

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie rostlin



*Interagují spolu ektomykorhizní a erikoidně mykorhizní  
hostitelské rostliny prostřednictvím ektomykorhizních, erikoidních  
a pseudomykorhizních hub?*

Matyáš Fendrych

Praha 2006

---

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jana Albrechtová, Dr.

Konzultanti: Mgr. Martin Vohník

Mgr. Miroslav Vosátka, CSc.

*Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a s použitím citované literatury pod vedením Doc. RNDr. Jany Albrechtové a Mgr. Martina Vohníka.*

*V Praze 15. srpna 2006*

*Matyáš Fendrych*

---

*Děkuji svým blízkým*

*Aleně, Martinovi, Andule, Mařce, samozřejmě Máje, Lence, Věře a Ludkovi*

*svým kolegům*

*Martinovi, paní docentce Albrechtové, Liborovi, Jirkovi, Radce, Báře, Daně, Ritě,  
Ondrovi, Petrovi, Marianně, Zuzce a lidem z Katedry fyziologie rostlin*

*Paní doktorce Lipavské děkuji za společně uskutečněné experimenty, paní docentce  
Zažímalové za provedené analýzy*

*Finanční zajištění práce*

*Grantová agentura Univerzity Karlovy, grant číslo 43-230349*

---

*Seznam použitých zkratek*

- CMN síť mycelia mykorhizních hub, z angl. „common mycorrhizal network“
- DSE z anglického „dark septate endophyte“, původně také pseudomykorhiza
- EcM ektomykorhizní (ve smyslu ektomykorhizní houba, asociace, rostlina)
- ErM erikoidní mykorhiza, erikoidně mykorhizní
- FAA fixáž, z angl. „formaldehyde, acetic acid, alcohol“
- G označení média v Pokusu 3, kde zdrojem N je aminokyselina glycin
- IAA kyselina indolyl-3-octová (angl. „indole-3-acetic acid“)
- IBA indolyl-3-máselná kyselina (angl. „3-indolebutyric acid“)
- MMN kultivační médium, z angl. „modified Melin Norkrans“
- NDIC Nomarského diferenciální interferenční kontrast
- NH<sub>4</sub> označeno médium v Pokusu 3, kde zdrojem N je amonný iont
- PCR polymerázová řetězová reakce z angl. „polymerase chain reaction“
- PDA kultivační médium (z angl. „potato dextrose agar“)
- PR proteiny proteiny související s obranou před patogenem (angl. „pathogen-related“)
- TIBA kyselina 2,3,5 trijodobenzoová (angl. „2,3,5-triiodobenzoic acid“)
- VWT variabilní bílý taxon (angl. „variable white taxon“) původní označení pro  
*Meliniomyces variabilis*

*Označení kmenů použitých hub nejsou v seznamu zkratek uvedena*



---

## Obsah

1.Úvod .....	7
2.Hypotézy a cíle.....	8
3.Literární úvod.....	9
3.1.Ektomykorhiza.....	9
3.1.1.Vznik a fungování EcM.....	10
3.1.2.Exprese genů účastnících se tvorby EcM.....	14
3.1.3.Výměna látek mezi kořeny hostitele a EcM houbami.....	17
3.1.4.Podmínky vzniku a trvání EcM.....	21
3.2.Erikoidní mykorhiza.....	22
3.2.1.Vznik a fungování ErM.....	23
3.2.2.Výměna látek v ErM.....	25
3.3.DSE asociace (pseudomykorhiza).....	27
3.4.Mykobionti EcM a ErM.....	28
3.4.1.Bazidiomycety jako mykobionti ErM.....	29
3.4.2. <i>Rhizoscyphus ericae</i> agregát jako mykobiont EcM.....	30
3.5.Propojení EcM a ErM rostlin.....	32
4.Materiál a metody.....	35
4.1.Rostlinný materiál.....	35
4.2.Houbový materiál.....	35
4.3.Metody pozorování kolonizace kořenů.....	39
4.4.Použitý software.....	40
4.5.Statistická analýza.....	40
4.6.Pokus 1.....	41
4.7.Pokus 2.....	43
4.8.Pokus 3.....	43
5.Výsledky.....	45
5.1.Pokus 1 .....	45
5.1.1. <i>Pinus sylvestris</i> .....	45

---

5.1.2. <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	47
5.1.3. <i>Picea abies</i> .....	51
5.2. Pokus 2.....	57
5.2.1. <i>Pinus sylvestris</i> .....	57
5.2.2. <i>Picea abies</i> .....	57
5.2.3. <i>Betula nana</i> .....	58
5.2.4. Pokus 3.....	59
6. Diskuze.....	61
6.1. Interakce ErM a EcM rostlin s DSE mykobionty.....	61
6.2. Interakce ErM a EcM rostlin s EcM mykobionty.....	62
6.3. Interakce ErM a EcM rostlin s <i>Oidiodendron maius</i> a s mykobionty z řádu <i>Helotiales</i> .....	66
6.4. Shrnutí.....	71
7. Závěry .....	74
8. Poznámky.....	75
9. Abstract.....	76
10. Citovaná literatura.....	78

## 1. Úvod

Mykorhizní symbióza je *de facto* makroskopickým ekvivalentem lišejníku. Vyvinula se již s přechodem rostlin na souš; kořeny prvních suchozemských rostlin byly pravděpodobně kolonizovány předchůdci dnešních arbuskulárně mykorhizních hub. Někteří autoři se domnívají, že mykorhiza byla jedním z hlavních faktorů určující podobu kořenů dnešních rostlin. Značná část dřevin severní polokoule tvoří ektomykorhizy, jejich kořenové špičky jsou od půdního prostředí odděleny hyfovým obalem mykobionta. Vřesovcovitým rostlinám umožňuje erikoidní mykorhiza (ErM) obývat stanoviště s extrémními podmínkami. Na přirozených stanovištích tvoří často vřesovcovité rostliny podrost ektomykorhizních (EcM) rostlin, jejich kořeny a tedy i mykobionti kořenů jsou ve vzájemném těsném kontaktu. Houby tvořící ektomykorhizu a ErM byly chápány jako zcela odlišné skupiny, častá izolace ErM mykobiontů z kořenů EcM rostlin a některé práce však naznačují, že tyto rostliny mohou sdílet mykobionty s vřesovcovitými rostlinami. Cílem diplomové práce bylo ověřit tuto hypotézu a rozšířit poznatky v oblasti interakce EcM a ErM rostlin.

Diplomová práce byla vypracována v rámci grantu Grantové agentury UK: *Interagují spolu ektomykorhizní a erikoidně mykorhizní hostitelské rostliny prostřednictvím ektomykorhizních, pseudomykorhizních a erikoidních hub?* Tato práce navazuje na studium problematiky erikoidních a DSE hub na Oddělení mykorhizních symbióz BÚ AVČR (Jansa a Vosátka 2000, Vohník 2002, Vohník a kol. 2003, Vohník a kol. 2005).

## 2. Hypotézy a cíle

*H1: Kořeny typicky EcM rostlin a typicky ErM rostlin mohou být kolonizovány stejným houbovým symbiontem*

*H2: Vzniklé asociace jsou mykorhizní*

### **Cíle diplomové práce**

- Ověřit hypotézy H1 a H2.
- Najít vhodné experimentální systémy pro syntézy asociací mezi typicky EcM rostlinami (*Picea*, *Pinus*, *Betula*) a typicky ErM rostlinami (*Vaccinium*)

### 3. Literární úvod

Ve všech typech mykorhiz je cytoplazma houbové buňky (hyfy) oddělená od cytoplazmy rostlinné buňky „houbovou“ buněčnou membránou, apoplastickým prostorem a „rostlinnou“ buněčnou membránou. Z anatomicko-morfologického hlediska se mykorhizní typy dělí na ektomykorhizní a endomykorhizní podle toho, zda hyfy vstupují do buněk rostlinného hostitele. Endomykorhizy se dále dělí na arbuskulární mykorhizu, orchideoidní mykorhizu, erikoidní mykorhizu. Nejrozšířenější typ - arbuskulární mykorhiza - je charakteristická přítomností tzv. arbuskulí („keříčků“ hyf, z lat. „arbor“ = strom) uvnitř buněk primární kůry. Orchideoidní mykorhiza je symbióza přítomná výlučně u rostlin řádu *Orchidales*, hyfy v buňkách primární kůry tvoří smotky a tzv. pelotony. Mezi ektomykorhizou a endomykorhizou existují přechodné typy: ektendomykorhiza – hyfy symbionta tvoří hyfový plášť, Hartigovu síť, ale na rozdíl od ektomykorhizy navíc pronikají do buněk hostitele, dále arbutoidní mykorhiza a monotropoidní mykorhiza. Specifickým typem asociace je tzv. DSE-asociace (z angl. dark-septate endophyte), dříve označovaná jako pseudomykorhiza. V úvodu této práce se podrobněji zabývám ektomykorhizou a erikoidní mykorhizou

#### 3.1. Ektomykorhiza

Ektomykorhiza byla původně považována za parazitismus. A.B Frank ji v roce 1885 označil za symbiózu a poprvé byla v laboratorních podmínkách syntetizována Eliasem Melinem v roce 1922 na semenáčcích modřínu (podle Gryndler a kol. 2004). Ektomykorhizu charakterizují specificky pozměněné kořenové špičky hostitelské rostliny: jsou obaleny hyfovým pláštěm a mezi buňkami epidermis a primární kůry je přítomná tzv. Hartigova síť, což je orgán výměny látek mezi ektomykorhizní (EcM) houbou a jejím hostitelem. Ektomykorhizu tvoří stromy a keře subarktického a mírného pásma a některé stromy tropického pásma.

Morfologický vývoj EcM špičky je závislý na okolních podmínkách, liší se podle druhu hostitelské rostliny i symbionta, přesto lze proces do jisté míry zobecnit: dochází ke stimulaci růstu houbového symbionta exudáty hostitelské rostliny, porůstání kořenové špičky hyfami, proniknutí hyf do kořene. V této fázi hyfy mění charakter růstu, mezi buňkami epidermis a vrchní vrstvou primární kůry vytvářejí Hartigovu síť. Z kolonizovaného kořene pak vyrůstají hyfy a vytváří hyfový plášť (Nylund a Unestam 1982). Tento model platí např. pro ektomykorhizu *Picea abies* – *Piloderma croceum*. Jiné hostitelské rostliny se mohou lišit ve sledu vytváření hyfového pláště a Hartigovy sítě. V *in vitro* systému *Betula pendula* – *Paxillus involutus* se hyfový plášť vytvářel dříve než Hartigova síť – 2-4 dny po kontaktu hyfa – kořen. Čtyři dny po kontaktu byly patrné první známky vytváření Hartigovy sítě. Osmý den byla vytvořena Hartigova síť, 15. den byla vytvořena zralá Hartigova síť (Brun a kol. 1995).

### 3.1.1. Vznik a fungování EcM

Signály mezi houbou a rostlinou zajišťující tvorbu ektomykorhizy nejsou prozkoumané tolik jako signální dráhy u arbuskulární mykorhizy či symbiózy bobovitých rostlin s hlízkovými bakteriemi. Vznik funkční ektomykorhizy je komplexní proces, vyžadující vhodný fyziologický stav obou symbiotických partnerů, jejich genetickou schopnost ektomykorhizu tvořit.

Martin a kol. (2001) rozděluje látky účastnící se vzniku a fungování ektomykorhizy do následujících skupin:

- látky zajišťující tropismus hyf ke kořeni, látky zajišťující přilnutí hyf na povrch kořene a jeho následnou invazi
- signály vedoucí ke spuštění genetických programů houby i rostliny zajišťující vznik funkční ektomykorhizy
- látky zajišťující přežití houbového symbionta uvnitř pletiv rostliny
- látky zajišťující koordinaci strategií výměny látek mezi houbou a rostlinou

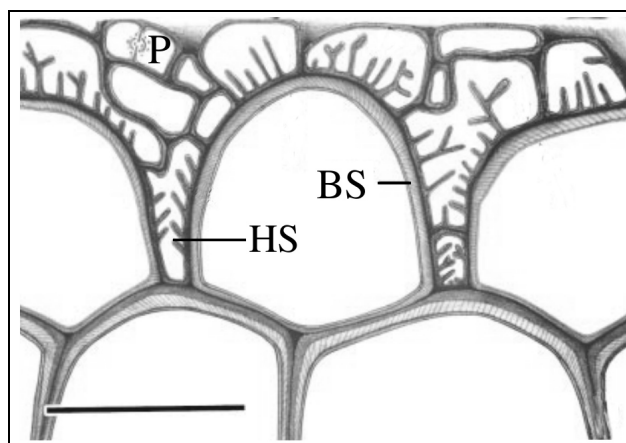
Pro tvorbu ektomykorhizy je nezbytná schopnost houbového symbionta najít kořeny

potenciálního hostitele v diverzifikovaném, trojrozměrném prostoru půdy. Kořeny rostlin mění prostředí půdy ve své blízkosti – odčerpávají živiny, snižují pH, produkují exudáty. Vzniklé zóny s nízkým obsahem N, P a vysokým obsahem cukrů však pravděpodobně jsou nespecifickým signálem pro různé druhy mikroorganismů, nejen EcM hub; jsou charakteristickou stopou kořene živé rostliny. Kořenové exudáty pravděpodobně poskytují specifičtější signál pro potenciální houbové symbionty (Tagu a kol. 2002). Tuto hypotézu potvrzuje fakt, že klíčení spór EcM hub je podporováno kořenovými exudáty pro ně specifických potenciálních hostitelských rostlin (např. Fries a kol. 1987), hyfy EcM hub na tyto exudáty reagují pozitivním směrovaným růstem (např. Horan a Chilvers 1990). Látky způsobující tuto chemotaxi jsou postupně objevovány: klíčení spór EcM houby *Suillus* bylo indukováno kořenovým exudátem *Pinus sylvestris*, jako účinná látka byla identifikována kyselina abietová (Fries a kol. 1987). Růst kolonií EcM houby *Pisolithus* byl podpořen přidáním fenolické látky rutinu izolované z kořenového exudátu *Eucalyptus globulus*, kolonie reagovaly na přítomnost rutinu již při koncentraci 1pM ( $10^{-12}$ Mol l<sup>-1</sup>) (Lagrange a kol. 2001). Další molekuly účastníci se komunikace mezi houbou a kořeny jsou kyselina jasmonová, zeatin (Martin a kol. 2001, Jambois a Lapeyrie 2005).

EcM houby jsou také charakteristické svou rhizosférickou stopou, kontakt kořen – houba však pravděpodobně zajišťuje více mobilní houbové mycelium. EcM houby produkují analogy rostlinných hormonů, kterými regulují růst budoucí hostitelské rostliny. Exudáty a extrakty z mycelia EcM hub mohou částečně nahradit jejich fyzickou přítomnost. Dlouho prokázanými látkami, které ovlivňují růst potenciálních hostitelů, jsou auxiny. Mycelia *Paxillus involutus* a *Pisolithus tinctorius* produkovala auxin IAA, který podporoval tvorbu kořenů a dichotomické větvení u *P. sylvestris* účinněji než syntetický analog auxinu IBA (Niemi a kol. 2002). *Hebeloma cylindrospora* mutantní v nadprodukcii IAA podporovala ektomykorhizní aktivitu (počet mykorhiz na rostlinu) u *Pinus pinaster*. Tento jev nebyl způsoben celkovým zvýšením počtu kořenů; ten zůstal stejný jako u varianty s divokým typem *H. cylindrospora*. Vliv houbového auxinu tedy nespočívá v „pouhém“ navýšení počtu kořenů potenciálních pro ektomykorhizu;

důležitý je také účinek dalších látek přítomných v houbovém exudátu (Gay a kol. 1994). V určitém stadiu vývoje ektomykorhizy tedy EcM houby produkují látky podporující růst kořenů. Růst kořene však musí být v pozdějších fázích vývinu ektomykorhizy potlačen. V nízkých koncentracích auxiny podporují tvorbu meristémů a růst kořenů, ve vyšších je mohou naopak potlačovat. Předpokládá se, že koncentrace auxinů v kořeni obaleném hyfovým pláštěm již na jeho růst působí inhibičně (Tagu a kol. 2002). Byly identifikovány i další látky, kterými EcM houby inhibují růst kořene v ektomykorhize: v přítomnosti hostitelské rostliny *Eucalyptus* docházelo v myceliu *Pisolithus* k akumulaci hypaphorinu, tato látka měla pak na rostlinu efekt opačný k IAA – redukovala apikální růst kořenů hostitelské rostliny a omezovala tvorbu kořenového vlášení (Beguiristain a Lapeyrie, 1997). Hypaphorin způsoboval reorganizaci cytoskeletu u *Eucalyptus globulus* – agregaci aktinových filament v apikální oblasti buňky - a tím pravděpodobně zamezil polárnímu transportu vezikulů do apikální části buněk. Exogenní aplikace IAA obnovila původní podobu aktinového cytoskeletu a následně došlo k obnovení růstu (Ditengou a kol. 2003). Hypaphorin tak může sloužit k regulaci apikálního růstu u funkční ektomykorhizy a k zabránění vzniku kořenových vlásků z epidermálních buněk.

Kořenová špička je kolonizována hyfami z půdy nebo (v dospělém kořenovém systému) jsou nově vyvíjející se kořeny kolonizovány hyfami z již kolonizovaných špiček (Wilcox 1968). Hyfy penetrují kořen v oblasti kořenové čepičky, prorůstají k epidermálním buňkám a rozvolňují je. Na povrchu epidermálních buněk se hyfy větví a vytváří vícevrstevnatý útvar – hyfový plášť (Horan a kol.



Obr. 1: Schématické znázornění Hartigovy sítě (HS) a hyfového pláště (P). BS: buněčná stěna, úsečka odpovídá 50µm. Převzato z Peterson a Massicotte 2004.



1988, Martin a kol. 2001). Mezi buňkami epidermis a primární kůry vzniká Hartigova síť (Obr. 1).

Rostliny reagují na přítomnost cizorodého organismu „imunitní“ reakcí, která je v některých rysech podobná imunitní reakci živočichů. Schopnost vnímat ne-sebe („nonsself recognition systems“) je společná všem eukaryotům (Nurnberger a kol. 2004). Tato reakce může mít hypersenzitivní podobu lokalizované programované buněčné smrti, nekrózy. Reakce může být spuštěna obecnými elicitory - houbovými produkty a také produkty degradace buněčné stěny rostliny. Chitotetraosa, koloidní chitin a další elicitory z buněčné stěny EcM *Hebeloma crustuliniforme* spouštěly v buňkách *Picea abies* kultivovaných v suspenzní kultuře řadu reakcí: výtok  $K^+$  a  $Cl^-$  z buňky, fosforylaci některých proteinů, alkalizaci extracelulárního prostředí a produkci  $H_2O_2$ . Tyto příznaky jsou podobné reakcím rostliny na nekompatibilní patogeny (Salzer a kol. 1997). Pro vytvoření ektomykorhizy je však nutné, aby byla hypersenzitivní reakce hostitelské rostliny na potenciálního houbového symbionta potlačena. Ve výše zmíněném pokusu s *P. abies* a *H. crustuliniforme* byla intenzita reakce snížena štěpením elicitorů apoplastickými chitinázami *P. abies* (Salzer a kol. 1997). Při tvorbě ektomykorhizy je tak pravděpodobně dostupnost elicitorů pro jejich receptory omezená, protože jsou v apoplastickém prostoru štěpeny na „neviditelné“ monomery. Dalšími látkami, které tlumí reakci hostitelských rostlin na elicitory hub, jsou auxiny. Buňky *P. abies* pěstované v suspenzní kultuře akumulovaly v buněčných stěnách peroxidázy v reakci na přidání elicitorů pocházejících z *H. crustuliniforme* (EcM houba kompatibilní s *P. abies*), *Suillus variegatus* (EcM houba nekompatibilní s *P. abies*) a *Heterobasidion annosum* (patogen *P. abies*). Akumulace peroxidáz byla snížena na mediích obsahujících auxin (Mensen a kol. 1998). Autoři navrhují model, podle kterého auxiny produkované EcM houbami snižují, zpozdí propojení makromolekul buněčných stěn katalyzované peroxidázami a tudíž umožní hyfám kolonizovat apoplastický prostor primární kůry. Hypotézu, že IAA tlumí reakci hostitelské rostliny na elicitory houby, potvrzuje práce Sylvie Herrmann a kol. (2004): V systému *Quercus robur-Piloderma croceum*, charakteristickém dlouhým pre-mykorhizním stadiem, byla urychlena tvorba mykorhiz

přidáním IAA nebo aktivním uhlím o cca 4 týdny. Aktivní uhlí adsorbuje látky, které mohou inhibovat vznik mykorhiz – pravděpodobně snižuje množství houbových elicitorů, čímž tlumí obrannou reakci hostitelské rostliny.

Kontakt mezi hynou a rostlinou je vlastně kontaktem jejich buněčných stěn. Charakter apoplastického prostoru ve vytvořené mykorhize se liší od apoplastického prostoru nekolonizovaného kořene, většina jeho složek pochází z metabolismu EcM houby. Buněčné stěny hyn se mění již v pre-mykorhizní fázi: charakter buněčné stěny *Laccaria bicolor* se měnil v přítomnosti hostitelské rostliny *P. abies*, polysacharidová vlákna byla orientována v pružích a asociována s proteiny bohatými cysteinem. Při průniku do primární kůry vytvářely hyny mezi sebou sacharidové pojivo a jejich buněčné stěny se asociovaly s buněčnými stěnami kořene. Po aplikaci inhibitoru transportu auxinu TIBA k výše zmíněným jevům nedocházelo, hyny nekolonizovaly kořen, nedošlo k vytvoření Hartigovy sítě (Rincón a kol. 2001). Autoři předkládají hypotézu, podle níž aplikace TIBA zabránila transportu auxinu produkovaného houbou do kořene. Potom by auxin hrál roli v produkci rostlinných elicitorů vyvolávajících přizpůsobení buněčných stěn hyn, nebo nedostatek transportu auxinu způsobuje, že rostlina nerozpozná houbu jako potenciálního symbionta, nýbrž jako patogena. Pokračuje tudíž v obraně proti napadení patogenem popsané výše (Salzer a kol. 1997).

### 3.1.2. Expres genů účastnících se tvorby EcM

Výše popsané morfologické a biochemické změny kořenů a hyn mají základ ve změně regulace genové exprese při tvorbě ektomykorhizy. Doposud nebyly identifikovány žádné mykorhizně specifické geny, tvorby mykorhizy se účastní geny ze stávajících metabolických drah (Duplessis a kol. 2005). Úroveň transkripce jednotlivých genů houby i rostliny se však při tvorbě ektomykorhizy výrazně liší od nesymbiotických podmínek. Le Quéré a kol. (2005) popsali odlišnou expresi 251 z 1075 sledovaných houbových a 138 z 1074 sledovaných rostlinných genů při tvorbě ektomykorhizy mezi

*Betula pendula* a *Paxillus involutus*. Jako referenční vzorek sloužilo volně rostoucí mycelium *P. involutus* a nekolonizované semenáčky *B. pendula*.

Krueger a kol. (2004) použili systém *Quercus robur* – *Piloderma croceum* charakteristický pozdní tvorbou mykorhizy (Herrmann a kol. 1998) k identifikaci pre-mykorhizních genů - genů účastnících se komunikace mezi houbou a rostlinou před vytvořením mykorhizy. U semenáčků *Q. robur* popsali zvýšenou expresi genu pro protein homologní k feromonovému receptoru kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Arabidopsis thaliana*, zvýšenou expresi genu pro methallothienuin. Methallothienuin se v kořenech akumuluje v reakci na stres; tento protein byl popsán u dalších interakcí rostlina – houba (Johansson a kol. 2004). Podle autorů (Krueger a kol. 2004) může jeho akumulace předcházet růstu laterálních kořenů. Další geny, jejichž exprese byla zvýšená v přítomnosti houby, byly geny pro formát dehydrogenázu (protein účastnící se odpovědi na stres) a geny pro inhibitory apoptózy - rev interagující protein a serin karboxypeptidázu. Reakce na přítomnost potenciálního symbionta je tedy podobná reakci na stres, dochází k podpoření větvení a růstu kořene hostitele; aby mohlo dojít k vytvoření Hartigovy sítě, exprimují se geny zabraňující apoptóze (Krueger a kol. 2004).

V systému *Eucalyptus globulus bicostata* – *Pisolithus microcarpus* sledovali Duplessis a kol. (2005) expresi genů v průběhu tvorby ektomykorhizy. V rané fázi (4 dny po kontaktu) docházelo v hyfách ke zvýšené expresi genů buněčné stěny: geny pro hydrofobiny a mannoproteiny. Na konstitutivní úroveň exprese se výše zmíněné geny vrátili ve zrající ektomykorhize (12 a 21 dní po kontaktu). Zvýšená exprese genů pro zmíněné proteiny svědčí o jejich úloze v adhezi na rostlinnou buněčnou stěnu. V pozdějších stádiích vývoje ektomykorhizy (7 – 12 dní po kontaktu) byla v hyfách zvýšená exprese genů pro enzymy glykolýzy (hexokináza, pyruvát kináza), enzymy Krebsova cyklu (citrát syntáza, izocitrát dehydrogenáza), enzymy mitochondriálního elektron transportního řetězce (NADH dehydrogenáza, F<sub>0</sub> F<sub>1</sub> ATPázy). Zvýšená úroveň transkripce těchto genů svědčí o celkové stimulaci katabolických drah, které dodávají energii a metabolity pro generování turgorového tlaku nutného pro růst hyf v apoplastickém prostoru hostitele a pro růst hyf jako takový. Docházelo k akumulaci

arabitolu a erythritolu, které pravděpodobně fungují jako osmotikum (Duplessis a kol. 2005).

V rostlinných pletivech se v rané fázi kolonizace exprimovaly geny účastníci se odpovědi na přítomnost patogena („hypersensitive-induced response“ proteiny a PR proteiny („pathogenesis related“)), zvýšila se exprese enzymů zajišťujících obrat proteinů v buňce (např. ubiquitin). 12 dní po kontaktu pozorovali autoři zvýšenou expresi genu pro cholin-P cytidylyl-transferázu, což je klíčový enzym v biosyntéze fosfatidylcholinu. Sníženou expresi vykazovaly v pozdním stadiu ektomykorhizy geny pro „abscisic stress“ proteiny (indukované vodním stresem), houbový symbiont pravděpodobně tedy 12 dní po kontaktu houba – rostlina usnadňoval příjem vody do kořenů.

Morel a kol. (2005) porovnávali expresi genů v extraradikálním myceliu a ektomykorhize *Paxillus involutus* – *Betula pendula* a pozorovala rozdílnou expresi u 65 genů. Exprese houbového homologu genu pro fosfatidilserin dekarboxylázu byla zvýšená v ektomykorhize 24krát oproti extraradikálnímu myceliu, kde byla téměř nedetekovatelná. Geny pro transportéry močoviny a sperminu byly naopak přibližně 5krát více exprimovány v hyfách extraradikálního mycelia. Fosfatidilserin dekarboxyláza má klíčovou úlohu v metabolismu fosfolipidů (Voelker 1997). Podle Morel a kol. (2005) souvisí zvýšení exprese tohoto genu v mykorhize se zvětšováním povrchu membrán symbiotického rozhraní, což je v souladu se zvýšenou expresí genu pro cholin-P cytidylyl-transferázu v práci Duplessis a kol. (2005). Zvýšená exprese genů pro transportéry močoviny a sperminu může ulehčovat přenos dusíkatých látek z půdy do hostitelské rostliny skrze extraradikální mycelium. V ektomykorhize byla také zvýšená exprese houbových genů pro ribozomální proteiny, což souvisí s přestavbou buněčných struktur nutných pro funkční ektomykorhizu.

V počátečních stádiích tvorby ektomykorhizy v systému *B. pendula* – *P. involutus* byla zvýšená exprese rostlinných genů pro vyvíjení reaktivních forem kyslíku („reactive oxygen species“), genů pro hypersenzitivní reakci a genů pro proteiny reakce na patogena (PR proteiny). Součástí obrany proti napadení patogenem je zvýšení obsahu fenolických látek v buněčných stěnách: v počátečních stádiích vývoje ektomykorhizy

byla zvýšená exprese pro homolog genu *A. thaliana* caffeoyl-CoA O-metyl-transferázu – enzymu účastnícího se syntézy ligninu a genu pro homolog dirigent proteinu *A. thaliana*. Tento protein se také účastní biosyntézy ligninu. V pozdějších stádiích vývoje byl patrný pokles exprese genů pro proteiny související s vodním stresem, což podle autorů souvisí s funkcí hyfového pláště jako ochrannou kořene před vodním stresem.

V houbových pletivech bylo pozorována zvýšená exprese genů pro proteiny respiračního řetězce po celou dobu vývinu ektomykorhizy související s vysokými energetickými nároky formování houbového pláště a Hartigovy sítě. Dále byla v počátečním období pozorovaná snížená exprese genů pro proteiny cytoskeletu. Autoři tento jev vysvětlují změnou charakteru a intenzity růstu oproti volně rostoucím myceliím (Le Quéré a kol. 2005).

Z uvedených příkladů lze tedy zobecnit, že při tvorbě ektomykorhizy se v hyfách v období tvorby hyfového pláště a Hartigovy sítě exprimují geny pro proteiny buněčné stěny nutné k adhezi na povrchy hostitele, dále proteiny katabolických drah (součásti metabolismu cukrů, proteiny mitochondriálního respiračního řetězce) nutné pro přestavbu hyfových struktur a jejich růst. Hyfy Hartigovy sítě obsahují mnoho mitochondrií a rozsáhlé endoplazmatické retikulum, což svědčí o jejich vysoké metabolické aktivitě (Tagu a kol. 2002). Rostlina zpočátku reaguje na přítomnost houby stejně jako na přítomnost patogena, dochází ke zvýšené expresi PR proteinů. Tato odpověď je však přechodná a v pozdějších fázích formování ektomykorhizy je potlačena. Dále dochází ke zvýšené expresi genů účastnících se metabolismu fosfolipidů, nutných k přestavbě membrán. V pozdějších stádiích dochází ke snížení exprese genů souvisejících s vodním stresem.

### 3.1.3. Výměna látek mezi kořeny hostitele a EcM houbami

V ektomykorhize dochází mezi oběma partnery k výměnně látek: rostlina dodává energeticky bohaté uhlovodíky, houba vodu, aminokyseliny a minerální živiny.

Přítomností houbového symbionta v kořeni stoupá síla sinku kořene, zvyšuje se poptávka po fotoasimilátech. Rychlost asimilace uhlíku rostlinou je mj. řízena silou sinků (Nehls a kol. 2001b). Pro danou rostlinu je charakteristický poměr C/N (a poměr C/minerálním živinám), dochází-li proto ke konstantnímu odběru uhlíkatých fotoasimilátů, může dojít ke zvýšení rychlosti asimilace aniž by byl narušen vhodný poměr C/N. V systému *Quercus robur-Piloderma croceum* byl pozorován pozitivní vliv houby na tvorbu postranních kořenů a zvětšení specifické listové plochy u hostitele ještě před vytvořením funkční ektomykorhizy, tj. před tvorbou hyfového pláště a Hartigovy sítě. Zvýšení specifické listové plochy pravděpodobně souviselo s tím, že mycelium mykobionta působilo jako silný sink pro fotoasimiláty již před vytvořením Hartigovy sítě a hyfového pláště (Herrmann a kol. 1998, 2004). Vyvíjející se a mladé ektomykorhizy jsou nejsilnějším sinkem pro fotoasimiláty. Cairney a kol. (1989) porovnávali alokaci fotoasimilátů do kořenů EcM a nemykorhizních rostlin *Eucalyptus pilularis* pomocí radioaktivně značeného CO<sub>2</sub>. Poměr v kořenech alokovaného C<sup>14</sup> byl 18,8:1 ve prospěch EcM rostlin. Nejsilnějšími sinky byly ektomykorhizy mladé, ektomykorhizy starší 90 dnů jako sink nepůsobily.

Houbový symbiont získává látky z apoplastického prostoru rostliny. Hlavním transportním cukrem u rostlin je sacharóza, EcM houby ji však neumějí využívat jako zdroj energie a uhlíku (Salzer a Hager 1991). Předpokládá se, že sacharóza je v apoplastu hydrolyzována kyselými invertázami rostlinného původu na hexózy – glukózu a fruktózu (Salzer a Hager 1991, Schaeffer a kol. 1995). Tento model podporuje i pozorování, ve kterém byla v ektomykorhize *Eucalyptus globulus* – *Pisolithus tinctorius* alokace C<sup>13</sup> do sacharózy snižena o 50% oproti neinokulovaným semenáčkům (Martin a kol. 1998). Aby mohly EcM houby vytvářet sink pro uvolněné hexózy, musí je účinně transportovat z apoplastického prostoru a zabudovávat je do produktů svého metabolismu. Nutnou podmínkou pro získávání hexóz z apoplastu je transportní systém. U EcM hub byly doposud identifikovány dva geny pro transportéry hexóz: *AmMstI* z *Amanita muscaria* (Nehls a kol. 1998) a zatím nepojmenovaný transportér u *Paxillus involutus* autory Le Quére a kol. (2005). Exprese obou dvou genů byla zvýšená v ektomykorhize oproti volně rostoucímu myceliu, v ektomykorhizách *Amanita*

*muscaria*-*Populus tremula* byla v hyfách Hartigovy sítě exprese genu *AmMst1* 6krát vyšší než v hyfách pláště (Nehls a kol. 2001a). Transportované hexózy jsou zabudovávány do houbového metabolismu např. v podobě polyolů, arabitolu, erythritolu, trehalozy, glykogenu. Trehalóza slouží jako krátkodobá a glykogen jako dlouhodobá zásoba C a energie (Martin a kol. 1998, Nehls a kol. 2001b). Možností, jak může hostitelská rostlina regulovat množství uhlíku alokovaného do houbového symbionta, je více: regulace syntézy fotoasimilátů, regulace exportu sacharózy z floému, regulace štěpení sacharózy v apoplastu kyselými invertázami a regulace transportu hexóz z apoplastu do rostlinných buněk (Nehls a kol. 2001b). Jedním z možných vysvětlení regulace alokace uhlíku mezi rostlinou a EcM houbou je tedy kompetice o hexózy v apoplastickém prostoru ektomykorhizy. Expresse rostlinných genů pro transportéry hexóz byla v ektomykorhize *Betula pendula* – *P. involutus* snížena oproti nemykorhizním rostlinám (Wright a kol. 2000). Odlišný výsledek získali Grunze a kol. (2004): v ektomykorhize *P. tremula* – *A. muscaria* byla exprese dvou rostlinných transportéru hexóz také snížena avšak exprese dalšího 12krát zvýšena oproti nemykorhizním rostlinám. Podle autorů zvýšení exprese tohoto genu zvýšilo schopnost rostlinných buněk kompetovat o apoplastické hexózy. Snížená exprese genů pro transportéry hexóz v práci Wright a kol. (2000) nevyvrací tuto teorii, autoři nemuseli postihnout zvýšení exprese jiných transportérů.

Kromě hexóz získávají EcM houby z hostitelských rostlin také lipidické látky, což dokládá práce Laczko a kol. (2004). Spektrum lipidických látek přítomných ve volně rostoucím myceliu *Pisolithus tinctorius* se lišilo od mycelia rostoucího z ektomykorhizy *P. tinctorius* – *Pinus sylvestris*; hyfy spojené s ektomykorhizou obsahovaly lipidy charakteristické pro *P. sylvestris*.

Jednou z nejstudovanějších minerálních živin dodávanou EcM houbami hostitelským rostlinám je dusík. Dodnes však není zcela vysvětleno, které látky fungují v jeho přenosu, zda organické či anorganické, ani jaká část asimilovaného N je dodávána houbovým symbiontem. Podle tradičního pohledu hrají úlohu v přenosu N z hyf v půdě do hyf Hartigovy sítě a posléze do buněk kořenů aminokyseliny, především glutamin. Tradiční model podporuje například práce Nasholm a kol. (1998): dvojitě značená



aminokyselina glycin ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) byla injikována do půdy a poté detekována v kořenech *Picea abies* (a také *Vaccinium myrtillus* a *Deschampsia flexuosa*), pro tento jev však existuje více vysvětlení než přímý přenos aminokyselin z houby do kořene (Selle a kol. 2005).

Nový model přisuzuje úlohu v přenosu N v apoplastickém prostoru ektomykorhizy amonnému iontu <sup>1</sup>(Govindarajulu a kol. 2005, Selle a kol. 2005, Chalot a kol. 2006). Export z hyf by měl probíhat pomocí difuze  $\text{NH}_3$  či pomocí transportu  $\text{NH}_4^+$  přenašečovými proteiny či vezikulární exkrecí (Chalot a kol. 2006). Reasimilace amonného iontu z apoplastu buňkami kořene je aktivní proces, rostlina disponuje mechanismy pro příjem amonného iontu z prostředí. Kapacita pro příjem amonného iontu z apoplastu se zvyšuje při EcM asociaci: Selle a kol. (2005) sledovali expresi vysokoafinitního transportéru amonného iontu v kořenech *Populus tremula* a pozorovali její zvýšení při EcM asociaci s *Amanita muscaria*. Nový model podporuje i fakt, že arbuskulárně mykorhizní houby exportují při mykorhizní asociaci amonný iont do apoplastu (Govindarajulu a kol. 2005). Chalot a kol. (2006) navrhují jako možný model také syntézu obou předchozích: upřednostňovaný způsob transportu N může záviset na dostupnosti C, při jeho vysoké dostupnosti budou syntetizovány aminokyseliny, při nízké dostupnosti bude jako přenašeč N fungovat amonný iont.

EcM houby dále dodávají svým hostitelským rostlinám P, K, Ca, Mg (Marschner a Dell 1994, Chalot a kol. 2002).

Přes vysoký obsah v půdě je fosfor často pro rostliny prvek nedostupný. EcM houby jeho dostupnost pro rostliny zvyšují, mají schopnost P enzymaticky vyvazovat z organických sloučenin (Chalot a kol. 2002). V pokusu Jentschke a kol. (2001) představoval P dodaný EcM houbou *Paxillus involutus* P deficientním semenáčkům *Picea abies* 52% celkového příjmu P; v podmínkách, kdy je P limitujícím prvkem, může být jeho přenos myceliem EcM houbovým symbiontem zcela zásadní.

---

1 Nový model je z pohledu našeho projektu závažný v tom smyslu, že na rozdíl od tradičního nepředpokládá spolu s přenosem N z houby do kořene také přenos uhlíkatých skeletů aminokyselin. Zkoumat přenos C mezi potenciálními EcM hostitelskými rostlinami a ErM rostlinami je však jedním z cílů našeho projektu.



### 3.1.4. Podmínky vzniku a trvání EcM

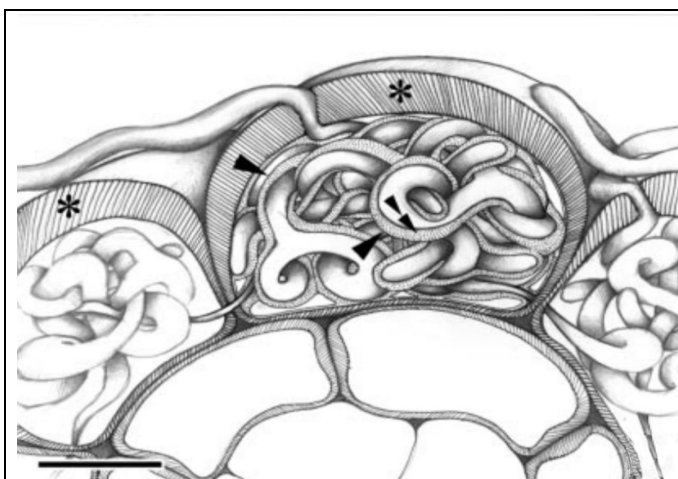
V předchozích oddílech byl popisován vznik ektomykorhizy z biochemické a genetické stránky, byl popsán přenos látek mezi hostitelskou rostlinou a houbovým symbiontem. Jaké jsou podmínky, za kterých ektomykorhiza vznikne?

EcM špička si pravděpodobně svou funkčnost nezachovává příliš dlouho (Cairney a kol. 1989). Množství fotoasimilátů alokovaných do houbového partnera, a na druhé straně množství látek předaných houbou, tak může být řízeno dynamikou vzniku EcM špiček. Regulace genetických programů houbového symbionta vedoucích k tvorbě ektomykorhizy je řízená mj. nabídkou hexóz v apoplastickém rozhraní. Při nižší než prahové nabídce tak tyto genetické programy nejsou spuštěny. Houbový symbiont si touto cestou „zajišťuje výhodné podmínky“. Vyšší dostupnost N pro rostlinu může mít podobný efekt, protože sinku Hartigovy sítě budou konkurovat růstové sinky rostliny (podle Hampp a kol. 1999). Nabídka sacharidů rostlinou je tak jedním z rozhodujících faktorů pro vznik ektomykorhizy. Jednou z prací potvrzujících tuto hypotézu je práce Sylvie Herrmann a kol. (2004). Semenačky *Quercus robur* byly vystaveny stresu, jejich růst a fyziologické parametry byly zlepšeny inokulací EcM houbou *Piloderma croceum*. *P. croceum* je charakteristická pozdní tvorbou mykorhizy; pokud byla tvorba mykorhiz urychlena dodáním IAA nebo aktivního uhlí, pozitivní vliv na růstové a fyziologické parametry se vytrácel. Autoři vyvozují, že umělým urychlením vzniku mykorhiz byly vyčerpány C zdroje hostitelských rostlin. Za nemanipulovaných podmínek EcM asociace vznikala pouze u kořenů s dostatečnou zásobou C. V systému *Betula pendula* – *Paxillus involutus* byl zkoumán vliv defoliace a vysokého obsahu živin v substrátu na alokaci  $^{14}\text{C}$  z rostliny do houby a  $^{15}\text{N}$  z houby do rostliny (Kytoviita 2005). Defoliace snížila příjem  $^{15}\text{N}$  zprostředkovaný *P. involutus*, koncentrace  $^{14}\text{C}$  v mimokořenovém myceliu korelovala s koncentrací  $^{15}\text{N}$  v prýtu *B. pendula*. Koncentrace  $^{14}\text{C}$  v kořenech *B. pendula* nebyla defoliací ovlivněna. Z výsledků vyplývá, že defoliace snížila dostupnost asimilátů pro EcM symbionta, ne však pro buňky kořene. Vlivem snížené dostupnosti C se snížil i transport N do hostitelské rostliny.

### 3.2. Erikoidní mykorhiza

Erikoidní mykorhizu (ErM) tvoří rostliny z čeledi Ericaceae (vřesovcovitých). Úroveň poznání fungování ErM je přes velkou rozšířenost vřesovcovitých rostlin, pravděpodobně vzhledem k jejich nevelké hospodářské významnosti, výrazně nižší než poznání EcM asociace. Vivienne Gianinazzi-Pearson v roce 1986 napsala, že „ultrastruktura ErM byla již dobře popsána, ale o buněčných základech specificity ErM a procesu určování kompatibility a rozpoznávání symbiontů není známo nic“ (Gianinazzi-Pearson a kol. 1986). Úroveň vědomostí zůstává do dnešní doby v podstatě stejná. Výzkum v této oblasti však možná zaznamená rozvoj kvůli bioremediačním schopnostem erikoidně mykorhizních rostlin (např. Sharples a kol. 2000).

Rostliny z čeledi *Ericaceae* mají zvláštní typ kořenů: tzv. vlasové kořeny, které jsou charakteristické pro ErM (Obr. 2). Jejich primární kůra často sestává z jedné vrstvy buněk, které v některých případech během vývoje kolabují, kořenové vlásky nejsou přítomné, epidermální buňky jsou v místě, kde by u běžných kořenů bylo kořenové



Obr. 2: Schématické znázornění vlasového kořenu rostlin z čeledi *Ericaceae* a smotků hyf typických pro erikoidní mykorhizu. Hvězdička: ztlustlá vnější stěna epidermální buňky; šipka: rostlinná buněčná membrána obalující hyfy; dvojitá šipka: interfaciální matrix. Úsečka odpovídá 25  $\mu\text{m}$ . Převzato z Peterson a Massicotte 2004.

vlášení, zvětšené a vyplněné hyfami hub. Tento typ kořene poprvé popsal McLennan v roce 1935. Funkci kořenového vlášení přebírá mycelium mykobionta; v přírodě jsou vlasové kořeny takřka vždy kolonizovány houbami. ErM postrádá specializované struktury (analogy Hartigovy sítě či arbuskulí), kolonizující hyfy jsou oddělené od rostlinných buněk membránou a interfaciální matrix, vytvářejí v nich smyčky a smotky (Bonfante-Fasolo a Gianinazzi-Pearson 1979).

### 3.2.1. Vznik a fungování ErM

ErM byla donedávna považována za mykorrhizu s vysokou specificitou houba – rostlina mezi několika rody rostlin z čeledi *Ericaceae* a několika rody hub náležící mezi *Ascomycetes*. S přibývajícím poznáním a používáním molekulárně genetických nástrojů však tento pohled přestává platit, spektrum hostitelských rostlin pro ErM houby je širší než se předpokládalo (Perotto a kol. 2002); *Rhizoscyphus ericae*<sup>2</sup> infikoval kořeny jätrovek a houby izolované z rhizoidů těchto rostlin tvořily ErM v kořenech vřesovcovitých rostlin (Duckett a Read 1995). Přesto vznik ErM musí být výsledek komplexní komunikace a vzájemné regulace mezi houbou a rostlinou. Podobně jako u ektomykorrhizy je pro vznik ErM nutný tropismus hyf ke kořeni, vzájemné rozpoznání symbiontů a adheze hyf na povrch kořene, jeho penetrace a kolonizace a vzájemná regulace partnerů symbiózy.

V literatuře jsem nenašel práci zabývající se látkami odpovědnými za tropismus ErM hub ke kořeni potenciální hostitelské rostliny. Berta a Gianinazzi-Pearson (1986) navrhli hypotézu, že podpoření růstu hostitelských rostlin ErM mykobionty je způsobené produkcí IAA, jeho produkce myceliem *R. ericae* byla pozorována po přidání tryptofanu (Gay a Debaud 1986, čerpáno z Villarreal-Ruiz 2004).

Za adhezi hyf na povrch kořene je dle literatury zodpovědná extracelulární fibrilární pochva odvozená od buněčné stěny houby. Byla nalezena korelace mezi schopností infikovat kořen hostitele a velikostí produkované fibrilární pochvy. Tato pochva obsahuje glukózu, manózu, N-acetylglukosamin, polysacharidy, mukopolysacharidy, glykoproteiny; výskyt chitinu je omezen na vnitřní stranu buněčné stěny hyf (Gianinazzi-Pearson 1986, Gianinazzi-Pearson a kol. 1986). Při porovnávání jejího složení mezi kmeny s vysokou a nízkou infektivitou byly nalezeny rozdíly například v obsahu cukerných zbytků manózy. Buněčná stěna hyf a fibrilární pochva vykazují vysokou aktivitu kyselých fosfatázy a kyselých invertázy, což jsou vysoce manózu

---

2 *Rhizoscyphus ericae*, syn. *Hymenoscyphus ericae*, *Pezizella ericae*. V této práci používám v současné době přijímaný název *Rhizoscyphus ericae*

glykosylované proteiny. Korelace obsahu manózy a míry infekitivity jednotlivých kmenů však nebyla úspěšná (Straker 1996).

Fibrilární pochva však není výlučnou vlastností ErM hub, samotná její přítomnost tedy nevysvětluje mechanismus kolonizace kořene hostitele (Straker 1996). Hyfy *R. ericae* vytvářely tuto pochvu jak při extracelulární kolonizaci potenciálního hostitele tak při extracelulární kolonizaci nekompatibilních semenáčků *Trifolium pratense*. Při intracelulární kolonizaci kompatibilních erikoidních hostitelů docházelo k vymizení této pochvy, kdežto při kolonizaci buněk *Trifolium* pochva zůstávala. V ErM kompatibilním hostiteli docházelo ke zmnožení počtu organel a nárůstu relativního objemu cytoplazmy kolonizovaných buněk, což je známka metabolické aktivity těchto buněk. V nekompatibilním *Trifolium* naopak kolonizované buňky odumíraly. Hyfy v ErM jsou vždy odděleny membránou od obsahu buňky hostitele (Bonfante-Fasolo a kol. 1984).

Adhezi hyf na kořen musí zajišťovat také jeho povrch: apikální části vlasových kořenů vřesovcovitých rostlin jsou potaženy slizovitým obalem vytvářeným  $\beta$ 1,4 glukany, N-acetylglukosaminem, xylózou, arabinózou, ramnózou. Buněčné stěny kořenů vřesovcovitých rostlin se liší složením od buněčných stěn jiných vyšších rostlin – neobsahují fukózu a polygalakturonovou kyselinu (Peretto a kol. 1990, Straker 1996). V buněčných stěnách epidermálních buněk vlasových kořenů *Woollisia pungens* byly detekovány  $\beta$  glukany, šroubovicová forma celulózy, galaktózové postranní řetězce, nebyl detekován žádný protein a na rozdíl od buněk stéle a primární kůry v nich nebyly detekovány pektiny (Briggs a Ashford 2001). Absence pektinů v buněčných stěnách také odlišuje epidermální buňky vlasových kořenů od buněk ostatních vyšších rostlin (Perotto a kol. 1995).

Hyfy penetrují ztlustlé epidermální buňky hostitele součinností enzymatických procesů a fyzikálního tlaku. ErM houby disponují enzymy k rozvolňování buněčné stěny rostlin (např. polygalakturonázy), při kolonizaci kompatibilních hostitelů však nebyla pozorována jejich aktivita (Perotto a kol. 1995). Plazmatická membrána hostitele se zvětšuje a obklopuje invadující hyfy, její funkčnost však není snížena, při kolonizaci stále vykazuje ATPázovou aktivitu. Růst hyf v buňkách kompatibilního hostitele je regulován – hyfy zpravidla neprorůstají mezi buňkami, při kolonizaci klesá aktivita

kyselý fosfatázy hyf (Gianinazzi-Pearson a kol. 1986). Musí tedy docházet ke změně exprese genů obou partnerů symbiózy, avšak v literatuře jsem práci zabývající se diferenciální expresí genů v ErM nenašel.

Mezi plazmatickými membránami hyfy a rostliny vzniká apoplastické rozhraní, jehož složení se liší od složení buněčných stěn hyf i hostitelských rostlin. Nebyly v něm prokázány ani  $\beta$  1-4 glukany (složky buněčných stěn obou partnerů symbiózy) ani  $\beta$  1-3 glukany (složky houbové buněčné stěny), identifikovány byly pouze rhamnogalaktouronany (Perotto a kol. 1995, Peterson a Massicotte 2004).

Celkově lze tedy shrnout, že úroveň poznání mechanismů vzniku a fungování ErM je velmi nízká. Pro hypotézy neexistuje opora například v pracích porovnávajících expresi genů při tvorbě ErM a volně žijícího mycelia a hostitele nebo v pokusech s mutantními kmeny hub či rostlinami. Někteří autoři (Straker 1996) se domnívají, že mechanismus vzniku a fungování ErM a exprese genů by mohly být podobné arbuskulární mykorhize. Vlasové kořeny 4 druhů havajských *Vaccinií* měly typickou ErM, silnější kořeny (>1,5mm, přítomnost vyvinuté primární kůry) byly kolonizovány arbuskulárně mykorhizními houbami. Na základě tohoto pozorování Koske a kol. (1990) vyvozují, že schopnost tvořit arbuskulární mykorhizu u havajských *Vaccinií* přetrvala z dob arbuskulárně mykorhizního předka. Mechanismy pro tvorbu ErM se později vyvinuly z mechanismů tvorby arbuskulární mykorhizy.

### 3.2.2. Výměna látek v ErM

Původně byla ErM považována za digestivní typ mykorhizy, tzn. že přenos minerálních živin do hostitelských rostlin je zajišťován postupným trávením hyf vrůstajících do buněk kořene (např. Stribley a Read 1974a). Pozdější studie však tuto hypotézu nepodporují, naopak dokumentují již zmíněnou metabolickou aktivitu obou partnerů symbiózy (Bonfante-Fasolo a Gianinazzi-Pearson 1979, Bonfante-Fasolo a kol. 1984). Za digesce hyf pozorovanou v některých pracích je pravděpodobně zodpovědná sezónnost fungování ErM: ke konci léta a začátkem podzimu je přísun cukrů do kořenů nejvyšší, míra kolonizace kořenů stoupá a převládá biotrofní soužití hyf s kořeny. V zimě

a na jaře je přísun cukrů do kořenů omezen, hyfy pak rostou více nekrotrofně, v mrtvých buňkách (Bonfante-Fasolo a kol. 1981).

V ErM dochází tak jako v ostatních mykorhizách k výměně cukrů fotosyntetického původu za minerální živiny a vodu. Přenos  $^{14}\text{C}$  z rostlin *Calluna vulgaris* a *Vaccinium oxycoccus* do mimokořenového mycelia ErM hub byl prokázán Pearson a Read (1973). Přenos  $^{14}\text{C}$  z *Vaccinium macrocarpon* do ErM mykobionta byl také prokázán v práci Stribley a Read, 1974a. Rostliny fotosynteticky asimilovaly  $^{14}\text{CO}_2$ , který byl následně detekován v mykorhizních a nemykorhizních kořenech. V obou typech kořenů byly nejvýrazněji značeny glukózové polymery a sacharóza. Mykorhizní kořeny obsahovaly na rozdíl od nemykorhizních manitol a trehalózu, cukry houbového původu, dále obsahovaly větší množství značené manózy. Značení cukrů houbového původu prokazuje přenos fotoasimilovaného C do mykorhizního symbionta.

Jaká látka zajišťuje přenos C mezi symbionty u ErM? U EcM je transportním cukrem mezi rostlinou a houbou glukóza, sacharózu neumí EcM houby využívat jako zdroj C. *R. ericae* však sacharózu jako zdroj uhlíku využívat dokáže, navíc byla sacharóza detekována v jeho hyfách (Hughes a Mitchell 1995). Mechanismus transportu C mezi symbionty tak může být jiný než u ektomykorhizy a než u arbuskulární mykorhizy, kde transportními cukry jsou pravděpodobně také hexózy (Schubert a kol. 2004).

ErM kolonizovanost vlasových kořenů *Empetrum hermaphroditum*, *Andromeda polifolia*, *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium vitis-idaea* byla pozitivně korelována se zvýšením rychlosti fotosyntézy, které bylo dosaženo aplikací zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$ . Výsledky svědčí o tom, že ErM vzniká za takových podmínek, kdy rostlina poskytuje dostatečné množství asimilátů. Míra kolonizace pravděpodobně není negativně korelována s obsahem minerálních živin v půdě. Jinými slovy, rostlina vytváří ErM ve všech případech - „nekontroluje“ nejprve obsah minerálních živin v půdě. Na přirozených stanovištích vřesovcovitých rostlin je totiž často většina N vázána v organických sloučeninách, ke kterým nemají rostliny na rozdíl od ErM hub přístup (Olsrud a kol. 2004).

ErM umožňuje vřesovcovitým rostlinám využívat jako zdroj N organické látky. ErM

*Vaccinium macrocarpon* využívaly jako zdroj N jak amonný iont, tak aminokyseliny, semenáčky bez ErM pouze amonný iont (Stribley a Read, 1980). *R. ericae* využíval jako jediný zdroj N peptidy různých délek, získaný N předával ErM rostlinám *Vaccinium corymbosum* (Bajwa a Read, 1985). Dalším zdrojem N pro ErM houby a potažmo pro jejich hostitele je chitin: *R. ericae* využíval jako jediný zdroj N houbová mycelia a zvyšoval obsah N v hostitelských rostlinách *V. macrocarpon* a *Calluna vulgaris* (Kerley a Read 1997). Hyfy ErM hub tak zprostředkovávají dostupnost N i z půd, ve kterých je často největší část N vázána v organické formě (například na vřesovištích je hlavní část N přítomná v proteinech, v lesích s podrostem vřesovcovitých rostlin je hlavní část vázána v aminokyselinách), mycelium prorůstá větší objem půdy než kořeny rostlin (Smith a Read 1997, Nordin a kol. 2001). Skutečnost, že ErM houby dodávají N hostitelským rostlinám, prokázali Stribley a Read (1974b) v práci, kdy pěstovali *V. macrocarpon* v rašelinné půdě značené  $^{15}\text{N}$  síranem amonným. ErM rostliny obsahovaly nižší množství  $^{15}\text{N}$ , protože ErM houby dodávaly N pocházející z organických sloučenin, kdežto nemykorhizní rostliny využívaly jako zdroj dusíku amonný iont značený  $^{15}\text{N}$ .

Není známo, v jaké formě je N přenášen přes apoplastické rozhraní, nejpravděpodobnější je přenos amonného iontu nebo aminokyselin (Cairney a Ashford 2002). U EcM a arbuskulární mykorhizy je v poslední době za transportní molekulu N považován amonný iont (viz kapitola 3.1.3.).

### 3.3. DSE asociace (pseudomykorhiza)

DSE asociace (z angl. „dark septate endophytes“ podle tmavě zbarvených, melanizovaných hyf DSE mykobiontů; dříve označovaná jako pseudomykorhiza) zahrnuje rozmanitou skupinu interakcí, u nichž není zatím zcela zřejmý mykorhizní status. Vliv DSE hub na hostitelské rostliny se pohybuje od pozitivního po negativní (Jumpponen 2001). Intracelulární a intercelulární kolonizace je působena skupinou askomycetních hub, jejichž nejznámějším představitelem je *Phialocephala fortinii*. Přehled literatury zahrnující partnery, proces kolonizace a morfologii DSE asociací



podává diplomová práce Martina Vohníka (Vohník 2002). Úroveň poznání mechanismů fungování DSE a jejího genetického pozadí je ještě výrazně nižší než úroveň poznání u ErM. Její význam v ekosystémech je však podle Mandyam a Jumpponen (2005) srovnatelný s mykorhizními houbami. Z pohledu této diplomové práce je DSE důležitá z toho důvodu, že kolonizuje kořeny hostitelských rostlin náležících do různých mykorhizních skupin – EcM, ErM, arbuskulárně mykorhizní, a tím pádem má potenciál tyto rostliny spojovat prostřednictvím společného mycelia a regulovat tak dynamiku rostlinných komunit (Mandyam a Jumpponen 2005). Mezi rostliny běžně kolonizované *P. fortinii* patří například rody *Abies*, *Alnus*, *Fagus*, *Lupinus*, *Picea*, *Pinus*, *Potentilla*, *Salix*, vřesovcovité *Calluna*, *Cassiope*, *Empetrum*, *Gaultheria*, *Vaccinium*, *Rhododendron* (podle Vohník 2002).

### 3.4. Mykobionti EcM a ErM

V severských lesích a v lesích mírného pásu stromovému patru dominují jehličnany a podrostu často rostliny náležící do čeledi *Ericaceae* – *Vaccinium* sp., *Arctostaphylos* sp., *Calluna vulgaris*. Jehličnany tvoří EcM, která je charakteristická pro stromy a keře mírného pásu, pro stromy severských a tropických lesů. Mykobionty EcM jsou především bazidiomycety a některé askomycety. ErM je výsadou čeledi *Ericaceae*. Nejznámějším houbovým symbiontem ErM je askomycet *Rhizoscyphus ericae* (voskovička vřesovcová) a jeho anamorfa *Scytalidium vaccinii*. Dalším rozšířeným mykobiontem je hyfomycet *Oidiodendron maius*. ErM byla považována za nejspecifičtější typ mykorhizy.

Houby tvořící ErM a EcM byly vždy považovány za odlišné skupiny. Přestože EcM je tvořena i askomycety, byly převážně studovány bazidiomycety. V případě ErM byl jako modelový organismus studován a používán hlavně *R. ericae*, patřící mezi askomycety. V posledních zhruba 6ti letech došlo ke zmírnění vnímání ostrých hranic mezi těmito dvěma typy mykorhiz a to především díky molekulárně biologickým nástrojům sloužícím k identifikaci houbových symbiontů.



### 3.4.1. Bazidiomycety jako mykobionti ErM

Seviour a kol. (1973) pozorovali struktury připomínající ErM a přisoudili jejich původ bazidiomycetu: opakovaně pozorovali výskyt bazidiokarpů (údajně několik tisíc plodnic během 4 let) v bezprostřední blízkosti vřesovcovité *Azalea indica* (a také *Rhododendron* a *Erica*). Pomocí fluorescenčních protilátek prokázali, že intracelulární hyfy a hyfy tvořící plodnice jsou totožné a náleží bazidiomycetu *Clavaria* (česky kyjanka). Funkčnost této asociace prověřili v roce 1980 Englander a Hull, kteří zkoumali přenos  $^{14}\text{C}$  a  $^{32}\text{P}$  mezi bazidiokarpy *Clavaria* a vřesovcovitými rostlinami *Rhododendron* sp. a *Pieris japonica*.  $^{14}\text{C}$  aplikovaný na listy pomocí  $^{14}\text{CO}_2$  byl následně detekován v bazidiokarpech a  $^{32}\text{P}$  aplikovaný v podobě kapky roztoku  $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$  na bazidiokarp byl detekován v kořenech asociovaných rostlin.

Bonfante-Fasolo (1980) pozorovala současnou kolonizaci vlasových kořenů *Calluna vulgaris* askomycety a bazidiomycety. Askomycety tvořily klasickou ErM v buňkách epidermis, kdežto bazidiomycety kolonizovaly buňky primární kůry. Charakter této kolonizace připomínal ErM asociaci, kolonizované buňky zůstávaly živé. Bonfante-Fasolo používala k pozorování transmisní elektronovou mikroskopii; ve světelném mikroskopu nebyly oba typy kolonizace vzájemně rozlišitelné.

Smith a kol. (1995) pozorovali EcM špičky na kořenech vřesovcovitých rostlin *Gaultheria shallon*, *Rhododendron macrophyllum* zároveň s ErM. Kolonizace byla popsána jako typ *Rhizopogon* a typ *Telephora*.

Allen a kol. (2003) identifikovali bazidiomycety v kořenech *Gaultheria shallon* pomocí extrakce houbové DNA - nejčastější zjištěné kmeny příbuzné bazidiomycetu *Sebacina*. Houby rodu *Sebacina* jsou také běžnými mykobionty tvořící EcM (Urban a kol. 2003). Struktury připomínající ErM mohou být tedy kromě hub náležících do agregátu *R. ericae* tvořeny i některými bazidiomycety. Tato skutečnost byla však v minulosti přehlížena částečně kvůli náročné odlišitelnosti této kolonizace od klasické ErM a částečně kvůli horší kultivovatelnosti bazidiomycetů.

### 3.4.2. *Rhizoscyphus ericae* agregát jako mykobiont EcM

Vrålstad a kol. (2000) určovali mykorhizní symbionty *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Betula pubescens*, *Populus tremula*, *Quercus robur* a *Salix phylicifolia* v ektomykorhizních špičkách odpovídajících morfotypu *Piceirhiza bicolorata*<sup>3</sup>. K identifikaci mykobiontů použili jejich ITS sekvence („internal transcribed spacers“) ribozomální DNA. Jako mykobiont byla určena houba blízce příbuzná *R. ericae*. Piercey a kol. (2002) naznačili možné propojení EcM a ErM hostitelských rostlin *Rhododendron groenlandicum* a *Picea mariana* jejich souběžnou inokulací *R. ericae*, *Oidiodendron maius* a houbou označovanou jako variabilní bílý taxon („variable white taxon“ VWT, v roce 2005 pojmenována *Meliniomyces variabilis* (Hambleton a Sigler 2005)) pocházející z ErM hostitele. *R. ericae* a VWT hojně intracelulárně kolonizovaly buňky rhizodermis a primární kůry kořenů *P. mariana*; hyfy netvořily smyčky a prorůstaly mezi buňkami. V kořenech *R. groenlandicum* vytvářely hyfy *R. ericae* a *M. variabilis* (VWT) smyčky charakteristické pro ErM. Vrålstad a kol. (2002b) testovali schopnost 12ti kmenů náležících k *R. ericae* agregátu izolovaných z EcM a ErM rostlin re-kolonizovat kořeny EcM a ErM hostitelských rostlin. 5 kmenů pocházejících z EcM rostlin tvořilo EcM u *Betula pubescens*, *P. abies* a *P. sylvestris*. 3 kmeny pocházející z ErM rostlin tvořily ErM u *Vaccinium vitis-idaea*. Žádný z kmenů však netvořil EcM když pocházel z ErM hostitele a naopak žádný z kmenů netvořil ErM když pocházel z EcM hostitele. Autoři touto prací dokázali, že u agregátu *R. ericae* se vyvinula schopnost tvořit jak EcM, tak ErM, avšak neprokázali schopnost jednotlivých kmenů tvořit současně oba typy asociací. Piercey a kol. (2002) však namítají, že značný vliv na tvorbu EcM či ErM má také laboratorní prostředí, diametrálně se lišící od skutečných půdních podmínek; jinými slovy, neprokázání schopnosti tvořit oba typy asociací tuto možnost nevyvrací. V roce 2003 identifikovali Rosling a kol. mykobionty z kořenových špiček *P. abies* rostoucích v podzolovité půdě v severním Švédsku. Z kořenových špiček charakteristických černým hyfovým pláštěm (podobné *Piceirhiza bicolorata*) získali

3 *Piceirhiza bicolorata* je EcM morfotyp, značící dvojbarevnou černo – bílou mykorhizní špičku, popsanou u *Picea abies*; nevztahuje se ke konkrétnímu houbovému symbiontu nýbrž k morfologii kořenové špičky.

sekvence *Cenococcum geophilum* a *Cadophora finlandica*, syn. *Phialophora finlandica*<sup>4</sup>. *C. geophilum* bylo častěji přítomné ve špičkách pocházejících z organického horizontu kdežto *C. finlandica* ve špičkách z ostatních horizontů (především minerálního). Tento fakt naznačuje odlišnou funkci a ekologické preference obou mykobiontů v EcM kořenech *P. abies*.

Bergero a kol. (2000) prokázali, že EcM špičky *Quercus ilex* a kořeny *Erica arborea* rostoucí pod nimi sdílí stejné mykobionty. Izoláty z ErM rostlin netvořily v experimentálních podmínkách EcM u *Q. ilex*, kolonizace připomínala spíše ErM. Sekvence ITS rDNA ukázala na příbuznost s *R. ericae*.

Současná syntéza EcM a ErM jediným mykobiontem byla provedena v roce 2004 Villarreal-Ruiz a kol. Z EcM morfotypu *Piceirhiza bicolorata* izolovali mykobionta a pomocí sekvence ITS oblastí rDNA jej určili jako *Cadophora finlandica* náležící do agregátu *R. ericae*. Při *in vitro* syntéze tvořil tento mykobiont ektomykorhizy s kořeny semenáčků *P. sylvestris*. Vzniklé mykorhizy měly hyfový plášť, vyvinutou Hartigovu síť a morfologicky byly shodné s *Piceirhiza bicolorata*. Při inokulaci semenáčků *Vaccinium myrtillus* docházelo v epidermálních buňkách vlasových kořenů ke tvorbě útvarů charakteristických pro ErM. Autoři sledovali také vliv mykobionta na růst a morfologii hostitele: semenáčky *V. myrtillus* po 3 měsících růstu s mykobiontem nejevily známky poškození, jejich hmotnosti se nelišily od kontrolních rostlin, byla však 8krát zvýšená délka kořenů a 6krát počet kořenových špiček. O vlivu na růst *P. sylvestris* není v práci zmínka.

V roce 2005 byl VWT náležící do *R. ericae* agregátu pojmenován *Meliniomyces variabilis*, jeho mykorhizní status není dosud zcela objasněn (Hambleton a Sigler 2005). Vohník (osobní sdělení) opakovaně izoloval z EcM špiček šumavských *P. abies* kolonie hub náležejících do *R. ericae* agregátu: *C. finlandica*, *M. variabilis*.

EcM tvořícím askomycetům se v současnosti dostává více pozornosti. Tuto schopnost mají *Elaphomyces* z řádu *Eurotiales*, *Cenococcum* z řádu *Dothideomycetes*, již zmíněný komplex *R. ericae* z řádu *Helotiales* a *Tuber* z řádu *Pezizales* (z Tedersoo a kol. 2006).

---

4 *P. finlandica* byla přefazena do rodu *Cadophora* a v současné době se nazývá *Cadophora finlandica*; v této práci bude dále označována jako *C. finlandica* :(např. Villarreal-Ruiz a kol. 2004). Někdy se také používá označení *C. finlandia*.

Tedersoo a kol. (2006) pomocí sekvenací DNA popsali dalších 33 druhů hub náležících do řádu *Pezizales*, které tvoří EcM. Tyto houby kolonizovaly cca 5 % zkoumaných mykorrhizních špiček.

Lze tedy shrnout, že schopnost tvořit EcM není u askomycetů nijak výjimečná, např. *C. geophilum* je běžný EcM symbiont *P. abies*. V agregátu *R. ericae* se vyvinula schopnost tvořit jak EcM, tak ErM. Zdá se, že v tomto agregátu existují skupiny preferující EcM hostitele a jiné preferující ErM hostitele, *C. finlandica* dokáže tvořit oba typy asociací a to i současně. Překvapivost faktu, že *R. ericae* agregát má tuto schopnost, pramení hlavně z dřívějšího jednostranného zkoumání bazidiomycetů jako EcM symbiontů a *R. ericae* jako modelového organismu pro ErM. Oddělení obou odvětví také umožnila ta skutečnost, že výzkum ErM se soustředil především na vřesoviště a stanoviště s extrémními klimatickými podmínkami – místa, kde vřesovcovité rostliny dominují, kdežto výzkum EcM byl soustředěn na lesy.

Studium mykobiontů se v minulosti opíralo o identifikaci pomocí plodnic u EcM asociace a o izolaci mykobiontů z vlasových kořenů vřesovcovitých rostlin v případě ErM asociace. Ne všechny EcM asociované houby však tvoří nadzemní plodnice a schopnost být izolován se u různých ErM hub také liší. Allen a kol. (2003) identifikovali mykobionty z kořenů *Gaultheria shallon* pomocí izolace kolonií z vlasových kořínků a pomocí extrakce houbové DNA. Zatímco izolace určila jako nejčastější *R. ericae* a *Capronia* sp., při extrakci DNA byly nejčastější zjištěné kmeny příbuzné bazidiomycetu *Sebacina*.

### 3.5. Propojení EcM a ErM rostlin

Jelikož byla v laboratorních podmínkách prokázána současná kolonizace EcM a ErM rostlin, je možné tuto situaci očekávat i v přírodních podmínkách. Vrålstad a kol. (2002a) identifikovali mykobionty EcM morfotypu *Piceirhiza bicolorata* a vlasových kořenů vřesovcovitých rostlin. *C. finlandica* nejčastěji kolonizovala EcM hostitele, byl však nalezen její genotyp, který kolonizoval kořeny obou typů hostitelů. Tento fakt

mluví ve prospěch možnosti současné kolonizace ErM a EcM rostlin jedním mykobiontem v přírodních podmínkách.

Pokud by k ní docházelo, znamenalo by to fyzické propojení EcM a ErM rostlin a možný přenos látek, informačních molekul mezi nimi.

V přírodních podmínkách lesa může pravděpodobně docházet k přenosu látek mezi EcM symbionty. Finlay a Read (1986) pozorovali zvýšený přenos  $^{14}\text{C}$  mezi hostitelskými *Pinus sylvestris* vlivem přítomnosti EcM mycelia. Přenos byl navíc směřovaný od donora k akceptorovi – stínění rostlin pozitivně ovlivňovalo přísun  $^{14}\text{C}$  od nestíněných jedinců. Tento fakt podporuje představu, že dospělé EcM stromy slouží jako podpůrné stromy („nurse trees“) pro mladé semenáčky. Stínění EcM *Pseudotsuga menziensis* také vedlo ke zvýšenému přenosu  $^{14}\text{C}$  z EcM *Betula papyrifera* (podle Simard a Durall 2004). Wu a kol. (2001) pozorovali (opět v laboratorních podmínkách) přenos  $^{14}\text{C}$  mezi sousedícími semenáčky *Pinus densiflora*. Po 3 dnech detekovali  $^{14}\text{C}$  v myceliu EcM mykobionta a v EcM špičkách sledovaného semenáčku, avšak jen velmi malé množství bylo detekovatelné v kořenech a prýtu. Extrémní případ vztahu donor – akceptor představují mykoheterotrofní, nezelené rostliny, které téměř veškerý C získávají prostřednictvím EcM mykobionta z fotosyntetizujících rostlin; mechanismus předávání C fotosyntetizující rostlině by mohl být podobný, za předpokladu že tato vyvine dostatečně velkou sílu sinku pro C (Simard a Durall 2004). Na druhou stranu je nutné připomenout, že snížená nabídka asimilátů snižuje pravděpodobnost vzniku EcM, což je v rozporu s představou podpůrných stromů.

Sítě mycelií mykorhizních hub (CMN, „common mycorrhizal networks“) však nemusí nutně transportovat velká množství C mezi hostitelskými rostlinami, vzhledem k povaze vyměňovaných molekul je to spíše nepravděpodobné (viz kapitola 3.1.3.). CMN mohou ovlivňovat kompetitivnost jednotlivých hostitelů různým čerpáním C a dodáváním minerálních živin (Simard a Durall 2004). Jedno z možných vysvětlení přenosu C mezi rostlinami za podmínek, že jeden z partnerů vytváří vyšší sink pro C, tkví v mechanismu transportu N přes apoplastické rozhraní EcM. Upřednostňovaný způsob transportu N může záviset na dostupnosti C, při jeho vysoké dostupnosti budou přenášeny

aminokyseliny, při nízké dostupnosti bude jako přenašeč N fungovat amonný iont (Chalot a kol. 2006).

Molekulárně biologické nástroje ukazují, že tytéž EcM houby kolonizují v přírodních podmínkách současně více různých hostitelů, čímž vytvářejí mezidruhová propojení (Simard a Durall 2004). Pro CMN použili Helgason a kol. v roce 1998 termín „wood-wide web“. Současná kolonizace EcM a ErM rostlin mykobiontem *C. finlandica* nabízí možnost *on-line* zapojení vřesovcovitých rostlin podrostu do této sítě.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Rostlinný materiál

#### ***Vaccinium myrtillus* L., *Betula nana* L.**

Semena *V. myrtillus* byla získána sběrem zralých plodů v Krušných horách a pohoří Retezat, Rumunsko. Semena *B. nana* byla původem z Islandu.

Semena byla povrchově sterilizována 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dobu 12 minut, poté byla opláchnuta sterilizovanou deionizovanou vodou a vysazena do Petriho misky dělené na třetiny na médium MMN/2 (jeho složení ukazuje tabulka 2). Petriho miska byla uzavřena Parafilmem. Klíčení probíhalo 2 týdny ve tmě a následně 2 týdny na světle.

#### ***Picea abies* (L.) Karst. , *Pinus sylvestris* L.**

Semena *P. abies* a *P. sylvestris* byla zakoupena z komerční sbírky.

Semena byla povrchově sterilizována 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dobu 23 minut, opláchnuta sterilizovanou deionizovanou vodou a vysazena do Petriho misky dělené na třetiny s médiem MMN/2 (Tabulka 2). Petriho miska byla uzavřena Parafilmem. Klíčení probíhalo cca 3-4 týdny na světle.

### 4.2. Houbový materiál

Použité druhy a kmeny hub shrnuje Tabulka 1 a Obrázek 3. Houbové kultury byly kultivovány ve tmě při laboratorní teplotě v Petriho miskách na médiích MMN (Tabulka 2) a PDA („potato dextrose agar“, 39 g l<sup>-1</sup>, Fluka).

#### **Izolace houbových kmenů**

Kořeny byl povrchově sterilizovány 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebo 10% SAVO a položeny na Petriho misku s médiem PDA (39 g l<sup>-1</sup>, Fluka). Kultivace probíhala ve tmě při laboratorní teplotě.

druh	kmen	původ	typ
<i>Phialocephala fortinii</i> Wang & Wilcox	PFO-1	<i>Picea abies</i>	DSE
	PFO-2	<i>P. abies</i> <sup>1)</sup>	DSE
	PFO-F	<i>Vaccinium myrtillus</i>	DSE
	PFO-H	<i>Rhododendron</i> sp.	DSE
	PFO-P	<i>Erica herbacea</i>	DSE
<i>Cryptosporiopsis ericae</i>	CER-1	<i>P. abies</i> <sup>1)</sup>	ErM(?)
<i>Oidiodendron maius</i> Barron	OMA-B	<i>Rhododendron</i> sp.	ErM
<i>Meliniomyces bicolor</i> Hambleton & Sigler	MBI-1	<i>P. abies</i> <sup>1)</sup>	ErM/EcM(?)
<i>Meliniomyces variabilis</i> Hambleton & Sigler	MVA-1	<i>P. abies</i>	ErM/EcM(?)
	MVA-2	plodnice EcM houby <i>Hydnotrya tullasnei</i> <sup>2)</sup>	ErM/EcM(?)
<i>Rhizoscyphus ericae</i> (Read) Korf & Kernan	RER-1	<i>Calluna vulgaris</i>	ErM
<i>Cadophora finlandica</i> (Wang & Wilcox) Harrington & McNew	CFI-3	<i>P. abies</i> <sup>1)</sup>	ErM/EcM
<i>Cenococcum geophilum</i> Fr.	CGE-3	- <sup>3)</sup>	EcM
	CGE-4	- <sup>3)</sup>	EcM
<i>Boletus badius</i> Fr.	BBA	<i>P. abies</i> <sup>2)</sup>	EcM
<i>Laccaria proxima</i> (Boud.) Pat.	LPR-1	- <sup>4)</sup>	EcM
<i>Entoloma confierendum</i> (Britz.) Noord.	ECO-1	<i>P. abies</i> <sup>1)</sup>	EcM(?)
<i>Suillus luteus</i> (L.) Gray.	SLU-1	-	EcM

Tabulka 1: Použité kmeny hub: ErM/EcM a (?) je uvedeno u kmenů, které nejsou jasně zařaditelné do kategorií ErM či EcM; 1) poskytl Mgr. O. Koukol; 2) poskytl RNDr. M. Gryndler CSc.; 3) poskytla RNDr. Helena Lipavská, PhD.; 4) zakoupeno z komerční sbírky; ostatní kmeny pocházejí ze sbírky Mgr. M. Vohníka



	MMN	MMN/2	MMN/10	NH <sub>4</sub>	G	0	jednotky
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	125	25	250	0	0	mg l <sup>-1</sup>
glycin	-	-	-	0	282	0	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500	250	50	500			
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	150	75	15	150			
CaCl <sub>2</sub>	38	19	3,8	38			
NaCl	25	12,5	2,5	25			
FeNaEDTA	20	10	2	20			
thiamin	0,1	0,05	0,01	0			
glukóza	10	5	1	10		g l <sup>-1</sup>	
Malt extract	3	1,5	0,3	0			
agar	10	10	10	0			

Tabulka 2: Použitá média: MMN: „Modified Melin Norkrans“ médium, podle Marx 1969; NH<sub>4</sub>, G a 0 jsou média použitá v první části Pokusu 3.

### Izolace DNA

Pro izolace houbové DNA byl použit UltraClean<sup>TM</sup> microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories), postup dle přiloženého návodu.

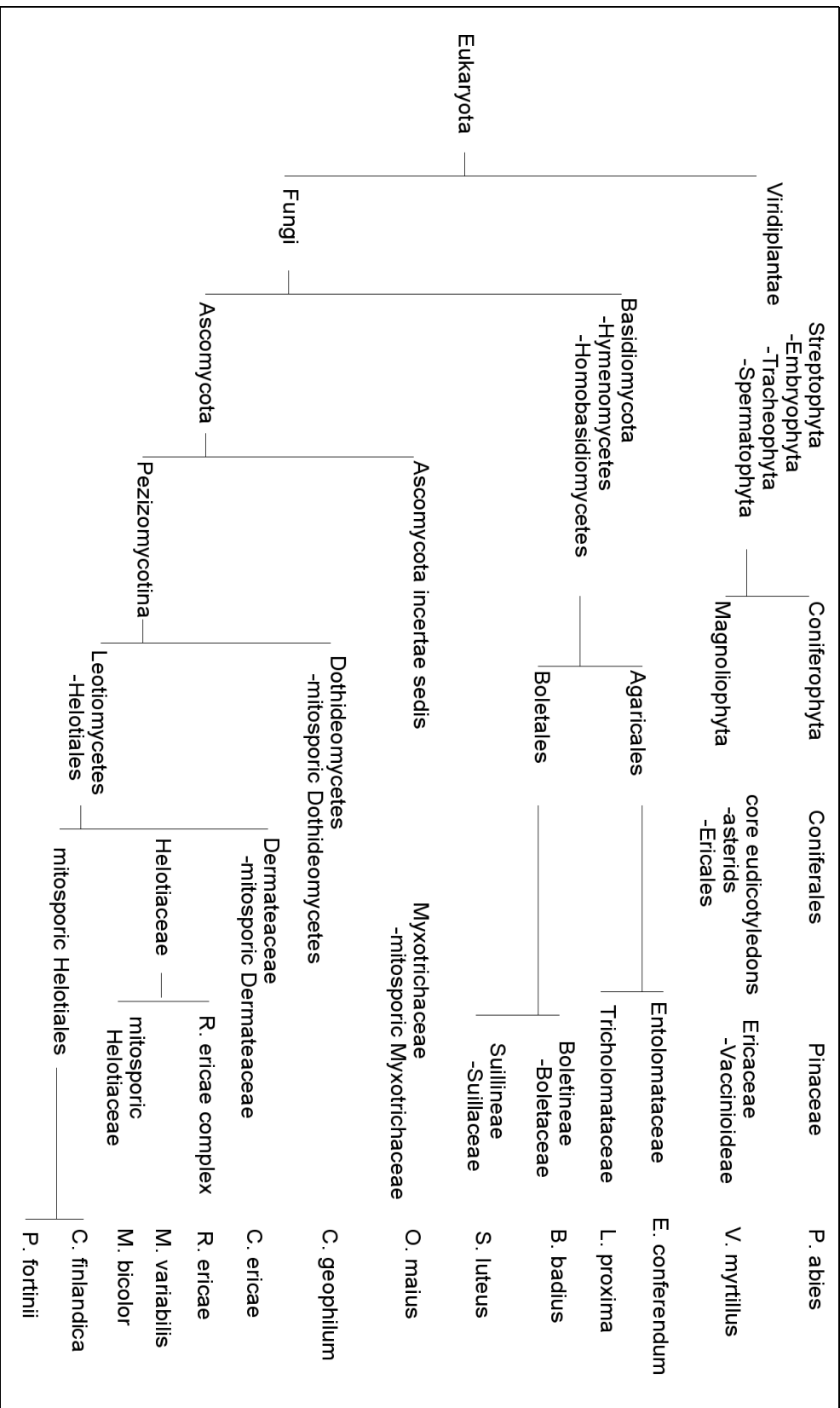
Pro PCR byla použita Taq polymeráza (MBI Fermentas), primery ITS4 a ITS1F. Složení PCR reakce ukazuje Tabulka 3.

	Koncentrace	Objem [μl]	PCR program			
Pufr	10x	5	Pre-denaturace	1)	94°C	4'
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4	Denaturace	2)	94°C	30''
dNTP	10mM	5	Annealing	3)	55°C	30''
Primery	10M	2x1,2	Elongace	4)	72°C	70''
Taq	1,25 U	0,25	Počet cyklů	5)	Go to 2)	35
Templát		4	Uchování	6)	4°C	∞
Celkový objem reakce 50 μl						

Tabulka 3: složení reakční směsi pro PCR reakci a použitý PCR program.

K purifikaci PCR produktů byl použit High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics), postup dle návodu.

Obr. 3: schématické zarazení druhů rostlin a hub použitých v Pokusu 1, podle <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>.



### 4.3. Metody pozorování kolonizace kořenů

#### **Fixace**

Vzorky po pozdější zpracování byly uchovávány v FAA (Etanol 50% (v/v) kyselina octová 5% (v/v), formaldehyd 5% (v/v), deionizovaná voda 40% (v/v)) či v okyseleném glycerolu (40% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) glycerol, 20% (v/v) deionizovaná voda)

#### **Barvení trypanovou modří**

příprava kořenů na pozorování

- 1) 15min při 121°C v autoklávu
- 2) promývání vodou a následné ponoření do 1% HCl na 20s
- 3) 30min při 121°C v autoklávu ve směsi trypanová modř (0.05% w/v) – kyselina octová – glycerol (1:1:1)
- 4) odbarvení přebytečného barviva pomocí glycerolu (cca 1den, laboratorní teplota)
- 5) montovat do glycerolu či destilované vody

#### **Pozorování Hartigovy sítě pomocí epifluorescence**

Ruční řezy byly barveny anilinovou modří v okyseleném glycerolu (0,01%w/v anilinová modř, 40% (v/v) kyselina octová, 40% (v/v) glycerol, 20% (v/v) deionizovaná voda) a pozorovány v oblasti excitace světlem o vlnových délkách od 355–425nm (podle Cudlína 1991).

#### **Řezání kořenů**

Příčné řezy kořeny byly zhotovovány ručně a barveny směsí trypanová/anilinová modř (0.05% w/v) – kyselina octová – glycerol (1:1:1)

#### **Optické vybavení**

Fotografie byly pořizovány digitálním fotoaparátem Olympus C5000.

Pro detailnější pozorování byla používána binokulární lupa Olympus SZX12. Pro mikroskopická pozorování byl používán světelný mikroskop Olympus BX60. Obraz z lupy a mikroskopu byl snímán digitální kamerou Olympus DP70.

K mikroskopickému pozorování byl používán Nomarského diferenciální interferenční kontrast (NDIC).

Pro skenovací elektronovou mikroskopii byl využit mikroskop FEI Quanta 200. Snímky byly pořízeny v tzv. enviromentálním modu (vzorek je ochlazen až na  $-20^{\circ}\text{C}$  a pozorován v prostředí nízkého vakua prosyceného vodními parami).

Mikroskopická pozorování byla provedena v Optické laboratoři BÚAVČR (Mgr. J. Machač).

#### *4.4. Použitý software*

Obraz z digitální kamery Olympus DP70 a byl zpracováván a videa vytvořena v programu Olympus QuickPHOTO MICRO 2.2. Následné úpravy fotografií byly prováděny v programu Gimp 2.2 (GNU Image Manipulation Program) a Adobe Photoshop 7.0.

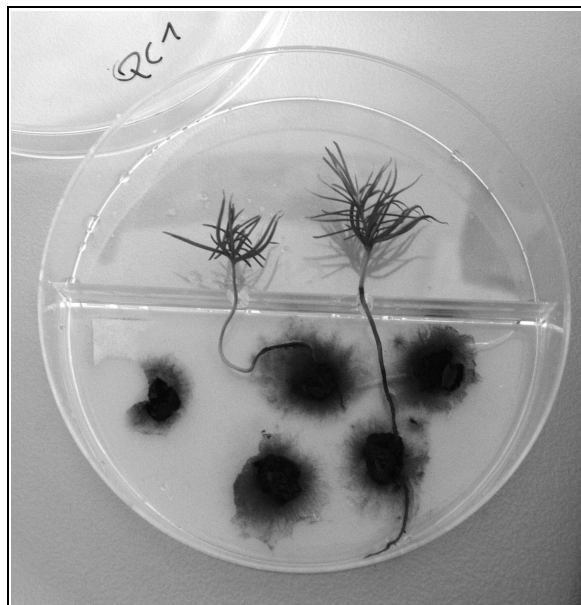
Diplomová práce byla vytvořena na počítači s operačním systémem Ubuntu 6.06 (GNU/Linux, <http://www.ubuntu.cz/index.php>) s využitím kancelářského balíku OpenOffice.org 2.0 ([www.openoffice.org](http://www.openoffice.org)).

#### *4.5. Statistická analýza*

K analýze rozptylů byla používána ANOVA, homogenita rozptylů byla ověřována Bartlettovým testem (Bartlett test of homogeneity of variances), průměry byly vzájemně porovnávány pomocí Tukeyova testu. K porovnávání výběrového průměru byl použit Welshův t-test. Ke statistické analýze byl využit program R 2.3.1 (The R Foundation for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) a grafické uživatelské prostředí R Commander 1.1-6 (autor John Fox, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

#### 4.6. Pokus 1

Tento pokus byl proveden v podmínkách *in vitro*, aby bylo možné případnou pozorovanou kolonizaci kořenů přisoudit námi inokulovanému mykobiontu. Sterilní kultivační systém představovala půlená Petriho miska (průměr 90mm), v jejíž spodní polovině bylo kultivační médium přikryté celofánovou folií zabráňující prorůstání hyf do agaru. Mycelium mykobionta porůstalo povrch této fólie. Sterilní semenáčky byly položeny na povrch předpěstovaného mycelia (cca 3týdny) a přikryty filtračním papírem. Tímto byla zvýšena pravděpodobnost kontaktu



Obr. 4: *in vitro* systém použitý v Pokusu 1. Dělená Petriho miska, ve spodní části médium MMN, pokryté celofánovou fólií. Jsou patrné kolonie *C. geophilum* a semenáčky *P. abies*. Filtrační papír byl pro názornost odstraněn.

hyfa – kořen. Petriho miska byla uzavřena Parafilmem a izolační páskou, na vrchní straně byl mezi Parafilm a izolační pásku vložen proužek buničiny zajišťující výměnu plynů mezi vnitřkem Petriho misky a okolní atmosférou. Spodní část Petriho misky byla poté zabalena alobalem, který omezoval osvětlení kořenů pokusných rostlin. Kultivace probíhala ve svislé poloze v růstové komoře se světelným režimem 16/8h den/noc, průměrnou teplotou 23°C a osvětlením 150  $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Kultivační systém dokumentuje Obrázek 4. V následujícím textu budou popsány varianty pokusů, použitá kultivační média a doby kultivace pro *P. sylvestris*, *P. abies* a *V. myrtillus*. Doba kultivace závisela především na zdravotním stavu semenáčků, proto není jednotná mezi variantami.

### ***Pinus sylvestris***

Použité médium: MMN (Tabulka 2)

Varianty: RER-1, MVA-1, MVA-2, kontrola

Opakování: 3 Petriho misky na variantu, 2 semenáčky na Petriho miskou. V případě varianty RER-1 bylo zhotoveno 7 Petriho misek.

Doba kultivace: 12 týdnů

### ***Picea abies***

Pro *P. abies* byla použita dvě kultivační média, varianty pokusů jsou rozepsány pro každé z nich zvlášť.

Použité médium: MMN (Tabulka 2)

Varianty: RER-1, MVA-1, MVA-2, MBI-1, CFI-3, CER-1, OMA-B, CGE-4, ECO-1, LPR-1, PFO-F, kontrola

Opakování: 4 Petriho misky na variantu, 2 semenáčky na Petriho miskou

Doba kultivace: 14 až 16 týdnů

Použité médium: MMN/2 (Tabulka 2)

Varianty: RER-1, MVA-1, MVA-2, MBI-1, CFI-3, CER-1, OMA-B, CGE-4, ECO-1, LPR-1, PFO-H, PFO-F, PFO1, PFO-2, kontrola

Opakování: 4 Petriho misky na variantu, 2 semenáčky na Petriho miskou

Doba kultivace: 19-26 týdnů

### ***Vaccinium myrtillus***

Použité médium: MMN (Tabulka 2)

Varianty: RER-1, MVA-1, MVA-2, MBI-1, CFI-3, CER-1, OMA-B, CGE-4, ECO-1, LPR-1, SLU-1, BBA, PFO-H, PFO-F, PFO1, PFO-2, kontrola

Opakování: 3 Petriho misky na variantu, 2-3 semenáčky na Petriho miskou

Doba kultivace: 8-16 týdnů

Před mikroskopickým pozorováním byla zjištěna čerstvá hmotnost jednotlivých rostlin.

#### 4.7. Pokus 2

Kultivace pokusných rostlin probíhala v aseptických podmínkách. Vysterilizovaný (autokláv 121°C 1hodina, 2x opakovaně po 24hodinách) zvlhčený substrát (rašelina – komerční zahradnický substrát, zeolit, 2:1, cca 150ml) byl umístěn do plastických 0,5l kádinek. Substrát byl inokulován agarovými bločky porostlými myceliem vybraných mykobiontů a kádinka byla uzavřena vysterilizovanou fólií a uzavřena do sterilního plastického obalu. Po nárůstu mycelia (cca 3 týdny, tma, laboratorní teplota) byly přisazeny sterilní semenáčky pokusných rostlin, kádinky byly opět uzavřeny a umístěny do růstové komory (režim 16/8h den/noc, průměrná teplota 23°C a osvětlení 150  $\mu\text{mol}$  fotonů  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). V následujícím textu jsou uvedeny varianty pokusů, použitá kultivační média a doby kultivace pro *P. sylvestris*, *P. abies* a *B. nana*.

##### *P. sylvestris*

Varianty: OMA-B, CGE-4, PFO-H, MVA-1, MVA-2, RER-1

Doba kultivace: 12 týdnů

##### *P. abies*

Varianty: CGE-4, MVA-1, RER-1

Doba kultivace: 16 týdnů

##### *B. nana*

Varianty: CGE-4, MVA-1, MVA-2, RER-1

Doba kultivace: 10 týdnů

#### 4.8. Pokus 3

V první části Pokusu 3 jsme zjišťovali, zda jsou zda jsou houby RER-1, PFO-P, PFO-H a PFO-F schopny pro růst v tekutém médiu na bázi MMN schopny využívat jako zdroj dusíku aminokyselinu glycin. Použitá média NH<sub>4</sub>, G 0 ukazuje Tabulka 2. Koncentrace

glycinu byla zvolena podle práce Xiao a Berch 1999. Média byla sterilizována v autoklávu při 121°C po dobu 25 minut,  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  a glycin byly do média následně přidány sterilní filtrací. Cca 30ml média bylo nalito do Ehrlenmayerovy baňky o obsahu 100ml. Médium bylo poté inokulováno bločkem agaru o průměru 5mm porostlého myceliem mykobionta (mycelia mykobiontů byla předpěstována na médiu o složení shodném s médiem 0 obsahujícím 10g agaru  $\text{l}^{-1}$ ). Baňka byla uzavřena sterilní zátkou z buničiny a umístěna do růstové komory (22°C, rychlost třepání  $120\text{min}^{-1}$ , neosvětleno). Po 8 týdnech byl pokus sklizen, narostlé mycelium bylo zachyceno filtrací přes předsušený, zvážený filtrační papír (Filtrak, No. 389), sušeno 2hodiny při 60°C a zváženo.

Varianty: média:  $\text{NH}_4$ , G, 0, mykobionti: RER-1, PFO-P, PFO-H a PFO-F, celkem 12

Opakování: 5 baněk na variantu

*Ve druhé části Pokusu 3 jsme zjišťovali vliv mykobiontů RER-1, PFO-H, CFI-3, CGE-4 na růst hostitelských rostlin (*V. corymbosum*, *P. abies*) v podmínkách ex vitro. Výsledky pokusu však nebyly v době sepsování této práce známy.*



## 5. Výsledky

### 5.1. Pokus 1

#### 5.1.1. *Pinus sylvestris*

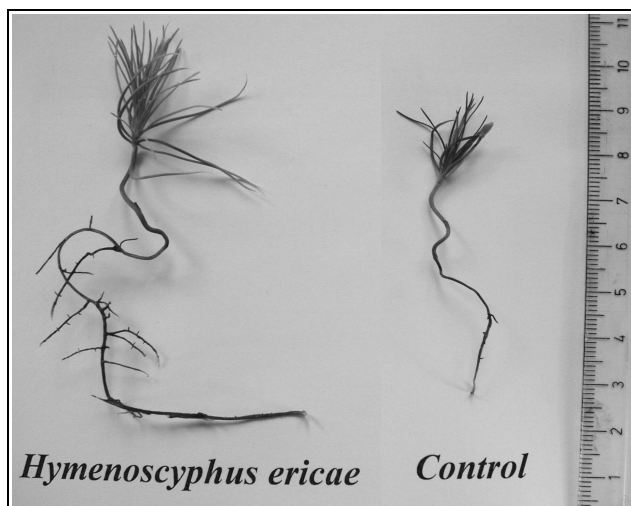
Testovali jsme vliv inokulace mykobionty *Rhizoscyphus ericae* RER-1, *Meliniomyces variabilis* MVA-1 a MVA-2.

Jejich přítomnost vedla ke zvýšenému větvení kořenů, jak ukazuje Obrázek 5. Tento efekt nebyl statisticky vyhodnocován. Morfologie kořenových špiček byla

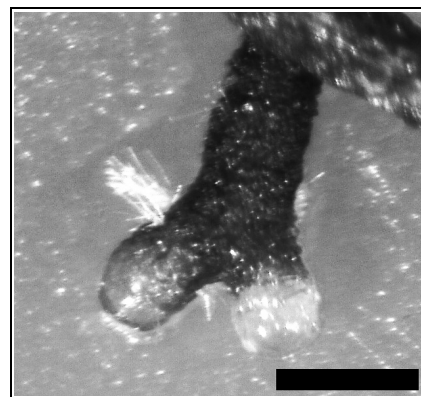
pozměněná: koř. špičky rostoucí v kontaktu s myceliem mykobionta byly ztlustlé, prosté kořenového vlášení. V případě inokulace RER-1 jsme pozorovali jednu a v případě MVA-1 čtyři vidličnatě větvené kořenové špičky (Obr. 6).

Morfologie kořenů připomínala ektomykorhizu, avšak postrádala její hlavní rysy: hyfový plášť a Hartigovu síť. Hyfy RER-1, MVA-1 a MVA-2 intracelulárně kolonizovaly buňky primární kůry kořenů, ve středním válci nebyla kolonizace patrná. Hyfy prorůstaly buňky izodiametrálně,

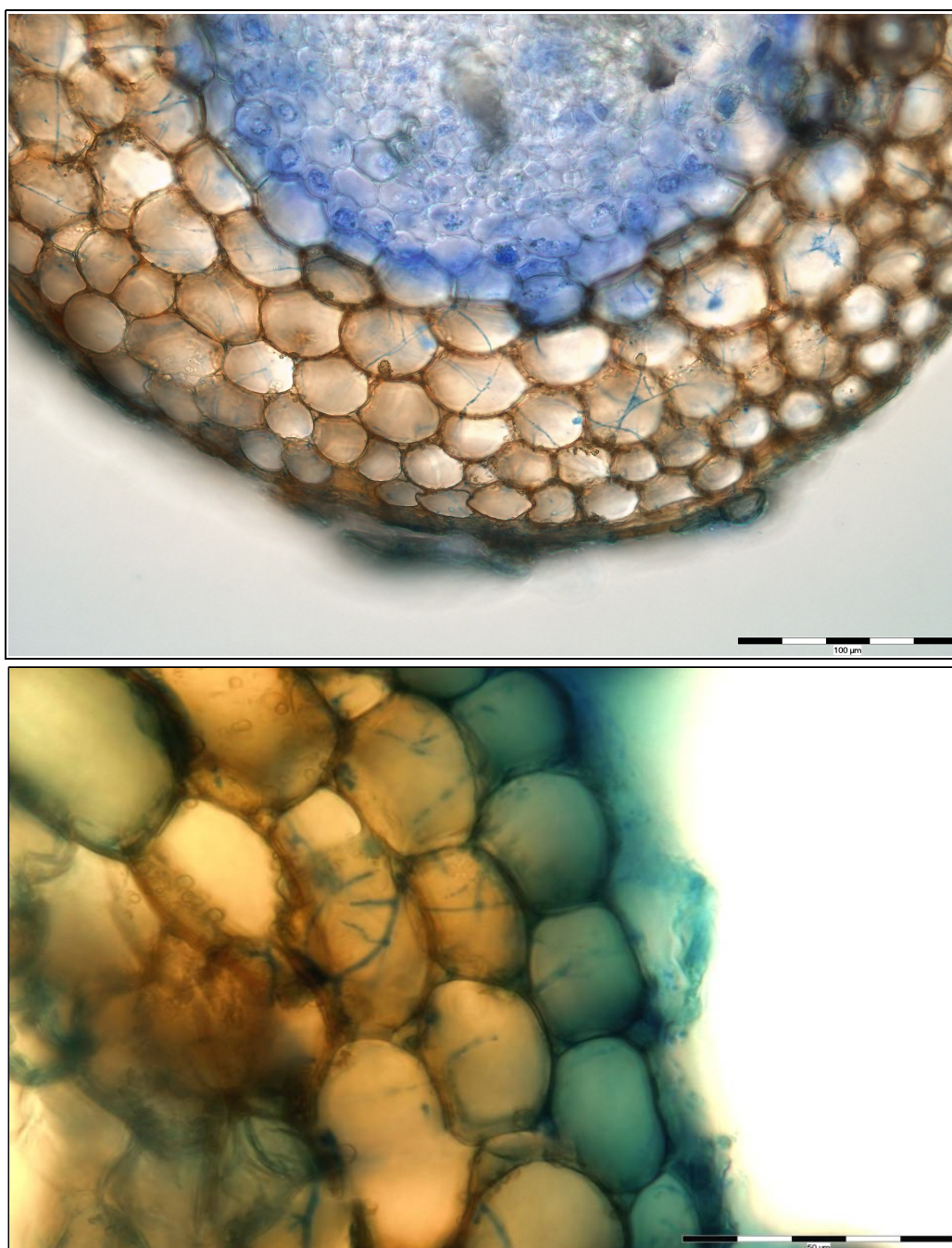
pozorovali jsme větvení hyf. Míra kolonizace se mezi jednotlivými mykobionty lišila, nejmasivnější byla u RER-1 (Obr. 7). Semenačky *P. sylvestris* zůstávaly zelené, nejevily známky poškození.



Obr. 5: Pokus 1: srovnání *P. sylvestris*, rostoucí 12 týdnů v Petriho misce s *ErM R. ericae* RER-1 (na obrázku s původním označením *H. ericae*) s kontrolní variantou. Je patrné, že přítomnost kolonie RER-1 podporovala větvení a růst kořene.



Obr. 6: Pokus 1: vidličnatě větvená kořenová špička *P. sylvestris*, která rostla na kolonii *ErM M. variabilis*. Úsečka odpovídá 1mm.



Obr. 7: Ruční příčný řezy kořenem *P. sylvestris*, Pokus 1. V buňkách primární kůry kořene jsou viditelné modře obarvené hyfy *R. ericae* RER-1. **Nahoře:** úsečka odpovídá 100µm. **Dole:** kompozitní obrázek – digitálně složen ze 3 optických řezů, patrné větvení hyf RER-1. Úsečka odpovídá 50 µm. Barveno anilínovou modří.

### 5.1.2. *Vaccinium myrtillus*

Zjišťovali jsme jaký vliv mají houby z řádu *Helotiales*, ErM, EcM a DSE na kořenový systém *V. myrtillus*.

Přítomnost mykobiontů měla pozitivní vliv na růst kořenů a prýtů rostlin, výjimkami byly varianty *Boletus badius* BBA, *Suillus luteus* SLU-1 a *Entoloma conferendum* ECO-1. Variabilita velikosti rostlin v rámci varianty byla vysoká, nejvýraznější pozitivní vliv na růst měla přítomnost EcM *Cenococcum geophilum* CGE-3, *M. variabilis* MVA-2, jak ilustruje Obrázek 8. Tento efekt nebyl statisticky hodnocen kvůli nesplnění předpokladů pro testování (závislost pozorování, neshodnost rozptylů), přesto jsou pro vybrané varianty box ploty hmotností uvedeny v Obrázku 8.

#### **Mykobionti z řádu *Helotiales***

*R. ericae* RER-1 vyplňoval epidermální buňky vlasových kořenů jemnými smyčkami hyf charakteristickými pro ErM (Obr. 9a).

Hyfy *M. variabilis* MVA-1 také kolonizovaly buňky epidermis, vytvářely v nich smotky hyf, které však byly robustnější než v případě RER-1 (Obr. 9b, video *vaccini\_MVA-1.avi* na přiloženém CD). *M. variabilis* MVA-2 kolonizoval epidermální buňky vlasových kořenů a vyplňoval je smotky hyf připomínajícími ErM avšak také robustnějšími než v případě RER-1 (Obr. 9c).

*M. bicolor* MBI-1 masivně kolonizoval epidermální buňky a vyplňoval je smotky hyf charakteristickými pro ErM (Obr. 9f)

Mykobiont *Cadophora finlandica* CFI-3 porůstal povrch vlasových kořenů a místy vyplňoval buňky epidermis, charakter kolonizace připomínal ErM (Obr. 9d, e).

*Cryptosporiopsis ericae* CER-1 neměl na růst *V. myrtillus* výrazný vliv, nepozorovali jsme kolonizaci kořenů.

#### ***Oidiodendron maius* OMA-B**

*O. maius* OMA-B vytvářel v epidermálních buňkách vlasových kořenů smotky hyf charakteristické pro ErM.

### **EcM mykobionti**

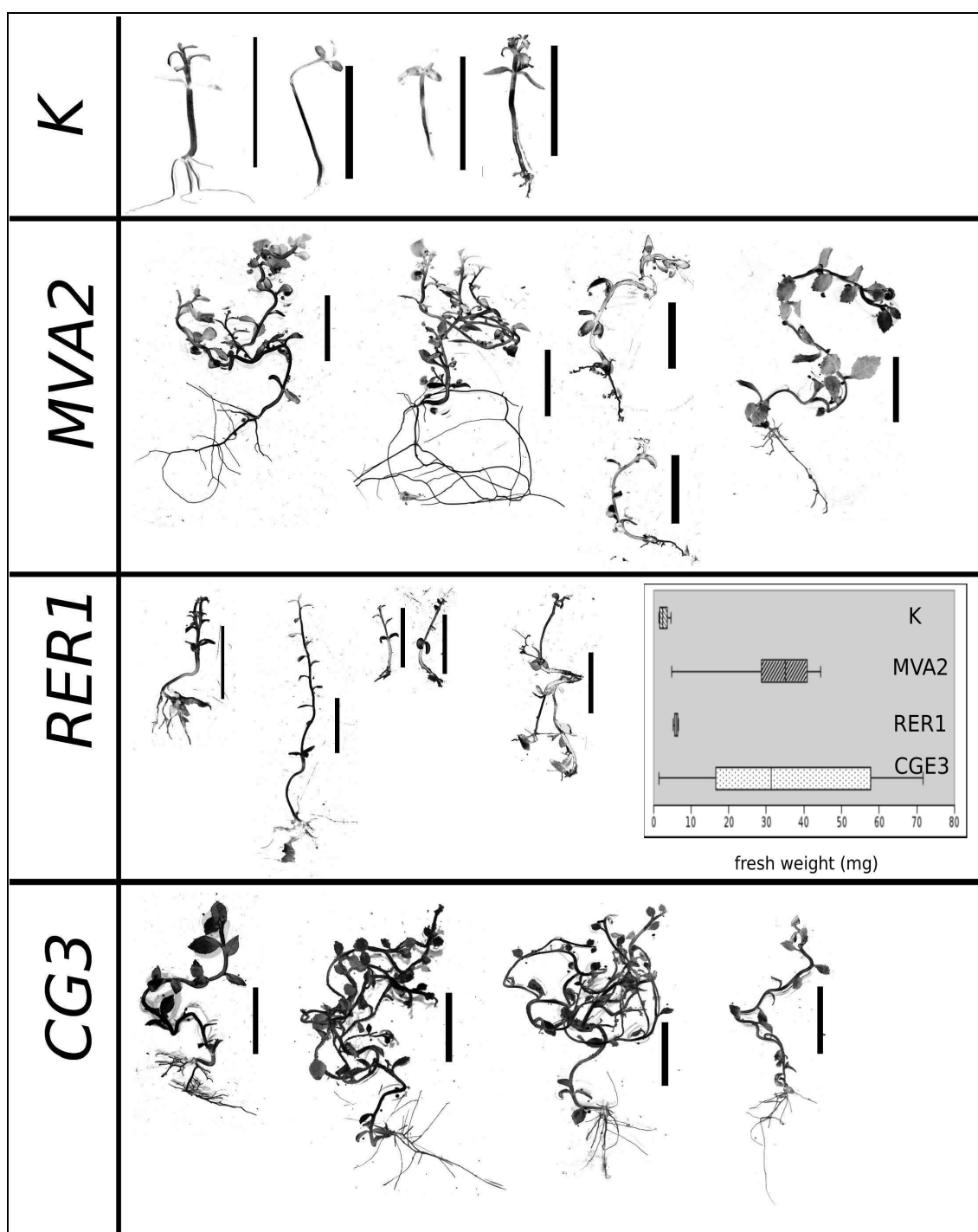
Vliv EcM mykobiontů *B. badius* BBA, *L. proxima* LPR-1, *E. conferendum* ECO-1 a *S. luteus* SLU-1 na růst *V. myrtillus* byl negativní nebo neutrální, nepozorovali jsme kolonizaci kořenů.

*C. geophilum* CGE-3 a CGE-4 podporovaly růst *V. myrtillus* (Obr. 8), nepozorovali jsme kolonizaci kořenů hyfami.

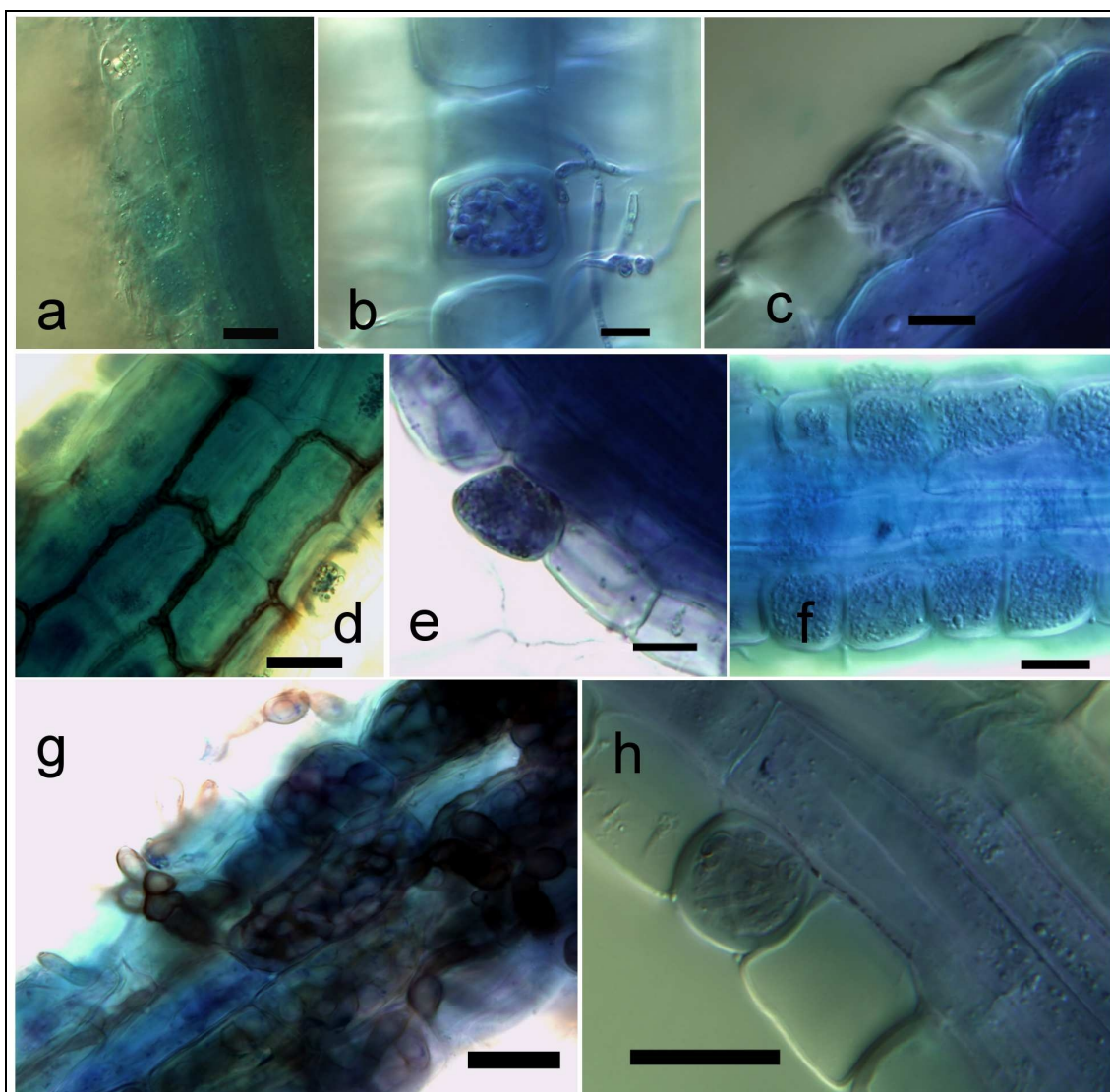
### **DSE mykobionti**

Hyfy *Phialocephala fortinii* PFO-F a PFO-H porůstaly povrch kořenů, masivně je kolonizovaly a vytvářely v nich četná mikrosklerocia (Obr. 9g), PFO-F podporovala růst kořenů *V. myrtillus*.

Kolonizace *P. fortinii* PFO-1 a PFO-2 se lišila od PFO-F a PFO-H: nepozorovali jsme tvorbu mikrosklerocií. Povrch kořene a jeho mezibuněčné prostory byly kolonizovány hyfami rovnoběžnými s povrchem (tzv. „runner“ hyfy), místy byly buňky epidermis vyplněny smotky hyf, jak je vidět na Obrázku 9h (a na videu *vaccini\_PFO-1.avi* a *vaccini\_PFO-1a.avi* na přiloženém CD).



Obr. 8: Vliv mykobiontů na habitus a velikost *V. myrtillus* v Pokusu 1. **K**: kontrolní, neinokulovaná varianta; **MVA-2**: inokulace *M. variabilis* MVA-2 vedla ke zvýšenému růstu kořenů a prýtu; **RER-1**: inokulace *R. ericae* RER-1 měla variabilní odpověď v růstu semenáčků; **CGE-3**: inokulace *C. geophilum* CGE-3 podporovala růst a větvení prýtu semenáčků. Úsečka na pravé straně všech fotografií odpovídá 1cm. Ve výřezu jsou box ploty čerstvých hmotností jednotlivých variant v miligramech (*n* pro jednotlivé varianty postupně: 4, 6, 3, 9).



Obr. 9: Pokus 1: kolonizace kořenů *V. myrtillus* **a**: *R. ericae* RER-1, epidermální buňky vyplněné smotky hyf, charakteristická ErM; **b**, **c**: buňky epidermis vyplněné smotky hyf *M. variabilis* MVA-1 (**b**) a MVA-2 (**c**), charakter kolonizace připomíná ErM.; **d**, **e**: hyfy *C. finlandica* CFI-3 kolonizují povrch kořen (**d**) a vyplňují epidermální buňky hyfami (**e**); **f**: *M. bicolor* MBI-1 vytváří v epidermálních buňkách útvary charakteristické pro ErM; **g**: mikrosklerocia vytvořená DSE houbou *P. fortinii* PFO-F; **h**: buňka epidermis vyplněná smotky hyf DSE *P. fortinii* PFO-1. Úsečky odpovídají 20 $\mu$ m. Fotografováno v režimu NDIC.



### 5.1.3. *Picea abies*

Testovali jsme vliv inokulace mykobionty náležících do řádu *Helotiales*, ErM, EcM a DSE mykobionty.

#### **Interakce s mykobionty z řádu *Helotiales***

Kultivace s *R. ericae* RER-1 a *M. variabilis* MVA-1 a MVA-2 vedla k podpoření větvení kořenů *P. abies*. Kořenové špičky byly paličkovité, postrádaly kořenové vlášení. Nejvýraznější změny jsme pozorovali u MVA-1 při kultivaci na mediu MMN: kořeny se v blízkosti kolonie MVA-1 bohatě větvaly, morfologicky připomínaly EcM morfortyp *Piceirhiza* sl., byla patrná ztráta koř. vlášení po kontaktu s myceliem (Obr. 10a, b). Na příčných řezech takto modifikovanými kořenovými špičkami jsme pozorovali kolonizaci povrchu kořene a intracelulární kolonizaci buněk vrchních vrstev kořene (Obr. 10c, d). Intenzita kolonizace klesala v pořadí RER-1 > MVA-1 = MVA-2. V žádné variantě nebyly přítomné hyfový plášť ani Hartigova síť, hyfy prorůstaly buňkami primární kůry, charakter kolonizace byl stejný jako v případě *P. sylvestris* (Obr 7, video picea\_MVA-2.avi na přiloženém CD).

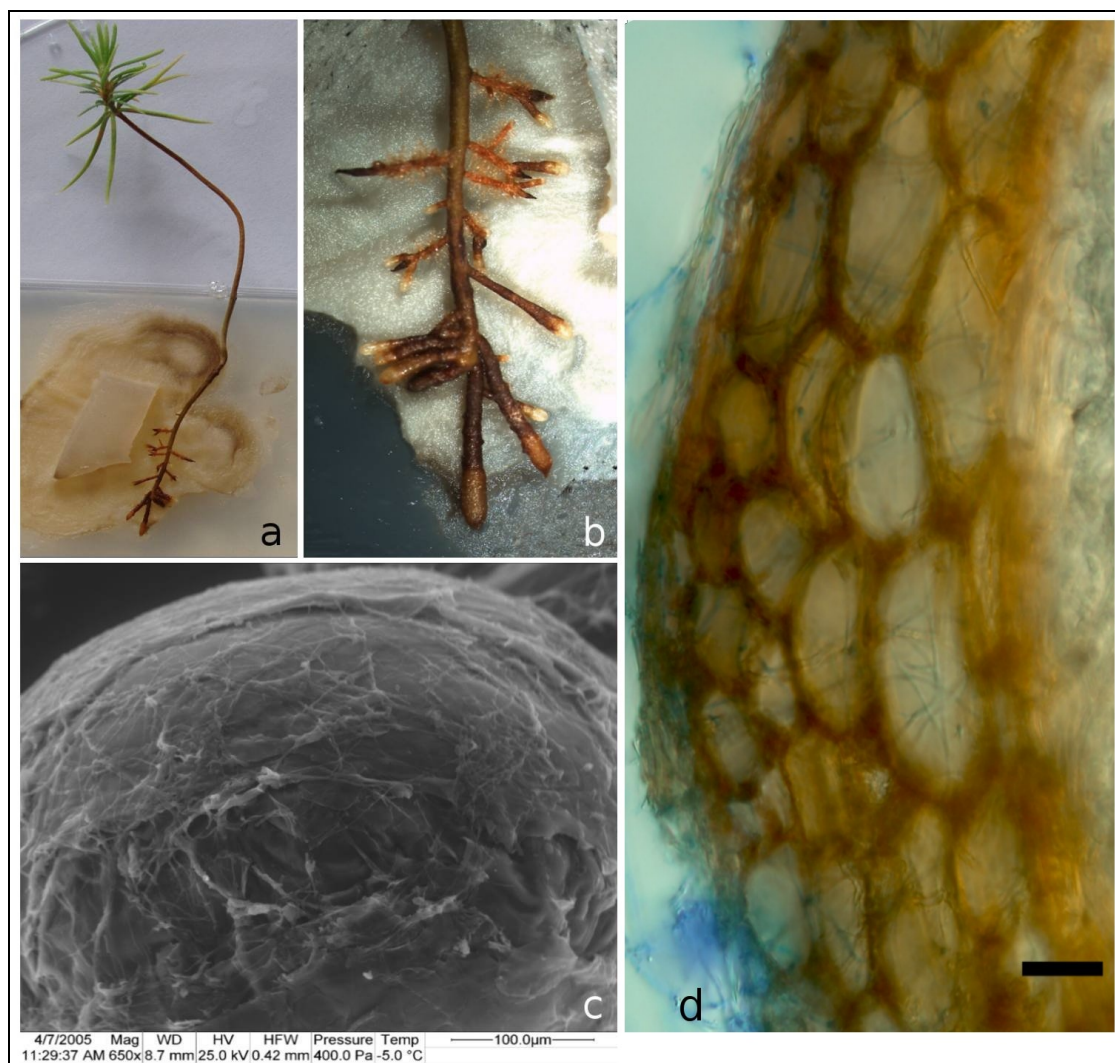
Z kolonizovaných kořenů jsme reizolovali kolonie RER-1, MVA-1 a MVA-2.

*M. bicolor* MBI-1 podporoval větvení kořenů, velmi řídko kolonizoval buňky primární kůry podobným způsobem jako RER-1.

*C. ericae* CER-1 podporoval větvení kořenů (Obr. 11), pozorovali jsme občasnou kolonizaci podobnou RER-1.

Kultivace s *C. finlandica* CFI-3 vedla ke zvýšenému větvení kořenů (Obr. 11) a ke vzniku modifikovaných kořenových špiček, připomínajících morfologií EcM morfortyp *Piceirhiza* sl. (Obr. 12a). Při kultivaci na mediu MMN byla na příčných řezech patrná občasná kolonizace mezibuněčných prostor a buněk primární kůry; při kultivaci na mediu MMN/10 jsme na příčných řezech pozorovali různá stádia vývoje Hartigovy sítě: od občasné kolonizace hyfami po vyvinutou Hartigovu síť (Obr. 12a, b).

Z kolonizovaných kořenů jsme reizolovali kolonii CFI-3.

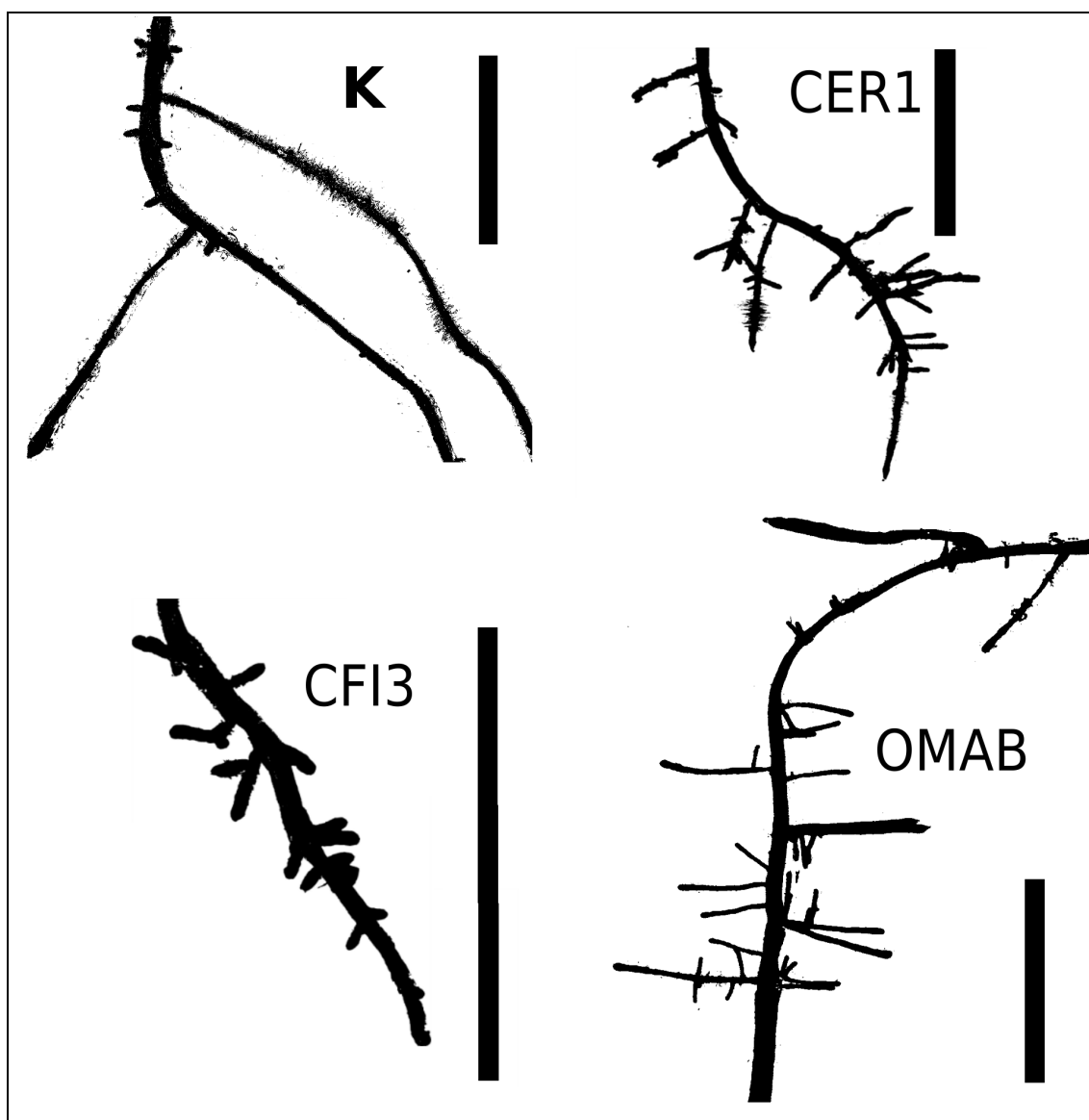


Obr. 10: Pokus 1: semenáček *P. abies* inokulovaný *M. variabilis* MVA-1 (a,b,c) a RER-1 (d). a: celkový pohled na semenáček *P. abies* a kolonii houby, b: detail kořenového systému, patrný přechod od koř. špiček s vlášením (nahore) po zdánlivě EcM koř. špičky (dole). c: mikrofotografie koř. špičky pořízená SEM, patrné hyfy porůstající povrch, které však tvoří hyfový plášť, úsečka 100µm. d: příčný řez kořenem, viditelné modře obarvené hyfy RER-1 na povrchu kořene a v buňkách primární kůry kořene. Není přítomná Hartigova síť. Barveno anilínovou modří, úsečka 20µm.

### Interakce s *Oidiodendron maius* OMA-B

Kořenové špičky byly zkrácené, paličkovité, prosté kořenového vlášení. Pozorovali jsme řídkou intracelulární kolonizaci primární kůry shodnou s kolonizací působenou RER-1, OMA-B podporoval větvení kořenů *P. abies* (Obr. 11).

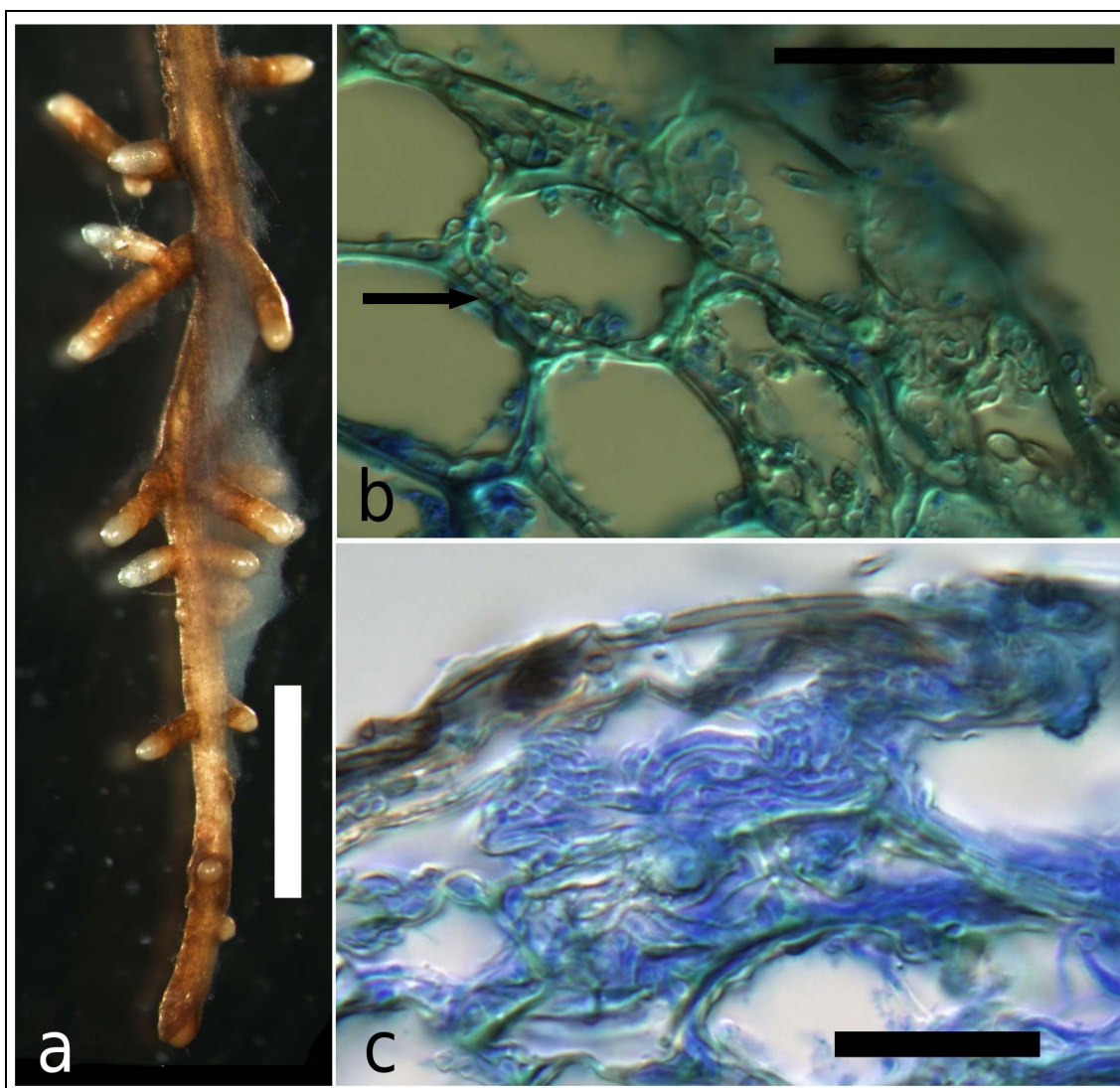




Obr. 11: Vliv mykobiontů na morfologii kořenového systému *P. abies* v Pokus 1. **K**: kontrolní varianta s málo větvenými kořeny, patrné kořenové vlášení; **CER-1**: ErM *C. ericae* podporoval větvení kořenů, většina kořenových špiček byla bez kořenového vlášení; **CFI-3**: *C. finlandica* podporovala větvení kořenů, patrné paličkovité koř. špičky bez vlášení; **OMA-B**: ErM *O. maius* podporoval větvení kořenů. Úsečky na pravé straně obrázků odpovídají 1cm.

### Interakce s EcM mykobionty

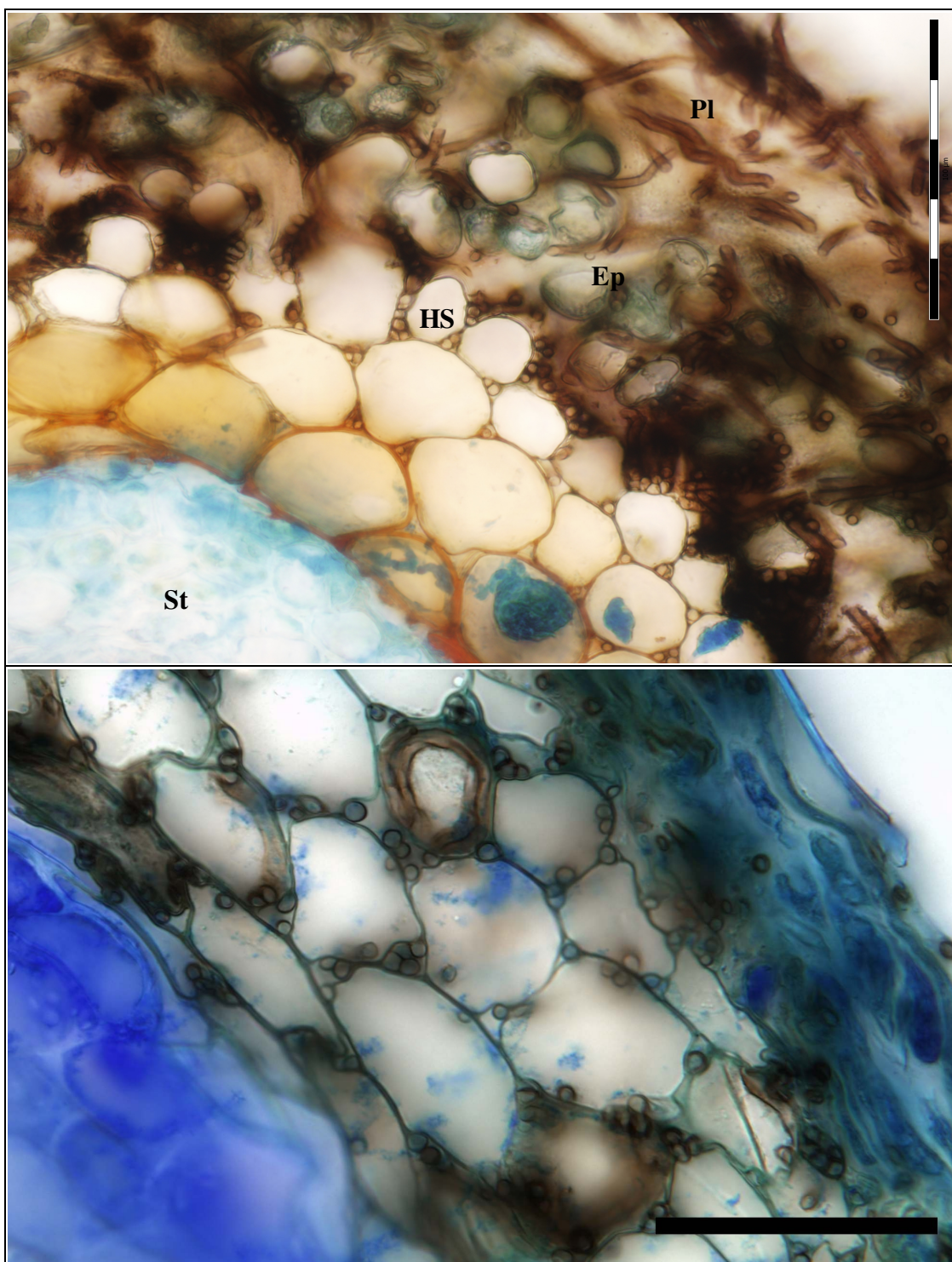
Při inokulaci *E. conferendum* ECO-1 jsme pozorovali žloutnutí jehlic semenáčků v jednom případě a úhyn semenáčku v druhém. ECO-1 nekolonizovala kořeny *P. abies*. *L. proxima* LPR-1 také nekolonizovala kořeny a neměla vliv na jejich morfologii.



Obr. 12: Pokus 1: inokulace *P. abies* *C. finlandica* CFI-3. **a**: modifikované kořenové špičky bez koř. vlášení připomínají EcM morfortyp *Piceirhiza* sl., úsečka 2mm; **b**: příčný řez kořenem, v buňkách primární kůry je viditelná Hartigova síť (označeno šipkou), úsečka 50µm; **c**: pohled na Hartigovu síť shora, řez byl veden v úrovni styku dvou buněk, jsou viditelné ploché hyfy tvořící Hartigovu síť. Úsečka 20µm. Mikrofotografie pořizeny v režimu NDIC.

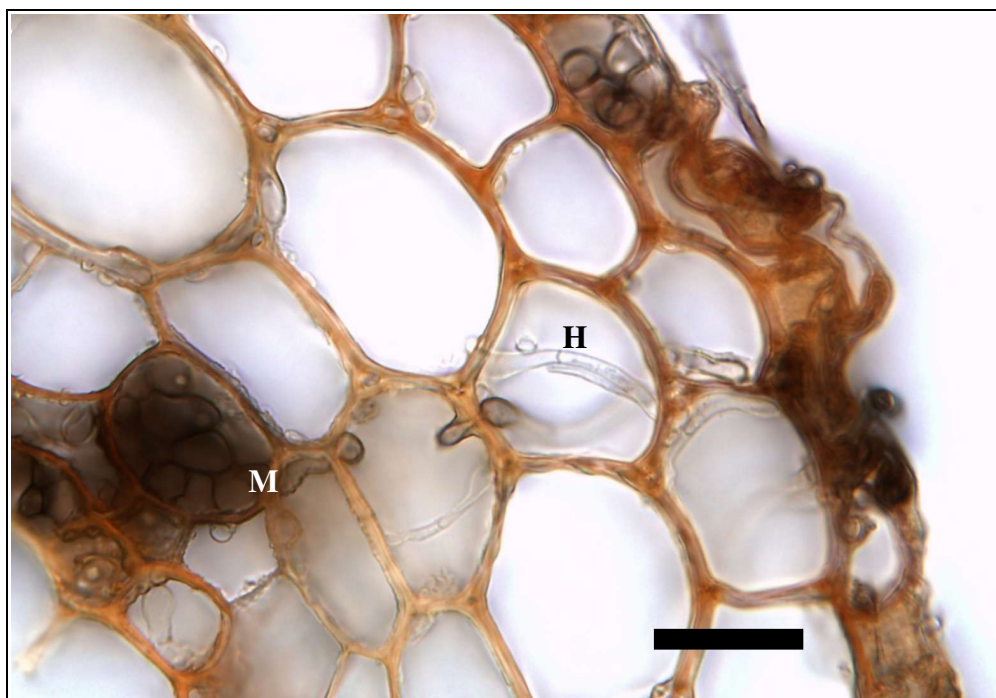
Při růstu na médiu MMN vedla inokulace *P. abies* mykobiontem *C. geophilum* CGE-4 ke vzniku EcM špiček s vyvinutým hyfovým pláštěm a vznikající periepidermální<sup>5</sup> Hartigovou sítí prorůstající směrem k endodermis, jak je patrné na Obrázku 13. Na mediu MMN/10 neměl mykobiont výrazný vliv na větvení kořene,

<sup>5</sup> V paraepidermální síti jsou obaleny hyfami pouze transverzální stěny, kdežto v periepidermální Hartigově síti dochází ke kompletnímu obalení buněk



Obr. 13: Pokus 1: příčný řez kořenovou špičkou *P. abies* inokulovanou Ecm *C. geophilum* CGE-4. Nahoře: kultivace na mediu MMN; **PI** označuje patrný vícevrstevný hyfový plášť, **Ep** rozvolněné buňky epidermis a primární kůry obalené hyfami CGE-4. Na obrázku je patrná Hartigova síť (**HS**), obklopující buňky primární kůry. Střední válec (**St**) zůstává nekolonizovaný. Úsečka 100 $\mu$ m. Dole: kultivace na mediu MMN/10; hyfový plášť je méně vyvinutý, jsou patrné hyfy tvořící Hartigovu síť na průřezu (**HS**) a shora obalující buňku primární kůry (**HV**), úsečka 50 $\mu$ m.





Obr. 14: Příčný řez kořenem *P. abies* inokulovaným *P. fortinii* PFO-H v Pokusu 1. **H**: hyalinní hyfa prorůstající buňku primární kůry kořene; **M**: mikrosklerocium PFO-H v primární kůře. Úsečka 20 $\mu$ m.

na příčných řezech kořeny jsme však pozorovali vyvinutou periepidermální Hartigovu síť dosahující k endodermis (Obr. 13). Z kolonizovaných kořenů jsme reizolovali kolonii CGE-4.

#### **Interakce s DSE mykobionty**

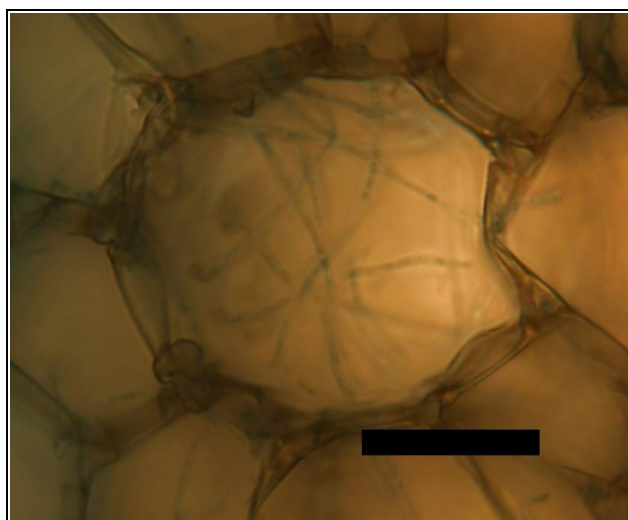
DSE *P. fortinii* PFO-F měla pozitivní vliv na růst a větvení kořenů, hyfy PFO-F masivně kolonizovaly primární kůru a střední válec a vytvářely v nich četná mikrosklerocia, jak je patrné na Obrázku 14.

## 5.2. Pokus 2

### 5.2.1. *Pinus sylvestris*

Mezi testovanými variantami (*O. maius* OMA-B, *C. geophilum* CGE-4, *P. fortinii* PFO-H, *M. variabilis* MVA-1, MVA-2, *R. ericae* RER-1) byl patrný rozdíl v růstu semenáčků: nejvyšší byl ve variantě OMA-B a nejnižší v CGE-4, tento rozdíl však nebyl statisticky průkazný.

Z testovaných variant inokulací jsme pozorovali vliv na morfologii kořenového systému a jeho kolonizaci pouze v případě RER-1: kořeny většinou postrádaly kořenové vlášení, byly paličkovitě ztlustlé, některé se vidličnatě větvily. Na příčných řezech kořenovými špičkami z této varianty jsme pozorovali masivní intracelulární kolonizaci buněk primární kůry kořene (Obr. 15). Tato kolonizace byla stejného charakteru jako v případě *P. sylvestris* a RER-1 v Pokusu 1.



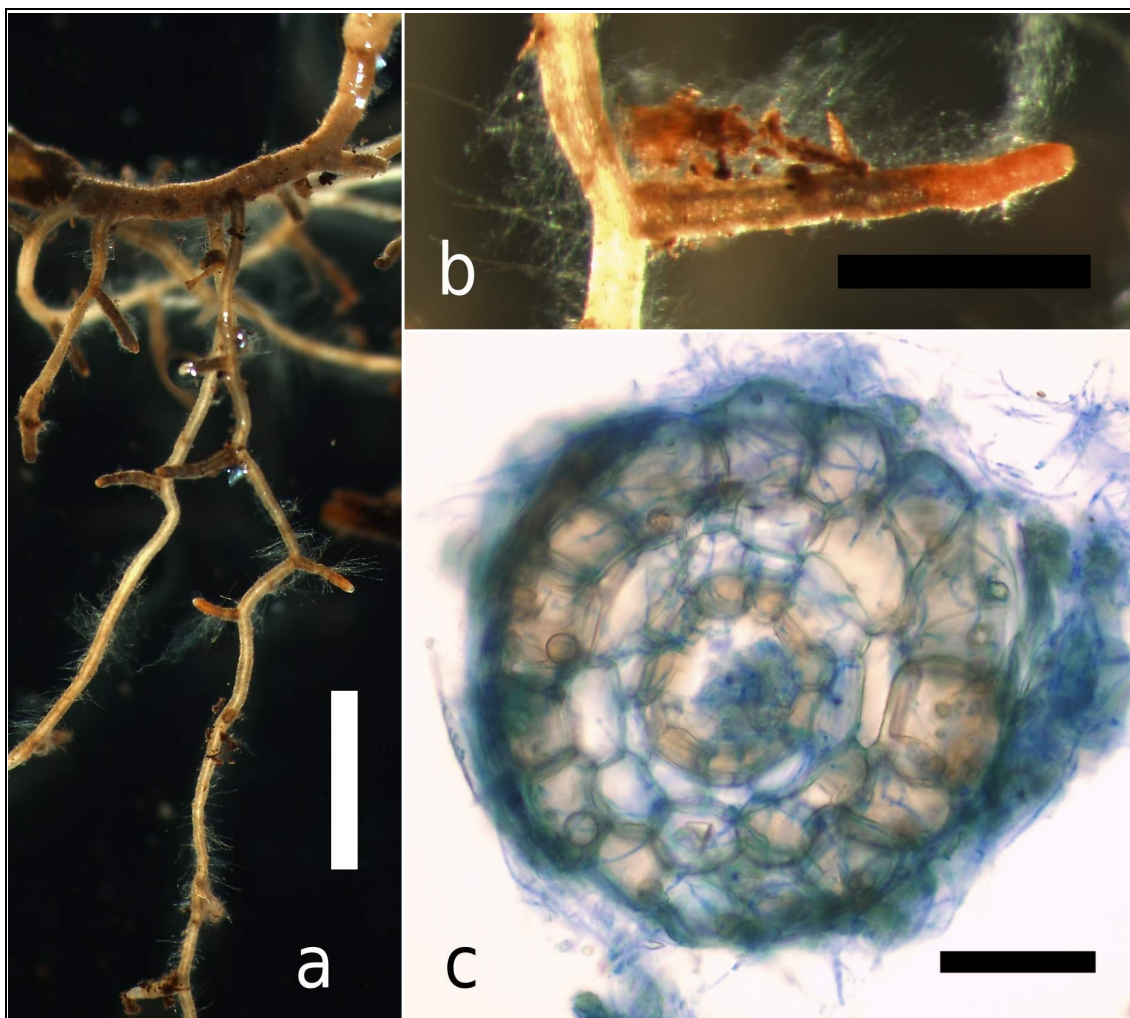
Obr. 15: Pokus 2: buňka primární kůry kořene *P. sylvestris*, která rostla v substrátu preinokulovaném *R. ericae* RER-1. V buňce jsou patrné modře obarvené hyfy RER-1. Kompozitní obrázek, digitálně složený ze 4 optických řezů v rámci preparátu. Barveno anilinovou modří, úsečka 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.2. *Picea abies*

Zkoumané varianty (*C. geophilum* CGE-4, *R. ericae* RER-1, *M. variabilis* MVA-1) neměly vliv na morfologii kořene, nepozorovali jsme kolonizaci kořene.

5.2.3. *Betula nana*

Ze zkoumaných variant (*C. geophilum* CGE-4, *M. variabilis* MVA-1, MVA-2, *R. ericae* RER-1) měla na morfologii kořene a jeho kolonizaci vliv pouze varianta RER-1: Na kořenech *B. nana* jsme pozorovali černo-oranžovo-hnědé, zdánlivě EcM špičky (Obr. 16a, b). Kořenové vlášení pravděpodobně přestávalo růst po kolonizaci kořenové špičky houbou. Na příčných řezech jsme nepozorovali Hartigovu síť ani hyfový plášť typický pro EcM, buňky primární kůry byly masivně kolonizované hyfami RER-1 (Obr. 16c). Na rozdíl od výsledků u *P. sylvestris* a *P. abies* hyfy RER-1 prorůstaly do buněk



Obr. 16: Pokus 2: kořen *B. nana*, která byla inokulovaná *R. ericae* RER-1. **a**: zdánlivě EcM špičky, úsečka 2mm; **b**: detail trojbarevné, zdánlivě EcM špičky, úsečka 500 µm; **c**: příčný řez kořenovou špičkou, patrná je absence Hartigovy sítě, modře obarvené hyfy masivně kolonizují buňky primární kůry i středního válce, úsečka 40 µm.

---

centrálního válce. Kontaminace byla vyloučena reizolací mykobionta z „mykorhizních“ špiček pokusných rostlin, následná sekvenace potvrdila přítomnost RER-1.

#### 5.2.4. Pokus 3

V první části Pokusu 3 jsme zjišťovali, zda jsou houby *P. fortinii* PFO-1, PFO-H, PFO-F a *R. ericae* RER-1 schopny pro růst v tekutém mediu využívat jako jediný zdroj N aminokyselinu glycin.

Růst PFO-1 se statisticky významně lišil mezi variantami (ANOVA  $p < 0,000$ , Tukey  $p < 0,05$ ), nejnižší byl na médiu, kde zdrojem N byla aminokyselina glycin (dále značeno G), nejvyšší na médiu s amonným iontem (dále NH<sub>4</sub>).

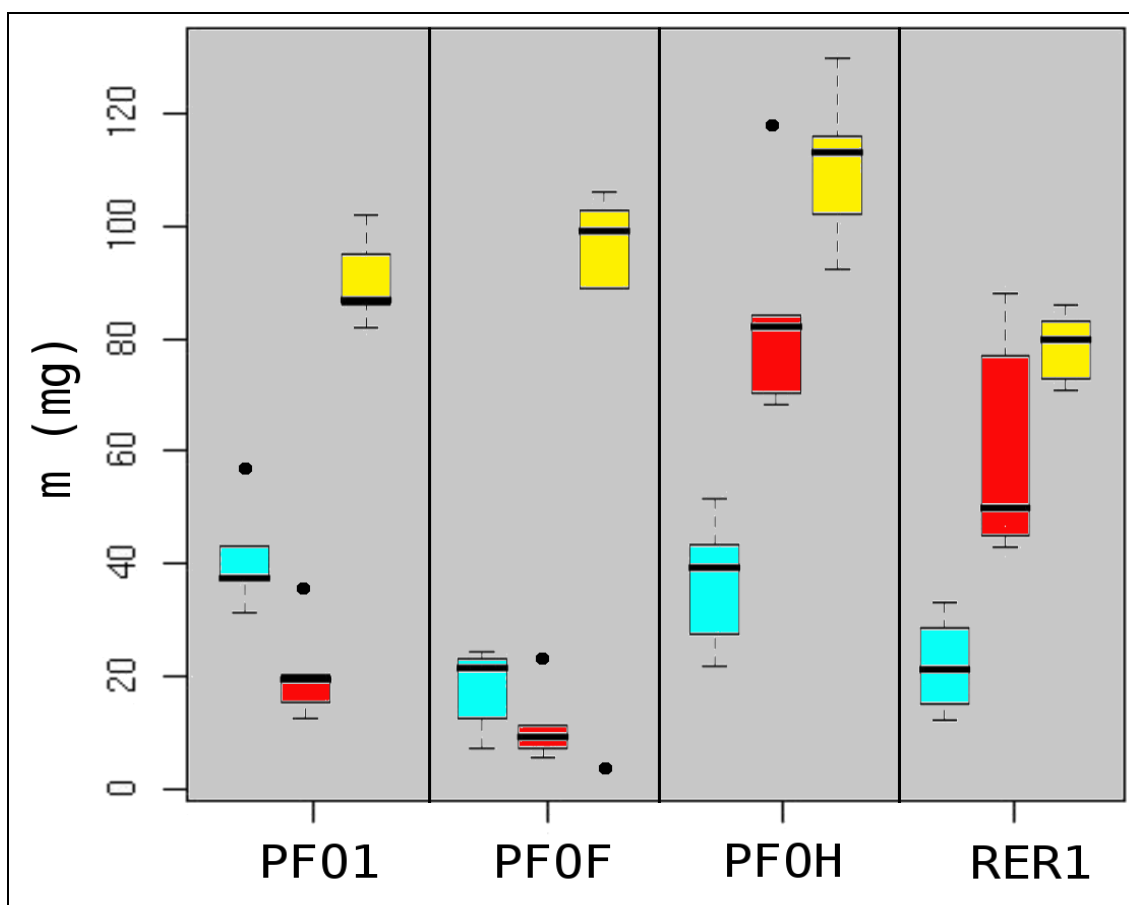
Růst PFO-F byl nejvyšší ve variantě NH<sub>4</sub>, ve variantě G a v kontrole byl nižší. Statisticky významný rozdíl byl mezi variantami NH<sub>4</sub> a G a mezi variantami NH<sub>4</sub> a kontrolou (jednostranný dvouvýběrový Welshův t-test,  $p < 0,05$ ), varianty G a kontrola se na zvolené hladině významnosti nelišily.

Růst PFO-H se statisticky lišil mezi variantami (ANOVA  $p < 0,000$ , Tukey  $p < 0,05$ ), stoupal v pořadí kontrola <G<NH<sub>4</sub>.

Růst RER-1 se lišil mezi variantou NH<sub>4</sub> a kontrolou (Tukey  $p < 0,00$ ) a mezi variantou G a kontrolou (Tukey  $p < 0,005$ ), mezi variantami G a NH<sub>4</sub> se na zvolené hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) nelišil.

Jak je patrné z Obrázku 17, všechny zkoumané houby rostly nejlépe ve variantě NH<sub>4</sub>, aminokyselinu glycin dokázaly jako zdroj N pro růst v tekutém médiu využívat pouze houby *P. fortinii* PFO-H a *R. ericae* RER-1.

*Výsledky druhé části Pokusu 3 nebyly v době sepisování diplomové práce známy.*



Obr. 17: Pokus 3: boxploty hmotností sušiny *P. fortinii* PFO-I, PFO-F, PFO-H a *R. ericae* RER-1 rostoucích v mediích s různými zdroji N: modře je značena kontrolní varianta bez N, červeně varianta, kde byla jediným zdrojem N aminokyselina glycin a žlutě varianta, ve které byl zdrojem N amonný iont. Všechny testované houby rostly nejlépe ve variantě s amonným iontem, PFO-H a RER-1 jako zdroj N využívaly aminokyselinu glycin. Na ose x vyneseny testované varianty, na ose y hmotnost vyprodukované sušiny v mg.



## 6. Diskuze

### 6.1. Interakce ErM a EcM rostlin s DSE mykobionty

DSE *Phialocephala fortinii* je častým mykobiontem vřesovcovitých i potenciálně ektomykorhizních rostlin, v jejich kořenech tvoří mikrosklerocia – buňky zpravidla primární kůry vyplňuje krátkými, ztlustlými, melanizovanými hyfami, tyto útvary slouží k přečkávání nepříznivých podmínek a také nejspíše umožňují častou izolaci *P. fortinii* z environmentálních vzorků (Addy a kol. 2005). Mikrosklerocia pravděpodobně neslouží k výměně látek mezi mykobiontem a rostlinou.

Stoyke a Currah (1991) pozorovali tvorbu mikrosklerocií v buňkách primární kůry vřesovcovité rostliny *Menziesia ferruginea* v podmínkách *in vitro*, podobně jako Vohník a kol. (2003) v případě *Rhododendron* cv. Azurro a *P. fortinii* PFO-F a PFO-H.

Kmen PFO-F byl izolován z kořenů volně rostoucích *Vaccinium myrtillus*, kmen PFO-H z kořenů *Rhododendron* sp.; přes svůj rozdílný původ vytvářely oba kmeny mikrosklerocia v kořenech *V. myrtillus* i *Picea abies* (Obr. 9g, h, 14, Tab. 4), vliv na růst obou hostitelských rostlin byl v porovnání s neinokulovanými rostlinami pozitivní. Tento efekt byl zřejmý zvláště v případě *V. myrtillus*. U kmenů PFO-1 a PFO-2 jsme tvorbu mikrosklerocií nepozorovali, kolonizace kořenů *V. myrtillus* svou morfologií – smotky hyf v epidermálních buňkách – v některých případech připomínala ErM.

Mykorhizní status *P. fortinii* je nejasný, její vliv na hostitelské rostliny se v experimentech pohybuje od pozitivního po negativní (Jumpponen 2001). *P. fortinii* tvořila v *in vitro* podmínkách tenký hyfový plášť a Hartigovu síť u semenáčků *Salix glauca* (Fernando a Currah 1996). Jumpponen a kol. (1998) pozorovali v *in vitro* podmínkách nárůst biomasy u *Pinus concorta* po inokulaci *P. fortinii*, který byl umocněn dodáním glukózy do média. Při pěstování v květináčích se efekt ztrácel. Autoři přisuzují tento jev vlivu respirace *P. fortinii* v uzavřeném *in vitro* systému a tedy zvýšené

dostupnosti CO<sub>2</sub> pro rostlinu. Podpoření růstu *V. myrtillus* a *P. abies* v naší práci může být částečně přisouzeno podobnému vlivu.

Jumpponen a kol. (1998) pozorovali zvýšený příjem P u semenáčků *P. concerta* inokulovaných *P. fortinii*, hyfy kolonizovaly kořeny inter- a intracelulárně a vytvářely mikrosklerocia. Mikrosklerocia však výměnu látek nezajišťují, k tomuto účelu pravděpodobně slouží obtížně pozorovatelné inter- a intracelulárně rostoucí hyalinní hyfy mykobionta (Barrow 2003), které zároveň zajišťují výživu mikrosklerocií. Přenos látek může být usnadněn jejich výrazně vyšším poměrem povrchu k objemu ve srovnání s kulovitými mikrosklerocii. PFO-H a PFO-F v naší práci vytvářely četné hyalinní hyfy (Obr. 14), pozorovaný pozitivní vliv na růst inokulovaných rostlin může být tedy přisouzen právě jim. Přítomnost mikrosklerocií tedy nevylučuje pozitivní působení mykobionta na rostlinu a přenos látek mezi nimi. *P. fortinii* se jeví jako kandidát propojení EcM jehličnanů (*P. abies*) a ErM rostlin podrostu (*V. myrtillus*).

## 6.2. Interakce ErM a EcM rostlin s EcM mykobionty

Některé práce popisují kolonizaci vlasových kořenů ErM rostlin bazidiomycety (Seviour a kol. 1973, Bonfante-Fasolo 1980, Allen a kol. 2003), Smith a kol. (1995) podal zprávu o EcM špičkách na kořenech *Gaultheria shallon* a *Rhododendron macrophyllum*. V naší práci však bazidiomycety *Suillus luteus*, *Entoloma conferendum*, *Boletus badius* a *Laccaria proxima* nekolonizovaly kořeny *V. myrtillus* (Tabulka 4). Vliv *L. proxima* a *S. luteus* na růst semenáčků byl negativní. Tyto houby však za daných podmínek nekolonizovaly ani kořeny *P. abies* (Tabulka 4). Vznik ektomykorhizy je ovlivňován mj. nabídkou dostupných fotoasimilátů (Herrmann a kol. 2004), spektrem a intenzitou použitého osvětlení (Niemi a kol. 2005). V námi použitých růstových komorách bylo osvětlení standardní a vzhledem k tomu, že jsme pozorovali tvorbu ektomykorhiz mezi *P. abies* a houbami *Cenococcum geophilum* a *Cadophora finlandica*, příčinou neúspěchu jejich tvorby mezi použitými bazidiomycety a *P. abies* je pravděpodobně vzájemná nekompatibilita genotypů.

Bazidiomycety netvořily ektomykorhizy na médiu MMN ani na médiu MMN/10, které obsahovalo 10x méně minerálních i organických živin. Brun a kol. (1995) pozorovali potlačení tvorby ektomykorhiz při snížení obsahu N v mediu, optimální poměr P:N (látkových množství) pro vznik mykorhiz byl asi 3. V médiu MMN i MMN/10, která jsme použili, je poměr P:N roven 2,96. Tento fakt také podporuje domněnku, že příčinou neúspěchu tvorby ektomykorhiz byla nekompatibilita genotypů.

Použitý *in vitro* systém nebyl pro studium tvorby ektomykorhiz nevhodný, což dokládá inokulace *P. abies* askomycetem *C. geophilum* CGE-4, která vedla ke vzniku Hartigovy sítě a hyfového pláště na mediu MMN i MMN/10 (Obr. 13, Tabulka 4). Použitý *in vitro* systém mohl být pro *C. geophilum* vhodný z několika důvodů: *C. geophilum* je symbiontem juvenilních rostlin *Picea* (Hasselquist a kol. 2005) a často nejhojnějším symbiontem dospělých *P. abies* (Baier a kol. 2006), použité semenáčky byly cca 2 měsíce staré; *C. geophilum* patří mezi tzv. „short-distance exploration type“ - EcM typ charakteristický silným hyfovým obalem s občasnými rhizomorfy (Agerer 2001) využívající živiny z blízkého okolí mykorhizy; podmínky v Petriho misce mohou vzhledem k omezenému prostoru takovému typu vyhovovat.

Na médiu MMN jsme pozorovali tvorbu mocnějšího hyfového pláště než na MMN/10 (Obr. 13). Tento jev byl pravděpodobně způsoben celkově nižším růstem *C. geophilum* na médiu MMN/10. Vyšší růst mycelia v experimentálním systému umožňuje častější kontakt hyf s kořeny potenciálního hostitele, a tedy vyšší pravděpodobnost vzniku ektomykorhiz, na druhou stranu vyšší růst mycelia přináší akumulaci sekundárních metabolitů houby a odpadních látek, které mohou vést k poškození hostitelské rostliny (Hutchison a Piche 1995). Použití média MMN s obsahem glukózy  $10 \text{ g l}^{-1}$  i MMN/10 s obsahem  $1 \text{ g l}^{-1}$  se vzhledem k interakci *P. abies*-*C. geophilum* ukázalo jako vhodné, protože růst mycelia byl dostatečný, nedocházelo však k poškození semenáčků produkty metabolismu mykobionta.

Tabulka 4: Shrnutí dosažených výsledků. Vysvětlení jednotlivých označení hub v textu. *IK-M*: intracelulární kolonizace kořene, přitomná mikrosklerocia, charakteristické pro DSE asociaci; *IK-H*: intracelulární kolonizace kořene – hyfy pronikající buňky, vyrůstá v nich smotky; *IK-R*: intracelulární kolonizace pozorovaná u *EcM* hostitelských rostlin a *R. ericae* – kolonizace buněk primární kůry (v případě *B. nana* i centrálního válce) přímými hyfami místy se větvícími; *ER*: buňky vyplněné smotky hyf charakteristickými pro *ErM*; *EK*: *EcM* asociace – přitomná Hartigova síť; *EM*: morfologie kořenových špiček podobná *EcM* morfologii; *PR/NR*: pozitivní/negativní vliv na růst kořene či prýtu inokulované rostliny; 0: žádná pozorovaná kolonizace kořene či vliv na rostlinu; “-“: neustavováno; “( )“: občasná, málo intenzivní kolonizace. Žluté značeny houby, které interagují s *ErM* i *EcM* hostitelskými rostlinami.

Typ	DSE		ErM?	ErM	?	?	?	ErM	EcM?	EcM	EcM	EcM	EcM	EcM?	EcM			
	PFOF, PFOH	PFO1, PFO2																
$\underline{ErM}$	houba																	
	rostlina																	
	<i>V. myrtillus</i>	IK-M, IK-H, PR	IK-H	0	ER	ER	(ER)	ER	(ER)	PR, (ER)	ER	(ER)	PR	(PR)	0	0, (NR)	0	
$\underline{EcM}$	<i>P. abies</i>	IK-M, IK-H, PR	0	(IK-R), PR	(IK-R), PR	(IK-R), PR	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	PR, EK	0	EK	-	0	0	0
	<i>P. sylvestris</i>	0	-	-	0	-	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	IK-R, EM	-	0	-	-	-	-	-
	<i>B. nana</i>	-	-	-	-	-	0	0	0	IK-R, EM	IK-R, EM	-	-	-	-	-	-	-

V podmínkách *ex vitro* jsme nepozorovali ovlivnění morfologie kořenů ani jejich kolonizaci u semenáčků *P. sylvestris* a *P. abies*. Na vině byl špatný růst *C. geophilum* v použitém substrátu. Přes relativně masivní inokulaci – ve srovnání například s prací Hasselquist a kol. (2005) kteří inokulovali substrát přiložením 1cm<sup>3</sup> myceliem porostlého agaru ke kořenům semenáčků – jsme v substrátu nepozorovali růst mycelia. V předběžném pokusu jsme testovali růst *C. geophilum* v rašelinném substrátu zalitém médiem MMN; mycelium po dvou týdnech prorůstalo substrát. Pro další pokusy bude pravděpodobně použit tento typ inokulace substrátu.

Přítomnost mycelia *C. geophilum* CGE-3 a méně CGE-4 v Pokusu 1 výrazně podporovala růst *V. myrtillus* (Obr. 8, 18, Tabulka 4). EcM houby produkují auxiny (Niemi a kol. 2002), jejich produkce je součástí vzniku EcM asociace (Herrmann a kol. 2004). V literatuře jsem však nenašel práci zabývající se produkcí auxinu u *C. geophilum*, proto jsme ve spolupráci s Doc. RNDr. Evou Zažímalovou (Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, UEB AVČR) v předběžném pokusu stanovili jeho produkci myceliem *C. geophilum*. Zjistili jsme, že mycelium bylo producentem významného množství IAA. Ačkoliv mycelium CGE-3 a CGE-4 tedy pravděpodobně v Pokusu 1 produkovalo IAA, nedošlo k tvorbě EcM, nýbrž k podpoření růstu semenáčků *V. myrtillus*.



Obr. 18: Srovnání *V. myrtillus* inokulované EcM *C. geophilum* CGE-3 (vpravo) s kontrolní variantou (vlevo) v Pokusu 1. Úsečka odpovídá 1cm.

Alternativní vysvětlení nabízí již zmíněná produkce CO<sub>2</sub> myceliem CGE-3 a CGE-4, avšak jejich růst (a tudíž produkce CO<sub>2</sub>) nebyl výrazně vyšší než u ostatních testovaných hub, které růst *V. myrtillus* nepodporovaly. Mycelium také může ovlivňovat osmotické vlastnosti agaru – zvyšovat dostupnost vody – a tím podporovat růst semenáčků.

Přes podpoření růstu semenáčků *V. myrtillus* jsme nepozorovali kolonizaci jejich kořenů hyfami CGE-3 ani CGE-4. Přímé propojení *P. abies* a *V. myrtillus* hyfy *C. geophilum* pravděpodobně nezprostředkovávají, jeho pozitivní vliv na růst *V. myrtillus* může však mít ekofyziologický význam.

### 6.3. Interakce ErM a EcM rostlin s *Oidiodendron maius* a s mykobionty z řádu *Helotiales*

*Oidiodendron maius* je vedle *Rhizoscyphus ericae* nejstudovanějším symbiontem vřesovcovitých rostlin, spektrum jeho potenciálních hostitelských rostlin je však pravděpodobně širší: Bergero a kol. (2000) izolovali z EcM špiček kořenů *Quercus ilex* několik druhů *Oidiodendron*, mezi nimi i *O. maius*. Stejně druhy byly zároveň izolovány z vřesovcovité rostliny *Erica arborea*. V následných *in vitro* syntézách vytvářely izoláty *Oidiodendronů* ErM asociace s vlasovými kořeny *E. arborea*. V naší práci jsme pozorovali tvorbu ErM struktur v kořenech *V. myrtillus* a velmi řídkou kolonizaci buněk primární kůry *P. abies* hyfami *O. maius* OMA-B. Toto pozorování je v souladu s hypotézou, že *O. maius* může kolonizovat EcM špičky společně s EcM houbami, význam této asociace však není objasněn. V naší práci OMA-B podporoval větvení kořenů *P. abies* (Obr. 11, Tabulka 4), v práci Abuzinadah a Read (1989) stimuloval bez tvorby asociací s kořeny *O. griseum* růst *B. pendula* na médiu, kde jediným zdrojem N byly proteiny.

*Meliniomyces bicolor* je častým mykobiontem EcM morfotypu *Piceirhiza bicolorata* (Hambleton a Sigler 2005), v *in vitro* syntézách Vrålstad a kol. (2002b) vytvářel EcM struktury (hyfový plášť a Hartigovu síť) u *B. pubescens*, *P. abies* a *P. sylvestris*, avšak netvořil ErM v kořenech *V. vitis-idaea*. Naše výsledky jsou v přímém rozporu s tímto pozorováním: *M. bicolor* MBI-1, přestože byl izolován ze zdánlivě EcM špičky *P. abies*, netvořil EcM v kořenech *P. abies*, kořeny *V. myrtillus* naopak kolonizoval masivně

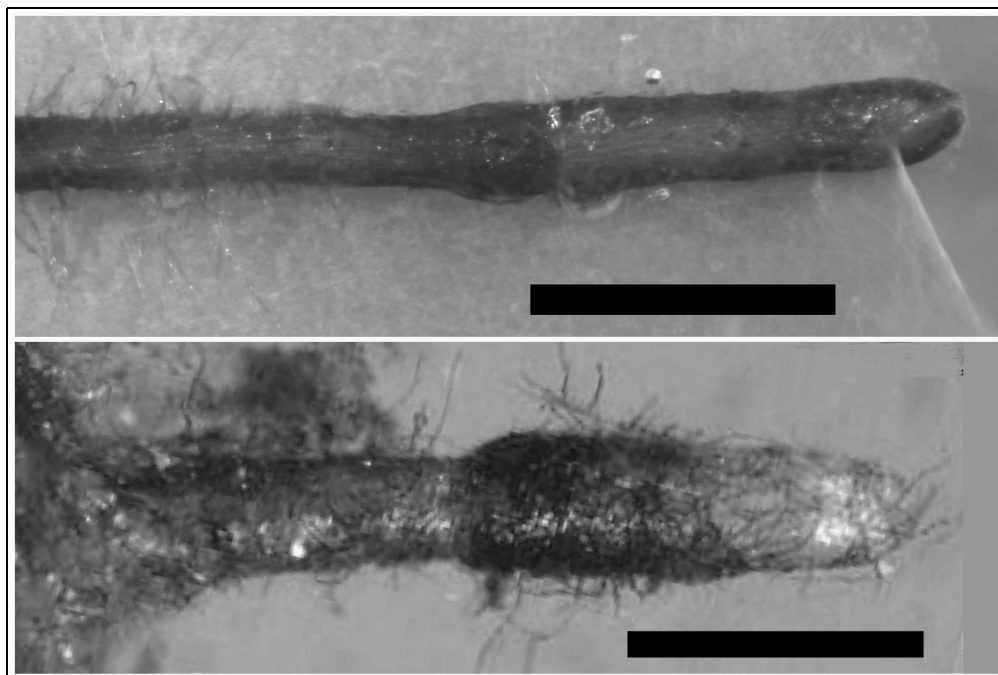
a vytvářel v nich ErM (Obr. 9f, Tabulka 4). Příčinou můžou být rozdílné podmínky experimentů, nebo taxonomická nejasnost druhu *M. bicolor*.

*Meliniomyces variabilis* byl izolován z kořenů rostlin náležících do čeledí *Ericaceae*, *Fagaceae*, *Orchidaceae*, *Pinaceae*, *Cornaceae* a *Salicaceae*. Výsledky pokusů o syntézy mykorrhiz mezi *M. variabilis* a ErM a EcM hostiteli jsou nejednotné: hyfy *M. variabilis* kolonizovaly buňky primární kůry *Picea sitchensis*, nebyl pozorován negativní vliv na zdravotní stav semenáčků; při inokulaci *Picea mariana* kolonizace kořenů pozorována nebyla (podle Hambleton a Sigler 2005). Vrålstad a kol. (2002b) inokulovali semenáčky *Betula pubescens*, *P. abies*, *P. sylvestris* a *V. vitis-idaea* a nepozorovali kolonizaci kořenů ani v jednom z případů; v práci Berch a kol. (2002) *M. variabilis* izolovaný z ErM hostitele tvořil ErM struktury v kořenech vřesovcovité rostliny *Gaultheria shallon*. Piercey a kol. (2002) popisují současnou kolonizaci kořenů *P. mariana* a *R. groenlandicum*: v kořenech vřesovcovité rostliny pozorovali tvorbu ErM, buňky primární kůry *P. mariana* byly kolonizovány hyfami *M. variabilis*.

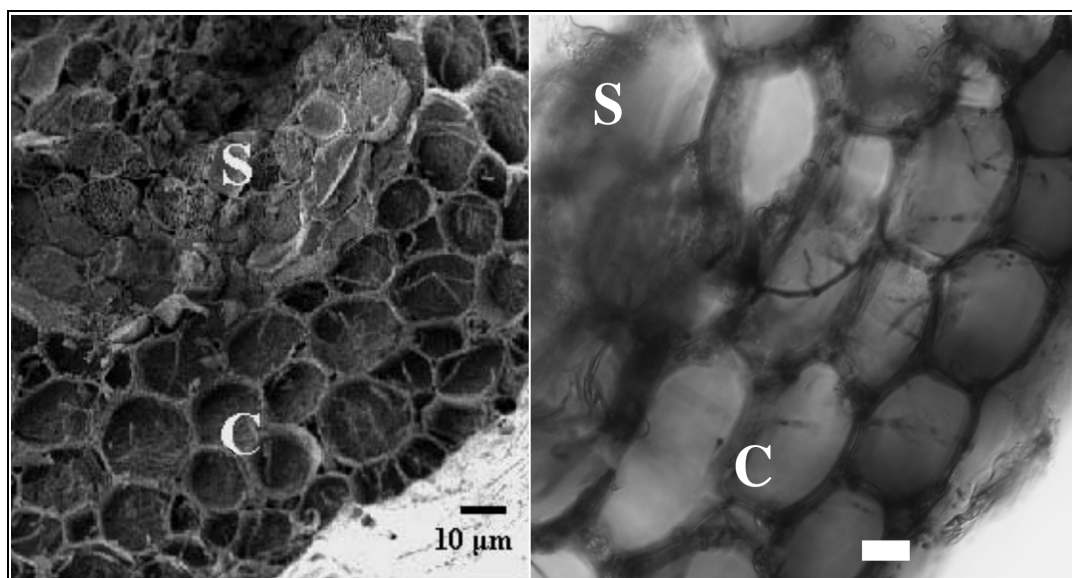
Inokulace *P. abies* a *P. sylvestris* myceliem *M. variabilis* MVA-1 a MVA-2 vedla v naší práci k relativně řídké kolonizaci buněk primární kůry hyfami mykobionta. Charakter kolonizace byl podobný jako v práci Piercey a kol. (2002). Přítomnost mycelia vedla v několika případech k modifikaci kořenových špiček *P. abies* do podoby charakteristické pro EcM (Obr 10b, 19), u *P. sylvestris* jsme u několika kořenových špiček pozorovali typický znak EcM: vidličnaté větvení (Obr. 5, 6, 10, Tabulka 4).

Ve vlasových kořenech *V. myrtillus* tvořily hyfy *M. variabilis* struktury připomínající ErM (Obr. 9b, c, Tabulka 4). Výsledky syntéz byly podobné u obou použitých kmenů - MVA-1 a MVA-2, přestože pochází z různých organismů: MVA-1 byl izolován z kořene *P. abies* a MVA-2 z plodnice EcM houby *Hydnotrya tulasnei*.





Obr. 19: Srovnání morfologie kořenové špičky *P. abies* inokulované *M. variabilis* MVA-2 v podmínkách *in vitro* (nahore), Pokus 1 a terénního vzorku EcM špičky *P. sitchensis* tvořené mykobionty agregátu *R. ericae* (dole), spodní obrázek převzat z Palfner a kol. (2005). Úsečky odpovídají 1mm.



Obr. 20: Kolonizace buněk primární kůry *P. mariana* (vlevo) a *P. abies* (vpravo) hyfami *R. ericae*, C – primární kůra, S – centrální váleček, úsečky odpovídají 10 $\mu$ m. Vlevo: SEM mikrofotografie, mrazové lámání, převzato z Piercey a kol. (2002). Vpravo: mikrofotografie pořízená světelným mikroskopem, Pokus 1.



Nejmasivnější kolonizaci kořenů *P. sylvestris* a *P. abies* v podmínkách *in vitro* způsoboval v naší práci *Rhizoscyphus ericae* RER-1 (Obr. 10, Tabulka 4), tato kolonizace se nápadně podobala kolonizaci buněk primární kůry kořenů *P. mariana* působenou *R. ericae* UAMH 8680 v práci Piercey a kol. (2002) (Obr. 20). Podobně jako v naší práci, autoři nepozorovali i přes masivní kolonizaci buněk primární kůry negativní vliv mykobionta na zdravotní stav semenáčků, jeho přítomnost naopak zvyšovala délku kořenů *P. mariana*.

Není zřejmé, zda kolonizované buňky byly živé. Charakter kolonizace (přímé hyfy netvořící smotky) připomíná kolonizaci nekompatibilního hostitele *Trifolium pratense* v práci Bonfante-Fasolo a kol. (1984). Na rozdíl od této práce však (s výjimkou *B. nana*) nedocházelo ke kolonizaci středního válce. Pomocí elektronové mikroskopie jsme se pokusili zjistit, zda jsou hyfy odděleny od obsahu buňky membránou hostitele, ale nepodařilo se nám hyfy lokalizovat (výsledky neuvedeny). Pokud by se jednalo o nekrotrofní vztah, byla by primární kůra některých pokusných rostlin *de facto* celá odumřelá, což je na první pohled v rozporu s dobrým zdravotním stavem infikovaných semenáčků. Na druhou stranu je známo, že například u trav primární kůra často odumírá a funkci pokožky plní endodermis; tento jev nemá na funkci kořene negativní vliv.

EcM houby produkují celou řadu rostlinných růstových regulátorů: auxiny, cytokininy, ethylen, polyaminy (Niemi a kol. 2004). Vidličnaté větvení u *P. sylvestris* je podporováno právě auxinem (Niemi a kol. 2002). Existují práce popisující pozitivní vliv ErM hub na zakořeňování vřesovcovitých rostlin (Scagel 2005), v literatuře jsem však našel jedinou práci popisující produkci auxinu houbami v přítomnosti tryptofanu (viz Villarreal-Ruiz a kol. 2004). Piercey a kol. (2002) se prodloužením růstu kořenů *P. mariana* způsobeného *R. ericae* příliš nezaobírají, příčinou prý mohla být vágně označená „difuzibilní složka podporující růst“ nebo absorpce živin uvolněných z mrtvých částí mycelia. V naší práci jsme pozorovali tvorbu vidličnatě větvených špiček u *P. sylvestris* po inokulaci *M. variabilis* MVA-1 a *R. ericae* RER-1 (Obr. 6). Předpokládáme tedy, že MVA-1 a RER-1 produkují růstový regulátor s funkcí podobnou auxinu. Kořeny *P. abies* a *P. sylvestris* reagují na tuto látku tvorbou kořenových špiček morfologicky připomínajících ektomykorhizy, avšak nedojde ke tvorbě hyfového pláště

ani Hartigovy sítě. Místo toho hyfy mykobiontů kolonizují buňky primární kůry. EcM morfologie tedy u *P. abies* a *P. sylvestris* není nutně specifickou odpovědí na přítomnost kompatibilní EcM houby. Identifikaci hormonální složky produkovanou ErM houbami by měla být jedním z cílů výzkumu v oblasti interakce EcM rostlin a ErM hub.

Morfologie kořenů však může být přítomností mykobiontů zásadně ovlivněná i nepřímo: například změny v dostupnosti vody pro kořeny mají podstatný vliv na jejich podobu a délku, určitou roli podle mého názoru může hrát i kompetice kořenů s myceliem o dostupné živiny.

*R. ericae* vytvářel ve vlasových kořenech *V. myrtillus* struktury charakteristické pro ErM (Obr. 9a), což je opět v souladu s výsledky Piercey a kol. (2002).

*R. ericae* RER-1 jako jediný z použitých mykobiontů kolonizoval kořeny *P. sylvestris* a *B. nana* také v podmínkách *ex vitro*, tedy v rašelinném substrátu. Morfologie kořenových špiček *B. nana* připomínala EcM, jak je patrné na Obrázku 16. Pokud je nám známo, jde o první zprávu o asociaci mezi kořeny této rostliny a *R. ericae*.

Mycelium *R. ericae* a *P. fortinii* prorůstalo viditelně substrát<sup>6</sup>, u ostatních použitých hub jsme kolonizaci substrátu nepozorovali, proto pravděpodobně nemohlo dojít ani ke kolonizaci kořenů pokusných rostlin ostatními testovanými houbami.

*Cadophora finlandica* je častým mykobiontem EcM morfotypu *P. bicolorata* (Vrålstad a kol. 2002b, Rosling a kol. 2003), její schopnost tvořit EcM byla ověřena v laboratorních podmínkách. Villarreal-Ruiz a kol. (2004) prokázali schopnost *C. finlandica* simultánně kolonizovat kořeny *P. sylvestris* a *V. myrtillus*. U *P. sylvestris* pozorovali tvorbu EcM špiček s vyvinutou Hartigovou sítí, v epidermálních buňkách vlasových kořenů *V. myrtillus* pozorovali smotky hyf podobné ErM. Autoři sledovali i vliv mykobionta na růst a morfologii *V. myrtillus*: semenáčky po 3 měsících růstu s *C. finlandica* nejevily známky poškození, jejich hmotnosti se nelišily od kontrolních rostlin, byla však 8krát zvýšená délka kořenů a 6krát počet kořenových špiček. Tento efekt byl zachován ale snížen, když mycelium *C. finlandica* bylo v kontaktu i s kořeny *P. sylvestris*. V naší práci *C. finlandica* vytvářela EcM asociaci s kořeny *P. abies*

<sup>6</sup> Tuto schopnost měla také *C. finlandica* CF3, u té však nebyla tvorba mykorhiz v podmínkách *ex vitro* testována, protože CF3 jsme v době *ex vitro* pokusů ještě neměli k dispozici.

a podporovala jejich větvení (Obr. 11, 12). Asociace s kořeny *V. myrtillus* je méně jednoznačná, pozorovali jsme kolonizaci povrchu kořene a občasnou kolonizaci epidermálních buněk smotky hyf (Obr. 9d, e), vliv na růst kořenů byl také spíše pozitivní, avšak tato pozorování vyžadují detailnější studium, aby bylo možné tvrdit, že vzniklá asociace je ErM.

#### 6.4. Shrnutí

Vřesovcovité rostliny často tvoří souvislý podrost jehličnatých lesů dominovaných *P. abies*. Vztah *P. abies* a *V. myrtillus* je obecně vnímán jako negativní; semenáčky smrků se těžko uchycují v souvislém porostu vřesovcovitých rostlin kvůli konkurenci o světlo a živiny, výluhy z *V. myrtillus* působí alelopaticky na semenáčky *P. abies* – inhibují jejich klíčení a růst kořenů (Pellissier 1994, Gallet 1994). Vzhledem k tomu, že kořeny EcM *P. abies* nerostou *de facto* v půdě nýbrž v hyfovém obalu svých mykobiontů, je nutné znát reakci těchto mykobiontů na alelopatické působení *V. myrtillus*. Růst a respirace EcM houby *Hebeloma crustuliniforme* byly inhibovány fenolickými látkami z humusu (Souto a kol. 2000). Výluh z vřesovcovité rostliny *Kalmia angustifolia* však v určitých koncentracích stimuloval růst EcM hub *Laccaria laccata* a *Paxillus involutus* (Zeng a Mallik 2006). Zdá se tedy, že EcM mykobionti mohou být na alelopatické působení přizpůsobeni. V naší práci jsme pozorovali pozitivní vliv EcM mykobionta *C. geophilum* na růst *V. myrtillus*, což by mohlo znamenat výhodu pro růst *V. myrtillus* mezi EcM kořeny *P. abies*. Vztah obou rostlin lze také převést na vztah jejich mykobiontů: DSE mykobiont *P. fortinii* v naší práci kolonizoval kořeny *P. abies* i *V. myrtillus*, charakter kolonizace byl stejný v obou případech. *O. maius* a mykobionti náležící do řádu *Helotiales* také interagovali s kořeny *P. abies* i *V. myrtillus*. Obě rostliny mohou sdílet stejné mykobionty, zdá se tedy, že vztah mezi těmito rostlinami nepředstavuje pouze alelopatické působení.

Nejmasivněji z mykobiontů z řádu *Helotiales* kolonizoval oba typy kořenů *R. ericae* RER-1. Otázkou zůstává, jaký může být ekofyziologický význam této kolonizace. V literatuře jsem práci zmiňující izolaci *R. ericae* z kořenů volně rostoucích EcM rostlin nenašel, není tedy zřejmé, zda *R. ericae* je či není přirozeným mykobiontem EcM

kořenů. V naší práci opakovaně prokázal schopnost intracelulárně kolonizovat kořeny *P. abies*, *P. sylvestris* a *V. myrtillus*, v případě *P. sylvestris*, *B. nana* a *Vaccinium* sp. (pozorování z předchozích pokusů) i v *ex vitro* podmínkách, teoreticky by jím tedy být mohl. V případě *M. variabilis*, *M. bicolor* a *C. finlandica* není pochyb o tom, že kolonizují EcM hostitele; byly izolovány z kořenů *P. abies*. Význam mykobiontů z agregátu *R. ericae* tvořící EcM asociaci dokládá práce Palfner a kol. (2005): 10% EcM špiček 30letých *P. sitchensis* popsali jako EcM tvořenou *R. ericae* agregátem.

Pro semenáčky *P. abies* rostoucí v podrostu tvořeném *V. myrtillus* znamená schopnost tolerovat mykobionty *V. myrtillus* výhodu, jelikož je jimi *de facto* inokulován prostřednictvím ErM vlasových kořenů. Pokud by se prokázalo, že vzniklé asociace jsou mykorhizní, semenáčky *P. abies* by měly značně usnadněnou fázi růstu v podrostu tvořeném vřesovcovitými rostlinami.

ErM mykobionti jsou známí svou schopností zvyšovat toleranci hostitelských rostlin vůči těžkým kovům (Bradley a kol. 1981, Perotto a kol. 2002), mohly by tedy tuto schopnost přinášet i EcM hostitelům. Vrålstad a kol. (2000) pozorovali u semenáčků *Salix phylicifolia*, *P. sylvestris* a *B. pubescens* rostoucích na okrajích výsypky dolu na měď převahu EcM morfotypu *P. bicolorata* tvořenou mykobionty z agregátu *R. ericae*. Autoři se domnívají, že asociace s těmito mykobionty umožňovala semenáčkům tolerovat vysoké koncentrace těžkých kovů v půdě. Dělbou funkcí mezi různými mykobionty na témže hostiteli ilustruje fakt, že *C. finlandica* byla přítomná převážně v EcM špičkách odebraných z minerálního horizontu, kdežto špičky tvořené *C. geophilum* se vyskytovaly hlavně v horizontu organickém (Rosling a kol. 2003).

Schopnost *C. finlandica* CFI-3, *C. geophilum* CGE-4, *R. ericae* RER-1, *P. fortinii* PFO-H kolonizovat kořeny *P. abies* a *Vaccinium corymbosum* v podmínkách *ex vitro* je v současné době ověřována v Pokusu 3. Dále budeme zjišťovat funkčnost případných asociací pomocí sledování obsahu <sup>15</sup>N dodaného ve formě aminokyseliny glycin v prýtech rostlin. Pro ověření mykorhizního statutu vzniklých mykorhiz jsou totiž *in vitro* pokusy nedostačující: situace, kdy je například jemný vlasový kořen *V. myrtillus* ze všech stran atakován myceliem jediné inokulované houby, je velmi vzdálená skutečné situaci v půdě (Read 1996). Read (1996) dokonce navrhuje inokulovat pokusné rostliny

---

směsí testovaných mykorhizních a saprotrofních hub a používat pro kultivaci substráty z přirozených stanovišť. Tento návrh je však kvůli své složitosti *de facto* nerealizovatelný.

V první části Pokusu 3 jsme ověřili, že je možné použít glycin  $^{15}\text{N}$  pro sledování transportu N z půdy do rostlin. Na základě výsledků pokusu (Obr. 17) jsme vybrali *P. fortinii* PFO-H jako zástupce DSE hub pro Pokus 3. V podobném pokusu zjišťovali Xiao a Berch (1999) schopnost ErM hub předávat N pocházející z organických sloučenin hostitelským *G. shallon*. Pouze inokulované rostliny měly k organickým zdrojům N přístup. Autoři navrhují velmi zajímavou myšlenku: používat pro zkoumání tvorby ErM v systémech *in vitro* místo anorganických zdrojů komplexní organické zdroje N (v současné době se hojně využívá médium MMN, kde zdrojem N je dihydrogenfosforečnan amonný), aby byla rostlina „nucena“ vytvářet mykorhizy s inokulovaným mykobiontem.

*V době sepisování této práce nebyly známé výsledky druhé části Pokusu 3, ve které jsme zjišťovali vliv mykobiontů na P. abies a V. myrtillus ex vitro.*

## 7. Závěry

*H1: Kořeny potenciálně ektomykorhizních hostitelských rostlin a vřesovcovitých rostlin mohou být kolonizovány stejným houbovým symbiontem*

Tato hypotéza byla potvrzena; 8 ze 17 testovaných kmenů hub interagovalo s kořeny obou typů rostlin:

Hyfy *Phialocephala fortinii* PFO-H a PFO-F kolonizovaly kořeny *Vaccinium myrtillus* a *Picea abies*, v epidermálních buňkách *V. myrtillus* a v buňkách primární kůry a centrálního válce *P. abies* vytvářely četná mikrosklerocia.

Hyfy *Oidiodendron maius* OMA-B, *Meliniomyces bicolor* MBI-1, *M. variabilis* MVA-1 a MVA-2 a *Rhizoscyphus ericae* RER-1 tvořily v kořenech *V. myrtillus* struktury charakteristické pro erikoidní mykorhizu. Jejich hyfy kolonizovaly také buňky primární kůry *P. abies*. V případě *O. maius* OMA-B a *M. bicolor* byla tato kolonizace sporadická, v případě *R. ericae* RER-1 masivní. *R. ericae* stejným způsobem kolonizoval kořeny *P. abies*, *Pinus sylvestris* a *Betula nana* i v podmínkách *ex vitro*.

*Cadophora finlandica* vytvářela ektomykorhizu v kořenech *P. abies* a útvary podobné erikoidní mykorhize v kořenech *V. myrtillus*

*H2: Vzniklé asociace jsou mykorhizní*

V případě interakce *P. abies* – *C. finlandica* jsme pozorovali Hartigovu síť, útvar charakteristický pro ektomykorhizu; u jiných interakcí není mykorhizní status jasný, pozorování však indikují, že některé mají potenciál pozitivně ovlivňovat hostitelské rostliny.

## 8. Poznámky

*Na přiloženém ceděčku je diplomová práce v pdf formátu. Jeho výhodou je vyšší kvalita obrázků a „klikací“ hypertextové odkazy v textu odkazující na konkrétní položky v seznamu citované literatury, na příslušné obrázky a na internetové stránky. Rád poskytnu další informace o tématu této práce, fotografie či literaturu. Zájemce mě může napsat na [mates.fendrych@seznam.cz](mailto:mates.fendrych@seznam.cz)*

Latinské názvy podle NCBI Taxonomy browser

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>

Webové stránky o mykorhize

<http://www.ibot.cas.cz/mykosym/mykorhiza.html>

<http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html>

<http://www.deemy.de/>

<http://mycor.nancy.inra.fr/>

## 9. Abstract

Roots of ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal plants are believed to be colonized by fungi belonging to different taxonomic groups. However, both frequent isolations of ericoid mycorrhizal fungi from ectomycorrhizal root tips and a few recent studies (Vrålstad et al. 2000, 2002b, Piercey et al. 2002, Hambleton & Sigler 2005) indicate that there is a group of mycobionts colonizing both types of roots. Ectomycorrhizal morphotype *Piceirhiza bicolorata* was shown to be induced by *Meliniomyces* sp. belonging to the *Rhizoscyphus ericae* aggregate (Vrålstad et al. 2000). The ability to colonize roots of potentially ectomycorrhizal and ericoid plants simultaneously was proven in *in vitro* experiments in the case of *Rhizoscyphus ericae* (Piercey et al. 2002) and *Cadophora finlandica* (Villarreal-Ruiz et al. 2004). DSE fungi (“dark septate endophytes”, formerly termed pseudomycorrhizal) represent another group of mycobionts colonizing both ericoid and potentially ectomycorrhizal plant roots.

In the present work, we inoculated roots of ericoid (*Vaccinium myrtillus*) and potentially ectomycorrhizal plants (*Picea abies*, *Pinus sylvestris* and *Betula nana*) with typically ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi and mycobionts belonging to the *R. ericae* aggregate. The experiments were performed in both *in vitro* and *ex vitro* conditions.

Eight out of 17 strains tested in this study interacted with both types of roots. Typically ectomycorrhizal *Cenococcum geophilum* supported growth of *V. myrtillus* *in vitro* without colonizing its roots, the same strain formed ectomycorrhiza (hyphal mantle and Hartig net) with *P. abies* *in vitro*.

Typically ericoid mycorrhizal *R. ericae* colonized intracellularly cortical cells of *P. abies*, *P. sylvestris* and *B. nana*. Morphology of their root tips resembled ectomycorrhizal root tips but neither hyphal mantle nor Hartig net were present. *R. ericae* formed ericoid mycorrhiza in the roots of *V. myrtillus*. Similar results were obtained for interaction of *Meliniomyces variabilis* and *M. bicolor* with roots of *P. abies*. In the *V. myrtillus* roots, *M. variabilis* and *M. bicolor* formed structures resembling ericoid mycorrhiza.



*Cadophora finlandica* formed ectomycorrhiza (Hartig net) with the roots of *P. abies* in vitro. In the case of *V. myrtillus* roots, we observed structures resembling ericoid mycorrhiza

DSE *Phialocephala fortinii* formed microsclerotia in both types of roots without negatively affecting growth of experimental plants.

Our findings show that roots of ectomycorrhizal and ericoid plants can be inhabited with the same mycobionts. The mycorrhizal status of some of these associations is not clear yet, but there is increasing evidence that both types of roots could be linked via shared mycobionts in natural conditions.

---

## 10. Citovaná literatura

- Abuzinadah RA, Read DJ. 1989.** The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula* L.) infected with different mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 112: 55-60
- Addy HD, Piercey MM, Currah RS. 2005.** Microfungal endophytes in roots. *Canadian Journal of Botany* 83: 1-13
- Agerer R. 2001.** Exploration types of ectomycorrhizae—a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107–114
- Allen TR, Millar T, Berch SM, Berbee ML. 2003.** Culturing and direct DNA extraction find different fungi from the same ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist* 160: 255–272.
- Baier R, Ingemhaag J, Blaschke H, Goettlein A, Agerer R. 2006.** Vertical distribution of an ectomycorrhizal community in upper soil horizons of a young Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) stand of the Bavarian Limestone Alps. *Mycorrhiza* 16: 197–206
- Bajwa R, Read DJ. 1985.** The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. IX. Peptides as nitrogen sources for the ericoid endophyte and for mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. *New Phytologist* 101: 459–467
- Barrow JR. 2003.** Atypical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. *Mycorrhiza* 13: 239-247
- Beguiristain T, Lapeyrie F. 1997.** Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development. *New Phytologist* 136: 525-532
- Bergero R, Perotto S, Girlanda M, Vidano G, Luppi AM. 2000.** Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology* 9: 1639–1649

- Berch SM, Allen TR, Berbee ML, 2002.** Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244 : 55–66
- Berta G, Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Influence of mycorrhizal infection on root development in *Calluna vulgaris* (L.) hull [sic.] seedlings. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*, Paris, France: INRA, 673–676.
- Bonfante-Fasolo P, Gianinazzi-Pearson V. 1979.** Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the *Ericaceae*. I. Naturally infected hair roots of *Calluna vulgaris* L. *New Phytologist* 83: 739–744
- Bonfante-Fasolo P. 1980.** Occurrence of a Basidiomycete in living cells of mycorrhizal hair roots of *Calluna vulgaris*. *Transactions of the British mycological Society* 75: 320-325
- Bonfante-Fasolo P, Berta G, Gianinazzi-Pearson V. 1981.** Ultrastructural aspects of endomycorrhizas in the *Ericaceae* 2. Host endophyte relationships in *Vaccinium myrtillus* L. *New Phytologist* 89: 219-224
- Bonfante-Fasolo P, Gianinazzi-Pearson V, Martinengo L. 1984.** Ultrastructural aspects of endomycorrhiza in the *Ericaceae*. IV. Comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non-host plants. *New Phytologist* 98: 329–333
- Bradley R, Burt AJ, Read DJ. 1981.** Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292, 335 – 337
- Briggs CL, Ashford AE. 2001.** Structure and composition of the thick wall in hair root epidermal cells of *Woolfsia pungens*. *New Phytologist* 149: 219-232
- Brun A, Chalot M, Finlay RD, Soderstrom B. 1995.** Structure and function of the ectomycorrhizal association between *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. and *Betula pendula* Roth. *New Phytologist* 129: 487-493
- Cairney JWG, Ashford AE, Allaway WG. 1989.** Distribution of photosynthetically fixed carbon within root systems of *Eucalyptus pilularis* plants ectomycorrhizal with *Pisolithus tinctorius*. *New Phytologist* 112:495–500
- Cairney JWG, Ashford AE. 2002.** Biology of mycorrhizal associations of epacrids (*Ericaceae*). *New Phytologist* 154: 305–326

- Cudlín P. 1991.** Epifluorescent microscopy for identification of Ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 23: 365-368
- Ditengou FA, Raudaskoski M, Lapeyrie F. 2003.** Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in *Eucalyptus globulus* ssp. *bicostata* root hairs. *Planta* 218: 217-225
- Duckett JG, Read DJ. 1995.** Ericoid mycorrhizas and rhizoid-ascomycete associations in liverworts share the same mycobiont: isolation of the partners and resynthesis of the associations *in vitro*. *New Phytologist* 129: 4398-447
- Duplessis S, Courty PE, Tagu D, Martin F. 2005.** Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globulus* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist* 165: 599-611
- Englander L, Hull RJ 1980.** Reciprocal transfer of nutrients between ericaceous plants and a *Clavaria* sp. *New Phytologist*, 84: 661-667
- Fernando AA, Currah RS. 1996.** A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Canadian Journal of Botany* 74: 1071-1078
- Finlay RD, Read DJ. 1986.** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of <sup>14</sup>C-labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist* 103: 143–156
- Fries N, Serckhanssen K, Dimberg LH, Theander O. 1987.** Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (*Boletaceae*). *Experimental Mycology* 11: 360-363
- Gallet C. 1994.** Allelopathic potential in Bilberry-Spruce forests – influence of phenolic compounds on Spruce seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 20: 1009-1024
- Gay G, Normand L, Marmeisse R, Sotta B, Debaud JC. 1994.** Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytologist* 128:4 645

- Gianinazzi-Pearson V. 1986.** Cellular modifications during host-fungus interactions in endomycorrhizae. V: Bailey J (ed) *Biology and molecular biology of plant-pathogen interactions*. (NATO ASI series, vol H1) Springer, Berlin Heidelberg New York, str. 29–37
- Gianinazzi-Pearson V, Bonfante-Fasolo P, Dexheimer J. 1986.** Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoid endomycorrhizal fungi. In: Lugtenberg, B. (ed) *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. (NATO ASI series, vol 4) Springer, Berlin Heidelberg New York, str. 273–282
- Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin HR, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435: 819-823
- Grunze N, Willmann M, Nehls U. 2004.** The impact of ectomycorrhiza formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytologist* 164: 147-155
- Gryndler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M. 2004.** Mykorhizní symbióza. *Academia*, Praha
- Hambleton S, Sigler L. 2005.** *Meliniomyces*, a new anamorph genus for root-associated fungi with phylogenetic affinities to *Rhizoscyphus ericae* (= *Hymenoscyphus ericae*), *Leotiomyces*. *Studies in Mycology* 53: 1–27.
- Hampp R, Wiese J, Mikolajewski S, Nehls U. 1999.** Biochemical and molecular aspects of C/N interaction in ectomycorrhizal plants: an update. *Plant and Soil* 215: 103-113
- Hasselquist N, Germino MJ, McGonigle T, Smith WK. 2005.** Variability of *Cenococcum* colonization and its ecophysiological significance for young conifers at alpine-treeline. *New Phytologist* 165: 867-873
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. 1998.** Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431-431

- Herrmann S, Munch JC, Buscot F. 1998.** A gnotobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. *New Phytologist* 138: 203–212
- Herrmann S, Oelmüller R, Buscot F. 2004.** Manipulation of the onset of ectomycorrhiza formation by indole-3-acetic acid, activated charcoal or relative humidity in the association between oak microcuttings and *Piloderma croceum*: influence on plant development and photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 161:509-517
- Horan DP, Chilvers GA, Lapeyrie FF. 1988.** Time sequence of the infection process in eucalypt ectomycorrhizas. *New Phytologist* 109: 451-458
- Horan DP, Chilvers GA. 1990.** Chemotropism - the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytologist* 116:297-301
- Hughes E, Mitchell DT. 1995.** Utilization of sucrose by *Hymenoscyphus ericae* (an ericoid endomycorrhizal fungus) and ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 99: 1233-1238
- Hutchison LJ, Piche Y. 1995.** Effects of exogenous glucose on mycorrhizal colonization *in vitro* by early-stage and late-stage ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 73: 898-904
- Chalot M, Javelle A, Blaudez D, Lambilliotte R, Cooke R, Sentenac H, Wipf D, Botton B. 2002.** An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 244: 165-175
- Chalot M, Blaudez D, Brun A. 2006.** Ammonia: a candidate for nitrogen transfer at the mycorrhizal interface. *Trends in Plant Science* 11: 261-316
- Jambois A, Lapeyrie F. 2005.** Jasmonates, together with zeatin, induce hypaphorine accumulation by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus*. *Symbiosis* 39: 137-141
- Jansa J, Vosátka M. 2000.** *In vitro* and post *in vitro* inoculation of micropropagated Rhododendrons with ericoid mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology* 15: 125-136

- Jentschke G, Brandes B, Kuhn AJ, Schroder WH, Godbold DL. 2001.** Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 149: 327-337
- Johansson T, Le Quéré A, Ahren D, Söderström B, Erlandsson R, Lundeberg J, Uhlén M, Tunlid A. 2004.** Transcriptional responses of *Paxillus involutus* and *Betula pendula* during formation of ectomycorrhizal root tissue. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17: 202–215
- Jumpponen A, Mattson KG, Trappe JM. 1998.** Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii* with *Pinus contorta* on glacier forefront soil: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* 7: 261-265.
- Jumpponen A. 2001.** Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* 11:207–211
- Kerley SJ, Read DJ. 1997.** The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. 19. Fungal mycelium as a nitrogen source for the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* and its host plants. *New Phytologist* 136: 691–701.
- Koske RE, Gemma JN, Englander L. 1990.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae in Hawaiian *Ericales*. *American Journal of Botany* 77 :64–68
- Krueger A, Peskan-Berghofer T, Frettinger P, Herrmann S, Buscot F, Oelmüller R. 2004.** Identification of premycorrhiza-related plant genes in the association between *Quercus robur* and *Pisolithus croceum*. *New Phytologist* 163: 149-157
- Kytöviita MM. 2005.** Role of nutrient level and defoliation on symbiotic function: experimental evidence by tracing C-14/N-15 exchange in mycorrhizal birch seedlings. *Mycorrhiza* 15: 65-70
- Laczko E, Boller T, Wiemken V. 2004.** Lipids in roots of *Pinus sylvestris* seedlings and in mycelia of *Pisolithus tinctorius* during ectomycorrhiza formation: changes in fatty acid and sterol composition. *Plant Cell and Environment* 27: 27–40
- Lagrange H, Jay-Allemand C, Lapeyrie F. 2001.** Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist* 149: 349 – 355

- Le Quére A, Wright DP, Soderstrom B, Tunlid A, Johansson T. 2005.** Global patterns of gene regulation associated with the development of ectomycorrhiza between birch (*Betula pendula* Roth.) and *Paxillus involutus* (Batsch) fr. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 659-673
- Mandyam K, Jumpponen A. 2005.** Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology* 53: 173-189
- Marschner H, Dell B. 1994.** Nutrient Uptake in Mycorrhizal Symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102
- Martin F, Boiffin V, Pfeffer PE. 1998.** Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globulus* – *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during glucose utilization. *Plant Physiology* 118: 627-635
- Martin F, Duplessis S, Ditengou F, Lagrange H, Voiblet C, Lapeyrie F. 2001.** Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151:145-154
- Marx DH. 1969.** The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- McLennan EI. 1935.** Non-symbiotic development of seedlings of *Epacris impressa* Labill. *New Phytologist* 34: 55–63
- Mensen R, Hager A, Salzer P. 1998.** Elicitor-induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins. *Physiologia plantarum* 102: 539-546
- Morel M, Jacob C, Kohler A, Johansson T, Martin F, Chalot M, Brun A. 2005.** Identification of Genes Differentially Expressed in Extraradical Mycelium and Ectomycorrhizal Roots during *Paxillus involutus* – *Betula pendula* Ectomycorrhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 382–391
- Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M, Högberg P. 1998.** Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392: 914 –916.



- Nehls U, Wiese J, Guttenberger M, Hampp R. 1998.** Carbon allocation in ectomycorrhizas: Identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 167-176
- Nehls U, Bock A, Ecke M, Hampp R. 2001a.** Differential expression of the hexose-regulated fungal genes AmPAL and AmMst1 within *Amanita/Populus* ectomycorrhizas. *New Phytologist* 150:583–589.
- Nehls U, Mikolajewski S, Magel E, Hampp R. 2001b.** Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist* 150:533 – 541
- Niemi K, Vuorinen T, Ernstsén A, Haggman H. 2002.** Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. *Tree Physiology* 22: 1231-1239
- Niemi K, Scagel C, Häggman H. 2004.** Application of Ectomycorrhizal Fungi in Vegetative Propagation of Conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 83 - 91
- Niemi K, Julkunen-Tiitto R, Tegelberg R, Haggman H. 2005.** Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scots pine *in vitro*. *Tree Physiology* 25: 123-128
- Nordin A, Hogberg P, Nasholm T. 2001.** Soil nitrogen form and plant nitrogen uptake along a boreal forest productivity gradient. *Oecologia* 129:125-132
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266
- Nylund JE, Unestam T. 1982.** Structure and physiology of ectomycorrhizae I. The process of mycorrhiza formation in Norway spruce *in vitro*. *New Phytologist* 91: 63-79
- Olsrud M, Melillo JM, Christensen TR, Michelsen A, Wallander H, Olsson PA. 2004.** Response of ericoid mycorrhizal colonization and functioning to global change factors. *New Phytologist* 162: 459–469

- Palfner G, Casanova-Katny MA, Read DJ. 2005.** The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) in Northern England. *Mycorrhiza* 15: 571–579
- Pearson V, Read DJ. 1973.** The biology of mycorrhiza in the Ericaceae II. The transport of carbon and phosphorus by the endophyte and the mycorrhiza. *New Phytologist* 72: 1325-1331
- Pellissier F. 1994.** Effect of phenolic compounds in humus on the natural regeneration of spruce. *Phytochemistry* 36: 865–867
- Peretto R, Perotto S, Faccio A, Bonfante-Fasolo P. 1990.** Cell surface in *Calluna vulgaris* L. hair roots - In situ localization of polysaccharidic components. *Protoplasma* 155:1-18
- Perotto S, Peretto R, Faccio A, Schubert A, Varma A, Bonfante P. 1995.** Ericoid mycorrhizal fungi – cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. *Canadian Journal of Botany* 73: Suppl. 1 A-D:S557-S568
- Perotto S, Girlanda M, Martino E. 2002.** Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. *Plant and Soil* 244: 41-53
- Peterson RL, Massicotte HB. 2004.** Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany* 82: 1074-1088
- Piercey MM, Thormann MN, Currah RS. 2002.** Saprotrophic characteristics of three fungal taxa from ericalean roots and their association with the roots of *Rhododendron groenlandicum* and *Picea mariana* in culture. *Mycorrhiza* 12:175–180
- Read DJ. 1996.** The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany* 77: 365-374
- Rincón A, Gérard J, Dexheimer J, Le Tacon F. 2001.** Effect of an auxin transport inhibitor on aggregation and attachment processes during ectomycorrhiza formation between *Laccaria bicolor* S238N and *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany* 79: 1152–1160

- Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsoon KH, Kuypers TW, Taylor AFS, Finlay RD. 2003.** Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159: 775–783
- Salzer P, Hebe G, Hager A. 1997.** Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K<sup>+</sup> and CIA release, extracellular alkalinization and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis of *Picea abies* cells. *Planta* 203:470-479
- Salzer P, Hager A. 1991.** Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall- bound invertase activity of their host *Picea abies*. *Botanica Acta* 104: 439–445
- Scagel CR. 2005.** Isolate-specific rooting responses of *Leucothoe fontanesiana* cuttings to inoculation with ericoid mycorrhizal fungi. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80: 254-262
- Selle A, Willmann M, Grunze N, Gessler A, Weiss M, Nehls U. 2005.** The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168: 697-706
- Seviour RJ, Willing RR, Chilvers GA. 1973.** Basidiocarps associated with ericoid mycorrhizas. *New Phytologist* 72: 381–385
- Sharples JM, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG. 2000.** Symbiotic solution to arsenic contamination. *Nature* 404 (6781): 951-952
- Schaeffer C, Wallenda T, Guttenberger M, Hampp R. 1995.** Acid invertase in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) seedlings. *New Phytologist* 129: 417– 424
- Schubert A, Allara P, Morte A. 2004.** Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 161: 495–501
- Simard SW, Durall DM. 2004.** Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140–1165

- Smith JE, Molina R, Perry DA. 1995.** Occurrence of ectomycorrhizas on ericaceous and coniferous seedlings grown in soils from the Oregon Coast Range. *New Phytologist*, 129: 73 - 81
- Smith SE, Read DJ. 1997.** Mycorrhizal Symbiosis. London, UK: Academic Press.
- Souto C, Pellissier F, Chiapusio G. 2000.** Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* 26: 2015-2023
- Stoyke G, Currah RS. 1991.** Endophytic fungi from the mycorrhizae of alpine ericoid plants. *Canadian Journal of Botany* 69: 347-352
- Straker CJ. 1996.** Ericoid mycorrhiza: Ecological and host specificity. *Mycorrhiza* 6: 215-225
- Stribley DP, Read DJ. 1974a.** The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. III. Movement of carbon-14 from host to fungus. *New Phytologist*, 73: 731-741
- Stribley DP, Read DJ. 1974b.** The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*: IV. The effect of mycorrhizal infection on uptake of <sup>15</sup>N from labelled soil by *Vaccinium macrocarpon* Ait. *New Phytologist* 73:1149–1155
- Stribley DP, Read DJ. 1980.** The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. VII. The relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilize simple and complex organic nitrogen sources. *New Phytologist* 86 : 365–371
- Tagu D, Lapeyrie F, Martin F. 2002.** The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil* 244: 97–105
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjølner R. 2006.** Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170: 581-596
- Urban A, Weiss M, Bauer R. 2003.** Ectomycorrhizas involving sebacinoid mycobionts. *Mycological Research* 107: 3-14
- Villarreal-Ruiz L, Anderson IC, Alexander IJ. 2004.** Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytologist* 164: 183–192
- Voelker DR. 1997.** Phosphatidylserine decarboxylase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1348: 236-244

- Vohník M. 2002.** Inoculation of *Vaccinium vitis-idaea* and *Rhododendron* cv. Belle-Heller with ericoid mycorrhizal *Oidiodendron griseum* and pseudomycorrhizal *Phialocephala fortinii*. Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha. Diplomová práce
- Vohník M, Lukančič S, Bahor E, Regvar M, Vosátka M, Vodník D. 2003.** Inoculation of *Rhododendron* cv. Belle-Heller with two strains of *Phialocephala fortinii* in two different substrates. *Folia Geobotanica* 38: 191-200
- Vohník M, Albrechtová J, Vosátka M. 2005.** The inoculation with *Oidiodendron maius* and *Phialocephala fortinii* alters phosphorus and nitrogen uptake, foliar C : N ratio and root biomass distribution in *Rhododendron* cv. Azurro. *Symbiosis* 40: 87-96
- Vrálstad, T., Fossheim, T., Schumacher, T. 2000.** *Piceirhiza bicolorata* – the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate? *New Phytologist* 145: 549–563
- Vrálstad T, Myhre E, Schumacher T. 2002a.** Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the *Helotiales* in burnt and metal polluted habitats. *New Phytologist* 155: 131–148
- Vrálstad T, Schumacher T, Taylor AFS. 2002b.** Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytologist* 153: 143–152
- Wilcox H. 1968.** Morphological studies of the roots of Red pine, *Pinus resinosa*. II. Fungal colonization of roots and the development of mycorrhizae. *American Journal of Botany* 55: 686-700.
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ, Rolfe SA. 2000.** Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. *Plant Cell and Environment* 23: 39-49

- Wu B, Nara K, Hogetsu T. 2001.** Can <sup>14</sup>C-labelled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? *New Phytologist* 149: 137–146
- Xiao G, Berch SM. 1999.** Organic nitrogen use by salal ericoid mycorrhizal fungi from northern Vancouver Island and impacts on growth *in vitro* of *Gaultheria shallon*. *Mycorrhiza* 9 :145–149
- Zeng RS, Mallik AU. 2006.** Selected Ectomycorrhizal Fungi of Black Spruce (*Picea mariana*) can Detoxify Phenolic Compounds of *Kalmia angustifolia*. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1473–1489