

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**katedra**



**Vliv vlastností substrátu na ontogenezi pěstovaných  
dřevních hub**

.....  
doktorská disertační práce

**Autor: Ing. Lucie Wiesnerová**

**Školitel: doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Ivan Jablonský, CSc.**

**Praha 2023**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou disertační práci „Vliv vlastností substrátu na ontogenezi pěstovaných dřevních hub“ jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne .....

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. Ing. Bc. Martinu Koudelovi, Ph.D. za vedení mé dizertační práce a cenné rady v průběhu studia. Dále mé poděkování patří Ing. Ivanu Jablonskému, CSc. za pomoc při plánování pokusů, jejich realizaci a přípravě dizertační práce. Také bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a kolegům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

## Obsah

1.	Úvod .....	6
2.	Literární přehled.....	7
2.1.	Rod <i>Pleurotus</i> spp.....	7
2.1.1.	Zařazení do systému .....	7
2.1.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> – hlíva ústříčná.....	8
2.1.3.	Faktory ovlivňující vývoj <i>Pleurotus</i> spp. ....	11
2.1.4.	Pěstování <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	14
2.2.	Rod <i>Hericium</i> .....	19
2.2.1.	Zařazení do systému .....	19
2.2.2.	<i>Hericium erinaceus</i> – korálovec ježatý.....	19
2.2.3.	Faktory ovlivňující růst <i>Hericium</i> spp. ....	21
2.2.4.	Pěstování rodu <i>Hericium</i> spp.....	22
2.3.	Enzymatická aktivita hub .....	25
2.3.1.	Ligninolytické enzymy .....	25
2.3.1.1.	Lakáza.....	26
2.3.1.2.	Mangan peroxidáza .....	28
2.3.2.	Hydrolytické enzymy .....	29
2.3.2.1.	$\beta$ -glukosidáza.....	29
2.3.2.2.	Celobiohydroláza .....	30
3.	Cíle a hypotézy .....	31
4.	Metodika.....	32
4.1.1.	Použité organismy .....	32
4.1.2.	Kultivační médium .....	32
4.1.3.	Extrakce DNA a analýza PCR .....	32
4.1.4.	Fylogenetická analýza, test populační diferenciace.....	33
4.1.5.	Odhad evoluční divergence .....	34
4.1.6.	Porovnání kardinálních teplot .....	34
4.2.	Vliv různých vlhkostí substrátu na kulturu <i>Pleurotus ostreatus</i> a <i>Hericium erinaceus</i> .....	36
4.2.1.	Příprava substrátu .....	36
4.2.2.	Odebírání vzorků .....	36
4.2.3.	Měření přírůstku mycelia .....	36
4.2.4.	Měření pH.....	37
4.2.5.	Měření vlhkosti substrátu.....	37
4.2.6.	Měření enzymatické aktivity.....	37

4.3.	Enzymatická aktivita <i>Pleurotus ostreatus</i> v půdě kontaminované PAH .....	38
4.3.1.	Analýzy množství biomasy hub .....	39
4.3.2.	Analýza PAH .....	39
4.4.	Statistické analýzy .....	41
5.	Výsledky a diskuze .....	42
5.1.	Fylogenetická analýza a vliv teploty na růst jednotlivých skupin rodu <i>Pleurotus</i> spp. ....	42
5.2.	Vliv různých vlhkostí substrátu na kulturu <i>Pleurotus ostreatus</i> a <i>Hericium erinaceus</i> .....	49
5.3.	Enzymatická aktivita <i>Pleurotus ostreatus</i> v půdě kontaminované PAH.....	65
6.	Závěr .....	69
7.	Literatura .....	70
8.	Přílohy .....	84

## 1. Úvod

Rychle rostoucí celosvětová populace a expanze zemědělského sektoru a potravinářského průmyslu mají za následek každoroční produkci velkého množství zemědělského odpadu. Jednou z možností jak tento odpad využít je k pěstování hub. Houby jsou ceněny pro své ekonomické a ekologické vlastnosti a jsou zdrojem bohatým na živiny, jako jsou bílkoviny, minerály a vitamíny B, C a D. V poslední době se houby těší zájmu také z hlediska výzkumu obsažených bioaktivních látek, které zahrnují terpeny, steroidy a například polysacharidy (Bellettini et al. 2019).

Je známo přes 300 druhů jedlých hub, nicméně pouze okolo 30 druhů je pěstováno komerčně. Jedněmi z těchto druhů jsou *Pleurotus ostreatus* (hlíva ústříčná) a *Hericiium erinaceus* (korálovec ježatý). Tyto houby jsou pěstovány nejen za účelem sklizně plodnic, ale také z důvodu produkce ligninolytických a hydrolytických enzymů, které mohou být dále využity v biotechnologiích. Tyto enzymy se využívají papírnickém, textilním a potravinářském průmyslu a také například k bioremediacím (Sánchez 2010).

Jedním z důležitých parametrů pro správnou kultivaci hub je obsah vody v substrátu, který ovlivňuje růst mycelia, vývoj plodnic a minimalizuje výskyt kontaminace substrátu. Nastavení optimálních vlhkostních podmínek pro kultivaci vede k maximálnímu výnosu plodnic či vyšší enzymatické aktivitě mycelia v substrátu, který může být dále využit.

## **2. Literární přehled**

### **2.1. Rod *Pleurotus* spp.**

#### **2.1.1. Zařazení do systému**

Říše: *Fungi* (Houby)

Oddělení: *Basidiomycota* (Houby stopkovýtrusné)

Podkmen: *Agaricomycotina*

Třída: *Agaricomycetes*

Podtřída: *Agaricomycetidae* (Houby rouškaté)

Řád: *Agaricales* (Pečárkotvaré)

Čeleď: *Pleurotaceae* (Lupenotvaré)

Rod: *Pleurotus* (Hlíva)

(<https://www.Mykobank.org>)



Obrázek 1: plodnice *Pleurotus ostreatus*

### **2.1.2. *Pleurotus ostreatus* – hlíva ústříčná**

*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. patří mezi gymnokarpní druhy kloboukatých hub. Lamely nejsou v průběhu vývoje plodnic kryty obalem a spory jsou při zrání lamel postupně uvolňovány. Výjimku tvoří *Pleurotus calypratus* (Lindbl. in Fr.) Sacc. (hlíva čepičatá), která má v mládí lupeny částečně překryté obalem (Bresinsky et al. 1987). *P. ostreatus* tvoří klobouky o velikosti 5 – 15 cm. Povrch klobouku je hladký, lysý a lesklý. Barva klobouku je ocelově šedá nebo modrošedá, může být ale také olivová nebo nahnědlá. Lupeny mají bělavou nebo krémovou barvu, jsou sbíhavé, husté a mnohé jsou navzájem srostlé. Výtrusy mají elipsoidní tvar a jsou 8 – 12 x 3 – 4 µm velké. Třeň houby má válcovitý tvar bělavé barvy, přičemž báze je často plstnatá. Třeň je obvykle asymetricky přirostlý ke klobouku a dosahuje velikosti 6 – 12 cm délky a tloušťky 1 – 3 cm (Deepalakshmi & Mirunalini 2014).

Druhy rodu *Pleurotus* patří celosvětově mezi nejvýznamnější komerčně pěstované druhy hub. Přes jejich ekonomický význam je taxonomická identita izolátů běžně pěstovaných v severním mírném pásmu (Asie, Evropa a Severní Amerika) nejasná. Zatímco *P. eryngii* (DC.) Quél. a *P. pulmonarius* (Fr.) Quél. jsou dobře taxonomicky ohraničené, nejčastější jméno *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm je někdy zaměňováno s *P. florida* (nom. inval.) nebo *P. cornucopiae* (Paulet) Rolland (Gonzalez & Labarère 2000). Tradiční identifikace pěstovaných monomitických *Pleurotus* spp. vycházející z morfologie plodnic a rozměrů bazidiospor je někdy nedostatečná (Alam et al. 2010; Li et al. 2017; Vilgalys et al. 1993), protože vlastnosti plodnic se mohou u různých druhů překrývat a mohou být také ovlivněny podmínkami prostředí (Zervakis et al. 2014). Morfologická podobnost geneticky vzdálených druhů může být navíc způsobena jejich konvergentním vývojem za stejných nebo velmi podobných podmínek prostředí (Petersen & Hughes 1999). Historicky byl často používán metodický přístup založený na testech intersterility s použitím monokaryotických izolátů (Bao et al. 2005; Hilber & Hilber 1982; Vilgalys et al. 1993). Tato metoda byla založena na teorii, že pouze konspecifické monokaryony mohou produkovat dikaryony, avšak tento koncept nezvažuje možnost tvorby dikaryonů odlišnými alopatrickými druhy (Schardl & Craven 2003; Taylor et al. 2000). Bylo publikováno několik záznamů o tvorbě dikaryonů mezi dvěma odlišnými alopatrickými druhy u basidiomycet. Takové chování umožňují nedostatečně vyvinuté genetické bariéry mezi alopatrickými druhy — druhy oddělenými především geografickými bariérami. Novější výsledky tedy



odhalily, že tento koncept není zcela v souladu s daty DNA sekvenace (Depotter et al. 2016; Petersen & Hughes 1999; Steenkamp et al. 2018). Hilber & Hilber (1982) navrhli komplexní systematickou revizi rodu *Pleurotus*. Ve střední Evropě byly popsány čtyři druhy podrodu *Pleurotus* (další dva podrody, *Coremiopleurotus* a *Lentodiopsis*): *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. ostreatus* a *P. pulmonarius*; *P. columbinus* Quél. byl považován za kmen *P. ostreatus*. Podobné závěry učinili Vilgalys et al. (1993). Autoři popsali nový druh *P. populinus* O. Hilber & O. K. Miller, který se morfologicky podobá *P. ostreatus*, ale je sexuálně nekompatibilní s *P. ostreatus* nebo *P. pulmonarius* (Vilgalys et al. 1993). Dále bylo rozlišeno pět intersterilních skupin a dalších sedm vzájemně intersterilních druhů. Jejich diference je v hrubé shodě s předchozí, ale izoláty s pochybným názvem *P. florida*, který je obvykle považován za synonymum *P. ostreatus*, byly přiřazeny ke komplexu *P. pulmonarius* (Bao et al. 2004; Bao et al. 2005). Molekulárně fylogenetické studie ukazují, že využití oblasti ITS (Internal transcribed spacer) genomické DNA je velmi užitečné při zjišťování fylogenetických vztahů na nižších taxonomických úrovních. Oblast ITS rDNA je považována za velmi variabilní, a to jak v rámci druhů, tak i mezi kmény (Alam et al. 2010). Shnyreva & Shnyreva (2015) také odhalili značnou variabilitu oblasti ITS *P. ostreatus*. Byly zjištěny dvě skupiny oddělených divokých a kultivovaných izolátů. Kultivované izoláty byly geneticky variabilnější ve srovnání s divokými typy. Oba typy byly geneticky kompatibilní. Občas je používáno jméno *P. floridanus* Singer (Singer 1948), jeho identita je však nejasná. Jména *P. florida* Eger, *P. ostreatus* f. *florida* a *P. ostreatus* var. *floridanus* byly odmítnuty Hilberem (Hilber & Hilber 1997; Hilber & Hilber 1982) jako chybná jména („nomen nudum“) a synonymizovány s *P. ostreatus*. V každém případě se název *P. florida* nebo *P. floridanus* stále používá v pěstování a obchodování s houbami a také se pravidelně objevuje ve výzkumných pracích. Morfologie plodnic „*P. florida*“ má být jasnější než je tomu u šedavé *P. ostreatus* a byla zaznamenána odlišná reakce na teploty pro zakládání primordií. Izoláty „*P. florida*“ jsou schopny tvorby plodnic při vyšších teplotách (22 °C) než *P. ostreatus* (11 °C), a jsou proto vhodnější pro kultivaci v teplejších obdobích roku, navíc je uváděno, že jsou kompatibilní s *P. ostreatus* (Vilgalys et al. 1993). Šlechtění hlívy ústřičné má dlouhou tradici, kdy jsou získávány izoláty se zlepšenými vlastnostmi, jako jsou lepší kvalita plodnic, rychlejší růst při určité teplotě. Jedním z klíčových cílů hybridizačního programu byl vývoj bezsporných izolátů za účelem zlepšení pracovního prostředí v pěstírnách (Baars et al. 2000).

Houby jsou ceněným zdrojem pro své nutriční hodnoty. Plodnice obsahují 70 - 95 % vody, v závislosti na době sklizně a podmínkách prostředí a 10 – 13 % sušiny. Množství makronutrientů v sušině hub je přibližně 15 – 28 % bílkovin, 61 – 84 % sacharidů a 3 – 33 % vlákniny. Obsah bílkovin je ve srovnání se zeleninou vyšší, ale hodnot masa a mléčných výrobků nedosahuje. Druhy rodu *Pleurotus* spp. jsou bohatým zdrojem nejen bílkovin, ale také minerálů (Na, Ca, P, Fe a K) a vitamínů (vitamín C a vitamín skupiny B). Množství bílkovin závisí na genetické charakteristice druhu, velikosti plodnice a fyzikálním a chemickém složení kultivačního média. Plodnice rodu *Pleurotus* spp. jsou považovány za dobrý zdroj sacharidů a také vlákniny. Sacharidy, obsažené v houbách zahrnují především polysacharidy (chitin, glukany a jiné hemicelulózy) a glykoproteiny. Obsah tuků v plodnicích je malý, ale některé druhy jsou zdrojem všech esenciálních mastných kyselin. Nicméně houby nejsou považovány za významný zdroj esenciálních mastných kyselin. Dalšími tuky, které jsou v houbách přítomny, jsou mono-, di- a triglyceridy, steroly, estery sterolů a fosfolipidy. Zástupci rodu *Pleurotus* spp. mají zvláště vysoký obsah některých mikronutrientů, například vitamínu B<sub>9</sub> (kyselina listová), který si lidské tělo není schopno samo vytvořit, ale musí být přijímán z potravy (Khan & Tania 2012; Raman et al. 2021). Dalším důležitým mikronutrientem, který ve vyskytuje v houbách je provitamin D<sub>2</sub> (ergosterol). Ergosterol je hlavním steroidem a prekurzorem vitamínu D<sub>2</sub> (ergokalciferol) v houbách. Přeměňuje se prostřednictvím absorpce energie ultrafialového záření B (UVB) při vlnových délkách 290 – 320 nm. Tvorba ergokalciferolu začíná bezprostředně po vystavení UVB záření. Kromě vlnové délky UV záření může být účinnost syntézy vitamínu D<sub>2</sub> ovlivněna dalšími parametry prostředí, jako je teplota prostředí, doba expozice a intenzita záření (Chen et al. 2015; Kefflie et al. 2019).

### **2.1.3. Faktory ovlivňující vývoj *Pleurotus* spp.**

Pro pěstování se používá velké spektrum druhů *Pleurotus* spp., teplomilné, chladnomilné i tropické druhy. Nejčastěji pěstovaným druhem je *Pleurotus ostreatus*, která je chladnomilná, dále její kultivar Florida a vzájemní kříženci. Kromě *P. ostreatus* jsou dále pěstovány druhy *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus citrinopileatus*, a *Pleurotus djamor* (Knop et al. 2015; Sánchez 2010).

V přírodě lze *P. ostreatus* nejčastěji nalézt rostoucí na odumřelém dřevě. Tento druh patří mezi houby bílé hniloby, které se podílejí na rozkladu ligninu ve dřevě. Meziprodukty tohoto rozkladu jsou voda, oxid uhličitý, enzymy, uhlovodíky a další látky sloužící jako výživa dalším organismům (Sánchez 2010).

#### **Teplota**

Optimální teplota pro klíčení spor a růst mycelia *P. ostreatus* je 28 - 30 °C. Při teplotě okolo 20 °C dochází ke zpomalení růstu mycelia a může dojít k znevýhodnění oproti ostatním mikroorganismům. Pokud teplota klesne pod 5 °C, růst mycelia je zastaven, avšak mycelium není poškozeno, ani pokud teplota klesne bod mrazu. Kolonizovaný substrát je možné vystavit teplotám pod 0 °C a při následném zvýšení teploty se růst mycelia obnoví a dojde k fruktifikaci. Problémem při pěstování v letním období je přehřívání substrátu. Toto přehřívání způsobuje zvýšená aktivita mycelia. Mycelium odumírá, pokud je vystaveno teplotám vyšším než 32 – 35 °C, přičemž výraznou roli hraje také vlhkost substrátu (Hoa & Wang 2015; Jablonský et al. 2019; Zervakis et al. 2001). Zharare et al. (2010) v experimentu zjišťovali vliv teploty na růst mycelia různých druhů rodu *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. cornicopae* var *citrinopilae*, *P. salmoneo stramineus*, *P. eryngii*). Největší růst mycelia u většiny druhů byl zaznamenán při teplotě 25 – 30 °C. Při teplotě 35 °C došlo k rapidnímu omezení růstu mycelia, s výjimkou *P. sajor-caju*.

Zástupci rodu *Pleurotus* mají v průběhu fruktifikace různá teplotní maxima. Pokud je toto maximum překročeno, nasazování primordií je znemožněno. Teplotní optimum je také určeno vybraným kmenem, který je použit pro pěstování. Optimální teplota *P. ostreatus* pro nasazení primordií je 8 – 12 °C a zastavuje se při teplotách nad 15 °C. V případě *P. ostreatus* je možné dosáhnout nasazení primordií i při teplotách nad 15 °C za podmínky, že je kultura vystavena tzv. chladovému šoku, kdy

je substrát po dobu několika dnů v teplotě 5 °C (Stamets 2011). Optimální teplota pro fruktifikaci *P. pulmonarius* je 20 – 25 °C. Také izoláty *P. florida* jsou schopny plodit při vyšších teplotách (22 °C) a jsou proto vhodnější k pěstování v teplejších částech roku. *P. djamor* má teplotní optimum ještě vyšší, a to 24 – 30 °C (Vilgalys et al. 1993).

## **pH**

Mycelium *P. ostreatus* má pro růst optimální hodnotu pH v rozmezí 5,5 – 6,5. *P. eryngii* má toto optimum lehce nižší, a to 5 – 6. Pokud je hodnota pH mimo toto optimum, je růst mycelia zpomalen (Bellettini et al. 2019). Ibekwe et al. (2008) testovali hodnoty pH (5 – 9) a jejich vliv na nárůst biomasy *P. ostreatus* a došli k závěru, že nejvhodnější pro jeho růst je hodnota pH 6,5. Hodnota pH v průběhu kultivace klesá, a to až na hodnotu 4,0, přičemž hodnota pH v povrchové vrstvě substrátu bývá nižší než ve vnitřních vrstvách. Pro úpravu pH v substrátu je vhodné použití přísady vápence (Bellettini et al. 2019; Jablonský & Šašek 2006).

## **Světlo**

V průběhu kultivace *P. ostreatus* je potřeba různá intenzita osvětlení. Ve fázi kolonizace substrátu není osvětlení potřeba. Ve fázi nasazování primordií je nutné osvětlení 100 – 400 lux po dobu alespoň 12 hodin za den. Osvětlení by mělo být umístěno nejméně 90 – 100 cm nad poslední vrstvou substrátu. Intenzita osvětlení by se měla zvyšovat s teplotou v pěstírně. Správný vývoj plodnic je ovlivněn také vlnovou délkou použitého osvětlení. Jako optimální se doporučuje osvětlení v modré části spektra (430 – 500 nm). Pokud je osvětlení v průběhu fruktifikace nedostatečné, dochází k výskytu protáhlých třeňů a zakrnělých klobouků. V případě absence osvětlení se u plodnic nevyvíjí klobouk, ale pouze třeň a plodnice připomínají tvar korálu (Marino et al. 2003; Okwujiako 2001).

## **Voda**

Vlhkost substrátu je důležitým parametrem při kultivaci *P. ostreatus*. Tento faktor ovlivňuje rychlost kolonizace substrátu a také výnos. Vysoký obsah vody v substrátu ztěžuje respiraci mycelia a znemožňuje správný vývoj plodnic a může vést k rozvoji nežádoucích organismů. Zvyšující se obsah vody v substrátu snižuje pórovitost substrátu, a tím se omezuje přenos kyslíku. To vede k omezení růstu mycelia v rámci celého substrátu a mycelium kolonizuje substrát pouze na povrchu (Bellettini et al.

2019). Miles & Chang (2004) uvádějí optimální vlhkost pro kultivaci *P. ostreatus* mezi 50 – 75 %. Wang et al. (2002) testovali široké spektrum vlhkostí substrátu (45 – 75 %) a jejich vliv na růst mycelia a biologickou efektivitu. Biologická efektivita je parametr, který vyjadřuje výnos čerstvých plodnic na 100 g suché hmoty substrátu. Tento parametr bývá používán k zjištění kvality organického materiálu použitého jako substrát pro kultivaci. Bylo zjištěno, že s rostoucí vlhkostí substrátu se zvyšovala biologická efektivita. Nejvyšší biologická efektivita byla dosažena při 70 % vlhkosti substrátu. Při této vlhkosti byl substrát také nejrychleji kolonizován. Nicméně tento trend platí pouze do vlhkosti 70 %, poté se biologická efektivita substrátu snížila. Girmay et al. (2016) kultivovali *P. ostreatus* na substrátech s obsahem vody 65 – 70 %. Nejvyšší biologické efektivitě substrátu bylo dosaženo na substrátu z bavlníkových semen (74,17 %). Substrát z pšeničné slámy dosáhl biologické efektivitě 35,88 %. Siwulski et al. (2007) zkoumali vliv vlhkosti substrátu na výnos. Byly testovány vlhkosti 60, 65, 70, 75 a 80 %. Jako optimum pro výnos byla stanovena vlhkost 75 %, při vyšší vlhkosti byl výnos nižší a docházelo k tvorbě deformovaných plodnic.

### **Oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>)**

Oxid uhličitý je důležitým stopovým plynem v zemské atmosféře a změny v jeho koncentraci mohou ovlivňovat růst a přežívání živých organismů. V případě hub oxid uhličitý ovlivňuje vývoj plodnic. Studie prokázaly, že CO<sub>2</sub> je do buněk transportován přes membrány a působí jako signální molekula pro řízení růstu, diferenciaci a další reakce. Koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje vývoj plodnic *P. ostreatus*, zejména diferenciaci klobouků, která je při vysoké koncentraci inhibována (více než 5 % CO<sub>2</sub>). Respirační aktivita se během tvorby primordií zvyšuje a vysoká koncentrace CO<sub>2</sub> ovlivňuje tvar plodnic, kdy jsou třeně vřetenovité a prodloužené a klobouk není plně vyvinutý. Morfologie je podobná té, která vzniká za nepřítomnosti světla. V rané fázi vývoje plodnice je citlivost na koncentraci CO<sub>2</sub> výraznější. Regulace koncentrace CO<sub>2</sub> v pěstírnách se dosahuje pravidelným větráním (Kinugawa et al. 1994; Lin et al. 2022). Jang et al. (2003) zjistili, že už při koncentraci CO<sub>2</sub> koncentraci 0,03 až 0,1 % dochází k prodloužení třenů a pokud je koncentrace CO<sub>2</sub> 0,5 % velikost klobouků se zmenšuje.

#### **2.1.4. Pěstování *Pleurotus ostreatus***

V přírodě lze plodnice hlívy nalézt v období léta a podzimu vyrůstající jednotlivě nebo v trsech na kmenech a pařezech. Rod *Pleurotus* se vyskytuje na obou polokoulích ve všech zeměpisných šířkách a vegetačních pásech. Osidluje většinou dřevo listnatých stromů (Zervakis & Polemis 2013).

V průběhu let se zvýšila produkce rodu *Pleurotus* a stala se důležitou komoditou pro potravinářský průmysl. *P. ostreatus* je druhou nejčastěji konzumovanou jedlou houbou ve světě s roční produkcí přibližně 3 miliony tun (Knop et al. 2015). Houby rodu *Pleurotus* se pěstují na nejrůznějších lignocelulózových odpadech například na slámě, kukuřičných vřetenech, hrachovině, bavlníkových odpadech nebo pilinách. V těchto surovinách se nachází lignin, celulóza a hemicelulóza, které jsou důležitým zdrojem živin pro tyto organismy. Aby mohly být tyto suroviny použity jako substrát pro pěstování hlívy, musí být nejprve teplotně ošetřeny (pasterizace, sterilizace) (Stamets 2011).

#### **Substráty pro pěstování *Pleurotus ostreatus***

Základní surovinou pro přípravu substrátu pro kultivaci *P. ostreatus* jsou lignocelulózové odpady jako je sláma obilnin, kukuřice, kukuřičná vřetena, piliny, bavlníkové odpady a další materiály. Pokud je k pšeničné slámě přidán malý podíl slámy ječné, dochází k rychlejší kolonizaci substrátu a primordia se objevují o 5 – 7 dnů dříve než pokud je použita pouze pšeničná sláma (Shah et al. 2004).

Na růst podhoubí a výnos má vliv nejen druh použité slámy, ale také její sklizeň a skladování. Vlhkost slámy vhodné pro skladování by měla být 13 - 15 %. Sláma vhodná pro výrobu substrátu musí být suchá a mít žlutou barvu. Sláma, která opakovaně zmokla a vyschla, je pro použití na výrobu substrátu nevhodná, neboť se na slámě množí konkurenční mikroorganismy snižující její výživovou hodnotu, a nelze je dokonale odstranit ani při jejím teplotním ošetření. Pokud je sláma šedá, černá, plesnivá či se na ní objevují černá místa, je pro výrobu substrátu nevhodná (Jablonský & Šašek 2006).

Hoa et al. (2015) provedli studii s porovnáním efektu různých substrátů na růst mycelia *P. ostreatus* a *P. cystidiosus*. Jako substrát byly použity piliny, kukuřičná vřetena, bagasa (vylisovaná cukrová třtina) a jejich směsi v poměru 80:20 a 50:50 suché hmoty. Jako nejvhodnější se ukázaly substráty pouze z kukuřičných vřeten nebo bagasy. Tyto substráty měly pozitivní vliv na průměr klobouku, tloušťku třeně, hmotnost

houby a jejich obsahových látek. Nicméně u substrátu složeného pouze z kukuřičných vreten byl zjištěn nejdelší čas od růstu ke sklizni, a to 46 dnů.

Sobieralski et al. (2011) zkoumali růst mycelia *P. ostreatus* na substrátech z březových a dubových pilin, obilné a rýžové slámy a meziproductů textilního průmyslu (len a konopí). Z těchto substrátů byla pro růst mycelia nejvhodnější obilná a rýžová sláma a lněné pazdeří. Nejvyššího výnosu bylo dosaženo při kultivaci na substrátu ze směsi obilné slámy a konopí.

V současné době je snaha využít k pěstování alternativní celulózní substráty, které pocházejí ze zemědělství a potravinářství. Využití odpadů pro kultivaci hub má svoji přidanou hodnotu: udržitelné nakládání s potravinářským odpadem, výroba vysoce kvalitních potravin z nekvalitního odpadu, ale i řešení ekologických a ekonomických problémů. Jednou z alternativ slámových substrátů může být pevný odpad vznikající při zpracování oliv. *P. ostreatus* během kultivace využívá složky rozpustné v tucích, které mění degradaci sacharidů a mohou ovlivnit koncentraci glukánů v houbách.  $\beta$  – glukany jsou strukturální složky buněčné stěny hub na rozdíl od  $\alpha$  – glukánů, které jsou v houbách v nízké koncentraci, a jejich biologická funkce není zatím známá. Tento odpad je také dobrým zdrojem dusíku, minerálů a dalších živin. Dalším možným substrátem pro kultivaci *P. ostreatus* je například kávová sedlina. Jedná se o výživný substrát, který je dostupný jako odpad a lze jej dehydratovat po delší dobu, aniž by byl ovlivněn výnos hub. Navíc by mohla být kávová sedlina degradovaná houbami využita jako organické hnojivo nebo vermikompostována (Doroški et al. 2022).

### **Příprava substrátu**

Při využití surovin jako je sláma, je nejprve nutné tento materiál upravit na vhodnou délku a následně upravit vlhkosti namáčením ve vodě. Tento proces trvá 24 – 71 hodin podle množství požadovaného substrátu a probíhá při teplotě do 60 °C. Vlhkost slámy vhodná k následnému teplotnímu ošetření je 65 – 76 % vody (Jablonský et al. 2019; Shah et al. 2004).

Dalším krokem v přípravě substrátu pro pěstování *P. ostreatus* je teplotní ošetření substrátu, které vede k likvidaci zárodků ostatních konkurenčních hub. Pro teplotní ošetření se využívá sterilizace, semisterilizace, pasterizace a řízená fermentace (Oseni et al. 2012; Stamets 2011).

Při procesu sterilizace je nutné, aby byla dosažena teplota 110 – 121 °C, a to z důvodu zničení všech stádií konkurenčních hub ve všech částech substrátu. Doba potřebná ke sterilizaci se liší podle použitého materiálu substrátu a také podle jeho množství. Při procesu sterilizace nedochází ke ztrátám sušiny a tento proces trvá pouze několik hodin. Proces sterilizace probíhá v autoklávu a jeho nevýhodou je energetická náročnost (Bernardi et al. 2013; Hasan et al. 2010; Higgins et al. 2017).

Pasterizace se provádí v uzavřeném prostoru pomocí páry v takzvaném „tunelu“ ve vrstvě substrátu 150 – 200 cm. Pro správný průběh pasterizace je důležité, aby byl substrát všude ve stejně vysoké vrstvě, jinak by vzduch unikal nižší vrstvou substrátu. Dále je nutné, aby měl substrát ve všech místech stejnou vlhkost. Pokud by byla v některých místech vlhkost substrátu nižší, vzduch by pronikal nerovnoměrně. Celý proces trvá 24 – 96 hodin při teplotě 60 – 70 °C (Jablonský et al. 2019; Sánchez 2010; Ziombra 2000).

Při semisterilizaci trvá teplotní ošetření 2 hodiny při teplotě 80 – 100 °C. Pokud jsou tyto parametry při procesu správně dodrženy, jsou vegetativní formy konkurenčních hub spolehlivě zničeny (Higgins et al. 2017; Jablonský & Šašek 2006).

Nejčastěji uplatňovanými postupy přípravy substrátu jsou dvě metody pasterizace. V prvním případě je substrát zahříván na teplotu 58 – 60 °C po dobu 18 - 21 hodin. K zahřátí na cílovou teplotu by mělo dojít během 5 – 6 hodin. Po uplynutí doby pasterizace se nechá substrát přirozeně zchladnout na 43 °C. Poté je substrát prudce zchlazen na 25 °C. Celková doba trvání této metody je 4 dny. Další často používanou metodou je kombinace pasterizace s „kondicionací“. Substrát se zahřeje na teplotu 60 °C po dobu 8 – 10 hodin, poté je teplota snížena na 48 – 52 °C. Při této teplotě se podpoří rozvoj termotolerantních hub a aktinomycet, které využijí k růstu rozpustné cukry v substrátu a tento substrát je tak lépe chráněn před rozvojem konkurenčních plísní. Ve fázi rozvoje těchto hub je nutné přivádět kyslík a podle potřeby udržovat teplotu regulováním přívodu páry (Jablonský et al. 2019).

Na rozdíl od žampionové kultury, která se kultivuje na odlišných substrátech, vhodných k zálivce, nedochází při kultivaci *P. ostreatus* k zálivce substrátu, a proto je vlhkost substrátu spolu s vysokou relativní vzdušnou vlhkostí v pěstírně zásadním faktorem pro úspěšné pěstování (Dias et al. 2013).



## **Sadba a prorůstání substrátu**

Pro přípravu sadby *P. ostreatus* se používají zrna pšenice, prosa a žita. Sadba se používá čerstvá a její skladování je možné po dobu maximálně 2 týdnů při teplotě 2 – 4 °C. Jednotlivé kmeny hlívy mají různé požadavky na pěstování, optimální podmínky pro fruktifikaci, vzhled plodnic a další, proto je důležité k tomuto faktoru přihlídnout při výběru sadby. Optimální teplotou pro inokulaci substrátu je 22 – 24 °C. Sadby se do substrátu přidává 2 – 3 % jeho konečné hmotnosti. Pokud je přidáno vyšší množství sadby, má substrát vyšší aktivitu, a může dojít k přehřátí substrátu. Pro správnou kolonizaci substrátu je důležité sadbu se substrátem rovnoměrně promíchat (Miles & Chang 1997; Sánchez 2010).

Inokulovaný substrát je plněn do pytlů nebo bloků, které je nutné perforovat, a to kvůli přístupu vzduchu ke kultuře (prorůstání je proces semiaerobní). Množství otvorů by mělo činit 0,5 – 1,8 % z celkové plochy. V případě, že je vytvořen menší počet, tvoří se větší trsy. Pokud jsou otvory ve folii příliš malé, dochází k tvorbě deformovaných plodnic. Kolonizace substrátu probíhá při teplotě 24 – 28 °C a to po dobu 14 – 17 dní. Teplota substrátu by neměla překročit 30 °C. Tomuto přehřátí lze předejít pomocí cirkulace vzduchu v pěstírně a snížené teplotě v kultivační místnosti (18 – 20 °C) (Jablonský et al. 2019).

## **Fruktifikace**

Pro zahájení tvorby primordií je nutné, aby mycelium v substrátu určitou dobu zrálo. Při tomto procesu dochází k přemístění vody a živin k vnějším vrstvám (k povrchu substrátu). Proces fruktifikace probíhá za snížené teploty, podle daného kmene *P. ostreatus*. Relativní vlhkost v pěstírně je do doby nasazení primordií 70 – 75 %, během vývoje primordií se vlhkost zvýší na 85 – 90 %. Před sklizní se relativní vzdušná vlhkost v pěstírně snižuje na 80 % a to z důvodu zabránění rozvoje bakteriózy (*Pseudomonas* ssp.). Bakterióza způsobuje oranžové až hnědé skvrny na plodnicích. Oproti tomu nízká relativní vzdušná vlhkost v pěstírně způsobuje zasychání primordií a praskání okrajů plodnic (Cantore & Iacobellis 2014; Jablonský et al. 2019).

Dalším podstatným faktorem při fruktifikaci je koncentrace CO<sub>2</sub>. Při sklizni plodnic by neměla být koncentrace CO<sub>2</sub> vyšší než 800 ppm. V případě, že je koncentrace CO<sub>2</sub> vyšší a to 1500 – 1800 ppm, dochází k tvorbě deformovaných zárodků, které se dále nevyvíjejí. Regulace vzduchu v pěstírně závisí na množství substrátu v pěstírně, teplotě a fázi vývoje houby. Při vyšší teplotě dochází

k intenzivnějšímu dýchání kultury, a proto je nutná větší výměna vzduchu. Kvalitu plodnic ovlivňuje také rychlost proudění vzduchu. Při 85 % vlhkosti vzduchu v pěstírně by rychlost proudění na povrchu neměla překročit 6 – 8 cm/s (Jablonský et al. 2019; Kamra & Zdražil 1986; Miles & Chang 1997).

Plodnice *P. ostreatus* se sklízají v trsech a sklizeň plodnic probíhá v několika vlnách. První sklizňová vlna probíhá přibližně po 12 dnech od nasazení primordií. Plodnice v optimální sklizňové kvalitě mají podvinutý okraj klobouku. Klobouky přezrálých plodnic mají nálevkovitý tvar a mohou být porostlé bílým myceliem. Sklizeň probíhá většinou ve dvou sklizňových vlnách a následně je substrát využit k dalším účelům. Výnos druhé sklizňové vlny je obvykle menší než při první sklizňové vlně (Jablonský & Šašek 2006).

## 2.2. Rod *Hericium*

### 2.2.1. Zařazení do systému

Říše: *Fungi* (Houby)

Oddělení: *Basidiomycota* (Houby stopkovýtrusné)

Podkmen: *Agaricomycotina*

Třída: *Agaricomycetes*

Řád: *Russulales* (Holubinkotvaré)

Čeleď: *Hericiaceae* (Korálovcovité)

Rod: *Hericium* (Korálovec)

(<https://www.Mykobank.org>)



Obrázek 2: *Hericium erinaceus*

### 2.2.2. *Hericium erinaceus* – korálovec ježatý

*Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. je saprotrofní houba rostoucí na kmenech a pařezech listnatých stromů, především buků a dubů (Dvořák & Hrouda 2005) s rozšířením v Evropě, Severní Americe a Asii (Halpern 2007). Plodnice houby jsou kompaktní, nevětvené a dosahují velikosti 7 – 25 cm v průměru. Na povrchu je plodnice pokryta ostny, které jsou v horní části pokroucené. V mládí má plodnice bílou barvu, která později zežloutne (Thongbai et al. 2015). Tramata jsou monomitická, generativní hyfy jsou tlustostěnné, amyloidní s přezkami. Gloeocystidy jsou přítomny. Výtrusy jsou

obvykle 5,3 - 6,4 × 4,3 - 5,2 μm velké, silnostěnné, široce elipsoidní, bradavičnaté a amyloidní (Dvořák & Hrouda 2005). *H. erinaceus* je vedené v Červeném seznamu hub ČR jako zranitelný druh (Holec & Beran 2006).

*H. erinaceus* je známé pro své nutriční, kulinářské a také medicínální účinky. Plodnice jsou bohaté na bílkoviny, vitamín B<sub>12</sub> a minerály. Obsahuje také mnoho bioaktivních látek, které mohou být rozděleny na vysokomolekulární látky, jako jsou polysacharidy a nízkomolekulární látky, které zahrnují například polyketidy a terpenoidy. Bioaktivní polysacharidy jsou hojně studovány pro své možné farmaceutické využití. Nicméně, bioaktivní sekundární metabolity, které lze získat ze submerzních kultur, se však nemusí vyskytovat v plodnicích. Ještě markantnější je rozdílné složení plodnic a kultur s ohledem na jejich obsah bioaktivních nízkomolekulárních metabolitů. Například hericenony a erinaciny převládají buď v plodnicích, nebo v myceliu. Monitorování spotřeby živin, respirace a produkce metabolitů v kultivačních médiích za řízených podmínek je pro optimalizaci procesu zásadní. Několik studií se snažilo zjistit nejlepší podmínky pro pěstování, tak aby houby produkovaly co nejvyšší množství biomasy a cenných bioaktivních metabolitů. Submerzní kultivace je nejslibnější alternativou pro vysoké výnosy biomasy mycelia a erinacinů, nikoli však hericenonů, které lze zatím získat pouze z plodnic. Z plodnic *H. erinaceus* bylo také izolováno pět polysacharidů, které vykazovaly protinádorovou aktivitu (xylany, glukoxylany, heteroxyloglukany a galaktoxyloglukany). Ve vodě rozpustné sacharidy extrahované z plodnic (β-1,6-glukan) o molekulární hmotnosti přibližně 13kDa vykazovaly schopnost aktivovat makrofágy v imunitním systému. V poslední době byly izolovány mnohé nízkomolekulární sekundární metabolity získané z mycelia nebo plodnic. Tyto metabolity mají špatnou rozpustnost ve vodě a jejich extrakce vyžaduje použití organických rozpouštědel jako je metanol nebo etylacetát (Atila et al. 2021; Lee et al. 2009; Ma et al. 2010; Mizuno et al. 1992; Thongbai et al. 2015).

### **2.2.3. Faktory ovlivňující růst *Hericium spp.***

#### **Teplota**

Teplotní optimum pro růst mycelia se pohybuje v rozmezí 25 – 30 °C, přičemž maximální teplota je 35 °C. V době fruktifikace je vhodné teplotu snížit na 16 - 23 °C. Tato změna teploty pro zahájení tvorby primordií může být v teplých oblastech nebo během léta limitujícím faktorem při kultivaci (Atila et al. 2021; Ko et al. 2005). Stamets (2011) uvádí, že při vlhkosti substrátu 50 – 70 % je optimální teplota pro růst mycelia 21 – 24 °C. Grigansky et al. (1999) studovali fyziologické charakteristiky 14 kmenů *H. erinaceus*. Zjistili, že se růst mycelia zastavil při teplotách 3 a 37 °C. Jako optimální teplota pro růst mycelia byla teplota 26 °C. Atila et al. (2021) zkoumali vliv teploty na fruktifikaci u izolátů rodu *Hericium spp.* (*H. erinaceus*, *H. coralloides* a *H. americanum*). Zjistili, že se jednotlivé izoláty *H. erinaceus* liší v teplotních požadavcích pro fruktifikaci. Jedna skupina izolátů vytvářela plodnice i při teplotě 25 °C. Oproti tomu druhá skupina tvořila plodnice při teplotách nižších (15 a 20 °C). *H. americanum* a *H. coralloides* mají potenciál pro kultivaci při 25 °C, nicméně tato teplota může negativně ovlivnit obsah bílkovin v plodnicích.

Teplota ovlivňuje také tvorbu spor. V laboratorních podmínkách byla zvýšená sporulace při teplotě 24 – 27 °C a vzdušné vlhkosti 85 – 95 %. Pokud byla teplota vyšší než 31 – 35 °C, tvorba spor se zastavila (McCracken 1970).

#### **pH**

Doporučené pH substrátu pro kultivaci rodu *Hericium spp.* je v rozpětí 4 – 6 (Sokół et al. 2015). Jiná studie udává optimální pH pro kultivaci 5,8 – 6,2 (Grigansky et al. 1999). Atila (2019) kultivoval *H. erinaceus* na substrátech z pilin, slámy a dalších zemědělských odpadů. pH těchto substrátů bylo před inokulací v rozmezí 4,37 – 6,53 při vlhkosti 70 %. V průběhu kultivace se hodnota pH snižovala (až o 21,5 %), stejně jako obsah vody v substrátech. Nejvyšší výnos byl zjištěn u substrátu z pilin, nicméně substráty ze slámy dosahovaly také uspokojivých výnosů. Další možností kultivace je kultivace submerzní. Jung et al. (2006) optimalizovali podmínky pro submerzní kultivaci a došli k závěru, že optimální složení média je 3 % glukózy, 0,2 % sladového extraktu/peptonu (1:1) a 0,1 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub> (1:1) při pH 5,7.

## **Světlo**

Také světelné podmínky jsou důležitým faktorem, který ovlivňuje růst a vývoj *H. erinaceus*. Optimální intenzita osvětlení pro kultivace se udává 200 – 400 lux, při relativní vzdušné vlhkosti 85 – 95 % a teplotě 10 až 24 °C (Sokół et al. 2015). Jednou z možností jak ovlivnit vývoj *H. erinaceus* je použití helium-neonového a argonového laseru. Bylo zjištěno, že ozáření červeným a zeleným světlem stimuluje růst mycelia na různých substrátech a zkracuje dobu kolonizace a fruktifikace (Poyedinok et al. 2003).

## **Voda**

Stejně jako u jiných pěstovaných hub i pro kultivaci *H. erinaceus* je důležitá vlhkost substrátu. Sokół et al. (2015) udávají jako optimum pro růst mycelia rozmezí 50 – 70 % vlhkosti při teplotě 21 – 24 °C. Hassan (2007) kultivoval *H. erinaceus* na substrátech složených z pilin, pšeničné slámy a otrub v různém poměru při počáteční vlhkosti substrátu 63 – 64 %. Nejvyšší biologické efektivity bylo dosaženo na substrátu z pilin a následně na substrátu z pilin v kombinaci s pšeničnou slámou. Siwulski et al. (2007) porovnávali různý počáteční obsah vody ve slámovém substrátu (60, 65, 70, 75 a 80 %) a jeho vliv na výnos plodnic. Nejvyššího výnosu bylo dosaženo při vlhkosti 70 % a 75 %, nejnižšího při vlhkosti 60 %. Vyšší vlhkost negativně ovlivnila tvar plodnic a způsobila jejich deformaci. Atila (2019) porovnával šest substrátů pro kultivaci *H. erinaceus* a sledoval změny složení substrátu v průběhu kultivace. Bylo zjištěno, že největší úbytek vody v substrátu nastal v čase mezi kolonizací substrátu a sklizní. V případě substrátu z pšeničné slámy došlo k největšímu úbytku vlhkosti (17,3 %) a také k největšímu poklesu pH (21,5 %) ze všech variant.

### **2.2.4. Pěstování rodu *Hericiium* spp.**

Přestože se *H. erinaceus* dnes pěstuje především v asijských zemích, jako je Čína, Japonsko a Severní Korea, poprvé byl korálovec pěstován v USA (Sokół et al. 2015). První záznamy o pěstování *H. erinaceus* pocházejí z roku 1988 z Číny, kdy se ke kultivaci využívaly špalky dřeva, lahve a propylenové sáčky (Suzuki & Mizuno 1997). V České republice je prodej čerstvých plodnic korálovce ježatého povolen vyhláškou Ministerstva zemědělství (Vyhláška č. 397/2021 Sb.), která zařazuje tuto houbu do seznamu pěstovaných hub povolených k přímému prodeji nebo k dalšímu průmyslovému zpracování pro potravinářské účely.

## Příprava substrátu

K přípravě substrátu na pěstování *H. erinaceus* je vhodné použít tvrdé dřevo listnatých stromů (dub, buk, javor, olše). Použití dřeva jehličnanů není vhodné z důvodu vysokého obsahu pryskyřic a taninu. K vybranému substrátu se dále přidává další zdroj uhlíku jako například otruby, ovesná mouka nebo obilí. Tento doplněk tvoří 8 – 25 % celkové suché hmotnosti substrátu (Stamets 2011).

Pro kultivaci *H. erinaceus* je možné využít různé lignocelulózové odpady jako jsou piliny, bavlníkové odpady, kukuřičná vřetena, rýžová sláma nebo obilná zrna (Sokół et al. 2015). Hassan (2007) kultivoval *H. erinaceus* na bukových pilinách obohacených o pšeničné otruby, žitné zrna, sójovou moučku, řepkový šrot a masokostní moučku. Bylo zjištěno, že nejvyššího výnosu dosahuje *H. erinaceus* na substrátu z bukových pilin s přídavkem pšeničného šrotu a sójových otrub. Siwulski et al. (2009) při kultivaci *H. erinaceus* dosáhli nejvyšších výnosů při kultivaci na substrátu složeného z bukových a borovicových pilin doplněných o 20 % pšeničných otrub a 1 - 3 % glukózy, při počáteční vlhkosti substrátu 70 %. Došli k závěru, že se jednotlivé testované kmeny liší v rychlosti růstu a pro růst je lepší substrát s přídavkem 3 % glukózy. Ko et al. (2005) kultivovali různé druhy *Hericiium* spp. a čtyři kmeny *H. erinaceus* na dubových pilinách o vlhkosti 65 % a pH substrátu 5,0 – 6,0. K substrátu byli přidány vybrané suplementy (rýžové otruby, pšeničné otruby, ječmenné otruby, čínské zelí, sójový prášek a vaječné skořápky) a byl zjišťován vliv na růst mycelia a na biologickou efektivitu. Pro růst mycelia se u všech kmenů *H. erinaceus* ukázal jako nejvhodnější přídavek otrub z ječmene a sójového prášku. Jako nejméně vhodný přídavek do substrátu se projeví vaječné skořápky. V případě hodnocení biologické efektivity substrátu byly použity piliny s přídavkem rýžových otrub s vlhkostí 65 % vody v substrátu. Biologická efektivita substrátu u různých kmenů *H. erinaceus* se pohybovala v rozpětí 31 – 70 %. Další možností přípravy substrátu je jeho obohacení o další složky, jako je například selen. Selen je esenciální prvek důležitý pro člověka. Tento prvek je zabudován do selenoproteinů ve formě selenocysteinu a podílí se na buněčných fyziologických procesech (redoxní homeostáza, imunologické reakce a další). Zvýšení koncentrace selenu v potravinách je jednou z možností, jako ho ve stravě doplnit (D'Amato et al. 2020). Pro fortifikaci substrátu se nejčastěji používají anorganické seleničnany a seleničitany, které se později přeměňují na organické selenoaminokyseliny (selenomethionin, selenocystin)

(Niedzielski et al. 2014; Rayman 2020). Hu et al. (2020) zkoumali vliv biofortifikace selenem na *H. erinaceus* a jeho *in vitro* biologickou přístupnost. Zjistili, že kultura *H. erinaceus* lépe rostla na substrátu se selenomethioninem, než na substrátech s anorganickými variantami selenu. Dále došli k závěru, že s rostoucí koncentrací selenu se také zvyšoval obsah selenu v plodnicích a byla ovlivněna akumulace dalších prvků. Selen obsažený v substrátu byl absorbován a přeměněn do organické formy, zejména selenomethioninu a selenocysteinu.

Suchý substrát je smíchán s vodou na požadovanou vlhkost. Jako optimální vlhkost substrátu se uvádí rozpětí 50 – 70 % (Hassan 2007; Miles & Chang 1997; Sokół et al. 2015). Navlhčený substrát je plněn do polypropylenových nádob, sáčků či lahví. Uzavřené nádoby jsou opatřeny mikroporézními filtry. Následně jsou nádoby se substrátem podrobeny tepelnému ošetření. Jako tepelné ošetření se využívá sterilizace při 121 °C po dobu 1 – 2 hodin (Siwulski & Pawlak 2005).

### **Sadba a prorůstání substrátu**

Při pěstování *Hericium* spp. se využívá stejné přípravy jako u dalších pěstovaných hub, kdy se uvařené zrno obilnin sterilizuje a následně inokuluje vybraným myceliem druhu a kmenu rodu *Hericium*. Teplota vhodná pro kolonizaci zrna je 24 – 27 °C. Zrno se po dobu 14 dnů pravidelně protřepává, aby došlo k rovnoměrné kolonizaci zrna. Takto připravenou sadbu lze skladovat při teplotě 2 – 5 °C po dobu maximálně jeden měsíc (Jablonský et al. 2019).

Substrát se inokuluje sadbou a nechá se prorůstat při teplotě 25 – 30 °C po dobu 14 – 21 dnů (Ko et al. 2005). Kolonizace substrátu probíhá bez přítomnosti světla a optimální rozmezí teplot je zajišťováno chlazením a větráním v kultivační místnosti (Stamets 2011).

### **Fruktifikace**

Podmínky pro tvorbu primordií jsou odlišné od podmínek kolonizace substrátu myceliem. Teplota substrátu je snížena na teplotu okolo 20 °C, relativní vzdušná vlhkost je 90 – 95 %, dochází také ke snížení koncentrace CO<sub>2</sub> pod 800 ppm (Stamets 2011). Miles & Chang (1997) uvádějí jako teplotní optimum 20 °C. Při teplotě 25 °C je tvorba primordií a plodnic zpomalena až zcela zastavena. Pokud teplota klesne pod 14 °C, dochází sice k nasazování primordií, ale ty se dále nevyvíjejí. Jiná studie uvádí optimální podmínky pro fruktifikaci zahrnující teplotu 10 – 24 °C, pH 4 – 6, relativní



vzdušnou vlhkost v pěstírně 85 – 98 % a osvětlení o intenzitě 200 – 400 lux (Wang 2002). Hu et al. (2008) doporučují pro fruktifikaci konstantní teplotu 23 °C.

Výměna vzduchu je regulována tak, aby nedocházelo k přílišnému výparu a následnému vysychání substrátu. Nízká relativní vlhkost vzduchu se projevuje na kvalitě plodnic, kterým praskají okraje a primordia zasychají a dále se nevyvíjejí (Stamets 2011). Deformaci plodnic způsobuje také vysoká koncentrace CO<sub>2</sub> (Miles & Chang 1997).

Před sklizní by se teplota v pěstírně měla snížit na 10 – 17 °C, relativní vzdušná vlhkost na 80 – 88 % a koncentrace CO<sub>2</sub> klesnout pod 1000 ppm. V případě, že je relativní vlhkost vyšší, zvyšuje se riziko napadení velkých plodnic bakteriózou (Jablonský & Šašek 2006).

Pokud byla kultura pěstována v lahvích, sklízí se plodnice z hrdla lahve. Při pěstování v propylenových sáčcích vyrůstá plodnice z mikroporézního filtru (Stamets 2011). Plodnice jsou bílé až lehce nažloutlé s měkkou dužinou (Imtiaj et al. 2008). Hmotnost plodnice je 60 – 70 g, v některých případech až 100g (Miles & Chang 1997). K nasazení primordií druhé sklizňové vlny dochází za 2 – 3 týdny po sklizni první vlny. Výnos druhé sklizňové vlny je nižší a to 5 – 30 % vlny první (Jablonský & Šašek 2006).

## **2.3. Enzymatická aktivita hub**

### **2.3.1. Ligninolytické enzymy**

Houby bílé hniloby, jako je například *P. ostreatus*, *Bjerkadere sp.*, *Trametes versicolor* a další, jsou charakteristické produkcí extracelulárních enzymů, které rozkládají lignin, celulózu a hemicelulózu. Mezi tyto enzymy patří mangan peroxidáza (MnP, EC 1.11.1.13) a lakáza (EC 1.10.3.2). Některé houby produkují všechny ligninolytické enzymy, zatímco některé houby produkují pouze jeden či dva enzymy z této skupiny (Elisashvili et al. 2008). Pro tyto ligninolytické enzymy je charakteristická nízká substrátová specifita, a proto jsou schopny katalyzovat různé typy reakcí. Nízká substrátová specifita se využívá pro různé biotechnologické účely, jako jsou biomechanické rozvlákňování, bělení buničiny, degradace barviv a transformace a detoxifikace xenobiotik a dalších aromatických složek (Camassola et al. 2013; Patel et al. 2009). Basidiomycety, které efektivně rozkládají lignocelulózové odpady jsou jedny z nejvíce aktivních rozkladačů polycyklických aromatických uhlovodíků. Ukázalo se, že kromě rozkladu ligninu, efektivně rozkládají taky široké spektrum aromátů,

včetně pesticidů, polychlorovaných bifenyly, trinitrotoluenu a také polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) (Pozdnyakova et al. 2016). Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou organické polutanty s kondenzovanými aromatickými jádry, které jsou zvláště zajímavé kvůli své toxicitě a všudypřítomnosti v životním prostředí. Mimo to je závažná jejich karcinogenita. PAH mají tendenci se hromadit v půdách, sedimentech nebo čistírenských kalech. Rozpustnost PAH ve vodě je nízká, ale některé studie naznačují, že jsou transportovány ve spojení s rozpuštěnou organickou hmotou, což zvyšuje jejich biologickou dostupnost, která je základním požadavkem pro bioremediace PAH. Výzkum ukazuje, že extracelulární peroxidázy jsou zodpovědné za prvotní oxidaci PAH. Lignin peroxidázy oxidují množství PAH přímo, zatímco mangan peroxidázy je spoluoxidují nepřímo prostřednictvím enzymaticky zprostředkované peroxidace ligninu. Rozklad ligninu je oxidativní, indukovaný vysokým obsahem kyslíku v médiu a je součástí sekundárního metabolismu organismu. Převažujícími produkty degradace PAH je několik derivátů, jako jsou chinony, dikarboxyláty a jejich deriváty. Degradace PAH pomocí hub není tak rychlá nebo účinná jako bakteriální, ale je velmi nespecifická a má tak schopnost hydroxylovat širokou škálu xenobiotik. Kromě toho mnoho hub se přirozeně vyskytuje v půdě a lze je proto využít k odstranění polutantů (Kadri et al. 2017; Gerhardt et al. 2017; Košnář et al. 2019).

Produkce ligninolytických enzymů je závislá na kultivačním médiu, pH, teplotě a také na růstové fázi dané houby (Knop et al. 2015). Bylo zjištěno, že se v průběhu kultivace mění aktivita jednotlivých enzymů, a to při přechodu z fáze kolonizace do fáze fruktifikace (Isikhuemhen & Mikiashvilli 2009).

#### **2.3.1.1. Lakáza**

Lakáza patří do skupiny polyfenolických oxidáz obsahující čtyři atomy mědi v katalytickém místě, která katalyzuje redukci kyslíku na vodu za současné oxidace substrátu (Patel et al. 2009). Lakáza se vyskytuje v několika izoformách, které se od sebe liší strukturou proteinové části, molekulovou hmotností, optimálním pH, teplotou a dalšími vlastnostmi (Palmieri et al. 2000). Produkce tohoto enzymu houbami bílé hniloby je spojena nejen s degradací ligninu, ale také s produkcí spor, produkcí pigmentu a vývojem plodnic (Chen et al. 2004; Patel et al. 2009).

Produkce lakázy závisí na druhu houby, kultivačním médiu, koncentraci uhlíku a dusíku v médiu, době inkubace a přítomnosti induktoru. Induktor je molekula, která

dopomáhá syntéze daného enzymu a je také substrátem daného enzymu. Jako induktory mohou sloužit přírodní složky (sláma, dřevo a jiné materiály) nebo chemické sloučeniny (2,5-xyloidin, guajakol, kyselina ferulová, 1- hydroxybenzotriazol a další) (Baldrian & Gabriel 2002). Důležitými induktory pro produkci ligninolytických enzymů jsou některé rizikové prvky. Mezi prvky, které ovlivňují aktivitu enzymů, patří měď, mangan, molybden, zinek, nikl a železo. Nejdůležitějšími prvky pro houby bílé hniloby jsou mangan a měď. Mangan slouží jako regulátor při expresi lignin peroxidázy, mangan peroxidázy a lakázy a také při degradaci ligninu. Měď působí jako kofaktor v katalytickém centru lakázy a působí na ni na transkripční úrovni (Palmieri et al. 2000).

Pro aktivitu lakázy je důležitý substrát, na kterém se vybraná houba kultivuje. El-Batal et al. (2015) ve svém experimentu s použitím různých zdrojů uhlíku a dusíku zjistili, že nejvyšší aktivita lakázy byla u varianty pěstování *P. ostreatus* na pšeničných větvech jako zdroji uhlíku. Nejnižší aktivita lakázy byla zaznamenána při pěstování na kávové sedlině. Při zkoumání vhodného zdroje dusíku byla nejvyšší aktivita lakázy zjištěna u sladinového a kvasničného extraktu. Pro podporu růstu byly použity pšeničné otruby a sladinový extrakt. Luz et al. (2012) v provedených pokusech zjistili nejvyšší aktivitu lakázy u substrátu složeného z pilin s přídavkem 20 % rýžových otrub a kávové sedliny s přídavkem 20 % rýžových otrub, zatímco nejnižší aktivita byla zaznamenána u substrátu z blahovičnickové kůry.

Schopnosti lakázy se využívají v různých průmyslových odvětvích. V potravinářském průmyslu se používá při stanovení kyseliny askorbové, ke zvýraznění chuti a barvy nápojů, při odstraňování fenolových látek v moštu a víně a jako jejich biosenzor. Dále se v průmyslu využívá k biomechanickému rozvláknování, bělení buničiny a degradaci barviv (Madhavi & Lele 2009; Patel et al. 2009).

V současné době je významným problémem kontaminace životního prostředí různými polutanty. Pro jejich odstranění se používá lakáza produkovaná houbami bílé hniloby. Tento enzym slouží k dekontaminaci životního prostředí chloraromáty, pesticidy, aromatickými herbicidy, polycyklickými aromatickými uhlovodíky a také syntetickými barvivy. Při pokusu s degradací antracenu a pyrenu z kontaminované půdy za pomoci *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Pleurotus ostreatus* bylo zjištěno, že degradované množství těchto organopolutantů závisí na množství produkované lakázy a mangan peroxidázy v kontaminované půdě (Novotný et al. 2004). Degradace polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) pomocí lakázy také závisí na hodnotě pH. Jako optimum pro aktivitu lakázy produkované houbami

bílé hniloby se uvádí pH 3 - 6 (Jořenek & Zajoncová 2013). Wang et al. (2018) zjistili, že k větší degradaci pyrenu a benzopyrenu v kontaminované půdě dochází při pH 4 než při pH 6.

### **2.3.1.2. Mangan peroxidáza**

Mangan peroxidáza je nejběžnější glykoproteinovou peroxidázou, která je produkována téměř všemi houbami osidlujícími dřevo a způsobujícími bílou hnilobu a dále mnohými houbami osidlujícími půdu podílejí se na rozkladu ligninu. Molekulová hmotnost mangan peroxidázy se pohybuje okolo 40 – 62,5 kDa (Hofrichter 2002). Tento enzym je houbami produkován do jejich mikroprostředí. Mangan peroxidáza v prostředí přednostně oxiduje ionty  $Mn^{2+}$ , které jsou vždy přítomné ve dřevě a v půdě, na vysoce reaktivní  $Mn^{3+}$ , který je stabilizován karboxylovými kyselinami (šťavelová, malonová, mléčná) a vznikajícími cheláty (oxalát, malonát a maleát) (Hofrichter et al. 2010). Tyto cheláty pak mohou katalyzovat jednoelektronovou oxidaci dalších substrátů. Mangan peroxidáza se mnohdy nachází ve formě izoenzymů. Tyto izoenzymy se liší především v izoelektrických bodech, nacházejících se zejména při kyselém pH (3 – 4) (Šušla & Svobodová 2006).

dos Santos Bazanella et al. (2013) zjišťovali vliv složení substrátu na aktivitu ligninolytických enzymů. Nejvyšší aktivita mangan peroxidázy byla zaznamenána v substrátu z ananasových slupek a dále v substrátu z pšeničné slámy. Také byl zjištěn vliv počáteční vlhkosti substrátu na aktivitu enzymů. U substrátu z ananasových slupek byla nejvyšší aktivita mangan peroxidázy při počáteční vlhkosti 75 %. U substrátů z pšeničné slámy a kukuřičných větven byla jako optimální počáteční vlhkost substrátu vyhodnocena vlhkost substrátu 70 %.

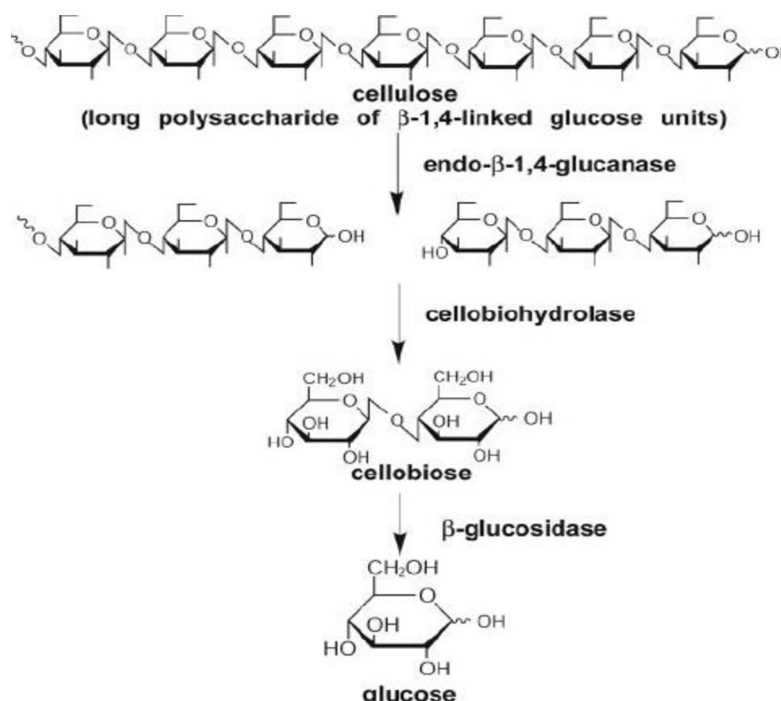
Při zkoumání vlivu média na aktivitu ligninolytických enzymů včetně mangan peroxidázy bylo zjištěno, že aktivita enzymů je vyšší, pokud je použito kultivační médium bohaté na dusík, jako například glukozo - peptonové (Knop et al. 2015). Ruiz-Dueñas et al. (1999) zkoumali, které složky peptonu byly zapojeny do změny exprese mangan peroxidázy, na základě frakcionace peptonu gelovou filtrací. Bylo zjištěno, že jako nejvyšší induktor exprese peroxidázy může fungovat pouze frakce s nejvyšší molekulovou hmotností, sestávající z poměrně nízkého obsahu aromatických aminokyselin.

Díky nízké substrátové specifitě nachází mangan peroxidáza využití v biotechnologiích, jako je například výroba přírodní aromatické chuti nebo

odbarvování průmyslových odpadních vod při výrobě textilu, lihovin, buničiny a papíru. Tento enzym se využívá také při biodegradacích mnoha xenobiotik (Chowdhary et al. 2018).

### 2.3.2. Hydrolytické enzymy

Hydrolytické enzymy jako jsou endoglukanáza (EC 3.2.1.4), exocelobiohydroláza (EC 3.2.1.91),  $\beta$ -glukosidáza (EC 3.2.1.21) a další se podílí na konečném rozkladu celulózy (Ghosh et al. 1998). Kompletní enzymatická hydrolyza vyžaduje synergický účinek 3 typů enzymů, jmenovitě celobiohydrolázy, endoglukanázy nebo karboxymethylcelulázy (CMCase) a  $\beta$ -glukosidázy (Bhat 2000).



Obrázek 3: Rozklad celulózy pomocí enzymů (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17400776/>)

#### 2.3.2.1. $\beta$ -glukosidáza

$\beta$ -glukosidáza je enzym podílející se na degradaci celulózy, což je hlavní složka rostlinných polysacharidů. Při degradaci celulózy se uplatňují tři enzymy, a to  $\beta$ -1,4-glukosidáza (EC 3.2.1.21),  $\beta$ -1,4-endoglukanáza (EC 3.4.1.4),  $\beta$ -1,4-exoglukanáza (celobiohydroláza) (EC 3.2.1.91).  $\beta$ -glukosidáza dokončuje proces hydrolyzy tím, že katalyzuje hydrolyzu alkyl- a aryl- $\beta$ -glukosidů, diglukosidů a oligosacharidů. Dochází ke štěpení celobiózy, aby se uvolnily dva moly glukózy na mol celobiózy, a proto reguluje dodávku důležitého zdroje energie pro mikroorganismy, které nemohou přímo

absorbovat celobiózu (Morais et al. 2002; Turner et al. 2002).  $\beta$ -glukosidázu produkují mnohé organismy, jako jsou bakterie, kvasinky a houby. Nejvíce zkoumanými enzymy byly celulózy, které jsou produkovány houbami *Trichoderma* spp. a *Aspergillus* spp. (Baig 2005; Narasimha et al. 2006). Nicméně jsou zkoumány také další alternativy organismů, které efektivně degradují lignocelulózu, jako například *Pleurotus* spp. (Salmones et al. 2005; Zhang et al. 2002). V průběhu kultivace *Pleurotus sajor – caju* byl zaznamenán postupný růst aktivity  $\beta$ -glukosidázy. Tento nárůst aktivity závisel na aktivitě endoglukanázy a celobiohydrolázy, které poskytovaly substrát pro  $\beta$ -glukosidázu (Kannan et al. 1990).

Na aktivitu  $\beta$ -glukosidázy má vliv řada faktorů, jako je pH, teplota, kultivační médium a vlhkost substrátu. Optimální hodnota pH pro aktivitu  $\beta$ -glukosidázy je v rozmezí 4,5 – 7,0. Nebyl zjištěn vliv rychlosti růstu na aktivitu tohoto enzymu, ale byl zjištěn vliv teploty. Teplotní optimum se pohybuje mezi 20 – 30 °C při vlhkosti substrátu 60 % (Goyal & Soni 2011; Hong et al. 1984).

$\beta$ -glukosidáza může být zvláště užitečným enzymem pro monitorování kvality půdy, protože má ústřední roli v koloběhu organických látek v půdě, což je obecně považováno za důležitou složku kvality půdy. Výzkum ukázal, že  $\beta$ -glukosidáza je snadno detekovatelná a nejhojnější ze tří enzymů podílejících se na degradaci celulózy v půdě a málokdy je omezena substrátem (Turner et al. 2002).

#### **2.3.2.2. Celobiohydroláza**

Celobiohydroláza se podílí na degradaci celulózy tím, že odštěpuje dvě spojené glukózové molekuly z konců celulóзовého řetězce, který byl předtím rozštěpen endoglukanázou na kratší řetězce (Dahman et al. 2019).

Při degradaci celulózy se enzymy chovají synergisticky a dochází k produkci sacharidů, které mohou být snadno asimilovány pomocí mycelia hub. Nejvyšší aktivita celobiohydrolázy byla proto zaznamenána ve fázi nasazení primordií a fruktifikace. Ve fázi kolonizace a po sklizni nebyla zaznamenána žádná aktivita celobiohydrolázy. Množství celulózy se během kolonizace substrátu nesnížilo a k výraznějšímu poklesu obsahu celulózy došlo až ve fázi nasazení primordií a fruktifikace. Toto zjištění vysvětluje vyšší aktivitu celobiohydrolázy až v pozdějších fázích kultivace. Protože nasazení primordií vyžaduje zvýšenou mobilizaci živin, aktivita celobiohydrolázy a endoglukanázy může tento požadavek na živiny vyrovnat (Claydon et al. 1988; Velázquez-Cedeño et al. 2002).

### **3. Cíle a hypotézy**

#### **3.1. Hypotézy**

- 1) Různé druhy hub reagují na přidavek vody do substrátu odlišně.
- 2) Obsah vody v substrátu ovlivní pH kolonizovaného substrátu.

#### **3.2. Cíle práce**

- 1) Nalezení optimální vlhkosti (obsahu vody) substrátu pro příslušné druhy hub během celého trvání kultury.
- 2) Objasnění vztahu mezi vlhkostí a aktivitou hydrolytických a ligninolytických enzymů, pH a dalších vybraných parametrů substrátu.

## **4. Metodika**

### **4.1. Fylogenetická analýza a vliv teploty na růst jednotlivých skupin rodu *Pleurotus* spp.**

#### **4.1.1. Použité organismy**

Pro pokusy byly použity kultury rodu *Pleurotus* spp. (Příloha 1) ze sbírek Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i., Mikrobiologického ústavu AV ČR a Katedry zahradnictví České zemědělské univerzity v Praze.

#### **4.1.2. Kultivační médium**

Kmeny vybraných organismů byly kultivovány na 2% agarovém médiu (MEA) (Carl Roth GmbH, Germany) s přídavkem 2 % sladinového extraktu (Carl Roth GmbH, Germany) připraveného dle Pánek et al. (2019).

#### **4.1.3. Extrakce DNA a analýza PCR**

Pro analýzu byly vybrány tři oblasti jaderné DNA. DNA byla extrahována z čerstvých kultur pomocí Qiagen Plant mini kit (Qiagen, Nizozemsko). Pro DNA amplifikaci byly použity primery internal transcribes spacer rRNA (ITS): ITS1/ITS4-B, translační elongační faktor 1-alfa (TEF1): EF1160R/EF595F a druhá největší podjednotka RNA polymerázy II (RPB2): bRPB2-6.9F/fRPB2-11R1. PCR mix pro ITS obsahoval 20 ng DNA, 1x standard NEB pufr, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,06 mM primerů a 0,01 U/μl NEB standard Taq DNA polymerázy. Pro TEF1 bylo použito 24mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM primerů a 0,015 U/μl NEB standard Taq DNA polymerázy. Pro RPB2 byla koncentrace primerů 0,2 mM a 0,2 U/μl NEB standard Taq DNA polymerázy. Koncentrace dNTPs byla 0,2 mM pro všechny tři reakce.

Analýza PCR proběhla pro ITS: denaturace 95 °C po dobu 5 minut, dále 35x (95 °C/35 s, 60 °C/20 s, 72 °C/ 20 s), extenze 72 °C/ 5 min. TEF1: denaturace 95 °C po dobu 5 minut, dále 35x (95 °C/30 s, 57 °C/30 s, 72 °C/ 30 s), extenze 72 °C/5 min. RPB2: denaturace 95 °C po dobu 5 minut, dále 35x (95 °C/30 s, 58 °C/40 s, 72 °C/ 30 s), extenze 72 °C/5 min (Pánek et al. 2019).



#### **4.1.4. *Fylogenetická analýza, test populační diferenciace***

Získané sekvence všech tří oblastí DNA byly zarovnány pomocí online programu MAFFT (verze 7, Osaka), s nastavením možnosti Q-INS-i a ručně upraveny pomocí programu BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>). Sekvence získané pomocí PCR byly použity pro fylogenetickou analýzu. ITS dataset byl obohacen o dříve publikované sekvence (Petersen & Hughes 1999; Liu et al. 2016; Li et al. 2019; Zervakis et al. 2019). Dataset ITS dosahoval délky 641 bp (472 konzervovaných, 166 variabilních a 19 singletových pozic). Kombinovaný dataset ITS-TEF1-RPB2 byl dlouhý 1421 bp (1899 konzervovaných, 451 variabilních a 247 singletových pozic). K porovnání fylogenetického vztahu obou datasetů byla použita analýza Bayesovské inference (BI). Analýza BI byla provedena pomocí programu MrBayes 3.2.6. (Ronquist et al. 2012). Nastavení pravděpodobnosti z nejlépe vyhovujícího modelu pro ITS (GTR + G) a kombinovaný soubor dat (TPM2uf + G = ITS, TIM2ef + G = TEF1, TIM1 + I + G = RPB2) bylo vybráno pomocí informačního kritéria Akaike v programu jModelTest2 (Darriba et al. 2012). Kombinovaný soubor dat byl rozdělen na tři podmnožiny nukleotidových míst: ITS, TEF1, RPB2. Byly spuštěny čtyři řetězce pro 10 milionů reakcí. Frekvence vzorkování byla nastavena na každou 1000. generaci.

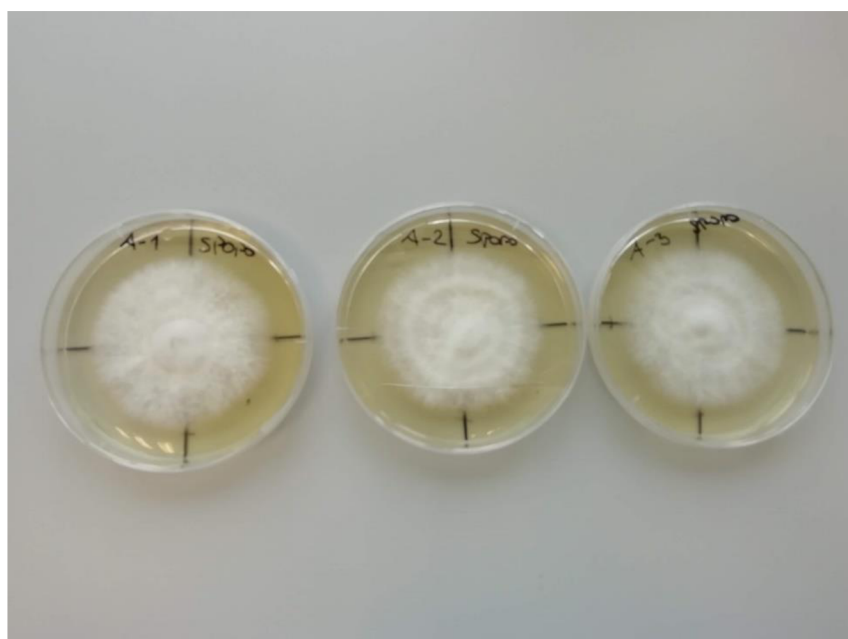
Dále byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA). AMOVA byla zpracována softwarem Arlequin (Excoffier et al. 1992) ve standardním nastavení výpočtu AMOVA po lokusech v haplotypovém formátu. Na základě této analýzy byla vypočtena celková hodnota  $F_{ST}$  a populační párová  $F_{ST}$  jednotlivých skupin identifikovaných fylogenetickou analýzou. Pro vyhodnocení míry přirozené náhodné hybridizace mezi příslušníky populací byl zpracován test vazebné nerovnováhy. Pro popis molekulární diverzity byla vyjádřena nukleotidová diverzita, jako pravděpodobnost, že dvě náhodně vybraná homologická nukleotidová místa budou odlišná. Genová diverzita byla vypočtena jako pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané haplotypy ve skupině budou odlišné. Pro potvrzení diferenciace mezi navrženými skupinami byl zpracován test populační diferenciace s počtem kroků Markovova řetězce 10 000 a počtem kroků dememorizace 1000 (Pánek et al. 2019).

#### 4.1.5. Odhad evoluční divergence

Evoluční divergence mezi skupinami izolátů definovanými na základě fylogenetické analýzy byla odhadnuta pomocí softwaru Mega 7.0 (Kumar et al. 2016). Byly použity všechny substituce (přechody + transverze) v rámci zarovnání, počet bootstrapových opakování byl nastaven na 100 a byl použit model Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993).

#### 4.1.6. Porovnání kardinálních teplot

Porovnáním kardinálních teplot bylo provedeno určení minimálního a maximálního růstu mycelia k ověření rozdělení skupin *Pleurotus* spp. Pro experiment byly vybrány kmeny *P. ostreatus* a *P. pulmonarius* (Tabulka 1). Jednotlivé kmeny byly pomocí fylogenetické analýzy a analýzy populační diferenciace rozděleny do skupin OA (skupina *P. ostreatus* A), OB (skupina *P. ostreatus* B) a P (skupina *P. pulmonarius*). Kultury byly kultivovány na MEA dle Pánek et al. (2019). Kultivace proběhla při 8 teplotách, a to: 7 °C, 10 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 32 °C, 35 °C a 37 °C. Petriho misky s MEA byly inokulovány 3 mm terčíky mycelia jednotlivých izolátů, které byly umístěny na střed dvou na sebe kolmých os. Přírůstek mycelia byl zaznamenán po 7 dnech (pro teploty 22 °C, 25 °C, 28 °C a 32 °C) a 14 dnech (pro teploty 7 °C, 35 °C a 37 °C). Z měření spočítán přírůstek mycelia za den. Pokus byl proveden v 5 opakováních pro každý izolát a teplotu.



Obr. 4: Příklad měření přírůstku mycelia u *P. ostreatus* SPOPO

**Tabulka 1:** Kmeny *P. ostreatus* a *P. pulmonarius* použité pro porovnání kardinálních teplot

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank number	molekulární skupina	GenBank number	molekulární skupina	GenBank number		
6689*	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757090	OA	MK810672	OA	MK810572	W	Rakousko
CCBAS 459	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757081	OA	MK810664	OA	MK810553	W	Německo
CCBAS 462	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757077	OA	MK810666	OA	MK810568	W	VB
CCBAS 472	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757084	OA	MK810663	OA	MK810578	C	ČR
CCBAS 474	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757083	OA	MK810661	OA	MK810551	W	Bulharsko
CCBAS 692	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757091	OA	MK810668	OA	MK810554	W	Japonsko
CCPF 5001	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757104	OB	MK810637	OB	MK810587	U	ČR
CCPF 5002	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757105	OB	MK810635	OB	MK810589	U	ČR
CCPF 5117	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757070	OA	MK810647	OA	MK810555	C	Čína
CCPF 5155	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757072	OA	MK810649	OA	MK810549	W	Slovensko
HK35	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757107	OB	MK810641	OB	MK810582	C	Maďarsko
M2125	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757101	OB	MK810638	OB	MK810579	C	Florida, USA
SPOPPO	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757103	OB	MK810636	OB	MK810588	C	komerční izolát
CCPF 5011	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757117	P	MK810714	P	MK810629	W	ČR
CCPF 5015	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757116	P	MK810718	P	MK810614	W	Tenerife
CCPF 5023	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757115	P	MK810717	P	MK810615	C	Čína
CCPF 5086	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757119	P	MK810715	P	MK810633	W	ČR
CCPF 5127	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757129	P	MK810709	P	MK810625	W	ČR
CCPF 5128	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757110	P	MK810712	P	MK810618	W	ČR
CCPF 5152	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757122	P	MK810711	P	MK810619	W	Slovensko
CCPF 5168	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757123	P	MK810701	P	MK810617	W	ČR

Izoláty byly přiřazeny do skupiny: E - *P. eryngii*, OA – *P. ostreatus* A, OB – *P. ostreatus* B, P – *P. pulmonarius*, T – *P. tuoliensis*. Kultivační historie izolátů: W – divoký kmen, C – pěstovaný, U - neznámý.

## **4.2. Vliv různých vlhkostí substrátu na kulturu *Pleurotus ostreatus* a *Hericiium erinaceus***

### **4.2.1. Příprava substrátu**

Mycelium *P. ostreatus* a *H. erinaceus* bylo kultivováno na 2% agarovém médiu (MEA) (Carl Roth GmbH, Germany) s přídatkem 2 % sladidového extraktu (Carl Roth GmbH, Germany) připraveného dle Pánek et al. (2019). Tyto kultury byly umístěny v inkubátorech Q-Cell 140/40 Basic (POL-LAB, Polsko) při teplotě 25 °C.

Následně byla připravena sadba z pšeničného zrna. Zrna pšenice byla vařena ve vroucí vodě po dobu 30 minut. Po odstranění přebytečné vody byl přidán síran vápenatý, a to v množství 2 % hmotnosti pšeničných zrn. Poté byla připravená obilná zrna plněna do skleněných lahví a následně sterilizována v autoklávu Sanyo MLS-3781L (Sanyo, Japonsko) při 121 °C po dobu 2 hodin. Zchladlá pšeničná zrna byla inokulována vybranými kulturami a ponechána v inkubátoru Q-cell při 25 °C, dokud nebylo zrno zcela kolonizováno myceliem (Košnář et al. 2019). Takto připravená sadba byla použita pro inokulaci substrátu pro pěstování *P. ostreatus* a *H. erinaceus*.

Jako pěstební substrát pro kultivaci *P. ostreatus* a *H. erinaceus* byly použity slaměné pelety. Pelety byly smíchány s vodou v poměrech odpovídajících 60 %, 65 %, 70 % a 75 % konečné vlhkosti substrátu. Takto připravený substrát byl plněn do kbelíků o objemu 2300 ml a následně podroben sterilizaci v propařovací komoře při teplotě 90 °C po dobu 24 hodin. Po zchladnutí substrátu byla provedena inokulace zrnitou sadbou (10 g sadby na povrch substrátu v kbelíku). Poté byl substrát ponechán ke kolonizaci myceliem při teplotě 24 °C (Wiesnerová et al. 2023).

### **4.2.2. Odebírání vzorků**

V průběhu experimentů byly odebírány vzorky z okrajové vrstvy substrátu (1 – 2 cm od povrchu) a ze středu substrátu. Tyto vzorky byly následně použity k dalším analýzám.

### **4.2.3. Měření přírůstku mycelia**

Pro zhodnocení růstu kultur byl měřen přírůstek mycelia. Přírůstek byl zaznamenán na 4 osy po obvodu kbelíku, a to po 7 a 14 dnech od inokulace. Z těchto hodnot byl vypočítán průměrný přírůstek mycelia za den.

#### **4.2.4. Měření pH**

Na počátku a v průběhu kultivace (před inokulací, úplná kolonizace substrátu, nasazení primordií a sklizeň první vlny plodnic) byla měřena hodnota pH v substrátu za pomoci pH metru Jenway 3505 (Cole-Parmer, Velká Británie). Hodnota pH byla stanovena ve směsi čerstvého vzorku s deionizovanou vodou v poměru 1:5 (w/v) dle normy ČSN EN 15933.

#### **4.2.5. Měření vlhkosti substrátu**

Vlhkost substrátu byla měřena pomocí analyzátoru vlhkosti KERN DAB 200-2 (KERN & SOHN GmbH, Německo) při 105 °C. Vlhkost substrátu byla zjišťována ve fázích před inokulací substrátu, po jeho úplné kolonizaci myceliem, při nasazení primordií a při sklizni první vlny plodnic.

#### **4.2.6. Měření enzymatické aktivity**

Pro analýzu enzymatické aktivity bylo použito 0,2 g lyofilizovaného vzorku substrátu. K vzorku substrátu bylo přidáno 20 ml octanového pufru (pH 5,0; koncentrace  $c = 50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a směs byla homogenizována pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Německo) při 8000 otáčkách/min po dobu 30 vteřin. Pro měření aktivity lakázy a mangan peroxidázy byl vzorek následně zfiltrován a odsolen pomocí PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare, Germany) dle Košnář et al. (2019). Měření probíhalo v mikrotitračních destičkách a každý vzorek byl měřen ve 4 opakováních.

Aktivita ligninolytických enzymů (mangan peroxidáza, lakáza) byla měřena spektrofotometricky. Pro měření aktivity mangan peroxidázy byly použity roztoky DMAB (3,3-dimethylamino-benzooová kyselina;  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon hydrochlorid;  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4$  ( $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina;  $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), peroxid vodíku ( $0,08 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a sukcinátovo - laktátový pufr ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 4,5) podle Baldrian (2009). Pro stanovení enzymatické aktivity lakázy byly použity roztoky  $150 \mu\text{L}$  citrátovo – fosfátového pufru (2,1 g monohdrátu kyseliny citronové a 3,56 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a  $50 \mu\text{L}$  0,08 % ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina).  $50 \mu\text{L}$  vzorku se substrátem bylo pipetováno do mikrotitračních destiček a okamžitě umístěno do modulárního readeru Tecan Infinite® M200 (Tecan, Rakousko). Následně byla měřena absorbance při 420 nm po dobu 14 minut (měření 7 x 2 minuty) dle Baldrian (2009) a Štursová & Baldrian (2011).

Aktivita hydrolytických enzymů ( $\beta$ -glukosidáza a celobiohydroláza) byla měřena dle Košnář et al. (2019), a to pomocí substrátů 4-methylumbellyferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid (MUFG,  $c = 2.75\text{mmol.L}^{-1}$ , rozpouštědlo DMSO - dimethylsulfoxid) pro  $\beta$ -glukosidázu a 4-methylumbellyferyl-N-cellobiopyranosid (MUFC,  $c = 2.50\text{mmol.L}^{-1}$ , rozpouštědlo DMSO) pro celobiohydrolázu. Aktivita byla měřena pomocí změny fluorescence po 5 minutách a po 125 minutách při excitační vlnové délce 355 nm a emisní vlnové délce 460 nm pomocí modulárního readeru Tecan Infinite® M200 (Rakousko). Mikrotitrační destičky byly umístěny v inkubátoru při 40 °C.

#### **4.3. Enzymatická aktivita *Pleurotus ostreatus* v půdě kontaminované PAH**

Půda odebraná při dlouhodobém pokusu v lokalitě Humpolec, byla kontaminována směsí 16 individuálních PAH ze skupin s nízkou molekulovou hmotností (LMW), střední molekulovou hmotností (MMW) a vysokou molekulovou hmotností (HMW) (Tabulka 2).

**Tabulka 2:** Rozdělení použitých PAH do skupin podle molekulové hmotnosti

<b>skupina</b>	<b>PAH</b>
LMW	acenaften acenaftylen antracen fenantren fluoren naftalen
MMW	chrysen benz(a)antracen
HMW	benzo(b)fluoranten benzo(k)fluoranten benzo(g,h,i)perylene benzo(a)pyren dibenz(a,h)antracen fluoranten indeno(1,2,3-c,d)pyren pyren

Pro kultivaci *P. ostreatus* byla použita dřevní štěpka o velikostech 10 – 30 mm (varianta S1), 30 – 50 mm (varianta S2) a směs variant S1 a S2 v poměru 1:1 (W/W) (varianta S3). Pro pokus byl použit kmen *P. ostreatus* HK 35 ze sbírky Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i a osivo kukuřice (*Zea mays* L. var. Colisee). Dřevní štěpka

byla namočena, po dosažení vlhkosti 60 % naplněna do nádob a vysterilizována v autoklávu Sanyo MLS-3781L (Sanyo, Japonsko) při 121 °C po dobu 2 hodin. Po proběhnutí sterilizace byl substrát inokulován zrnitou sadbou *P. ostreatus* a ponechán ke kolonizaci po dobu 4 týdnů při teplotě 24 °C. Ke kontaminované půdě bylo přidáno 5 % (WW) substrátu s myceliem. Směs půdy s houbovým substrátem byla naplněna do polypropylenových kontejnerů o objemu 6 L. Každý kontejner obsahoval 5 kg suché experimentální půdy. Experiment trval 120 dnů a byl proveden v 7 variantách po 4 opakováních:

- 1) NA: kontrolní varianta bez přidaného houbového substrátu a kukuřice
- 2) M + S1: kontaminovaná půda + houbový substrát 10 – 30 mm
- 3) M + S2: kontaminovaná půda + houbový substrát 30 – 50 mm
- 4) M + S3: kontaminovaná půda + houbový substrát směs 10 – 50 mm
- 5) PAM + S1: kontaminovaná půda + kukuřice + houbový substrát 10 – 30 mm
- 6) PAM + S2: kontaminovaná půda + kukuřice + houbový substrát 30 – 50 mm
- 7) PAM + S3: kontaminovaná půda + kukuřice + houbový substrát 10 – 50 mm

U variant s kukuřicí bylo vyseto 8 semen do každého kontejneru a po 15 dnech od vyklíčení byl počet zredukován na 3 rostliny stejné velikosti. Vlhkost substrátu byla udržována při 60 – 70 % vlhkosti. Na konci experimentu byly odebrány 3 vzorky z každého kontejneru, které byly smíchány a použity jako finální vzorek. Tyto vzorky byly použity pro analýzu enzymatické aktivity (viz. Kapitola 4.2.6 Měření enzymatické aktivity)

#### **4.3.1. Analýzy množství biomasy hub**

Biomasa hub v půdě byla kvantifikována pomocí nealkalické extrakce volného ergosterolu z živých houbových buněk dle Djajakirana et al. (1996). 1 g půdy byl přidán k 25 ml etanolu a třepán ve tmě po dobu 30 minut při 250 rpm na orbitální třepačce. Suspenze byla zfiltrována a odpařena ve vakuové rotační odparce při 40 °C. Suchý extrakt byl rozpuštěn v 1 ml etanolu. Kvantitativní stanovení ergosterolu bylo provedeno pomocí HPLC analýzy (1260 Infinity HPLC, Agilent Technologies, USA).

#### **4.3.2. Analýza PAH**

Extrakce PAH ve vzorcích půdy byla provedena dle US EPA s extrakcí v ultrazvukové lázni s průběžným trojím reextrakčním cyklem. Pro stanovení PAH bylo použito 5 g

vzorku. Ultrazvuková extrakce vzorku byla provedena v 30 ml směsi hexan:aceton (1:1 V/V) v ultrazvukové lázni (Bandelin Sonorox Digitec DT510/H, Německo) a sonikována po dobu 30 minut při teplotě 35 °C. Reakční směs byla poté přefiltrována přes filtrační papír a propláchnuta 5 ml hexanu. Vzorek byl dvakrát reextrahován 30 ml hexan-acetonu (1:1, V/V) stejným postupem. Extrakty byly společně shromážděny a odpařeny na rotační odparce (Büchi rotavapor R-300, Švýcarsko) při 40 °C téměř do sucha (> 1 ml), rozpuštěny v 5 ml hexanu a zahuštěny na 1-2 ml pro další čištění. Křemelina SPE kolon byla kondicionována pomocí 10 ml 15% (V/V) dichlormethanu-hexanu, promyta 10 ml hexanu a následovala eluce 10 ml 15% (V/V) dichlormethanu-hexanu. Eluát byl rekoncentrován na 1 ml a po přidání roztoku IS v koncentraci 500 µg/l byl analyzován na přítomnost PAH.

Analýza jednotlivých PAH byla provedena pomocí plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC/MS) Agilent HP 6890 N (Agilent Technologies, USA) připojeném k inertnímu hmotnostně selektivnímu detektoru Agilent HP 5975 (Agilent Technologies, USA) vybaveném autosamplerem Agilent 7683B a kapilární kolonou DBEUPAH (20 m × 0,18 mm vnitřní průměr, tloušťka vrstvy 0,14 µm) (Agilent J&W Scientific, USA). Jako nosný plyn bylo použito helium (HiQ, 6.0, Linde, Česká republika) s konstantní průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Vzorky byly vstříkovány v režimu pulzního stavu (1 µl, průtok proplachu 70 ml/min při 0,75 min). Hmotnostní spektrometr pracoval s využitím elektronové ionizace (70 eV). PAH v půdních extraktech byly identifikovány na základě retenčních časů standardů PAH a kvantifikovány pomocí faktorů odezvy vztahených k příslušným vnitřním standardům na základě externí pětibodové kalibrační křivky (10-1000 µg/l) pro každou jednotlivou sloučeninu PAH. Kalibrační křivky vykazovaly přijatelnou linearitu ( $R > 0,9985$ ) pro každý z PAH. Limity kvantifikace byly vypočteny v rozmezí 1,8 (ACE) a 5,6 (BghiP) µg/kg dw. Výtěžnost SS 2-FBP a p-TER-d14 se v analyzovaných vzorcích pohybovala v rozmezí 89,7-98,0 % a 90,5-117,8 %.



#### **4.4. Statistické analýzy**

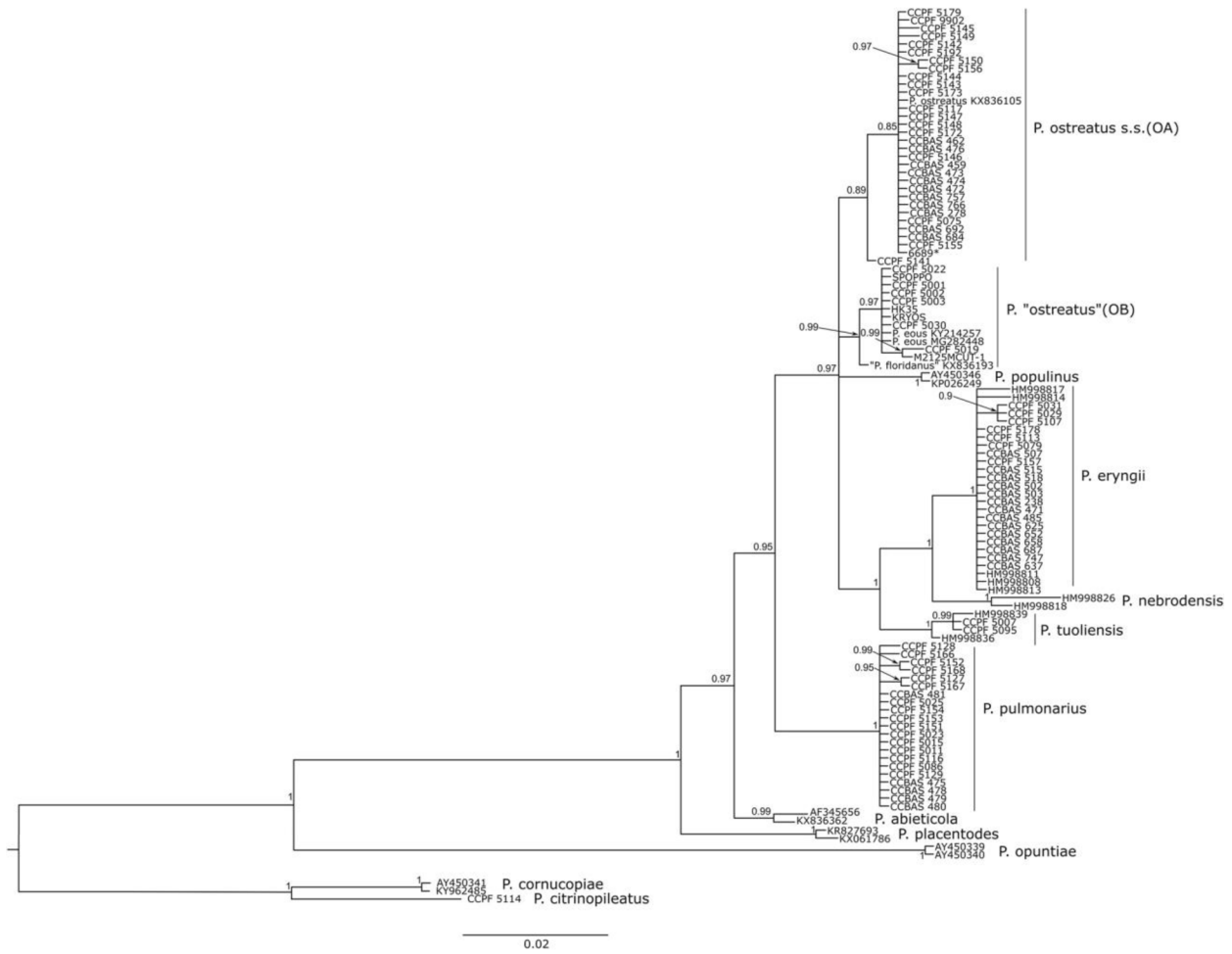
U naměřených hodnot byly provedeny analýzy normality (Kolmogorův - Smirnovův, Lillieforsův, Shapiro - Wilkův W test) a homogenity (Cochranův, Hartleyův, Bartlettův test). Pro vyhodnocení výsledků kardinálních teplot byla použita diskriminační analýza ( $p < 0.0000$ ), Mahalanobisovy vzdálenosti. Na základě výsledků normality a homogenity byla zvolena analýza rozptylu jednofaktorová ANOVA následovaná Tukeyho HSD testem ( $p \leq 0,05$ ) nebo neparametrický Kruskal – Wallisův testem ( $p \leq 0.05$ ). Tyto analýzy byly provedeny pomocí softwaru Statistica 12 CZ (StatSoft, Tulsa, USA).

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Fylogenetická analýza a vliv teploty na růst jednotlivých skupin rodu *Pleurotus* spp.

V rámci fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že jak ITS tak kombinovaný soubor dat vedly k téměř identickým výsledkům. Všechny v současnosti uznávané druhy byly dobře ohraničeny. Izoláty *P. ostreatus* rozděleny do dvou skupin (OA a OB). Do skupiny OA byly zařazeny izoláty divokých kmenů (včetně ex-typu izolátu 6689). Skupina OB zastupuje kultivované izoláty.

Nejvyšší genová diverzita H byla zaznamenána ve skupině OA, zatímco nejnižší genová diverzita H byla u skupiny *P. eryngii* (E). Nejvyšší hodnota průměrného počtu párových rozdílů byla ve skupině OB. Podobně nukleotidová diverzita byla vyšší u skupiny OB, než v ostatních skupinách. Kromě haplotypů OA a OB u *P. ostreatus* byly zjištěny také přechodné, hybridní haplotypy. Při rozlišování polohy nukleotidů nesly tyto hybridní sekvence oba nukleotidy charakteristické pro haplotypy OA a OB. V porovnání s tím byly sekvence *P. pulmonarius* (P) a E velmi uniformní. Ve srovnání s ITS a TEF1 obsahovaly sekvence RPB2 všechny charakteristické nukleotidové pozice, které odlišují OB od heterozygotů OA. Celkové hodnoty fixačních indexů  $F_{ST}$  (Tabulka 3) se pohybovaly mezi 0,8961 (TEF1) a 0,96181 (ITS), procento variability mezi všemi skupinami tak bylo 89,6 - 96,2 % ( $p < 0,000001$ ). Nejnižší hodnota  $F_{ST}$  při párovém srovnání byla mezi skupinami OA a OB ve všech třech genových oblastech.



Obrázek 4: Fylogenetický strom rodu *Pleurotus* vypočtený na základě Bayesovy analýzy ITS rDNA (Pánek et al. 2019)



**Tabulka 3:** Výsledky AMOVA pro analyzované skupiny izolátů

ITS	E	T	OA	OB	
E					
T	0,98103				
OA	0,97298	0,95482			F <sub>ST</sub> total = 0,96181; P value pro F <sub>ST</sub> < 0,05
OB	0,9227	0,78387	0,85685		
P	0,9875	0,98242	0,97352	0,94749	
<b>TEF1</b>			OA	OB	
E					
T	0,8759				
OA	0,94314	0,95569			F <sub>ST</sub> total = 0,89610; P value pro F <sub>ST</sub> < 0,05
OB	0,84213	0,72195	0,7795		
P	0,91978	0,8958	0,9236	0,8153	
<b>RPB2</b>			OA	OB	
E					
T	0,96839				
OA	0,94361	0,91089			F <sub>ST</sub> total = 0,91469; P value pro F <sub>ST</sub> < 0,05
OB	0,95367	0,88478	0,76004		
P	0,93551	0,8825	0,9006	0,8632	

Do analýzy byly zahrnuty skupiny *P. ostreatus* - OA a OB definované na základě fylogeneze odvozené z molekulárních dat, izoláty *P. pulmonarius* (P), *P. eryngii* (E) a *P. tuoliensis* (T).

Pro test kardinálních teplot byly vybrány skupiny OA, OB a P. Výsledky Kruskal – Wallisova testu ukázaly signifikantní rozdíly v růstu mezi skupinami OA, OB a P. Pouze při teplotě 25 °C nebyl zjištěn žádný rozdíl. Při nízkých teplotách (7 °C a 10 °C) rostly izoláty skupiny *P. pulmonarius* (P) pomaleji než izoláty ostatních skupin (Tabulka 4). Skupina OB vykazovala při vyšších teplotách (35 °C) rychlejší přírůstek než skupina OA.

**Tabulka 4:** Přírůstek mycelia skupin OA, OB a P

	OA	OB	P
7 °C	1,75 ± 1,28 a	1,30 ± 0,68 a	0,93 ± 0,5 b
10 °C	2,79 ± 1,76 a	2,287 ± 1,02 a	1,44 ± 0,75 b
22 °C	4,51 ± 2,55 a	8,86 ± 1,6 b	6,48 ± 4,52 c
25 °C	15,54 ± 2,47 a	15,26 ± 2,17 a	14,63 ± 3,8 a
27 °C	14,9 ± 1,27 a	14,38 ± 2,39 b	14,09 ± 3,05 a
32 °C	6,11 ± 2,74 a	7,31 ± 1,99 a	7,71 ± 2,88 b
35 °C	0,84 ± 1,05 a	2,51 ± 2,09 b	0,53 ± 0,44 a

Průměrná hodnota denního přírůstu mycelia ± směrodatná odchylka [mm] izolátů skupin *P. ostreatus* OA a OB a *P. pulmonarius* (P) při různých teplotách. Skupiny, které se statisticky významně liší od ostatních, jsou odlišeny indexovým písmenem a, b, c. Kruskal-Wallisův test,  $p \leq 0.05$ .

Diskriminační analýza (Tabulka 5) odhalila, že kardinální teploty jsou vhodné pro odlišení všech skupin, které byly zahrnuty do analýzy; celková diferenciální schopnost modelu byla Wilks'  $\lambda$  total = 0,35917,  $p < 0,0001$ . Hodnota Wilk's  $\lambda$  total je na škále 0 (žádná diskriminace) až 1 (největší diskriminace) a vyjadřuje celkovou diskriminační schopnost modelu. Nejdůležitější pro rozlišení těchto skupin jsou teploty 22 °C a 35 °C.

**Tabulka 5:** Výsledky diskriminační analýzy založené na kardinálních teplotách

teplota	Wilks' lambda: 0,35917 aprox. $F(12,460)=25,629$ $p < 0,0000$					
	Wilk's. $\lambda$	Parc. $\lambda$	F-remove - 2.23	p value	Toler.	1-toler. R <sup>2</sup>
7 °C	0,378076	0,950002	6,05239	0,002744	0,936622	0,063378
10 °C	0,379772	0,945759	6,59546	0,00164	0,743733	0,256267
22 °C	0,445643	0,805966	27,686	0,00000	0,887193	0,112807
27 °C	0,388091	0,925486	9,25901	0,000136	0,422103	0,577897
32 °C	0,377933	0,950362	6,00655	0,002866	0,393576	0,606424
35 °C	0,582375	0,616739	71,46477	0,00000	0,681944	0,318056

Mahalanobisovy vzdálenosti (Tabulka 6) na základě výsledků diskriminační analýzy vykazovaly podobné hodnoty vzdáleností mezi skupinami OA/OB a OB/P. Vzdálenost mezi skupinami OA/P byla výrazně menší než u předchozích dvou a značí, že jsou si skupiny bližší.

**Tabulka 6:** Mahalanobisovy vzdálenosti mezi skupinami izolátů vypočtené na základě kardinálních teplot

skupina	OA	OB	P
OA		5,639034	2,497967
OB	5,639034		5,253574
P	2,497967	5,253574	

Do analýzy byly zahrnuty skupiny *P. ostreatus* - OA a OB definované na základě fylogeneze odvozené z molekulárních dat a izoláty *P. pulmonarius* (P).

Výsledky fylogenetické analýzy a porovnání kardinálních teplot odhalily kontrast mezi populačními skupinami *P. ostreatus* a *P. pulmonarius*. U *P. pulmonarius* je celková genetická variabilita poměrně vysoká. Takto vysoká úroveň genové variability u tohoto druhu naznačuje existenci větší, strukturovanější populace. Tato variabilita není překvapivá, protože do studie byly zahrnuty izoláty z Evropy i Asie. Skupina *P. pulmonarius* se od ostatních druhů výrazně odlišuje relativně vysokým fixačním indexem  $F_{ST}$ . Výsledky ukazují, že tok genů mezi *P. pulmonarius* a ostatními skupinami je velmi nepravděpodobný, ačkoli hodnoty  $F_{ST}$  mezi skupinami OB a P se blíží hodnotám mezi skupinami OA a OB. Tyto výsledky potvrzuje i exaktní test diferenciace vzorků. Test evoluční divergence však ukazuje relativně vyšší podobnost mezi OA a OB, než mezi těmito dvěma skupinami a *P. pulmonarius*. Na rozdíl od *P. pulmonarius* je *P. ostreatus* jasně rozdělena do dvou skupin, a to OA a OB. Podle výsledků fylogenetické analýzy tvoří obě skupiny dobře ohraničené skupiny a lze je tak považovat za samostatné druhy. Identický výskyt dvou různých skupin *P. ostreatus* byl doložen již předchozími autory (Li et al. 2017, Li et al. 2019, Shnyreva & Shnyreva 2015; Stajic et al. 2005). Zatímco skupina OA zahrnuje převážně divoké izoláty středoevropského původu (včetně ex-typu izolátu *P. ostreatus*), skupina OB je složena z izolátů kultivovaných, někdy domněle hybridního původu, a považovaných za „*P. florida*“. Rozdíly mezi skupinami potvrzují i měření přírůstku mycelia. Byl detekován genetický tok mezi skupinami OA a OB. Hybridizace mezi dvěma druhy u basidiomycet není běžným jevem, ale existuje několik příkladů mezidruhových hybridizačních

událostí (semipermeabilní povaha hranic druhů hub), zejména pokud jsou dva blízké příbuzné druhy odděleny hlavně geografickými bariérami (Steenkamp et al. 2018). Historicky pěstovaná hlíva ústříčná pocházela z kmene evropského *P. ostreatus* s poněkud pevnými plodnicemi. K nasazení primordií však dochází při nízkých teplotách 15 – 20 °C, zatímco u křehčích plodnic „*P. florida*“ dochází k nasazení primordií při příznivějších teplotách 20 – 30 °C (Li & Eger 1979). Navíc 40 let záměrné šlechtitelské činnosti pěstitelů hub vyústilo v nové kultivované genotypy hlívy ústříčné (Eger et al. 1976; Tsukihara et al. 2006). Celkové výsledky experimentu naznačují, že většina komerčně pěstovaných kmenů, a tedy potomci záměrného šlechtění izolátů *P. ostreatus*, patří do skupiny OB. Ne všechny kultivované izoláty zahrnuté ve studii jsou jasněho geografického původu, ale izoláty identifikované jako *P. ostreatus* jsou převážně typu OB, zatímco evropské izoláty zjevně dominují ve skupině OA. Na druhou stranu, žádný izolát skupiny OB nebyl potvrzen jako divoký izolát z Evropy. Přestože izoláty OB zahrnuté v této studii byly získány z pěstíren a šlechtitelských podniků z různých zdrojů, zejména v Asii, jejich skutečný geografický původ není jasný.



## **5.2. Vliv různých vlhkostí substrátu na kulturu *Pleurotus ostreatus* a *Hericium erinaceus***

Pro úspěšnou kultivaci hub je důležitý nejen výběr vhodného druhu a kmene, ale také parametry, za jakých kultivace probíhá. Jedním z těchto parametrů je obsah vody v substrátu, který je posléze využit kulturou během jejího vývoje.

Při experimentu s kultivací *P. ostreatus* a *H. erinaceus* byl zjišťován vliv různého počátečního obsahu vody v substrátu a jeho vliv na změnu vlhkosti substrátu v průběhu kultivace, pH, růst mycelia, biologickou efektivitu substrátu a enzymatickou aktivitu v různých vrstvách substrátu. Na základě výsledků uvedených v Tabulce 7 je zřejmé, že v průběhu kultivace *P. ostreatus* došlo k postupnému snižování vlhkosti substrátu. Největší pokles byl zaznamenán u varianty 60 % (z 59,4 % na 41,4 %). Tento pokles může být způsoben nižší počáteční vlhkostí substrátu, a proto během kultivace *P. ostreatus* využila více vody ze substrátu než u jiných variant. Během kolonizace substrátu myceliem byla u většiny variant vlhkost substrátu vyšší v okrajové vrstvě, zatímco při fruktifikaci (fáze nasazení primordií až sklizeň plodnic) byla vlhkost vyšší ve středu substrátu. Nižší vlhkost v okrajové vrstvě v pozdějších fázích kultivace, lze vysvětlit využitím vody k nasazení primordií a vývoji plodnic. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vrstvami substrátu, a to u všech variant s výjimkou 70 %. Dále byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými fázemi kultivace, zejména mezi fází kolonizace a sklizní. Během kultivace došlo ke snížení obsahu vody v substrátu, a to nejvíce u varianty s nejnižší počáteční vlhkostí. U většiny variant byl ve fázi kolonizace obsah vody vyšší v okrajové vrstvě, zatímco při fruktifikaci (fáze nasazení primordií a sklizně) byl obsah vody vyšší ve středu substrátu. Nižší obsah vody v okrajové vrstvě může být zapříčiněn tvorbou primordií a jejich růstem, kdy kultura využívá vodu v substrátu a transportuje ji z něj do plodnic a atmosféry. Z výsledků uvedených v Tabulce 8 je patrné, že v průběhu kultivace *H. erinaceus* se vlhkost substrátu u všech variant také postupně snižovala. K nejvyššímu úbytku vlhkosti v substrátu došlo u varianty 60 % obsahu vody v substrátu, stejně jako v případě *P. ostreatus*. V okrajové vrstvě substrátu se vlhkost snížila z fáze kolonizace do fáze sklizně o 19,77 %, ve středu substrátu o 11,4 %. U varianty s nejvyšší vlhkostí (75 %) byl v okrajové vrstvě zaznamenán nejnižší úbytek vlhkosti v průběhu kultivace *H. erinaceus*, který byl pouze 1,22 %. Variantám s nižší vlhkostí (60 % a 65 %) klesala vlhkost více v okrajové vrstvě, zatímco u variant 70 %

a 75 % obsahu vody v substrátu došlo k většímu úbytku ve středu substrátu. Statisticky významné rozdíly v obsahu vody v substrátu byly zaznamenány mezi fázemi kolonizace substrátu a sklizní plodnic. Tento rozdíl byl zjištěn zejména u středové vrstvy substrátu (varianty 65 %, 70 % a 75 % vlhkosti substrátu). K nejnižšímu úbytku vody došlo u varianty s nejvyšší vlhkostí (75 %). Atila (2019) kultivoval *H. erinaceus* na různých lignocelulózových odpadech. Pro kultivaci byly použity substráty z dubových pilin, slámu a piliny z olše, přičemž počáteční vlhkost substrátu byla 68,5 % až 70 %. Během jeho experimentu také došlo k poklesu obsahu vody v substrátu o 8,7 - 17,3 %. Nejvyšší pokles vlhkosti substrátu byl zaznamenán u substrátu z pšeničné slámy. Tento pokles vlhkosti substrátu lze vysvětlit transferem vody do atmosféry a plodnic. Bellettini et al. (2019) zmiňují riziko výskytu chorob během kultivace při vlhkosti substrátu vyšší než 70 %. Nicméně, v našem případě nedošlo k výskytu chorob ani při vlhkosti substrátu 75 %. Hassan (2007) kultivoval *H. erinaceus* při počáteční vlhkosti 63 – 64 % a zhodnotil tuto vlhkost jako dostačující pro optimální růst kultury, což se v našem experimentu ukázalo jako nedostačující

**Tabulka 7:** Změny vlhkosti a pH substrátu v průběhu kultivace *Pleurotus ostreatus* při různých vlhkostech substrátu

		60 %		65 %		70 %		75 %	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Vlhkost substrátu</b>	kolonizace	59,4 ± 0,7 aA	62,63 ± 0,76 aB	72,01 ± 1,09 aA	68,75 ± 1,07 aB	72,75 ± 1,89 aA	72,37 ± 0,53 aA	79,32 ± 0,69 aA	76,82 ± 0,66 aB
	primordia	68,1 ± 0,87 aA	52,37 ± 1,02 bB	67,8 ± 0,65 bA	66,08 ± 0,63 bA	70,65 ± 1,21 abA	68,95 ± 0,19 bA	78,93 ± 1,06 aA	76,55 ± 0,37 aB
	[%] sklizeň	41,4 ± 0,45 bA	57,7 ± 0,37 cB	58,5 ± 0,67 cA	66,55 ± 0,61 abB	68,17 ± 1,02 bA	67,28 ± 0,22 cA	74,55 ± 0,47 bA	75,0 ± 0,8 aA
<b>pH</b>	kolonizace	4,74 ± 0,03 aA	5,09 ± 0,01 aB	4,81 ± 0,02 aA	5,22 ± 0,01 aB	5,12 ± 0,12 aA	5,27 ± 0,06 aA	5,13 ± 0,07 aA	5,43 ± 0,04 aB
	primordia	5,33 ± 0,19 bA	5,27 ± 0 abA	5,13 ± 0,01 bA	5,31 ± 0,03 bB	5,13 ± 0,06 aA	5,2 ± 0,01 aA	5,37 ± 0,06 bA	5,37 ± 0 aA
	sklizeň	5,29 ± 0,1 bA	5,35 ± 0,11 bA	5,5 ± 0,05 cA	5,63 ± 0,03 cB	5,16 ± 0,08 aA	5,26 ± 0,02 aA	5,83 ± 0,03 cA	5,63 ± 0,01 bB

Hodnoty značí průměrné hodnoty vlhkosti substrátu a pH ± směrodatná odchylka (n = 3). 60 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 60 %, 65 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 65 %, 70 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 70 %, 75 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 75 %; 1 – okrajová vrstva substrátu, 2 – střed substrátu. Malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými stádii kultivace, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými vrstvami (Kruskal-Wallisův test, p ≤ 0.05) (Wiesnerová et al. 2023).

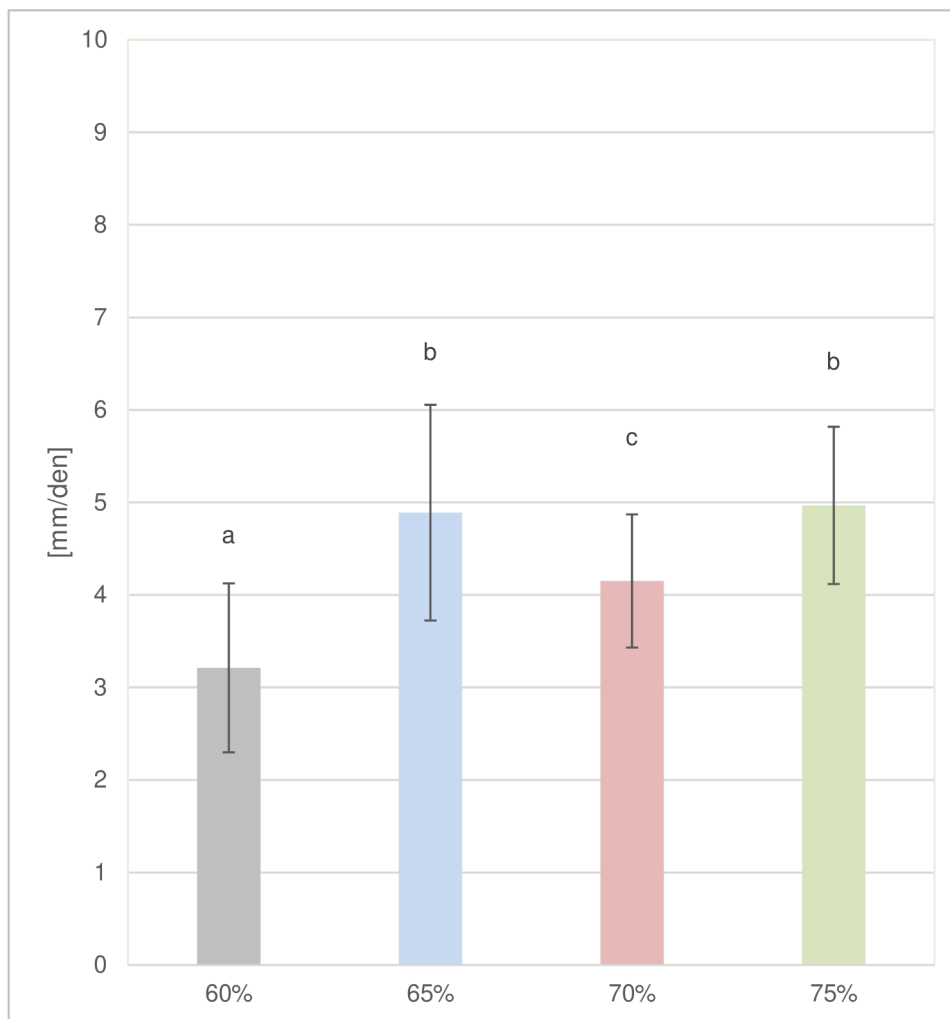
Dalším studovaným parametrem byla změna pH v průběhu kultivace (Tabulky 7 a 8). U obou kultur došlo k poklesu pH během kolonizace substrátu z hodnoty 6,0 a 6,01 (před inokulací substrátu) na 4,74 – 5,43 v případě *P. ostreatus* a 4,04 - 5,09 v případě *H. erinaceus*. V dalších fázích pH u všech variant mírně vzrostlo. Ve fázi kolonizace bylo pH vyšší ve středu substrátu než v okrajové vrstvě. Při kultivaci *P. ostreatus* bylo nejnižší pH (4,74) zjištěno u varianty 60 % vlhkosti substrátu ve fázi kolonizace a nejvyšší hodnota (5,83) byla u varianty 75 % při sklizni. Statisticky významné rozdíly byla zaznamenány mezi vrstvami, s výjimkou varianty 60 %, a také mezi jednotlivými fázemi kultivace. V průběhu kultivace *H. erinaceus* došlo ve fázi nasazení primordií u variant 65 %, 70 % a 75 % ke zvýšení pH ve středové vrstvě substrátu. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi vrstvami v jednotlivých fázích kultivace, s výjimkou variant 60 % a 65 % (fáze sklizně). Statisticky významné rozdíly v hodnotách pH v čase kultivace byly zaznamenány u variant 70 % a 75 %, a to ve středové vrstvě substrátu. Bellettini et al. (2019) zmiňují stejný pokles pH během kolonizace substrátu *P. ostreatus*, kdy se pH snížilo na hodnotu 4. Atila (2019) při kultivaci *H. erinaceus* došel k závěru, že se pH během vývoje snižuje, a to u všech testovaných substrátů (piliny, sláma, zbytky po zpracování světlice). Hodnoty pH klesly ze 4,4 – 6,5 na 4,0 – 5,1, což je shodné s hodnotami pH v předkládané práci. Öztürk & Atila (2021) kultivovali *Hypsizygus ulmarius* na substrátech z fazolové slámy, kukuřičné siláže, pšeničné slámy a pilin při počáteční vlhkosti substrátu 70 % a sledovali změnu různých parametrů substrátu. Také došli k zjištění, že pH v průběhu kultivace klesá z původních 7,46 – 6,87 na 6,18 – 4,52. Klesal také obsah celulózy, hemicelulózy a ligninu, kdy kultura využívá tyto složky jako zdroj energie. Philippoussis et al. (2003) sledovali změnu parametrů substrátu při pěstování *Lentinula edodes* a i tomto případě došlo ke snížení hodnot pH v průběhu kultivace z 6,2 – 6,91 na 4,49 – 5,06. Korelační analýza odhalila, že počáteční pH substrátů ovlivnilo průběh kolonizace. Pokles pH substrátu může být ovlivněn přítomností metabolitů nebo látkami jako například organickými kyselinami, které vznikly při procesu kultivace. Akpinar & Urek (2014) také zaznamenali pokles pH v průběhu kultivace *P. ostreatus* na substrátu z granátových a meruňkových slupek, kdy se z původních 6,0 snížilo na 4,8. Zjištění uvedených autorů i v této práci naznačují, že v průběhu kultivace pH postupně klesá, a to až na hodnoty okolo 4.

**Tabulka 8:** Změny vlhkosti a pH substrátu v průběhu kultivace *Hericium erinaceus* při různých vlhkostech substrátu

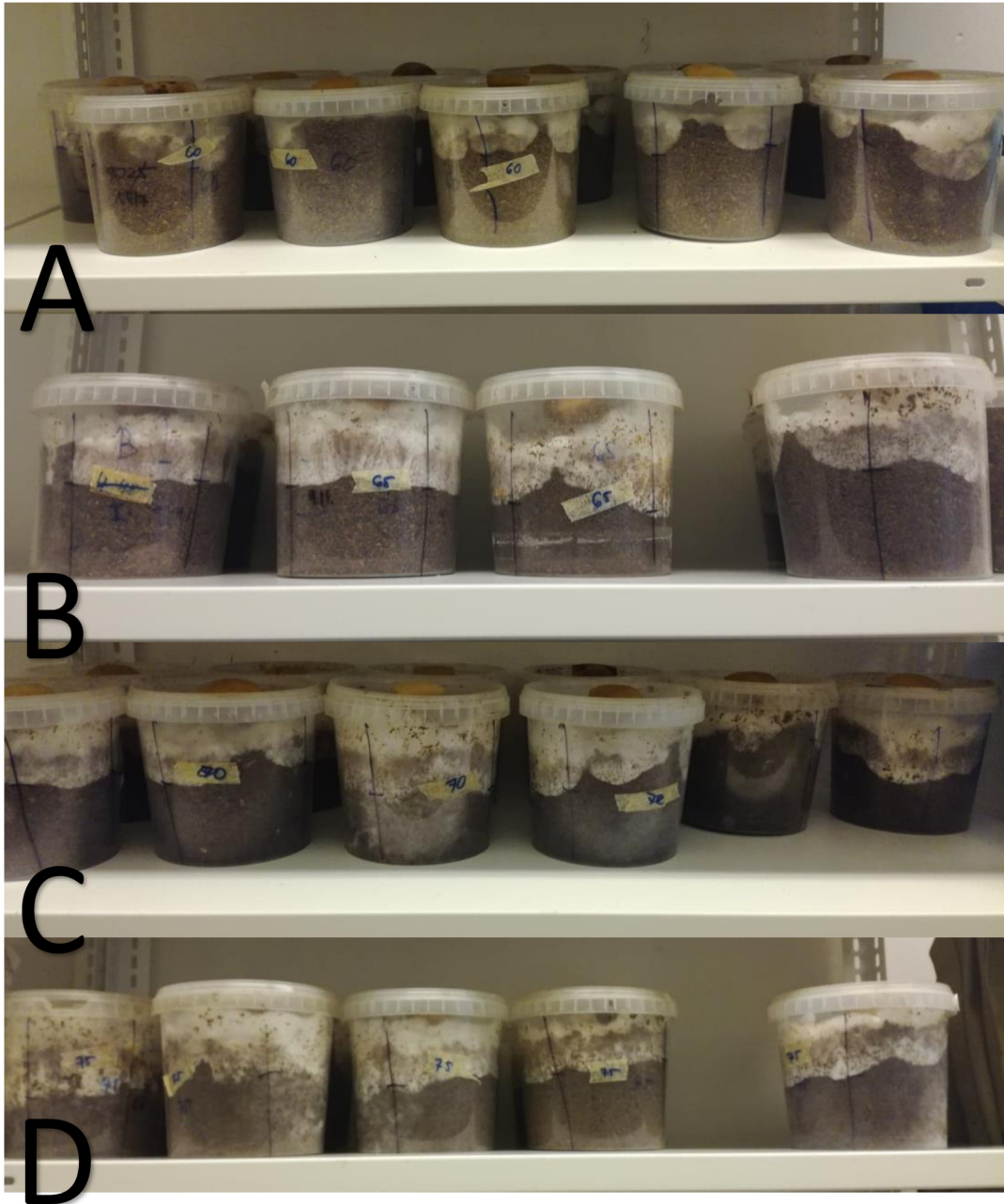
		60%		65%		70%		75%	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>Vlhkost substrátu</b>	kolonizace	60,89 ± 5,06 aA	51,15 ± 1,35 aB	67,82 ± 1,13 aA	66,06 ± 0,37 aB	66,66 ± 0,67 aA	72,17 ± 1,38 aB	76,52 ± 0,3 aA	77,02 ± 0,34 aA
	primordia	55,37 ± 1,19 abA	51,28 ± 2,26 aA	66,7 ± 2,22 aA	67,15 ± 0,29 abA	61,83 ± 0,76 abA	66,05 ± 0,29 abB	75,63 ± 0,57 aA	74,95 ± 0,29 aA
	sklizeň	41,12 ± 0,36 bA	39,75 ± 0,94 aA	61,06 ± 0,49 aA	63,62 ± 0,64 bB	58,08 ± 0,63 bA	63,5 ± 1,14 bB	75,3 ± 0,57 aA	71,65 ± 1,18 bB
<b>pH</b>	kolonizace	4,29 ± 0,14 aA	5,09 ± 0,04 aB	4,58 ± 0,02 aA	4,39 ± 0,04 aB	4,04 ± 0,01 aA	4,79 ± 0,19 abB	4,32 ± 0,04 aA	4,62 ± 0,01 abB
	primordia	4,29 ± 0,06 aA	4,71 ± 0,04 aB	4,38 ± 0,04 aA	4,89 ± 0,01 aB	4,17 ± 0,09 aA	6,35 ± 0,01 aB	4,05 ± 0 aA	4,64 ± 0,01 aB
	sklizeň	4,37 ± 0,16 aA	4,59 ± 0,15 aA	4,31 ± 0,17 aA	4,44 ± 0,09 aA	4,18 ± 0,05 aA	4,47 ± 0,05 bB	4,33 ± 0,01 aA	4,43 ± 0,03 bB

Hodnoty značí průměrné hodnoty vlhkosti a pH substrátu ± směrodatná odchylka (n = 3). 60 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 60 %, 65 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 65 %, 70 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 70 %, 75 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 75 %; 1 – okrajová vrstva substrátu, 2 – střed substrátu. Odlišná malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými stádii kultivace, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými vrstvami (Kruskal-Wallisův test,  $p \leq 0.05$ ).

Rychlost růstu mycelia *P. ostreatus* je uvedena v Grafu 1. Varianty s obsahem vody 65 % a 75 % vykazovaly nejrychlejší růst mycelia za den (4,88 a 4,96 mm/den). Mezi těmito variantami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Na druhé straně, byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi variantami 60 % a 70 %, které jsou zároveň odlišné od variant 65 % a 75 %. Varianta s nejnižším obsahem vody měla nejnižší přírůstek mycelia, což značí, že v substrátu nebyl dostatečný obsah vody pro růst mycelia a to rostlo pomaleji. Toto zjištění znamená, že vlhkost substrátu nižší než 65 % není příliš vhodná pro růst mycelia *P. ostreatus*. Zervakis et al. (2001) testovali růst *P. ostreatus* a dalších hub na různých substrátech při vlhkosti 65 – 75 %. Růst na pšeničné slámě byl vyšší než v případě našeho experimentu s kultivací *P. ostreatus* (5,26 mm/den). Nicméně u ostatních hub (*P. eryngii*, *P. pulmonarius* a *Lentinula edodes*) byl přírůstek mycelia nižší (*P. eryngii* 3,8 mm/den, *P. pulmonarius* 4,4 mm/den, *Lentinula edodes* 2,3 mm/den). Vliv vlhkosti substrátu byl sledován také ve vztahu k rychlosti růstu mycelia *H. erinaceus* (Graf 3). Nejvyššího přírůstku za den dosáhla varianta 70 % (7,84 mm/den), zatímco nejnižší přírůstky byly zaznamenány u variant 60 % a 65 % (6,37 mm/den a 5,8 mm/den). Varianta s obsahem vody v substrátu 70 % se statisticky významně lišila od variant s nižší vlhkostí (60 % a 65%). Mezi variantami 60 %, 65 % a 75 % nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Ko et al. (2005) zkoumali růst různých druhů rodu *Hericium* spp. na 6 vybraných substrátech o vlhkosti 65 %. Nejvyšší přírůstek byl zaznamenán u *H. erinaceus* kultivovaném na pilinách s přidavkem sójové moučky (4,2 mm/den), což je nižší přírůstek než v případě našeho pokusu při vlhkosti 65 %. Gonkhom et al. (2022) testovali růst mycelia *H. erinaceus* na různých lignocelulózových odpadech, kdy vlhkost substrátu byla v rozmezí 50 – 70 %. Ve všech případech byl přírůstek mycelia nižší než přírůstek *H. erinaceus* v našem pokusu. Philippoussis et al. (2001) kultivovali *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *Agrocybe aegerita* a *Volvariella volvacea* na substrátech z pšeničné slámy, bavlníkového odpadu a arašídových skořápek o vlhkosti 70 %. Nejvyššího přírůstku mycelia dosáhla kultura *P. ostreatus* a *P. pulmonarius* (6,92 – 9,58 mm/den), což je více než v případě našeho experimentu s kultivací *P. ostreatus*. Nicméně v případě našeho experimentu s kultivací *H. erinaceus* je růst mycelia v podobném rozmezí (7,84 mm/den).



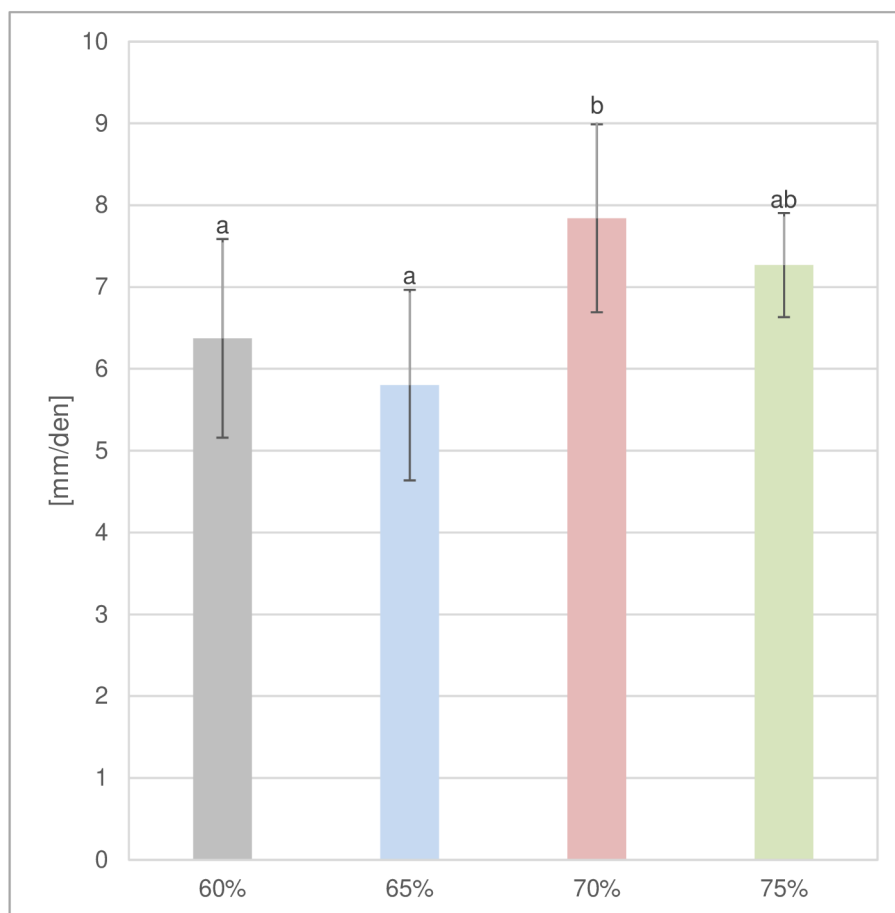
**Graf 1:** Růst mycelia *P. ostreatus* při různých počátečních vlhkostech substrátu. Sloupce představují průměr přírůstku  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n=40$ ). Odlišná indexová písmena značí signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallisův test,  $P \leq 0.05$ ) (Wiesnerová et al. 2023).



Obrázek 6: Průběh kolonizace (7 dní od inokulace) substrátu s různým obsahem vody kulturou *P. ostreatus*

A – 60 % vlhkosti, B – 65 % vlhkosti, C – 70 % vlhkosti, D – 75 % vlhkosti

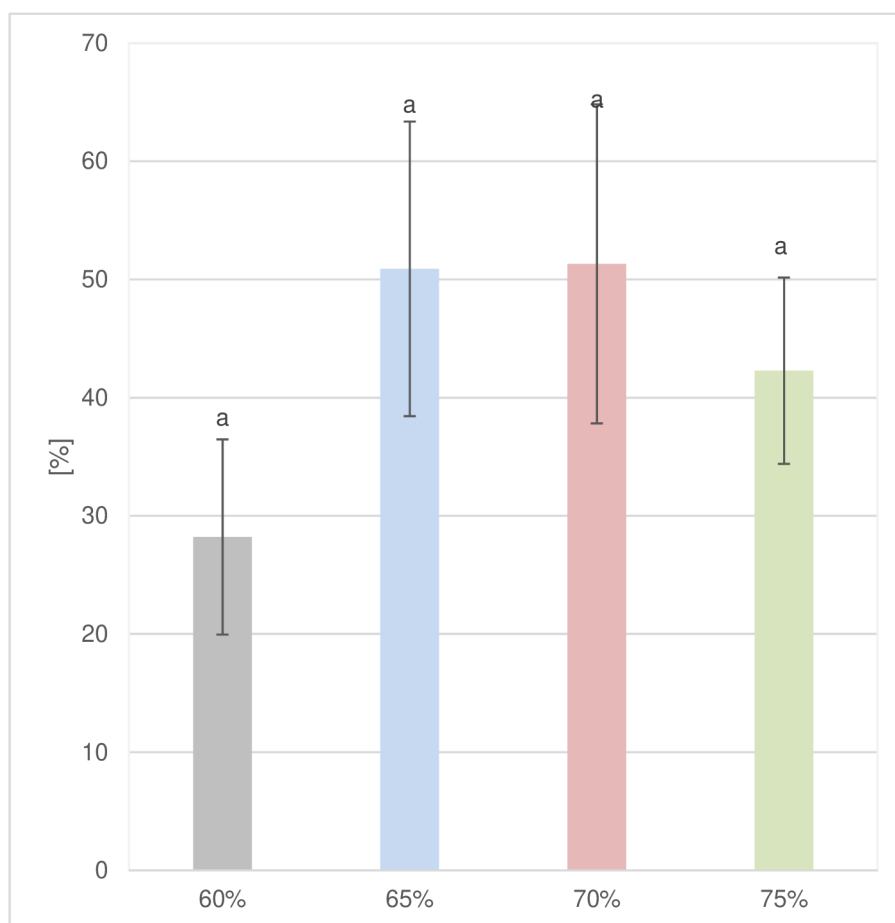




**Graf 2:** Růst mycelia *H. erinaceus* při různých počátečních vlhkostech substrátu. Sloupce představují průměr přírůstku  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n=20$ ). Odlišná indexová písmena značí signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallisův test,  $P \leq 0.05$ ).

Biologická efektivita substrátu (BE) je vyjádřena jako poměr hmotnosti čerstvých plodnic (g) a hmotnosti suchého substrátu (g), tento poměr se udává v procentech (Liang et al. 2019). V pokusu s porovnáním různých vlhkostí substrátu nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými variantami (Graf 2). Nejvyšší BE měly varianty 65 % a 70 % vody v substrátu, a to 50 % a 51 %. Nejnižší BE byla zjištěna u varianty 60 %, kde byl zároveň nejpomalejší růst mycelia. V experimentu Kalmise et al. (2008) byla kultivována hlíva ústříčná na substrátu z pšeničné slámy v kombinaci s odpadní vodou z olivového mlýna. Hodnoty BE se pohybovaly v rozmezí 14,7 – 50,7 % při vlhkosti substrátu 70 %. V porovnání s experimentem v předkládané práci jsou hodnoty BE nižší, a to u všech variant. Girmay et al. (2016) provedli experiment s kultivací na různých substrátech a BE substrátu z pšeničné slámy s obsahem vody 60 – 70 % byla 35,88 %. Wang et al. (2001) kultivovali *P. ostreatus*

při různém obsahu vody v substrátu a zkoumali vliv na BE. Jako substrát byly použity pšeničné otruby a mláto v poměru 50:50. Zjistili, že nejvyšší BE dosáhl substrát s vlhkostí 70 % a BE se zvyšovala se zvyšující se vlhkostí substrátu. Růst mycelia byl také nejvyšší při vlhkosti 70 %. Tyto hodnoty se shodují se zjištěním v předkládané práci. Hassan (2007) kultivoval *H. erinaceus* na substrátech složených z pilin, rýžové slámy, pšeničné slámy a jejich kombinacích. Vlhkost substrátů dosahovala 63 – 64 %. Nejvyšší BE vykazoval substrát složený z pilin a jako nejméně vhodný byl vyhodnocen substrát z rýžové slámy. Philippoussis et al. (2001) porovnávali BE u substrátu z pšeničné slámy, bavlníkových odpadů a arašídových slupek při kultivaci *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* a *P. eryngii*. Počáteční vlhkost substrátu byla 70 %. V případě *P. ostreatus* dosahovaly substráty z pšeničné slámy a bavlníku vyšší BE (70,61 – 116,7 %) než substrát z arašídových slupek (13,7 %). Tyto hodnoty jsou vyšší než v případě našeho experimentu, což může být způsobeno odlišnou přípravou substrátu a kultivačními podmínkami. Muswati et al. (2021) hodnotili různé kombinace substrátu na růst a výnos *P. ostreatus*. Zjistili, že nejvyšší BE dosáhl substrát z bavlníkového odpadu a směs bavlníkového odpadu, slámy a slupek z baobabu (86,2 % a 85,9%). V případě substrátu ze slámy byla dosažena BE 55 %, což se blíží BE v našem pokusu. Také zjistili, že nejvyšší vodní kapacitu má substrát z bavlníkového odpadu a nejnižší substrát ze slámy. Rozdíly v BE a vodní kapacitě substrátu mohou být v důsledku odlišného složení substrátu (poměr C:N).



**Graf 3:** Výnos plodnic vyjádřený biologickou efektivitou substrátu při různé počáteční vlhkosti substrátu. Sloupce představují průměr hodnot biologické efektivity substrátu  $\pm$  směrodatná odchylka ( $n=3$ ). Odlišná indexová písmena značí signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallisův test,  $P \leq 0.05$ ) (Wiesnerová et al. 2023).

*P. ostreatus* a *H. erinaceus* patří k houbám bílé hniloby, které produkují ligninolytické a hydrolytické enzymy. Jedním z enzymů byla 1,4- $\beta$ -D-glukosidáza. Při kultivaci *P. ostreatus* se aktivita 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy (Tabulka 9) postupně zvyšovala a nejvyšší aktivita byla zaznamenána u varianty 75 % vlhkosti ve fázi sklizně. Při kultivaci *H. erinaceus* (Tabulka 10) také došlo ke zvýšení aktivit 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy a celobiohydrolázy a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u varianty 70 % ve fázi sklizně plodnic ( $3297,9$  a  $1867,32 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Nejnižší hodnoty těchto enzymů ve fázi sklizně byly zjištěny u varianty 60 % vlhkosti substrátu. V průběhu kultivace byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi fázemi kolonizace substrátu a sklizní plodnic. Aktivita 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy a celobiohydrolázy u *P. ostreatus*

vykazovaly silnou korelaci, a také korelovaly s hodnotami pH. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny mezi fázemi kolonizace a nasazením primordií a také fází sklizně. Tento trend byl zjištěn i pro aktivitu celobiohydrolázy u varianty 75 % vody v substrátu, a to v obou vrstvách kde byly zároveň naměřeny nejvyšší hodnoty celobiohydrolázy (3349,13 a 4083,42  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Hodnoty 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy a celobiohydrolázy vykazovaly silnou korelaci (korelační koeficient = 0,97) a také korelaci s pH (0,55 a 0,49). Aktivita Mn – P se v průběhu kultivace snižovala a byla v negativní korelaci s aktivitou 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy a celobiohydrolázy (-0,24 a -0,25). Aktivita lakázy byla pod limitem detekce. Při kultivaci *H. erinaceus* došlo u varianty 60 % vlhkosti substrátu k postupnému snížení aktivity tohoto enzymu, zatímco u variant 65 % a 75 % se aktivita v průběhu kultivace zvýšila stejně jako v případě Mn - P. Nicméně v průběhu kultivace se statisticky významné rozdíly v hodnotách neprokázaly. U všech variant byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými vrstvami substrátu a aktivita lakázy byla vyšší ve středové vrstvě substrátu. Nejvyšší aktivita Mn – P byla v případě *H. erinaceus* zjištěna u varianty 60 % vlhkosti substrátu v okrajové vrstvě. Toto zjištění je v souladu s prací Souzy et al. (2006), kteří pozorovali nárůst aktivity Mn – P do 10. dne kultivace a poté došlo k jejímu postupnému snížení. Kannan et al. (1990) kultivovali *P. sajor-caju* na substrátu z papírenského odpadu a také zaznamenali zvýšení aktivity tohoto enzymu v průběhu kultivace. Stejný trend byl zjištěn při naší kultivaci *H. erinaceus* v případě aktivity celobiohydrolázy. Xie et al. (2016) zaznamenali nejvyšší aktivitu Mn – P a lakázy při kolonizaci substrátu *P. eryngii* a při tvorbě primordií, poté aktivita klesala. Vyšší aktivitu těchto enzymů lze přisoudit rozkladu substrátu a zpřístupnění živin pro další vývoj kultury. V experimentu Velázquez-Cedeño et al. (2002) došlo také ke zvýšení aktivity celobiohydrolázy během kultivace a nejvyšších hodnot dosahovala ve fázi fruktifikace. Kurt & Buyukalaca (2010) kultivovali *P. ostreatus* na různých zemědělských odpadech. Došli k zjištění, že nejvyšší aktivita lakázy byla 10. den kultivace a poté se snižovala. Baldrian et al. (2005) provedli experiment s kultivací *P. ostreatus* za přítomnosti mědi, manganu, olova a zinku v substrátu. V případě aktivity Mn – peroxidázy byla nejvyšší aktivita na začátku pokusu a poté se snižovala, stejně tak aktivita lakázy. Nejvyšší aktivita 1,4- $\beta$ -D-glukosidázy se v případě kontroly (sláma o vlhkosti 75 %) byla

zaznamenána po 42 dnech pokusu. Pokud byl k substrátu přidán jeden z testovaných prvků byla aktivita nejvyšší již po 14 dnech a poté se snižovala.



Obrázek 7: *P. ostreatus* ve fázi sklizně

**Tabulka 9:** Změny enzymatické aktivity v průběhu kultivace *Pleurotus ostreatus* při různých vlhkostech substrátu

		60%		65%		70%		75%	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>β-D-G</b> [μmol·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	474,88 ± 153,2 aA	221,65 ± 27,75 aA	275,17 ± 99,17 aA	560,2 ± 176,26 aA	717,26 ± 45,31 aA	508,59 ± 47,71 aB	184,77 ± 14,27 aA	260,08 ± 23,03 aB
	primordia	252,16 ± 78,34 aA	219,69 ± 6,63 aA	1046,78 ± 10,52 bA	417,16 ± 18,37 aB	332,68 ± 34,07 bA	125,93 ± 25,27 bB	382,05 ± 35,24 aA	278,41 ± 91,8 aA
	sklizeň	236,59 ± 30,11 aA	570,39 ± 27,34 bB	843,88 ± 5,23 cA	691,2 ± 31,11 aB	678,78 ± 12,87 aA	290,46 ± 15,24 cB	3349,13 ± 549,5 bA	4083,42 ± 608,2 bA
<b>Cel.</b> [μmol·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	96,03 ± 9,69 aA	24,06 ± 4,03 aB	34,68 ± 6,18 aA	40,53 ± 12,42 aA	108,3 ± 28,03 aA	61,81 ± 4,08 aA	17,93 ± 11,54 aA	13,61 ± 5,07 aA
	primordia	34,56 ± 19,44 bA	33,3 ± 15,28 aA	110,17 ± 27,99 bA	18,37 ± 8,37 aB	24,7 ± 2,61 bA	5,74 ± 0,3 bA	31,59 ± 7,79 aA	20,13 ± 5,9 aA
	sklizeň	30,74 ± 5,77 bA	59,15 ± 31,45 aA	85,59 ± 26,23 abA	71,47 ± 8,49 bA	110,23 ± 31,02 aA	25,57 ± 1,11 cB	931,88 ± 343,3 bA	1306,13 ± 387,54 bA
<b>Mn - P</b> [mU·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	1,38 ± 0,01 aA	2,39 ± 0,91 aA	1,18 ± 0,54 aA	1,2 ± 0,64 aA	1,27 ± 0,09 aA	1,13 ± 0,42 aA	1,49 ± 0,09 aA	1,79 ± 0,13 aA
	primordia	0,96 ± 0,37 aA	1,1 ± 0,03 aA	1,1 ± 0,3 aA	0,96 ± 0,12 aA	0,12 ± 0,13 aA	1,07 ± 0,24 aB	1,4 ± 0,17 aA	1,31 ± 0,04 bB
	sklizeň	0,09 ± 0,02 bA	1,55 ± 0,03 aB	0,92 ± 0,24 aA	0,62 ± 0,24 aA	0,92 ± 0,34 aA	0,55 ± 0,14 aA	0,76 ± 0,2 bA	0,53 ± 0,34 bA

Hodnoty značí průměrné hodnoty enzymatické aktivity ± směrodatná odchylka (n = 3). β-D-G – 1,4-β-D-glukosidáza, Cel. – celobiohydroláza, Mn – P – mangan peroxidáza; 60 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 60 %, 65 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 65 %, 70 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 70 %, 75 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 75 %; 1 – okrajová vrstva substrátu, 2 – střed substrátu. Odlišná malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými stádii kultivace, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými vrstvami (Kruskal-Wallisův test, p ≤ 0.05) (Wiesnerová et al. 2023).

Ni et al. (2020) stanovovali produkci enzymů *Pleurotus eryngii* kultivované na zemědělských odpadech. Došli k zjištění, že aktivita  $\beta$ -glukosidázy se postupem času zvyšovala a nejvyšších hodnot dosahovala ve fázi sklizně. Aktivita Mn - peroxidázy vykazovala nejvyšší aktivitu při kolonizaci substrátu a poté prudce klesala. Aktivita lakázy vykazovala podobný trend jako Mn – peroxidáza. Což může vysvětlovat aktivitu pod mezí detekce v případě našeho pokusu s kultivací *P. ostreatus*, kdy byla aktivita měřena až po úplné kolonizaci substrátu. Trend aktivity lakázy a Mn – peroxidázy byl spojen s degradací ligninu spojenou s kolonizací substrátu. Dále autoři uvádějí, že na základě relativně nízkého množství polysacharidů během fáze kolonizace, lze usoudit, že snížení množství sacharidů v nekolonizovaném substrátu je dostatečné pro růst *P. eryngii* a zvýšení produkce enzymů v pozdějším vývoji kultury slouží k doplnění spotřebovaných cukrů k vytvoření plodnic.

**Tabulka 10:** Změny enzymatické aktivity v průběhu kultivace *Hericium erinaceus* při různých vlhkostech substrátu

		60%		65%		70%		75%	
		1	2	1	2	1	2	1	2
<b>β-D-G</b> [μmol·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	212,7 ± 23,7 aA	217,8 ± 49,02 aB	98,16 ± 27,78 aA	50,46 ± 0,78 aB	96,96 ± 13,26 aA	110,76 ± 3,72 aA	64,38 ± 1,08 aA	102,9 ± 32,4 aA
	primordia	212,8 ± 30,6 aA	322,02 ± 31,74 aB	248,04 ± 28,86 abA	112,5 ± 18,96 abB	265,44 ± 49,32 abA	221,58 ± 20,88 abA	87,6 ± 1,08 abA	154,5 ± 16,98 abB
	sklizeň	318,18 ± 56,64 aA	432,42 ± 5,4 aB	365,1 ± 40,74 bA	1114,2 ± 19,74 bB	3159,9 ± 240,9 bA	3297,9 ± 169,8 bA	2737,68 ± 497,88 bA	518,64 ± 114,12 bB
<b>Cel.</b> [μmol·h <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	48,6 ± 4,44 aA	125,94 ± 6,12 aB	16,98 ± 5,88 aA	6,24 ± 1,38 aB	15,18 ± 2,82 aA	8,64 ± 1,62 aB	23,94 ± 8,46 aA	57,6 ± 33,96 aA
	primordia	87,36 ± 16,5 bA	135,66 ± 9,18 aB	31,26 ± 12,06 aA	39,3 ± 17,46 aA	57,06 ± 15,42 aA	53,52 ± 2,58 aA	21,12 ± 0,12 aA	104,34 ± 25,8 abB
	sklizeň	298,62 ± 0,3 cA	476,16 ± 47,1 bB	1039,92 ± 308,4 bA	502,14 ± 76,26 bB	1482,24 ± 55,86 bA	1867,32 ± 130,38 bB	1410,3 ± 126,78 bA	181,68 ± 49,62 bB
<b>Mn - P</b> [mU·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	3,64 ± 0,07 aA	1,1 ± 0,06 aB	3,23 ± 0,08 aA	2,52 ± 0,51 aA	2,68 ± 0,19 aA	1,24 ± 0,07 aA	2,37 ± 0,19 aA	1,88 ± 0,48 aB
	primordia	3,21 ± 0,2 abA	0,06 ± 0,04 bB	2,61 ± 0,05 abA	2,04 ± 0,58 aA	2,28 ± 0,85 aA	1,83 ± 1 aB	2,09 ± 0,21 abA	0,83 ± 0,3 aA
	sklizeň	0,57 ± 0,15 bA	0,52 ± 0,12 abA	1,45 ± 0,02 bA	6,73 ± 0,69 aB	0,58 ± 0,45 aA	0,67 ± 0,23 aA	0,63 ± 0,16 bA	2,76 ± 1,15 aB
<b>Lakáza</b> [mU·g <sup>-1</sup> ]	kolonizace	0,09 ± 0,12 aA	3,19 ± 1,27 aB	0,03 ± 0,04 aA	4,02 ± 1,3 aB	0,00 ± 0,00 aA	0,51 ± 0,38 aB	0,00 ± 0,00 aA	2,19 ± 1,43 aB
	primordia	0,18 ± 0,25 aA	2,12 ± 1,36 aB	0,02 ± 0,03 aA	2,57 ± 1,61 aB	0,00 ± 0,00 aA	1,99 ± 1,31 aB	0,00 ± 0,00 aA	1,94 ± 1,09 aB
	sklizeň	0,00 ± 0,00 aA	0,09 ± 0,06 aB	0,55 ± 0,77 aA	5,15 ± 3,49 aA	0,00 ± 0,00 aA	0,75 ± 0,11 aB	0,43 ± 0,61 aA	0,05 ± 0,07 aA

Hodnoty značí průměrné hodnoty enzymatické aktivity ± směrodatná odchylka (n = 3). β-D-G – 1,4-β-D-glukosidáza, Cel. – celobiohydroláza, Mn – P – mangan peroxidáza; 60 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 60 %, 65 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 65 %, 70 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 70 %, 75 % - varianta s počáteční vlhkostí substrátu 75 %; 1 – okrajová vrstva substrátu, 2 – střed substrátu. Odlišná malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými stádii kultivace, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými vrstvami (Kruskal-Wallisův test, p ≤ 0.05).



### **5.3. Enzymatická aktivita *Pleurotus ostreatus* v půdě kontaminované PAH**

Jedním z využití substrátů hub je možnost mykoremediací. K půdě kontaminované PAH byl přidán substrát kolonizovaný myceliem *P. ostreatus* a následně byla sledována enzymatická aktivita a obsah PAH v půdě. Z výsledků uvedených v Tabulce 11 je patrné, že statisticky významný nárůst aktivity lakázy byl u varianty M + S2 oproti ostatním variantám a kontrole. Dále došlo k signifikantnímu nárůstu aktivity Mn – P v průběhu experimentu u variant PAM + S1, PAM + S2 a PAM + S3 a také byly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami. Při použití substrátu S2 (M + S2, PAM + S2) bylo pozorováno významně vyšší odstranění LMW, MMW a HMW než u ostatních variant (Tabulka 13). Odstranění jednotlivých PAH se však mezi těmito variantami po 120 dnech od ošetření nelišilo, což nebylo očekáváno, protože při ošetření PAM + S2 došlo k významnému zvýšení jak houbové biomasy, tak aktivity enzymů. V případě 1-4- $\beta$ -D-glukosidázy došlo k statisticky významnému nárůstu aktivity testovaných variant oproti kontrole. Také byly zjištěny signifikantní rozdíly u variant M + S2, M + S3, PAM + S2 a PAM + S3 mezi dny 0 a 120. V případě kontroly nedošlo u žádného enzymu ke změně aktivity v průběhu experimentu. V experimentu Šnajdra & Baldriana (2006) také došlo k nárůstu aktivity lakázy, Mn – P a 1-4- $\beta$ -D-glukosidázy v půdě pokud byla přidána sláma kolonizovaná *P. ostreatus*.

**Tabulka 11:** Enzymatická aktivita v půdě kontaminované PAH s přidáním substrátu *P. ostreatus*

enzym [U · g <sup>-1</sup> půdy]	Lak		Mn - P		β-D-G		
	dny	0	120	0	120	0	120
NA		0,3 ± 0,2 aA	0,2 ± 0,1 bA	0,4 ± 0,2 aA	0,4 ± 0,1 cA	1,2 ± 0,5 aA	1,1 ± 0,2 bA
M + S1		0,4 ± 0,4 aA	0,2 ± 0,1 bA	0,3 ± 0,1 aA	0,5 ± 0,1 bcA	1,2 ± 0,3 aA	1,4 ± 0,9 aA
M + S2		0,2 ± 0,1 aB	0,8 ± 0,3 abA	0,3 ± 0,1 aA	0,9 ± 0,4 bA	0,8 ± 0,6 aB	1,9 ± 0,1 aA
M + S3		0,2 ± 0,1 aA	0,2 ± 0,1 bA	0,4 ± 0,1 aA	0,5 ± 0,0 bcA	1,0 ± 0,3 aB	2,2 ± 0,7 aA
PAM + S1		0,4 ± 0,3 aA	0,2 ± 0,1 bA	0,4 ± 0,1 aB	0,5 ± 0,0 bcA	1,1 ± 0,3 aA	1,8 ± 0,7 aA
PAM + S2		0,4 ± 0,3 aA	0,3 ± 0,0 bA	0,3 ± 0,1 aB	1,5 ± 0,4 aA	1,1 ± 0,1 aA	2,2 ± 0,9 aB
PAM + S3		0,2 ± 0,1 aA	0,2 ± 0,2 bA	0,4 ± 0,0 aB	0,5 ± 0,0 bcA	1,0 ± 0,3 aA	2,6 ± 1,1 aB

Hodnoty značí průměrné hodnoty enzymatické aktivity ± směrodatná odchylka (n = 4). Lak – lakáza, Mn – P – mangan peroxidáza, β-D-G – 1-4-β-D-glukosidáza. Odlišná malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi dny 0 a 120 (Tukeyho test, p ≤ 0.05).

Statisticky významné rozdíly mezi dny 0 a 120 byly také nalezeny v případě stanovení množství biomasy hub v půdě (Tabulka 12). Biomasa *P. ostreatus* u ošetření M a PAM se pohybovala mezi 2,1 a 2,3 g/suché půdy v kbelíku, aniž by mezi nimi byly významné rozdíly (p < 0,05). K nejvyššímu nárůstu biomasy došlo u variant PAM + S1 a PAM + S2. Nejnižší nárůst biomasy hub byl zjištěn u kontrolní varianty a tato varianta se statisticky významně lišila od ostatních variant. Li et al. (2012) také zaznamenali nárůst houbové biomasy, pokud byl k půdě přidán substrát s *P. ostreatus*.

**Tabulka 12:** Množství biomasy *P. ostreatus* v půdě

dny	biomasa [μg ergosterol/ g sušiny]	
	0	120
NA	0,2 ± 0,1 aA	7,8 ± 3,3 cB
M + S1	0,1 ± 0,0 aA	48,0 ± 3,3 abB
M + S2	0,2 ± 0,1 aA	45,1 ± 8,2 bB
M + S3	0,2 ± 0,1 aA	41,9 ± 3,9 bB
PAM + S1	0,1 ± 0,0 aA	66,5 ± 7,4 aB
PAM + S2	0,2 ± 0,0 aA	65,8 ± 15 aB
PAM + S3	0,1 ± 0,0 aA	54,4 ± 12 abB

Hodnoty značí průměrné hodnoty houbové biomasy ± směrodatná odchylka (n = 4). Odlišná malá indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami, velká indexová písmena značí signifikantní rozdíly mezi dny 0 a 120 (Tukeyho test, p ≤ 0.05).

Použití houbových substrátů při mykoremediaci a mykoremediaci v kombinaci s rostlinami významně odstranilo fenantren, antracen a fluoanten, a to v rozmezí 18,0 – 42,0 μg/kg suché půdy ve srovnání neošetřené varianty. Nejvhodnějším houbovým substrátem pro odstranění jednotlivých PAH v úpravách M a PAM byl substrát S2 (30-50 mm dřevní štěpky s *P. ostreatus*). Při použití tohoto houbového substrátu došlo k významnému (p < 0,05) snížení chryseny, benzo(k)fluorantenu, benzo(a)pyrenu a dibenz(a,h)antracenu ze skupiny PAH s vysokou molekulovou z 10,8 na 42,2 μg/kg dw ve srovnání s příslušnými ošetřeními s použitím houbových substrátů S1 a S3. Houbové substráty aplikované do půdy mohly stimulovat odstraňování PAH v důsledku bohaté kolonizace *P. ostreatus* v půdě, což se projevilo nejvyšším nárůstem houbové biomasy. V případě ošetření M a PAM se tedy celkový obsah PAH v půdě snížil 4-7krát více než v případě ošetření NA. Na konci pokusu byl zbytkový obsah PAH v případě použití houbového substrátu S2 (Tabulka 13) nižší než limit pro celkové PAH (1000 μg/kg suché hmoty) podle Vyhláška č. 153/2016 Sb. pro zemědělské půdy v ČR. To by mohlo poskytnout podporu pro rozvoj bioremediace zemědělských půd kontaminovaných PAH na bázi hub.

**Tabulka 13:** Obsah PAH v půdě na začátku a konci experimentu

obsah PAH ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	dny	NA	M + S1	M + S2	M + S3	PAM + S1	PAM+ S2	PAM + S3
<b>LMW PAH</b>	0	562,2 $\pm$ 31	561,2 $\pm$ 9,4	546,0 $\pm$ 23	572,5 $\pm$ 7,3	549,2 $\pm$ 4	565,7 $\pm$ 13	567,8 $\pm$ 22
	120	527,9 $\pm$ 19	430,2 $\pm$ 12	339,4 $\pm$ 23	397,7 $\pm$ 7,1	424,2 $\pm$ 8,2	329,6 $\pm$ 27	390,8 $\pm$ 9,7
<b>MMW PAH</b>	0	376,7 $\pm$ 4	377,3 $\pm$ 13	372,7 $\pm$ 17	377,5 $\pm$ 5,4	376,4 $\pm$ 12	379,6 $\pm$ 12	366,4 $\pm$ 20
	120	354,5 $\pm$ 8,1	294,4 $\pm$ 5,8	215,0 $\pm$ 24	296,4 $\pm$ 5,4	275,7 $\pm$ 29	220,2 $\pm$ 23	269,9 $\pm$ 20
<b>HMW PAH</b>	0	566,1 $\pm$ 7,7	565,3 $\pm$ 14	572,2 $\pm$ 34	572,1 $\pm$ 36	573,3 $\pm$ 15	569,6 $\pm$ 15	564,8 $\pm$ 27
	120	549,7 $\pm$ 10	484,6 $\pm$ 18	408,0 $\pm$ 16	490,0 $\pm$ 25	492,1 $\pm$ 19	406 $\pm$ 14	488,5 $\pm$ 23
<b>celkové PAH</b>	0	1500 $\pm$ 32	1504 $\pm$ 1	1491 $\pm$ 50	1522 $\pm$ 39	1499 $\pm$ 21	1515 $\pm$ 24	1499 $\pm$ 59
	120	1432 $\pm$ 29	1209 $\pm$ 25	962,4 $\pm$ 20	1184 $\pm$ 21	1192 $\pm$ 40	955,7 $\pm$ 34	1149 $\pm$ 38

Průměrné hodnoty PAH  $\pm$  směrodatná odchylka, LMW – PAH s nízkou molekulovou hmotností, MMW – PAH se střední molekulovou hmotností, HMW – PAH s vysokou molekulovou hmotností.

## 6. Závěr

U *P. ostreatus* byly odhaleny dvě geneticky oddělené skupiny, které lze považovat za různé druhy. Zatímco skupina OA je totožná s *P. ostreatus* sensu stricto, skupina OB je variabilnější skupinou kultivovaných izolátů nejasného geografického původu. Vymezení těchto dvou skupin je potvrzeno třemi genetickými markery (ITS, TEF1 a RPB2). Byl detekován určitý omezený tok genů mezi těmito dvěma skupinami, který je srovnatelný s domnělým tokem genů mezi skupinou OB, *P. eryngii* a *P. pulmonarius*. Tento tok genů mezi OA a OB by mohl být způsoben umělým šlechtěním, ale počet takových hybridizačních událostí je omezený. Genetické rozdíly potvrzují také rozdílné rychlosti růstu obou skupin, alespoň při teplotách 22 °C a 35 °C. Centrum rozšíření *P. ostreatus* je v Eurasii, zatímco původ skupiny OB není znám. Díky těmto zjištěním, je možné rozlišit příslušnost izolátů ke geneticky a původem odlišeným skupinám a také tomu přizpůsobit kultivační podmínky.

Při pokusech s kultivací *P. ostreatus* a *H. erinaceus* bylo zjištěno, že v průběhu kultivace dochází k poklesu obsahu vody a pH. Tento pokles může být způsoben vývojem kultury, kdy dochází k transportu vody do vyvíjejících se plodnic a do atmosféry. Pokles pH je ovlivňován snížením obsahu vody a zvýšením koncentrace minerálů v substrátu a také přítomností metabolitů vzniklých v průběhu vývoje kultur. Toto zjištění se shoduje s ostatními autory. Zajištění optimální vlhkosti substrátu také ovlivňuje výnos plodnic, kdy nedostatečná vlhkost substrátu způsobuje nižší biologickou efektivitu substrátu. V případě enzymatické aktivity bylo zjištěno, že pokud má kultura dostatek vody v substrátu pro správný vývoj, je také podpořena enzymatická aktivita. Aktivita hydrolytických enzymů je vyšší u variant s vyšší vlhkostí substrátu a v průběhu kultivace stoupá. Aktivita ligninolytických enzymů se v průběhu času u většiny variant snižovala. Proto je pro další využití substrátu například k mykoremediacím vhodné použít substrát co nejaktivnější, a to v době, kdy je zcela kolonizován myceliem, ale nejsou ještě nasazena primordia.

Takto aktivní substrát *P. ostreatus* byl také využit v kombinaci s půdou kontaminovanou PAH. Jako nejvhodnější kombinace k odstranění polutantů se ukázaly varianty houbového substrátu s kulturou *Zea mays*, kdy po 120 dnech experimentu byla zjištěna nejvyšší enzymatická aktivita a také biomasa hub, což silně korelovalo s množstvím odstraněných PAH v půdě. Toto zjištění může vést k zlepšení vývoje metod bioremediací založených na kombinaci rostlin a hub.

## 7. Literatura

- Akpınar M, Urek RO. 2014. EXTRACELLULAR LIGNINOLYTIC ENZYMES PRODUCTION BY *Pleurotus eryngii* ON AGROINDUSTRIAL WASTES. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **44**:772–781.
- Alam N, JaeSeong L, TaeSoo L. 2010. Mycelial growth conditions and molecular phylogenetic relationships of *Pleurotus ostreatus*. *World Applied Sciences Journal* **9**:928–937.
- Atila F. 2019. Lignocellulosic and proximate based compositional changes in substrates during cultivation of *Herichium erinaceus* mushroom. *Scientia Horticulturae* **258**:108779.
- Atila F, Tüzel Y, Pekşen A, Cano AF, Fernández JA. 2021. The effect of different fruiting temperatures on the yield and nutritional parameters of some wild and hybrid *Herichium* isolates. *Scientia Horticulturae* **280**:109915.
- Baars JJP, Sonnenberg ASM, Mikosch TSP, Griensven LJLD van. 2000. Development of a sporeless strain of oyster mushroom *pleurotus ostreatus*. *Science and cultivation of edible-fungi. Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht, The Netherlands, 25-5-2000*:317–323.
- Baig M. 2005. Cellulolytic enzymes of *Trichoderma lignorum* produced on banana agro-waste: Optimisation of culture medium and conditions. *Journal of Scientific & Industrial Research* **64**: 57-60.
- Baldrian P. 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment* **55**:370–378.
- Baldrian P, Gabriel J. 2002. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS microbiology letters* **206**:69–74.
- Baldrian P, Valášková V, Merhautová V, Gabriel J. 2005. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology* **156**:670–676.
- Bao D, Aimi T, Kitamoto Y. 2005. Cladistic relationships among the *Pleurotus ostreatus* complex, the *Pleurotus pulmonarius* complex, and *Pleurotus eryngii* based on the mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequence analysis. *Journal of Wood Science* **51**:77–82.
- Bao D, Kinugasa S, Kitamoto Y. 2004. The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) from Asia based on mating compatibility tests. *Journal of Wood Science* **50**:162–168.

- Bellettini MB, Fiorda FA, Maieves HA, Teixeira GL, Ávila S, Hornung PS, Júnior AM, Ribani RH. 2019. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences* **26**:633–646.
- Bernardi E, Minotto E, Nascimento JS do. 2013. Evaluation of growth and production of *Pleurotus* sp. in sterilized substrates. *Arquivos do Instituto Biológico. Instituto Biológico* **80**: 318-324.
- Bhat MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **18**:355–383.
- Bresinsky A, Fischer M, Meixner B, Paulus W. 1987. Speciation in *Pleurotus*. *Mycologia* **79**:234–245.
- Camassola M, Rosa LO da, Calloni R, Gaio TA, Dillon AJP. 2013. Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. *Brazilian Journal of Microbiology* **44**:207.
- Cantore PL, Iacobellis N. 2014. Characterization of fluorescent pseudomonads responsible for the yellowing of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Phytopathologia Mediterranea* **53 (1)**: 54-65.
- Chen S, Ge W, Buswell JA. 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS microbiology letters* **230**:171–176.
- Chen S-Y, Huang S-J, Cheng M-C, Chen Y-K, Yang S-C, Mau J-L. 2015. Enhancement of Vitamin D2 Content in *Pleurotus* Mushrooms Using Pulsed Light. *Journal of Food Processing and Preservation* **39**:2027–2034.
- Chowdhary P, Shukla G, Raj G, Ferreira LFR, Bharagava RN. 2018. Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Applied Sciences* **1**:45.
- Claydon N, Allan M, Wood D. 1988. Fruit body biomass regulated production of extracellular endocellulase during periodic fruiting by *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society* **90(1)**:85-90.
- ČSN EN 15933. 2013. Kaly, upravený bioodpad a pŕdy – Stanovení pH, Praha
- D'Amato R et al. 2020. Current Knowledge on Selenium Biofortification to Improve the Nutraceutical Profile of Food: A Comprehensive Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**:4075–4097.
- Dahman Y, Syed K, Begum S, Roy P, Mohtasebi B. 2019. 14 - Biofuels: Their characteristics and analysis. Pages 277–325 in Verma D, Fortunati E, Jain S, Zhang X, editors.

- Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy. Woodhead Publishing, Sawston.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**:772–772.
- Deepalakshmi K, Mirunalini S. 2014. *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties.
- Depotter JR, Seidl MF, Wood TA, Thomma BP. 2016. Interspecific hybridization impacts host range and pathogenicity of filamentous microbes. *Current Opinion in Microbiology* **32**:7–13.
- Dias ES, Zied DC, Rinker DL. 2013. Physiologic response of *Agaricus subrufescens* using different casing materials and practices applied in the cultivation of *Agaricus bisporus*. *Fungal Biology* **117**:569–575.
- Djajakirana G, Joergensen RG, Meyer B. 1996. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. *Biology and Fertility of Soils* **22**:299–304.
- Doroški A, Klaus A, Režek Jambrak A, Djekic I. 2022. Food Waste Originated Material as an Alternative Substrate Used for the Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*): A Review. *Sustainability* **14**:12509.
- dos Santos Bazanella GC, de Souza DF, Castoldi R, Oliveira RF, Bracht A, Peralta RM. 2013. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia Microbiologica* **58**:641–647.
- Dvořák D, Hrouda P. 2005. *Ježaté houby*. Masarykova univerzita, Brno.
- Eger G, Eden G, Wissig E. 1976. *Pleurotus Ostreatus* — breeding potential of a new cultivated mushroom. *Theoretical and Applied Genetics* **47**:155–163.
- El-Batal AI, ElKenawy NM, Yassin AS, Amin MA. 2015. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)* **5**:31–39.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**:1531–1538.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479–491.



- Gerhardt KE, Gerwing PD, Greenberg BM. 2017. Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Science* **256**:170–185.
- Ghosh M, Mukherjee R, Nandi B. 1998. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acta Biotechnologica* **18**:243–254.
- Girmay Z, Gorems W, Birhanu G, Zewdie S. 2016. Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express* **6**:87.
- Gonkhom D, Luangharn T, Hyde KD, Stadler M, Thongklang N. 2022. Optimal conditions for mycelial growth of medicinal mushrooms belonging to the genus *Hericium*. *Mycological Progress* **21**:82.
- Gonzalez P, Labarère J. 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains. *Microbiology (Reading, England)* **146 ( Pt 1)**:209–221.
- Goyal M, Soni G. 2011. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Mycosphere* **2**:249–254.
- Grigansky AP, Solomko EF, Kirchhoff B. 1999. Mycelial Growth of Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. in Pure Culture. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**.
- Hasan DrMdN, Rahman MS, Nigar S, Bhuiyan MZA, Ara N. 2010. Performance of Oyster mushroom on different pretreated substrate. *International Journal of Sustainable Crop Production* **5**:16–24.
- Hassan FRH. 2007. Cultivation of the monkey head mushroom (*Hericium erinaceus*) in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* **10**:1229–1233.
- Higgins C, Margot H, Warnquist S, Obeysekare E, Mehta K. 2017. Mushroom cultivation in the developing world: A comparison of cultivation technologies. Pages 1–7.
- Hilber O, Hilber O. 1997. The genus *Pleurotus* (Fr.) Kummer (2). O. Hilber, Kelheim Germany.
- Hilber O, Hilber R. 1982. Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer: unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-Formenkomplexes. J. Cramer.
- Hoang HT, Wang C-L. 2015. The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* **43**:14–23.

- Hoang HT, Wang C-L, Wang C-H. 2015. The Effects of Different Substrates on the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* **43**:423–434.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* **30**:454–466.
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**:871–897.
- Holec J, Beran M, editors. 2006. Červený seznam hub (makromycetů) České republiky. Příroda, Praha
- Hong JS, Kim DH, Lee JY. 1984. Studies on characteristics of the cellulolytic enzymes produced by *Pleurotus sajor-caju*. *Korean Journal of Mycology* **12(4)**:133-140.
- Hu S-H, Wang J, Wu C-Y, Hsieh S-L, Chen K-S, Chang S-J, Liang Z-C. 2008. Bioconversion of Agro Wastes for the Cultivation of the Culinary-Medicinal Lion's Mane Mushrooms *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. and *H. laciniatum* (Leers) Banker (Aphyllophoromycetideae) in Taiwan. *International Journal of Medicinal Mushrooms - INT J MED MUSHROOMS* **10**:385–398.
- Hu T, Hui G, Li H, Guo Y. 2020. Selenium biofortification in *Hericium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry* **331**:127287.
- Ibekwe V, Ezeji U, Chinakwe E. 2008. Effects of Nutrient Sources and Environmental Factors on the Cultivation and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Pakistan Journal of Nutrition* **7**.
- Imtiaj A, Jayasinghe C, Lee GW, Shim MJ, Rho H-S, Lee HS, Hur H, Lee MW, Lee U-Y, Lee T-S. 2008. Vegetative Growth of Four Strains of *Hericium erinaceus* Collected from Different Habitats. *Mycobiology* **36**:88–92.
- Isikhuemhen OS, Mikiashvilli NA. 2009. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**:1353–1362.
- Jablonský I, Šašek V. 2006. Jedlé a léčivé houby - pěstování a využití<sup>1</sup>. Brázda, Praha.
- Jablonský I, Šašek V, Koudela M. 2019. Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat<sup>1</sup>. Profi Press s.r.o., Praha.

- Jang K-Y, Jhune C-S, Park J-S, Cho S-M, Weon H-Y, Cheong J-C, Choi S-G, Sung J-M. 2003. Characterization of Fruitbody Morphology on Various Environmental Conditions in *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology* **31**:145–150.
- Jořenek M, Zajoncová L. 2013. Biotechnologický význam lakasy a její charakteristika. *Chemické listy* **107**:921–928.
- Jung J-H, Lee K-E, Lee S-Y. 2006. Optimization of Submerged Cultivation of *Hericium erinaceum*. *KSBB Journal* **21**:96–102. The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering.
- Kadri T, Rouissi T, Kaur Brar S, Cledon M, Sarma S, Verma M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences* **51**:52–74.
- Kalmıs E, Azbar N, Yıldız H, Kalyoncu F. 2008. Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on wheat straw. *Bioresource Technology* **99**:164–169.
- Kamra DN, Zadražil F. 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit-body formation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* spp. *Agricultural Wastes* **18**:1–17.
- Kannan K, Oblisami G, Loganathan BG. 1990. Enzymology of ligno-cellulose degradation by *Pleurotus sajor-caju* during growth on paper-mill sludge. *Biological Wastes* **33**:1–8.
- Keflie TS, Nölle N, Lambert C, Nohr D, Biesalski HK. 2019. Impact of the natural resource of UVB on the content of vitamin D2 in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) under subtropical settings. *Saudi Journal of Biological Sciences* **26**:1724–1730.
- Khan MdA, Tania M. 2012. Nutritional and Medicinal Importance of *Pleurotus* Mushrooms: An Overview. *Food Reviews International* **28**:313–329. Taylor & Francis. Available from <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.637267> (accessed December 1, 2022).
- Kinugawa K, Suzuki A, Takamatsu Y, Kato M, Tanaka K. 1994. Effects of concentrated carbon dioxide on the fruiting of several cultivated basidiomycetes (II). *Mycoscience* **35**:345–352.
- Knop D, Yarden O, Hadar Y. 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:1025–1038.

- Ko HG, Park HG, Park SH, Choi CW, Kim SH, Park WM. 2005. Comparative study of mycelial growth and basidiomata formation in seven different species of the edible mushroom genus *Hericium*. *Bioresource Technology* **96**:1439–1444.
- Košnář Z, Částková T, Wiesnerová L, Praus L, Jablonský I, Koudela M, Tlustoš P. 2019. Comparing the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil after different bioremediation approaches in relation to the extracellular enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences (China)* **76**:249–258.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**:1870–1874.
- Kurt S, Buyukalaca S. 2010. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology* **101**:3164–3169.
- Lee JS, Min KM, Cho JY, Hong EK. 2009. Study of macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**:951–959.
- Li J, He X, Liu X-B, Yang Z, Zhao Z-W. 2017. Species clarification of oyster mushrooms in China and their DNA barcoding. *Mycological Progress* **16**.
- Li J, Liu X-B, Zhao Z-W, Yang ZL. 2019. Genetic diversity, core collection and breeding history of *Pleurotus ostreatus* in China. *Mycoscience* **60**:14–24.
- Li S-F, Eger G. 1979. Characteristics of Some *Pleurotus* Strains from Florida, Their Practical and Taxonomical Importance. *Mushroom Science X (part I)* **10**:155–169.
- Li X, Wu Y, Lin X, Zhang J, Zeng J. 2012. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil microcosms amended with mushroom cultivation substrate. *Soil Biology and Biochemistry* **47**:191–197.
- Liang C-H, Wu C-Y, Lu P-L, Kuo Y-C, Liang Z-C. 2019. Biological efficiency and nutritional value of the culinary-medicinal mushroom *Auricularia* cultivated on a sawdust basal substrate supplement with different proportions of grass plants. *Saudi Journal of Biological Sciences* **26**:263–269.
- Lin R, Zhang L, Yang X, Li Q, Zhang C, Guo L, Yu H, Yu H. 2022. Responses of the Mushroom *Pleurotus ostreatus* under Different CO<sub>2</sub> Concentration by Comparative Proteomic Analyses. *Journal of Fungi* **8**:652.
- Liu X-B, Li J, Horak E, Yang ZL. 2016. *Pleurotus placentodes*, originally described from Sikkim, rediscovered after 164 years. *Phytotaxa* **267**:137–145.

- Luz JMR da, Nunes MD, Paes SA, Torres DP, Silva M de CS da, Kasuya MCM. 2012. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**:1508–1515.
- Ma B-J, Shen J-W, Yu H-Y, Ruan Y, Wu T-T, Zhao X. 2010. Hericenones and erinacines: stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in *Herichium erinaceus*. *Mycology* **1**:92–98.
- Madhavi V, Lele SS. 2009. LACCASE: PROPERTIES AND APPLICATIONS. *BioResources* **4**:1694–1717.
- Marino RH, Eira AF da, Kuramae EE, Queiroz EC. 2003. Morphomolecular characterization of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) kummer strains in relation to luminosity and temperature of frutification. *Scientia Agricola* **60**:531–535.
- McCracken FI. 1970. Spore Production of *Herichium erinaceus*. *Phytopathology* **60**:1639.
- Miles PG, Chang S-T. 1997. *Mushroom Biology: Concise Basics and Current Developments*. WORLD SCIENTIFIC, Singapur.
- Miles PG, Chang S-T. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton.
- Mizuno T, Wasa T, Ito H, Suzuki C, Ukai N. 1992. Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Herichium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**:347–348.
- Morais H, Ramos C, Matos N, Forgács E, Cserhádi T, Almeida V, Oliveira J, Darwish Y, Ilés Z. 2002. Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular beta-glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **770**:111–119.
- Muswati C, Simango K, Tapfumaneyi L, Mutetwa M, Ngezimana W. 2021. The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Journal of Agronomy* **2021**:e9962285.
- Mycobank. 2022. Available from <https://www.mycobank.org> (accessed august 2022).
- Narasimha G, Sridevi A, Buddolla V, Subhosh CM, Rajasekhar RB. 2006. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* **5**:472–476.
- Ni TT, Zhao X, Xing Z, Tan Q, Buswell JA. 2020. Ligno(hemi)cellulolytic Enzyme Profiles during the Developmental Cycle of the Royal Oyster Medicinal Mushroom *Pleurotus*

- eryngii* (Agaricomycetes) Grown on Supplemented Agri-Wastes. International Journal of Medicinal Mushrooms **22**.
- Niedzielski P, Mleczek M, Siwulski M, Gąsecka M, Kozak L, Rissmann I, Mikołajczak P. 2014. Efficacy of supplementation of selected medicinal mushrooms with inorganic selenium salts. Journal of Environmental Science and Health, Part B **49**:929–937.
- Novotný C, Svobodová K, Erbanová P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Šašek V. 2004. Lignolytic Fungi in Bioremediation: Extracellular Enzyme Production and Degradation Rate. Soil Biology and Biochemistry **36**:1545–1551.
- Okwujiako A. 2001. Influence of light on the vegetative growth and fruit body formation of pleurotus sajor - caju (FR) Singer. Global Journal of Pure and Applied Sciences **7**:235–240.
- Oseni TO, Dlamini S, Earnshaw D, Masarirambi M. 2012. Effect of substrate pre-treatment methods on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. International Journal of Agriculture & Biology **14**: 251-255.
- Öztürk C, Atila F. 2021. Changes in lignocellulosic fractions of growing substrates during the cultivation of *Hypsizygus ulmarius* mushroom and its effects on mushroom productivity. Scientia Horticulturae **288**:110403.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. 2000. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Lignolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology **66**:920–924.
- Pánek M, Wiesnerová L, Jablonský I, Novotný D, Tomšovský M. 2019. What is cultivated oyster mushroom? Phylogenetic and physiological study of *Pleurotus ostreatus* and related taxa. Mycological Progress **18**:1173–1186.
- Patel H, Gupte A, Gupte S. 2009. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. BioResources **4**(1): 268-284.
- Petersen RH, Hughes KW. 1999. Species and Speciation in Mushrooms: Development of a species concept poses difficulties. BioScience **49**:440–452.
- Philippoussis A, Zervakis G, Diamantopoulou P. 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology **17**:191–200.

- Philippoussis AN, Diamantopoulou PA, Zervakis GI. 2003. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**:551–557.
- Poyedinok NL, Buchalo AS, Negriyko AM, Potemkina JV, Mykchaylova OB. 2003. The Action of Argon and Helium Neon Laser Radiation on Growth and Fructification of Culinary Medicinal Mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, and *Hericium erinaceus*(Bull.:Fr.)Pers. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **5 (3)**: 293-300.
- Pozdnyakova NN, Chernyshova MP, Grinev VS, Landesman EO, Koroleva OV, Turkovskaya OV. 2016. Degradation of fluorene and fluoranthene by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* **52**:621–628.
- Raman J, Jang K-Y, Oh Y-L, Oh M, Im J-H, Lakshmanan H, Sabaratnam V. 2021. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. *Mycobiology* **49**:1–14.
- Rayman MP. 2020. Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones* **19**:9–14.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* **61**:539–542.
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* **31**:223–235.
- Salmones D, Mata G, Waliszewski KN. 2005. Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* **96**:537–544.
- Sánchez C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**:1321–1337.
- Schardl CL, Craven KD. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* **12**:2861–2873.
- Shah ZA, Ashraf M, Ch MI. 2004. Comparative Study on Cultivation and Yield Performance of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on Different Substrates (Wheat Straw, Leaves, Saw Dust). *Pakistan Journal of Nutrition* **3(3)**: 158-160.

- Shnyreva AA, Shnyreva AV. 2015. Phylogenetic analysis of *Pleurotus* species. *Russian Journal of Genetics* **51**:148–157.
- Singer R. 1948. New and Interesting Species of Basidiomycetes. *Mycologia* **37(4)**: 425-439.
- Siwulski M, Pawlak R. 2005. Influence of sawdust substrate and its heat treatment on the mycelium growth and yield of *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Rolnictwo (Poland)* **51586**: 491-496.
- Siwulski M, Sobieralski K, Miran D. 2007. The effect of moisture of the substrate on yielding of two oyster mushroom strains. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Ogrodnictwo (Poland)* **41383**: 615-618.
- Siwulski M, Sobieralski K, Wojniłowicz M. 2009. Comparison of mycelium growth and yielding of selected strains of *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. on sawdust substrates with the glucose addition **55(3)**: 266-272.
- Sobieralski K, Siwulski M, Sas-Golak I, Mańkowski J, Kotlińska T. 2011. Mycelium growth and yield of wild strains of (Jacq.: Fr.) Quel. cultivated on waste materials from the textile industry. *Folia Horticulturae* **23**:67–71.
- Sokół S, Golak-Siwulska I, Sobieralski K, Siwulski M, Górka K. 2015. Biology, cultivation, and medicinal functions of the mushroom *Hericium erinaceum*. *Acta Mycologica* **50**.
- Souza DF de, Tychanowicz GK, Souza CGM de, Peralta RM. 2006. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. *Journal of Basic Microbiology* **46**:126–134.
- Stajic M, Sikorski J, Wasser S, Nevo E. 2005. Genetic similarity and taxonomic relationships within the genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) determined by RAPD analysis. *MYCOTAXON* **93**:247–255.
- Stamets P. 2011. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Clarkson Potter/Ten Speed Berkeley.
- Steenkamp ET, Wingfield MJ, McTaggart AR, Wingfield BD. 2018. Fungal species and their boundaries matter – Definitions, mechanisms and practical implications. *Fungal Biology Reviews* **32**:104–116.
- Suzuki C, Mizuno T. 1997. XI. Cultivation of yamabushitake (*Hericium erinaceum*). *Food Reviews International* **13**:419–421.
- Šnajdr J, Baldrian P. 2006. Production of lignocellulose-degrading enzymes and changes in soil bacterial communities during the growth of *Pleurotus ostreatus* in soil with different carbon content. *Folia Microbiologica* **51**:579–590.



- Štursová M, Baldrian P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil* **338**:99–110.
- Šušla M, Svobodová K. 2006. Ligninolytic Enzymes as Useful Tools for Biodegradation of Recalcitrant Organopollutants. *Chemické listy* **100**.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512–526.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology: FG & B* **31**:21–32.
- Thongbai B, Rapior S, Hyde KD, Wittstein K, Stadler M. 2015. *Herichium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress* **14**:91.
- Tsukihara T, Honda Y, Watanabe T, Watanabe T. 2006. Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP2. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**:114–120.
- Turner BL, Hopkins DW, Haygarth PM, Ostle N. 2002.  $\beta$ -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* **20**:157–162.
- US EPA, 2007. Method 3550C: Ultrasonic Extraction, Part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. EPA Publication SW-846, Washington, DC February, 2007. Revision 3 – Final Update. Available: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3550c.pdf>, Accessed: January 2018.
- Velázquez-Cedeño M, Mata G, Savoie J-M. 2002. Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: Changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**:201–207.
- Vilgalys R, Smith A, Sun BL, Miller Jr. OK. 1993. Intersterility groups in the *Pleurotus ostreatus* complex from the continental United States and adjacent Canada. *Canadian Journal of Botany* **71**:113–128. NRC Research Press.
- Vyhláška č. 153/2016 Sb., o stanovení podrobností ochrany kvality zemědělské půdy a o změně vyhlášky č. 13/1994 Sb., kterou se upravují některé podrobnosti ochrany zemědělského půdního fondu. Available from <http://www.eagri.cz/> (accessed August 2022).

- Vyhláška č. 397/2021 Sb. 2022. Vyhláška o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány. Available from <http://www.eagri.cz/> (accessed August 2022).
- Wang D, Sakoda A, Suzuki M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* **78**:293–300.
- Wang X, Shi Y, Ni Z, Li Z, Bao J. 2018. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by immobilized laccase. *Journal of the Serbian Chemical Society* **83**:22–22.
- Wiesnerová L, Hřebečková T, Jablonský I, Koudela M. 2023. Effect of different water contents in the substrate on cultivation of *Jacq. P. Kumm.* *Folia Horticulturae*
- Xie C, Yan L, Gong W, Zhu Z, Tan S, Chen D, Hu Z, Peng Y. 2016. Effects of Different Substrates on Lignocellulosic Enzyme Expression, Enzyme Activity, Substrate Utilization and Biological Efficiency of *Pleurotus Eryngii*. *Cellular Physiology and Biochemistry* **39**:1479–1494.
- Zervakis G, Philippoussis A, Ioannidou S, Diamantopoulou P. 2001a. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* **46**:231–234.
- Zervakis G, Philippoussis A, Ioannidou S, Diamantopoulou P. 2001b. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* **46**:231.
- Zervakis G, Polemis E. 2013. The Genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. (Pleurotaceae) in Europe. Pages 31–56 in Venturella G, Zervakis G, editors. *Pleurotus nebrodensis* A Very Special Mushroom. Bentham Science Publishers, Sharjah.
- Zervakis GI, Ntougias S, Gargano ML, Besi MI, Polemis E, Typas MA, Venturella G. 2014. A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex – New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach, and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with Apiaceae plants. *Fungal Biology* **118**:814–834.
- Zervakis GI, Venturella G, Fryssouli V, Inglese P, Polemis E, Gargano ML. 2019. *Pleurotus opuntiae* revisited – An insight to the phylogeny of dimitic *Pleurotus* species with emphasis on the *P. djamor* complex. *Fungal Biology* **123**:188–199.
- Zhang R, Li X, Fadel JG. 2002. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology* **82**:277–284.
- Zharare GE, Kabanda SM, Poku JZ. 2010. Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Scientia Horticulturae* **125**:95–102.

Ziombra M. 2000. Influence of Substrate and Pasteurization on Yield of *Pleurotus cornucopiae* (Paul.:Pers.) Roll. Journal of Vegetable Crop Production **6**:69–73.

## 8. Přílohy

**Příloha 1:** Seznam izolátů použitých k fylogenetické analýze

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank accesion number	molekulární skupina	GenBank accesion number	molekulární skupina	GenBank accesion number		
CCBAS 238	<i>P. eryngii</i>	E	MK757143	E	MK810690	E	MK810610	W	ČR
CCBAS 471	<i>P. eryngii</i>	E	MK757144	E	MK810682	E	MK810609	W	Slovensko
CCBAS 485	<i>P. eryngii</i>	E	MK757145	E	MK810691	E	MK810606	W	ČR
CCBAS 502	<i>P. eryngii</i>	E	MK757141	E	MK810683	E	MK810592	W	Německo
CCBAS 503	<i>P. eryngii</i>	E	MK757142	E	MK810684	E	MK810594	W	ČR
CCBAS 507	<i>P. eryngii</i>	E	MK757137	E	MK810685	E	MK810607	W	ČR
CCBAS 515	<i>P. eryngii</i>	E	MK757139	E	MK810686	E	MK810605	W	Slovensko
CCBAS 518	<i>P. eryngii</i>	E	MK757140	E	MK810687	E	MK810595	W	VB
CCBAS 625	<i>P. eryngii</i>	E	MK757146	E	MK810692	E	MK810603	W	Kanada
CCBAS 637	<i>P. eryngii</i>	E	MK757151	E	MK810696	E	MK810596	W	ČR
CCBAS 652	<i>P. eryngii</i>	E	MK757147	E	MK810693	E	MK810608	W	ČR
CCBAS 685	<i>P. eryngii</i>	E	MK757092	E	MK810669	E	MK810569	W	Slovensko
CCBAS 687	<i>P. eryngii</i>	E	MK757149	E	MK810689	E	MK810602	W	ČR
CCBAS 747	<i>P. eryngii</i>	E	MK757086	E	MK810671	E	MK810562	W	unclear
CCPF 5029	<i>P. eryngii</i>	E	MK757132	E	MK810681	E	MK810611	C	Čína
CCPF 5031	<i>P. eryngii</i>	E	MK757131	E	MK810680	E	MK810599	C	Korea
CCPF 5079	<i>P. eryngii</i>	E	MK757136	E	MK810678	E	MK810593	C	unclear
CCPF 5107	<i>P. eryngii</i>	E	MK757133	E	MK810679	E	MK810604	C	unclear
CCPF 5113	<i>P. eryngii</i>	E	MK757135	E	MK810676	E	MK810600	C	unclear
CCPF 5157	<i>P. eryngii</i>	E	MK757138	E	MK810677	E	MK810601	U	Německo
CCPF 5178	<i>P. eryngii</i>	E	MK757134	E	MK810695	E	MK810612	W	ČR

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number		
6689*	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757090	OA	MK810672	OA	MK810572	W	Rakousko
CCBAS 278	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757088	OA	MK810665	OA	MK810577	W	ČR
CCBAS 459	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757081	OA	MK810664	OA	MK810553	W	Německo
CCBAS 462	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757077	OA	MK810666	OA	MK810568	W	VB
CCBAS 472	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757084	OA	MK810663	OA	MK810578	C	ČR
CCBAS 473	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757082	OA	MK810670	OA	MK810552	W	ČR
CCBAS 474	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757083	OA	MK810661	OA	MK810551	W	Bulharsko
CCBAS 476	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757078	OA	MK810662	OA	MK810565	W	Slovensko
CCBAS 684	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757148	OA	MK810688	OA	MK810597	W	Slovensko
CCBAS 692	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757091	OA	MK810668	OA	MK810554	W	Japonsko
CCBAS 757	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757150	OA	MK810694	OA	MK810598	W	ČR
CCBAS 766	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757085	OA	MK810667	OA	MK810564	W	ČR
CCPF 5001	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757104	OB	MK810637	OB	MK810587	U	ČR
CCPF 5002	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757105	OB	MK810635	OB	MK810589	U	ČR
CCPF 5003	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757106	OB	MK810640	OB	MK810581	U	ČR
CCPF 5019	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757102	OB	MK810644	OB	MK810584	C	neznámý
CCPF 5022	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757100	OB	MK810645	OB	MK810586	C	Čína
CCPF 5030	<i>P. ostreatus</i>	OB	MK757109	OB	MK810639	OB	MK810580	C	ČR
CCPF 5075	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757089	OB	MK810642	OB	MK810583	C	ČR
CCPF 5117	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757070	OA	MK810647	OA	MK810555	C	ČR
CCPF 5141	<i>P. ostreatus</i>	OA	MK757097	OA	MK810659	OA	MK810561	W	ČR

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank accesion number	molekulární skupina	GenBank accesion number	molekulární skupina	GenBank accesion number		
CCPF 5142	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757094	OA	MK810652	OA	MK810560	W	ČR
CCPF 5143	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757076	OA	MK810653	OA	MK810550	W	ČR
CCPF 5144	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757071	OA	MK810646	OA	MK810557	W	ČR
CCPF 5145	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757095	OA	MK810657	OA	MK810566	W	ČR
CCPF 5146	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757079	OA	MK810654	OA	MK810575	W	ČR
CCPF 5147	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757073	OA	MK810650	OA	MK810556	W	ČR
CCPF 5148	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757074	OA	MK810651	OA	MK810559	W	ČR
CCPF 5149	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757096	OA	MK810648	OA	MK810571	W	ČR
CCPF 5150	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757069	OA	MK810658	OA	MK810558	W	ČR
CCPF 5155	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757072	OA	MK810649	OA	MK810549	W	Slovensko
CCPF 5156	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757087	OA	MK810656	OA	MK810567	W	ČR
CCPF 5172	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757075	OA	MK810660	OA	MK810576	W	ČR
CCPF 5173	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757080	OA	MK810655	OA	MK810563	W	ČR
CCPF 5179	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757093	OA	MK810673	OA	MK810570	W	ČR
CCPF 5192	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757099	OA	MK810675	OA	MK810573	W	ČR
CCPF 9902	<i>P.ostreatus</i>	OA	MK757098	OA	MK810674	OA	MK810574	W	ČR
HK35	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757107	OB	MK810641	OB	MK810582	C	Maďarsko
KRYOS	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757108	OB	MK810643	OB	MK810585	C	komerční
M2125	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757101	OB	MK810638	OB	MK810579	C	Slovensko
SPOPPO	<i>P.ostreatus</i>	OB	MK757103	OB	MK810636	OB	MK810588	C	ČR
CCBAS 475	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757124	P	MK810702	P	MK810620	W	Slovensko

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number		
CCBAS 478	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757125	P	MK810706	P	MK810621	W	VB
CCBAS 479	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757126	P	MK810707	P	MK810623	W	Německo
CCBAS 480	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757127	P	MK810705	P	MK810622	W	ČR
CCBAS 481	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757128	P	MK810708	P	MK810624	W	Španělsko
CCPF 5011	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757117	P	MK810714	P	MK810629	W	Čína
CCPF 5015	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757116	P	MK810718	P	MK810614	W	Čína
CCPF 5023	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757115	P	MK810717	P	MK810615	C	ČR
CCPF 5025	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757111	P	MK810719	P	MK810613	C	ČR
CCPF 5086	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757119	P	MK810715	P	MK810633	W	ČR
CCPF 5116	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757118	P	MK810716		MK810628	W	ČR
CCPF 5127	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757129	P	MK810709	P	MK810625	W	ČR
CCPF 5128	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757110	P	MK810712	P	MK810618	W	ČR
CCPF 5129	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757120	P	MK810704	P	MK810632	W	ČR
CCPF 5151	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757114	P	MK810699	P	MK810630	W	Slovensko
CCPF 5152	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757122	P	MK810711	P	MK810619	W	Slovensko
CCPF 5153	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757113	P	MK810703	P	MK810616	W	Slovensko
CCPF 5154	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757112	P	MK810710	P	MK810631	W	Slovensko
CCPF 5166	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757121	P	MK810713	P	MK810626	W	ČR
CCPF 5167	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757130	P	MK810700	P	MK810627	W	ČR
CCPF 5168	<i>P.pulmonarius</i>	P	MK757123	P	MK810701	P	MK810617	W	ČR

číslo izolátu	druh	ITS		TEF1		RPB2		kultivační historie	původ
		molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number	molekulární skupina	GenBank accession number		
CCPF 5007	<i>P.tuoliensis</i>	T	MK757152	T	MK810697	T	MK81050	U	neznámý
CCPF 5095	<i>P.tuoliensis</i>	T	MK757153	T	MK810698	T	MK810591	U	Čína

Izoláty byly přiřazeny do skupin: E - *P. eryngii*, OA – *P. ostreatus* A, OB – *P. ostreatus* B, P – *P. pulmonarius*, T – *P. tuoliensis*. Kultivační historie izolátů: W – divoký kmen, C – pěstovaný, U - neznámý.