

## Závěrečná výroční zpráva projektu specifického výzkumu Smlouva č. 4470 /2022

**Název projektu:** Identifikace a charakterizace environmentálních zdrojů houbových patogenů

**Specifikace výzkumného týmu**

Řešitel: Lenka Michalčíková

Další řešitelé: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, PhD.

**Celková výše dotace:** 169 500 Kč

**Stručný popis průběhu projektu:**

Studijní lokalita se nacházela v Národní přírodní rezervaci Žofínský Prales, neobhospodařovaném lesním porostu na jihu České republiky. Části lesa nejsou obhospodařovány od roku 1838, kdy byl vyhlášen rezervací. Studijní území se nachází v nadmořské výšce 730 až 830 m n. m., horninové podloží je téměř homogenní a je tvořeno jemnou až středně zrnitou porfyrickou a biotickou žulou. Všechny živé i mrtvé stromy jsou od roku 1975 sledovány v zóně rezervace o rozloze 25 hektarů. Uprostřed pozemku o výměře 25 ha (48,666 N, 14,707 E) byl vytyčen kruhový plot o poloměru 30 m. Na kruhovém plotu se nacházelo 51 padlých mrtvých dřevin (hrubá suť a kmeny stromů o průměru >10 cm), z toho tři dřeviny (buk, smrk a jedle), dvě polohy (stoje a pokácené mrtvé dřevo) a čtyři fáze rozkladu.

Měření respirace byla provedena in situ ve dnech 10. a 11. října 2019 pomocí infračerveného analyzátoru plynů (IRGA, GMP343, Vaisala Inc., Vantaa, Finsko) a akrylové komory (průměr: 9 cm, výška: 8 cm). Dvě vinylchloridové manžety byly připevněny k mrtvému dřevu tmelem, aby se utěsnila mezera. Akrylová komora IRGA byla umístěna na kruhové těsnění na 5 minut a zapisovač dat CO<sub>2</sub> (GL200A, Graphtech Inc., Yokohama, Japonsko) zaznamenával koncentrace CO<sub>2</sub> každou sekundu. Rovněž byla zaznamenávána teplota a vlhkost. Po změření respirace byla teploměrem změřena teplota dřeva v hloubce 3 cm.

Rychlost respirace bloků mrtvého dřeva udržovaných při teplotě vzduchu byla měřena rovněž v laboratoři pomocí akrylové komory (12 × 12 × 20 cm) jeden den po odběru vzorků, aby se posoudily případné rozdíly v rychlosti respirace mezi měřenými podmínkami in situ a v laboratoři. Postupy používané k měření bloků byly stejné jako postupy používané v terénu. Byla měřena mokrá hmotnost dřevěných bloků, následně byly lyofilizovány a znovu zváženy, aby se vypočítal obsah vody. Jejich velikost byla také zaznamenána pro výpočet hustoty lyofilizovaného dřeva. Bloky byly poté rozemlety na jemný prášek mlýnem (Ultra Centrifugal Mill ZM 200, Retsch, Haan, Německo) pro následnou analýzu. Druhá polovina bloků byla také lyofilizována a rozemleta na jemný prášek ve stejném mlýnu pro následnou extrakci DNA.

Celková genomová DNA byla extrahována z 200 mg dřevěného prášku pomocí NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel, Duren, Německo). Extrahovaná DNA byla použita jako templát pro

amplifikaci oblasti hub ITS2 pomocí primerů s čárovým kódem gITS7 a ITS4 a oblasti bakterií V4 pomocí primerů 515F a 806R ve třech reakcích PCR na vzorek. PCR reakce obsahovaly 2,5 µl 10× pufru pro DyNAzyme DNA polymerázu, 0,75 µl DyNAzyme II DNA polymerázy (2 ug.µL<sup>-1</sup>), 1,5 µl BSA (10 mg.ml<sup>-1</sup>), 0,5 µl směsi nukleotidů PCR (10 mM), 1 µl každého primeru (10 µM), 1,0 µl templátové DNA (koncentrace přibližně 5–50 ng.µL<sup>-1</sup>) a sterilní ddH<sub>2</sub>O do 25 µl. Podmínky amplifikace začaly při 94 °C po dobu 4 minut, následovalo 35 cyklů 94 °C po dobu 45 s, 50 °C po dobu 60 s a 72 °C po dobu 75 s a skončilo konečným nastavením 72 °C po dobu 10 minut. Amplikony byly purifikovány, spojeny a sekvenovány na Illumina MiSeq, aby se získaly spárované sekvence 2 x 250 bp.

Kopie houbových a bakteriálních genů rRNA byly kvantifikovány pomocí qPCR (qTower3G, Analytik Jena, Německo) s použitím primerů FR1 a FF390 pro houby a primerů 1108f a 1132r pro bakterie. Podmínky amplifikace začaly při 56 °C po dobu 2 minut a 95 °C po dobu 10 minut, následovalo 40 cyklů 95 °C po dobu 15 s, 50 °C po dobu 30 s a 70 °C po dobu 1 minuty a skončilo konečným nastavením 95 °C po dobu 10 min.

Zpracování sekvenčních dat bylo provedeno pomocí programu SEED 2.0. Sekvenční data byla uložena v databázi NCBI pod přístupovým číslem PRJNA827576. Aby bylo možné přiřadit předpokládané ekologické funkce funkčním taxonomickým jednotkám hub (OTU), byly rody hub klasifikovány do ekofyziologických kategorií (např. bílá hniloba, hnědá hniloba, saprotrof a ektomykorhiza) na základě publikované literatury.

Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru R. Byla provedena jednosměrná ANOVA pro posouzení vlivu druhů dřevin, polohy mrtvého dřeva a doby rozpadu na sledované proměnné. Pro korelační analýzu mezi sledovanými proměnnými byl použit Studentův t-test. Ve statistickém programu R, pomocí balíčku VEGAN byla provedena NMDS ordinační analýza Bray-Curtisových vzdáleností houbových a bakteriálních komunit. Vliv všech fyzikálně-chemických a biologických faktorů na rychlost respirace byl analyzován pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM).

### Dosažení cílů řešení a přínosu projektu.

První článek z důvodu dvojité afiliace a také nedefinování podpory z ministerstva v článku mi nebyl uznán, ale **nyní je v editorské tvorbě spoluautorů druhý článek**. Výstup v rozsahu nejméně jednoho článku se očekává v roce 2024.

### Splnění kontrolovatelných výsledků řešení.

- ✘ *V rámci disertační práce, terénních odběrů vzorků a synchronní spolupráce na dalších článcích a projektech jsem tento úkol letos nesplnila a druhý článek je momentálně v editorské fázi kolegů a předpokládáme submitaci článku v roce 2024.*
- ✘ *V OBD záznam není uveden, protože je ve fázi editace spoluautorů.*

U výstupů Jimp a Jsc uveďte do závorek plánovaný a skutečný kvartil deníku .

**Tab. 1 Shrnutí výstupů projektu**

Typ výstupu	Plán	Fakt	Poznámka
Jimp (databáze WoS)*	1	0	
Jsc (databáze Scopus)		0	
B (recenzovaná kniha)* *			
C (kapitola v recenzované vědecké knize)**			
D (článek ve sborníku WoS, Scopus)	1	0	
P (patent)			
Počet obhájených disertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací			
<b>Počet výsledků</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	

Nehodnocené výstupy projektu			
Poster/prezentace na konferenci			
Počet obhájených disertačních prací			
Počet obhájených diplomových prací			
Počet výsledků			

**Výsledek plnění rozpočtu:**

a) **Spotřeba materiálu (položka dle IS Magion č. 501):**

Materiálové náklady (musí soutěžit v rámci DNS)	Stručné zdůvodnění nákupu	Přesná specifikace	Cena vč. DPH (Kč)
Datalogger	Datalogger pro sběr dat z pole. Načtení několika parametrů v terénu bylo klíčové po získání dostatečného množství dat pro projekt.	Přenosný přístroj pro měření vlhkosti, ozáření a proudění vzduchu na vybraných místech v terénu.	7301,0

Náklady na spotřební materiál (spotřební a kancelářské potřeby)	Stručné zdůvodnění nákupu	Cena vč. DPH (Kč)
Laboratorní spotřební materiál a pomůcky	Pro laboratorní práci jsou vyžadovány spotřební plasty (špičky, mikrozkmavky, pipety, smyčky atd.) a základní chemikálie pro PCR a kultivaci různých mikroorganismů, stejně jako osobní ochranné prostředky (rukavice) a další běžný spotřební materiál.	129536,19

\* Povinný výjezd.

\*\* Pouze renomovaná vydavatelství jako Elsevier, Springer, Bentham atd.

- b) **Jízdné** (položka dle IS Magion č. 512):  
cestovní výdaje zaměstnanců a jejich stručné zdůvodnění;

Titul, jméno a příjmení zaměstnance	Ubytování (cca Kč)	Cestovní výdaje (cca Kč)	Stravné (cca Kč)	Celkem (€)	(Název, místo konání a datum)

- c) **Jiný služby** (položka dle IS Magion č. 518):  
Náklady nebo výdaje na služby a jejich stručné zdůvodnění

Typ služby	Stručné zdůvodnění služby	Cena vč. DPH (Kč)
Tisk plakátů	Tisk posteru na konferenci, kde byly prezentovány dílčí výsledky projektu.	193,6

- d) **Mzdové náklady** (položka dle IS Magion č. 521):

Titul, jméno a příjmení	Odměna (Kč)	Zdůvodnění	Celkem (€)

- e) **Legální pojištění** (položka dle IS Magion č. 524):

Titul, jméno a příjmení	Odvody z odměn 34,52 % (Kč)	Celkem (€)

- f) **Jiný jiný náklady** (položka dle IS Magion č. 549):  
Zejména **stipendia** a jejich stručné zdůvodnění

#### Studentské stipendium za práci na projektu

Titul, jméno a příjmení studenta	Číslo studenta	Typ studia (Mgr./Ph.D.) / ročník	Studijní obor	Bankovní spojení	Stipendium (Kč)
Mgr. Lenka Michalčíková	S21BI005DP	Ph.D./3	Biologie a ekologie		8000

#### Studentská cestovní stipendia

Titul, jméno a příjmení studenta	Konferenční poplatek (cca Kč)	Ubytová ní (cca Kč)	Cestovní výdaje (cca Kč)	Stravné (cca Kč)	Celkem (€)	Plánovaná konference (název, místo a datum)

Mgr. Lenka Michalčíková					8000	Náhrada výdajů na exkurze za odběr vzorků
Mgr. Lenka Michalčíková					12800	Výdaje spojené s účastí na Konferenci půdních mikroorganismů
Mgr. Lenka Michalčíková					3836	Kompenzace výdajů za online kurz Learn Data Plans

g) **Ostatní položky** (uvádějte čísla podle IS Magion):  
Další body a jejich stručné zdůvodnění

Výsledek využití finančních prostředků by měl být uveden v jednotné přehledové tabulce 2.

Tab. č. 2 Čerpání peněžních prostředků v Kč

Kouzelný předmět	Položka	Plán Kč	Žádost o změnu	Fakt	Poznámka
	Počet členů řešitelského týmu, kteří pobírají mzdové prostředky	0	-	0	
	Počet studentů, kteří pobírají finanční prostředky ze mzdy	1	-	1	
501	Spotřeba materiálu DHIM	77000	rok	136837,19	Zvýšeno z položek 518 a 549
512	Jízdné	0	-	0	
518	Další služby	41200	rok	193,6	Přesun části prostředků do položky 501
521	Mzdové náklady	0	-	0	
524	Zákonné pojištění	0	-	0	
549	Ostatní náklady (stipendia)	51300	rok	32626,0	Přesun části prostředků do položky 501
*					
	<b>Celkové náklady</b>	<b>169500</b>		<b>169666,79</b>	

Přílohy:

Výkaz zisku a ztráty z ekonomického informačního systému Magion – dotační účetnictví.  
(Příloha)

Datum: 23. 12. 2023

Podpis odpovědného řešitele:

\* V případě potřeby doplňte další řádky se záznamy v IS Magion.