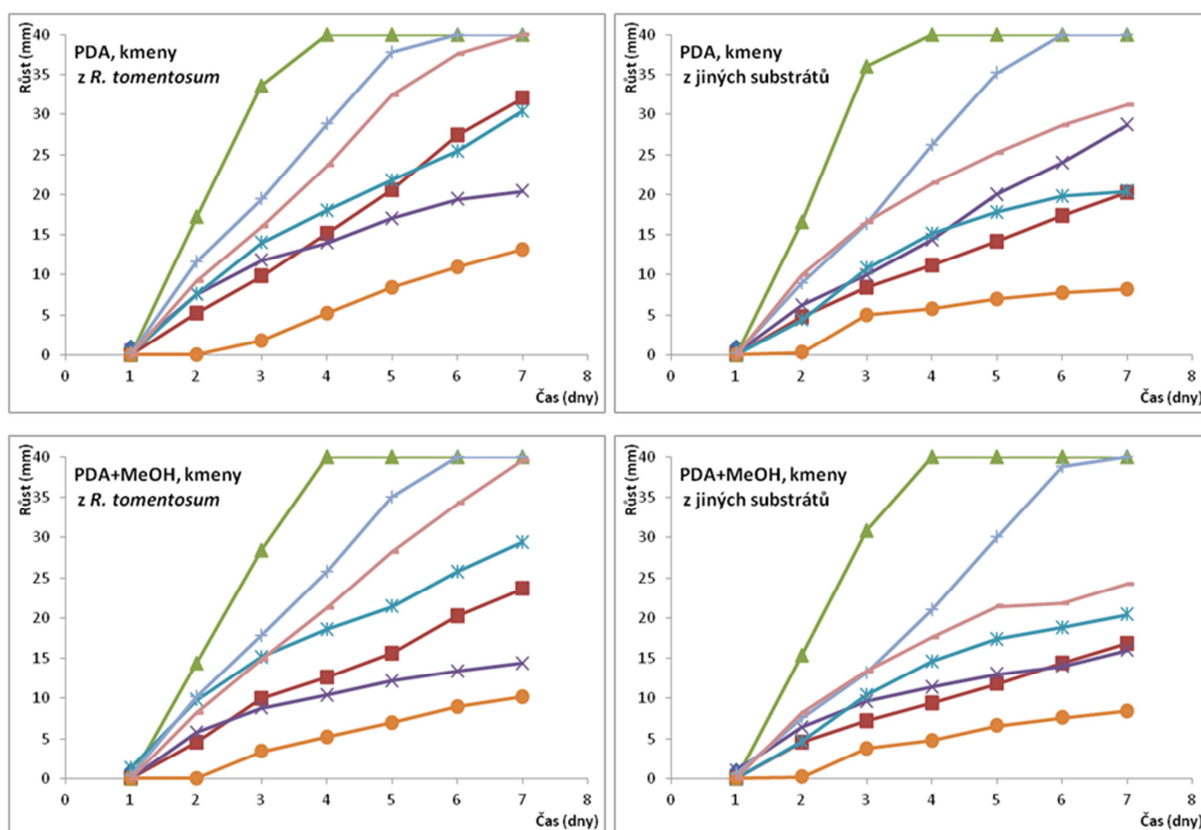
Obrázek 7: Růst kmene *Desmazierella acicola* získaného z jiného substrátu na různých koncentracích chemických látek

Některé kmeny hub (jak už jsem nastínila výše) ale také rostly odlišně i na kontrolních miskách. U čtyř druhů ze sedmi testovaných měl průkazný vliv na jejich růst substrát, ze kterého byly izolované. Kmeny získané z *R. tomentosum* tedy rostly rychleji už na kontrolních miskách. Jednalo se o kmeny *H. howeanum* ( $p = 1,99 \cdot 10^{-3}$ ), *D. eres* ( $p = 4,93 \cdot 10^{-7}$ ), *B. inquinans* ( $p = 1,82 \cdot 10^{-5}$ ) a *A. montagnei*. U posledního zmíněného druhu vyšel signifikantní, ale nestejný vliv substrátu i přidaného metanolu ( $p = 1,12 \cdot 10^{-9}$ ).

Na tři z testovaných druhů hub měl také signifikantní vliv metanol přidaný do média jako rozpouštědlo chemických sloučenin. Byly to druhy *H. howeanum* ( $p = 3,26 \cdot 10^{-2}$ ), *C. globosum* ( $p = 9,81 \cdot 10^{-6}$ ), a již výše zmíněný druh *A. montagnei*.

Na zobrazení časového průběhu růstu všech kmenů na kontrolách i na médiích s přidanými chemickými sloučeninami (Grafy 8 až 11, 12 až 17) je obzvláště patrný vliv největší koncentrace přidaných chemických sloučenin na růst hub.

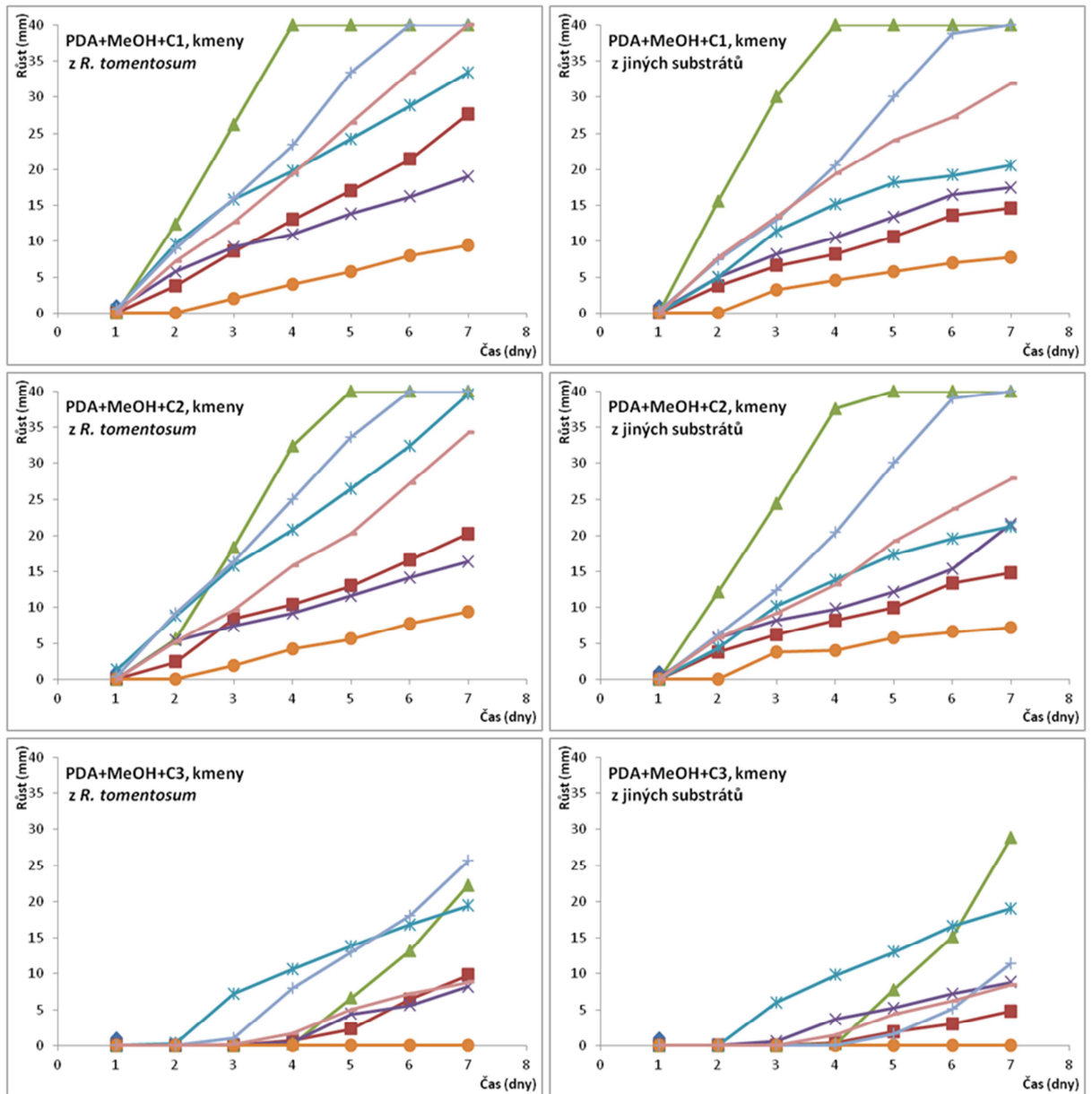
Grafy 8 - 11: Časový průběh růstu všech kmenů na kontrolních miskách



Legenda

- *H. howeanum*
- × *C. globosum*
- *B. inquinans*
- ◆ *A. montagnei*
- ▲ *N. oryzae*
- ✱ *D. eres*
- + *V. trifidum*

Grafy 12 - 17: Časový průběh růstu všech kmenů na médiích s různými koncentracemi chemických látek



Legenda

- |                    |                    |                     |                     |
|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>H. howeanum</i> | <i>C. globosum</i> | <i>B. inquinans</i> | <i>A. montagnei</i> |
| <i>N. oryzae</i>   | <i>D. eres</i>     | <i>V. trifidum</i>  |                     |



## 5 Diskuse

### 5.1 Endofytické houby izolované z *R. tomentosum*

U většiny izolovaných druhů docházelo k překryvu mezi předpokusem s listy z Botanické zahrady PřF UK a hlavním pokusem. Na úrovni rodů se všechny houby z botanické zahrady kromě jedné (*Annulohyphoxylon cohaerens*) vyskytovaly i v listech z hlavního pokusu. Na úrovni druhů se v obou pokusech vyskytovaly druhy *Hypoxylon fragiforme*, *Hypoxylon howeanum* a *Khuskia oryzae*. Tento fakt není překvapivý, protože se jedná většinou o běžně rozšířené endofyty (Stone et al., 2004). V dalších částech se věnuji druhům, které jsem izolovala s velkou četností, nebo naopak těm vzácnějším.

#### 5.1.1 Druhy izolované s vysokou četností

Většina izolovaných druhů (*H. howeanum*, *H. fragiforme*, *Chaetomium globosum*, *Diaporthe eres*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium* sp., *Sordaria* sp., *Xylaria* sp.) patří mezi běžně izolované endofyty z listů dřevin (Stone et al., 2004). Z *R. tomentosum* izoloval většinu těchto běžných druhů také Tejesvi et al. (2011). Druhy nejvíce zastoupeného řádu Xylariales *Xylaria* spp. a *Hypoxylon* spp. patří mezi široce rozšířené endofyty v rostlinné říši a také v této práci se druhy rodu *Hypoxylon* řadí mezi nejčastěji izolované. V literatuře byl například *H. fragiforme* izolován z čeledi Ericaceae a z jehličnanů, *H. rubiginosum* z čeledi Ericaceae a z dalších čeledí rostlin (Petrini a Petrini, 1985). Druhy rodu *Xylaria* spp. jsou jako endofytické houby rozšířené především v tropických čeledích Araceae, Bromeliaceae, Orchidaceae (Dreyfuss a Petrini, 1984). Druhy rodu *Xylaria* ale izolovali také Petrini et al. (1982) ze dvou rostlin čeledi Ericaceae *Arctostaphylos uva-ursi* a *Gaultheria shallon* v USA.

Četné byly také druhy rodu *Nigrospora* a druh *K. oryzae* z řádu Trichosphaeriales. Druhy rodu *Nigrospora* patří mezi běžně izolované endofyty z kůry a výhonků dřevin (Stone et al., 2004).

Dále byly přítomny dva druhy (*Alternaria* sp. a *Phoma herbarum*) z řádu Pleosporales, čeledi Pleosporaceae. Druhy z čeledi Pleosporaceae jsou buď parazitické (anamorfy) nebo saprotrofní, často asociované s travami (Cannon a Kirk, 2007). Z několika rostlin čeledi Ericaceae izolovali jako běžného endofyta např. druh *Alternaria alternata* Okane et al. (1998).

Z řádu Hypocreales jsem izolovala tři druhy ze dvou čeledí, Nectriaceae (*Fusarium poae*, *Fusarium* sp.) a Bionectriaceae (*Clonostachys rosea*). Zástupci řádu Hypocreales mají velkou diverzitu na hostitelských rostlinách v tropech (Arnold a Lutzoni, 2007). Čeleď

Nectriaceae je opět kosmopolitně rozšířená, rostoucí na mrtvém rostlinném materiálu. Anamorfní rod *Fusarium* je ekonomicky významný rostlinný parazit (Cannon a Kirk, 2007). Druh *Fusarium poae* je významným patogenem několika druhů obilí (Stenglein, 2009). Další druhy rodu *Fusarium* izolovali jako dominantní Tejesvi et al. (2011) přímo z *R. tomentosum* ve Finsku, kde tyto druhy produkovaly látky s antimikrobiálními a antioxidačními účinky. Čeleď Bionectriaceae byla zastoupena jedním anamorfním druhem *C. rosea*. Jedná se o kosmopolitně rozšířenou čeleď na rostlinném opadu (Cannon a Kirk, 2007).

Z řádu Sordariales jsem izolovala druhy ze dvou čeledí, Sordariaceae (*Sordaria* sp.) a Chaetomiaceae (*C. globosum*, *Chaetomium* sp.). Obě čeledi jsou široce rozšířené, druhy z čeledi Chaetomiaceae jsou často saprotrofní, hrají roli významných rozkradačů rostlinného materiálu (Cannon a Kirk, 2007). Druh *C. globosum*, vyskytující se i v této práci, izolovali např. Okane et al. (1998) s malou četností z listů *Rhododendron obtusum*.

### 5.1.2 Druhy izolované s nižší četností

Jedním druhem (*Desmazierella acicola*) byl zastoupen řád Pezizales. *D. acicola* se běžně vyskytuje v opadu *Pinus sylvestris*, dalších zástupců rodu *Pinus* a dalších jehličnanů (Kendrick a Burges, 1962; Pfister et al., 2008). V této práci byl druh *D. acicola* izolován pravděpodobně poprvé jako endofyt z listů *R. tomentosum*. Mohl se zde vyskytnout právě proto, že na daných lokalitách roste *R. tomentosum* v podrostu *P. sylvestris*. Podobný vliv totiž konstatovali i Petrini a Fisher (1988), kteří ve své studii izolovali druh *D. acicola* z kmenů *Fagus sylvatica* a vysvětlili to právě tím, že tento strom roste v blízkosti druhu *P. sylvestris*, pro který je endofyta *D. acicola* typický.

Řád Diaporthales, zde zastoupený jedním druhem (*Diaporthe eres*), má největší diverzitu v tropech (Arnold a Lutzoni, 2007). Zahrnuje mnoho rostlinných patogenů a některé druhy produkující sekundární metabolity (Castlebury et al., 2002). Druhy rodu *Diaporthe* mají široký rozptyl hostitelů a vyskytují se jako saprotrofové nebo endofyté, mohou být také významnými patogeny rostlin (Gomes et al., 2013). Z čeledi Ericaceae (z druhů *Erica tetralix* a *Vaccinium myrtillus*) izoloval druh *Diaporthe vaccinii* Petrini (1984) ve Velké Británii.

Pouze jedním druhem byla zastoupena skupina basidiomycetů. Jednalo se o druh *Bjerkandera adusta* z čeledi Meruliaceae. Tato čeleď je kosmopolitně rozšířená, jedná se většinou o houby žijící paraziticky nebo saprotrofně na dřevinách (Cannon a Kirk, 2007). Druh *B. adusta* vytváří charakteristické plodnice na kmenech a pařezech listnatých dřevin (Holec et al., 2012). Tento druh byl také izolován jako endofyt např. z xylému jihoamerického stromu *Drimys winteri* (Oses et al., 2008), ale i z mechu *Sphagnum fuscum* (Thormann et al.,

2002). Dále také z klinického materiálu jako kůže nebo moč (Sigler a Abott, 1997) nebo jako kontaminant nerezových trubek v továrně na zpracování mléka (Koukol 2013). Tento druh má tedy natolik široké spektrum substrátů, na kterých byl nalezen, že zřejmě nelze jeho výskyt v listech *R. tomentosum* považovat za nijak výjimečnou skutečnost.

Pouze na dvou částech listu byl také přítomen druh *Physalospora vaccinii* řádu Xylariales jinak poměrně hojně zastoupeného druhu rodu *Hypoxylon* a *Xylaria*. Tento druh a další druhy rodu *Physalospora* zaznamenala např. Barr (1970) jako saprotrofy na mrtvých listech různých rostlin čeledi Ericaceae. V mé práci se tento druh vyskytoval pouze na lokalitě v Estonsku.

### 5.1.3 Neurčené kmeny

Kmeny BK20, BK21, BK35, a BK39 (Sordariomycetes spp.) se nepodařilo určit ani do řádu, shoda se sekvencemi v GenBank byla příliš nízká. Kmen BK41 (Xylariaceae sp. 1) se podařilo určit pouze na úrovni čeledi. Sekvence těchto izolátů nebyly podobné ani sekvencím endofytických hub z *R. tomentosum* z práce Tejesvi et al. (2011), kde se také věnovali diverzitě endofytických hub v tomto druhu a určovali je na základě úseků ITS1 a ITS2 rDNA. Zjevně se tedy nejednalo o druhy, které by byly vázané přímo na *R. tomentosum*. Tejesvi et al. (2011) naopak také izolovali velké množství běžně se vyskytujících druhů, podobně jako já v této práci. Z toho usuzuji, že pravděpodobně neexistují druhy endofytických hub specifické přímo pro *R. tomentosum*.

## 5.2 Chemické látky extrahované z listů *R. tomentosum*

Sloučeniny extrahované z listů se v některých případech příliš neshodovaly se sloučeninami, které byly z listů nebo jiných částí *R. tomentosum* extrahovány v prostudované literatuře. To však může být ovlivněno odlišnými lokalitami, protože v jednotlivých studiích z různých míst se výsledky také poměrně dost liší.

Například ledol, který by měl být jednou z nejčastěji se vyskytujících sloučenin v *R. tomentosum* (Butkienė et al., 2008; Gretšušnikova et al., 2010), jsem zaznamenala v listech pouze na dvou českých lokalitách a to jenom ve velmi malých koncentracích. Ve větší koncentraci (17,81 %) se ledol vyskytoval pouze v listech z PR Endla v Estonsku. Odchyly by mohly být způsobeny odlišnými lokalitami, například v práci Gretšušnikova et al. (2010), kde se zabývali složením esenciálního oleje z výhonků, listů a kmenů *R. tomentosum* právě v Estonsku, převažují sloučeniny ledol a palustrol, čemuž odpovídá i vyšší koncentrace ledolu na estonské lokalitě v této práci. Práce Butkienė et al. (2008), kde také převažují sloučeniny ledol a palustrol, se zabývala složením esenciálního oleje z výhonků *R. tomentosum* z lokalit

v Litvě. V práci Kim a Nam (2006), kde se zabývali esenciálním olejem z lokalit v Koreji, se sloučeniny ledol a palustrol nevyskytovaly vůbec. V listech na všech studovaných lokalitách v mé práci se ovšem v menších či větších koncentracích vyskytovaly sloučeniny ledolu strukturně velmi podobné.

Naopak sloučenina p-cymen, která byla v listech z většiny studovaných lokalit dominantní, se v některých studiích vyskytuje v poměrně malých koncentracích (Butkienė et al., 2008) a v některých je uváděna také mezi dominantními (Gretšušnikova et al., 2010).

Některé odchylky by také mohly být způsobeny dobou sběru rostlinného materiálu. Obecně by obsah esenciálního oleje měl být větší v mladých listech, které jsou více metabolicky aktivní (Butkienė et al., 2008). V mé práci byly použity listy podzimní (staré od jara téhož roku).

### **5.3 Růst kmenů hub z *R. tomentosum* a z jiných substrátů na médiu s chemickými látkami**

Při testování se projevil obecný trend, že první dvě koncentrace chemických sloučenin mnoho druhů hub příliš neovlivňovaly, inhibovala je až třetí (nejvyšší) koncentrace a to bez rozdílu mezi kmeny z *R. tomentosum* a z jiných substrátů. Proto se také u třech testovaných druhů (*Diaporthe eres*, *Bulgaria inquinans* a *Apiospora montagnei*) projevil větší inhibiční vliv chemických sloučenin na kmeny z *R. tomentosum*. U těchto tří druhů rostly kmeny z *R. tomentosum* rychleji na kontrolních miskách i na dvou nižších koncentracích. Na nejvyšší koncentraci však již rostly stejně pomalu jako kmeny z jiných substrátů, rychlost jejich růstu tím pádem klesala prudčeji (Grafy 4, 5 a 6). Nejvyšší koncentrace chemických látek přidaná do média byla řádově odpovídající skutečné koncentraci v živých listech rostlin (Kapitola 3.3.3). Fakt, že některé terpeny mohou ovlivňovat růst hub ve vysokých koncentracích (hlavně v koncentracích blízkých nasycenému roztoku), konstatovali také Jurc et al. (1999). Nejvyšší koncentrace přidávaných chemických sloučenin v mé práci (celková koncentrace 1,369 ml/l; Tabulka 2, Kapitola 3.3.3) se blížila maximální rozpustnosti některých látek. Rozpustnost např. p-cymenu ve vodě je 23,4 mg/l při 25 °C (ChemIDplus Advanced).

Předpoklad, že houby získané z listů *R. tomentosum* budou přizpůsobené růstu v prostředí esenciálního oleje a porostou tedy ne médiu s přidanými chemickými sloučeninami rychleji než kmeny stejných druhů získaných z jiných substrátů, se mi nepodařilo potvrdit u šesti ze sedmi testovaných druhů. Z těchto výsledků usuzuji, že endofytické houby z listů *R. tomentosum* nebyly pravděpodobně růstu v tomto prostředí nijak

přizpůsobené. Druh *R. tomentosum* tedy pro ně nejspíše nebyl příliš příznivým prostředím a do listů se na dané lokalitě dostaly spíše náhodou. Podobnou počáteční hypotézu měli Espinosa-Garcia a Langenheim (1991c) ve své studii, kde předpokládali, že endofytický druh *Pleuroplaconema* sp. bude přizpůsobený růstu v prostředí esenciálního oleje z konkrétního stromu druhu *Sequoia sempervirens*, ze kterého byl přímo izolován. Tento předpoklad se jim však také nepodařilo potvrdit. Obdobnou hypotézu ale podpořili Jurc et al. (1999), v jejichž studii terpeny z *Pinus nigra* ssp. *Austriaca* dokonce podporovaly růst latentní patogenní houby izolované z tohoto druhu *Cenangium ferruginosum*. Jurc et al. (1999) si to vysvětlovali tak, že druh *C. ferruginosum* je adaptován na konkrétní složení esenciálního oleje. V mé práci chemické látky z *R. tomentosum* nepodporovaly růst žádného testovaného kmenu.

Jediným druhem, pro který jsem potvrdila počáteční předpoklad, byl druh *Desmazierella acicola*. I zde však byly oba kmeny inhibovány výrazně až nejvyšší koncentrací chemických látek. Zajímavé je, že kmen *D. acicola* získaný pro testování z jiného substrátu pochází z jehlic *Pinus sylvestris*, tedy také ze substrátu, který produkuje esenciální olej (Judzentiene a Kupcinskiene, 2008). Bylo by jistě zajímavé provést podobný pokus testování růstu na médiích s přidanými chemickými látkami ve větším měřítku, s větším množstvím kmenů *D. acicola*.

## 6 Závěr

Z 80 listů *R. tomentosum* jsem izolovala a určila 30 druhů hub, z nichž dominovaly běžně se vyskytující druhy (*Hypoxylon howeanum*, *Hypoxylon fragiforme*, *Chaetomium globosum*, *Diaporthe eres*, *Clonostachys rosea.*, *Fusarium* sp., *Sordaria* sp., *Xylaria* sp.), které jako endofyty kolonizují většinu zástupců rostlinné říše. V listech *R. tomentosum* se tedy pravděpodobně nevyskytují endofytické houby specifické pouze pro tento druh.

Většinu druhů endofytických hub výrazněji inhibovala až nejvyšší koncentrace chemických látek přidaných do média, ať už šlo o kmeny získané z *R. tomentosum*, či z jiného substrátu.

U čtyř ze sedmi testovaných druhů (*H. howeanum*, *D. eres*, *Bulgaria inqiuans* a *Apiospora montagnei*) rostly kmeny získané z *R. tomentosum* rychleji již na kontrolních miskách bez přidaných chemických sloučenin.

Hypotézu rychlejšího růstu kmenů získaných z *R. tomentosum* na médiu s přidanými chemickými sloučeninami z *R. tomentosum* v porovnání s kmeny stejných druhů získaných z jiných substrátů jsem potvrdila pouze u jednoho druhu ze sedmi testovaných, jednalo se o druh *Desmazierella acicola*. U tohoto druhu rostl kmen z *R. tomentosum* signifikantně rychleji na médiích s přidanými chemickými látkami. Pro zbylých šest testovaných druhů jsem počáteční předpoklad nepotvrdila. Endofytické houby se tedy růstu v listech *R. tomentosum* pravděpodobně nepřizpůsobují, růst v listech tohoto druhu je pro ně na dané lokalitě spíše nevýhodný.

## 7 Seznam literatury

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. – *Journal of Molecular Biology* 215: 403 – 410.

Arnold, A. E., Herre, E. A., 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). – *Mycologia* 95: 388 – 398.

Arnold, A. E., Lutzoni, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? – *Ecology* 88: 541 – 549.

Barr, M. E., 1970. Some amerosporous Ascomycetes on Ericaceae and Empetraceae. – *Mycologia* 62: 377 – 394.

Belousova, N. I., Dmitruk, S. E., Khan, V. A., 1989. Essential oils in *Ledum* L.: antifungal properties. – *Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal* 23: 317 – 319.

Boyle, C., Götz, M., Dammann-Tugend, U., Schulz, B., 2001. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. – *Symbiosis* 31: 259 – 281.

Butkienė, R., Mockutė, D., 2011. The variability of the essential oil composition of wild *Ledum palustre* L. shoots during vegetation period. – *Journal of Essential Oil Research* 23: 9 – 13.

Butkienė, R., Šakočiutė, V., Latvėnaitė, D., Mockutė, D., 2008. Composition of young and aged shoot essential oils of the wild *Ledum palustre* L. – *Chemija* 19: 19 – 24.

Cairney, J. W. G., Ashford, A. E., 2002. Biology of mycorrhizal associations of epacrids (Ericaceae). – *New Phytologist* 154: 305 – 326.

Cannon, P. F., Kirk, P. M., 2007. *Fungal families of the world*, CAB International, Wallingford, 456 str.

Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Jaklitsch, W. J., Vasilyeva, L. N., 2002. A preliminary overview of the Diaporthales based on large subunit nuclear ribosomal DNA sequences. – *Mycologia* 94: 1017 – 1031.

Dampc, A., Luczkiewicz, M., 2013. *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*). A review of traditional use based on current research. – *Fitoterapia* 85: 130 – 143.

Dreyfuss, M., Petrini, O., 1984. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. – *Botanica Helvetica* 94: 33 – 40.

Espinosa-Garcia, F. J., Langenheim, J. H., 1991a. Effect of some essential oil phenotypes in coastal redwood on the growth of several fungi with endophytic stages. – *Biochemical Systematics and Ecology* 19: 629 – 642.

Espinosa-Garcia, F. J., Langenheim, J. H., 1991b. Effect of sabinene and  $\gamma$ -terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. – *Biochemical Systematics and Ecology* 19: 643 – 650.

Espinosa-Garcia, F. J., Langenheim, J. H., 1991c. Effect of some leaf essential oil phenotypes from coastal redwood on growth of its predominant endophytic fungus *Pleuroplaconema* sp. – *Journal of Chemical Ecology* 17: 1837 – 1857.

Fahn, A., 1988. Secretory tissues in vascular plants. – *New Phytologist* 108: 229 – 257.

Fassatiová, O., 1986. Moulds and filamentous fungi in technical mikrobiology, Elsevier, Amsterdam, 223 str.

Fisher, P. J., Anson, A. E., Petrini, O., 1984. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. – *Botanica Helvetica* 94: 249 – 253.

Ganley, R. J., Newcombe, G., 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. – *Mycological Research* 110: 318 – 327.

Gersbach, P. V., 2002. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). – *Annals of Botany* 89: 225 – 260.

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., 2013. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. – *Persoonia* 31: 1 – 41.

Gretšušnikova, T., Järvan, K., Orav, A., Koel, M., 2010. Comparative analysis of the composition of the essential oil from the shoots, leaves and stems the wild *Ledum palustre* L. from Estonia. – *Procedia Chemistry* 2: 168 – 173.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P. (2001). PAST – Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. – *Palaeontologia Electronica* 4: 1 – 9.

Hejný, S., Slavík, B., 2003. Květena České republiky 2 (2. vydání), Academia, Praha, 540 str.

Holec, J., Bielich, A., Beran, M., 2012. Přehled hub střední Evropy, Academia, Praha, 624 str.

Chang, S. T., Wang, S. Y., Wu, C. L., Su, Y. C., Kuo, Y. H., 1999. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. – *Holzforschung* 53: 487 – 490.

Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., Chen, H. M., 2007. Anti-fungal activity of crude extracts and Essentials oil of *Moringa oleifera* Lam. – *Bioresource Technology* 98: 232 – 236.



Judzentiene, A., Butkienė, R., Budiene, J., Tomi, F., Casanova, J., 2012. Composition of seed essential oils of *Rhododendron tomentosum*. – Natural Product Communications 7: 227 – 230.

Judzentiene, A., Kupcinskiene, E., 2008. Chemical composition of essential oils from needles of *Pinus sylvestris* L. grown in northern Lithuania. – Journal of Essential Oil Research 20: 26 – 29.

Jurc, D., Bojović, S., Jurc, M., 1999. Influence of endogenous terpenes on growth of three endophytic fungi from the needles of *Pinus nigra* Arnold. – Phyton 39: 225 – 229.

Kendrick, W. B., Burges, A., 1962. Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. – Nova Hedwigia 4: 313 – 342.

Kim, D., Nam, B., 2006. Extracts and essentials oil of *Ledum palustre* L. leaves and their antioxidant and antimicrobial activities. – Journal of Food Science and Nutrition 11: 100 – 104.

Kinkel, L. L., Andrews, J. H., 1988. Disinfection of living leaves by hydrogen peroxide. – Transactions of the British Mycological Society 91: 523 – 528.

Koukol, O., 2013. Řekni mi, kde rosteš, já ti povím, jaká jsi. – Živa 1: 7 – 10.

Krause-Baranowska M., Mardarowicz, M., Wiwart, M., Poblocka, L., Dynowska, M., 2002. Antifungal activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. – Zeitschrift für Naturforschung 57: 478 – 482.

Kron, K. A., Judd, W. S., 1990. Phylogenetic relationships within the Rhodora (Ericaceae) with specific comments on the placement of *Ledum*. – Systematic Botany 15: 57 – 68.

Mitchell, D. T., Gibson, B. R., 2006. Ericoid mycorrhizal association: ability to adapt to a broad range of habitats. – Mycologist 20: 2 – 9.

Okane, I., Nagakiri, A., Ito, T., 1998. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. – Canadian Journal of Botany 76: 657 – 663.

Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E., Rodríguez, J., 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. – Fungal Diversity 33: 77 – 86.

Petrini, L., Petrini, O., 1985. Xylariaceous fungi as endophytes. – Sydowia 38: 216 – 234.

Petrini, O., 1984. Endophytic fungi in British Ericaceae: a preliminary study. – Transactions of the British Mycological Society 83: 510 – 512.

- Petrini, O., Fisher, P. J., 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. – Transactions of the British Mycological Society 91: 233 – 238.
- Petrini, O., Stone, J., Carroll, F. E., 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. – Canadian Journal of Botany 60: 789 – 796.
- Pfister, D. H., Slater, C., Hansen, K., 2008. Chorioactidaceae: a new family in the Pezizales (Ascomycota) with four genera. – Mycological Research 112: 513 – 527.
- Raal, A., Orav, A., Gretšušnikova, T., 2014. Composition of the essential oil of the *Rhododendron tomentosum* Harmaja in Estonia. – Natural Product Research: *in press*.
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., Aust, H. J., 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. – Mycological Research 97: 1447 – 1450.
- Sigler, L., Abott, S. P., 1997. Characterizing and conserving diversity of filamentous basidiomycetes from human sources. – Microbiology and Culture Collections 13: 21 – 27.
- Stenglein, S. A., 2009. *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. – Journal of Plant Pathology 91: 25 – 36.
- Stone, J. K., 1988. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. – Canadian Journal of Botany 66: 45 – 54.
- Stone, J. K., Polyshook, J. D., White, J. F. Jr., 2004. Endophytic fungi. – In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S., Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods, Elsevier, Amsterdam, str. 241 – 270.
- Sutton, B. C., 1969. Forest microfungi. I. *Ampulliferina persimplex* n. gen., n. sp. on leaves of labrador tea. – Canadian Journal of Botany 47: 609 – 616.
- Tejesvi, M. V., Kajula, M., Mattila, S., Pirttilä, A. M., 2011. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. – Fungal Diversity 47: 97 – 107.
- Thormann, M. N., Currah, R. S., Bayley, S. E., 2002. The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. – Canadian Journal of Microbiology 48: 204 – 211.
- U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Laetsch, A. D., Arnold, A. E., 2012. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. – American Journal of Botany 99: 898 – 914.

Verma, R. K., Chaurasia, L., Kumar, M., 2011. Antifungal activity of essential oils against selected building fungi. – Indian Journal of Natural Products and Resources 2: 448 – 451.

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T., PCR protocols, a guide to methods and applications, Academic Press, New York, str. 315 – 322.

**Internetové zdroje:**

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, stav k lednu 2014.

ChemIDplus Advanced, <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>, stav k dubnu 2014

Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>, stav k lednu 2014

Integrated Taxonomic Information System on-line database, <http://www.itis.gov>, stav k dubnu 2014.



Četnost endofytů (BK17 až BK47) na daných lokalitách a listech (Lo = lokalita, Li = list, ŠK = Široký kámen, KV = Konvalinkový vrch, ČJ = Černá jezírka, PO = Podkovák, PD = Pryskyřičný důl, BAB = Babylon, BOT = Botanická zahrada PŘF UK, EST = Endla v Estonsku) - POKRAČOVÁNÍ

|     |    | BK |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|---|--|
|     |    | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 |  |   |  |
| Lo  | Li |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 1A |    | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 1B |    |    | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 2A |    | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 2B |    | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 3A |    | 3  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 3B |    | 1  | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 4A |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 4B |    | 1  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 4C |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| PD  | 4D |    | 1  |    |    |    | 1  |    | 1  |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 1A |    |    |    | 1  | 1  |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 1B |    |    |    | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 2A |    |    |    | 4  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 2B |    |    |    | 4  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 3A |    |    |    | 1  | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 3B |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 4A |    |    |    | 1  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |  |   |  |
| BAB | 4B |    |    |    | 4  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 5A |    |    |    |    | 3  |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BAB | 5B |    |    |    |    |    | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1A |    |    |    |    |    |    |    |    | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1B |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1C |    | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1D |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1E |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1F |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1G |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1H |    |    | 1  |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1I |    |    |    | 2  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| BOT | 1J |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 1A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 1B |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 1C |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 1D |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 2A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 2  | 1  |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 2B |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 3A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |  | 2 |  |
| EST | 3B |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 4A |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |
| EST | 4B |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |  |

Růst kmenů *H. howeanum* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

| JS/R | konc. | Růst (mm) 1. až 7. den |   |    |    |    |    |    |
|------|-------|------------------------|---|----|----|----|----|----|
|      |       | 1                      | 2 | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 5 | 9  | 12 | 15 | 18 | 20 |
| 1    | 1     | 0                      | 5 | 9  | 12 | 15 | 18 | 21 |
| 1    | 1     | 0                      | 4 | 7  | 10 | 13 | 17 | 20 |
| 1    | 1     | 0                      | 5 | 9  | 11 | 14 | 17 | 20 |
| 1    | 1     | 0                      | 5 | 8  | 11 | 14 | 17 | 20 |
| 1    | 2     | 0                      | 5 | 8  | 10 | 12 | 14 | 16 |
| 1    | 2     | 0                      | 5 | 7  | 9  | 12 | 14 | 17 |
| 1    | 2     | 0                      | 5 | 7  | 10 | 12 | 15 | 17 |
| 1    | 2     | 0                      | 4 | 7  | 9  | 12 | 14 | 17 |
| 1    | 2     | 0                      | 4 | 7  | 9  | 11 | 15 | 17 |
| 1    | 3     | 0                      | 4 | 7  | 8  | 11 | 13 | 14 |
| 1    | 3     | 0                      | 4 | 6  | 8  | 10 | 13 | 14 |
| 1    | 3     | 0                      | 3 | 6  | 8  | 10 | 14 | 14 |
| 1    | 3     | 0                      | 4 | 7  | 9  | 11 | 14 | 15 |
| 1    | 3     | 0                      | 4 | 7  | 8  | 11 | 14 | 16 |
| 1    | 4     | 0                      | 4 | 6  | 8  | 10 | 13 | 15 |
| 1    | 4     | 0                      | 4 | 7  | 8  | 10 | 14 | 15 |
| 1    | 4     | 0                      | 4 | 6  | 8  | 10 | 13 | 14 |
| 1    | 4     | 0                      | 3 | 6  | 9  | 10 | 14 | 15 |
| 1    | 4     | 0                      | 4 | 6  | 8  | 10 | 13 | 15 |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 4  | 5  | 6  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 3  | 4  | 5  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 0  | 0  | 1  | 4  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 2  | 4  | 5  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 0  | 1  | 1  | 4  |
| 2    | 1     | 0                      | 5 | 9  | 14 | 22 | 32 | 38 |
| 2    | 1     | 0                      | 5 | 12 | 20 | 28 | 36 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 5 | 11 | 20 | 25 | 33 | 39 |
| 2    | 1     | 0                      | 6 | 9  | 12 | 15 | 18 | 22 |
| 2    | 1     | 0                      | 5 | 8  | 10 | 13 | 18 | 21 |
| 2    | 2     | 0                      | 5 | 11 | 14 | 16 | 19 | 22 |
| 2    | 2     | 0                      | 5 | 11 | 15 | 21 | 27 | 34 |
| 2    | 2     | 0                      | 5 | 9  | 11 | 13 | 17 | 20 |
| 2    | 2     | 0                      | 4 | 9  | 12 | 14 | 19 | 21 |
| 2    | 2     | 0                      | 4 | 10 | 11 | 14 | 19 | 21 |
| 2    | 3     | 0                      | 3 | 7  | 10 | 12 | 15 | 18 |
| 2    | 3     | 0                      | 4 | 9  | 15 | 21 | 28 | 33 |
| 2    | 3     | 0                      | 4 | 9  | 15 | 20 | 27 | 33 |
| 2    | 3     | 0                      | 5 | 10 | 15 | 20 | 22 | 34 |
| 2    | 3     | 0                      | 3 | 8  | 10 | 12 | 15 | 20 |
| 2    | 4     | 0                      | 3 | 8  | 10 | 12 | 17 | 20 |
| 2    | 4     | 0                      | 1 | 8  | 10 | 12 | 16 | 20 |
| 2    | 4     | 0                      | 3 | 9  | 11 | 14 | 16 | 21 |
| 2    | 4     | 0                      | 1 | 9  | 10 | 14 | 17 | 20 |
| 2    | 4     | 0                      | 4 | 8  | 11 | 13 | 17 | 20 |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 4  | 8  | 12 |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 4  | 9  | 14 |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 1  | 4  | 6  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 2  | 7  | 11 |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 0  | 1  | 4  | 6  |

Růst kmenů *K. oryzae* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

| JS/R | konc. | Růst (mm) 1. až 7. den |    |    |    |    |    |    |
|------|-------|------------------------|----|----|----|----|----|----|
|      |       | 1                      | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 17 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 18 | 38 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 16 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 17 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 15 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 16 | 32 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 14 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 13 | 27 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 16 | 32 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 18 | 33 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 1                      | 17 | 32 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 16 | 31 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 15 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 13 | 27 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 17 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 12 | 25 | 38 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 13 | 27 | 39 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 12 | 23 | 38 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 11 | 22 | 35 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 13 | 25 | 38 | 40 | 40 | 40 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 7  | 15 | 29 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 5  | 14 | 25 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 14 | 20 | 36 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 6  | 12 | 23 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 7  | 15 | 31 |
| 2    | 1     | 0                      | 14 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 20 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 20 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 17 | 35 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 15 | 33 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 18 | 32 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 13 | 28 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 12 | 27 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 13 | 27 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 16 | 28 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 10 | 25 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 13 | 26 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 14 | 28 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 13 | 27 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 12 | 25 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 8  | 20 | 35 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 4  | 18 | 32 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 3  | 18 | 32 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 11 | 20 | 33 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 2  | 16 | 30 | 40 | 40 | 40 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 5  | 11 | 18 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 6  | 13 | 23 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 5  | 13 | 22 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 11 | 16 | 25 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 6  | 13 | 23 |

Růst kmenů *C. globosum* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

|      |       | Růst (mm) 1. až 7. den |   |    |    |       |       |       |
|------|-------|------------------------|---|----|----|-------|-------|-------|
| JS/R | konc. | 1                      | 2 | 3  | 4  | 5     | 6     | 7     |
| 1    | 1     | 0                      | 7 | 11 | 13 | 19    | 23    | 28    |
| 1    | 1     | 0                      | 7 | 12 | 14 | 20    | 24    | 28    |
| 1    | 1     | 1                      | 7 | 13 | 16 | 21    | 25    | 30    |
| 1    | 1     | 0                      | 5 | 7  | 12 | kont. | kont. | kont. |
| 1    | 1     | 1                      | 5 | 7  | 12 | kont. | kont. | kont. |
| 1    | 2     | 2                      | 7 | 9  | 11 | 12    | 13    | 14    |
| 1    | 2     | 2                      | 6 | 9  | 12 | 14    | 16    | 20    |
| 1    | 2     | 0                      | 6 | 10 | 11 | 11    | 12    | 12    |
| 1    | 2     | 1                      | 6 | 10 | 11 | 13    | 14    | 19    |
| 1    | 2     | 0                      | 7 | 10 | 12 | 15    | 15    | 15    |
| 1    | 3     | 1                      | 7 | 10 | 12 | 14    | 16    | 17    |
| 1    | 3     | 0                      | 5 | 7  | 10 | 12    | kont. | kont. |
| 1    | 3     | 1                      | 6 | 8  | 9  | kont. | kont. | kont. |
| 1    | 3     | 0                      | 1 | 6  | 7  | kont. | kont. | kont. |
| 1    | 3     | 0                      | 6 | 10 | 11 | 14    | 17    | 18    |
| 1    | 4     | 0                      | 5 | 8  | 10 | 12    | 16    | 22    |
| 1    | 4     | 1                      | 6 | 8  | 10 | 12    | 15    | 20    |
| 1    | 4     | 0                      | 6 | 9  | 10 | 12    | 17    | 25    |
| 1    | 4     | 1                      | 6 | 9  | 10 | 13    | 15    | 19    |
| 1    | 4     | 1                      | 6 | 7  | 9  | 12    | 14    | 22    |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 1  | 4  | 5     | 6     | 9     |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 1  | 5  | 6     | 8     | 11    |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 4     | 6     | 6     |
| 1    | 5     | 0                      | 1 | 1  | 5  | 6     | 9     | 11    |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 1  | 4  | 5     | 7     | 7     |
| 2    | 1     | 1                      | 8 | 12 | 14 | 17    | 19    | 19    |
| 2    | 1     | 1                      | 7 | 11 | 14 | 15    | 18    | 18    |
| 2    | 1     | 1                      | 8 | 12 | 14 | 17    | 21    | 22    |
| 2    | 1     | 1                      | 8 | 12 | 15 | 19    | 21    | 24    |
| 2    | 1     | 1                      | 7 | 12 | 13 | 17    | 18    | 19    |
| 2    | 2     | 0                      | 6 | 9  | 11 | 12    | 13    | 14    |
| 2    | 2     | 1                      | 6 | 9  | 11 | 13    | 14    | 14    |
| 2    | 2     | 0                      | 6 | 8  | 10 | 13    | 14    | 17    |
| 2    | 2     | 0                      | 5 | 9  | 10 | 11    | 13    | 13    |
| 2    | 2     | 0                      | 6 | 9  | 10 | 12    | 13    | 14    |
| 2    | 3     | 1                      | 6 | 10 | 12 | 16    | 20    | 28    |
| 2    | 3     | 1                      | 6 | 9  | 11 | 13    | 16    | 16    |
| 2    | 3     | 1                      | 6 | 9  | 10 | 13    | 14    | 17    |
| 2    | 3     | 1                      | 6 | 10 | 12 | 15    | 17    | 18    |
| 2    | 3     | 0                      | 5 | 8  | 10 | 12    | 14    | 16    |
| 2    | 4     | 0                      | 5 | 7  | 9  | 11    | 13    | 14    |
| 2    | 4     | 0                      | 6 | 8  | 10 | 13    | 17    | 20    |
| 2    | 4     | 1                      | 6 | 8  | 9  | 12    | 15    | 20    |
| 2    | 4     | 0                      | 5 | 7  | 9  | 11    | 13    | 15    |
| 2    | 4     | 0                      | 5 | 7  | 9  | 11    | 13    | 13    |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 0  | 5     | 6     | 7     |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 3     | 4     | 7     |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 5     | 6     | 8     |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0  | 1  | 4     | 5     | 9     |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 1  | 1  | 5     | 7     | 10    |

Růst kmenů *D. eres* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

|      |       | Růst (mm) 1. až 7. den |    |    |    |    |    |    |
|------|-------|------------------------|----|----|----|----|----|----|
| JS/R | konc. | 1                      | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 6  | 10 | 14 | 17 | 18 | 19 |
| 1    | 1     | 0                      | 2  | 11 | 15 | 20 | 25 | 25 |
| 1    | 1     | 0                      | 1  | 11 | 16 | 19 | 21 | 22 |
| 1    | 1     | 0                      | 7  | 11 | 17 | 18 | 19 | 19 |
| 1    | 1     | 0                      | 6  | 11 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| 1    | 2     | 0                      | 6  | 11 | 15 | 19 | 20 | 22 |
| 1    | 2     | 0                      | 7  | 10 | 14 | 16 | 18 | 21 |
| 1    | 2     | 0                      | 5  | 10 | 14 | 17 | 19 | 20 |
| 1    | 2     | 0                      | 1  | 10 | 15 | 18 | 19 | 20 |
| 1    | 2     | 0                      | 5  | 11 | 15 | 17 | 18 | 19 |
| 1    | 3     | 0                      | 6  | 12 | 16 | 19 | 21 | 22 |
| 1    | 3     | 0                      | 7  | 13 | 16 | 18 | 19 | 19 |
| 1    | 3     | 0                      | 6  | 12 | 16 | 20 | 20 | 23 |
| 1    | 3     | 0                      | 1  | 9  | 13 | 17 | 18 | 20 |
| 1    | 3     | 0                      | 5  | 11 | 15 | 17 | 18 | 19 |
| 1    | 4     | 0                      | 4  | 10 | 12 | 16 | 19 | 20 |
| 1    | 4     | 0                      | 5  | 10 | 13 | 17 | 18 | 20 |
| 1    | 4     | 0                      | 2  | 9  | 14 | 18 | 22 | 24 |
| 1    | 4     | 0                      | 5  | 11 | 15 | 18 | 20 | 22 |
| 1    | 4     | 0                      | 6  | 11 | 15 | 18 | 19 | 20 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 7  | 10 | 13 | 17 | 20 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 7  | 11 | 14 | 18 | 20 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 5  | 9  | 11 | 15 | 17 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 5  | 9  | 13 | 17 | 20 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 6  | 10 | 14 | 16 | 18 |
| 2    | 1     | 1                      | 9  | 14 | 17 | 22 | 26 | 32 |
| 2    | 1     | 1                      | 8  | 14 | 17 | 20 | 21 | 25 |
| 2    | 1     | 0                      | 6  | 14 | 19 | 23 | 28 | 33 |
| 2    | 1     | 0                      | 7  | 14 | 19 | 22 | 26 | 31 |
| 2    | 1     | 0                      | 8  | 14 | 18 | 22 | 26 | 31 |
| 2    | 2     | 2                      | 10 | 15 | 17 | 20 | 25 | 30 |
| 2    | 2     | 2                      | 9  | 14 | 18 | 20 | 23 | 25 |
| 2    | 2     | 2                      | 12 | 17 | 20 | 24 | 29 | 32 |
| 2    | 2     | 1                      | 10 | 16 | 20 | 21 | 26 | 30 |
| 2    | 2     | 0                      | 8  | 14 | 18 | 22 | 26 | 30 |
| 2    | 3     | 1                      | 11 | 16 | 20 | 24 | 28 | 33 |
| 2    | 3     | 1                      | 10 | 17 | 20 | 25 | 29 | 32 |
| 2    | 3     | 1                      | 10 | 16 | 21 | 25 | 29 | 34 |
| 2    | 3     | 0                      | 7  | 14 | 18 | 23 | 28 | 32 |
| 2    | 3     | 0                      | 10 | 16 | 20 | 24 | 30 | 36 |
| 2    | 4     | 0                      | 7  | 15 | 20 | 25 | 32 | 39 |
| 2    | 4     | 1                      | 10 | 15 | 20 | 25 | 32 | 39 |
| 2    | 4     | 2                      | 9  | 17 | 22 | 27 | 34 | 40 |
| 2    | 4     | 1                      | 8  | 15 | 20 | 27 | 32 | 40 |
| 2    | 4     | 3                      | 10 | 17 | 22 | 28 | 32 | 40 |
| 2    | 5     | 0                      | 1  | 8  | 11 | 15 | 17 | 22 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 7  | 10 | 13 | 16 | 18 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 5  | 9  | 12 | 17 | 19 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 8  | 11 | 15 | 17 | 19 |
| 2    | 5     | 0                      | 1  | 8  | 12 | 14 | 17 | 19 |

Růst kmenů *B. inquinans* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

|      |       | Růst (mm) 1. až 7. den |   |   |   |   |    |    |
|------|-------|------------------------|---|---|---|---|----|----|
| JS/R | konc. | 1                      | 2 | 3 | 4 | 5 | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 1 | 4 | 5 | 6 | 6  | 6  |
| 1    | 1     | 0                      | 0 | 6 | 7 | 8 | 9  | 10 |
| 1    | 1     | 0                      | 1 | 5 | 5 | 7 | 7  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 0 | 5 | 6 | 7 | 9  | 10 |
| 1    | 1     | 0                      | 0 | 5 | 6 | 7 | 8  | 8  |
| 1    | 2     | 0                      | 0 | 3 | 4 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 2     | 0                      | 1 | 4 | 6 | 7 | 8  | 9  |
| 1    | 2     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 7 | 9  | 10 |
| 1    | 2     | 0                      | 1 | 4 | 5 | 7 | 8  | 9  |
| 1    | 2     | 0                      | 0 | 4 | 4 | 6 | 6  | 6  |
| 1    | 3     | 0                      | 0 | 3 | 5 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 3     | 0                      | 0 | 3 | 4 | 5 | 6  | 6  |
| 1    | 3     | 0                      | 0 | 3 | 5 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 3     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 6 | 8  | 9  |
| 1    | 3     | 0                      | 0 | 3 | 4 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 4     | 0                      | 0 | 4 | 4 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 4     | 0                      | 0 | 4 | 3 | 5 | 6  | 6  |
| 1    | 4     | 0                      | 0 | 4 | 4 | 6 | 7  | 8  |
| 1    | 4     | 0                      | 0 | 4 | 4 | 6 | 6  | 7  |
| 1    | 4     | 0                      | 0 | 3 | 5 | 6 | 7  | 7  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 1    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 2    | 1     | 0                      | 0 | 3 | 6 | 9 | 11 | 13 |
| 2    | 1     | 0                      | 0 | 4 | 6 | 9 | 10 | 13 |
| 2    | 1     | 0                      | 0 | 1 | 5 | 9 | 12 | 14 |
| 2    | 1     | 0                      | 0 | 1 | 5 | 8 | 12 | 14 |
| 2    | 1     | 0                      | 0 | 0 | 4 | 7 | 10 | 12 |
| 2    | 2     | 0                      | 0 | 1 | 5 | 6 | 8  | 10 |
| 2    | 2     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 7 | 9  | 10 |
| 2    | 2     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 7 | 9  | 10 |
| 2    | 2     | 0                      | 0 | 5 | 6 | 8 | 10 | 11 |
| 2    | 2     | 0                      | 0 | 3 | 5 | 7 | 9  | 10 |
| 2    | 3     | 0                      | 0 | 1 | 3 | 5 | 8  | 9  |
| 2    | 3     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 6 | 9  | 10 |
| 2    | 3     | 0                      | 0 | 1 | 3 | 5 | 7  | 9  |
| 2    | 3     | 0                      | 0 | 1 | 4 | 6 | 7  | 9  |
| 2    | 3     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 7 | 9  | 10 |
| 2    | 4     | 0                      | 0 | 3 | 4 | 5 | 7  | 9  |
| 2    | 4     | 0                      | 0 | 4 | 5 | 7 | 8  | 10 |
| 2    | 4     | 0                      | 0 | 1 | 4 | 5 | 8  | 9  |
| 2    | 4     | 0                      | 0 | 1 | 4 | 6 | 9  | 10 |
| 2    | 4     | 0                      | 0 | 1 | 4 | 5 | 7  | 9  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |
| 2    | 5     | 0                      | 0 | 0 | 0 | 0 | 0  | 0  |

Růst kmenů *D. acicola* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

|      |       | Růst (mm) 1. až 7. den |    |    |    |    |    |    |
|------|-------|------------------------|----|----|----|----|----|----|
| JS/R | konc. | 1                      | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 9  | 17 | 29 | 37 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 1                      | 10 | 17 | 27 | 35 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 7  | 14 | 25 | 34 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 10 | 18 | 25 | 35 | 40 | 40 |
| 1    | 1     | 0                      | 9  | 16 | 25 | 35 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 7  | 13 | 20 | 29 | 38 | 40 |
| 1    | 2     | 1                      | 8  | 14 | 21 | 30 | 39 | 40 |
| 1    | 2     | 1                      | 9  | 14 | 23 | 32 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 1                      | 8  | 14 | 22 | 32 | 40 | 40 |
| 1    | 2     | 0                      | 6  | 11 | 19 | 27 | 37 | 40 |
| 1    | 3     | 1                      | 6  | 11 | 19 | 29 | 37 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 17 | 23 | 32 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 1                      | 7  | 12 | 20 | 29 | 38 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 13 | 21 | 30 | 40 | 40 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 12 | 20 | 30 | 39 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 8  | 14 | 22 | 31 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 5  | 12 | 20 | 30 | 39 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 6  | 11 | 20 | 29 | 38 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 7  | 13 | 21 | 32 | 40 | 40 |
| 1    | 4     | 0                      | 5  | 12 | 19 | 28 | 38 | 40 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 1  | 8  | 14 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 1  | 5  | 11 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 5  |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 7  | 12 | 20 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 7  |
| 2    | 1     | 1                      | 12 | 20 | 30 | 38 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 12 | 20 | 28 | 38 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 11 | 19 | 29 | 37 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 11 | 19 | 28 | 38 | 40 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 12 | 19 | 29 | 38 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 1                      | 10 | 18 | 26 | 35 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 9  | 16 | 24 | 32 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 1                      | 11 | 19 | 27 | 36 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 11 | 18 | 26 | 36 | 40 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 10 | 18 | 26 | 36 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 1                      | 10 | 17 | 25 | 35 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 9  | 16 | 24 | 33 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 7  | 14 | 20 | 30 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 1                      | 10 | 17 | 25 | 35 | 40 | 40 |
| 2    | 3     | 1                      | 9  | 16 | 23 | 34 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 1                      | 9  | 16 | 25 | 33 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 1                      | 10 | 17 | 26 | 35 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 8  | 16 | 25 | 33 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 10 | 17 | 25 | 34 | 40 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 9  | 16 | 24 | 33 | 40 | 40 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 2  | 10 | 15 | 20 | 28 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 1  | 9  | 14 | 19 | 28 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 1  | 7  | 11 | 16 | 23 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 1  | 8  | 13 | 19 | 26 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 6  | 12 | 16 | 23 |



Růst kmenů *A. montagnei* (JS - jiný substrát - 1; R - *R. tomentosum* - 2; koncentrace: 1 - PDA, 2 - PDA+MeOH, 3 - C1, 4 - C2, 5 - C3)

| JS/R | konc. | Růst (mm) 1. až 7. den |    |    |    |    |    |    |
|------|-------|------------------------|----|----|----|----|----|----|
|      |       | 1                      | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 1     | 0                      | 9  | 15 | 20 | 25 | 32 | 36 |
| 1    | 1     | 0                      | 11 | 17 | 22 | 26 | 29 | 31 |
| 1    | 1     | 0                      | 9  | 16 | 22 | 25 | 28 | 30 |
| 1    | 1     | 0                      | 10 | 17 | 22 | 25 | 27 | 29 |
| 1    | 1     | 0                      | 11 | 18 | 21 | 25 | 27 | 30 |
| 1    | 2     | 0                      | 8  | 12 | 17 | 19 | 19 | 20 |
| 1    | 2     | 0                      | 7  | 14 | 19 | 23 | 24 | 27 |
| 1    | 2     | 0                      | 8  | 12 | 16 | 20 | 20 | 23 |
| 1    | 2     | 0                      | 8  | 13 | 17 | 21 | 21 | 23 |
| 1    | 2     | 0                      | 10 | 16 | 19 | 24 | 25 | 28 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 14 | 20 | 26 | 29 | 34 |
| 1    | 3     | 0                      | 9  | 14 | 20 | 25 | 27 | 32 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 13 | 20 | 25 | 28 | 34 |
| 1    | 3     | 0                      | 8  | 14 | 19 | 23 | 25 | 27 |
| 1    | 3     | 0                      | 6  | 12 | 18 | 21 | 27 | 32 |
| 1    | 4     | 0                      | 7  | 12 | 17 | 22 | 27 | 30 |
| 1    | 4     | 0                      | 7  | 8  | 10 | 19 | 22 | 27 |
| 1    | 4     | 0                      | 6  | 11 | 16 | 22 | 27 | 30 |
| 1    | 4     | 0                      | 4  | 8  | 12 | 19 | 25 | 30 |
| 1    | 4     | 0                      | 5  | 7  | 11 | 14 | 17 | 22 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 1  | 5  | 8  |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 5  | 6  | 8  |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 2  | 6  | 8  | 11 |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 2  | 5  | 6  | 7  |
| 1    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 2  | 5  | 6  | 8  |
| 2    | 1     | 0                      | 8  | 14 | 22 | 32 | 38 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 10 | 16 | 24 | 32 | 39 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 8  | 16 | 23 | 32 | 35 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 10 | 17 | 24 | 32 | 37 | 40 |
| 2    | 1     | 0                      | 10 | 17 | 25 | 34 | 39 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 10 | 20 | 24 | 33 | 37 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 9  | 14 | 22 | 28 | 35 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 8  | 14 | 21 | 28 | 34 | 40 |
| 2    | 2     | 0                      | 7  | 13 | 17 | 25 | 32 | 39 |
| 2    | 2     | 0                      | 7  | 13 | 22 | 27 | 33 | 39 |
| 2    | 3     | 0                      | 8  | 15 | 20 | 26 | 34 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 8  | 12 | 20 | 27 | 35 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 6  | 11 | 19 | 26 | 32 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 7  | 12 | 18 | 26 | 34 | 40 |
| 2    | 3     | 0                      | 7  | 13 | 20 | 27 | 32 | 40 |
| 2    | 4     | 0                      | 6  | 11 | 18 | 21 | 28 | 37 |
| 2    | 4     | 0                      | 5  | 12 | 17 | 21 | 28 | 34 |
| 2    | 4     | 0                      | 4  | 8  | 14 | 20 | 26 | 33 |
| 2    | 4     | 0                      | 6  | 10 | 17 | 20 | 29 | 33 |
| 2    | 4     | 0                      | 5  | 7  | 13 | 19 | 25 | 34 |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 5  | 8  | 9  |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 6  | 7  | 9  |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 1  | 6  | 8  | 9  |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 0  | 0  | 1  | 5  | 8  |
| 2    | 5     | 0                      | 0  | 1  | 6  | 7  | 8  | 9  |