

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Beata Holková

Fyziologie ektomykorrhizních hub – kultivace *in vitro*
Physiology of ectomycorrhizal fungi – *in vitro* cultivation

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, Ph.D., který mě postavil před toto bohaté mykologické téma a poskytnul mi možnost vyzkoušet si práci s ektomykorrhizními houbami na vlastní kůži. Další velké díky patří bc. Dominiku Lovásovi, konzultantovi mé práce, jenž mi poskytl cenné vhledy a vstřícně mě provedl některými základními metodami houbového výzkumu. Děkuji také mé drahé rodině za její neutuchající zájem a vytvoření vlídného prostředí pro psaní.

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 dne 29. 4. 2024

Abstrakt

Ektomykorrhizní symbióza (ektomykorrhiza) je velice podstatnou interakcí, která ovlivňuje rostliny i houby v řadě ekosystémů. Toto spojení hub s rostlinami se těší zájmu mykologů a botaniků již déle než století. Přesto stále skýtá množství neprobádaných témat pro výzkum. Ektomykorrhizní houby jsou významnými inokulanty, zdroji biologických pigmentů, antibiotik i potravy. Větší porozumění v oblasti výživové a růstové fyziologie těchto hub, jíž se ve své práci zabývám, může zvýšit efektivitu *in vitro* kultivace, a tedy hrát ve prospěch pokroku v oborech sahajících i za hranice mykologie.

Klíčová slova

ektomykorrhiza, ektomykorrhizní houby, růst a výživa hub, fyziologie ektomykorrhizních hub, abiotické faktory, biotické faktory, kultivace *in vitro*

Abstract

Ectomycorrhizal symbiosis (ectomycorrhiza) is a very important interaction, which affects plants and fungi in a variety of ecosystems. This interaction has been of interest to many mycologists and botanists for over a century. However, there is still a lot to be discovered. Ectomycorrhizal fungi are valuable inoculants, sources of biological pigments, antibiotics and even food. Better understanding of their nourishment and growth physiology, which is the main focus of my work, may increase the efficiency of *in vitro* cultivation and thus promote progress in fields beyond mycology.

Key words

ectomycorrhiza, ectomycorrhizal fungi, fungal growth and nutrition, physiology of ectomycorrhizal fungi, abiotic factors, biotic factors, *in vitro* cultivation

Obsah

Úvod	1
Požadavky hub na růst se zaměřením na ektomykorrhizní druhy	2
Abiotické faktory	2
Voda	2
Makroelementy	5
Mikroelementy	9
Vitamíny	9
Těžké kovy	10
Teplota	10
pH	12
Salinita	13
Světlo	14
Polutanty	15
Biotické faktory	15
Efekty mikroorganismů na růst ektomykorrhizních hub	15
Kořenové exudáty	22
Kultivace ektomykorrhizních hub	24
Izolace do čisté kultury	24
Izolační média	25
Typy kultivace EM hub	27
Uchovávání v kultuře	28
Perspektivy pro další práci	29
Závěr	30
Seznam použité literatury	31

Úvod

Jednou z prvních významných osobností, která se zabývala symbiotickými vztahy mezi rostlinami a houbami, byl německý biolog Albert Bernhard Frank. Byl to právě on, kdo v roce 1885 poprvé použil termín „mykorrhiza“. Na základě řady experimentů a morfologických studií navíc vypracoval hypotézu o vzájemně prospěšné výměně živin mezi stromy a houbami, čímž se zasloužil o první správnou interpretaci nově objeveného fenoménu mykorrhizní symbiózy (Frank 1885; Read 1995; Trappe 2005; Smith and Read 2008).

Ektomykorrhizní symbióza (ektomykorrhiza) je spojení hub (především ze skupin Basidiomycota a Ascomycota) s kořeny vyšších rostlin (typicky se dřevinami z oddělení Acrogymnospermae a Magnoliophyta) (Brundrett 2009). Rozhraní mezi houbovým a rostlinným partnerem je tvořeno hyfovým pláštěm, jenž přímo obklopuje kořen rostliny, a Hartigovou sítí hyf proplétající se v mezibuněčných prostorech kořene (Smith and Read 2008). Funkce obou struktur je zvětšení povrchu pro výměnu živin mezi houbou a rostlinou (Charya and Garg 2019). Na dalším získávání živin ze substrátu a napojení sporokarpů k tomuto systému se pak podílí extraradikální mycelium (Smith and Read 2008). Právě výměna živin je klíčovým benefitem pro oba účastníky. Rostlina slouží houbě jako zdroj uhlíkatých látek (získaných při fotosyntéze), houba zase významně pomáhá rostlině s příjmem vody a živin ze substrátu (Stuart and Plett 2020).

Již Albert Bernhard Frank (1894) pozoroval ve svých experimentech rychlejší růst semenáčků borovice s rozvinutou ektomykorrhizou. Další pozorování exotických druhů ektomykorrhizních stromů na mnoha místech světa dokonce uváděla nezbytnost zformování ektomykorrhizy pro jejich úspěšný růst (Smith and Read 2008).

Samozřejmě, že nic není černobílé a vlivy ektomykorrhizy na růst a vývoj rostlin se mohou lišit v závislosti na konkrétní interakci a řadě lokálních faktorů, jako jsou například obsah živin v substrátu či míra osvitů rostliny (Smith and Read 2008). Dnes už je ovšem nesporným faktem, že ektomykorrhizní houby (dále jako EM houby) mohou poskytnout mnoho užitku jak rostlinám, tak člověku, pokud jich tedy užívá správně.

Požadavky hub na růst se zaměřením na ektomykorrhizní druhy

Tato kapitola je věnována růstu hub, příjmu jednotlivých nutrientů v přírodě a jeho odrážení se v potřebách hub pěstovaných na médiu. V houbové říši se rozvinuly saprotrofní, parazitické a mutualistické strategie. Saprotrofní houby plní, díky své schopnosti rozkládat organickou hmotu, významnou funkci v koloběhu živin (Walker and White 2017; Moore, Robson, Trinci 2021).

Houby jsou chemoorganotrofové s absorpční výživou. Do svého okolí vylučují enzymy, které zajišťují rozklad substrátu na jednodušší, přes buněčnou stěnu vstřebatelné, složky (Moore, Alexopoulos and Ahmadjian 2023). Výživové požadavky konkrétních druhů hub se odvíjejí od jejich životních strategií a mohou se výrazně lišit. Velké rozdíly lze nalézt například mezi kvasinkami a vláknitými houbami (Walker 1998; Walker and White 2017).

Studie zmiňované ve stávající kapitole se většinou zaměřují na vliv konkrétního faktoru prostředí. Tyto faktory se však vzájemně různě ovlivňují a teprve jejich souhra určuje výslednou povahu houbového růstu. Při rozboru růstu a akvizice živin ektomykorrhizními houbami je potřeba mít na paměti jejich úzkou návaznost na rostlinné symbionty, která je výrazně ovlivňuje. Stejně tak okamžité abiotické i další biotické faktory. To lze demonstrovat na studiích Romella (1930, 1938, 1939), který opakovaně pozoroval vymizení plodnic některých druhů ektomykorrhizních hub, jemuž předcházela separace či úplně vykácení s nimi asociovaných stromů.

Abiotické faktory

Voda

Vodné roztoky, s minimální vodní aktivitou okolo 0,65, jsou stěžejní pro růst většiny hub (Walker and White 2005). Vodní aktivita (a_w) je definována jako podíl parciálního tlaku páry roztoku (substrátu) a parciálního tlaku páry čisté vody při stejné teplotě (Scott 1953). Další významná veličina pro popis vodního režimu organismů je vodní potenciál (Ψ), který udává rozdíl potenciální energie mezi vodou v systému a čistou vodou. Jeho hlavní složky tvoří potenciál osmotický a tlakový (Kramer et al. 1966).

Některé druhy hub, jako je kvasinka *Zygosaccharomyces rouxii*, jsou osmotolerantní a dokáží růst i v podmínkách s nízkým Ψ . Obecně vzato jsou houby schopné krátkodobě alternovat svůj vnitřní osmotický potenciál v reakci na osmotický stres. Využívají k tomu například syntézy glycerolu, který napomáhá udržení buněčného objemu a metabolismu v hypertonickém prostředí (Walker and White 2005).

Mnoho studií ukázalo, že schopnost růstu jednotlivých EM druhů ve vysoce vodou saturovaných půdách (s vysokým Ψ , často poznamenaných horší dostupností kyslíku či některých živin ve vhodných formách), nebo naopak půdách s nízkou dostupností vody (nízkým Ψ a hrozbou ztráty turgidity houbových buněk) se liší. Studie zabývající se vodním režimem EM hub probíhaly jak *in vivo* (Bougher and Malajczuk 1990; Jany et al. 2003; Lilleskov et al. 2009; Thomas 2021), tak *in vitro* (Mexal and Reid 1973; Coleman et al. 1989; Stenström 1991; Sánchez et al. 2001)

Druh *Cenococcum graniforme* dosahoval na tekutém MMN (modifikovaném Melin-Norkrans médiu) s nízkým Ψ maximálního růstu při -15 barech (-1,5 MPa). Variabilních Ψ bylo dosaženo různými přísadkami polyethylenglykolu PEG 4000 (Mexal and Reid 1973). Rozsáhlejší experiment s obdobnými podmínkami (Coleman et al. 1989) odhalil další sucho tolerující druhy, a sice *Cenococcum geophilum*, *Boletus edulis*, *Rhizopogon vinicolor* a některé druhy rodu *Suillus*. Tyto byly schopny růst i při Ψ rovnému 3 MPa. Druhy *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor* a *Lactarius controversus* byly naopak zcela inhibovány při hodnotě Ψ -0,4 MPa a nižší. Obecně byla většina testovaných izolátů jen málo tolerantní k vodnímu stresu. Reakce jednotlivých izolátů v rámci druhu byly až na výjimky velmi podobné, nicméně po srovnání s výsledky dalších studií byly i zde nalezeny vnitrodruhové rozdíly, a je tedy pravděpodobné, že tolerance k vodnímu stresu je, spíše než adaptivní vlastností druhu, podmíněna charakterem původního prostředí konkrétního izolátu (Sánchez et al. 2001).

C. geophilum vykazovalo podobné vlastnosti jako v předešlé studii také *in vivo*. PRA (potenciální respirační aktivita), odrážející metabolickou aktivitu tohoto druhu, byla signifikantně vyšší při nízkém Ψ (< -0,2 MPa) ve srovnání s blíže neurčeným druhem rodu *Lactarius* (Jany et al. 2003).

Se zvýšenou schopností EM hub odolávat suchu jsou spojovány vlastnosti, jako jsou tvorba rhizomorfů, malý relativní povrch sporokarpů (poměrně k objemu) nebo schopnost získávat

vodu z hlubších vrstev půdy (např. z hydraulického zdvihu – za pomoci rostlinných symbiontů). Jedním z druhů, kterému tyto vlastnosti přísluší, je *B. edulis*. *Amanita muscaria* s větším poměrem povrchu k objemu se naopak jeví náchylnější k vysychání. U rodů *Tricholoma* a *Russula*, kde bychom vzhledem k morfologii mohli očekávat podobnou náchylnost, je však situace poněkud odlišná. Zde by se na redukci ztrát vody mohlo podílet též shlukování, převážně hypogeické formování plodnic a další specifické vlastnosti jejich buněk a povrchů (Lilleskov et al. 2009).

Bougher a Malajczuk (1990) pozorovali ve skleníkovém experimentu redukci formování ektomykorrhizy semenáčků karri (*Eucalyptus diversicolor*) druhy *L. laccata*, *P. tinctorius* a *Descolea maculata* se zvyšující se vodní saturací písčitého substrátu. Izolát druhu *D. maculata* původem z bažinatého prostředí kupodivu neprodukoval při vyšší vodní saturaci větší množství ekromykorrhizních kořenů než izolát druhu *L. laccata* z lesa. K dalším významným faktorům ovlivňujícím formování ektomykorrhizy by se tudíž mohly přiřadit i extrémní sezónní fluktuace půdní vlhkosti či konkrétní vlastnosti půdy hrající více či méně ve prospěch některých druhů.

Tuto teorii podpořil i jeden z výsledků studie Elny Stenström (1991). *Suillus flavidus* je druhem často rostoucím na bažinaté půdě jehličnatých lesů. Přesto při pravidelném zaplavení v *in vitro* podmínkách ektomykorrhizu vůbec nevytvořil (společně se svým příbuzným druhem *Suillus bovinus*). V kontrastu s předchozí studií zde *L. laccata* (společně s druhy *Thelephora terrestris* a *Hebeloma crustuliniforme*) nevykazovala citlivost k zaplavení. Nicméně metodika obou studií byla odlišná a je otázkou, na kolik lze situaci *in vitro* srovnávat s komplexním stavem věcí v přírodě.

Redukce ektomykorrhizy v důsledku vysoké vodní saturace byla pozorována i u druhu *Tuber aestivum* (symbionta druhu *Quercus robur*). Tento druh byl schopný přežít zaplavení trvající minimálně 65 dní, nicméně už pouhých sedm dní mělo signifikantní redukční vliv (Thomas 2021). Rozšíření ektomykorrhizy sice může být periodickým zaplavením poznamenáno, ale pakliže je tato symbióza jednou ustavena, má určitou resilienci a měla by být schopná obnovit svou normální aktivitu po znovunastolení původních podmínek (Stenström 1991; Thomas 2021).

Makroelementy

Kyslík

Mezi houby patří jak obligátně aerobní (např. *Gaeumannomyces graminis*), tak obligátně anaerobní (např. *Kazachstania telluris*) či fakultativně anaerobní organismy (např. *Saccharomyces cerevisiae*) schopné fermentativního metabolismu (Walker and White 2005). Kyslík může být pro houby, které jej potřebují k respiraci, limitujícím faktorem například při zaplavení půdy (Slankis 1974; Thomas 2021) nebo při jejich nevhodně navrženém průmyslovém pěstování (Rossi et al. 2017).

EM houby jsou silně aerobní (Melin 1953; Harley and Smith 1983; Boucher and Malajczuk 1990). *Suillus variegatus* v agarových kulturách se semenáčky vykazoval nejvyšší růst na povrchu agaru (v místě nejvíce kontaktním se vzduchem). Nejsilnější růst hyfového pláště byl pozorován okolo částí kořene, která jsou spojována s vývinem kyslíku a příjmem živin. Formování ektomykorrhizy tedy může být ovlivněno nejen živinami dostupnými v půdě, nýbrž i mírou jejího provzdušnění či schopností rostlinných symbiontů dopravovat kyslík do kořenů a poskytovat jej houbovému partnerovi (Read and Armstrong 1972).

Uhlík

Houby jsou schopné získávat uhlík, základní strukturní element a zdroj energie (Walker and White 2005), ze široké škály sloučenin, mezi kterými dominují sacharidy. Od jednoduchých pentóz (např. D-xylóza, L-arabinóza) a hexóz (D-glukóza, D-galaktóza, aj.) přes di-/tri-/oligosacharidy (např. maltóza, sacharóza, rafinóza, maltodextriny) až po polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, škrob). Dalšími zdroji mohou být jednoduché alifatické alkoholy, jako je ethanol, mastné kyseliny (oleát, palmitát), organické kyseliny (malát, laktát), cukerné alkoholy (glycerol, glucitol), některé vyšší n-alkany, aromatické látky (fenol, resorcinol) či kyselina močová. Keratinofilní houby jsou schopny využít keratin, intenzivní rozklad ligninu je výsadou hub bílé hniloby (Walker 1998; Walker and White 2017). EM houby jsou většinou jen omezeně schopné využívat komplexní polymery jako zdroj uhlíku (Melin 1925; Smith and Read 2008), jistou schopnost rozkládat lignin a celulózu však většina EM hub přeci jen vykazuje (Harley and Smith 1983; Smith and Read 2008).

Většina hub prosperuje na médiích obsahujících glukózu, manózu, maltózu, fruktózu a v menší míře i sacharózu (Moore, Alexopoulos and Ahmadjian 2023). Obvykle dobrými

zdroji uhlíku pro růst EM hub jsou glukóza, manóza a fruktóza (Smith and Read 2008). Pro pěstování některých druhů EM hub *in vitro* lze do tohoto výčtu zařadit například ještě pektin, sacharózu, arabinózu (Ceci et al. 2018), trehalózu, celobiózu, škrob (Ohta 1997) a aminokyseliny (studie viz podkapitola Dusík). I zde ovšem panuje značná variabilita mezi jednotlivými kmeny a jejich chování se může lišit i v závislosti na typu používaného média či koncentraci daného zdroje (Ito and Reshi 2014). *Rhizopogon roseolus* například prosperoval na tekutém médiu obsahujícím manózu, celobiózu či trehalózu (Palmer and HacsKaylo 1970; Harley et al. 1975), *L. laccata* na tekutém médiu obsahujícím trehalózu, *Scleroderma citrinum* a *Cortinarius fulvoconicus* na médiích s glukózou, sacharózou nebo trehalózou (Ito and Reshi 2014). V poslední citované studii rostly všechny druhy při relativně vysokých koncentracích glukózy (20 až 40 g/l) dobře.

Schopnost využívat škrob, glykogen, inulin a pektiny se pak liší mezidruhově i vnitrodruhově (Smith and Read 2008). Rápidní růst na médiu obsahujícím škrob jakožto hlavní zdroj uhlíku vykazovaly některé kmeny druhů *Cortinarius purpurascens*, *Hebeloma radicosum*, *Lyophyllum fumosum*, *Sarcodon aspratus* a *Tricholoma matsutake* (Ohta 1997). Některé EM houby vykazují schopnost efektivně využívat též mastné kyseliny (oleát, palmitát) a tuky (triolein) (Hattori et al. 2003).

Vzhledem k tomu, že jednou ze základních vlastností ektomykorrhizy je dotování houbového symbionta uhlíkem fixovaným rostlinou při fotosyntéze, je omezená schopnost EM hub získávat uhlík z komplexnějších látek pochopitelná. Tuto základní vlastnost ektomykorrhizy prokázala studie Melina a Nilssona (1957; Harley et al. 1975; Smith and Read 2008), kteří pozorovali translokaci uhlíku ^{14}C , dodávaného rostlině (*Pinus sylvestris*) ve formě $^{14}\text{CO}_2$, do kořenů a hyfového pláště (formovaného druhu *R. roseolus* a *S. variegatus*).

Uhlík je tedy dopravován do kořenů a dále, především v podobě rozpustných uhlovodíků, poskytován houbě (Harley et al. 1975). Extraradikální mycelium je významný sink rostlinou fixovaného uhlíku. Nicméně jeho značná část je zase uvolňována při respiraci a sekreci (organických kyselin aj.) (Cairney 2012). U druhu *Laccaria amethystina* byl pozorován transport rostlinou čerstvě fixovaného uhlíku převážně do sporokarpů (Teramoto et al. 2012). HacsKaylo (1965) sledoval kompletní inhibici růstu mycelia a sporokarpů druhu *T. terrestris* poté, co byla jejímu rostlinnému partnerovi (*Pinus virginiana*) znemožněna fotosyntéza. V přírodě nám zde tedy vstupují do hry další faktory ovlivňující výživu hub zejména

skrze rostlinného symbionta, jako jsou fotoperioda, fotosyntetická aktivita nebo dostupnost živin v substrátu (především dusíku a fosforu) (Smith and Read 2008).

Fosfor

Fosfor plní velké množství zásadních funkcí v energetickém metabolismu buňky i jako strukturní komponenta nukleových kyselin či biomembrán (Raghothama 1999). Běžným zdrojem fosforu pro houby jsou fosfáty (Walker and White 2005). Schopnost uvolňování fosforu z okolního substrátu se mezidruhově liší. Některé houby jsou schopné mobilizovat fosfor z nerozpustných anorganických (např. fosforečnanu vápenatého) (Ceci et al. 2018) i ze složitějších organických forem (např. fytátu) (Howson and Davis 1983), fosfolipidů či nukleových kyselin (Jennings 1995).

Ektomykorrhizní houby mají ve své enzymatické výbavě kyselé fosfatázy, zejména fosfomonoesterázy, a přijímají fosfáty jak anorganického tak organického původu (Smith and Read 2008). Bylo zjištěno, že některé ektomykorrhizní druhy mají potenciál získávat fosfor z apatitu (Wallander 2000; Berner et al. 2012) a železné rudy (Adeleke et al. 2010). Jako zdroj fosforu v médiích může sloužit například dihydrogenfosforečnan draselný nebo hydrogenfosforečnan diamonný (Moore, Robson, Trinci 2021).

Dusík

Dusík je velmi důležitým prvkem pro růst hub. Je součástí buněčných membrán, nukleových kyselin, proteinů a sekundárních metabolitů (Walker and White 2005; Tudzynski 2014). Jako zdroje dusíku mohou houbám sloužit aminokyseliny či peptony, tedy produkty dekompozice proteinů (na které se houby mohou podílet produkcí extracelulárních proteáz), dále také amonné soli, nitráty (Moore, Alexopoulos and Ahmadjian 2023), obvykle též amidy a aminy. Nitrát a nitrit mohou využívat houby, které mají ve své enzymatické výbavě nitrát reduktázu následovanou nitrit reduktázou. Obdobně houby schopné produkce ureázy mohou využít močovinu.

Některé EM houby jsou v *in vitro* podmínkách schopné využít proteiny (např. *H. crustuliniforme*), nitrátu (např. *Paxillus involutus*), aminokyselin či amidů (Lundeberg 1970; Abuzinadah and Read 1989; Finlay et al. 1992). Pro mnoho EM druhů je ovšem preferovaným zdrojem dusíku amonné kation NH_4^+ (Finlay et al. 1992; Ito and Reshi 2014; Nicolás et al. 2018). V médiích jsou často jako praktické společné zdroje amonného kationtu

s dalšími makroelementy využívány soli síran amonný a fosforečnan amonný (Walker and White 2017).

U několika druhů EM hub na MMN médiu (*Suillus luteus*, *S. citrinum*, *L. laccata*, *Tricholoma aurantium*, *C. fulvoconicus*, *Cortinarius flexipes*) bylo pozorováno při konstantní koncentraci glukózy (10 g/l) zvyšování růstu mycelia se zvyšující se koncentrací fosforečnanu amonného (od 2 g/l výše). Jednotlivé druhy se lišily koncentrací fosforečnanu, při které dosáhly maximálního růstu, než tento začal klesat. Ke zmíněnému poklesu docházelo u všech druhů při koncentracích fosforečnanu 10 g/l a vyšších.

Mimo individuální nároky hub na dusík a jeho vlastní dostupnost je dalším faktorem ovlivňujícím růst EM hub *in vitro* poměr C/N. Po utilizaci dusíku dochází k formování kyselin, které mohou způsobovat náhlé změny pH. Je tedy potřeba vhodně vybalancovat množství utilizovatelného uhlíku a dusíku. Zvýšeného poměru C/N je v často používaném modifikovaném MN médiu (MMN) docíleno náhradou 2,5 g/l sacharózy za 10 g/l glukózy. Pro své pufrací vlastnosti mohou být do média přidány též kyselina citronová, citrát vápenatý, nebo jak je tomu u Pridham-Gottliebova média, dihydrogenfosforečnan draselný a hydrogenfosforečnan draselný (Rossi et al. 2007). Zejména pro třepané kultury může být výhodné použití tartarátu amonného, coby pufrujícího zdroje dusíku (Harvey 1991).

Síra

Houby efektivně získávají síru ze sulfátu, sulfitu, thiosulfátu, glutathionu či methioninu. Je komponentou některých vitamínů, aminokyselin a enzymů. V médiích je často obsažena, společně s dalšími prvky, v podobě síranů (CuSO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 , atp.) (Walker and White 2005; Moore, Robson, Trinci 2021).

Hořčík

Hořčík, získávaný houbami z hořečnatých solí (např. heptahydrátu síranu hořečnatého), plní v houbových buňkách řadu funkcí zejména jako kofaktor (Walker and White 2005; Moore, Robson, Trinci 2021).

Draslík

Draslík je důležitým prvkem osmoregulace. Je také potřebný pro fungování řady enzymů. Jeho hlavním zdrojem jsou draselné soli (v médiích např. dihydrogenfosforečnan draselný) (Moore, Robson, Trinci 2021).

Obdobně jako u fosfátu i v případě hořčíku byly provedeny studie pokoušející se o prokázání výrazné účasti EM hub na uvolňování draslíku přímo z některých minerálů. V laboratorních podmínkách byla vyšší solubilizace některých minerálů ektomykorrhizou či přímo EM houbami skutečně opakovaně zaznamenána (Wallander H. 2006). Obecně však acidifikace prostředí (např. produkcí organických kyselin), jež za tímto jevem stojí, může být výsledkem působení nejen EM hub, ale i přímo rostlin, bakterií nebo dalších půdních mikroorganismů (Leyval and Berthelin 1989; H. Wallander and Wickman 1999; Koele et al. 2014). Kdo je hlavním kontributorem do tohoto procesu, jak jej ovlivňují interakce mezi zmíněnými organismy a další faktory, to vše jsou otázky čekající na zodpovězení.

Mikroelementy

Zinek, železo, mangan, nikl, vápník, měď, molybden a kobalt jsou prvky, jež stačí houbám ve velice nízkých koncentracích (μg až mg na litr). Jedná se často o kofaktory enzymů či stavební složky pigmentů a vitamínů. Jejich zdroji jsou nejčastěji soli (Moore, Robson, Trinci 2021).

Vitamíny

Některé houby umí samy syntetizovat všechny vitamíny potřebné pro růst a reprodukci v dostatečné míře, jiné nikoliv. Takto jsou houby často odkázány na okolní zdroje thiaminu (B_1) a biotinu (B_7) (Moore, Alexopoulos and Ahmadjian 2023).

Strzelczyk, Dahm a Pachlewski (1991) ukázali, že *in vitro* produkce jednotlivých B-vitamínů EM houbami je ovlivněna hodnotou pH a liší se mezidruhově i vnitrodruhově. *C. graniforme* bylo například schopné syntézy thiaminu v rozmezí hodnot pH 5,0–7,0. Ve stejném rozmezí však nedocházelo k produkci žádného z dalších studovaných vitamínů (B_7 – biotin, B_3 – kyselina nikotinová a B_5 – kyselina pantothenová). *S. bovinus* byl schopen syntézy všech vitamínů, avšak při odlišných hodnotách pH různě efektivně. Thiamin byl produkován především v kyselém pH (5,0–6,0) a sice v dosti nepatrném množství, obdobně jako biotin (zlomky až jednotky mikrogramů). *H. crustuliniforme-5397* a *Hebeloma mesophaeum* biotin vůbec neprodukovaly. Další izolát *H. crustuliniforme-5392* se produkcí vitamínů lišil od výše zmíněného izolátu. Opět se zde setkáváme s vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitou.

Těžké kovy

V nižších koncentracích jsou pro houby toxickými prvky Cd, Pb, Hg, Ag nebo Cr. Některé esenciální mikronutrienty (např. Zn, Cu nebo Mn) se stávají toxickými až ve vyšších koncentracích (Baldrian 2010; Gube 2016). Saprotrofní houby jsou na přítomnost těchto prvků zvláště citlivé, neboť jim k akvizici živin slouží ve velké míře produkce extracelulárních enzymů, jejichž funkce je těžkými kovy často negativně ovlivněna.

Přítomnost těžkých kovů může, mimo vlastní výživu hub a s ní spojený růst, ovlivnit též morfologii hub (Baldrian 2003; Mahanty et al. 2021). Houby si ovšem vyvinuly řadu mechanismů rezistence na těžké kovy (imobilizace v buněčné stěně aj.), které jim umožňují osidlovat kontaminované habitaty a jejichž efekt může být přenesen na případné rostlinné symbionty (Hassan et al. 2017). Tato schopnost, o jejímž využití v biotechnologiích, bioremediacích či zemědělství pojednává nejedna studie, posouvá význam hub zase o kus dále.

Míra tolerance k těžkým kovům se zdá být závislá na konkrétním houbovém kmenu (Joo and Hussein 2012). Mycelium EM druhu *Lepista sordida* na PDA (bramboro-dextrózovém agaru) bylo výrazně redukováno přidávkou kadmia a mědi. I EM houby mají ovšem mechanismy k přečkání stresu vyvolaného těžkými kovy. Z toho plynou benefity též pro s nimi asociované rostliny (Dachuan and Jinyu 2021).

Těžké kovy ovšem nemusí pro houby znamenat vždy jen přítěž. *A. muscaria* (a některé další druhy téhož rodu) je zkoumána pro svou schopnost akumulovat vanad ve formě amavadinu (komplexní sloučeniny s centrálním vanadičítým kationem). Amavadin, s prokázanou peroxidázovou a katalázovou aktivitou, by mohl tvořit jeden z obranných prostředků hub proti poškození buněk či mikrobiálním patogenům (Matoso et al. 1998; da Silva et al. 2013)

Teplota

Rozmezí teplot, ve kterém jsou houby schopné růst, je různě široké pro jednotlivé druhy a jako ve všech organismálních říších i zde nalezneme extremofily. Obecně roste většina hub dobře při teplotě okolo 25 °C (Walker and White 2005). EM druhy hub jsou schopny formovat ektomykorrhizu obvykle při nižších teplotách, než při kterých vykazují maximální růst *in vitro* (Slankis 1974). Co se optimální teploty pro růst týče, EM houby vykazují značnou mezidruhovou i vnitrodruhovou variabilitu. Toto demonstruje Tabulka 1.

Tabulka 1. Rozmezí optimálních teplot pro růst různého počtu izolátů studovaného druhu na daném médiu

Druh	Počet izolátů	Médium	Rozmezí optimálních teplot (°C)	Studie
<i>Pisolithus tinctorius</i>	11	MMN ¹	21–32	(Cline, France and Reid 1987)
<i>Suillus granulatus</i>	8	MMN	16–32	
	3	MNM ²	20–25	(Theodorou and Bowen 1971)
<i>Suillus punctipes</i>	1	Hagem ³	13–24	(Hacskeylo, Palmer and Vozzo 1965)
	1	tartarát ⁴	18–29	
<i>Suillus luteus</i>	1	Hagem	18–29	
	1	tartarát	13–32	
	4	PDA ⁵	20–25	
<i>Suillus grevillei</i>	5	PDA	15–25	(Jeon, Sung-Min et al. 2012)
<i>Thelephora terrestris</i>	3	MMN	16–32	(Cline, France and Reid 1987)
<i>Cenococcum geophilum</i>	20	MMN	16–27	
<i>Cenococcum graniforme</i>	1	MNM	20–25	(Theodorou and Bowen 1971)
	1	Hagem	18–24	(Hacskeylo, Palmer and Vozzo 1965)
	1	tartarát	18–24	
<i>Rhizopogon roseolus</i>	1	Hagem	18–24	(Hacskeylo, Palmer and Vozzo 1965)
	1	tartarát	13–18	
<i>Rhizopogon luteolus</i>	3	MNM	23–25	(Theodorou and Bowen 1971)
<i>Laccaria laccata</i>	1	MNM	20–25	

Druh	Počet izolátů	Médium	Rozmezí optimálních teplot (°C)	Studie
<i>Amanita rubescens</i>	1	Hagem	24–29	(HacsKaylo, Palmer and Vozzo 1965)
	1	tartarát	29–32	
<i>Russula emetica</i>	1	Hagem	24–29	
	1	tartarát	24–29	
<i>Ramaria botrytis</i>	2	PDA	20–25	(Jeon, Sung-Min et al. 2012)
<i>Heimioporus japonicus</i>	2	PDA	25	
<i>Tricholoma matsutake</i>	7	PDA	20–25	
<i>Leccinum extremiorientale</i>	2	PDA	25	
<i>Hygrophorus russula</i>	3	PDA	20–25	
<i>Lactarius laeticolor</i>	2	PDA	20–25	

¹⁾ modifikované Melin-Norkrans médium

²⁾ Melin-Norkrans médium

³⁾ Hagemovo médium (glukózo-salmiakové, bez přídavku agaru)

⁴⁾ glukózo-tartarátové médium (tartarát neboli vinan amonný)

⁵⁾ bramboro-dextrózový agar

pH

Houby jsou povětšinou acidofilní organismy, pro něž je optimální hodnota pH někde v rozmezí 4–6 (Walker and White 2005). Hodnota pH a její kolísání jsou jedněmi z faktorů ve studiích často opomíjených, jež přitom mohou výrazně ovlivňovat houbový metabolismus.

Optimální pH pro růst EM hub nejčastěji spadá do rozmezí hodnot 3,5–5,9 (Modess 1941), proto by se iniciální hodnota pH média měla pohybovat okolo 5 (Harvey 1991). Pozorování Sáncheze, Honrubia a Torrese (2001) přinesla poznatek, že řada EM druhů hub vykazuje podobné chování v reakci na rozdílné pH *in vitro*, byť i zde panuje mezidruhová variabilita. Většina studovaných hub rostla nejméně při počátečním pH 2,5 a v průběhu experimentu tuto

hodnotu zvyšovala. Druhy rodu *Suillus* (*S. collinitus*, *granulatus*, *luteus*) a *R. roseolus* byly schopné růst i při takto nízkém pH relativně dobře. Například druhy *Hebeloma edurum* a *Lactarius deliciosus* ovšem tvořily při takovém pH (2,5–5,5) nejmenší kolonie, největší pak v rozmezí pH 6,5–8,5. Růstové odezvy při stejné hodnotě pH se lišily i v rámci druhu, a sice v závislosti na použité acidifikační látce (H_2SO_4 , HNO_3 či jejich kombinace).

Další autoři, kteří se tomuto tématu věnovali, však nepřicházeli vždy s podobnými výsledky. Interpretaci poznatků znovu znesnadňuje vnitrodruhová variabilita. I zde navíc nelze spoléhat na znalost vlastností původního substrátu. Druhy z alkaličtějších půd nemusí růst lépe na médiích s vyšším pH (Hung and Trappe 1983).

Salinita

Jednotlivé druhy hub se v míře tolerance k zasolení značně liší. Vysoká koncentrace NaCl jde často ruku v ruce s vysokou koncentrací dalších iontů, extrémním pH, nízkou nebo kolísavou a_w , nízkou koncentrací kyslíku, vysokou teplotou a vysokým přísunem UV záření. Přesto existují halofilní druhy hub hned v několika řádech (Eurotiales, Dothideales, Capnodiales a Wallemiales). Tyto byly izolovány z prostředí s minimálně 1,7M salinitou a jsou dále definovány schopností růstu při 3M koncentraci soli (a_w 0,85) *in vitro* (Gundecimerman et al. 2009; Gostinčar et al. 2011).

EM druhy vykazují značnou růstovou variabilitu při různých koncentracích sodných solí, a to jak mezidruhovou, tak vnitrodruhovou. Rody *Pisolithus*, *Laccaria* a *Suillus* se jeví tolerantnější k sodným solím, nežli rody *Thelephora* a *Cenococcum* (*in vitro*). Některé izoláty druhů *P. tinctorius*, *S. luteus* a *L. laccata*, byly přítomností malého množství NaCl (10–40 mM) stimulovány (Dixon et al. 1993). Tato studie ovšem pracovala s relativně nízkými koncentracemi solí (0–120 mM).

Matsuda et al. (2006) sledovali produkci biomasy čtyřmi druhy EM hub na MMN médiích s 0 až 200mM koncentracemi NaCl. Tato se signifikantně nelišila u druhů *P. tinctorius* a *R. rubescens*. Druhy *C. geophilum* a *S. luteus* vykazovaly úbytek hmotnosti mycelia se zvyšující se koncentrací soli. Obdobný klesající trend vykazoval *S. luteus* i v případě růstové rychlosti při 0,1 až 0,8M koncentraci NaCl. *Boletus luridus* v této studii vykazoval největší toleranci ke stresu vyvolanému NaCl, ale i jeho růstová rychlost se snižovala (Tang et al. 2009).

Dalšími druhy, které jsou schopné růst na škále koncentrací NaCl 0 až 200 mM, jsou *Suillus tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *L. bicolor* a *H. crustuliniforme*. Izoláty prvních tří zmíněných pocházely ze substrátu bohatšího na sůl, akumulovaly signifikantně méně sodných i chloridových iontů a produkovaly více biomasy při kultivaci na MMN. Mechanismy, jimiž se druhy vyrovnávaly s osmotickým stresem, se lišil v případě Ascomycet, které využívaly zejména prolin jako podpůrné osmotikum (*Hymenoscyphus*) či melanin s obecně protektivními účinky (*Phialocephala*), a v případě Basidiomycet, u nichž byla naměřena především zvýšená produkce manitolu a/nebo prolinu (Bois et al. 2006). Podpora rostlinné tolerance k solím je další zásluhou, kterou lze EM houbám připsat (Gehring 2017).

Světlo

Houby jsou schopné vnímat červené, dlouhovlnné červené, zelené, modré a blízké ultrafialové záření pomocí až 11 fotoreceptorů (Yu and Fischer 2019). Světlo indukuje v houbách důležité fyziologické a morfologické odpovědi, může houbám poskytovat informaci o denní době a umožňovat tak fungování cirkadiánních oscilátorů, být signálem otevřeného prostoru (jak je dobře prostudováno například u druhu *Pilobolus cristallinus*) či stresu (oxidativního, tepelného atp.). Mezi možné odpovědi hub na světlo patří růstové a vývojové změny. Jeden ze zajímavých směrů výzkumu v této oblasti se zabývá též zapojením světla v patogenezi hub (Fuller et al. 2015). Komunity EM hub, respektive jejich diverzita a míra kolonizace, jsou do značné míry ovlivněny dostupností světla pro rostlinné symbionty (Turner et al. 2009). U druhů *Alnicola lactariolens* a *Hebeloma vinosophyllum* byla pozorována akcelerace tvorby plodnic v reakci na světlo, které bylo též potřeba pro jejich úplnou maturaci (Ho et al. 2012).

EM houby k běžné kultivaci mycelií na médiu světlo nepotřebují. V celé řadě experimentů uvedených v této práci byly čisté kultury uchovávány ve tmě. Na vystavení ionizačnímu záření (ve tmě při 21 °C) reagovaly některé kmeny EM hub sníženým radiálním růstem a nižší produkcí biomasy. U některých izolátů byla v reakci na zvyšující se intenzitu záření pozorována zvýšená produkce melaninu či enzymů zapojených do odstraňování reaktivních forem kyslíku (superoxid dismutáza a kataláza) (Kothamasi et al. 2019).

Polutanty

S ohledem na moderní dobu by výčet abiotických faktorů nemohl být kompletní beze zmínky o polutantech prostředí, jejichž negativních dopadů nebyly ušetřeny ani EM houby. Prokázány byly například vlivy ozonu, oxidu siřičitého, hliníku (a dalších těžkých kovů viz kapitola výše) či mikroplastů na fyziologii některých EM druhů (Garrett et al. 1982; Dighton and Jansen 1991; Dachuan and Jinyu 2021).

Biotické faktory

Většina časných studií zabývajících se ektomykorrhizou, které probíhaly jak v terénu, tak v laboratoři, pracovala s počáteční sterilizací a tím opomíjela jeden důležitý aspekt – interakce mezi EM houbami a dalšími mikroorganismy běžně se vyskytujícími v půdě. Od šedesátých let minulého století je však průzkumu těchto interakcí věnována stále větší pozornost. Pomalu je odkrývána skutečná komplexita ektomykorrhizy a nedostatečnost jejího chápání jakožto bipartitního systému.

Efekty mikroorganismů na růst ektomykorrhizních hub

Inhibiční efekty

Ida Levisohn (1957) pozorovala inhibiční efekty vrčkovýtrusné houby *Alternaria tenuis* na růst mycelia EM hub rodu *Boletus* a *Rhizopogon*. Theodorou (1967) si všiml, že introdukce druhu *R. luteolus* probíhala snadněji do methyl-bromidem sterilizované půdy. Rozsáhlá navazující studie se pak zabývala interakcemi mezi osmi druhy bakterií a osmi druhy EM hub na pěti různých médiích i přímo v rhizosféře (Bowen and Theodorou 1979). Bakterie použité v tomto experimentu byly izolovány ze substrátu školky *Pinus radiata* a z rhizosféry stejného druhu pěstovaného v květináči na analogickém substrátu. Jednalo se o čtyři pseudomonády (FP4, NF1, S8Y, S80) a čtyři kmeny rodu *Bacillus* (3H19, PP, WR1, WR4). Dále byly testovány reakce hub na *Streptomyces* sp. (antagonistu houbového patogenu rostlin, druhu *Phytophthora cinnamomi*). Experiment v laboratoři sledoval interakce na PDA, WA (vodním agaru), MNM, MMN (s redukovanou glukózou z 2% na 0,2%) a na M32 (obecném bakteriálním médiu).

Povahy interakcí mezi stejnými druhy bakterií a hub se lišily v závislosti na použitém médiu. Redukce růstu houbového mycelia inokulovaného bakteriemi byla obecně nejčastěji zaznamenána na MMN, oproti tomu na MNM k ní vůbec nedocházelo, přestože jediným rozdílem mezi těmito médii byl obsah glukózy (viz Tab. 2.).

Tabulka 2. Procentuální redukce houbového růstu bakteriemi na laboratorních médiích

Druh	Médium	Procentuální redukce růstu v přítomnosti uvedených bakteriálních kmenů								Poloměr kolonie kontroly (mm)
		S8Y	FP ₄	PP	S80	NF1	3H19	WR1	WR ₄	
<i>Rhizopogon luteolus</i>	PDA	31 d**	26 c,d**	14 a**	19 a,b**	25 c**	22 b,c**	24 b,c**	21 b,c**	34,5
	WA	26 a**	24 a**	20 a**	22 a**	25 a**	26 a**	27 a**	25 a**	28,2
	MMN	56 c,d**	57 c,d**	57 c,d**	29 a**	68 d**	49 b,c**	46 b,c**	37 a,b**	14,0
	MNM	-2 a	4 a	0 a	4 a	-5 a	-5 a	4 a	7 a	16,2
	M32	36 a**	42 a**	41 a**	-	46 a**	36 a**	42 a**	42 a**	15,2
<i>Rhizopogon vinicolor</i>	PDA	32 a,d**	15 b,c*	20 c,d**	10 b	27 c,d**	0 a,b	-3 a	-1 a,b	15,0
	WA	32 a**	23 c**	23 c**	15 b**	32 d**	4 a,d	11 b**	16 b**	15,8
	MMN	50 b,c**	60 c**	53 b,c**	53 b,c**	56 b,c**	27 a**	54 b,c	46 b**	18,0
	MNM	-3 a	-2 a	-1 a	-4 a	0,5 a	0,5 a	-4 a	-3 a	20,3
<i>Suillus granulatus</i>	PDA	24 c**	6 b,c**	11 c,d**	14 d,c**	11 c,a**	-5 a	-1 a,b	-1 a,b	16,8
	WA	41 c**	36 c**	12 b	-11 a,b	-16 a	-8 a,b	30 c**	25 c*	12,2
	MMN	18 a,b	53 c**	12 a,b	6 a	18 a,b	32 b,c*	41 c**	39 b,c**	8,5
	MNM	-5 b	25 a	-20 a,b	-20 b	-22 a,b	-12 a,b	0 b	-4 a	20,0
	M32	48 a	30 a*	41 a	54 a**	49 a**	36 a*	32 a*	51 a**	17,3
<i>Suillus luteus</i>	PDA	37 d**	15 b**	30 c,d**	24 b,c**	37 d**	12 a,b*	3 a	15 b**	14,2
	MA	32 b**	25 a,b**	16 a*	20 a,b**	21 a,b**	16 a*	17 a**	20 a,b**	19,0
	MMN	26 a,b**	37 a,b**	32 a,b**	30 a,b**	41 b**	26 a,b**	23 a,b**	26 a,b**	8,8
	MNM	0 a,b	-4 a	12 b	7 a,b	1 a,b	4 a,b	13 b	7 a,b	18,2
	M32	16 a,b	6 a	3 a	15 a,b	9 a	3 a	29 b**	10 a,b	14,3
<i>Cenococcum graniforme</i>	PDA	27 a**	19 a**	20 a**	-	27 a**	25 a**	25 a**	23 a**	15,0
	WA	58 b,c**	56 c,d**	30 b,c**	55 b,c**	58 d**	55 c,d**	47 b**	15 a**	21,0
	MMN	29 b**	63 c**	65 c**	-	63 c**	58 c**	24 a,b**	13 a,b	11,5
	MNM	6 b	-5 a	-1 a,b	-1 a,b	-1 a,b	-3 a,b	2 a,b	5 b	10,7

Mezi bakteriálními kmeny stejná písmena za čísly = data se významně neliší při $P = 0,05$. (Bowen and Theodorou 1979)

* Kolonizace v přítomnosti bakterií se významně liší od kontroly při $P = 0,05$.

** Kolonizace v přítomnosti bakterií se významně liší od kontroly při $P = 0,01$.

Experiment probíhající v rhizosféře semenáčků (*Pinus radiata*) přinesl jen málo podobné výsledky. S výjimkou dvou izolátů rodu *Bacillus* (3H19, WR1) a jedné interakce pseudomonádového kmene S80 s *C. bicolor*, způsobila inokulace všemi bakteriálními kmeny signifikantní snížení růstu EM hub, a to o 31 až 100%. WR1 zvýšil kolonizaci kořenů u většiny testovaných hub. Citlivost jednotlivých druhů hub na přítomnost bakterií se lišila (viz Tab. 3.).

Tabulka 3. Kolonizace kořenů *Pinus radiata* ektomykorrhizními druhy hub v přítomnosti bakterií po 4 týdnech

Délka kolonizovaného kořene (mm)											
Druh	Experiment A				Experiment B				Experiment C		
	B0 ¹	B ⁺ % z B0			B0	B ⁺ % z B0			B0	B ⁺ % z B0	
		S8Y	FP4	PP		S80	NF1	3H19		WR1	WR4
<i>Rhizopogon luteolus</i>	30,4 A	11 a**	19 a**	12,5 a,b**	27,6 a	17 c**	30 a,b**	86 a	30,7 a	111 a	13 b**
<i>Rhizopogon vinicolor</i>	15,3 C	17 a**	10 b**	0 b**	20,2 b,c	36 b,c**	12 c**	66 b,c*	25,8 a,b	127 a,b**	10 b**
<i>Suillus granulatus</i>	20,0 B	8 a**	15 a,b**	10 a,b**	20,7 b,c	19 c**	16 b,c**	67 b,c*	20,2 b,c	158 a,b,c**	69 a*
<i>Suillus luteus</i>	19,5 B	15 a**	9 a,b**	26 a**	16,2 c	44 b,c**	20 b,c**	54 c**	19,1 c	137 c*	13 b**
<i>Cenococcum graniforme</i>	18,3 B	13 a**	12 a,b**	13 a,b**	16,2 c	51 b,c**	20 b,c**	46 c**	14,4 d	125 d	16 b**
<i>Thelephora terrestris</i>	20,7 B	16 a**	14 a,b**	17 a,b**	22,4 a,b	47 a,b**	58 a*	81 b	12,1 d	92 c	17 b**
<i>Corticium bicolor</i>	22,1 B	11 a**	11 a,b**	13 a,b**	17,2 b,c	82 a	19 b,c**	89 b	15,8 d	172 b,c**	17 b**

¹ Stejná písmena za čísly = data se signifikantně neliší při $P = 0,05$.

(Bowen and Theodorou 1979)

* Kolonizace v přítomnosti bakterií (B⁺) se signifikantně liší od kontroly (B0) při $P = 0.05$.

** Kolonizace v přítomnosti bakterií (B⁺) se signifikantně liší od kontroly (B0) při $P = 0.01$.

Pro získání věrnějšího obrazu o interakcích *in situ* byly provedeny navazující testy. V dalším experimentu byla rhizosféra *P. radiata* kolonizována druhem *R. luteolus* a posléze inokulována směsí kmenu bakterií s inhibičním vlivem (FP4) vždy s jedním kmenem nevykazujícím inhibiční vliv (3H19, WR1). Výsledky ukazuje Tabulka 4. Vliv neinhibujících bakterií na růst inhibujících bakterií byl relativně malý (naopak je zde tendence inhibujícího kmene redukovat růst neinhibujícího). Přesto se v jejich přítomnosti efekt inhibujících bakterií značně smazává.

Tabulka 4. Kolonizace kořenů *Pinus radiata* druhem *Rhizopogon luteolus* v přítomnosti bakteriálních směsí po 4 týdnech

Inokulum	Délka kolonizovaného kořene (mm)	Počty bakterií cm ⁻¹	
		Počáteční	Konečné
<i>Rhizopogon luteolus</i> (RL)	30,7		
RL + FP4	15,4	3,0 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁷
RL + FP4 + 3H19	25,4	FP4: 9,4 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁷
		3H19: 6,8 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁷
RL + 3H19	26,1	1,76 x 10 ⁶	7,0 x 10 ⁷
RL + WR1	33,8	1,21 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁷
RL + WR1 + FP4	28,3		
	LSD 8,0 (<i>P</i> = 0,05)	FP4: 4,3 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁷
	10,8 (<i>P</i> = 0,01)	WR1: 7,8 x 10 ⁵	3,7 x 10 ⁶

(Bowen and Theodorou 1979)

Vliv inhibičního kmenu FP4 na kolonizaci kořenů *P. radiata* druhem *R. luteolus* byl dále studován v závislosti na množství glukózy přidaného do substrátu. Přídavek glukózy zvýšil kolonizaci kořenů za absence bakteriálního kmenu a naopak signifikantně podpořil inhibici kolonizace v jeho přítomnosti, byť na vlastní velikost bakteriální populace vliv neměl. Možným vysvětlením tohoto zvýšení inhibice bez nárůstu populace by mohla být alelopatie.

K signifikantní redukci růstu po inokulaci *Streptomyces* došlo u druhů *R. luteolus* na M32 médiu a *S. granulatus* na WA. Další vlivy tohoto rodu bakterií jsou rozebrány v samostatné kapitole níže.

Z výsledků této studie lze vyvodit hned několik závěrů. Přestože vlivem bakterií opakovaně docházelo k redukci růstu EM hub na médiích, byla tato redukce značně závislá právě na použitém médiu, přičemž se nezdá, že by míra redukce byla prostou funkcí „úživnosti“ média (redukce růstu na bohatším MMN médiu byla podobného rázu jako na WA). Pokusy prováděné na médiu mohou poskytnout jen omezenou představu o skutečné povaze interakcí v rhizosféře. Vlivy bakterií na kolonizaci kořenů EM houbami mohou být jak inhibiční, tak neutrální, či dokonce stimulační. Inhibice růstu může být výsledkem kompetice o zdroje či amenzalismu.

Burkholderia cepacia je dalším bakteriálním druhem vykazujícím negativní vliv na ektomykorrhizní kolonizaci kořenů druhů *Pinus concorta* a *Picea glauca* houbou *P. involutus*, ovšem pouze v prvních měsících života semenáčků (Pedersen et al. 1999). Stejná studie navíc ukázala schopnost druhu *P. involutus* inhibovat růst některých houbových patogenů rostlin. Pozitivní efekty tohoto druhu na přežívání semenáčků a k nim se pojící

potenciál EM hub coby alternativních prostředků biologické kontroly rostlinných chorob byly objeveny již dříve (Marx 1972). Ve studii, původně se zabývající rolí mikroorganismů při zvětrávání minerálů (Leyval and Berthelin 1989), byl odhalen jiný druh bakterie (*Agrobacterium radiobacter*) mající naopak inhibiční vliv na druh *L. laccata*.

Formování ektomykorrhizy mohou ovlivnit i půdní mikroskopické houby. Studie Summerbella (1987) odhalila čtyři druhy rodu *Trichoderma* (*T. viride*, *polysporum*, *inflatum*, *beigelii*), které vykazovaly inhibiční vliv na formování ektomykorrhizy na kořenech druhu *Picea mariana* druhem *L. bicolor*. Tento jev byl vysvětlován pravděpodobným alelopatickým či mykoparazitickým působením mikroskopických hub.

Myccorhiza helper bacteria

Již výše bylo pojednáváno o bakteriích stimulujících růst EM hub. Tyto se v pozdější literatuře objevují pod zkratkou MHB (mycorrhiza/mycorrhization helper bacteria) a je třeba jim věnovat adekvátní pozornost. Aplikace MHB společně s EM houbami může vést k úspěšnější ektomykorrhizní inokulaci (Garbaye 1994).

Za MHB z tropických oblastí jsou považovány kmeny fluorescenčních pseudomonád HR13 a HR26. Tyto významně stimulovaly růst EM druhu *Pisolithus alba* a produkci ergosterolu (Founoune et al. 2002).

Studie Duponnoa a Garbayea (1991), věnující se ektomykorrhize stromu *Pseudotsuga menziesii* formovanou druhem *L. laccata*, odhalila čtrnáct izolátů grampozitivních i gramnegativních MHB (z okolního substrátu a sporokarpů), které měly stimulační účinek na rozvoj ektomykorrhizy ve skleníku se simulovanou letní teplotou 15–28 °C), přičemž šest z nich mělo obdobný vliv též při zimních teplotách (10–20 °C). Pět izolátů stimulovalo ektomykorrhizní infekci pouze v zimní simulaci. Mimo to vzešel z experimentů ještě jeden významný poznatek. Tam, kde byla zformována ektomykorrhiza s druhem *L. laccata*, nedocházelo k infekci dalším, méně efektivním, ektomykorrhizním druhem *T. terrestris*, jež je běžným skleníkovým kontaminantem. Šest bakteriálních izolátů navíc vykazovalo významný inhibiční vliv na tento druh. Z toho vyplývá závěr, patrný již i ve výše uvedených studiích, že mechanismy zahrnuté v interakcích mezi bakteriemi a ektomykorrhizou jsou částečně druhově specifické, jak ostatně potvrdila i další studie, ve které se bakteriální kmeny BBc6 (*Pseudomonas fluorescens*), SBc5 (*Pseudomonas* sp.), MB3 (*Bacillus subtilis*) a SHB1 (*Bacillus* sp.) chovaly jako MHB pouze v asociaci s druhem *L.*

bicolor a *L. laccata*. Na druhy *Hebeloma cylindrosporum*, *P. involutus*, *S. bovinus* a *P. tinctorius* měly naopak negativní vliv (Duponnois and Garbaye 1992).

V *in vitro* podmínkách vykazuje bakteriální kmen MB3 inhibiční efekt na růst některých rostlinných patogenů (*Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon* sp.) sám o sobě. V duální kultuře s druhy *Laccaria proxima* a *S. granulatus* je však tento inhibiční efekt na *F. oxysporum* dále posílen. Obdobně je zvýšena inhibice blíže neurčeného druhu rodu *Cylindrocarpon* po inokulaci MB3 společně s druhem *S. granulatus* (Schelkle and Peterson 1997). Užití MHB v lesnictví a agrikultuře by tedy mohlo, mimo vlastní zefektivnění růstu EM hub, též snížit nároky na sterilizaci půdy před inokulací tím, že zredukuje výskyt nechtěných infekcí méně efektivními EM houbami (Duponnois and Garbaye 1991) či rostlinnými patogeny.

Streptomyces

Asi nejlépe prozkoumané mechanismy působení MHB na EM houby, včetně těch molekulárních, jsou u aktinomycet rodu *Streptomyces*. Tyto organismy jsou proslulé svou schopností stimulovat růst druhu *A. muscaria*, která vytváří symbiotické vztahy s celou řadou listnatých i jehličnatých stromů (Maier 2003; Maier et al. 2004).

Jedna ze studií na toto téma (Schrey et al. 2005) si kladla za cíl nalezení preferenčně exprimovaných genů druhu *A. muscaria* v asociaci s kmenem AcH 505 (*Streptomyces* sp.). Byly k tomu využity metody SSH (subtraktivní hybridizace) a čtení komplementární DNA (cDNA subtraction). Houbová mRNA byla extrahována ve fázi největší růstové odezvy. Po jejím přepisu do cDNA byla provedena SSH hybridizace s cDNA původem z čisté houbové kultury.

Výsledná změna exprese se týkala jak dosud neznámých genů, tak genů pro proteiny (ribozomální, beta-glukosidáza, p21-aktivovaná kináza, cyklofilin 40, GABA/polyamin permeáza a histon H4) zapojené v buněčném růstu, buněčném stresu a v utváření buněčné struktury. Další dotčené geny patří do skupin ovlivňujících metabolismus (acetoacyl-koenzym A syntetáza, adenylyl sulfát kináza, sulfid reduktáza, glutamin syntetáza a proteáza) a signální dráhy (protein kinázy, transkripční faktory). Zvýšená exprese genu kódujícího acetoacetyl-coA syntetázu (*AmAacs*) nejspíše podporuje myceliální růst přes zvýšenou produkci ergosterolu. Produkty nejvýrazněji up-regulovaného genu *AmCyp40* (pro cyklofilin) zase hrají roli v buněčné proliferaci, diferenciaci a stresové

odpovědi. Zvýšené exprese *AmCyp40* bylo docíleno i aplikací bakteriálního supernatantu. Down-regulovaný gen *Uga4* (pro polyamin permeázu) by zase mohl urychlovat houbový růst v reakci na změny koncentrací polyaminů v hyfách. Ve smíšených kulturách byla též pozorována vyšší exprese mono-oxidázy poukazující na možnou aktivaci specifických kroků katabolismu či sekundárního metabolismu. Zvýšená exprese centrálního regulátoru polarizovaného růstu (PAK kinázy) a katalytické podjednotky cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA) pak může ovlivňovat organizaci aktinového cytoskeletu a signální transdukcii spojenou s růstem.

Ve studii Maiera et al. (2004) byly odhaleny i další mykorrhizu stimulující kmeny streptomycet. Navíc se ukázalo, že kmen AcH 505 je taktéž schopen inhibovat některé rostlinné patogeny (*Heterobasidium annosum* a *Armillaria obscura*).

V předchozích studiích byla popsána řada možných odpovědí EM hub na přítomnost bakterií. Žádná z nich ovšem neosvětlila, které konkrétní bakteriální sloučeniny stojí za vyvoláním těchto odpovědí. V práci Riedlingera et al. (2006) byly ze supernatantu kmenu AcH505 vyizolovány tři dominantně zastoupené sekundární metabolity – auxofuran a dvě naftochinonová antibiotika WS-5995 B a C (Ikushima et al. 1980). Produkce auxofuranu byla posílena při společné kultivaci AcH 505 s druhem *A. muscaria*. K největší stimulaci růstu docházelo při 15 μ M koncentraci auxofuranu. Efekt jeho syntetického derivátu 7-dehydroxy-auxofuranu byl dokonce ještě silnější a déle působící. Obě bakteriální antibiotika vykazovala inhibiční vliv na růst druhu *A. muscaria*, nicméně WS-5995 C až při vyšších koncentracích. WS-5995 B inhibovalo také testované grampozitivní bakterie a jednu gramnegativní (*Haemophilus influenzae*). K signifikantně vyšší inhibici růstu působením WS-5995 B docházelo u EM druhu *H. cylindrosporum* (toho si povšimnuli již Schrey et al. 2005). Zatímco *A. muscaria* v duální kultuře s AcH 505 prosperovala, růst *H. cylindrosporum* byl potlačen, přestože na auxofuran reagovaly oba druhy obdobně kladně. Rezistence na antibiotické komponenty by tedy mohla vydělovat fenotypy s posíleným růstem v reakci na auxofuran. Zajímavý je též fakt, že kmen AcH 505 preferenčně produkoval auxofuran v prostředí s nižším pH, ve kterém současně docházelo k inhibici produkce antibiotik (ta probíhala v neutrálním pH). Kyselá substance produkované houbami tedy nemusí sloužit pouze k obraně a mobilizaci živin, ale také k modulaci produkce sekundárních metabolitů okolními mikrobiálními druhy.

V dalším experimentu byla sledována změna exprese tří genů druhu *A. muscaria* po inkubaci s WS-5995 B a 7-dehydroxy-auxofuranem. Exprese *Aacs* byla navýšena přibližně třikrát v případě WS-5995 B a dvakrát v případě auxofuranu. Třikrát byla navýšena též exprese *Cyp40* a *Uga4* po inkubaci s WS-5995 B. Zvýšená exprese *Aacs* bývá spojována s houbovým růstem, přesto se tato dělá i v reakci na antibiotikum. V druhém případě se tak houba pravděpodobně vyrovnává s poškozením membrán a náhlou potřebou biosyntézy ergosterolu. Stejně tak zvýšení produkce cyklofilinu 40 zřejmě plní svou roli spíše v přečkání buněčného stresu způsobeného antibiotikem. Vedle zvýšené exprese *Uga4* po přidavku WS-5995 B bylo pozorováno i zvýšení intracelulární koncentrace GABA. Tento jev je možnou reakcí na oxidativní stres potenciálně způsobený antibiotikem, neboť katabolismus kyseliny gama-aminomáselné souvisí též s likvidací reaktivních forem kyslíku. Nicméně na tomto poli jsou nezbytné další analýzy.

Efekty na klíčení bazidiospor

Fries (1984) shrnuje ve své studii dřívější poznatky o stimulačním vlivu mikroorganismů na klíčení bazidiospor. Tímto fenoménem je ve spojitosti s EM houbami nejvíce proslulá kvasinka *Rhodotorula glutinis*, která má schopnost za specifických podmínek stimulovat klíčení celé řady druhů patřících do rodů *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Clitopilus*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Leccinum*, *Paxillus*, *Suillus*, *Tricholoma* a *Tylopilus*.

Klíčení bazidiospor druhu *H. crustuliniforme* bylo prokazatelně stimulováno mikroorganismy izolovanými z jejích plodnic a bezprostřední blízkosti ektomykorrhizy (houbou *Tritirachium roseum* a bakteriemi *Corynebacterium* spp, *Micrococcus roseus*, *Pseudomonas stutzeri*) (Ali and Jackson 1989).

Kořenové exudáty

Rostliny vylučují svými kořeny celou řadu organických látek, které jsou klíčové pro komunikaci s prostředím. Patří mezi ně některé ionty, cukry, organické kyseliny, cytokininy, aminokyseliny nebo vitamíny. Skrze tyto látky mohou rostliny do značné míry regulovat růst saprotrofních či parazitických hub a formování ektomykorrhizy. Exudáty považované za esenciální pro růst symbiotických hub byly zprvu v literatuře uváděny pod souhrnným názvem „M-faktor“ (Melin and Das 1954; Slankis 1974). V tomto směru věda příliš nepokročila. Existuje sice řada studií zabývajících se společnou kultivací EM hub

s kořeny rostlin či s kořenovými extrakty, nicméně jen zlomek odhaluje konkrétní látky ovlivňující fyziologii hub. Tomuto zlomku je věnována stávající kapitola.

Při pojednávání o vlivech kořenových exudátů na povahu ektomykorrhizy je nutné vyhnout se generalizaci. Z výsledků mnoha studií vyplývá, že vlivy těchto látek se různí s hostitelskou rostlinou, konkrétním houbovým druhem či izolátem a v případě *in vitro* kultivací též s použitým médiem.

Jeden z dějů, který mohou rostlinné exudáty ovlivňovat, je klíčení bazidiospor. To ovšem může být výrazně ovlivněno též produkty mikroorganismů (viz předchozí kapitola) (Ali and Jackson 1988). Jedním z rostlinných exudátů majících prokazatelný indukční efekt na klíčení bazidiospor čtyř druhů rodu *Suillus* (*S. granulatus*, *grevillei*, *luteus* a *variegatus*) je kyselina abietová (Fries et al. 1987). V navazující studii se ukázalo, že i bazidiospory dalších druhů rodu *Suillus* reagovaly na přítomnost kyseliny abietové. Zároveň v ní byly odhaleny jiné diterpenové pryskyřičné kyseliny s obdobným či méně výrazným efektem (kyselina palustrová, dehydroabietová, neoabietová, isopimarová a levopimarová) (Fries 1988). Flavonoidy, konkrétně genistein, rutin, quercitrin, naringenin, hesperidin, chrysin a morin, stimulovaly klíčení bazidiospor druhu *S. bovinus* (Kikuchi et al. 2007).

Některé fytohormony mohou ovlivňovat růst EM druhů. Cytokininy (zde jmenovitě zeatin, zeatin ribosid a kinetin), známé svou rolí v buněčném dělení a růstu vyšších rostlin, stimulovaly též růst druhu *S. variegatus*. Při určitých koncentracích byl dokonce pozorován synergický efekt kinetinu v kombinaci s auxinem (Gogala and Pohleven 1976). Nelze opomenout, že pozitivní efekt cytokininů na růst EM druhů hub (*Boletus edulis* var. *pinicola* a *S. variegatus*) byl studován v pracích Gogaly (1970; 1973) již dříve. Častým funkčním protipólem cytokininů v rostlinách je auxin. Přírodní auxiny vyvolávaly opačnou reakci i v případě mycelia druhu *S. variegatus*, jehož růst inhibovaly (Gogala and Župančič 1980).

Sun a Fries (1992) přidali k výše zmíněnému výčtu cytokininů ještě isopentenyl-aminopurin, který kromě druhu *S. variegatus* stimuloval též druhy *S. granulatus*, *P. tinctorius*, *L. bicolor* a *T. terrestris*. Poslední dva zmíněné poskytovaly pozitivní odpověď též na zeatin a v případě *T. terrestris* navíc na kinetin (KIN). Studie dále testovala reakci výše uvedených druhů na mastné kyseliny, které se řadí mezi složky některých kořenových exudátů. Kyselina palmitová byla efektivním růstovým stimulem pro všechny druhy (mimo netestovaný *P.*

tinctorius), kyselina stearová pouze pro *S. variegatus* a *S. granulatus*. Některé z giberelinů jsou také schopné stimulovat růst druhu *S. variegatus*. Samotná kyselina gibberelová (GA) má tento efekt pouze v úzkém rozmezí koncentrací (10^{-7} až 10^{-6} g/l). Nad a pod touto hranicí působí inhibičně (Gogala and Župančič 1980).

Avšak kořenové exudáty jsou komplexními směsmi látek, které až společně utvářejí výsledný efekt na EM houby. Kupříkladu inhibiční vliv jasmonátů (methyl-jasmonátu a kyseliny jasmonové) na růst druhu *S. variegatus* může být potlačen přidavkem růstových stimulátorů (GA a KIN) (Gogala 1989). Navíc to nejsou pouze produkty vlastních rostlinných symbiontů, které mohou ovlivňovat růst EM hub. Artemisinin, antimalarikum extrahované z listů pelyňku, signifikantně inhibovalo růst všech izolátů dvou druhů rodu *Suillus* (*S. luteus* a *subluteus*) (Li et al. 2014).

Příklady studií zmíněné v této kapitole nastiňují význam variabilních půdních interakcí pro ustavení ektomykorrhizního vztahu. Je nasnadě, že výsledky laboratorních experimentů mohou jen stěží objasnit všechny možné kombinace podmínek a organismů vyskytujících se v přírodě.

Kultivace ektomykorrhizních hub

Osvojení si metod a principů kultivace EM hub *in vitro* je nutným prvním krokem nejen pro vlastní studium fyziologie, nýbrž i pro masovější produkci inokul aplikovatelných v lesních školkách. Komerčně dostupná jsou například inokula druhů *P. tinctorius*, *H. crustuliniforme*, *P. involutus*, *T. terrestris* či *L. laccata* (Kumar and Satyanarayana 2002).

Izolace do čisté kultury

Hostitelská rostlina může tvořit spojení s vícem druhů EM hub. Sporokarpy obvykle slouží jako spolehlivý materiál k identifikaci konkrétního druhu. Z toho a dalších praktických důvodů je vnitřní pletivo mladých sporokarpů preferovaným zdrojem izolátů pro *in vitro* kultivace. Zároveň je zde menší riziko kontaminace jinými druhy (Molina and Palmer 1982; Harvey 1991). Méně časté izolace jsou pak prováděny přímo z mykorrhizy, rhizomorfů, bazidiospor či sklerocií (typické pro druh *C. graniforme* (Trappe 1969)).

Izolační média

Přírodní vzorky jsou tradičně nejprve izolovány na agarová média. Nejčastěji používanými izolačními médii jsou modifikované Melin-Norkrans médium (MMN), bramboro-dextrózový agar (PDA) a Hagemovo médium. Ovšem je to možná spíše tradice, která vedla k jejich rozsáhlému využití. Kultivace druhů rodu *Pisolithus* a *Thelephora* se přitom setkává s úspěchem při použití Pridham-Gottliebova média či jeho modifikací (Harvey 1991). Jako slibné médium se jeví též dobře definované GSM (glucose mineral salt medium) (Charya and Garg 2019). Složení uvedených médií shrnuje Tabulka 5.

Tabulka 5. Složení nejčastěji používaných médií pro *in vitro* kultivace EM hub

Složka	MMN	Hagem	GSM	MPG
Makronutrienty (g/l)				
Glukóza		5,00	20,00	30,00
Sacharóza	10,00			
Pepton				10,00
Maltózový extrakt	3,00	5,00		
Kvasinkový extrakt				2,00
NH ₄ Cl		0,50	1,00	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25			
(NH ₄)NO ₃				3,00
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆				
KH ₂ PO ₄	0,50	0,50	1,00	2,38
K ₂ HPO ₄				5,65
KCl			0,10	
MgCl ₂ × 4H ₂ O			0,30	
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,15	0,50		1,00
CaCl ₂	0,05		0,132	

Složka	MMN	Hagem	GMSM	MPG
NaCl	0,025		0,10	
Na ₂ EDTA			0,03752	
FeCl ₃ (1% o)	1,2 ml	1,2 ml		
FeSO ₄ × 7H ₂ O			0,01053	0,0011
Mikronutrienty (µg/l)				
CuSO ₄ × 5H ₂ O			97	6400
H ₃ BO ₃			2784	
MnCl ₂ × 4H ₂ O				1900
MnSO ₄ × H ₂ O			3380	
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O			338,46	
ZnSO ₄ × 7H ₂ O			201	1500
Kyseliny (µg/l)				
H ₂ SO ₄			240	
Vitamíny (µg/l)				
Thiamin. HCl	100	50	100	
Biotin			40	
pH	5,50	4,60–4,80	6,0	4,00/6,00

Převzato a upraveno (Kumar and Satyanarayana 2002; Charya and Garg 2019)

Typy kultivace EM hub

Pevná média

Pro laboratorní a vědecké účely jsou EM houby nejčastěji kultivovány na pevných médiích (s přídavkem agaru) v Petriho miskách. Médium musí být zvoleno tak, aby vyhovovalo výživovým nárokům konkrétního druhu či izolátu i cílům prováděné studie. Klade-li si studie za cíl získání informací o výživové fyziologii a jejích regulacích, je vhodné použít chemicky striktně definované syntetické médium. Na běžnou kultivaci, prováděnou za cílem propagace, produkce inokul či udržení životaschopných kmenů, je možné použít semisyntetické médium, které obsahuje též komplexnější složky jakožto zdroje organických látek (například pepton, maltózový extrakt či kvasinkový extrakt) (Molina and Palmer 1982). Typickým semisyntetickým médiem používaným pro kultivace EM hub je PDA (pro své nestandardizované složení je také vynecháno v Tabulce 5).

Kultury EM hub uchovávané při pokojové teplotě na pevném médiu by měly být přeočkovávány každých 60 dní. Pro delší uskladnění je vhodné využít jednu z metod popsaných níže. Zároveň by v pravidelných intervalech mělo být ověřeno, je-li zachována životaschopnost a udržení ektomykorrhizní potenciál kultivovaných druhů.

Tekutá média

Inokulum pro kultivaci na tekutém médiu je získáváno homogenizací kultury rostoucí na povrchu agaru (Harvey 1991).

Stacionární kultivace

Již dříve bylo zmíněno, že EM houby jsou silně aerobní. Nedostatečné okysličení může být úskalím statické kultivace na tekutém médiu, a je tedy vhodné zvolit pro její provedení Erlenmayerovu baňku s dostatečnou plochou pro kontakt se vzduchem a zároveň sníženou mírou evaporace (Harvey 1990). Evaporační ztráty je možné kompenzovat přídavkem malého množství sterilní destilované vody i v průběhu kultivace. Takovéto kultury jsou protřepávány v týdenních intervalech. Protřepání zajistí fragmentaci mycelia, tvorbu nových růstových bodů, a tím i zkrácenou dobu inkubace (Harvey 1991).

Třepaná kultivace

Při třepané kultivaci odpadá problém nedostatečné aerace. Tato metoda se jeví vyhovující, tedy při nastavení optimálních druhově specifických podmínek, například pro kultivaci druhů *H. crustuliniforme* (Mauperin et al. 2011) či *L. laccata* (Kuek 1996).

Submerzní tekutá fermentace

Submerzní tekutá fermentace je typem kultivace (nejčastěji třepané), jež probíhá v bioreaktoru na tekutém médiu (Harvey 1991; Kumar and Satyanarayana 2002). Typicky je pro tyto účely využíván tzv. bioreaktor „se vzdušným výtahem“ (airlift). S vhodně nastavenými podmínkami fermentace může být tato metoda efektivnější než výše zmíněné, jako bylo pozorováno například u druhů *H. crustuliniforme*, *Pisolithus microcarpus*, *P. tinctorius* či *T. terrestris* (Litchfield et al. 1982; Rossi et al. 2002; Tacon et al. 2011). Přestože tato metoda skýtá řadu výhod, jako jsou možnost produkce většího množství biomasy (potažmo inokul pro případné komerční využití) nebo vyšší životaschopnost kultivovaných izolátů, od její aplikace je řada výzkumníků odrazena nutnou počáteční investicí, častými kontaminacemi, stále ještě neznalostí řady aspektů fyziologie EM hub a s ní související nedostupností informací o optimálních postupech a metodologii kultivace konkrétních EM druhů (Harvey 1991; Rossi et al. 2007).

Uchovávání v kultuře

Kultury EM hub jsou nejčastěji uchovávány při 3 až 5 °C ve zkumavkách na šikmém agaru (MMN či PDA médiu). Nízká teplota zajistí výrazné zpomalení růstu, přesto je potřeba kultury v pravidelných intervalech 3–4 měsíců, nebo dle preferencí konkrétního druhu, přeočkovávat (Molina and Palmer 1982). Některé druhy mohou být uchovávány též ve sterilní destilované vodě ve tmě při 5 °C, a to až po dobu tří let beze ztráty či snížení životaschopnosti (Marx and Daniel 1976).

Perspektivy pro další práci

Studium EM hub je nevyčerpatelným zdrojem nových poznatků. V předchozích kapitolách byla zmíněna řada výzkumných polí s půdou dostatečně neoranou. Byť dnes není axenická kultivace EM hub žádnou raritou, ve studiích se stále objevují zmínky o pomalém růstu těchto druhů v nepřítomnosti rostlinných symbiontů. Současný výzkum by se proto měl zaměřit na identifikaci většího množství, ideálně obecně aplikovatelných, stimulačních faktorů, rostlinného či jiného původu, které mohou být klíčem k redukci tohoto problém.

Mnoho studií prokázalo, že existují určité substance produkované okolními mikroorganismy či rostlinami, které mohou významně ovlivnit fyziologii EM hub. Avšak nemnoho z nich se pokusilo odhalit konkrétní látky a změny genové exprese s nimi asociované. Je nasnadě, že sekundární metabolity, jejichž produkce je jednou ze základních charakteristik obou ektomykorrhizních partnerů a jejichž biologické role jsou intenzivně studovány, by měly přitahovat více pozornosti též v kontextu ektomykorrhizní symbiózy, neboť právě ony mohou tvořit významný zdroj ektomykorrhizu-regulujících sloučenin.

Některé sekundární metabolity, jako jsou quercetin, rutin, kyselina abietová, kyselina tříslová, kyselina gallová, kyselina salicylová, kyselina chlorogenová, kyselina vanilinová, resveratrol, kyselina ferulová či houbový auxofuran, již byly studovány pro své specifické efekty na houbový metabolismus (Bécard et al. 1992; Black and Dix 1976; Bending and Read 1996; Münzenberger et al. 2003; Wu et al. 2010; Mishra et al. 2017; Zhang et al. 2018; Vestergaard and Ingmer 2019; Clocchiatti et al. 2021) a mohly by být vhodnými adepty též pro studium EM druhů.

Závěr

Cílem mé práce bylo shrnout dosavadní poznatky o růstu a výživě hub (především EM druhů) v přírodě i *in vitro*.

Příjem živin houbami je ovlivněn řadou abiotických i biotických faktorů, přičemž se zdá, že efekty vyvolané jejich působením jsou jak mezidruhově, tak vnitrodruhově specifické a ve většině případů nelze naleznout obecné trendy. Tato vlastnost EM hub a fakt, že skutečná komplexita ektomykorrhizního vztahu sahá dále než k oboustranně výhodné výměně živin, poskytují mnoho oblastí výzkumu, které vyžadují hlubší porozumění. Porozumění, jež je nezbytné pro zefektivnění *in vitro* kultivace EM hub a využití jejich plného potenciálu coby rostliny podporujících organismů, producentů bioaktivních látek a zdrojů potravy.

Seznam použité literatury

* symbol hvězdičky označuje sekundární citace

- Abuzinadah, R. A. and Read, D. J. (1989). Carbon transfer associated with assimilation of organic nitrogen sources by silver birch (*Betula pendula* Roth.). *Trees*, 3(1), 17–23.
- Adeleke, R. A., Cloete, T. E., Bertrand, A. and Khasa, D. P. (2010). Mobilisation of potassium and phosphorus from iron ore by ectomycorrhizal fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1901–1913.
- Ali, N. A. and Jackson, R. M. (1988). Effects of plant roots and their exudates on germination of spores of ectomycorrhizal fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(2), 253–260.
- Ali, N. A. and Jackson, R. M. (1989). Stimulation of germination of spores of some ectomycorrhizal fungi by other micro-organisms. *Mycological Research*, 93(2), 182–186.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 78–91.
- Baldrian, P. (2010). Effect of heavy metals on saprotrophic soil fungi. *Soil Biology. Soil Heavy Metals*, 19, 263–279.
- Bécard, G., Doude, D. D. and Pfeffer, P. E. (1992). Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 821–825.
- Bending, G. D. and Read, D. J. (1996). Effects of the soluble polyphenol tannic acid on the activities of ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12), 1595–1602.
- Berner, C., Johansson, T. and Wallander, H. (2012). Long-term effect of apatite on ectomycorrhizal growth and community structure. *Mycorrhiza*, 22(8), 615–621.
- Black, R. L. B. and Dix, N. J. (1976). Utilization of ferulic acid by microfungi from litter and soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(2), 313–317.
- Bois, G., Bertrand, A., Piché, Y., Fung, M. and Khasa, D. P. (2006). Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza*, 16, 99–109.
- Boucher, N. L. and Malajczuk, N. (1990). Effects of high soil moisture on formation of ectomycorrhizas and growth of karri (*Eucalyptus diversicolor*) seedlings inoculated

- with *Descolea maculata*, *Pisolithus tinctorius* and *Laccaria laccata*. *New Phytologist*, 114(1), 87–91.
- Bowen, G. D. and Theodorou, C. (1979). Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(2), 119–126.
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: Understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320(1), 37–77.
- Cairney, J. W. G. (2012). Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 47, 198–208.
- Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F., Maggi, O. and Persiani, A. M. (2018). Saprotrophic soil fungi to improve phosphorus solubilisation and release: *In vitro* abilities of several species. *Ambio*, 47(1), 30–40.
- Charya, L. S. and Garg, S. (2019). Advances in methods and practices of ectomycorrhizal research. In Meena, S. N. and Naik, M. M. (eds.), *Advances in Biological Science Research*, 303–325.
- Cline, M. L., France, R. C. and Reid, C. P. P. (1987). Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Canadian Journal of Botany*, 65, 869–875.
- Clocchiatti, A., Hannula, S. E., van den Berg, M., Hundscheid, M. P. J. and de Boer, W. (2021). Evaluation of phenolic root exudates as stimulants of saprotrophic fungi in the rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1–15.
- Coleman, M. D., Bledsoe, C. S. and Lopushinsky, W. (1989). Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Canadian Journal of Botany*, 67(1), 29–39.
- da Silva, J. A. L., Fraústo da Silva, J. J. R. and Pombeiro, A. J. L. (2013). Amavadin, a vanadium natural complex: Its role and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(15), 2388–2400.
- Dachuan, Y. and Jinyu, Q. (2021). The physiological response of Ectomycorrhizal fungus *Lepista sordida* to Cd and Cu stress. *PeerJ*, 9.
- Dighton, J. and Jansen, A. E. (1991). Atmospheric pollutants and ectomycorrhizae: More questions than answers? *Environmental Pollution*, 73(3), 179–204.
- Dixon, R. K., Rao, M. V. and Garg, V. K. (1993). Salt stress affects *in vitro* growth and *in situ* symbioses of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 3(2), 63–68.

- Duponnois, R. and Garbaye, J. (1991). Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir – *Laccaria laccata* symbiosis: Effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Annales Des Sciences Forestières*, 48(3), 239–251.
- Duponnois R. and Garbaye J. (1992). Specificity and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the *Pseudotsuga menziesii* – *Laccaria laccata* symbiosis. *Symbiosis*, 14, 335–344.
- Finlay, R. D., Frostegård, Å. and Sonnerfeldt, A.-M. (1992). Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytologist*, 120(1), 105–115.
- Founoune, H., Duponnois, R., Bâ, A. M., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J. and Chotte, J. L. (2002). Mycorrhiza helper bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *The New Phytologist*, 153(1), 81–89.
- Frank, A. B. (1885). Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3(4), 128–145.
- *Frank, A. B. (1894). Die Bedeutung der Mykorhiza für die gemeine Kiefer. *Forstwissenschaftliches Centralblatt*, 38, 185–190.
- Fries, N. (1984). Spore germination in the higher Basidiomycetes. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences*, 93(3), 205–222.
- Fries, N., Serck-Hanssen, K., Dimberg, L. H. and Theander, O. (1987). Abietic acid and activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology*, 11(4), 360–363.
- Fries, N. (1988). Specific effects of diterpene resin acids on spore germination of ectomycorrhizal basidiomycetes. *Experientia*, 44(11), 1027–1030.
- Fuller, K. K., Loros, J. J. and Dunlap, J. C. (2015). Fungal photobiology: Visible light as a signal for stress, space and time. *Current Genetics*, 61(3), 275–288.
- Garbaye, J. (1994). Helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128(2), 197–210.
- Garrett, H. E., Carney, J. L. and Hedrick, H. G. (1982). The effects of ozone and sulfur dioxide on respiration of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research*, 12(2), 141–145.
- Gehring, C. A. (2017). Mycorrhizas and soil structure, moisture and salinity. In Johnson, N. C., Gehring, C. and Jansa, J. (eds.), *Mycorrhizal Mediation of Soil*, 235–240.

- Gogala, N. (1970). Einfluß der natürlichen Cytokinine von *Pinus sylvestris* L. und anderer Wuchsstoffe auf das Myzelwachstum von *Boletus edulis* var. *Pinicolus* Vitt. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 118, 321–333.
- Gogala, N. (1973). Einfluß der natürlichen Cytokinine von *Monotropa hypopitys* L. auf das Myzelwachstum von Mykorrhizapilzen. *Österreichische botanische Zeitschrift*, 121(5), 255–267.
- Gogala, N. and Pohleven, F. (1976). The effect of cytokinins and auxins on the growth of mycorrhizal fungus *Suillus variegatus*. *Acta botanica croatica*, 35, 129–134.
- Gogala, N. and Župančič, A. (1979). The influence of root exudate auxins and gibberellins on the growth of *Suillus variegatus* mycelium. *Acta botanica croatica*, 39, 85–93.
- Gogala, N. (1989). Growth substances in root exudate of *Pinus sylvestris* – Their influence on mycorrhizal fungi (effects of jasmonic acid). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 28(1), 151–154.
- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N. and Plemenitaš, A. (2011). Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. In Laskin, A. I., Sariaslani, S. and Gadd, G. M. (eds.), *Advances in Applied Microbiology*, 77, 71–96.
- Gube, M. (2016). 4 fungal molecular response to heavy metal stress. In Hoffmeister, D. (ed.), *Biochemistry and Molecular Biology*, 47–68.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J. and Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231–1241.
- Hacsckaylo, E. (1965). *Thelephora terrestris* and mycorrhizae of Virginia pine. *Forest Science*, 11(4), 401–404.
- Hacsckaylo, E., Palmer, J. G. and Vozzo, J. A. (1965). Effect of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 57(5), 748–756.
- Harley, J. L., Kozłowski, T. T. and Marks, G. C. (1975). Ectomycorrhizae, their ecology and physiology. *The Journal of Ecology*, 63(1), 209–227.
- *Harley, J. L. and Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*, 483.
- Harvey, L. M. (1990). The cultivation of ectomycorrhizal fungi. In Whipps, J. M. and Lumsden, R. D. (eds.), *Biotechnology of fungi for improving plant growth*, 27–39.
- Harvey, L. M. (1991). Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. *Biotechnology Advances*, 9(1), 13–29.
- Hassan, Z. ul, Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Nafees, M. and Waseem, M. (2017). Role of bioremediation agents (bacteria, fungi and algae) in alleviating heavy metal

- toxicity. In Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S. and Prasad, R. (eds.), *Probiotics in Agroecosystem*, 517–537.
- Hattori, T., Ohta, A., Itaya, M. and Shimada, M. (2003). The ability of ectomycorrhizal fungi to utilize fatty acids and a lipid as a carbon source for mycelial growth. *Canadian Journal of Botany*, 81(12), 1285–1292.
- Ho, Q. B.-T., Suzuki, A. and Nguyen, T. P. (2012). Photo-responses of the fruit body formation in two ectomycorrhizal fungi *Alnicola lactariolens* and *Hebeloma vinosophyllum*. *International Journal of Agricultural Technology*, 8(7), 2215–2225.
- Howson, S. J. and Davis, R. P. (1983). Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(5), 377–382.
- Hung, L.-L. and Trappe, J. M. (1983). Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia*, 75(2), 234–241.
- Ikushima, H., Okamoto, M., Tanaka, H., Ohe, O., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1980). New anticoccidial antibiotics, WS-5995 A and B. Isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*, 33(10), 1107–1113.
- Ito, Z. A. and Reshi, Z. A. (2014). Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under *in vitro* conditions. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29(7), 619–628.
- Jany, J.-L., Martin, F., Garbaye, J. (2003). Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius* sp. in relation to soil water potential in five beech forests. *Plant and Soil*, 255(2), 487–494.
- Jennings, D. H. (1975). *The Physiology of Fungal Nutrition*, 251–254.
- Jeon, Sung-Min, Kim, Min-Soo and Ka, Kang-Hyeon. (2012). Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *The Korean Journal of Mycology*, 40(4), 191–203.
- Joo, J.-H. and Hussein, K. A. (2012). Heavy metal tolerance of fungi isolated from contaminated soil. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 45(4), 565–571.
- Kikuchi, K., Matsushita, N., Suzuki, K. and Hogetsu, T. (2007). Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza*, 17(7), 563–570.
- Koele, N., Dickie, I. A., Blum, J. D., Gleason, J. D. and de Graaf, L. (2014). Ecological significance of mineral weathering in ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal ecosystems from a field-based comparison. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 63–70.

- Kothamasi, D., Wannijn, J., Van Hees, M., Nauts, R., Van Gompel, A., Vanhoudt, N. and Vandenhove, H. (2019). Exposure to ionizing radiation affects the growth of ectomycorrhizal fungi and induces increased melanin production and increased capacities of reactive oxygen species scavenging enzymes. *Journal of Environmental Radioactivity*, 197, 16–22.
- Kramer, P. J., Knipling, E. B. and Miller, L. N. (1966). Terminology of cell-water relations. *Science*, 153(3738), 889–890.
- Kuek, C. (1996). Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 319–326.
- Kumar, S. and Satyanarayana, T. (2002). Production of inoculum of ectomycorrhizal fungi. In Mukerji, K. G., Manoharachary, C. and Chamola, B. P. (eds.), *Techniques in Mycorrhizal Studies*, 143–166.
- Levisohn, I. (1957). Antagonistic effects of *Alternaria tenuis* on certain root-fungi of forest trees. *Nature*, 179(4570), 1143–1144.
- Leyval, C. and Berthelin, J. (1989). Interactions between *Laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots: Influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil*, 117(1), 103–110.
- Li, Q., Yuan, L. and Huang, J. (2014). Allelopathic effects of artemisinin on ectomycorrhizal fungal isolates *in vitro*. *Pedobiologia*, 57(4), 271–276.
- Lilleskov, E. A., Bruns, T. D., Dawson, T. E. and Camacho, F. J. (2009). Water sources and controls on water-loss rates of epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps during summer drought. *New Phytologist*, 182(2), 483–494.
- Litchfield, J. H. and Jr, W. T. L. (1982). Aerobic submerged fermentation of sporulating, ectomycorrhizal fungi. *United States Patent No. US4327181A*.
- Lundeberg, G. (1970). Utilisation of various nitrogen sources, in particular bound soil nitrogen, by mycorrhizal fungi. *Studia Forestalia Suecica*, (79), 26–39.
- Mahanty, S., Tudu, P., Ghosh, S., Chatterjee, S., Das, P., Bhattacharyya, S. and Chaudhuri, P. (2021). Chemometric study on the biochemical marker of the manglicolous fungi to illustrate its potentiality as a bio indicator for heavy metal pollution in Indian Sundarbans. *Marine Pollution Bulletin*, 173.
- *Maier, A. (2003). Einfluss bakterieller Stoffwechselprodukte auf Wachstum und Proteom des Ektomykorrhizapilzes *Amanita muscaria*. PhD Thesis. University of Tübingen.

- Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H.-P. and Hampp, R. (2004). Actinomycetales bacteria from a spruce stand: Characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungi in dual culture. *Mycological Progress*, 3(2), 129–136.
- Marx, D. H. (1972). Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Annual Review of Phytopathology*, 10(1), 429–454.
- Marx, D. H. and Daniel, W. J. (1976). Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(3), 338–341.
- Matoso, C. M. M., Pombeiro, A. J. L., Fraústo da Silva, J. J. R., da Silva, M. F. C. G., da Silva, J. A. L., Baptista-Ferreira, J. L. and Pinho-Almeida, F. (1998). A possible role for amavadine in some *Amanita* fungi: A unique case in biology. *ACS Symposium Series*, 711, 241–247.
- Matsuda, Y., Sugiyama, F., Nakanishi, K. and Ito, S. (2006). Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. *Mycoscience*, 47(4), 212–217.
- Mauperin, C., Mortier, F., Garbaye, J., Tacon, F. and Carr, G. (2011). Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Canadian Journal of Botany*, 65, 2326–2329.
- Melin, E. (1953). Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 4, 325–346.
- Melin, E. and Rama Das, V. S. (1954). Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, 7(4), 851–858.
- *Melin, E. and Nilsson, H. (1957). Transport of C¹⁴ labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 51, 166.
- Mexal, J. and Reid, C. P. P. (1973). The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. *Canadian Journal of Botany*, 51(9), 1579–1588.
- Mishra, V., Jana, A. K., Jana, M. M. and Gupta, A. (2017). Synergistic effect of syringic acid and gallic acid supplements in fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse for improved lignin degradation and enzymatic saccharification. *Process Biochemistry*, 55, 116–125.
- Modess, O. (1941). Zur Kenntnis der Mycorrhizabildner von Kiefer und Fichte. *Symbolae Botanicae Upsalienses*, 5, 1–146.
- Molina, R. and Palmer, J. G. (1982). Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenck, N. C. (ed.), *Methods and principles of mycorrhizal research*, 115–129.

- Moore, D., Robson Geoffrey, D. and Trinci Anthony, P. J. (2021). *21st Century Guidebook to Fungi, second edition online* (chap. 17.2).
- Moore, D., Alexopoulos, C. J. and Ahmadjian, V. (2023). *Encyclopedia Britannica*, "fungus".
- Münzenberger, B., Hammer, E., Wray, V., Schauer, F., Schmidt, J. and Strack, D. (2003). Detoxification of ferulic acid by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 13(2), 117–121.
- Nicolás, C., Martin-Bertelsen, T., Floudas, D., Bentzer, J., Smits, M., Johansson, T. and Tunlid, A. (2018). The soil organic matter decomposition mechanisms in ectomycorrhizal fungi are tuned for liberating soil organic nitrogen. *The ISME Journal*, 13(4), 977—988.
- Ohta, A. (1997). Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience*, 38(4), 403–408.
- Pedersen, E. A., Reddy, M. S. and Chakravarty, P. (1999). Effect of three species of bacteria on damping-off, root rot development and ectomycorrhizal colonization of lodgepole pine and white spruce seedlings. *European Journal of Forest Pathology*, 29(2), 123–134.
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 665–693.
- Read, D. J. and Armstrong, W. (1972). A relationship between oxygen transport and the formation of the ectotrophic mycorrhizal sheath in conifer seedlings. *New Phytologist*, 71(1), 49–53.
- Read, D. J. (1995). Ectomycorrhizas in the ecosystem. In Stocchi, V., Bonfante, P. and Nuti, M. (eds.), *Biotechnology of Ectomycorrhizae: Molecular Approaches*, 1–23.
- Riedlinger, J., Schrey, S. D., Tarkka, M. T., Hampp, R., Kapur, M. and Fiedler, H.-P. (2006). Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3550–3557.
- *Romell, L.-G. (1930). Blodriskan, en granens följesvamp (Der echte Reizker, ein Fichtenbegleiter). *Svensk Botanisk Tidskrift*, 24, 524-529.
- *Romell, L.-G. (1938). A trenching experiment in spruce forest and its bearing on problems of mycotrophy. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 32, 89–99.
- Romell, L.-G. (1939). The ecological problem of mycotrophy. *Ecology*, 20(2), 163–167.
- Rossi, M. J., Souza, J. a. R. and Oliveira, V. L. (2002). Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 175–181.

- Rossi, M., Furigo, A. and Oliveira, V. (2007). Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food technology*, 45, 277–286.
- Rossi, M. J., Nascimento, F. X., Giachini, A. J., Oliveira, V. L. and Furigo, A. (2017). Transfer and consumption of oxygen during the cultivation of the ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon nigrescens* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 1013–1024.
- Sánchez, F., Honrubia, M. and Torres, P. (2001). Effects of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie*, 22(4), 243–258.
- Schelkle, M. and Peterson, R. L. (1997). Suppression of common root pathogens by helper bacteria and ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Mycorrhiza*, 6(6), 481–485.
- Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. and Tarkka, M. T. (2005). Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*, 168(1), 205–216.
- Scott, W. J. (1953). Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Australian Journal of Biological Sciences*, 6(4), 549–564.
- Slankis, V. (1974). Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 437–457.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, third edition, 296–301.
- Stenström, E. (1991). The effects of flooding on the formation of ectomycorrhizae in *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil*, 131(2), 247–250.
- Strzelczyk, E., Dahm, H. and Pachlewski, R. (1991). B-group vitamins production by mycorrhizal fungi in response to pH (*in vitro* studies). *Plant and Soil*, 137(2), 237–241.
- Stuart, E. K. and Plett, K. L. (2020). Digging deeper: In search of the mechanisms of carbon and nitrogen exchange in ectomycorrhizal symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–11.
- Summerbell, R. C. (1987). The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* *in vitro*. *The New Phytologist*, 105(3), 437–448.
- Sun, Y.-P. and Fries, N. (1992). The effect of tree-root exudates on the growth rate of ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. *Mycorrhiza*, 1(2), 63–69.

- Tacon, F., Jung, G., Mugnier, J., Michelot, P. and Mauperin, C. (2011). Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Canadian Journal of Botany*, 63, 1664–1668.
- Tang, M., Sheng, M., Chen, H. and Zhang, F. F. (2009). *In vitro* salinity resistance of three ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5), 948–953.
- Teramoto, M., Wu, B. and Hogetsu, T. (2012). Transfer of ¹⁴C-photosynthate to the sporocarp of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina*. *Mycorrhiza*, 22(3), 219–225.
- Theodorou, C. (1967). Inoculation with pure cultures of mycorrhizal fungi of radiata pine growing in partially sterilized soil. *Australian Forestry*, 31(4), 303–309.
- Theodorou, C. and Bowen, G. D. (1971). Influence of temperature on the mycorrhizal associations of *Pinus radiata* D. Don. *Australian Journal of Botany*, 19(1), 13–20.
- Thomas, P. W. (2021). Ectomycorrhiza resilience and recovery to extreme flood events in *Tuber aestivum* and *Quercus robur*. *Mycorrhiza*, 31(4), 511–517.
- Trappe, J. M. (1969). Studies on *Cenococcum graniforme*. An efficient method for isolation from sclerotia. *Canadian Journal of Botany*, 47(9), 1389–1390.
- Trappe, J. M. (2005). A. B. Frank and mycorrhizae: The challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza*, 15(4), 277–281.
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5, 656.
- Turner, G. D., Lewis, J. D., Mates-Muchin, J. T., Schuster, W. F. and Watt, L. (2009). Light availability and soil source influence ectomycorrhizal fungal communities on oak seedlings grown in oak- and hemlock-associated soils. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(7), 1247–1258.
- Vestergaard, M. and Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(6), 716–723.
- Walker, G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*, 51–61.
- Walker, G. M. and White, N. A. (2005). In Kavanagh, K. (ed.), *Introduction to Fungal Physiology, Fungi, first edition*, 1–34.
- Walker, G. M. and White, N. A. (2017). *Introduction to Fungal Physiology. Fungi, first edition*, 1–35.
- Wallander, H. and Wickman, T. (1999). Biotite and microcline as potassium sources in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza*, 9(1), 25–32.

- Wallander, H. (2000). Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 218(1/2), 249–256.
- Wallander, H. (2006). In Gadd, G. M. (ed.), *Fungi in Biogeochemical cycles*, 14, 337.
- Wu, H., Liu, Y.-D., Yang, X.-I., Chen, X.-Q., Wang, Z.-H., Kong, X. and Yan, S. (2010). Growth responses of *in vitro* *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to external supply of tannic acid. *Journal of Environmental Biology*, 31(6), 1017–1022.
- Yu, Z. and Fischer, R. (2019). Light sensing and responses in fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 25–36.
- Zhang, M., Xu, L., Zhang, L., Guo, Y., Qi, X. and He, L. (2018). Effects of quercetin on postharvest blue mold control in kiwifruit. *Scientia Horticulturae*, 228, 18–25.