

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BOTANIKY

2008



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VLIV INOKULACE
VYBRANÝCH EKTOMYKROHIZNÍCH HUB
NA RŮSTOVÉ CHARAKTERISTIKY
SEMENÁČKŮ DUBU A BUKU**

Vypracoval: Tomáš Zíbar
Školitel: Miloslava Kavková

Zíbar T (2008): Vliv inokulace vybraných ektomykorhizních hub na růstové charakteristiky semenáčků buku a dubu. [Influence of selected ectomycorrhizal fungi on growth characteristics of oak and beech seedlings.] Mgr. Thesis [in Czech]

Annotation:

Ectomycorrhizal inoculation proved to be an useful tool for promotig growth and survival of nursery seedlings, but little research of inoculation practices has been done in the Czech Republic so far. To fill this gap, effect of inoculation of *Laccaria laccata* and *Russula ochroleuca* on growth characteristic of beech and oak seedlings has been evaluated.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, jen s použitím uvedené literatury

V Českých Budějovicích, dne:

.....

Tomáš Zíbar

Poděkování: Děkuji své školitelce za nenahraditelné rady a ochotu, svým rodičům a přátelům za nekončící podporu a trpělivost

Obsah

1. Úvod	1
2. Rešerše	2
2.1 Mykorhiza	2
2.2. Ektomykorhiza	2
2.2.1. Ektomykorhizní rostliny	2
2.2.2. Ektomykorhizní houby	2
2.2.3. Struktura ektomykorhizy	3
2.2.4. Ektomykorhizní morfotypy a determinace	4
2.2.5. Význam ektomykorhizní symbiosy pro rostliny	4
2.2.6. Koncept late / early stage fungi	6
2.2.7. Specifita v ektomykorhizní symbiose	6
2.2.8. Souvislost struktury mykorhizy s kompatibilitou a růstovou odezvou	8
2.3. Ektendomykorhizy	8
2.4. Inokulace semenáčků ektomykorhizními houbami	9
2.5.1. Výběr mykorhizní houby	9
2.5.2. Aplikace inokulace mykorhizních hub	10
2.5.3. Metody inokulace	11
2.5.4. Persistence mykorhizních hub po vysazení	13
2.5.5. Koinokulace více druhů mykorhizních hub	13
2.6. Stručná charakteristika použitých dřevin	14
2.7. Stručná charakteristika použitých mykorhizních hub	15
2.7.1 <i>Laccaria laccata</i>	15
2.7.2. <i>Russula ochroleuca</i>	17
3. Metodika	18
3.1. Izolace mykorhizních hub a použité izoláty	18
3.2. Původ a příprava osiva	18
3.3. Příprava inokula	19
3.3.1. Myceliální suspenze	19
3.3.2. Vegetativní inokulum	19
3.4. Vyhodnocení pokusů	19
3.4.1. Růstové charakteristiky	19
3.4.2. Mykorhizní kolonizace	20
3.5. Anatomická srovnání mykorhiz různých kmenů	20
3.6. Fruktifikace	21
3.7. Použitá nomenklatura	22
3.8. Pokus 1	22
3.9. Pokus 2	23
3.10. Pokus 3	24
3.11. Pokus 4	24
3.12. Pokus 5	25

4. Výsledky	27
4.1. Pokus 1	27
4.1.1. Přežívání semenáčků	27
4.1.2. Mykorhizní kolonizace	27
4.1.3. Růstové charakteristiky	29
4.1.4. Fruktifikace	29
4.2. Pokus 2	30
4.2.1. Přežívání semenáčků	30
4.2.2. Mykorhizní kolonizace	30
4.2.3. Růstové charakteristiky	32
4.2.4. Fruktifikace	33
4.2.5. Anatomická srovnání mykorhiz různých kmenů	33
4.3. Pokus 3	35
4.4. Pokus 4	35
4.4.1 Přežívání semenáčků	35
4.4.2. Mykorhizní kolonizace	35
4.4.3. Růstové charakteristiky	35
4.5. Pokus 5	36
4.5.1. Přežívání semenáčků	36
4.5.2. Mykorhizní kolonizace	36
5. Diskuze	37
6. Závěr	48
7. Literatura	49
Příloha 1 (Tabulky a Grafy)	I
Příloha 2 (Design experimentů)	XXII
Příloha 3 (Popisy hlavních morfotypů mykorhiz)	XXIV
Příloha 4 (Měřené anatomické charakteristiky)	XXXI

Tabulka	Str.	Obrázky	Str.
TR1	28	R1	29
TR2	28	R2	32
TR3	28	R3	34
TR4	31		
TR5	31	P1.1	I, II
TR6	32	P1.2	III, IV
TR7	34	P1.3	V, VI
TR8	36	P1.4	VI
		P1.5	VI
TP1.1	XV	P1.6	VII, VIII
TP1.2	XV	P1.7	IX, X, XI
TP1.3	XV	P1.8	XII, XIII, XIV
TP1.4	XVI	P1.9	XIX
TP1.5	XVI	P2.1	XXII
TP1.6	XVII	P2.2	XXII
TP1.7	XVII	P2.3	XXIII
TP1.8	XVIII	P3.1	XXVIII
TP1.9	XVIII	P3.2	XXVIII
TP1.10	XVIII	P3.3	XXIX
TP1.11	XIX	P3.4	XXIX
TP1.12	XX	P3.5	XXX
TP1.13	XX		
TP1.14	XXI		
TP1.15	XXI		
TP4.1	XXX		

1. Úvod

Uplatňování tradičních lesnických metod zaměřených na maximalizaci produkce dřeva v uplynulých dvou stoletích vedlo k postupné degradaci lesů. Jehličnaté, zvláště smrkové, monokultury na nepřírozených stanovištích trpí výkyvy klimatu, napadením houbovými patogeny, degradují půdu a mají minimální hodnotu z biologického a ochranného hlediska (Hruška et Cienciala 2003). V důsledku zvyšujících se požadavků na složení lesa vyplývajících z lesního zákona (z. č. 289/1995 Sb.), stoupá i poptávka po kvalitních sazenicích listnatých dřevin.

Inokulace mykorhizními houbami byla již mnohokrát ve světě aplikována pro podporu růstu a zlepšení šance semenáčků na uchycení po vysazení. Výsledky však nejsou ve všech případech přesvědčivé, zvláště pokud se získané poznatky aplikují mimo oblast původní studie. Pozitivní efekt inokulace mykorhizní houbou se může projevit pouze v případě, že je zvolena odpovídající kombinace dřeviny a mykorhizní houby pro lokální podmínky. Metodiku inokulace semenáčků dřevin je tedy vždy nutné upravit pro cílovou dřevinu a pěstební podmínky. Většina výzkumu ve světě, věnující se praktickému uplatnění inokulace semenáčků mykorhizními houbami, byla zaměřena na jehličnaté dřeviny, studií na listnácích byl publikován omezený počet. V ČR jsou zatím zkušenosti s aplikací inokula ektomykorhizních hub značně omezené (Gryndler et al. 2004).

Kmen mykorhizní houby vhodný pro inokulace musí mít schopnost, kromě pozitivní růstové odezvy semenáčků po inokulaci, kolonizovat v dostatečné míře kořenový systém a být schopný odolat kompetičnímu tlaku ostatních mykorhizních hub (Cordell et Marx 1994).

Bylo zaznamenáno, že v některých případech je růstová odezva semenáčků spojená s strukturálními charakteristikami mykorhiz (Burgess et al. 1994), tento vztah nebyl nikdy testován.

Cílem mé práce bylo vybrat a izolovat vhodné mykorhizní symbionty pro inokulace semenáčků dubu a buku, stanovit jaký je vliv inokulace na růstové charakteristiky těchto semenáčků a dále zjistit jak se kompatibilita symbiontů odráží na anatomii mykorhiz.

2. Literární rešerše

2.1. Mykorhiza

Mykorhiza je: „symbiotická, nepatogenní nebo slabě patogenní, asociace, tvořená houbou a kořeny rostlin“ (Hawksworth et al. 1996). Původně tento termín označoval morfologickou strukturu, běžně se však používá i ve smyslu označujícím symbiotický vztah, který na této struktuře probíhá. Více než 90% čeledí vyšších rostlin obsahuje zástupce podílející se na nějakém typu mykorhizy (Wang et Qiu 2006). Mykorhizy jsou sice považovány za mutualistický vztah, není to však pravidlem (Jones et Smith 2004, Johnson et al 1997). Z organismů, účastnících se mykorhizní symbiosy, u kterých se předpokládá, že svému partnerovi nijak nezvyšují *fitness*, lze u rostlin jmenovat mykoheterotrofní rostliny (Bidartondo et al. 2005), u hub např. čeleď *Gomphidiaceae* (Agerer 1990). Ale i u „běžných“ mykorhizních druhů je vzájemná prospěšnost ovlivněna vlivy prostředí a kombinací druhů a genotypů symbiontů. (Smith & Read 1997, srv. Brundrett 2004).

2.2. Ektomykorhiza

Ektomykorhiza (ECM) je jedním ze sedmi tradičně rozeznávaných typů mykorhiz (Smith & Read 1997). Ektomykorhizy jsou dominantním a funkčně nejvýznamnějším typem mykorhizy v lesních biomech temperátního a boreálního pásu (Read et al. 2004), kde tvoří jednu z hlavních složek mikrobiální biomasy (Hogberg et Hogberg 2002).

2.2.1. Ektomykorhizní rostliny

Naprostá většina ektomykorhizních rostlin jsou dřeviny. Velký podíl temperátních stromů je ektomykorhizních – z našich významných čeledí: *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae* nebo *Salicaceae*. (Harley et Harley 1987, Wang et Qiu 2006). Některé ektomykorhizní rostliny jsou schopné se podílet i na jiných typech mykorhiz, často souběžně s ektomykorhizami (van der Heijden 2001b)

2.2.2. Ektomykorhizní houby

Houby tvořící ektomykorhizu jsou velmi diverzifikovanou skupinou (odhadovaných 5000-6000 druhů, Molina et al. 1992), většinu zástupců lze nalézt v odděleních *Ascomycota* a *Basidiomycota*, vzácně tvoří ektomykorhizy i zástupci *Zygomycota* (Smith et Read 1997). Ektomykorhizní houby jsou považovány za obligátní symbionty (Brundrett 2004), uplatňují se však i v jiných typech mykorhizní symbiosy jako je monotropoidní (Bidartondo et Bruns

2001, Yokoyama et al. 2005), některé typy orchideoidní (Selosse et al. 2004), arbutoidní (Smith et Read 1997).

Ektomykorhizní symbiosa se v evoluci vyvinula pravděpodobně nezávisle u více vývojových linií v rámci rostlin i hub (Bruns et Shefferson 2004). Ačkoli mykorhizy jsou známé již od přechodu rostlin na souš (Brundrett 2002), ektomykorhizy jsou mnohem mladší, jejich vznik pravděpodobně souvisí se šířením čeledi *Pinaceae* (Smith et Read 1997), struktury připomínající ektomykorhizy jsou známy z eocénu (LePage et al. 1996).

2.2.3. Struktura ektomykorhizy

Ektomykorhizní houby kolonizují kořinky posledního řádu větvení, které v důsledku kolonizace výrazně mění svoji morfologii a způsob růstu (Wilson et Harley 1983). Nápadnou strukturou na povrchu ektomykorhizního kořene je hyfový plášť. Změny v charakteru růstu a přítomnost hyfového pláště umožňují hodnocení mykorhizní kolonizace již při malém zvětšení. Funkce pláště je pravděpodobně ochranná nebo zásobní, předpokládá se, že na výměně metabolitů mezi symbionty se nepodílí (Smith et Read 1997). Z pláště vystupují jednotlivé extraradikální hyfy nebo rhizomorfy, které propojují mykorhizu se substrátem¹.

Podstatným rozdílem odlišujícím ektomykorhizu od ostatních typů mykorhiz je nepřítomnost intracelulární penetrace hyf do buněk kořene rostliny. Hyfy houby pronikají pouze mezibuněčnými prostory v kořeni, těsně obklopují jednotlivé buňky kořene a vytvářejí strukturu, nazývanou Hartigova síť, která je pravděpodobně hlavním místem výměny metabolitů mezi symbionty (Smith et Read 1997).

U nahosemenných rostlin a malé části krytosemenných (např. *Dryas*, *Cistus*) pokožka (rhizodermis) mykorhizního kořene je často zdegenerovaná ve formě oploštělých buněk vyplněné taninovými látkami. Mezi buňky primární kůry (cortex) kořenu proniká jedna až více řad hyf houby, tento typ Hartigovy sítě se označuje jako kortikální.

U většiny krytosemenných rostlin proniká houba jen mezi buňky rhizodermis, hlubšímu pronikání zabraňuje vnější vrstva korových buněk (hypodermis), takové uspořádání Hartigovy sítě je označováno jako epidermální (Godbout et Fortin 1983). U tohoto typu Hartigovy sítě je často pozorováno zvětšení rhizodermálních buněk, pravděpodobně za účelem zvětšení plochy rozhraní. Jsou rozlišovány dvě varianty: paraepidermální, kdy Hartigova síť dosahuje jen po radiální stěny epidermálních buněk a periepidermální, kdy

¹ V dalším textu užívám termínu rhizomorfa v širokém pojetí, jak činí Agerer (1987-2002, 2001 aj.). Rhizomorfa v užším pojetí (Hawksworth et al. 1996) předpokládá diferencovaný apikální meristém, pokud ten chybí, jedná se pouze o myceliální provazec.

Hartigova síť zcela obklopuje epidermální buňky. Mezi jednotlivými typy Hartigovy sítě však byly pozorovány přechody, i v závislosti na podmínkách symbiosy (Godbout et Fortin 1985).

2.2.4. Ektomykorhizní morfotypy a determinace

Mykorhizy různých taxonů se mohou podstatně, morfologicky i anatomicky lišit. Na základě odlišností a sdílených znaků lze, v některých případech, zařadit mykorhizu do systematické skupiny (Agerer 2006), rodu či dokonce druhu (Agerer 1987-2002). Popisy by měly být zacíleny na znaky, které jsou stabilní mezi jednotlivými rostlinnými hostiteli. Mykorhizy u semenáčků, které se mohou do jisté míry odlišovat od mykorhiz u dospělých stromů, podrobně popisuje Ingleby et al. (1990).

Vyvinutí pro houby specifických primerů (Gardes et Bruns 1993), umožnilo přesnou identifikaci houbového symbionta, který je součástí určitého morfotypu pomocí molekulárních metod. Aplikace těchto metod zpřesnila výsledky získávané analýzou morfotypů, navíc bylo ukázáno, že jeden druh houby nemusí odpovídat jen jedinému morfotypu a na jednom mykorhizním kořínku může být přítomno více druhů mykorhizních hub zároveň (Erland et al. 1999, Wurzbürger et Bledsoe 2001, Wu et al. 1999). Menkis et al. (2005) zjistil, že jeden mykorhizní morfotyp může obsahovat 1 až 41 (průměrně 6.5) taxonů hub. Ve stejné práci je uvedeno, že každý identifikovaný taxon se vyskytoval v průměru v 2.4 morfotypech. Není však zcela jasné, jaké vzájemné vztahy panují ve společenstvech těchto hub na jedné kořenové špičce.

I přesto má popis morfotypů v současné době své nezastupitelné místo, zpravidla předchází aplikaci molekulárních metod, které se použijí jen na reprezentativní vzorek každého morfotypu (Horton et Bruns 1998). Navíc morfotyp mykorhizy může mít vztah k její ekologické funkci (Agerer 2001, van der Heijden et Kuyper 2003), data založená na morfotypech mohou tedy lépe odrážet např. funkční stránku společenstva.

2.2.5. Význam ektomykorhizní symbiosy pro rostliny

Mykorhizní houby usnadňují rostlinám příjem minerálních živin – jedná se hlavně o špatně mobilní prvky jako fosfor, zinek, síra (Smith et Read 1997). Mykorhizní houby jsou schopné se podílet na zvětrávání minerálů v půdě a získávat z nich uvolněné živiny (Landeweert et al. 2001). Oproti arbuskulární mykorhizám je u ektomykorhiz podstatný i příjem dusíku, který je často limitující živinou v lesních ekosystémech (Read et Perez-Moreno 2003). Ektomykorhizní houby jsou schopné, kromě anorganických forem, využít i organické formy dusíku (Read et Perez-Moreno 2003, Lindahl et Taylor 2004), který je jinak pro rostliny nedostupný. Na oplátku získávají od rostliny energii ve formě jednoduchých cukrů.

Náklady na udržování mykorhizní symbiosy mohou zahrnovat až desítky procent rostlinné produkce asimilátů (Smith et Read 1997). Na druhou stranu, mykorhizní rostliny vykazují vyšší rychlost fotosyntézy (Conjeaud et al. 1996, Dosskey et al. 1990) a jsou schopné tak náklady do jisté míry kompenzovat. Mykorhizní kolonizace nemusí nutně mít za následek zvýšený růst, ale třeba jen zvýšení obsahu minerálních živin v tkáních nebo zlepšení fyziologického stavu (Dunabeita et al. 2004).

Tuomi et al. (2001) ve svém článku navrhuje model popisující optimální poměr mezi náklady a přínosem mykorhizní symbiosy, vyjádřenou jako podíl kolonizovaných kořenů. Podle tohoto modelu je pro rostlinu výhodná mykorhiza nejen za předpokladu, kdy mykorhizní kořeny mají větší efektivitu v získávání minerálních živin (vyjádřená jako poměr mezi množstvím získaných živin a vynaloženými asimiláty), ale i v případě jsou-li mykorhizní kořeny v získávání minerálních živin méně efektivní. Tento druhý případ se vztahuje na takové podmínky, když mykorhizní kořeny jsou schopny zásobovat větším absolutním množstvím živin (třeba přístupem k živinám, které jsou pro rostliny přímo nevyužitelné) a zároveň je rostlina schopna tento zdroj účinně využívat (tj. je zde silná limitace tímto zdrojem). Tato situace je dobře představitelná právě u ektomykorhizní symbiosy, kdy ektomykorhizní houby mají přístup k širšímu spektru živin než kořeny dřevin, zvláště v boreálních oblastech, kde je růst silně limitován dostupností živin (Read et al. 2004). Zásadním nedostatkem tohoto modelu je skutečnost, že neuvažuje možnost rostliny více investovat do růstu kořenů, jsou-li efektivnější v příjmu živin než mykorhizy. Geritz et al. (2005) proto zformulovali jiný model vycházející z principu, že rostlina se snaží dosáhnout takového optimálního poměru příjmu minerálních živin a výdeje asimilátů, aby nebyla limitujícím pouze jedna z těchto proměnných, a to pomocí rozdílných investic do podzemní a nadzemní části. Na základě toho modelu předpovídají, že mykorhizní status rostlin se mohl vyvinout pouze za předpokladu, že příjem živin mykorhizními kořeny je vyšší v ohledu na vynaložené náklady než u kořenů nemykorhizních.

Mykorhizní symbiosa však není pouze omezena na nutriční vztahy, jedná o složitější, multifunkční vztah. Mykorhizní houby zvyšují toleranci hostitelů vůči patogenům (Morin et al. 1999, Sinclair et al. 1975): ať už jako důsledek zlepšené výživy, zlepšené tolerance, indukce defenzivních mechanismů nebo přímé interakce s patogeny (Benett et al. 2006, Duchesne 1994). Mykorhizní houby jsou schopné omezovat vodní stres kolonizovaných rostlin (Honig et al. 2000) a urychlovat regeneraci rostliny po vystavení suchu (Smith et Read 1997). Mykorhizní houby jsou rovněž schopné zmírňovat toxické působení těžkých kovů na rostlinu (Adriensen et al. 2006, Blaudez et al. 2000, van Scholl et al. 2005).

Mykorhizní rostliny rostou lépe při nízkých koncentracích živin, vysoká koncentrace živin tento efekt neguje (Bougher et al. 1990). Jonhson et al. (1997) spekuluje, že se mykorhizní vztah stane explozivním pokud je hladina živin na takové úrovni, kdy již je rostlina schopná získávat živiny účinněji než houba, ale ne dost vysoká, aby spustila mechanismy regulující kolonizaci. V některých případech mykorhizní kolonizace snižuje růst semenáčků bez ohledu na hladinu živin (Conjeaud et al. 1996), v takových případech lze vztah považovat za parasitismus (Brundrett 2004). Vzájemná výhodnost symbiosy se rovněž různě projevuje na rozdílné časové škále. Běžně je pozorován dočasný pokles v růstu semenáčků krátce po inokulaci, který lze přisuzovat nákladům na syntézu sítě extraradikálního mycelia v půdě (Dosskey et al. 1990).

2.2.6. Koncept *early / late stage hub*

Deacon et al. (1983) a Mason et al. (1983) rozlišili dvě ekologické strategie v sukcesi u ektomykorhizních hub – tzv. *early-stage* a *late-stage fungi*. Podle tohoto rozdělení *early-stage* fungi kolonizují semenáčky, a poté jsou postupně během sukcesního vývoje nahrazovány *late-stage fungi*. Omezení tohoto konceptu spočívá v aplikovatelnosti pouze na stanoviště bez kontaktu s dospělými stromy (Flemmig 1984), neplatí však ve většině případů pro již etablovaná lesní společenstva, kdy na kořenech semenáčků i dospělých stromů dominují *late-stage fungi* (Jonsson et al. 1999). Jak spekuluje Finlay et al. (1992) úspěch může být poháněn změnami v kvalitě substrátu, vyšší nároky *late-stage fungi* na asimiláty mohou být dalším vysvětlením (Gibson et Deacon 1990).

Na přirozených stanovištích pod zápojem dospělých stromů jsou semenáčky okamžitě kolonizovány *late-stage fungi*, což je pro jejich další růst výhodné, protože to umožňuje připojení na společnou myceliální síť (Simard et Durall 2004) bez nákladů na počáteční investice (Dickie et al. 2002). Pokud je kolonizován substrát bez přítomnosti mykorhizní houby, vytvoření myceliální sítě v půdě vyžaduje počáteční investici do její tvorby, která může být poměrně náročná na živiny (Colpaert et al. 1992) a způsobit dočasný pokles růstu semenáčku (Smith et Read 1997, Conjeaud et al. 1996).

2.2.7. Specifita v ektomykorhizní symbiose

Specifita v mykorhizní symbiose může být pojata mnoha pohledy (Molina et al. 1992). Pokud chápeme specifitu jako míru schopnosti asociace mezi jednotlivými symbionty, pak specifita partnerů v ektomykorhizní symbiose je lépe známá oproti např. arbuskulární mykorhize (Molina et al. 1992).

Jednotlivé ektomykorhizní rostliny mohou ve svém areálu zahrnovat tisíce druhů ektomykorhizních symbiontů (Smith et Read 1997). Výhody nízké specifity dřevin jsou zjevné (Bruns et al. 2002): umožňuje nalézt symbionty na stanovištích, na kterých se dosud druh nevyskytoval a více druhů symbiontů je schopných využívat diverzifikovanějších zdrojů. Vyjímkou v tomto ohledu jsou pouze epiparazitické nezelené rostliny, kde se jednotlivé druhy zpravidla asociují pouze s jedním druhem nebo skupinou druhů příbuzných (Bidartondo et Bruns 2001), což může být adaptace na účinnější využívání zdrojů z hostitele nebo důsledek 'závodu ve zbrojení', mezi hostitelem a parazitem (Bruns et al. 2002).

Specifita mykorhizních hub vůči dřevinám je lépe známým fenoménem (Molina et al. 1992). Jakkoli je u mnoha druhů hub známa úzká vazba na druh hostitelské rostliny, není zcela zřejmé jaké výhody specializace ektomykorhizních hub přináší. Z pohledu rostliny Molina et al. (1992) navrhuje hypotézu, že mykorhizní rostliny tvořící symbiosu se specializovanými houbami mají menší pravděpodobnost, že se stanou cílem mezidruhového fakultativního parazitismu, tj. že jedna rostlina nepřímou parazituje na druhé přes sdílenou mykorhizní houbu. Specializace z pohledu houby může být výhodná pokud je zvýšená kompetiční schopnost specializovaných hub o kořenový systém nebo specializovaná houba je úspěšnější v získávání asimilátů od svého hostitele (Bruns et al. 2002). Jak ukázaly studie zabývající se strukturou společenstev mykorhizních hub (Gardes & Bruns 1996, Horton & Bruns 1998), ve společenstvu často dominují druhy hub se širokým druhovým spektrem hostitelů, často v kontrastu ke složení nadzemního společenstva. Pozorované preference mykorhizních hub mohou být i důsledkem biologických interakcí, např. kompetice jednotlivých mykorhizních druhů, protože kombinace mykorhizní houby a dřeviny, které jsou schopné vytvářet mykorhizy *in vitro*, nevytvářejí mykorhizy v přírodních podmínkách (Palm et Stewart 1984).

Vnitrodruhová variabilita ve schopnosti kolonizovat kořenový systém byla dobře popsána u rodu *Pisolithus* (Burgess et al. 1994, Dixon et al. 1987). Burgess et al. (1994) testoval kolonizační schopnost dvaceti různých izolátů rodu *Pisolithus* izolovaných v asociaci s různými hostitelskými rostlinami. Testované izoláty vykazovaly různou schopnost kolonizace kořenů blahovičnicku (*Eucalyptus*) a morfologii mykorhiz, největší rozdíly byly mezi kmeny izolovanými z různých druhů rostlin. Vliv původu inokula *Hebeloma leucosarx* z různých půdních podmínek na kolonizaci a růst řízků *Salix repens* sledovali van der Heijden & Kuyper (2001), avšak nenalezli průkazné rozdíly mezi izoláty. Rovněž Brundrett et al. (2005) nepozoroval rozdíly v úspěšnosti kolonizace mezi izoláty z různých klimatických oblastí. Ruiz-Diez et al. (2006) se snažila najít vztah mezi fyziologickými charakteristikami

různých izolátů rodu *Suillus* a konstatuje, že nejrychleji rostoucí izolát má největší vliv na růst semenáček *Pinus halepensis*, z dat prezentovaných v této studii je však patrné, že se nejedná o obecný trend.

U druhů hub se širokým spektrem hostitelů, které se nejčastěji používají k inokulacím, se často vyskytují kryptické druhy (např. u rodu *Pisolithus* - Martin et al. 1998, *Paxillus* - Hahn et al. 1999, *Laccaria* – Fries 1983), s různými preferencemi hostitelů (Hahn et al. 1999, Kropp et Mueller 1999).

Úspěšnost a prospěšnost inokulace se rovněž liší mezi jednotlivými klony, liniemi a proveniencemi dřevin, jak bylo studováno u *Pisolithus tinctorius* (Rosado et al. 1994, Dixon et al. 1987, Tonkin et al. 1989)

2.2.8. Souvislost struktury mykorrhizy s kompatibilitou a růstovou odezvou

Ačkoli Smith et Read (1997) si ve své práci položili otázku, které anatomicko-morfologické znaky charakterizují mykorrhizy kmenů mykorrhizních hub vhodných pro inokulační programy, nebyl v této oblasti proveden rozsáhlý výzkum. Ektomykorrhizní houby vytvářejí s nekompatibilními hostiteli útvary, které se se ektomykorrhizám morfologicky podobají, avšak mohou mít vytvořený pouze vnější plášť, nikoliv Hartigovu síť (Harrington et Mitchell 2002). Rovněž Masicotte et al. (1999) a Godbout et Fortin (1983) pozorovali tenký plášť a špatně vyvinutou Hartigovu síť u mykorrhiz *Alnus glutinosa* s nekompatibilním druhem symbionta.

Jen málo prací hodnotících kolonizační schopnosti jednotlivých kmenů se zaměřilo i na morfologii nebo anatomii vzniklých mykorrhiz. Dixon et al. (1987) ve své práci testoval schopnost tří různých izolátů *Pisolithus tinctorius* kolonizovat kořenový systém *Pinus taeda* a zmiňuje, že izoláty, které byly méně úspěšné v tvorbě mykorrhiz vytvářely jen omezenou Hartigovu síť a tenčí plášť na povrchu kořene. U stejného druhu houby pozoroval Burgess et al. (1994), že růstová odezva hostitele korelovala s tloušťkou pláště vytvořených mykorrhiz a mírou vývinu Hartigovy sítě.

2.3. Ektendomykorrhizy

Ektendomykorrhizy bývají někdy rozlišovány jako zvláštní typ mykorrhizy (Smith et Read 1997), spíše se ale jedná o aberantní formu ektomykorrhizy (Brundrett 2004). Od ektomykorrhiz se odlišují tím, že hyfy houby (která za jiných podmínek vytváří obvyklou ektomykorrhizu) pronikají dovnitř buněk kořene. Ektendomykorrhizy bývají obvykle nacházeny u semenáček jehličnanů (Smith et Read 1997), avšak je znám případ i u dubu a

buku (Clowes 1951, Henry 1933 sek. cit.). Vzhledem k tomu, že ektendomykorhizy jsou zpravidla pozorovány v nepřírozených podmínkách, může pronikání hyf do buněk značit narušení mutualistického vztahu (Smith et Read 1997, Brudrett 2004).

2.4. Inokulace semenáčků ektomykorhizními houbami

Inokulace ektomykorhizními houbami je vhodná na stanovištích, kde lze očekávat nedostatečnou přirozenou kolonizaci semenáčků. Proto největší úspěch měly studie, které se zabývaly inokulací introdukovaných dřevin (Villeneuve et al. 1991, Selosse et al. 2000, Pera et al. 1999), zalesňování oblastí dominovaných arbuskulárně mykorhizní vegetací (Dunabeitia et al. 2004) a narušených stanovišť (Malajczuk et al. 1994, Lunt et Hedger 2003, Walker et al. 2004). Inokulace je vhodná rovněž v lesních školkách, kde používání nadměrného množství hnojiva, pesticidů a manipulace se semenáčky může omezovat mykorhizní kolonizaci (Cordell et Marx 1994). Výhoda inokulace ve školkách spočívá v šetrnosti k životnímu prostředí, umožňuje omezit množství aplikovaného hnojiva a pesticidů, při produkci semenáčků stejné cílové velikosti. Khasa et al. (2001) udává, že aplikace mykorhizního inokula umožňuje omezení použitého hnojiva o 33%. Alternativou k inokulaci je upravit podmínky ve školkách takovým způsobem, aby byl podpořen růst původních druhů (Cordell et Marx 1994). Je však nutné brát ohled na ekonomické náklady inokulace, které nesmí být významně vyšší oproti tradičnímu managementu (Miller et al. 1994). Produkce inokula mykorhizních hub je i zajímavou ekonomickou aktivitou (Gianinazzi et Vosatka 2004).

Jiným využitím inokulace semenáčků je zaměření na pěstování plodnic jedlých druhů mykorhizních hub v polokultuře (Guerin-Laguet 2005, Parladé et al. 2004)

2.5.1. Výběr mykorhizní houby

Proces výběru vhodného izolátu mykorhizní houby je víceúrovňový (Cordell et Marx 1994, Dodd et al. 1994, Riuz-Diez et al. 2006): prvním krokem je výběr druhů a izolátů schopných dobře růst v umělé kultuře, zhodnocení jejich efektu na růst semenáčků v kontrolovaných podmínkách a nakonec ověření jejich aplikovatelnosti v praxi. Účinnost stimulace růstu se liší mezi mykorhizními druhy – např. Jonsson et al. (2001) pozoroval až trojnásobné rozdíly v růstu semenáčků mezi různými druhy mykorhizních hub.

Vhodné mykorhizní houby je třeba zvolit podle jejich ekologických a fyziologických charakteristik. Kmeny vhodné pro rozsáhlou aplikaci by měly splňovat tato kritéria: snadná masová produkce inokula, biologie druhu musí být příhodná pro skladování a transport před aplikací, aplikace by měla vyžadovat co nejmenší nutnou manipulaci, vybrané izoláty by měly mít větší pozitivní efekt oproti přirozeně se vyskytujícím houbám, s nimiž by měly být co

nejlépe schopné obstát v kompetici (Cordell et Marx 1994). Pro inokulace jsou vhodnější spíše tzv. *early stage fungi*, které jsou obecně snadno kultivovatelné a kompetičně schopnější na narušených stanovištích (Fleming 1985). Jako prevence před možným zavlečením invazivních druhů se doporučuje použití domácích druhů oproti introdukovaným (Schwartz et al. 2006).

K tomu, aby se mykorrhizní inokulace projevila, je třeba, aby inokulovaný kmen obsadil alespoň určitou část kořenového systému. Například Cordell et Marx (1994) uvádějí, že pozitivní efekt inokulace semenáčků borovice houbou se projeví *Pisolithus tinctorius* pokud inokulant obsadí alespoň stejný podíl kořenů jako zbytek mykorrhizních hub dohromady.

Důležitým faktorem pro úspěšnost inokulace je správné načasování (Jones et al. 1990). Například ochrana před patogeny je účinná pouze v případě, že mykorrhizní houba je inokulována před nebo současně s infekcí patogenu (Duchesne 1994). Podstatný je i vliv substrátu (Chen et al. 2006), vhodnější jsou substráty s hrubší strukturou a nižším pH (Cordell et Marx 1994). Mykorrhizní kolonizace je omezena v prostředí s dobrou dostupností živin (Bougher et al. 1990).

2.5.2. Aplikace inokulace mykorrhizních hub

Většina inokulačních experimentů se zabývala inokulacemi jehličnanů (Castellano 1994, Reddy et Natarjan 1997, Rincón et al. 2001, Boukeim et al. 2002, Ruiz-Diez et al. 2006), z listnatých dřevin pak hlavně blahovičnicků (*Eucalyptus* spp.) (Lu et al. 1998, Mason et al. 2000, de Souza et al. 2004, Brundrett et al. 2005, Chen et al. 2006), studie na ostatních listnáčích jsou vzácné (Gagnon et al. 1991, Garbaye et Churin 1997, Dunabeitia et al. 2004, Kavková et al. 2007a).

Nejpoužívanější druhem houby pro inokulace je *Pisolithus tinctorius* (Castellano 1994). Tato houba je obzvláště účinná v inokulacích semenáčků jehličnanů v suchých a teplých oblastech (Dixon et al. 1987, Rincón et al. 2001, Walker 2001), avšak je málo vhodná pro inokulace semenáčků listnáčů (Domenech et al. 2004, Dunabeitia et al. 2004). Dalšími často používanými rody jsou: *Laccaria* (viz níže), *Paxillus* (de Souza et al. 2004), *Scleroderma* (Chen et al. 2006), *Hebeloma* (Boukeim et al. 2002) a *Rhizopogon* (Dunabeitia et al. 2004)

2.5.3. Metody inokulace

2.5.3.1. Aplikace lesní půdy

První používanou metodou je inokulace svrchními horizonty lesní půdy přimíšené do substrátu (Berman et Bledsoe 1998, Amaranthus et Perry 1987). Půda se odebírá pod stromy stejného rodu a přimíchává se do školkařského substrátu až do objemu 10% (Castellano 1994). Nevýhody jsou zřejmé: chybí kontrola nad složením inokula, hrozí zavlečení patogenů, narušení životního prostředí při využití ve velkém měřítku. Výhodou pak nenáročnost na technické vybavení. Modifikací metody je inokulace přímo izolovanými mykorhizami (Beyler et Heyser 1997). Tato metoda sice umožňuje jistou kontrolu nad identitou inokulovaného symbionta, avšak příprava inokula je natolik náročná, že není vhodná pro větší měřítko.

2.5.3.2 Inokulace sporami

K inokulaci lze použít i spory mykorhizních hub (Castellano 1994, Martines-Amores et al. 1991, Parladé et al. 1996, Lu et al. 1998, Walker 2001), které lze aplikovat ve formě pelet nebo suspenze. Jako zdroj spor se používají přímo volně rostoucí plodnice, opadá tedy nutnost kultivace mykorhizní houby. Protože množství spor nutných k inokulaci je velké, tato metoda je obzvláště vhodná u břichatkovitých hub, které produkují velké množství spor na jednu plodnici. Výhodou je, že spory vydrží klíčivé až několik měsíců (Fries 1983). U kloboukatých hub se tato metoda příliš nevyužívá, nicméně Lu et al. (1998) ve své práci úspěšně použili tuto metodu mimo jiné i pro druhy rodu *Laccaria*. Nevýhodou je velká genetická variabilita inokula, neumožňující výběr nejvhodnějšího izolátu a zpoždění ve tvorbě mykorhiz oproti vegetativnímu inokulu v důsledku doby nutné ke klíčení spor.

2.5.3.3. Vegetativní inokulum

Příprava vegetativního mycelia vyžaduje izolaci houby do kultury. Výhodou je možnost selekce jednoho určitého účinného izolátu. Mnohé z mykorhizních hub se však nepodařilo úspěšně izolovat do kultury nebo v kultuře rostou špatně (např. mnohé druhy z rodů *Russula* a *Cortinarius* - Smith et Read 1997).

Mycelium je možné kultivovat na pevné nebo v tekuté kultuře a inokulovat přímo myceliální suspenzí injektovanou do kořenového systému. Nevýhodou tohoto postupu ve krátká životnost inokula a obtížná manipulace omezující široké uplatnění v praxi. Výhodou je naopak snadná produkce inokula v malých dávkách a kontrola identity izolátů. Tato metoda se nejčastěji využívá při testování vhodnosti izolátů pro inokulaci. V některých případech však může fragmentace mycelia při přípravě inokula omezit jeho životaschopnost (Brundrett et al. 2005).

Modifikací metody je možnost nechat narůst mycelium po dobu několika týdnů na pevném nosiči s velkým povrchem (např. vermikulit, rašeliník, Perlit) v tekutém médiu (MMN, Hagem). Určitou nevýhodou je nutnost aplikovat poměrně velké množství inokula: po odstranění přebytečného média se inokulum aplikuje v koncentraci 1 díl inokula vůči 10-60 dílům substrátu (Castellano 1994). Ačkoli tato metoda je náročnější na techniku a manipulaci při přípravě, poskytuje zpravidla dobré výsledky (Honig et al. 2000, Parladé et al. 2004).

Mycelium je možné rovněž imobilizovat v alginátových peletách. Výhodou této metody je dlouhá životaschopnost těchto pelet (Rodriguez et al. 1999). Rovněž manipulace a dávkování pelet je velmi snadné. Ne vždy je však tato metoda účinná, což se přisuzuje, stejně v případě myceliální suspenze, fragmentaci mycelia (Parladé et al. 2004, Gagnon et al. 1991).

2.5.3.4. Vliv formy inokula na úspěch inokulace

Pro úspěch inokulace je důležitá forma a dávkování inokula. Bohužel výsledky jednotlivých studií srovnávající metody inokulace podávají nekonzistentní výsledky. Marx et al. (1992, sek. cit.) testoval vliv různých typů aplikace inokula *Pisolithus tinctorius* na kolonizaci semenáčků borovice. V této studii se aplikace vegetativního inokula ukázala být účinnější než aplikace spor v jakékoli formě. Míra kolonizace se rovněž zvyšovala s rostoucí aplikovanou dávkou vegetativního inokula. Naopak Rincón et al. (2001) nepozoroval vliv množství inokula na mykorhizní infekci u většiny testovaných druhů. V jiném případě byla inokulace sporami účinnější než myceliální suspenzí (Brundrett et al. 2005). Parladé et al. (2004) srovnával metody inokulace semenáčků borovice druhu rodu *Lactarius*. Nejlepší výsledky prokazovala inokulace vegetativním myceliem, naopak alginátové pelety zcela selhaly, úspěšnost myceliální suspenze vycházela mezi těmito dvěma metodami. Boukeim et al. (2002) našel větší míru kolonizace u semenáčků inokulovaných *Tricholoma cedretorum* vegetativní metodou oproti alginátovým peletám, míra kolonizace u druhu *Hebeloma sinapizans* se nelišila bez ohledu na metodu inokulace. Je patrné, že pro různé druhy a podmínky prostředí jsou vhodné různé metody inokulace a je třeba upravit metodiku pro lokální podmínky a kombinaci symbiontů.

Metodika by měla být také přizpůsobena požadovanému cíli, některé metody jsou vhodnější pro experimentální testování izolátů mykorhizních hub, jiné pro aplikaci v praxi (Cordell et Marx 1994)

2.5.4. Persistence mykorhizních hub po vysazení

Inokulované mykorhizní houby musí být schopné vydržet konkurenci přirozeně se vyskytujících druhů i po vysazení. Villeneuve et al. (1991) sledoval mykorhizní kolonizaci semenáčků douglasky inokulované vegetativním myceliem *Laccaria laccata* a *L. bicolor* vysazených na čerstvou paseku. Ačkoli došlo po 17 měsících k poklesu kolonizace lakovkou z >70% na cca 50%, lakovka byla stále dominujícím mykorhizním typem na kořenovém systému mykorhizních semenáčků. Dále je z práce patrné, že pozitivní efekt mykorhizní inokulace vytrval i po vysazení semenáčků, dokonce se rozdíl mezi inokulovanými na kontrolními semenáčky zvyšoval (výška inokulovaných semenáčků byla o 44% procent vyšší než neinokulovaných, viz dále). Pozitivní efekt inokulace semenáčků ve výše uvedené studii byl patrný i po osmi letech po vysazení semenáčků (Selosse et al. 2000), ačkoli se rozdíl mezi jednotlivými zásahy zmenšil. Zároveň bylo ve stejné studii prokázáno za pomoci molekulárních markerů, že inokulovaný kmen *L. bicolor* (S238N) vytrval po tuto dobu na lokalitě ve formě plodnic i mykorhiz. Stromky *Pseudotsuga menziesii* inokulované stejným kmenem *L. bicolor* ve Španělsku vykazovaly větší vzrůst i po pěti letech od vysazení do volné přírody (Pera et al. 1999). *Laccaria bicolor* byl jediný z inokulovaných druhů, který vytrval po pět let na kořenovém systému semenáčků vsazených na paseku (Gagné et al. 2006). *Amanita muscaria* introdukovaná do Austrálie persistovala na stanovišti po více než 30 let (Sawyer et al. 2001).

2.5.5. Koinokulace více druhů mykorhizních hub

Koinokulace semenáčků dvěma nebo více mykorhizními symbionty mají zpravidla silnější vliv na růstové charakteristiky než inokulace pouze jediného druhu (Reddy et Natarjan 1997). Různé druhy mají rozdílné enzymatické vybavení a způsob využívání prostoru (Agerer 2001), a tak vhodná kombinace zvyšuje diverzitu dostupných zdrojů živin a následný růst (Jonsson et al. 2001). Oproti tomu Kranabetter (2004) ukázal, že hybridní semenáčky smrku vykazovaly nejlepší růst pokud byly kolonizovány pouze jednoduchým a nevyrovnaným společenstvem mykorhizních hub. Autoři výše zmíněné studie spekulují, že v relativně homogenním prostředí není takový tlak na diferenciaci nik. Rovněž koinokulace arbuskulárních a ektomykorhizních hub měla u *Quercus agrifolia* negativní efekt na růstové charakteristiky semenáčků (Egerton-Warburton et Allen 2001).

Je však obtížné získat semenáčky kolonizované více druhy hub současně – Parladé et al. (1999) testoval široký rozsah koncentrací inokula *Laccaria bicolor* a *Rhizopogon* spp. Avšak množství semenáčků kolonizovaných oběma symbionty jen vzácně překročilo 25%.

2.6. Stručná charakteristika použitých dřevin

Dub letní (*Quercus robur*) je v současnosti v ČR druhou nejrozšířenější listnatou dřevinou. Původní těžiště rozšíření měl v lužních lesích a teplomilných doubravách, byl však široce vysazován v nižších polohách i mimo svá původní stanoviště. Semenáčky dubu klíčí hypogeicky, z děloh čerpá živiny pro tvorbu dosti mohutného křovitého hlavního kořenu, který umožňuje uchycení i na relativně suchých stanovištích (Úradníček 2004).

Buk lesní (*Fagus sylvatica*) je naší nejrozšířenější listnatou dřevinou. Původní těžiště se nachází v kolinním až submontánním stupni, vlivem působení člověka však dosti ustoupil. Semenáčky buku klíčí epigeicky, mají rovněž zpočátku vyvinutý křovitý kořen, který však nedosahuje takové mohutnosti jako u dubu. Oproti dubu, který je značně světlomilný, je buk schopný úspěšně zmlazovat i v zapojeném lesním porostu (Úradníček 2004).

Obě výše uvedené dřeviny vytvářejí ektomykorhizy (Wang et Qiu 2006, Harley et Harley 1987), u některých zástupců rodu *Quercus* byly nalezeny i arbuskulární mykorhizy (AM) (Egerton-Warburton et Allen 2001). Je však známo, že AM houby kolonizují i kořeny ECM rostlin, obvykle bez tvorby arbuskulů, i přesto však podobné asociace mohou být symbioticky účinné (Smith et al. 1998). Popis vývojových procesů kořenového systému a mykorhiz u *Fagus sylvatica* popisuje např. Wilson et Harvey (1983) a Clowes (1951). Vliv zdravotního stavu dubů na aktivitu mykorhiz se zabývala u nás Pešková (2005).

Kořenový systém u dubu i buku je v dospělosti tvořen krátce křovitým až srdcovitým hlavním kořenem. Mechanické funkce hlavního kořene přebírá systém kořenů postranních. Hrubé kořeny dubu zasahují do hlubších půdních horizontů (80% kořenů se nachází do hloubky 60cm – Rosengren et al. 2005) oproti kořenovému systému buku, který je mělký. Většina biomasy jemných kořenů obou dřevin se nachází ve svrchních organických a organominerálních horizontech a směrem hlouběji klesá. Rozdíly mezi oběma druhy ve vertikální distribuci jemných kořenů jsou nejasné - zatímco Leuschner et al. (2001) našli větší podíl jemných kořenů dubů blízko povrchu oproti buku, u kterého udávají jejich rovnoměrnější distribuci; Göransson et al (2006) popisují zcela opačný případ. Lze tedy předpokládat, že distribuce jemných kořenů se liší mezi stanovišti a může být ovlivněna i biotickou interakcí mezi dřevinami. Buk má ve srovnání s dubem výrazně menší poměr povrchové vůči podzemní biomase a je lepším kořenovým kompetitorem (Leuschner et al. 2001). Schopnost příjmu živin z různých půdních horizontů však nemusí vždy jednoduše korelovat s distribucí kořenů (Göransson et al 2006). Rozdíly v příjmu živin mezi půdními horizonty mohou souviset s vertikální distribucí mykorhizních hub (Rosling et al. 2003, Dickie et al. 2002), která se mezi horizonty liší, ale extraradikální mycelium mykorhizních

hub zhruba koreluje s vertikální distribucí kořenů dřevin (Wallander et al. 2004, Göransson et al 2006).

2.7. Stručná charakteristika použitých mykorrhizních hub

2.7.1 *Laccaria laccata*

2.7.1.1. Systematické postavení

Rod lakovka (*Laccaria*), dříve zařazovaný do čeledi *Tricholomataceae* (Singer 1986), se dnes podle poznatků moderní systematiky řadí do poměrně izolované čeledi *Hydnangiaceae* (Mueller et Ammirati 1993) v rámci moderně definovaného řádu *Agaricales* (Hibbett 2006). Pro svou snadnou kultivovatelnost jsou druhy rodu *Laccaria* oblíbenými modely pro výzkum ektomykorrhizní symbiosy (Kropp et Mueller 1999). Nejčastěji používanými modelovými druhy jsou *Laccaria laccata*, *L. amethystea* a *L. bicolor*. Taxonomická situace v rámci rodu je však poměrně nejednoznačná, v rámci druhu *L. laccata* byly párováním monosporických izolátů odhaleny intersterilní skupiny ukazující na přítomnost kryptických druhů (Fries 1983, Mueller 1991).

2.7.1.1. Ekologie

Druhy rodu *Laccaria* vytváří mykorrhizy se širokým spektrem hostitelů (Cainey et Chambers 1999). *Laccaria* je schopná účinně získávat fosfor *in vitro* (Bougher et al. 1990), na druhou stranu Thompson et al. (1994) ukázali, že ačkoliv je druh schopný vytvářet rozsáhlou síť extraradikálního mycelia, není příliš efektivní v přísunu fosforu k rostlině (srv. však Jones et al. 1990). Zástupci rodu *Laccaria* jsou schopni využívat široké spektrum aminokyselin (Ahmad et al. 1990), u rodu *Laccaria* však nebyla prokázána schopnost rozkládat proteiny *in vitro* (Finlay et al. 1992, Gebauer & Taylor 1999, Abuzinadah et Read 1986), ve shodě s preferencí pro minerální půdy a narušovaná stanoviště (Krop et Mueller 1999). Ruderálnímu charakteru odpovídá i malá citlivost na atmosférickou depozici dusíku (Lilleskov et al. 2001). Na druhou stranu Mucha et al. (2007) prokázal silnou proteázovou aktivitu, pravděpodobně související s fungicidními účinky.

Populační struktura u tohoto rodu byla sledována pomocí molekulárních markerů (Gherbi et al. 1999, Selosse et al. 2001, Fiore-Donno et Martin 2001). Výsledky ukazují, že pro tento rod jsou typické malé a krátkověké genety. To naznačuje, že se *Laccaria* spíše spoléhá na rekolonizaci substrátu pomocí vzduchem šířených spor oproti postupnému

vegetativnímu růstu v substrátu. Celkově se zástupci rodu *Laccaria* jeví jako typičtí představitelé r-strategie.

U rodu *Laccaria* byl pozorován mykoparazitický vztah *in vitro* vůči některým patogenním a saprotrofním houbám (Werner et al. 2002, 2003). *Laccaria* je schopná zvyšovat resistenci mykorhizních rostlin vůči napadení houbovými patogeny (Sinclair et al. 1975).

2.7.1.2. Mykorhizy

Podrobný popis mykorhizy u druhu *Laccaria laccata* mi není znám (pravděpodobně v souvislosti s nedořešenou taxonomií), v literatuře jsou sporadicky roztroušeny neúplné a zkratkovité popisy, nicméně u jiných druhů rodu již byly podrobné popisy publikovány (Ingleby et al. 1990, Cuvellier 1991, Weiss 1991, Agerer 1987-2002). Mykorhizy u rodu *Laccaria* bývají označovány jako *medium-distance exploration type* (Agerer 2001), tj. s rhizomorfami, které jsou schopné využívat zdroje na středně dlouhou vzdálenost. Struktura pláště u mykorhiz *Laccaria laccata* je jednoduché plektenchymatické stavby (typ B podle Agerer 1991), rhizomorfy nevykazují žádnou strukturní diferenciaci, ale jsou relativně kompaktní (typ B podle Agerer 1991). Právě přítomnost rhizomorf odlišuje mykorhizy u rodu *Laccaria* od těch u druhého testovaného rodu *Russula*, které je postrádají. Podle klasifikace Heijden et Kuyper (2001) lze rod *Laccaria* zařadit k *root-replacement* strategii, kdy je růst kořínků posledního řádu zastaven a kolem kořínku se vytváří silný plášť. V takových případech je příjem živin tímto kořínkem plně závislý na aktivitě houby.

2.7.1.3. Použití k inokulaci semenáčků

Rod *Laccaria* byl mnohokrát použit pro inokulace v kontrolovaných podmínkách (Lu et al. 1998, Rincón et al. 2001, Mason et al. 2000) i v lesních školcích (Villeneuve et al. 1991). *Laccaria* většinou vytvářela hojné mykorhizy (Molina 1982, Mason et al. 2000, Lu et al. 1998), v některých případech však kolonizace nedosahovala 50% (Lu et al. 1998, Rincón et al. 2001). Pozitivní efekt na růst se projevil pouze v některých studiích (např. Lu et al. 1998). *Laccaria* se ukázala být nejúspěšnějším z r-stratégů, když byla použita pro inokulace semenáčků blahovičníků v lesních školcích (Brundrett 2005).

2.7.2. *Russula ochroleuca*

2.7.2.1. Systematická pozice

Rod holubinka (*Russula*) je široce rozšířeným rodem mykorhizních hub. V současné době je systematicky řazen v rámci stopkovýtrusých hub do samostatného řádu *Russulales* (Hibbet 2006), spolu s rovněž mykorhizním rodem *Lactarius* do tradičně vymezované čeledě *Russulaceae* (Singer 1986).

2.7.2.2. Ekologie

Russula ochroleuca je běžným druhem listnatých, smíšených i listnatých lesů mírného pásu, bez výrazné preference hostitele (Breitenbach & Kranzlin 2005), vytváří mykorhizy s většinou ECM dřevin včetně dubu a buku (van Driessche et Piérart 1995) do sekce *Intergrae* a podsekce *Fellinae* (Romagnesi 1996).

Tento druh preferuje kyselé půdy s bohatou vrstvou humusu typu mor (Tyler 1984). Životaschopnost mykorhiz *Russula ochroleuca* není příliš omezena, ani acidifikací substrátu v důsledku kyselých dešťů (Quian et al. 1998). Druhy rodu *Russula* patří spíše k druhům označovaným jako *late-* nebo *multi-stage* fungi (Smith et Read 1997, Molina et al. 1992).

U druhů rodu *Russula* byly nalezeny spíše menší genety, řádově jednotky metrů v průměru (Redecker et al. 2001, Bergemann et Miller 2002). Bergemann et Miller (2002) ukázali, že genetická struktura populací *Russula brevipes* naznačuje, že rekolonizace substrátu pomocí bazidiospor je poměrně běžná, nicméně rovněž pozorovali i určitý potenciál pro vegetativní šíření myceliem v půdě na delší vzdálenosti. Jednotlivé genety u tohoto druhu se zdají být dosti dlouhověké (některé pozorovány po dobu celé výše uvedené studie, tj. 11 let.).

2.7.2.3. Mykorhizy

Mykorhizy *Russula ochroleuca* byly již v literatuře popsány (Cuvellier 1991, Agerer 1987-2002). Mykorhizy u rodu *Russula* jsou popisovány jako tzv. *contact exploration type* (Agerer 2001), tedy jako typ bez diferencovaných rhizomorf s těsným kontaktem se substrátem. Struktura pláště je pseudoparenchymatická (typ O podle Agerer 1991). Vzhledem k struktuře pláště lze i tento druh přiřadit k *root-replacement* strategii (Heijden et Kuyper 2001).

2.7.2.4 Použití k inokulaci semenáčků

Není mi známa žádná práce, která by se zabývala inokulací tohoto druhu. I v rámci rodu jsou literární údaje jen sporadické (Martinez-Amorez et al. 1991), příčinou je pravděpodobně nesnadná kultivovatelnost.

3. Metodika

3.1. Izolace mykorrhizních hub a použité izoláty

Jednotlivé kmeny mykorrhizních hub jsem izoloval z výtrusného prachu. Plodnice pro izolaci výtrusného prachu jsem sbíral v okolí Hluboké nad Vltavou na podzim 2005 (dokladové položky uloženy v osobní herbáři). Výtrusný prach jsem nechal vypadat přes noc na sterilní Petriho misku. Spory z výtrusného prachu jsem poté přenesl na Petriho misky s Maltózovým agarem a nechal vyklíčit. Po 4 týdnech kultivace jsem vybral nekontaminované misky a přeočkoval na MNM agar, na kterém byly izoláty za pravidelného přeočkovávání uchovávány. Identita izolátů byla potvrzena pomocí molekulárních metod (sekvenace ITS)(Kavková, ústní sdělení). Pro další pokusy jsem vybral druhy lakovka laková (*Laccaria laccata*) a holubinka hlínožlutá (*Russula ochroleuca*), od každého druhu izolát sbíraný v asociaci s bukem a dubem jako symbiotickým partnerem. (označení izolátů: *R. ochroleuca* z dubu (ROQ) a z buku (ROF), *L. laccata* z dubu (LLQ) a buku (LLF)).

3.2. Původ a příprava osiva

Pro pokusy v první sezoně (2006) jsem použil osivo dubu původem z uznaných semenných porostů v Poněšické oboře, sbíraných na podzim 2005. Osivo jsem nechal stratifikovat při 2°C po dobu tří měsíců. Žaludy jsem vysazoval do pokusu po prvních známkách klíčení (duben 2006).

Pro pokusy v druhé sezoně jsem použil osivo dubu a buku sbírané vždy pod jediným soliterním stromem za účelem omezení genetické variability osiva (*Quercus robur*, cca 500m SV od Holubova, okr. české Budějovice, *Fagus sylvatica*, Krasetín, JV okraj obce, okr. České Budějovice). Osivo jsem ošetřil preparátem Dithane DG Neotec (Dow Agrosiences s.r.o, 20g/10kg) a poté stratifikoval při 2°C po dobu tří měsíců. Protože původní osivo buku bylo napadeno v průběhu stratifikace houbovým patogenem, byl jsem nucen na jaře 2007, shromáždit novou dávku osiva. Nepodařilo se mi již zajistit osivo z jednoho rodičovského stromu, použil jsem proto směs původem z více rodičovských stromů (porost *Fagus sylvatica*, 1.5km ZJZ od obce Stará Vráž, okr. Písek). Osivo jsem poté nechal naklíčit ve sterilizovaném písku. Semenáčky obou druhů jsem vysadil v květnu 2007, ve stejnou dobu, cca 5 týdnů po vyklíčení dubu a 2 týdny po vyklíčení buku.

3.3. Příprava inokula

3.3.1. Myceliální suspenze

Při přípravě inokula ve formě myceliální suspenze jsem postupoval podle metodiky Parladé et al. (2004), použil jsem izoláty LLQ, LLF, ROQ a ROF. Kultury jsem přeočkoval na Petriho misky s pevným MNM médiem a kultivoval po 6 týdnů při 20°C. Poté jsem opatrně stáhnul z povrchu misek narostlé mycelium a zvážil. Mycelium jsem poté rozmixoval v 1% roztoku glukózy (100mg živé váhy mycelia na 1ml inokula). Mezi přípravou inokula různých kmenů jsem veškeré náčiní ošteřil 96% ethanolem.

3.3.2. Vegetativní inokulum

Při přípravě vegetativního inokula jsem postupoval podle modifikované metodiky Honig et al. (2000), použil jsem izoláty LLQ, LLF a ROQ. Inokulum jsem připravil v plastových pytlích s Hepa-filtrem (Fisher Scientific), s teplem sterilizovanou (120°C, 2h.) směsí Rašelina/Perlit (1:2) zvlhčené Hagemovým médiem (Honig et al. 2000). Pytle jsem poté inokuloval výřezy mycelia z okrajů aktivně rostoucí kolonie na pevném substrátu. Pytle jsem zatavil a nechal růst mycelium v temnotě při 20°C po dobu dvou měsíců. Před inokulací jsem přebytečné médium odfiltroval přes filtrační papír.

3.4. Vyhodnocení pokusů

Následující postupy jsou společné pro více pokusů, případné odchylky jsou popsány v metodice jednotlivých pokusů.

3.4.1. Růstové charakteristiky

U sklizených semenáčků jsem měřil jejich výšku, průměr kmínku (1cm nad kořenovým krčkem, posuvné měřidlo, přesnost 0.1mm) a počet listů delších než 1cm. Výšku jsem měřil jako vzdálenost od kořenového krčku k nejvzdálenějšímu živému apikálnímu pupenu (Dey et Parker 1997), posuvným měřidlem s přesností 1mm. V případě úhynu apikálního vrcholu byla měřena vzdálenost k nejdelší laterální větvi. Nadzemní část semenáčků jsem rozdělil na listy, kmínek a kořeny a usušil do konstantní hmotnosti při 75°C po dobu 24 hodin. Před samotným vážením (přesnost 0.01g) jsem biomasu semenáčků znovu přesušil při 75°C po dobu 12 hodin.

3.4.2. Mykorhizní kolonizace

Kořenový systém sklizených semenáčků jsem jemně promyl pod tekoucí vodou. Mykorhizní kolonizaci kořenů jsem vyhodnocoval pod binokulární lupou modifikovanou metodou podle Rincón et al. (2001). Kořenový systém každého semenáčku jsem rozdělil na fragmenty o délce cca 2cm, v Petriho misce jsem fragmenty důkladně promísil a poté jsem se snažil náhodně vybrat minimálně 50 fragmentů na jeden semenáček (u rozsáhlého kořenového systému pak 70-100), v případě, že celkový počet fragmentů byl menší, pak jsem vyhodnocoval celý kořenový systém. Pro stanovení mykorhizní kolonizace jsem používal pouze fragmenty s více než třemi špičkami, zlomené kořenové špičky jsem nepočítal. Mykorhizní kolonizaci pro jednotlivé mykorhizní morfotypy jsem stanovoval jako poměr počtu kořenových špiček kolonizovaných vůči celkovému počtu špiček pro každý semenáček zvlášť.

Z mykorhizní kolonizace jsem pro jednotlivé zásahy a jednotlivé dominantní morfotypy vypočítal obdobu Pt indexu (Vzorec 1, Cordell et Marx 1994), který v sobě integruje míru kolonizace s podílem kolonizovaných semenáčků.

$$Pt\ index = \frac{kol(M) \times n(M)}{kol(Tot)}$$

Vzorec 1: kol(M) - průměrná míra kolonizace semenáčků morfotypem M v zásahu, n(M) - podíl semenáčků kolonizovaných morfotypem M, kol(Tot) - průměrná celková míra kolonizace semenáčků v zásahu.

V případě nejistoty o mykorhizním statusu kořínku jsem vyhotovoval roztlakové preparáty kořínku v kotonové modři (Ingleby et al. 1990), pokud to technické možnosti dovolovaly.

Mykorhizní morfotypy jsem popsal vybranými morfologickými charakteristikami podle Agerer (1987-2002), pořídil jejich fotografickou dokumentaci (Olympus BX-41, Olympus C-5060, QuickPhotoCamera 2.1) a malý reprezentativní vzorek (cca 20 špiček), jsem fixoval (2.5% roztok glutaraldehydu, pH 5.6) pro další anatomická pozorování a uchovával v temnotě při cca 2°C.

3.5. Anatomická srovnání mykorhiz různých kmenů

Pro popis anatomicko-morfologických rozdílů mezi mykorhizami různých inokulovaných kmenů stejného druhu jsem použil mykorhizy izolované z Pokusu 2. Měřené charakteristiky jsou shrnuty v Příloze 4. Pro anatomická pozorování jsem vybíral mykorhizy zjevně vitální, s dostatečně vyvinutým pláštěm a bez známek senescence (ztráta turgidity, volný plášť). Anatomické znaky mykorhiz jsem pozoroval pod mikroskopem (BX-41) při

1000x zvětšení, s přesností měření na 1 μ m. Preparáty jsem barvil v kotonové modři v laktofenolu (Ingleby et al. 1990).

Preparáty příčných řezů mykorhizních kořenů jsem připravil ručními řezy žiletkou v bezové duši. Pro příčné řezy jsem vybíral pouze kořínky primární osy. Příčné řezy jsem vedl s důrazem na to, aby řez byl veden ve střední části, zhruba ve stejné úrovni u všech kořínků (tj. mimo kořenovou špičku a proximální senescentní část). Pro měření jsem použil 2-3 příčné řezy z 5 různých kořínků.

Preparáty svrchního pohledu na plášť jsem připravil opatrným seříznutím mykrohizního pláště špičkou jehly.

Data jsem analyzoval pomocí mnohorozměrných metod (Canoco for Windows 4.5). Nejdříve jsem se snažil nalézt gradient v datech pomocí metody PCA (analýza hlavních komponent) a poté nalézt rozdíl mezi skupinami pomocí metody LDA (lineární diskriminační analýza) (Lepš et Šmilauer 2003). Anatomické charakteristiky pro zahrnutí do LDA jsem vybíral postupným výběrem (*forward selection*), kritériem pro výběr bylo dosažení hladiny významnosti $p=0.05$ (Monte-Carlo permutační test při 999 permutacích). Data pro mnohorozměrné metody jsem logaritmičtě transformoval.

3.6. Fruktifikace

Srovnával jsem růstové charakteristiky a mykorhizní kolonizaci semenáčků, u kterých jsem pozoroval fruktifikaci *Laccaria laccata* se semenáčky, které byly kolonizované *Laccaria laacata*, avšak fruktifikace u nich nebyla pozorována. Pro porovnání jsem použil jednocestnou analýzu variance (ANOVA) pro růstové charakteristiky a Kruskal-Wallisův test pro mykorhizní kolonizaci. K tomu, abych zjistil, která charakteristika nejlépe předpovídá fruktifikaci, jsem použil postupný výběr (*forward selection*) s růstovými charakteristikami a mykorhizní kolonizací jako vysvětlujícími proměnnými a výskytem fruktifikace jako vysvětlovanou proměnnou. Jako metodu jsem použil zobecněných lineárních modelů (R 2.4.1), kdy jsem předpokládal Bernoulliho distribuci reziduálů. Jako kritérium pro přidání vysvětlující proměnné do modelu jsem užil kritérium dosažení hladiny významnosti 0.05 (*Chi-square* test). V případě, kdy přidání více proměnných by zvýšilo kvalitu modelu, jsem vybral tu s nejvyšší hodnotou testovacího kritéria.

3.7. Použitá nomenklatura

Nomenklatura a vymezení taxonů odpovídá následující literatuře: stopkovýtrusé houby - Horak (2005), Julich (1984), vřeckaté houby - Hansen et Knudsen (2000), cévnaté rostliny - Kubát et al. (2002).

3.8. Pokus 1

Tento pokus jsem navrhnul ke zjištění efektu současné koinokulace dvou druhů s rozdílnou ekologickou strategií na růst semenáčku a zodpovězení otázky, jak se projeví interakce mezi těmito druhy na míře kolonizace kořenového systému.

V prvním pokusu jsem inokuloval semenáčky dubu 15ml myceliální suspenze, po deset dnů po přesazení do 2l lesnických kontejnerů (Silvaco QP6T/20) se šesti buňkami. Před a po inokulaci jsem rostliny důkladně zalil a po inokulaci překryl povrch substrátu vrstvou písku, abych zabránil přeschnutí substrátu. Jako substrát jsem použil obvyklou školkařskou směs (rašelina, písek, perlit, mletý dolomitický vápenec - poměr 5:2:1:0.25), sterilizovanou vysokou teplotou (140°C po dobu 3h). Pro inokulaci jsem použil kmeny ROQ a LLQ v následujícím uspořádání: LLQ samotná, ROQ samotná, koinokulace LOQ+ROQ a neinokulovaná kontrola. Od každého zásahu jsem měl 12 replikací (celkem 48 semenáčků). Kontejnery byly uspořádány ve dvou řadách po čtyřech kontejnerech, uspořádání pokusu na jeho počátku je v Příloze 2, pozici každého kontejneru jsem poté v pravidelných týdenních intervalech náhodně měnil. Rostliny jsem pěstoval od června 2006 v nevytápěném skleníku po dobu 18 týdnů (do listopadu 2006). Další zpracování semenáčků bylo stejné jako u předchozího experimentu. Pro zabránění rozvoje padlí dubového jsem ošetřil semenáčky preparátem NEEM Oil (olej z *Azadirachta indica*, Thermotrilogy, US), účinným prostředkem pro kontrolu tohoto parazita (Soukup 2005).

Pokud by se mezi mykorhizními houbami projevovala negativní interakce, pak by množství semenáčků kolonizovaných oběmi houbami bylo nižší než předpokládané při jejich volné kombinovatelnosti. Narušení tohoto předpokladu jsem testoval *Chi-square* testem.

Vliv zásahu na míru mykorhizní kolonizace jsem hodnotil neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem. Ke statistickému vyhodnocení vlivu zásahu na růstové charakteristiky jsem použil jednocestnou analýzu variance (ANOVA), protože počty semenáčků na konci experimentu nebyly vyrovnané, bylo třeba Tukey test provést s korekcí pro nestejně velké skupiny.

Korelaci mezi růstovými charakteristikami a mírou kolonizace jednotlivými morfotypy jsem hodnotil pomocí zobecněných lineárních modelů (GLM). Jako vysvětlující proměnou jsem použil míru mykorhizace vybraným dominantním morfotypem, souhrnou kolonizaci ostatními morfotypy jsem použil jako kovariátu. O přijetí proměnné do modelu jsem rozhodoval na základě hodnocení parsimonie modelu (AIC). U proměnné počtu listů jsem při hodnocení GLM předpokládal Poissonovu distribuci, u ostatních Gamma distribuci s logaritmickou *link* funkcí. Ze statistického hodnocení metodami GLM jsem vypustil nekolonizované semenáčky.

3.9. Pokus 2

Tento pokus jsem navrhnul za účelem zjištění vlivu kmenů LLQ, LLF, ROQ, ROF na růst semenáčků dubu a zároveň srovnání úspěšnosti kolonizace jednotlivých kmenů v prostředí s konkurencí přirozeně se vyskytujících se druhů.

Naklíčené žaludy dubu jsem vysel na jaře 2006 (duben) do hloubky 2-3 cm do stejných kontejnerů a substrátu jako v Pokusu 1. Před inokulací jsem proředit semenáčky na jeden semenáček na buňku. Semenáčky jsem inokuloval 10ml inokula (červen 2006, cca 4 týdny od vyklíčení), stejným způsobem, jako v pokusu 1. Pro pokus jsem použil 72 semenáčků, inokulovaných kmeny: LLQ (15 semenáčků), LLF (14 s.), ROQ (14 s.), ROF (14 s.) a neinokulovaná kontrola (15 s.). Semenáčky jsem po dobu 18 týdnů pěstoval na pozemku katedry botaniky pod otevřeným nebem. Pokus jsem sklídl v listopadu 2006. Data získaná z tohoto pokusu jsem použil pro vyhodnocení vlivu růstových charakteristik na fruktifikaci inokulovaných hub a analýzu morfotypů (viz výše).

V průběhu vyhodnocování pokusu č. 2 jsem u 30 ze 70 (42.8%) semenáčků hodnotil, mimo celkové kolonizace, i vertikální distribuci jednotlivých morfotypů: kořenový systém jsem před stanovením mykorhizní kolonizace rozdělil cca 5cm od kořenového krčku podél hlavního kořene na dvě části - svrchní a spodní. Kořenový systém obou částí jsem rozdělil na 2cm fragmenty, jak je již popsáno výše. Pro obě části jsem samostatně hodnotil přítomnost jednotlivých morfotypů na 25 kořenových fragmentech. Po jejich zhodnocení jsem obě části smísl a postupoval v hodnocení mykorhizní kolonizace stejně jako uvedeno výše. Rozdíly v zastoupení jednotlivých morfotypů jakož i celkový počet mykorhizních špiček mezi oběma částmi kořenového systému jsem vyhodnocoval Wilcoxonovým párovým testem.

Při vyhodnocování růstových charakteristik bohužel nebylo možno u všech semenáčků zvážit biomasu listů, protože v době sklizení pokusu sněhová bouře odvála většinu listů, tato

měřená veličina byla proto k dispozici pouze u 42 (60%) semenáčků. Z tohoto důvodu je poměr nadzemní a podzemní biomasy (S:R) vypočítán pouze jako poměr mezi sušinou kmínku a kořenů a takto je používán v následujících statistických analýzách.

Statistické vyhodnocení růstových parametrů jsem provedl stejnými metodami jako v předchozím pokusu.

3.10. Pokus 3

Cílem pokusu bylo přímým pozorováním sledovat interakci mezi druhy koinokulovanými v Pokusu 1 a poskytnout tak argumentační podklad pro diskusi výsledků výše zmíněného pokusu. Cílem pokusu bylo rovněž otestovat použitou metodiku pro další použití.

Pro třetí experiment jsem sestrojil rhizoboxy pro přímé sledování mykorhizní infekce a interakce mykorhizních hub mezi sebou (Wu et al. 1999). Rhizoboxy měly rozměr 25(výška)x50(šířka)x3(hloubka)cm. Pro zabránění přístupu světla jsem boční stěny rhizoboxů zakryl hliníkovou fólií, kterou jsem odstraňoval pouze při kontrole postupu mykorhizace. Do rhizoboxů jsem vysadil, do stejného substrátu jako v prvním pokusu, po čtyřech semenáčcích dubu, o výšce cca 5cm (dbal jsem o to aby v rámci jednoho rhizoboxu byly semenáčky co nejjednodušší), předpěstovaných ve sterilizovaném písku. Krajiní semenáčky se nacházely 6.5cm od okraje rhizoboxu, mezi semenáčky byly rozestupy 12.5cm. Pokusné rostliny jsem pěstoval v klimaboxu, při 18°C a 12h světelném režimu. Po 5 týdnech po vysazení jsem semenáčky inokuloval myceliální suspenzí izolátů LLQ a ROQ (stejná dávka inokula jako v experimentu 2) do kořenového systému krajiní semenáčků, vždy dva různé izoláty na opačných koncích rhizoboxů.

Původním záměrem bylo rozdělit stěnu rhizoboxu pravidelnou čtvercovou sítí a sledovat v pravidelných intervalech postup mycelia v půdě a mykorhizní kolonizaci semenáčků, protože však k vytvoření mykorhiz nedošlo, od sledování tohoto experimentu jsem dále upustil a semenáčky uplatnil v následujících experimentech (Pokus 5)

3.11. Pokus 4

Tento pokus jsem navrhnul za cílem určení rozdílů v kolonizační schopnosti izolátů LLF a LLF u dvou druhů hostitelských semenáčků (dub a buk) a zjištění do jaké míry je tento rozdíl kompenzován objemem inokula.

Semena jsem nechal vyklíčit v klimaboxu (12h světla, 18°C). V červnu 2007 (tj. cca 6 týdnů po vyklíčení dubu, 4 týdnů po vyklíčení buku) jsem je přesadil do lesnických kontejnerů (viz výše). Před vysazením jsem u každého jednotlivého semenáčku jsem proměřil výšku semenáčku, počet listů a průměr kořenového krčku, u semenáčků dubu jsem navíc změřil délku a šířku děloh. Vypočítal jsem objem děloh jako součin délky děloh a druhé mocniny jejich šířky. Substrát byl stejný jako v předchozích pokusech. Celkem jsem vysadil 210 semenáčků (105 dubů a 105 buku). Protože krátce po přesazení došlo k náhlé mortalitě semenáčků buku vlivem houbové infekce kořenů nahradil jsem ve 20 kontejnerech (45.1%; tj. 60 semenáčků) uvolněná místa semenáčky dubů. Konečný poměr semenáčků buku a dubu byl: 165 dubů a 45 buku.

Použil jsem dvě úrovně zásahů v kompletním faktoriálním designu (Příloha 2). První zásah představovala inokulovaný izolát mykorrhizní houby (LLF, LLQ). Druhá úroveň zásahu bylo množství inokula. Pro inokulaci semenáčků jsem použil tři různé objemy vegetativního inokula (viz výše): 40, 80 a 160ml (objem inokula: objem substrátu -1:50, 1:25, 1:12.5). Posledním zásahem byla neinokulovaná kontrola.

Semenáčky jsem inokuloval dva týdny po vysazení. Abych zamezil vlivu přidaných živin z inokula, ke každému zásahu jsem navíc přidal nevysterlizovanou směs Perlitu s rašelinou (1:1) zvlhčenou Hagemsovým médiem v takovém objemu, aby dorovnal rozdíl vůči nejvyšší dávce aplikovaného inokula. Pokus jsem pěstoval ve venkovních podmínkách, na pozemcích ústavů AV, na lokalitě částečně zastíněné okolní vegetací před přímým slunečním svitem. Růst semenáčků jsem pravidelně kontroloval a odstraňoval plevel. Po 20 týdnech (konec října 2007) jsem pokus sklídl a semenáčky zpracoval výše uvedenými metodami.

Vliv zásahu na přežívání semenáčků, stejně jako na přítomnost jednotlivých mykorrhizních morfortypů jsem hodnotil Chi-square testem. Vliv zásahu na růstové charakteristiky jsem hodnotil analýzou kovariance, jako kovariáty jsem použil charakteristiky naměřené na začátku pokusu (výška semenáčku, průměr kmínku, počet listů, objem děloh).

3.12. Pokus 5

Tento pokus jsem navrhnul za cílem zjištění, zda se liší kolonizační schopnost *Russula ochroleuca* jako *late-stage* houby mezi semenáčky různého věku.

Pro pokus jsem použil 18 semenáčků. Substrát a pěstební podmínky byly shodné s Pokusem 4. Použil jsem dva pokusné zásahy v kompletním faktoriálním designu. Prvním

zásahem bylo stáří semenáčku (semenáčky vysazené 2006 a 2007), druhým typ inokula (ROQ, neinokulovaná kontrola). Jako semenáčky z r. 2006 jsem použil nekolonizované semenáčky z Pokusu 3. Semenáčky jsem inokuloval vegetativním inokulem v množství 80 ml/semenáček (1:25), kontrolní semenáčky stejným množstvím nesterilizované směsí Perlitu a rašeliny zvlhčené Hagemsovým médiem. Design experimentu je vyobrazen v Příloze 2. Čas inokulace, následná manipulace a doba sklizení experimentu jsou shodné s Pokusem 4.

Vliv zásahu (stáří semenáčku a inokulace *Russula ochroleuca*) na míru kolonizace jsem testoval Kruskal-Wallisovým testem.

4. Výsledky

4.1. Pokus 1

4.1.1. Přežívání semenáčků

Po jednom náhodně vybraném semenáčku ze zásahů LL, RO a LL+RO jsem sklídl o 6 týdnů dříve, konečný počet analyzovaných semenáčků v době sklizně byl 45. Většina semenáčků však byla poměrně záhy silně napadena padlím dubovým (*Microsphaera alphitoides*), po opakovaném ošetření přípravkem NEEM vykazovaly nově vyvinuté listy méně rozsáhlou, avšak stále zřetelnou infekci. I přesto byly semenáčky v průměru větší a s vyšší biomasou oproti Pokusu 2 v roce 2006. V části kontejnerů došlo krátce po přesazení k rozvoji blíže neurčených oportunních saprotrofních mikromycetů na povrchu substrátu, jejich vliv na růst semenáčků nebyl pozorován.

4.1.2. Mykorhizní kolonizace

U tří předčasně sklizených semenáčků jsem nepozoroval vyvinuté mykorhizy.

Mykorhizy jsem našel u 29 z 45 (64.4%) hodnocených semenáčků, průměrný podíl kolonizovaných špiček u mykorhizních semenáčků byl 15.9%, maximální pak 47.2%.

U semenáčků jsem našel tři mykorhizní morfotypy (Tab. TR1), u jednotlivých semenáčků jsem pozoroval 0 až 2 morfotypy současně, průměrný počet pozorovaných morfotypů vztažený na jeden semenáček : 0.73 morfotypu. Identifikované mykorhizní morfotypy: *Thelephora terrestris* (M3)(průměrná kolonizace 14.39%, max. 47.2%), *Laccaria laccata* (M5)(průměrná kolonizace 14.6%, max. 34.3%)(Tab. TR2). Dále jsem pozoroval jeden neidentifikovaný morfotyp (M2)(pouze 4 špičky u jednoho semenáčku). Morfotyp odpovídající druhu *Russula ochroleuca* jsem nepozoroval.

Podíl semenáčků, kolonizovaných oběma dominantními morfotypy zároveň, byl nižší oproti hodnotám očekávaným při splnění předpokladu o jejich volné kombinovatelnosti, statisticky však není rozdíl průkazný ($\text{Chi-square}(3)=4.53$; $p=0.21$)(Obr. R1).

Laccaria laccata kolonizovala v omezené míře i semenáčky zásahů, kde nebyla inokulována. Nenalezl jsem statisticky průkazný vliv zásahu na míru kolonizace *Laccaria laccata* ($H_{(3,41)}=3.04$, $p=0.39$), *Thelephora terrestris* ($H_{(3,41)}=1.59$; $p=0.66$), ani na celkovou míru kolonizace ($H_{(3,41)}=2.04$; $p=0.56$). (obr. P1.1a (Příloha 1)).

	<i>Thelephora</i>	<i>Laccaria</i>	M2	Celkem
K	5	3	0	12
%	41.67	25	0	66.67
RO	7	1	1	11
%	63.64	9.09	9.09	63.64
LL	6	3	0	11
%	54.55	27.27	0.00	72.73
RO+LL	3	4	0	11
%	27.27	36.36	0.00	63.64
Celkem	21	11	1	45
%	46.67	24.44	2.22	64.44

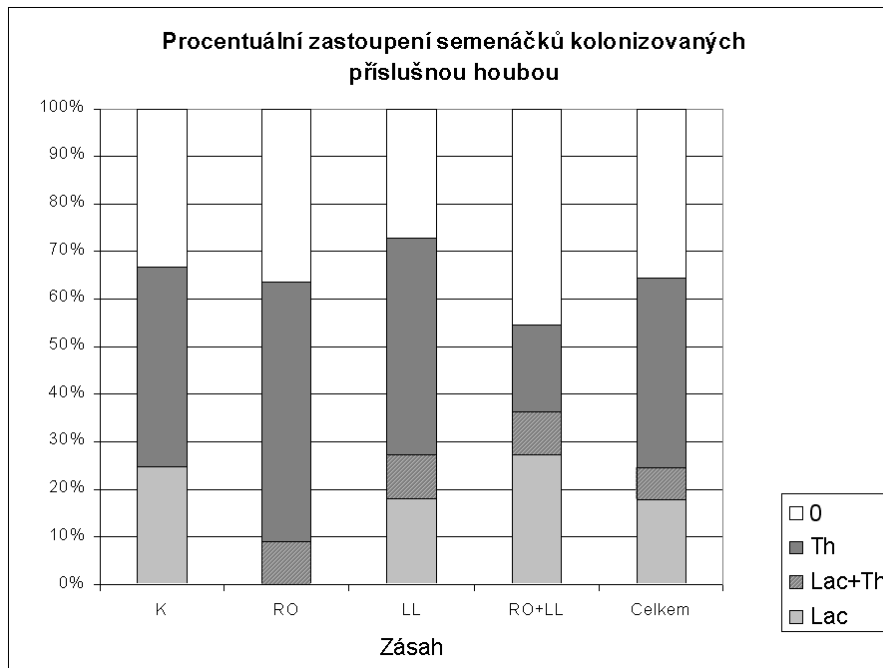
Tab. TR1: Počty a podíly semenáčků kolonizovaných jednotlivými mykorhizními morfofotypy v Pokusu 1

	<i>Laccaria</i> [%]	<i>Thelephora</i> [%]	Celkem [%]
K	2.83	6.30	9.12
SD	8.06	10.24	11.44
RO	0.55	6.45	7.00
SD	1.84	11.99	12.49
LL	3.26	9.21	12.47
SD	5.83	14.82	13.85
RO+LL	7.65	4.95	12.61
SD	11.73	10.04	13.30
Celkem	3.56	6.72	10.28
SD	7.91	11.58	12.55

Tab. TR2: Míra mykorhizace u morfofotopů, které se vyskytovaly u více než jednoho semenáčku, vyjádřená podílem kolonizovaných kořenových špiček v Pokusu 1. První řádek u jednotlivého zásahu označuje míru mykorhizace, druhý její směrodatnou odchylku.

	LL index	TT index
K	7,74	28,76
RO	0,72	58,60
LL	7,14	40,27
RO+LL	22,08	10,72
Celkem	8,46	30,51

Tab. TR3: LL a TT index pro jednotlivé zásahy v Pokusu 1



Obr. R1: Procentuální zastoupení semenáčků kolonizovaných příslušným dominantním morfotypem pro jednotlivé zásahy v Pokusu 1 (Th - *Thelephora terrestris*, Lac - *Laccaria laccata*, Lac+Th - oba morfotypy, 0 - mykorhizy nenalezeny).

4.1.3. Růstové charakteristiky

Zásah neměl průkazný vliv na žádnou z růstových charakteristik: výška ($F_{(3,41)}=0.53$; $p=0.67$), průměr kmínku ($F_{(3,41)}=0.86$); $p=0.47$), počet listů ($F_{(3,41)}=0.61$; $p=0.61$), sušina listů ($F_{(3,41)}=0.42$; $p=0.74$), sušina kmínku ($F_{(3,41)}=1.01$); $p=0.40$), sušina kořenů ($F_{(3,41)}=0.18$; $p=0.91$) celková biomasa ($F_{(3,41)}=0.70$; $p=0.56$) a poměr nadzemní a podzemní biomasy ($F_{(3,41)}=0.96$; $p=0.42$) (Tab. TP1.1, TP1.2, obr. P1.1 (Příloha 1)).

Míra mykorhizní kolonizace ani jednoho z obou dominantních mykorhizních morfotypů nesnížila AIC oproti nulovému modelu zahrnujícímu pouze kovariátu ani u jedné růstové charakteristiky. (Tab. TP1.3, Obr. P1.7 (Příloha 1)).

4.1.4. Fruktifikace

V průběhu posledních tří týdnů před sklizní jsem ve dvou kontejnerech pozoroval fruktifikaci *Laccaria laccata* (zásahy: 1x LL, 1x LL+RO) a jednu plodnici *Thelephora terrestris* (zásah LL). Počet opakování neumožňuje statistické zhodnocení.

4.2. Pokus 2

4.2.1. Přežívání semenáčků

Z vysazených 72 semenáčků jsem na konci experimentu sklídlil 70 (97.2%), dva semenáčky uhynuly (1x ROF, 1x LLF). Na uhynulých žaludech jsem pozoroval v druhé polovině léta stopkatá apothecia *Hymenoscyphus fructigenus*. Listy semenáčků byly napadeny padlím dubovým, ve srovnání s Pokusem 1 však napadení nebylo příliš intenzivní.

V pěti kontejnerech jsem cca 2 týdny před sklizní našel plodnice *Laccaria laccata* (zásahy: 3xLLQ, 1xLLF, 1xK)(viz 4.2.4), plodnice jiných druhů jsem nepozoroval.

4.2.2. Mykorhizní kolonizace

Mykorhizy jsem našel u 57 z 70 (81.4%) hodnocených semenáčků. Průměrný podíl kolonizovaných špiček u mykorhizních semenáčků bylo 11.5%, maximální pak 43.0%.

U semenáčků jsem našel celkem osm mykorhizních morfotypů (Tab. TR4), u jednotlivých semenáčků jsem pozoroval 0 až 3 různých morfotypů současně, průměrný počet pozorovaných morfotypů vztažený na jeden semenáček: 1.14 morfotypu. Identifikované mykorhizní morfotypy: *Thelephora terrestris* (M1, M3, M6)(průměrná kolonizace 9.5%, max. 42.6%), *Laccaria laccata* (M5)(pr. 7.8%, max. 27.5%), *Coenococcum geophilum* (M4)(Tab. TR5). Dále jsem pozoroval tři neidentifikované morfotypy (M2, M7, M8), tyto morfotypy se nikdy nevyskytovaly u více než jednoho semenáčku a nedosahovaly ani 1% míry kolonizace u jednotlivých semenáčků. Morfotyp odpovídající *Russula ochroleuca* jsem nepozoroval.

Podíl semenáčků, kolonizovaných oběma dominantními morfotypy zároveň, byl nižší oproti hodnotám očekávaným při splnění předpokladu o jejich volné kombinovatelnosti, statisticky však není rozdíl průkazný ($\text{Chi-square}_{(3)}=2.55$; $p=0.47$)(Obr. R2).

Laccaria laccata kolonizovala v omezené míře i semenáčky zásahů, kde nebyla inokulována. Vliv zásahu na kolonizaci *Laccaria laccata* byl statisticky průkazný ($H_{(4,65)}=39.37$, $p<10^{-6}$, Obr. P1.2a (Příloha 1)), průkazný rozdíl byl mezi zásahem LLQ, který vykazoval nejvyšší míru kolonizace a všemi ostatními zásahy. Zásah neměl statisticky průkazný vliv na míru kolonizace *Thelephora terrestris* ($H_{(4,65)}=6.51$, $p=0.164$) a *Coenococcum geophilum* ($H_{(4,65)}=1.83$, $p=0.767$). Vliv zásahu na kolonizaci ostatními morfotypy (M2, M7, M8) jsem nehodnotil, protože se vyskytovaly vždy pouze u jednoho semenáčku. Zásah měl statisticky průkazný vliv na celkovou míru kolonizace ($H_{(4,65)}=14.85$, $p=0.005$), průkazně se odlišovaly zásahy LLQ a ROF.

Pozoroval jsem rozdílnou preferenci ve vertikální distribuci morfotypů, kdy *Thelephora terrestris* kolonizovala ve větší míře kořínky blíže povrchu, distribuce *Laccaria*

laccata byla rozložená rovnoměrněji. Míra kolonizace se statisticky průkazně liší mezi svrchní (do 5cm) a spodní částí (pod 5cm) kořenového systému, pokud uvažujeme celkovou kolonizaci ($Z_{(1,16)}=2.09$, $p=0.036$)(Obr. P1.4, Příl. 1) nebo jen kolonizaci *Thelephora terrestris* ($Z_{(1,13)}=2.19$, $p=0.028$). Rozdíl v míře kolonizace *Laccaria laccata* mezi svrchní a spodní částí není průkazný ($Z_{(1,6)}=0.25$, $p=0.80$)(Obr. P1.5, Příl. 1).

	<i>Laccaria</i>	<i>Thelephora</i>	<i>Cg</i>	M2	M7	M8	Celkem
LLQ	14	8	1	0	0	0	15
%	93,33	53,33	6,67	0	0	0	100,00
LLF	6	10	0	1	0	0	13
%	40	66,67	0	6,67	0	0	84,62
ROQ	6	8	0	0	0	0	13
%	40	53,33	0	0	0	0	84,62
ROF	1	8	1	0	0	0	14
%	6,67	53,33	6,67	0	0	0	64,29
K	2	11	1	0	1	1	15
%	13,33	73,33	6,67	0	6,67	6,67	73,33
Celkem	29	45	3	1	1	1	70
%	41,43	64,29	4,29	1,43	1,43	1,43	81,42

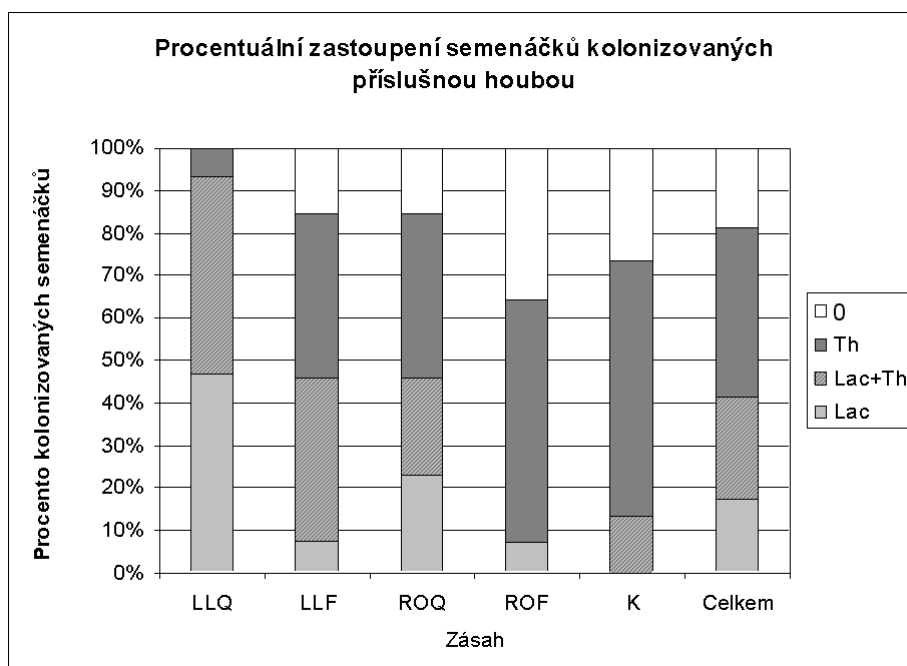
Tab. TR4: Počty a podíly semenáčků kolonizovaných jednotlivými mykorhizními morfotypy v Pokusu 2 (Legenda: *Cg* – *Coenococcum geophilum*)

	<i>Laccaria</i> [%]	<i>Thelephora</i> [%]	<i>Cg</i> [%]	Celkem
LLQ	12,89	2,80	0,01	15,70
SD	8,04	5,35	0,05	8,32
LLF	1,70	4,68	0,00	6,38
SD	2,37	5,22	0,00	5,94
ROQ	0,60	6,09	0,00	6,68
SD	0,79	8,42	0,00	0,79
ROF	0,03	4,57	0,03	4,63
SD	0,12	8,83	0,11	8,90
K	0,17	11,53	0,07	11,77
SD	0,61	12,53	0,29	12,77
Celkem	3,24	6,11	0,03	9,37
SD	6,31	8,91	8,91	9,86

Tab. TR5: Míra mykorhizace u morfotypů, které se vyskytovaly u více než jednoho semenáčku, vyjádřená podílem kolonizovaných kořenových špiček v Pokusu 2. První řádek u jednotlivých zásahů označuje míru mykorhizace, druhý její směrodatnou odchylku. (*Cg* = *Coenococcum geophilum*)

	LL index	TT index
LLQ	76,63	9,51
LLF	10,67	48,88
ROQ	3,57	48,57
ROF	0,05	52,60
K	0,19	71,83
Celkem	14,31	22,20

Tab. TR6: LL a TT index pro jednotlivé zásahy v Pokusu 2



Obr. R2: Procentuální zastoupení semenáčků kolonizovaných příslušným dominantním morfotypem pro jednotlivé zásahy v Pokusu 2 (Th - *Thelephora terrestris*, Lac - *Laccaria laccata*, Lac+Th - oba morfotypy, 0 - mykorhizy nenalezeny).

4.2.3. Růstové charakteristiky

Z růstových charakteristik měl zásah statisticky průkazný vliv na: průměr kořenového krčku ($F_{(4,65)}=2.81$; $p=0.03$), sušinu kmínku ($F_{(4,65)}=3.76$; $p=0.008$), sušinu kořenů ($F_{(4,65)}=4.81$; $p=0.002$), celkovou sušinu ($F_{(4,65)}=5.01$; $p=0.001$). Statisticky průkazný nebyl vliv zásahu na: výšku semenáčku ($F_{(4,65)}=2.51$; $p=0.05$), sušinu listů ($F_{(4,37)}=1.79$; $p=0.15$) a poměr nadzemní a podzemní biomasy ($F_{(4,65)}=0.84$; $p=0.50$) (Tab. TP1.4, TP1.5, Obr. P1.2 (Příloha 1)).

Modely zahrnující oba dominantní morfotypy (*Laccaria laccata*, *Thelephora terrestris*) byly více parsimonní (nižší AIC) ve srovnání s modely obsahujícími pouze kovariáty v případě následujících růstových charakteristik: průměr kmínku, výška semenáčku, sušina stonku a

poměr kmínku a podzemní biomasy. Pro vysvětlení variability v charakteristice celková sušina je nejvíce parsimonní model pouze s mírou mykorhizace *Thelephora terrestris* jako vysvětlující proměnnou (nikoli *Laccaria laccata*). U charakteristik sušina listů, sušina kořenů a počet listů je nejvíce parsimonní model bez doplňujících vysvětlujících proměnných (Tab. TP1.6, TP1.7, Obr. P1.8 (Příloha 1))

4.2.4. Fruktifikace

V průběhu pěti týdnů před sklizní jsem pozoroval fruktifikaci u pěti semenáčků, tří různých zásahů. Míra kolonizace *Laccaria laccata* u těchto semenáčků se pohybovala od 2,37% do 23,05% (Tab. TP1.8). Semenáčky s fruktifikující *Laccaria laccata* se statisticky průkazně lišily od ostatních kolonizovaných průměrem kmínku ($F_{(1,27)}=3.58$, $p<10^{-6}$) celkovou sušinou ($F_{(1,27)}$, $p=0.01$), sušinou kmínku ($F_{(1,27)}=7.09$, $p=0.01$) a sušinou kořenů ($F_{(1,27)}=6.81$, $p=0.01$) nikoli však mírou kolonizace *Laccaria laccata*. ($H_{(1,27)}$, $p=0.20$) (Tab. TP1.8, obr. P1.6 (Příloha 1)).

Postupný výběr zvolil proměnnou celková biomasa jako nejlepší prediktor fruktifikace ($p=0,005$), po zahrnutí této proměnné, by případné zahrnutí další proměnné nezlepšilo kvalitu modelu. Model s celkovou biomasou jako jedinou vysvětlující proměnnou vysvětluje 30.2% variability v datech.

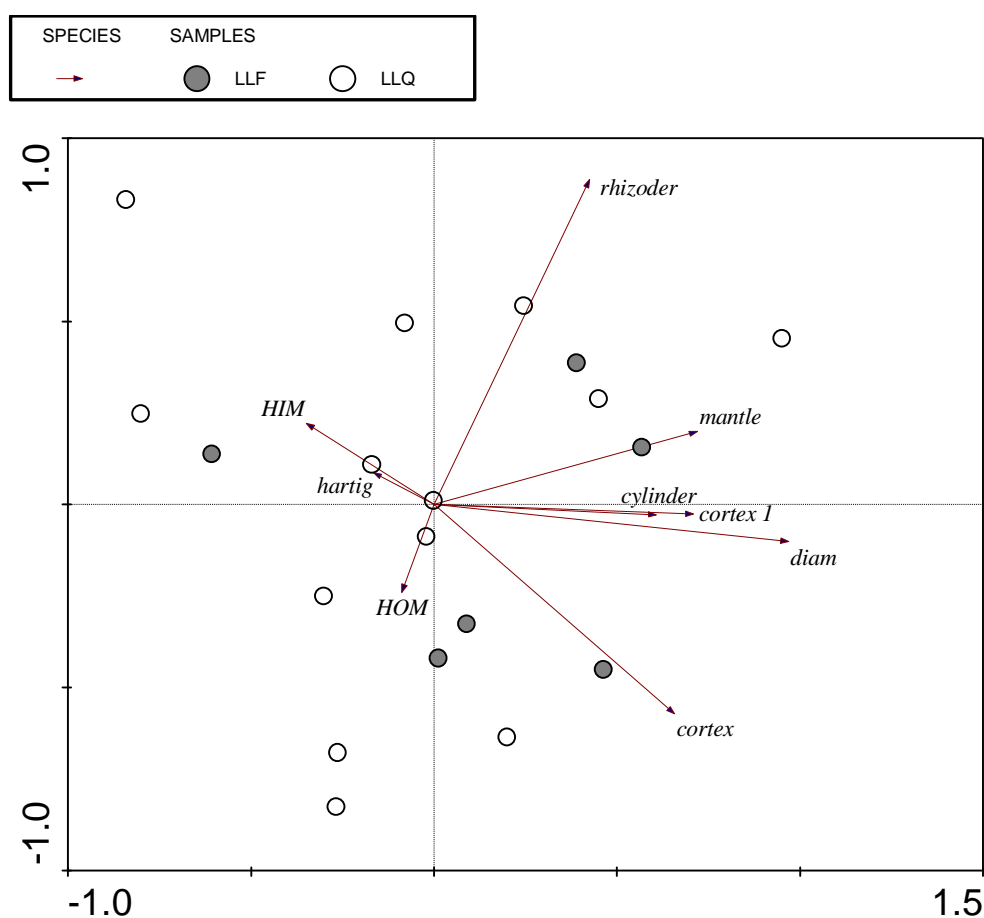
4.2.5. Anatomická srovnání mykorhiz různých kmenů

Hlavní mykorhizní morfotypy jsou popsány v Příloze 3, znaky společné všem morfotypům jsou popsány dále.

Mykorhizní systémy dubu vykazovaly monopodiálně-planární až -pyramidální větvení, běžné však byly i mykorhizy nevětvené (zvl. mykorhizy *C. geophilum*). U hlavní osy mykorhizy byl patrný větší průměr kořínku, často též se zašpičatělým zakončením, boční větve měly menší průměr a zakončení kořínků bylo tupé. Mykorhizy byly jen vzácně rovné, převažovaly ohnuté a pokroucené. Hartigova síť pronikala u všech pozorovaných druhů mykorhiz zpravidla jen podél radiální stěny pokožkových buněk, vzácněji až po vnitřní tangenciální stěnu. Velmi vzácně jsem pozoroval pronikání hyf houby mezi radiální stěny první řady korových buněk. Pronikání hyf do vnitrobuněčných prostor rhizodermis jsem nepozoroval. Počet řad buněk primární kůry kořene se pohyboval mezi dvěma a pěti. Proporce jednotlivých částí mykorhiz *Laccaria laccata* a srovnání s nemykorhizním kořínky posledních řádů shrnuje tabulka TR7.

	<i>Laccaria laccata</i>		Nemykorhizní	
	plocha [μm^2]	[%]	plocha [μm^2]	[%]
sřední válec	3869	5.9	9928	19.7
primární kůra	19706	30.0	31250	62.1
rhizodermis	17187	26.2	9121	18.1
plášť	24864	37.9	-	-
celkem	65626	100.0	50299	100.0

Tab. TR7: Plocha jednotlivých složek a relativní podíl z celkové plochy mykorhizního kořene *Laccaria laccata* (Pokus 2, zásahy LLQ, LLF) a srovnání s nemykorhizním kořínkem prvního řádu (průměr měření 2-3 příčných řezů z 12 jednotlivých kořínků, semenáčky K36, K49)



Obr. R3: PCA ordinační diagram v prostoru první a druhé kanonické osy. Body odpovídají jednotlivým semenáčkům (rozlišeny podle zásahu), šipky korelacím měřených charakteristik. Vlastní čísla os: 0.588 a 0.230 (Legenda: *cortex*: radální rozměr prim. kůry, *cortex I*: rad. rozměr 1. řady buněk prim kůry, *cylinder*: průměr centrálního válce, *diam*: průměr mykorhizy, *hartig*: hloubka pronikání H. sítě, *HIM/HOM*: průměr hyf vnitřního/vnějšího pláště, *mantle*: tloušťka pláště, *rhizoder*: radiální rozměr rhizodermis)

Z diagramu PCA (obr. R3) analýzy je patrné, že v prostoru prvních dvou kanonických osách není interpretovatelný gradient mezi mykorhizami kmenů LLF a LLQ. Diagram v prostoru první a třetí kanonické osy je uveden na Obr. P1.9 v Příloze 1. Již v prvním kroku

postupného výběru vysvětlujících proměnných pro LDA, nedosahovala žádná z měřených proměnných stanovené hladiny významnosti ($p < 0.05$) pro její přijetí do modelu (Tab P1.11, Příloha 1).

4.3. Pokus 3

U semenáčků jsem po dobu devíti měsíců po inokulaci nepozoroval žádné mykorhizy *Laccaria laccata* ani *Russula ochroleuca*. V jednom rhizoboxu jsem našel u jednoho semenáčku na jaře 2007 mykorhizy *Thelephora terrestris*. Zbylé semenáčky z rhizoboxů bez pozorovaných mykorhiz jsem použil k inokulaci do Pokusu 5 v následující sezoně (2007).

4.4. Pokus 4

4.4.1 Přežívání semenáčků

Z vysazených 45 semenáčků buku jsem na konci pokusu sklídl 9 semenáčků (20%), z 165 semenáčků dubů pak 163 (98.8%). Většina semenáčků buku uhynula záhy po vysazení; všechny semenáčky buku, které přežily tuto kritickou dobu se dožily doby sklizení pokusu. Vliv zásahu na přežívání buku nebyl průkazný ($\text{Chi-square}_{(6)}=2.01$, $p=0.37$). Fruktifikaci mykorhizních hub jsem nepozoroval.

4.4.2. Mykorhizní kolonizace

Mykorhizní infekci jsem pozoroval pouze u malého počtu semenáčků buku (3 z 9 semenáčků – 33.3%) i dubu (8 z 165 semenáčků – 4.9%). Míra kolonizace u buku nedosahovala ve všech případech ani 1% kořenových špiček, u dubu 1% přesáhla pouze v jednom případě (8.3%, sem. K19). U obou druhů dřevin jsem našel pouze jediný morfortyp – *Coenococcum geophilum* u buku a *Thelephora terrestris* u dubu. Protože míra kolonizace byla malá, statisticky jsem hodnotil pouze vliv zásahu na přítomnost daného morfortypu. U dubu neměl kmen inokulované houby ($\text{Chi-square}_{(2)}=1.81$, $p=0.40$) ani množství aplikovaného inokula ($\text{Chi-square}_{(2)}=3.8$, $p=0.28$) průkazný efekt na přítomnost mykorhiz *Thelephora terrestris*. Rovněž u semenáčků buku neměl kmen inokulované houby průkazný efekt na přítomnost mykorhiz *Coenococcum geophilum* ($\text{Chi-square}_{(2)}=1.75$, $p=0.41$). Mykorhizy *Laccaria laccata* jsem nepozoroval.

4.4.3. Růstové charakteristiky

Kmen inokulované houby ani množství inokula nemělo statisticky průkazný efekt na žádnou ze sledovaných růstových charakteristik semenáčků. Výsledky jsou shrnuty v Tab. TP1.12, TP1.13, TP1.14, TP1.15 a na Obr. P1.3 (Příl. 1). Protože vliv ani jedné

z vysvětlujících proměnných nebyl průkazný, nemělo význam testovat vliv interakce těchto dvou faktorů.

Z analýzy jsem odstranil sedm semenáčků (K120, FH162, QL163, K164, FM165, K166, QL167) pro neúplná data pro některou z měřených charakteristik.

4.5. Pokus 5

4.5.1. Přežívání semenáčků

Po sklizení pokusu jsem analyzoval všech vysazených 18 semenáčků. Doby sklizně pokusu se dožily všechny inokulované semenáčky. U semenáčků vyklíčených toho roku jsem pozoroval poměrně silné napadení padlím, u semenáčků z předchozího roku bylo napadení padlím pouze omezené.

4.5.2. Mykorhizní kolonizace

U 8 z 18 (44.4%) semenáčků jsem našel mykorhizy, celková míra mykorhizace jako počet špiček kolonizovaných oproti celkovému počtu dosahoval maximálně 14.8%, průměrná hodnota přes všechny mykorhizní semenáčky byla 3.3% (Tab. TR8)

U semenáčků jsem našel pouze jediný mykorhizní morfortyp odpovídající mykorhizám identifikovaným v předchozích pokusech jako *Thelephora terrestris*. Mykorhizy *Russula ochroleuca* jsem nenašel.

Stáří semenáčku mělo statisticky průkazný efekt na míru kolonizace *Thelephora terrestris* ($H_{(1,17)}=8.17$, $p=0.0042$), mykorhizy se až na jednu výjimku vyskytovaly pouze u semenáčků vyklíčených v roce 2006. Typ inokula neměl statisticky průkazný vliv na míru kolonizace ($H_{(1,17)}=1.04$, $p=0.31$).

	Nt	N mykor.	% mykor.	Kolonizace [%]
RO1	5	1	20.00	0.41
RO2	4	4	100.00	9.39
K1	4	0	0.00	0.00
K2	5	3	60.00	3.81
Celkem	18	8	44.44	3.26

Tab. TR8: Celkový počet semenáčků (Nt), počet mykorhizních semenáčků (N mykor), podíl mykorhizních semenáčků (% mykor) a míra kolonizace *Thelephora terrestris*, pro jednotlivé zásahy v Pokusu 5

5. Diskuze

Kmen LLQ kolonizoval takřka všechny semenáčky v Pokusu 2, průměrná míra kolonizace, byla v poměrně nízká (12.9%). Obdobně nízkou kolonizaci u rodu *Laccaria* pozoroval Tatishi et al (2003). Rincón et al. (2001) ukázal, že *Laccaria* je schopná kolonizovat vysoké procento semenáčků *Pinus pinea* v širokém rozpětí koncentrace inokula, míra kolonizace však byla vždy poměrně nízká (11-40% krátkých kořenů). Rovněž Lu et al. (1998) pozorovali, že kolonizace kořenového systému *Eucalyptus globulus* čtyřmi druhy rodu *Laccaria* se pohybovala vždy okolo 20%.

Na druhou stranu Molina (1982) ukázal, že *Laccaria laccata* je vhodným druhem pro inokulaci kontejnerizovaných semenáčků a dosahuje kolonizace >80% kořenů. Rovněž ve studii Khasa et al. (2001) *Laccaria bicolor* kolonizovala přes 80% kořínků semenáčků jehličnanů. Brundrett et al. (2005) ukázal, že druhy rodu *Laccaria* jsou nejúspěšnější z použitých druhů *early-stage* hub ve schopnosti kolonizovat kořenový systém semenáčků blahovičníků v lesních školkách.

Pozorovaná mykorhizní kolonizace je všeobecně nižší, než byla dosažena v jiných studiích zabývajících se inokulacemi dubů (Gagnon et al. 1991, Kavková et al. 2007a). Při srovnávání mykorhizní kolonizace mezi jednotlivými studiemi je však třeba mít na paměti rozdílné použité metody stanovení mykorhizní kolonizace semenáčků a rozdílné metody inokulace.

Nejednoznačnost publikovaných výsledků může být důsledkem citlivosti úspěchu kolonizace na konkrétní podmínky pokusu, vliv má např. typ substrátu (Chen et al. 2006, Kavková et al. 2007a); mykorhizní kolonizace je ovlivněna i ročním průběhem srážek a teplot (Swaty et al. 1998).

Nevysoká míra kolonizace však odpovídá výsledkům z jiných studií provedených stejnou metodou myceliální suspenze (Parladé et al. 2004, Brundrett et al. 2005). Například Brudrett et al. (2005) pozoroval úspěšnou izolaci myceliální suspenzí u 35% izolátů různých druhů ektomykrohizních hub oproti 49% úspěšnosti suspenze spor. Vliv zde má nejspíš fragmentce mycelia během přípravy inokula, kdy některé druhy mohou být poměrně citlivé; Brundrett et al. (2005) uvádí, že z fragmentovaného mycelia bylo možné zpětně vyizolovat jen 69% použitých kmenů. Inokulovaná *Laccaria bicolor* však dosahovala vyšší kolonizace kořenového systému semenáčků *Quercus rubra*, když byla inokulovaná ve formě myceliální suspenze ve srovnání s alginátovým inokulem (Gagnon et al. 1991).

Průměrná míra kolonizace semenáčků kmenem LLF v Pokusu 2 byla sice vyšší než u kontrolních neinokulovaných semenáčků, avšak tento rozdíl nebyl statisticky průkazný. Nelze tedy rozhodnout, zda mykorhizy nalezené u těchto semenáčků, reprezentují tento kmen, nebo přísluší ke kontaminujícím kmenům. Izoláty *Laccaria laccata* náležející k různým genetickým individuím lze rozlišit testy somatické inkompatibility (Rayner 1991). Z jediné plodnice *Laccaria laccata*, která fruktifikovala v zásahu LLF se však nepodařilo získat čistou kulturu a izolace z mykorhiz je komplikovaným postupem s nejistým výsledkem (Gryndler et al. 2004).

V každém případě je patrné, že izolát z buku má ve srovnání s izolátem z dubu omezené kolonizační schopnosti kořenového systému dubu. Tento výsledek odpovídá pozorované vnitrodruhové variabilitě v kolonizační schopnosti jiných druhů mykorhizních hub (Burgess et al. 1994, Dixon et al. 1987). Naproti tomu u druhu *Laccaria laccata* Molina (1982) nenalezl rozdíly v míře kolonizace semenáčků *Picea sitchensis* a *Tsuga heterophylla*, všechny čtyři použité kmeny dosahovaly vysoké míry kolonizace.

Je otázkou, zda by vyšší dávka inokula kompenzovala horší kolonizační schopnosti izolátu LLF. V Pokusu 4, který měl na tuto otázku odpovědět, selhala metoda inokulace i přes dodržení odpovídající metodiky přípravy a dávkování inokula (Honig et al. 2000, Rincón et al. 2001). Rincón et al. (2001) zjistil, že takřka všechny kontejnerizované semenáčky *Pinus pinea* byly kolonizovány v širokém rozpětí koncentrace vegetativního inokula (1:4 až 1:64). Rovněž Perrin et al (1996) ukázal, že *Laccaria bicolor* je schopná kolonizovat semenáčky již při malé použité dávce inokula. Kropp (1997) ukázal, že kolonizační schopnost *Laccaria laccta* je podmíněna geneticky polygenním systémem dědičnosti. Soudím tedy, že vyšší objem aplikovaného inokula by neměl vliv na výslednou míru kolonizace, a že schopnost kolonizace je v daných podmínkách spíše vlastností podmíněnou interakcí mezi fyziologickými vlastnostmi izolátu a podmínkami pokusu.

Lineární diskriminační analýza nenašla znaky ve stavbě mykorhiz *Laccaria laccata*, které by mohly odlišit mykorhizy ze zásahů LLQ a LLF. Snížená schopnost kmene LLF vytvářet mykorhizy s dubem se tedy neprojevuje na anatomické struktuře mykorhiz, nebo je její příspěvek na celkové variabilitě natolik nízký, že se při omezeném počtu vzorků nemohl projevit. Variabilita v rámci jednoho vzorku u některých charakteristik (tloušťka pláště, tloušťka rhizodermis) byla značná a nejspíš souvisí s ontogenetickým stářím mykorhizy, jakkoli jsem se z měření snažil vynechávat zjevně mladé a nevyvinuté a naopak senescentní mykorhizy.

V jiných publikovaných studiích (Dixon et al. 1987, Burgess et al. 1994) je zmiňováno, že růstová odezva semenáčků souvisela s tloušťkou pláště a mírou vývinu Hartigovy sítě. Jedním z možných důvodů, proč jsem podobný vztah nepozoroval je nejistý původ mykorhiz *Laccaria laccata* v zásahu LLF (jak je diskutováno výše), což při malém počtu opakování pro tento kmen mohlo mít nezanebatelné následky na výsledek analýzy.

Protože mykorhizní společenstva inokulovaných a neinokulovaných semenáčků po vysazení do volné přírody během času konvergují (Menkis et al. 2007), je samozřejmou a zásadní otázkou, zda inokulovaný kmen mykorhizní houby je schopný se v kořenovém systému udržet i po introdukci do volné přírody. Selosse et al. (2001) ukázali, že introdukovaný kmen *Laccaria bicolor* byl přítomný na kořenech *Pseudotsuga menziesii* i po mnoha letech od inokulace. Jakkoli jsou výsledky této studie optimistické, je třeba si uvědomit, že se jedná o nepůvodní druh hostitelské dřeviny v oblasti a lze tudíž předpokládat že tlak 'divokých' mykorhizních hub byl menší než v případě domácích dřevin. Nicméně i v jiné studii (Gagné et al. 2006) inokulovaný kmen *Laccaria* vytrval na stanovišti po šest let.

Důvodů, proč *Russula ochroleuca* nebyla schopna kolonizovat semenáčky dubu, lze uvažovat několik. Protože rod *Russula* je považován ze *late-stage* houby (Molina et al. 1982) jedním přijatelným vysvětlením je neschopnost houby kolonizovat mladé semenáčky a vydržet kompetiční tlak přirozeně se vyskytujících druhů. Fleming (1985) ukázal, že ačkoli *late-stage* houby vytvářely mykorhizy v axenických podmínkách, po přesazení do venkovních podmínek se začala míra mykorhizace snižovat, a to i bez ohledu na kolonizaci přirozeně se vyskytujících se druhů. Autor diskutuje hypotézu, že *late-stage* houby mají příliš velké nároky na přísun asimilátů, které není malý semenáček schopný uspokojit. Ani starší semenáčky v Pokusu 5 nebyly kolonizovány. Lepšová (2001) pozorovala mykorhizy jen u těch semenáčků *Picea abies*, které byly v kontaktu s kořeny dospělých stromů se stejným typem mykorhizy. Tento výsledek lze interpretovat tak, že *Russula ochroleuca* potřebuje ke kolonizaci semenáčků být napojena na dostatečný zdroj asimilátů, jak ukázal u jiných *late-stage* hub Fleming (1984). Mykorhizy *Russula ochroleuca* však byly nalezeny u semenáčků pěstovaných v květináčích s nesterilní lesní půdou (Kavková et al. 2007a), tento druh je tedy schopný vytvářet mykorhizy na semenáčcích dubu i v umělých podmínkách.

Příkladem úspěšné inokulace *late-stage* hub je studie Dunabeitia et al. (2004), ve které inokulace druhu rodu *Leccinum*, jinak považovaného za *late-stage* houbu (Mason et al. 1983), měla za výsledek podstatnou kolonizaci kořenového systému rok starých semenáčků břízy v polních podmínkách a zároveň byl prokázán její pozitivní vliv na růst těchto semenáčků.

Semenáčky v Pokusu 2 inokulované *Russula ochroleuca* měly menší míru kolonizace *Thelephora terrestris* ve srovnání s kontrolními semenáčky¹. Je pravděpodobné, že inokulované kmeny *Russula ochroleuca* nějakým způsobem snižovaly pravděpodobnost kolonizace přirozeně se vyskytujícími se druhy. To by mohlo znamenat, že ačkoli *Russula ochroleuca* nevytvořila mykorhizy v inokulovaných kontejnerech, mohla v substrátu po nějakou dobu přežívat ve formě vegetativního mycelia a zabraňovat kolonizaci z přírodních zdrojů. Schopnost některých mykorhizních druhů persistovat po určitou dobu v substrátu bez vytvořených mykorhiz byla popsána u jiných druhů (Jones et al. 1990). Rovněž doba, po kterou pokus běžel, mohla být příliš krátká, aby *Russula ochroleuca* vytvořila mykorhizy, v některých případech může doba mezi inokulací a prvními pozorovatelnými mykorhizami trvat i několik týdnů až měsíců (Tateishi et al. 2003, Wilson et Harvey 1984).

Je rovněž možné, že *Russula ochroleuca* má schopnost vytvářet látky s fungicidními účinky a že rezidua těchto látek zůstala v inokulu. Produkce inhibičních látek však byla ukázána z mykorhizních druhů u např. rodu *Pisolithus* (Kope et al. 1990), z dostupné literatury mi však takový případ u rodu *Russula* není znám. Tyler (1994) však uvádí negativní korelace ve výskytu plodnic u druhů rodů *Russula* a blízkého rodu *Lactarius*, což naznačuje jistou možnost vzájemné negativní interakce.

Jen s obtížemi lze získat semenáčky zcela prosté kontaminujících mykorhiz přirozeně se vyskytujících druhů, protože vzduchem šířené spory mykorhizních hub jsou takřka všudypřítomné. Nejčastějším kontaminantem byla *Thelephora terrestris*, tento druh byl přítomný ve všech mých pokusech z obou let a byl vždy jednou z dominantních složek. Právě tento druh je nejčastějším kontaminantem inokulačních experimentů, (např. Selosse et al. 2000, Pedersen et al. 1999, Parláde et al. 1999) a běžným druhem v lesních školkách (Rudawska et al. 2006, Croghan 1984). *T. terrestris* je považována za špatného kompetitora (Cairney et Chambers 1999). Je zpravidla jedním z prvních druhů, které zmizí z kořenového systému školkových semenáčků přesazených do volné přírody (Veilleneuve et al. 1991). Reddy et Natarjan (1997) však pozorovali, že současná inokulace *Laccaria* a *Thelephora* stejným množstvím inokula měla za výsledek dvojnásobnou kolonizaci *Thelephora* oproti *Laccaria*.

Rovnoměrné zastoupení *Laccaria laccata* ve svrchní a spodní části kořenového systému je ve shodě s výsledky jiných prací (Veilleneuve et al. 1991). Zajímavým jevem byla pozorovaná preference *Thelephora terrestris* pro kolonizaci kořínků blíže povrchu substrátu.

¹ Srovnáme-li kontrolní semenáčky se semenáčky všemi inokulovanými *Russula ochroleuca* je tento vztah marginálně průkazný ($H_{(1,42)}=3.19$, $p=0.074$)(Kruskal-Wallisův test)

Tento jev by mohl souviset s předpokládanou kolonizací pomocí větrem šířených spor. Coutts et Nicholl (1990) pozorovali, šíření rhizomorf *Thelephora terrestris* od povrchu substrátu podél kořenového systému. Zároveň autoři zaznamenali, že rychlost šíření *Thelephora terrestris* byla o polovinu větší než šíření *Laccaria laccata*. Vzhledem k tomu, že kompetice u mykorhizních hub probíhá spíše jako kompetice o kolonizaci nově vzniklých kořenových špiček než náhrada jedné houby druhou na jediné špičce (Smith et Read 1997), může mít tato skutečnost vliv na výsledek kompetice, v tomto jednoduchém systému. Schopnost rychlého šíření je však jistě výhodnou vlastností pro šíření v narušovaných stanovištích jako jsou lesní školky. Lze očekávat, že rychleji rostoucí druh rychleji kolonizuje nově vznikající kořenové špičky v distální části kořenového systému. Právě schopnost rychle kolonizovat kořenové špičky považují Kennedy et Bruns (2005) za hlavní kompetiční výhodu *Rhizopogon occidentalis* oproti druhu *R. salebrosus*. Jak diskutuje Honig et al. (2000), další růst kmene, který poprvé kolonizuje kořenový systém je podporován rostlinnými asimiláty a další kolonizace je podporována mechanismem zpětné vazby.

Je však rovněž možné, že preference *Thelephora terrestris* pro kořeny blíže povrchu nesouvisí se způsobem šíření, ale spíše s fyziologickým stavem kořenů. Mason et al. (1983) spekuluje, že starší kořeny blíže ke kmeni mají lepší přístup k rostlinným asimilátům. Mykorhizní houby mají v přirozeném prostředí vertikálně diferenciované niky (Dickie et al. 2001) a je možné, že toto chování přetrvává i v použitém, relativně homogenním substrátu.

Mykorhizy *Thelephora terrestris* poměrně dobře odpovídají popisu těchto mykorhiz v literatuře (Agerer 1986-2002, Agerer & Weiss 1989)(viz Příloha 3). Ačkoli morfologické odlišení mykorhiz *Laccaria* a *Thelephora* není jednoduché (Ingleby et al. 1990), s trochou zkušenosti lze oba druhy odlišit charakterem pláště. Povrch pláště u *Thelephora terrestris* působí kompaktním dojmem, oproti tomu plášť *Laccaria laccata* je poměrně rozvolněný. Starší mykorhizy se odlišují také barvou, kdy mykorhizy *Thelephora terrestris* zůstávají po dlouhou dobu bělavé, zatímco mykorhizy *Laccaria laccata* se poměrně záhy zabarvují do béžových až okrových barev. S jistotou lze však mykorhizy *Thelephora terrestris* odlišit v některých případech pouze mikroskopicky na základě přítomnosti silnostěnných cystid v plášti. Jednoznačnému určení obou dominantních morfotypů napomohlo, že jsem je našel jako jediný morfotyp v některých buňkách kontejneru, kde příslušná houba fruktifikovala.

Druhou nejčastější mykorhizní houbou, která kolonizovala semenáčky z přirozených zdrojů, byl druh rodu *Laccaria*. Plodnice, které jsem našel u semenáčků, kde jsem *Laccaria laccata* neinkuloval, odpovídaly druhu *Laccaria laccata* s.l. (Horak 2005), je však možné, že

nalezené mykorhizy mohly odpovídat i jiným druhům. Rovněž druhy rodu *Laccaria* jsou běžné v lesních školkách (Krop et Mueller 1999)

Dalším kontaminujícím druhem bylo *Coenococcum geophilum*, rovněž tento druh je běžně udáván z lesních školek (Rudawska et al. 2006) i na přirozených stanovištích (van Driessche et Piérart 1995), dobře snáší i vodní stres (Villeneuve et al. 1991). Nalezl jsem ho v mých pokusech v pouze minimálním množství, což pravděpodobně souvisí ze způsobem šíření u tohoto druhu, který nevytváří vzduchem šířitelné sexuální spory a spíše se spoléhá na šíření vegetativní cestou, ať již ve formě mycelia nebo sklerocií přenášených v půdě (Cairney et Chambers 1999). Nejvíce byl zastoupen u semenáčků buku v Pokusu 4, tento výsledek si vysvětluji tím, že jsem na jaře 2007 sbíral již naklíčené bukvice a inokulum *C. geophilum* přinesl na jejich povrchu.

Celkově druhové složení společenstva kontaminujících hub odpovídá složení dominantních druhů v lesních školkách (Rudawska et al. 2006). Nevyrovnané zastoupení morfortypů s několika málo dominantními morfortypy a větším počtem vzácných morfortypů je u semenáčků dřevin běžné, obzvláště na narušených stanovištích (Kranabetter 2004).

Při zhotovování příčných řezů kořeny z Pokusu 2, jsem zjistil, že u některých kořenů, které neměly na povrchu vytvořený hyfový plášť, je vytvořena peraepidermální Hartigova síť. Vzhledem k omezenému množství dostupného materiálu fixovaných nemykorhizních kořenů jsem mohl provést pouze extenzivní průzkum výskytu tohoto jevu. Z prozkoumaných 25 kořenů u čtyř semenáčků (K36, K49, LLQ19, ROQ17) jsem našel tři takovéto kořeny s přítomnou Hartigovou sítí u dvou semenáčků (K49, ROQ17), přičemž u jednoho ze semenáčků jsem předtím nepozoroval morfologické mykorhizy. Je pravděpodobné, že se jedná o mladé mykorhizy s dosud nevytvořeným pláštěm (Smith et Read 1997). Tateishi et al. (2003) ukázal, že pomocí fluorescenčních metod je možné zjistit přítomnost hyf *Laccaria laccata*, dlouho před vytvořením pláště na povrchu kořene. Je možné si položit otázku nakolik přítomnost takovýchto morfologicky nerozpoznatelných stádií zkreslila výslednou míru mykorhizní kolonizace. Mykorhizy mohou například projevit efekt na růst dřívě, než jsou plně vyvinuty (Frankland et Harrison 1985). Rovněž van der Heijden et Kuyper (2001) pozorovali růstovou odezvu řízků *Salix* na inokulaci týden předtím, než byly pozorovány dobře vyvinuté mykorhizy.

Během studie jsem se snažil i o extenzivní screening kolonizace AM hub. Ačkoli arbuskulární mykorhizy byly pozorovány u druhu *Quercus agrifolia* (Egerton-Warburton & Allen 2001), výsledek screeningu byl negativní. Tento výsledek je očekávatelný, protože výše

zmíněný druh roste v odlišných ekologických podmínkách a navíc možnost kolonizace semenáčků v mých pokusech AM symbionty byla omezená.

Ze tří pokusů, kde jsem sledoval vliv inokulace mykorrhizními houbami na růstové charakteristiky, se statisticky průkazný efekt projevil pouze v Pokusu 2. Semenáčky zásahů, které se průkazně odlišovaly od kontrolních však měly průkazně menší hodnoty některých růstových charakteristik než u semenáčků kontrolních. Menší úspěšnost inokulace listnatých dřevin může být odrazem menší závislosti listnáčů na mykorrhize oproti jehličnanům (Bauhus and Messier 1999). Ve všech případech nejmenší semenáčky, byly inokulované kmenem ROF. Tento výsledek je poměrně neočekávaný v souvislosti s tím, že *Russula ochroleuca* nevytvořila v žádném zásahu mykorrhizy. Vliv mykorrhizy se však může projevovat již předtím než jsou na kořenech vytvořeny morfologicky rozeznatelné mykorrhizy (Franklad et Harrison 1985). *Late-stage* houby jako je *Russula ochroleuca* mohou mít vyšší nároky na asimiláty než *early-stage* houby (Gibson and Deacon 1990). Negativní vliv inokulace *Russula ochroleuca* může být způsoben rovněž tím, že v tomto zásahu jsem našel vždy nejmenší míru kolonizace ze všech zásahů, protože jak je diskutováno níže, v Pokusu 2 jsem našel pozitivní korelaci mezi některými růstovými charakteristikami mírou mykorrhizní kolonizace.

V dostupné literatuře lze nalézt pouze sporadické údaje zabývající se inokulacemi druhů rodu *Russula*. Martinez-Amorez et al. (1991) inokuloval semenáčky dvou druhů borovic dvěma různými koncentracemi spor *Russula brevipes*. Inokulace oběma koncentracemi spor průkazně zvýšila sušinu semenáčků oproti neinokulované kontrole po pěti měsících, po deseti měsících byly průkazně odlišné pouze semenáčky *Pinus radiata* inokulované vyšší dávkou inokula. U *Pinus patula* nebyl efekt inokulace tak výrazný. Je však sporné nakolik jsou srovnatelné druhy v rámci tak velkého rodu jakým je *Russula*.

Míra mykorrhizní kolonizace pozitivně korelovala s některými růstovými charakteristikami (celková sušina, sušina kmínku, výška semenáčku a průměr kmínku). Množství variability v růstových datech vysvětlené kolonizací mykorrhizními houbami v datech je však poměrně malé (Tab. TP1.7). Jen málo prací podává zprávu o korelaci mykorrhizní kolonizace s některou z růstových charakteristik, ve shodě s mojí prací je většina hodnot uváděných korelačních koeficientů dosti nízká (González-Ochoa 2003). Naopak Thomson et al. (1994) našel vysoce průkaznou korelaci mezi poměrnou délkou kolonizovaných kořenů *Eucalyptus globulus* a sušinou semenáčků.

Nízká míra vysvětlené variability je zčásti nedostatečným odfiltrováním variability z jiných zdrojů. Vliv na růst a kolonizaci semenáčků má provenience použitého osiva (Rosado et al. 1994, Dixon et al. 1987, Tonkin et al. 1989), růst je ovlivněn i velikostí semene (Bonfil

1998). Pokus 4, ve kterém jsem se snažil tato omezení zmírnit použitím osiva z jednoho mateřského stromu a využitím charakteristik měřených na počátku pokusu jako kovariát bohužel nepřinesl očekávané výsledky.

Jako příčinu zlepšeného růstu mykorhizních semenáčků lze uvažovat zlepšení minerální výživy semenáčků. Bylo ukázáno, že *Laccaria* zvyšovala příjem fosforu semenáčky dřevin (Jones et al. 1990, Bougher et al. 1990). V jiné studii (Gagnon et al. 1991) však inokulace semenáčků *Quercus rubra* neměla efekt na koncentraci fosforu v pletivech, efekt na koncentraci dusíku byl dokonce negativní. Tento výsledek však lze vysvětlit poměrně vysokými dávkami aplikovaného hnojiva ve zmíněném pokusu, protože efekt inokulace závisí na množství dostupných minerálních živin. *Laccaria* měla největší efekt na růst semenáčků *Eucalyptus diversicolor* při střední koncentraci fosforu (Bougher et al. 1990). Při příliš nízké koncentraci fosforu, mykorhizní inokulace nezvýšila růst semenáčků, protože nedostatek fosforu limitoval i růst houby, pokud byl fosfor v nadbytku, dokázaly i nemykorhizní semenáčky přijímat dostatečné takové množství fosforu, aby nebyl prvkem limitujícím růst. Obdobné výsledky prezentovali Jones et al. (1990): *Laccaria proxima* zvyšovala růst řízků semenáčků *Salix viminalis* jen při střední koncentraci fosforu (10mg P kg⁻¹ substrátu)(Jones et al. 1990), při vyšších koncentracích byla kolonizace redukována.

Je patrné, že mykorhizní kolonizace měla vliv převážně na růst nadzemní části, což se odráží na vzrůstu poměru nadzemní oproti podzemní sušině (S:R). Vzrůst poměru S:R je v souladu s jinými studiemi (Reddy et Natarajan 1997, Berman et Bledsoe 1998), protože jsou-li mykorhizy účinnější v příjmu živin (nebo vody) oproti nemykorhizním kořenům, je pro rostlinu výhodnější alokovat více zdrojů do růstu nadzemních částí jak vyplývá z teoretických modelů (Geritz et al. 2005). Biomasa listů není průkazně korelovaná s mykorhizní infekcí, její podíl na biomase nadzemní části naopak průkazně klesá s rostoucí hodnotou nadzemní biomasy ($F_{(1,40)}=17.54$, $p=0.0001$). Spolu s tím, že s rostoucí mykorhizní kolonizací roste i výška semenáčku lze předpokládat, že semenáčky dubu investují více do výškového růstu nadzemní části (a tím budoucí kompetiční výhody o světlo), než do tvorby asimilačních orgánů. Investice do maximálního výškového růstu může být např. dobrou strategií při kompetici semenáčků o uvolněný prostor v lese. Villeneuve et al. (1991) diskutují hypotézu, že kompetice s okolní vegetací vede semenáčky k větší investici do výškového růstu oproti přírůstu průměru.

Naproti tomu Dunabeita et al. (2004) pozoroval nárůst pouze biomasy kořenů po inokulaci. Rovněž Kavková et al. (2007) pozorovala, že biomasa kořenů při použití stejného kmene *Laccaria laccata* (LLQ) vykazovala rychlejší růst sušiny nadzemních částí oproti

podzemním. Reakce na inokulaci ve formě změny distribuce sušiny mezi nadzemní a podzemní část je odlišná i mezi různými druhy dřevin (Khasa et al. 2001).

Smith et Read (1997) však varují před ukvapenými závěry týkajícími se změn poměru S:R u mykorhizních rostlin: není vždy snadné rozhodnout skutečný důvod změny poměru S:R, protože se liší v průběhu ontogeneze rostliny (větší a starší semenáčky jej mají větší) a změna může být zapříčiněna pouze tím, že mykorhizní semenáčky bývají větší. S tím jsou v shodě např. výsledky Conjeaud et al. (1996), kdy mykorhizované semenáčky byly menší než nemykorhizované a zároveň poměr nadzemní a podzemní biomasy byl větší u nemykorhizních semenáčků.

Jakkoli *Thelephora terrestris* dosahovala vyšší míry kolonizace než *Laccaria laccata*, semenáčky kolonizované oběma houbami byly srovnatelné, což značí, že *Laccaria laccata* je při stejné míře kolonizace schopná účinnější růstové odezvy než *Thelephora*. Možným vysvětlením je až 3x větší produkce extraradikálních hyf u *L. laccata* oproti *T. terrestris* (Jones et al. 1990) při stejné délce kolonizovaných kořenů. Zároveň *Laccaria* byla schopná účinněji získávat fosfor, což autoři spojují právě s vyšší produkcí extraradikálního mycelia. Vztah mezi produkcí extraradikálního mycelia a schopností přijímat fosfor však nemusí být tak jednoznačný jak ukázal Thomson et al. (1994). Odezva na inokulaci však vůbec nemusí záviset na míře kolonizace (van der Heijden et Kuyper 2001).

Lze sice namítat, že vliv na růstové charakteristiky dubu předvedené v mém pokusu nemusí přetrvat do dalších sezon, bylo však ukázáno, že pozitivní vliv inokulace rodem *Laccaria* přetrval po několik dalších let (Selosse et al. 2000) nebo semenáčky měly v následujících letech vyšší šanci na přežití (Richter et Bruhn 1989). I přesto by však bylo vhodné otestovat vliv inokulace v dlouhodobém experimentu.

Oproti Pokusu 2, v Pokusu 1 nebyla žádná růstová charakteristika průkazně korelovaná s mírou mykorhizní kolonizace. Protože v tomto pokusu nebyl průkazný efekt zásahu na míru mykorhizní kolonizaci, je možné že většina nalezených mykorhiz může pocházet od 'divokých' kmenů mykorhizních hub. Tyto houby mohly kolonizovat semenáčky již v době kdy byla ukončena hlavní fáze růstu nebo doba kolonizace byla příliš krátká na to, aby se její efekt projevil. Jak ukázal Jones et al. (1990) inokulace je třeba provést v době intenzivního růstu, pozdější inokulace již nemá efekt.

Laccaria laccata je jeden z mála druhů ektomykorhizních hub, který je schopný běžně fruktifikovat v květináčových pokusech, časový interval mezi inokulací a fruktifikací je často poměrně krátký, např. Lu et al. (1998) pozorovali fruktifikaci různých druhů rodu *Laccaria* již po 70 dnech od inokulace. Strategie preferující rychlou fruktifikaci může být

přizpůsobením pro narušovaná stanoviště, nicméně Selosse et al. (2001) uvádí, že jednotlivé genety *Laccaria bicolor* a *L. laccata* si zachovávaly fenologii fruktifikace v průběhu několika let, což naznačuje, že se stimulaci fruktifikace podílejí i jiné vlivy. Godbout et Fortin (1990) ukázali, že fruktifikace *Laccaria bicolor* byla stimulována zkrácením fotoperiody. Doba fruktifikace *Laccaria laccata* je ovlivněna i hostitelskou dřevinou (Molina 1982).

Překvapivé je zjištění, že nebyl průkazný rozdíl v míře kolonizace *Laccaria laccata* mezi semenáčky u kterých jsem fruktifikaci pozoroval a zbytkem semenáčků kolonizovaných *Laccaria laccata*. Jedno možné vysvětlení se opírá o skutečnost, že některý ze semenáčků mohl být kolonizován „divokým“ kmenem. Takový kmen může mít odlišné fyziologické charakteristiky od inokulovaných kmenů, může být např. účinnější v získávání asimilátů od hostitele na jednotku kolonizovaného kořene než ostatní, ostatně, o tom jaký vztah míry kolonizace a schopnosti houby získávat od rostliny asimiláty není známo mnoho (Bruns et al. 2002). Je však třeba připustit, že dalším z možných vysvětlení může být chyba při vyhodnocování zastoupení morfotypů. Jak uvádím výše, mykorhizy *Laccaria* a *Thelephora* nebyly vždy jednoduše rozlišitelné pouze na základě morfologie a nebylo technicky možné mikroskopicky ověřit určení u více než několika málo jednotek až desítek špiček u semenáčku.

Fruktifikace v mém pokusu však byla silně pozitivně korelována s celkovou biomasou semenáčku a jejími složkami (tj. biomasa kmínku a kořenů). Zdá se tedy, že jen relativně velké semenáčky byly schopné zásobovat houbu dostatkem asimilátů pro tvorbu plodnic, která může dosti nákladná a vázat podstatný podíl rostlinné fotosyntetické produkce (Smith et Read 1997). To je ve shodě např. s výsledky Lamhamedi et al. (1994), kteří ukázali, že produkce plodnic u *Laccaria bicolor* koreluje s fotosyntézou u semenáčků *Pinus strobus*.

Na základě vztahu fruktifikace a velikosti semenáčku si lze položit otázku, zda kauzalita vztahu mezi sušinou semenáčku a mykorhizní kolonizací není opačná než je diskutováno výše, zda menší semenáčky měly jen omezenou schopnost uspokojit potřebu houby po asimilátech, což redukovalo následnou kolonizaci. Omezení schopnosti rostliny produkovat asimiláty, např. zastíněním, může vést ke snížení mykorhizní kolonizace AM (Kumar et al. 2007) i ECM houbami (Cheng et al. 2005), ačkoliv tyto výsledky nejsou vždy jednoznačné (např. Dehlin et al. 2004). Tomuto vysvětlení by mohl odpovídat i charakter variability v růstových datech, kdy malé semenáčky měly jen minimální mykorhizní kolonizaci, zatímco u velkých byla variabilita vyšší.

Jedním z faktorů, které mohly ovlivnit kvalitu a schopnost semenáčků zásobovat mykorhizního symbionta asimiláty, bylo napadení semenáčků padlím dubovým. Chorobu

v současnosti způsobuje zavlečený druh *Microsphaera alphitoides*, který vytlačil původní druh (*Phyllactinia roboris*) a působí značné hospodářské škody na pěstovaných druzích dubů (Kavková et al. 2007b, Soukup 2005). Nejvíce byl ovlivněn počet listů a výška semenáčku, kdy jsem pozoroval zasychání růstových vrcholů a indukci bočních prýtů. Největší infekci padlí jsem pozoroval u semenáčků v Pokusu 1, kdy vlhký a teplý vzduch ve skleníku byl patrně příznivý rozvoji patogenu.

Málo je známo o interakci mezi ektomykorhizními houbami a nadzemními patogeny rostlin, nicméně alespoň částečný pohled na problematiku nám mohou přinést výsledky studií u arbuskulárně-mycorrhizních (AM) rostlin. AM houby (stejně jako ECM – Morin et al. 1999) zvyšují sice odolnost rostlin proti půdním patogenům (Smith et Read 1997), často však zvyšují citlivost nadzemních částí k útoku patogenů (Dugassa et al. 1996) a parazitů (Sanders et al. 1993). Tato zvýšená citlivost k infekci je však vyvážena vyšší schopností kompenzovat škody způsobené patogenem (Gernns et al. 2001). Nakolik lze výsledky získané z AM bylin na ektomykorhizní dřeviny je vždy sporné; je však známo, že snížení přísunu asimilátů např. defoliací (Cullings et al. 2005, Saikkonen et al. 1999, Kolb et al. 1999) ovlivňuje složení ektomykorhizního společenstva. Mueller et al. (2006) popisuje, že parazitace borovice (*Pinus pinea*) jmelím sice zvýšilo kolonizaci kořenového systému mycorrhizními houbami, zároveň však došlo ke změně druhového složení společenstva mycorrhizních hub.

6. Závěr

V rámci druhu *Laccaria laccata* jsem našel variabilitu ve schopnosti kolonizovat semenáčky dubu, kmen izolovaný z dubu byl lepším kolonizátorem než izolát z buku. Rozdíly v kolonizační schopnosti se neprojevily na měřených anatomických znacích mykorhiz. Úspěšnost kolonizace se však liší v závislosti na podmínkách a metodice inokulace a není vždy dobře predikovatelná. Semenáčky inokulované *Laccaria laccata* se v růstových charakteristikách po jednom roce neodlišovaly od kontrolních, neinokulovaných semenáčků. Kolonizace přirozeně se vyskytujícími houbami (zvl. *Thelephora terrestris*) byla dostatečná pro produkci semenáčků cílové velikosti. Inokulace testovanými kmeny *Laccaria laccata* za účelem zlepšení růstu kontejnerizovaných semenáčků dubu není příliš perspektivní, nicméně může být vhodná pro získání jiných popisovaných výhod spojených s mykorhizní kolonizací. Vliv inokulce se může projevovat i na delší časové škále, bylo by vhodné otestovat efekt inokulace v dlouhodobějším experimentu.

Ani jeden z obou kmenů *Russula ochroleuca* nebyl schopný kolonizovat kořenový systém dubu, semenáčky kolonizované tímto druhem byly v některých případech i menší než semenáčky kontrolní. Druh *Russula ochroleuca* nelze, podle výsledků mé studie, doporučit pro aplikaci v praxi.

7. Literatura

- Abuzinadah RA, Read DJ (1986) The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. utilization of peptides and protein by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 103: 481-493
- Adriensen K, Vangronsveld J, Vangronsveld JV (2006) Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 16:553–558
- Agerer R [ed.] (1987-2002) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Schwabisch Gmund
- Agerer R (1988) Studies on ectomycorrhizae XVII. The ontogeny of the ectomycorrhizas rhizomorphs of *Paxillus involutus* and *Thelephora terrestris* (Basidiomycetes). *Nova Hedwigia* 47: 311-334
- Agerer R (1990) Studies on ectomycorrhizae XXIV. Ectomycorrhizae of *Chroogomphus helveticus* and *C. rutilus* (Gomphidiaceae, Basidiomycetes) and their relationship to those of *Suillus* and *Rhizopogon*. *Nova Hedwigia* 50: 1-63
- Agerer R (1991) Characterisation of ectomycorrhiza. *Methods in Microbiology* 23: 25-73 , (sek. cit. in Smith et Read 1997)
- Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae, A proposal to classify mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114
- Agerer R (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological progress* 5: 67-107
- Agerer R, Weiss M (1989) Studies on ectomycorrhizae XX. Mycorrhizae formed by *Thelephora terrestris* on Norway spruce. *Mycologia* 81: 444-453
- Ahmad I, Carleton T J, Malloch DW, Hellbust JA (1990) Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (R. Mre.) Orton. *New Phytologist* 116: 431-441
- Amaranthus MP, Perry DA (1987) Effect of soil transfer on ectomycorrhiza formation and the survival of and growth of conifer seedlings on old non-reforested clear-cuts. *Canadian Journal of Forest Research* 17:944-950
- Bauhaus J, Messier C (1999) Soil exploration strategies of fine roots in different southern boreal forests of South Canada. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 260-273
- Bennett AE, Alers-Garcia J, Bever JD (2006) Three-Way Interactions among Mutualistic Mycorrhizal Fungi, Plants, and Plant Enemies: Hypotheses and Synthesis. *The American Naturalist* 167: 141-152
- Bergemann SE, Miller SL (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytologist* 153: 313-320
- Berman JT, Bledsoe CS (1998) Soil transfers from valley oak (*Quercus lobata* Nee) stands increase ectomycorrhizal diversity and alter root and shoot growth on valley oak seedlings. *Mycorrhiza* 7: 223-235
- Beyeler M, Heyser W (1997) The influence of mycorrhizal colonization on growth in the greenhouse and on catechin, epicatechin and procyanidin in roots of *Fagus sylvatica* L. *Mycorrhiza* 7: 171-177
- Bidartondo MI, Bruns TD (2001) Extreme specificity in epiparasitic Monotropoidaeae (Ericaceae): Widespread phylogenetic and geographic structure. *Molecular Ecology* 10: 2285-2295
- Blaudez D, Botton B, Chalet M (2000) Effects of heavy metals on nitrogen uptake by *Paxillus involutus* and mycorrhizal birch seedlings. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 61-67
- Bonfil C (1998) The effects of seed size, cotyledon reserves, and herbivory on seedling survival and growth in *Quercus rugosa* and *Q. laurina* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 85: 79–87

- Bougher NL, Grove TS, Malajczuk N (1990) Growth and phosphorus acquisition of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. *New Phytologist* 114: 77-85
- Boukeim H, Conventi S, Mousain D (2002) Ectomycorrhization de *Cedrus atlantica* en conditions contrôlées: efficacité de deux formes d'inoculum mycélien. *Annals of Forest Science* 59: 839-846
- Breitenbach J, Kranzlin F (2005) *Fungi of Switzerland*. (vol. 6) Russulaceae. Mykologia Verlag, Lucerne
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL (2002) Host specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do the Exceptions Tell Us? *Integrative and Comparative Biology* 45:352-359
- Bruns TD, Shefferson RP (2004) Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Canadian Journal of Botany* 82: 1122-1132
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 145: 311-320
- Brundrett MC (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495
- Brundrett MC, Malajczuk N, Mingquin G, Daping X, Snelling S, Dell B (2005) Nursery inoculation of *Eucalyptus* seedlings in Western Australia and Southern China using spores and mycelial inoculum of diverse ectomycorrhizal fungi from different climatic regions. *Forest Ecology and Management* 209: 193-205
- Burgess T, Dell B and Malajczuk N (1994) Variation in mycorrhizal development and Growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytologist* 127: 731-739.
- Castellano MA (1994) Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. in Pflieger FL, Linderman RG (ed.): *Mycorrhizae and plant health.*, The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 261-281
- Chen YL, Kang LH, Dell B (2006) Inoculation of *Eucalyptus urophylla* with spores of *Scleroderma* in a nursery in south China: Comparison of field soil and potting. *Forest Ecology and Management* 222: 439-449
- Cheng S, Widden P, Messier C (2005) Light and tree size influence belowground development in yellow birch and sugar maple. *Plant and Soil* 270 : 321-330
- Clowes FAL (1951) The structure of mycorrhizal roots of *Fagus sylvatica*. *New Phytologist* 50:1-16
- Colpaert et al. (1992) The growth of extramatrical mycelium and the growth response of *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* 120: 127-137
- Conjeaud C, Schreromm P, Muosain D (1996) Effect of ectomycorrhiza and phosphorus on maritime pine seedlings (*Pinus pinaster*). *New Phytologist* 133: 345-351
- Cordell CE, Marx DH (1994) Effects of Nursery Cultural Practices on Management of Bareroot Tree Seedlings. in Pflieger FL, Linderman RG (ed.): *Mycorrhizae and plant health.*, The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 133-151
- Coutts MP, Nicol BC (1989) Growth and survival of shoots, roots, and mycorrhizal mycelium in clonal Sitka spruce during the first growing season after planting. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 861-868
- Croghan CF (1984) Survey for mycorrhizal fungi in lake states tree nurseries. *Mycologia* 76: 951-953
- Cullings K, Raleigh Ch, New MH, Henson J (2005) Effects of Artificial Defoliation of Pines on then Structure and Physiology of the Soil Fungal Community of a Mixed Pine-Spruce Forest. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1996-2000
- Cuvelier J-J (1991) Characterization of birch ectomycorrhizae (II): *Laccaria amethystea* and *Russula ochroleuca*. *Belgian Journal of Botany* 124: 195-203.

- Deacon JW, Donaldson J, Last FT (1983) Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant and Soil* 71: 257-262
- Dehlin H, Nilsson MC, Wardle DA (2004) Effects of shading and humus fertility on growth, competition, and ectomycorrhizal colonization of boreal forest tree seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 2573-2586
- Dey DC, Parker WC (1997) Morphological indicators of stock quality and field performance of red oak (*Quercus rubra* L.) seedlings underplanted in a central Ontario shelterwood. *New Forests* 14: 145-156
- Dickie IA, Koide RT, Steiner KC (2002) Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition and growth of *Quercus rubra* seedlings. *Ecological Monographs* 74: 505-521
- Dickie IA, Xu B, Koide RT (2002) Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* 156:527-535
- Dixon, R.K.; Garrett, H.E., Stelzer, H.E. (1987) Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine progenies inoculated with three isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Silvae Genetica* 36: 240-245
- Dodd JC, Thomson BD (1994) The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149-158
- Domenech J, Ramos-Solano B, Probanza A (2004) *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 194 : 293-303
- Dosskey MG, Lindermann RG, Boersma L (1990) Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytologist* 115: 269-274
- van Driessche I, Piérart P (1995) Ectomycorrhization et état sanitaire du hêtre et du chêne en Forêt de Soignes. *Belgian Journal of Botany* 128: 57-70
- Duchesne LC (1994) Role of The Ectomycorrhizal Fungi in Biocontrol., in Pflieger FL, Linderman RG (ed.): *Mycorrhizae and plant health*. The American Phytopathological Society, Minnesota, 27-46
- Dugassa GD, von Alten H, Schönbeck F (1996) Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant & Soil* 185: 173-182
- Dunabeitia M, Rodriguez N, Salcedo I (2004) Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque country. *Forest Ecology and Management* 195: 129-139
- Egerton-Warburton L, Allen MF (2001) Endo- and ectomycorrhizas in *Quercus agrifolia* Nee. (Fagaceae): patterns of root colonization and effects on seedling growth. *Mycorrhiza* 11: 283-290
- Erland S, Jonsson T, Mahmood S, Finlay RD (1999) Below-ground ectomycorrhizal community structure in two *Picea abies* forests in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Forest Research* 14: 209-217
- Finlay RD, Frostegrad A, Sonnerfelt AM (1992) Utilization of organic and inorganic sources by mycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dough ex Loud. *New Phytologist* 120: 105-115
- Fiore-Donno AM, Martin F (2001) Population of ectomycorrhizal *Laccaria amethystea* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization pattern in a mixed forest. *New Phytologist* 152: 533-542
- Fleming LV (1984) Effects of trenching and coring on the formation of ectomycorrhizas on birch seedlings grown around mature trees. *New Phytologist* 98: 143-153
- Fleming LV (1985) Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (*Betula* sp.) seedling root systems. *Soil. Biol. Biochem* 17: 591-600
- Frankland JC, Harrison AF (1985) Mycorrhizal infection of *Betula pendula* and *Acer pseudoplatanus*: relation with seedling growth and soil factors. *New Phytologist* 101: 133-151

- Fries N (1983) Spore germination, homing reaction, and intersterility groups in *Laccaria laccata* (Agaricales). *Mycologia* 75: 221-227
- Gagné A, Jany JL, Bousquet J, Khasa DP (2006) Ectomycorrhizal fungal communities of nursery-inoculated outplanted on clear-cuts in northern Alberta. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 1684-1694
- Gagnon J, Langlois CG, Garbaye J (1991) Growth and ectomycorrhiza formation of container-grown red oak seedlings as a function of nitrogen fertilization and inoculum type of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Forest Research* 21: 966-973
- Garbaye J, Churin JL (1997) Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. *Forest Ecology and Management* 98: 221-228
- Gardes M, Bruns T (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118
- Gardes M, Bruns TD (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74: 1572-1583
- Gebauer G, Taylor AFS (1999) ¹⁵N natural abundance in fruit bodies of different functional groups of fungi in relation to substrate utilization. *New Phytologist* 142: 93–101.
- Geritz SAH, Gyllenberg M, Yan P (2006) Plant growth and the optimal sharing of photosynthetic products with a mycorrhizal symbiont. *Evolutionary Ecology Research* 8:577-590
- Gernns H, von Alten H, Poehling HM (2001) Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen - is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11: 237-243
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA (1999) High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* 8: 2003-2013
- Gianinazzi, S. & Vosátka, M. (2004) Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems, science meets business. *Canadian Journal of Botany* 82: 1264–1271.
- Gibson, F, Deacon JW (1990) Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of nitrogen and phosphorus in relation to successions. *Mycological Research* 94: 166-172.
- Godbout C, Fortin JA (1983) Morphological features of synthesized ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. A. rugosa*. *New Phytologist* 94: 249-262
- Godbout C, Fortin JA (1985) Synthesized ectomycorrhizas of aspen: fungal genus level of structural characterization. *Canadian Journal of Botany* 63: 252-262
- Godbout C, Fortin JA (1990): Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grown white pine seedlings., *Mycological Research* 94: 1051-1058
- González-Ochoa AI, Heras J, Torres P, Sánchez-Gomez E (2003) Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of Forest Science* 60: 43-48
- Göransson H, Wallander H, Ingerslev M, Rosengren U (2006) Estimating the relative nutrient uptake from different soil depths in *Quercus robur*, *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Plant Soil*: 286: 87-97
- Grydler M, Baláž M, Hršelová H, Jansa J, Vosátka M (2004) Mykorhizní symbiosa. Academia, Praha
- Guerin-Laguette A, Matsushita N, Lapeyrie F (2005) Successful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15: 301-305
- Hansen L, Knudsen H (ed.)(2000) Nordic Macromycetes, Vol. 1. Nordsvamp, Copenhagen

- Harrington TJ, Mitchell DT (2002) Colonization of root systems of *Carex flacca* a *C. pilulifera* by *Cortinarius* (*Dermocybe*) *cinnamomeus*. *Mycological Research* 106: 452-459
- Harley JL, Harley EL (1987) A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* 105: 1-102
- Hahn C, Agerer R (1999) Studies on the *Paxillus involutus*-complex. *Nova Hedwigia* 69: 241-310
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1996) *Ainsworth & Bisby's: Dictionary of Fungi*. CAB International, Wallingford, UK
- van der Heijden EW, Kuyper TW (2001) Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? *Plant and Soil* 230: 161-174
- van der Heijden EW (2001b) Differential benefits of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal infection of *Salix repens*. *Mycorrhiza* 10: 185-193
- van der Heijden EW, Kuyper TW (2003) Ecological strategies of ectomycorrhizal fungi of *Salix repens*: root manipulation versus root replacement. *Oikos* 103: 668-680
- Henry LK (1933) Mycorrhizas of trees and shrubs. *Bot. Gaz.* 94: 791-800 (sek cit. in Smith et REad 1997, Smith et al. 1998)
- Hibbett DS (2006) A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia* 98: 917-925
- Hogberg MN, Hogberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791-795
- Honig K, Riefler M, Kottke I (2000) Survey of *Paxillus involutus* (Batch) Fr. Inoculum and fruitbodies in a nursery by IGS-RFLPs and IGS sequences. *Mycorrhiza* 9: 315-322
- Horak E (2005) *Rohlinge und Blatterpilze in Europa.*, Elsevier, Munchen
- Horton TR, Bruns TD (1998) Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytologist* 139: 331-339
- Hruška J. and E. Cienciala [eds.](2003) *Long-term acidification and nutrient degradation of forest soils – limiting factors of forestry today.* Czech Ministry of Environment, Prague.
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV (1990) *Identification of ectomycorrhizas.* ITE research publication no.5, HMSO, London
- Johnson NC, Grahame JH, Smith FA (1997) Functioning of mycorrhizal association along mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585
- Jones MD, Durall MD, Tinker PB (1990) Phosphorus relationships and production of extramatrical hyphae by two types of willow ectomycorrhizas at different soil phosphorus levels. *New Phytologist* 115: 259-267
- Jones MD, Smith SE (2004) Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? *Canadian Journal of Botany* 82: 1089-1109
- Jonsson L, Dahlberg A, Nilsson MC, Karén O, Zackrisson O (1999) Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forest studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist* 142: 151-162
- Jonsson LM, Nilsson MC, Wardle DA, Zackrisson O (2001) Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93: 353-364

- Julich (1984) Die Nichtblatterpilze, Gallertpilze und Bauchpilze, Kleine Kryptogamenflora, Band IIb/1. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Kavková M, Čurn V, Kubátová B, Figura J (2007a) Effect of inoculation of oak seedlings with *Paxillus involutus* (Batch.) and Fr. and *Laccaria laccata* (Scop. ex Fr.) Cke. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae* 23: 82-95
- Kavková M, Čurn V, Kubátová B, Desprez-Loustau, Dutech C, Marcas B (2007b) Oak powdery mildew (*Microsphaera alphitoides*): Biology, epidemiology and potential control in Europe. *Communicationes Instituti Forestalis Bohemicae* 23: 73-81
- Kennedy PG, Bruns TD (2005) Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* 166: 631-638
- Khasa PD, Sigler L, Chakravarty P, Dancik BP, Erickson L, McCurdy D (2001) Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare root nursery conifer seedlings. *New Forests* 22:179-197
- Kolb TE, Dodds KA, Clancy KM (1999) Effect of western spruce budworm defoliation on the physiology and growth of potted Douglas-fir seedlings. *Forest Science* 45:280-291
- Kope HH, Fortin JA (1990) Germination and comparative morphology of basidiospores of *Pisolithus arrhizus*. *Mycologia* 82: 350-357
- Kranabetter JM (2004) Ectomycorrhizal community effect on hybrid spruce seedling growth and nutrition in clearcuts. *Canadian Journal of Botany* 82: 983-991
- Kropp BR (1997) Inheritance of the ability for ectomycorrhizal colonization of *Pinus strobus* by *Laccaria bicolor*. *Mycologia* 89: 578-585
- Kropp BR, Mueller GM (1999) *Laccaria*. in Cairney JWG, Chambers SM [ed.]: *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile*. Springer
- Kubát K, Hroudá L, Chrtek J jun., Kaplan Z, Kirschner J, Štěpánek J [eds.] (2002) *Klíč ke květeně České Republiky*. Academia, Praha
- Kumar A, Shukla A, Hashmi S (2007) Effect of trees on colonization of intercrops by vesicular arbuscular mycorrhizae in agroforestry systems. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 77: 291-298
- Lamahedi MS, Gobout C, Fortin JA (1994) Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobus* seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1797-1804
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 248-254
- LePage BA, Currah RS, Stockey RA, Rothwell GW (1996) Fossil mycorrhizae from the middle eocene. *American Journal of Botany* 84: 410-412
- Lepšová A. (2001) Ectomycorrhizal root system of naturally established Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) seedlings from different microhabitats – forest floor and coarse woody debris. *Silva Gabreta* 7: 223-234.
- Leuschner C, Hertel D, Coners H, Büttner V (2001) Root competition between beech and oak: a hypothesis. *Oecologia* 126:276-284
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Lovett GM (2001) Ectomycorrhizal aboveground community change over an atmospheric nitrogen gradient. *Ecological Application* 11: 397-410
- Lindahl BD, Taylor AFS (2004) Occurrence of N-acetylhexosaminidase-encoding genes in ectomycorrhizal basidiomycetes. *New Phytologist* 164: 193-199

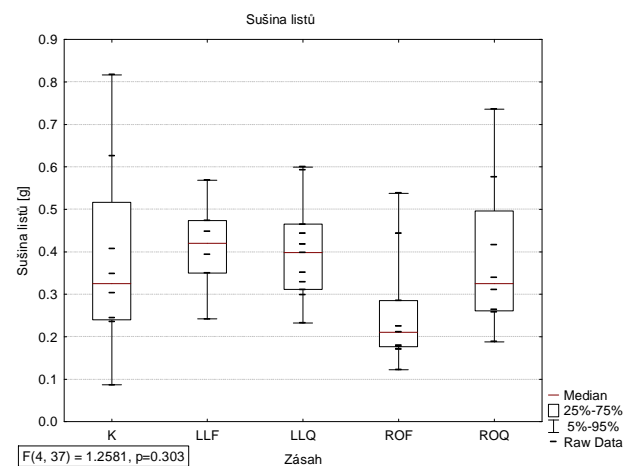
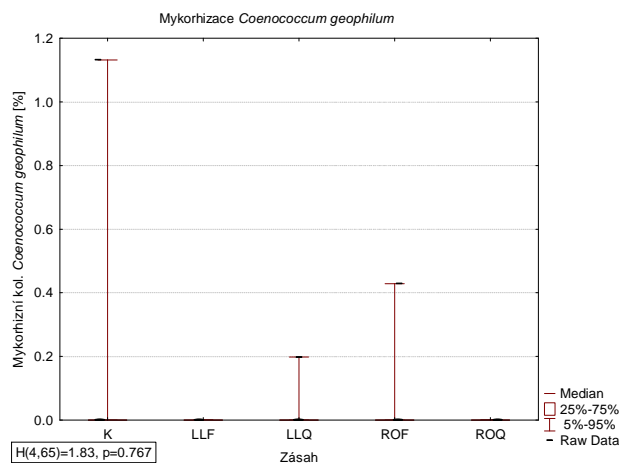
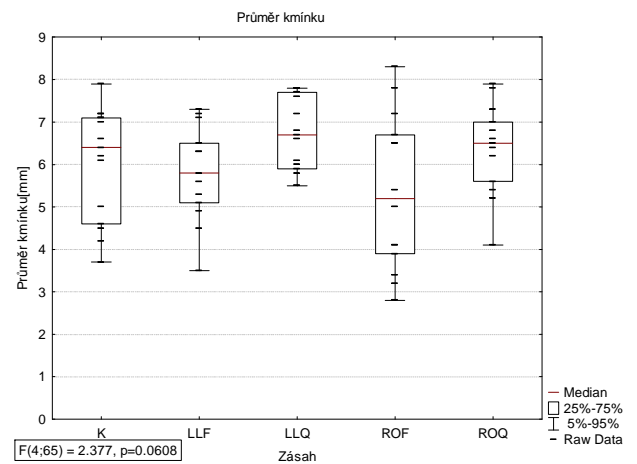
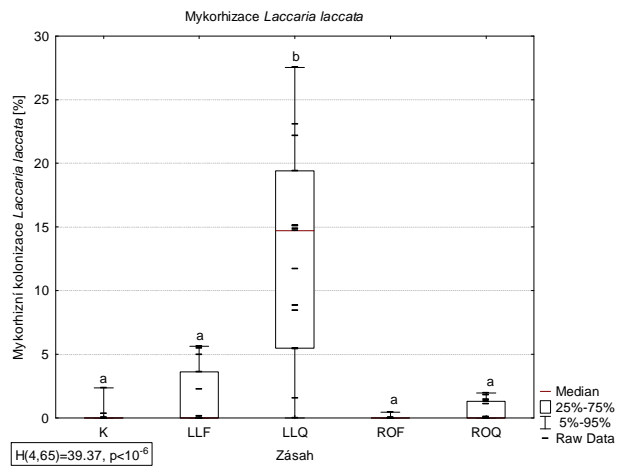
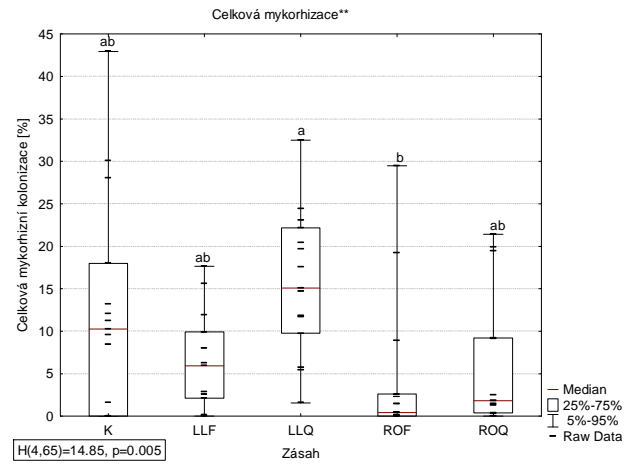
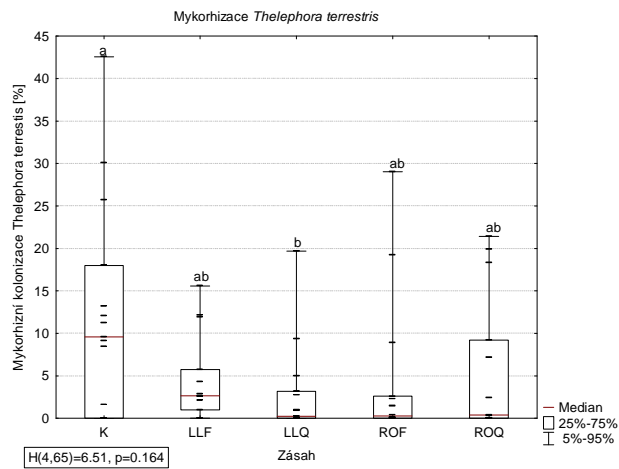
- Lu X, Malajczuk N, Dell B (1998) Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 8:81-86
- Lunt PH, Hedger JN (2003) Effects of Organic Enrichment of Mine spoil on Growth and Nutrient Uptake in Oak Seedlings Inoculated with Selected Ectomycorrhizal Fungi. *Restoration Ecology* 11:125-130
- Malajczuk N, Redell P, Brundrett M (1994) Role of Ectomycorrhizal Fungi in Minesite Reclamation. in Pflieger FL, Linderman RG (ed.) *Mycorrhizae and plant health.*, The American Phytopathological Society, Minnesota, 133-151
- Martin F, Delaruelle C, Ivory M (1998) Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Afzelia* in lowland Kenyan forests. *New Phytologist* 139: 341–352
- Martinez-Amores E, Valdes M, Quintos M (1991) Seedling growth and ectomycorrhizal colonization of *Pinus patula* and *P. radiata* inoculated with spores of *Helvella lacunosa*, *Russula brevipes* and *Lycoperdon perlatum*. *New Forests* 4: 237-245
- Marx DH, Maul SB, Cordell CE (1992) Application of specific ectomycorrhizal fungi in world forestry., in Leatham GF (ed.) *Frontiers in industrial mycology.*, Chapman and Hall, New York, pp. 78-98 (sek. citace Cordell et Marx 1994)
- Mason PA, Wilson J, Last FT, Walker C (1983) The concept of succession in relation to the spread of seathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings grown in unsterile soils. *Plant and Soil* 71: 247-256
- Mason PA, Ibrahim K, Ingleby K, Munro RC, Wilson J (2000) Mycorrhizal development of inoculated *Eucalyptus globulus* L. seedlings in wet and dry conditions in the glasshouse. *Forest Ecology and Management* 128: 269-277
- Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL, Unestam T (1999) Comparative studies of ectomycorrhiza formation in *Alnus glutinosa* and *Pinus resinosa* with *Paxillus involutus*. *Mycorrhiza* 8:228-240
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R (2005) Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33-41
- Menkis A, Vasiliauskas, Taylor AFS, Stenlid J, Finlay R (2007) Afforestation of abandoned farmland with conifer seedlings inoculated with three ectomycorrhizal fungi – impact on plant performance and ectomycorrhizal community., *Mycorrhiza* 17: 337-348
- Miller M, McGonigle T, Addy H (1994) An economic approach to evaluate the role of mycorrhizas in managed ecosystems. *Plant and Soil* 159: 27-35
- Molina R (1982) Use of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. I. Consistency between isolates in effective colonization of containerized conifer seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 12: 469-473
- Molina R., Massicotte H, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In Allen MF (ed.) *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungus process*, pp. 357-423. Chapman and Hall, New York
- Morin C, Samson J, Dessureault M (1999) Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 77: 169-174
- Mucha J, Dahm H, Werner A (2007) Influence of autoclaved saprotrophic fungal mycelia on proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 137–142
- Mueller GM (1991) *Laccaria laccata* complex in North America and Sweden: intercollection pairing and morphometric analyses. *Mycologia* 83: 578-594
- Mueller GM, Ammirati JF (1993) Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales) 2. Assessing phylogenetic-relationships among *Laccaria*, *Hydnagium*, and other Agaricales. *American Journal of Botany* 80: 322-329

- Mueller RC, Gehring CA (2006) Interactions between an above-ground plant parasite and below-ground ectomycorrhizal fungal communities on pinyon pine. *Journal of Ecology* 94: 276–284
- Palm ME, Stewart EL (1984) In vitro synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinations. *Mycologia* 76: 579-600
- Parladé J., Pera J, Alvarez IF (1996) Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* with spores of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6: 237-245
- Parladé J, Pera J, Luque J (2004) Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14: 171-176
- Pera J, Alvarez IF, Rincón A, Perladé J (1999) Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9:77-84
- Pešková V (2005) Dynamics of oak mycorrhizas. *Journal of Forest Science* 51:259-267
- Quian XM, Kottke L, Oberwinkler F (1998) Influence of liming and acidification on the activity of the mycorrhizal communities in a *Picea abies* (L.)Karst. *Stand. Plant and Soil* 199: 99-109
- Rayner ADM (1991) The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48-71
- Read DJ, Perez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157:475-492
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J (2004) Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82: 1243-1263
- Reddy MS, Natarajan K (1997) Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ (2001) Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* 10: 1025-1034
- Rincón A, Alvarez IF, Pera J (2001) Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271
- Richter DL, Bruhn JN (1989) Field survival of containerized red and jack pine seedlings inoculated with mycelial slurries of ectomycorrhizal fungi. *New Forests* 3: 247-258
- Rodrigues LD, Kasuya MCM, Borges AC (1999) Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza* 8: 263-266
- Romagnesi H (1996) *Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord*. A.R.G. Cantner, Vaduz.
- Rosado SCS, Kropp BR, Piché Y (1994) Genetics of ectomycorrhizal symbiosis I. Host plant variability and heritability of ectomycorrhizal and root traits. *New Phytologist* 126: 105-110
- Rosengren U, Göranson H, Jönsson U, Stjernquist I, Thelin G, Wallander H (2005) Functional biodiversity aspects on the nutritional sustainability in forests – importance of root distribution. *Journal of Sustainable Forestry* 21:75-98
- Rosling A, Ladeweert R, Lindahl BD, Larsson KH, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD (2003) Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159: 775-783
- Rudawska M, Leski T, Trocha LK, Gornowitz R (2006) Ectomycorrhizal status of Norway spruce seedlings from bare-root forest nurseries. *Forest Ecology and Management* 236: 375-384
- Ruiz-Diez B, Rincon AM, de Felipe MR, Fernandez-Pascual M (2006) Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from Central Spain for the selection of fungal inoculants. *Mycorrhiza* 16: 465-474

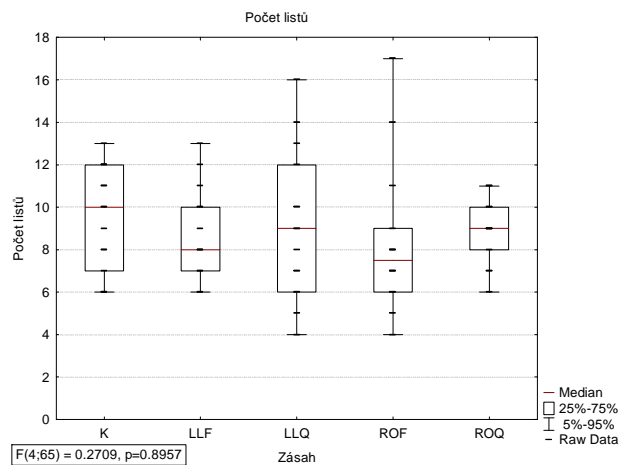
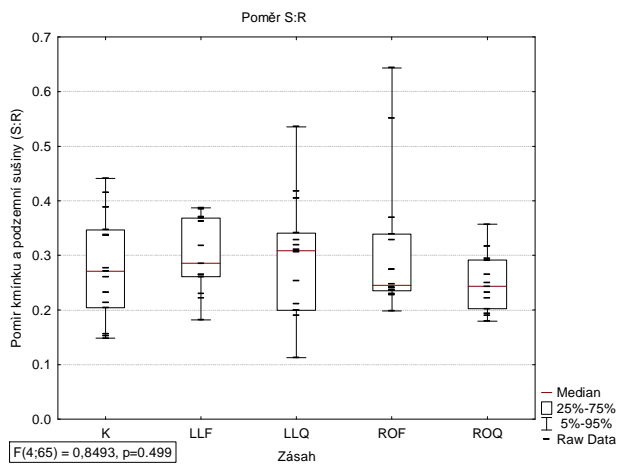
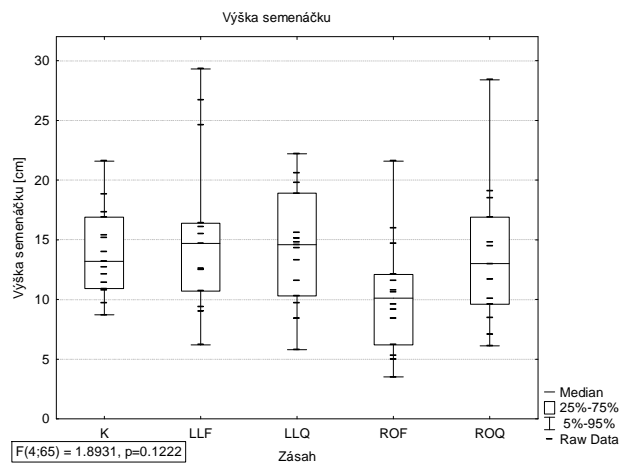
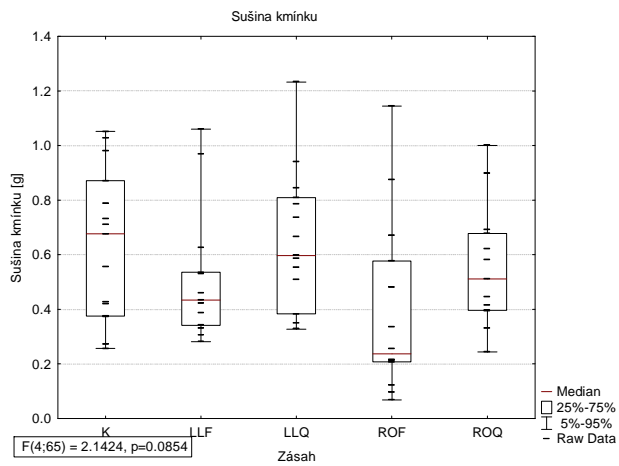
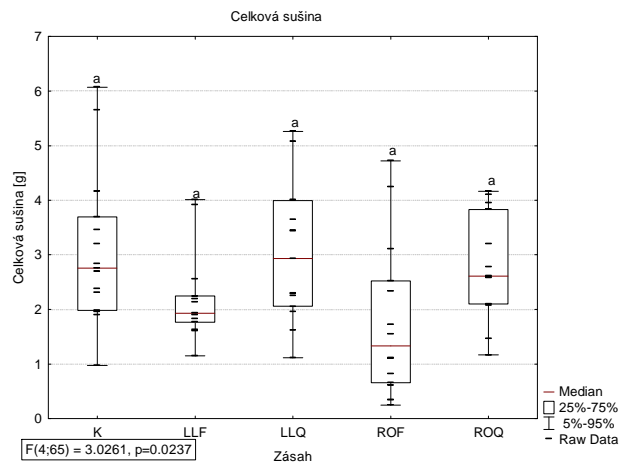
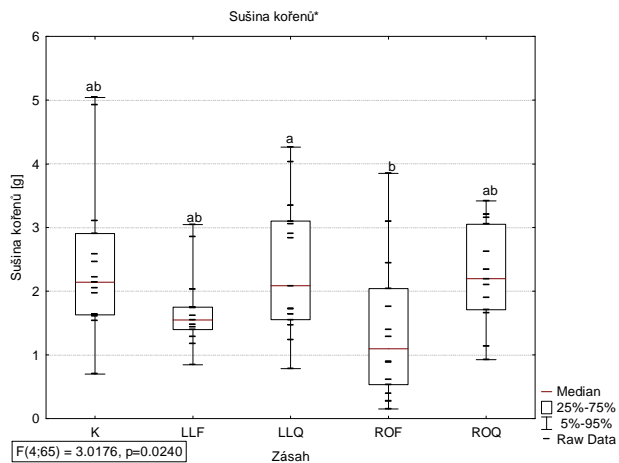
- Saikkonen K, Ahonenen-Janarath U, Mrakkola AM, Helander M, Tuomi J, Roitto M, Ranta H (1999) Defoliation and mycorrhizal symbiosis: a functional balance between carbon sources and below-ground sinks. *Ecology Letters* 2: 19-26
- Sanders IR, Koide RT, Shumway DL (1993) Mycorrhizal stimulation of plant parasitism. *Canadian Journal of Botany* 71: 1143-1146
- Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JWG (2001) Distribution and persistence of *Amanita muscaria* genotypes in Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycological Research* 105: 966-970
- van Scholl L, Keltjens WG, Hoffland E, van Breemen N (2005) van Scholl L, Keltjens WG, Hoffland E, van Breemen N. *Forest Ecology and Management* 215: 352-360
- Schwartz MW, Hoeksema JD, Gehring CA, Johnson NC, Klironomos JN, Abbott LK, Pringle A (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecology Letters* 9: 501-515
- Selosse MA, Bouchard D, Martin F (2000) Effect of *Laccaria bicolor* strains inoculated on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) several years after nursery inoculation. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 360-371
- Selosse MA, Martin F, Le Tacon F (2001) Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir. *Mycological Research* 105: 524-531
- Selosse MA, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology* 47: 416-426.
- Singer R (1986) *Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein
- Simard SW, Durall DM, (2004) Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82: 1140-1165
- Sinclair WA, Cowles DP, Hec SM (1975) *Fusarium* root rot of Douglas-fir seedlings: suppression by soil fumigation, fertility management and the fungal symbiont *Laccaria laccata*. *Forest Science* 21: 390-399
- Smith SF, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition. Academic Press, Cambridge
- Smith JE, Johnson KA, Cazáres (1998) Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 7 :279-285
- Soukup F.(2005) Oak mildew – possibilities of its control. *Journal of Forest Science* 51: 195-202
- de Souza LAB, Filho GNS, de Oliveira VL (2004) Eficiência de fungos ectomicorrizacos na absorcao de fosforo e na promocao do crescimento de eucalipto. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 349-355
- Swaty RL, Gehring CA, van Ert M, Theimer TC, Keim P, Whitham TG (1998) Temporal variation in temperature and rainfall differentially affects ectomycorrhizal colonization at two contrasting sites. *New Phytologist* 139: 733-739
- Tateishi T, Yokoyama K, Kohno N, Okabe H, Marumoto T (2003) Estimation of Mycorrhizal Colonization of the Roots of Oak Seedlings Inoculated with an Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria amethystea*. *Soil Science and Plant Nutrition* 49: 641-645
- Thompson BD, Grove TS, Malajczuk N, Hardy GSJ (1994) The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing growth of *Euclyptus globulus* Labill., in relation to root colonisation and hyphal development in soil. *New Phytologist* 126: 517-524

- Tonkin CM, Malajczuk N, McComb JA (1989) Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytologist* 111: 209–214
- Tuomi J, Kytoviita MM, Hardling R (2001) Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos* 92: 62-70
- Tyler G (1984) Macrofungi of Swedish Beech Forest. Department of Plant Ecology, University of Lund, Sweden
- Tyler G (1994) Spatial sporophore pattern of ectomycorrhizal fungi in hornbeam (*Carpinus betulus* L.) forest. *Forest Ecology and Management* 65: 165-170
- Úradníček L (2004): *Lesnická dendrologie II (Angiospermae)*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno
- Villeneuve N, La Tacon F, Bouchard D (1991) Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil* 135: 95-107
- Walker RF (2001) Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. *Forest Ecology and Management* 149: 163-179
- Walker RF, McLaughlin SB, West DC (2004) Establishment of sweet birch on surface mine spoil as influenced by mycorrhizal inoculation and fertility. *Restoration Ecology* 12: 8-19
- Wallander H, Göransson H, Rosengren U (2004) Productin, standing biomass and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ abundance of ectomycorrhizal mycelia at different soil depths in spruce forests and mixed (spruce–oak) forests in southern Sweden. *Oecologia* 139: 89-97
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299–363
- Weiss M (1991) Studies on ectomycorrhizae XXXIII. Description of three mycorrhizae synthesized on *Picea abies*. *Mycotaxon* 40: 53-77
- Werner A, Zadworny M, Idzikowska K (2002) Interaction between *Laccaria laccata* and *Trichoderma virens* in co-culture and in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* in vitro. *Mycorrhiza* 12: 139-145
- Werner A, Zadworny M (2003) In vitro evidence of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris* in vitro. *Mycorrhiza* 13: 41-47
- Wilson JW, Harley JL (1983) The development of mycorrhiza on seedlings of *Fagus sylvatica* L. *New Phytologist* 95: 673-695
- Wu, B., Nara, K. & Hogetsu, T. 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9: 151–159.
- Wurtzburger N, Bledsoe CS (2001) Comparison of ericoid and ectomycorrhizal colonization and ectomycorrhizal morphotypes in mixed conifer and pygmy forests on the northern California coast. *Canadian Journal of Botany* 79: 1202-1210
- Yokoyama J, Fukuda T, Tsukaya H (2005) Molecular identification of the mycorrhizal fungi of the epiparasitic plant *Monotropastrum humile* var. *glaberrimum* (Ericaceae). *Journal of Plant Research* 118: 53-56

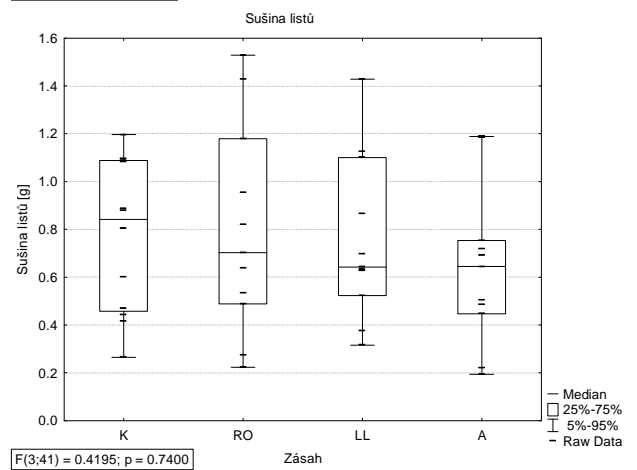
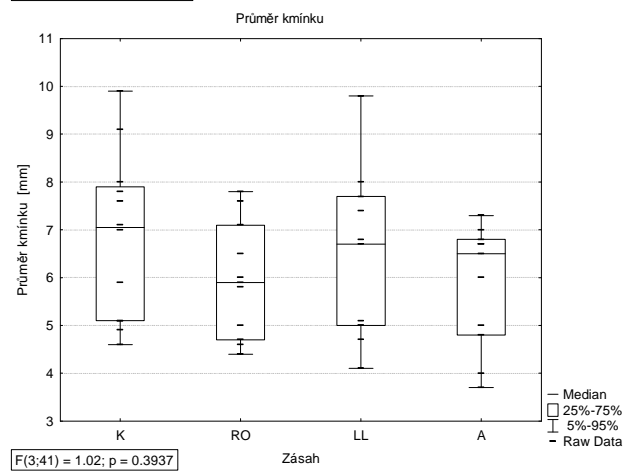
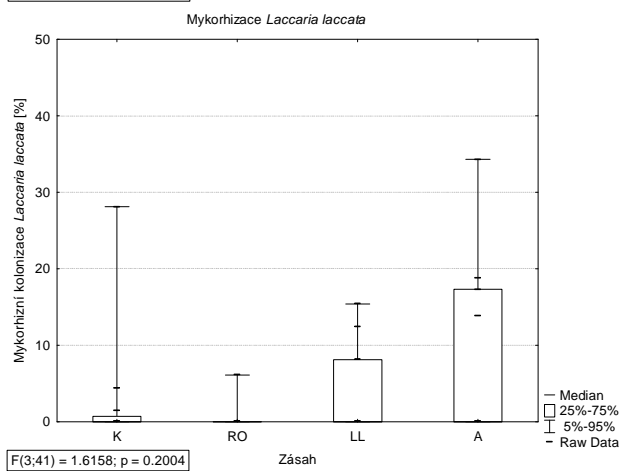
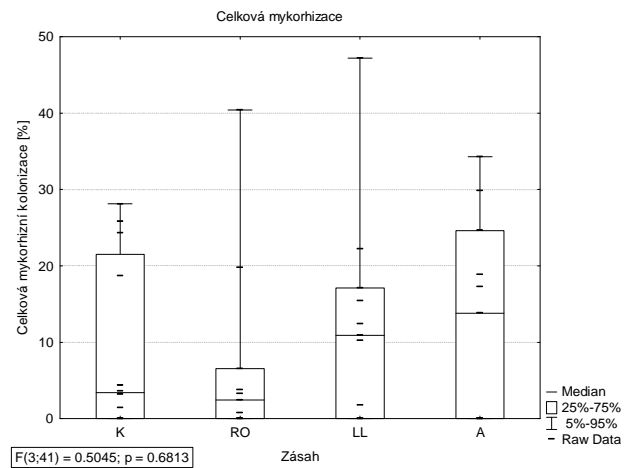
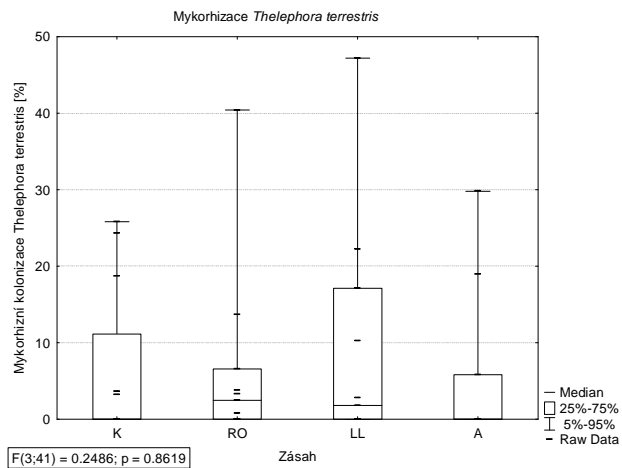
Příloha 1 (Tabulky a Grafy)



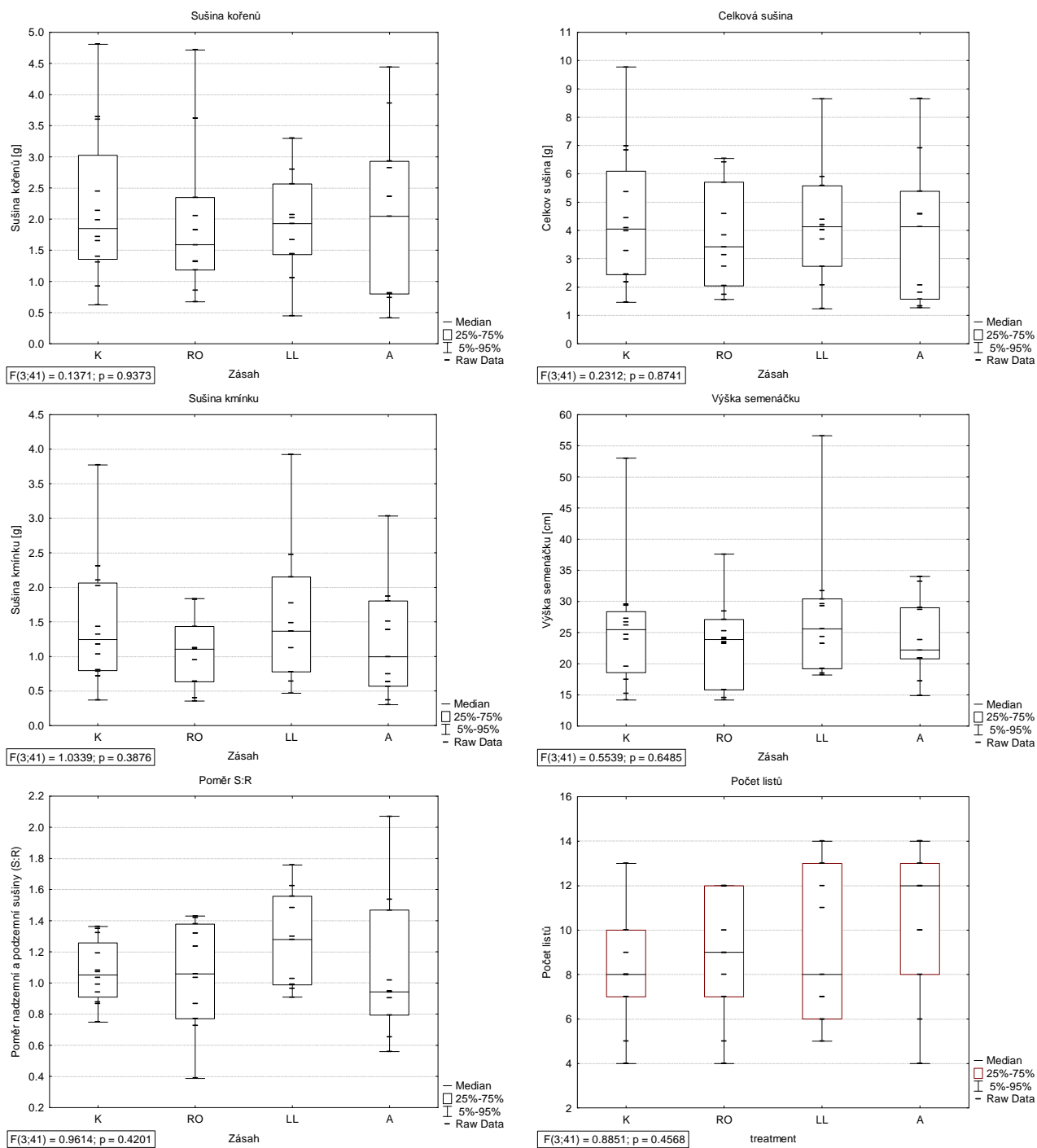
Obr. P1.1a: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 2 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, LLF, LLQ: jednotlivé kmeny *Laccaria laccata*, ROF, ROQ: jednotlivé kmeny *Russula ochroleuca*)



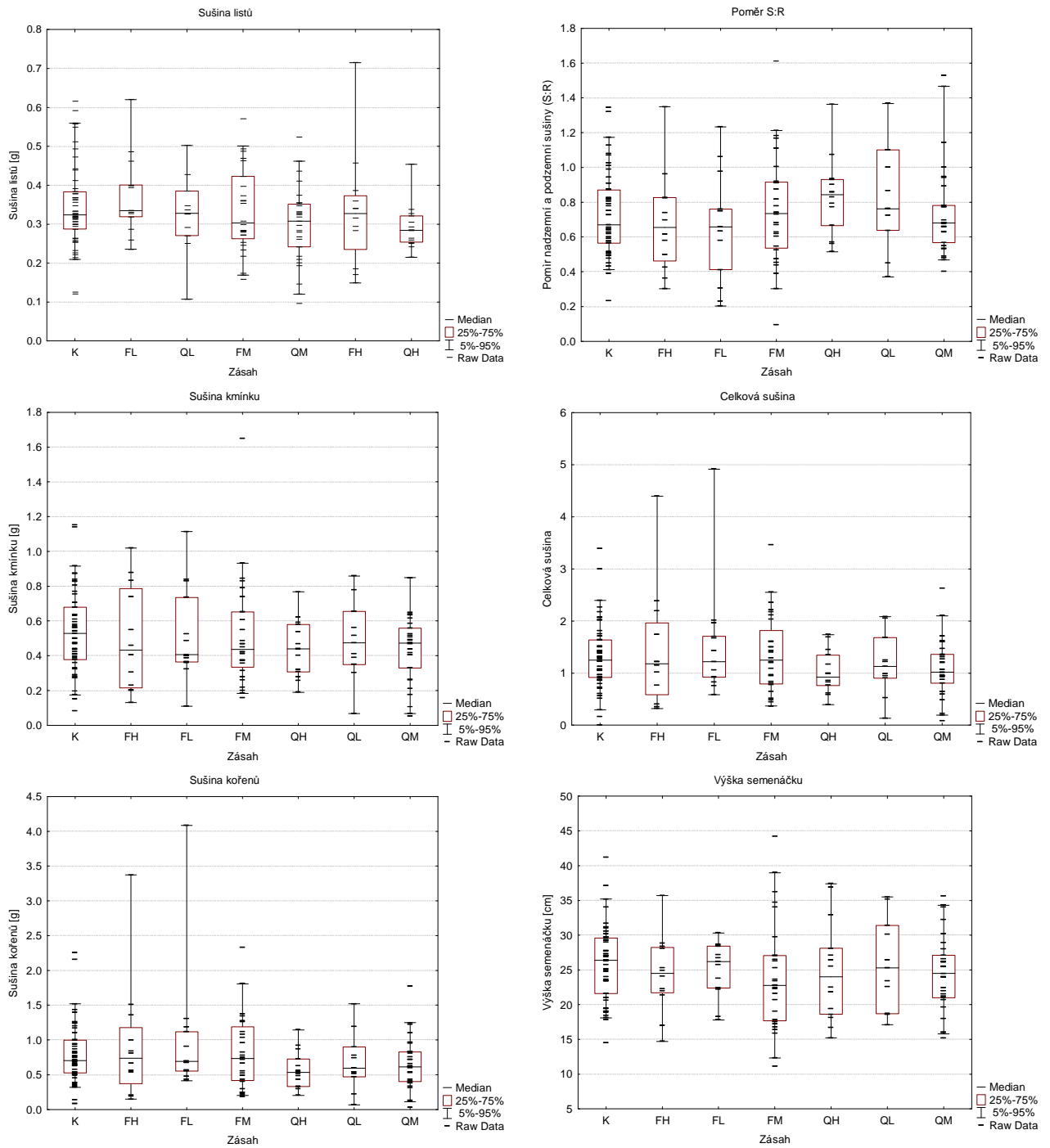
Obr. P1.1b: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 2 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, LLF, LLQ: jednotlivé kmeny *Laccaria laccata*, ROF, ROQ: jednotlivé kmeny *Russula ochroleuca*)



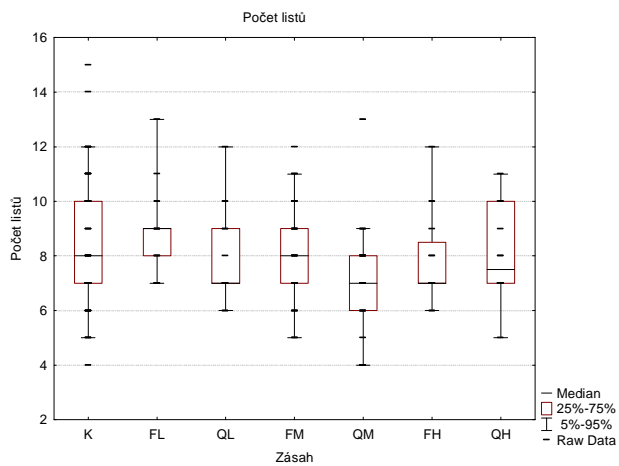
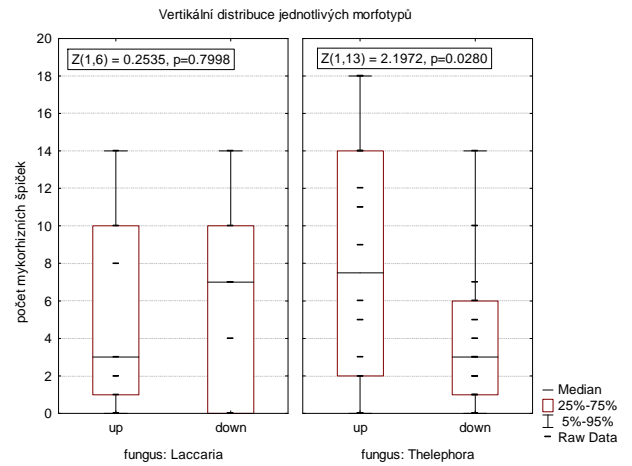
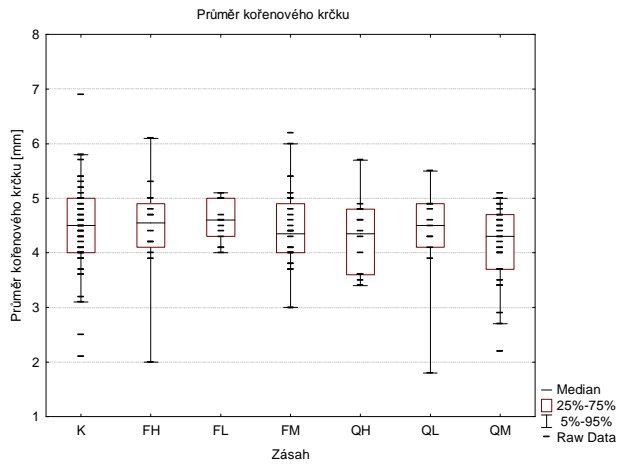
Obr. P1.2a: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 1 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, RO: inokulace *Russula ochroleuca*, LL: inokulace *Laccaria laccata*, A: koinokluace *R. ochroleuca* a *L. laccata*)



Obr. P1.2b: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 1 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, RO: inokulace *Russula ochroleuca*, LL: inokulace *Laccaria laccata*, A: koinokluace *R. ochroleuca* a *L. laccata*)

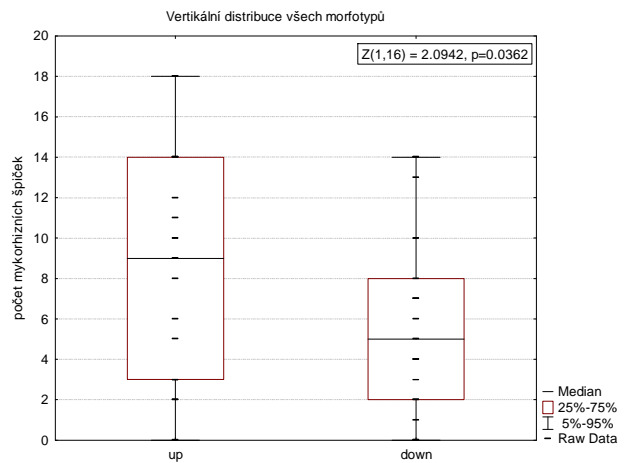


Obr. P1.3a: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 2 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, F: inokulace *Laccaria laccata* kmen LLF, Q: inokulace *Laccaria laccata* kmen LLQ, H: koncentrace inokula 1:12.5, M: konc. inok. 1:25, L: konc. inok 1:12.5)

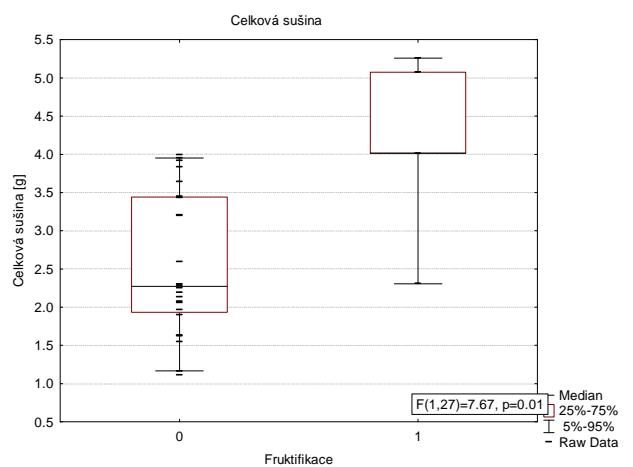
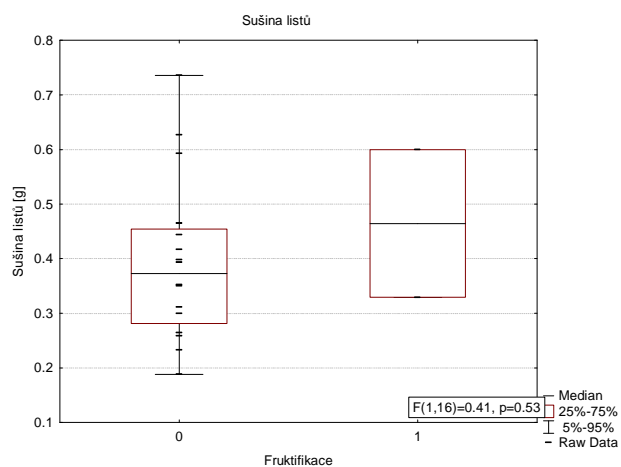
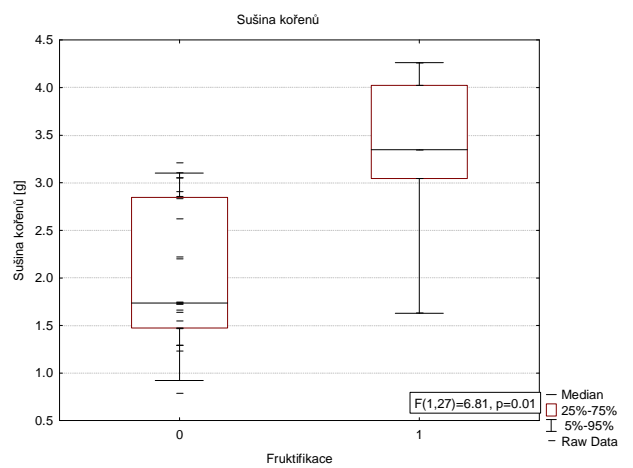
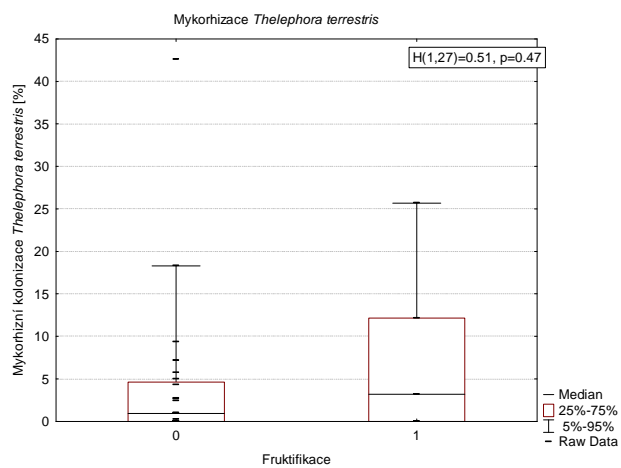
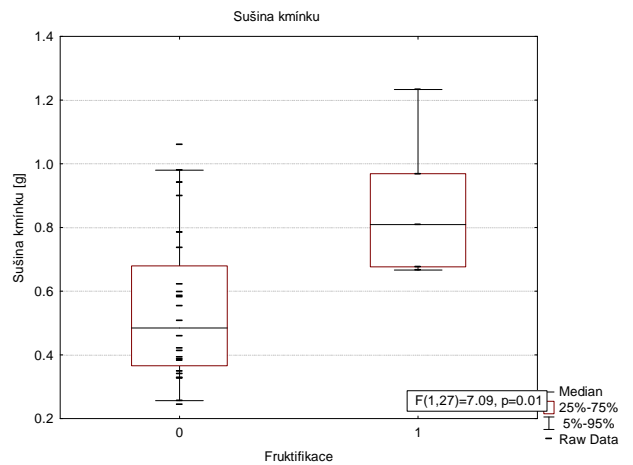
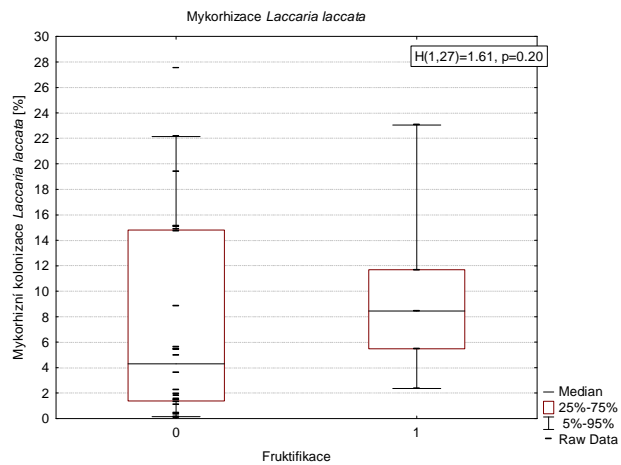


Obr. P1.4: Box and Whisker diagram pro vertikální distribuci mykorrhiz *Laccaria laccata* a *Thelephora terrestris* v Pokusu 2 (Legenda: up - do 5cm, down - pod 5cm)

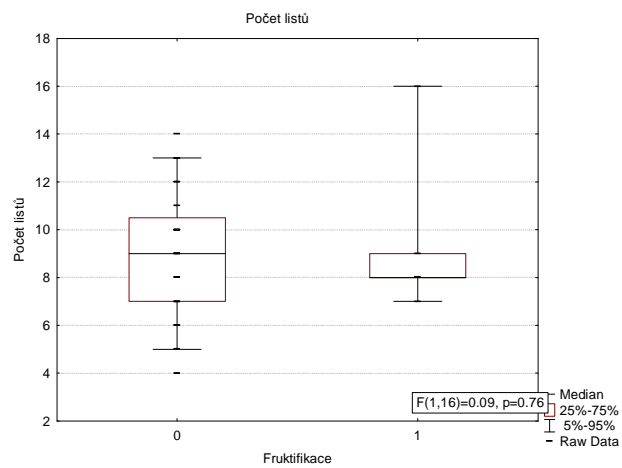
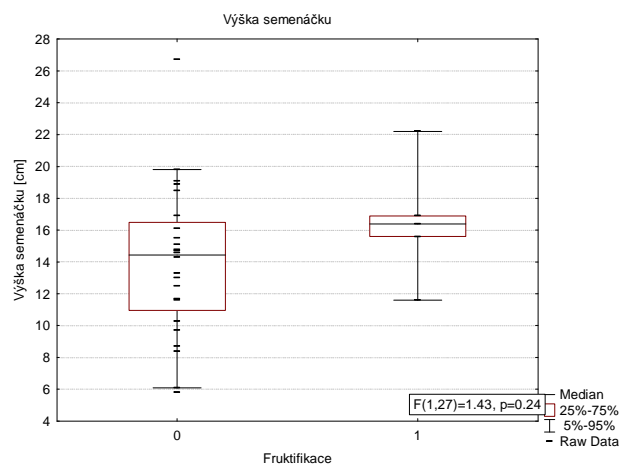
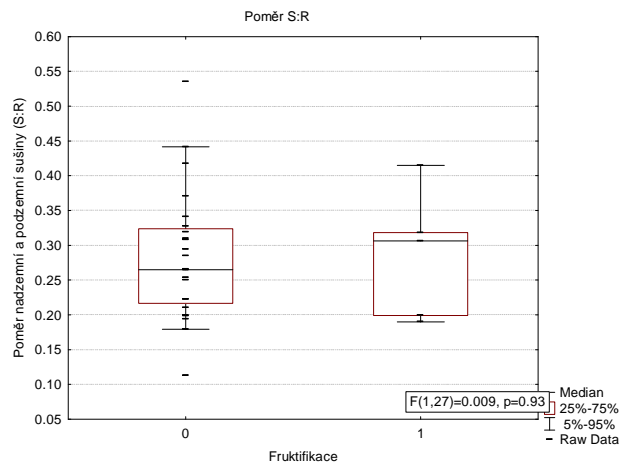
Obr. P1.3b: Box and Whisker diagramy pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 2 (Legenda: K: neinokulovaná kontrola, F: inokulace *Laccaria laccata* kmen LLF, Q: inokulace *Laccaria laccata* kmen LLQ, H: koncentrace inokula 1:12.5, M: konc. inok. 1:25, L: konc. inok 1:12.5)



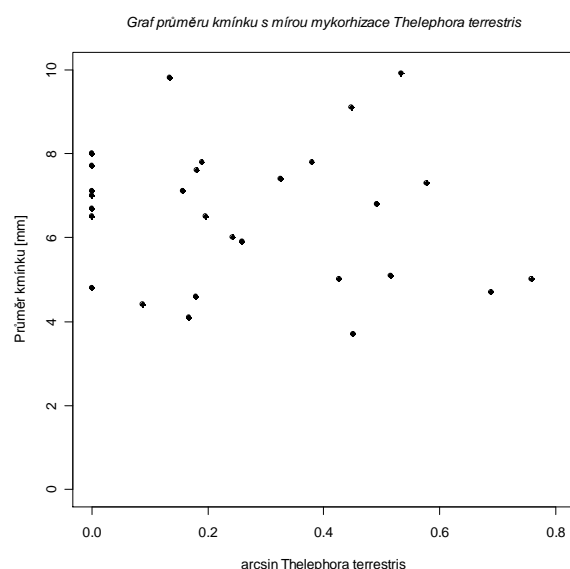
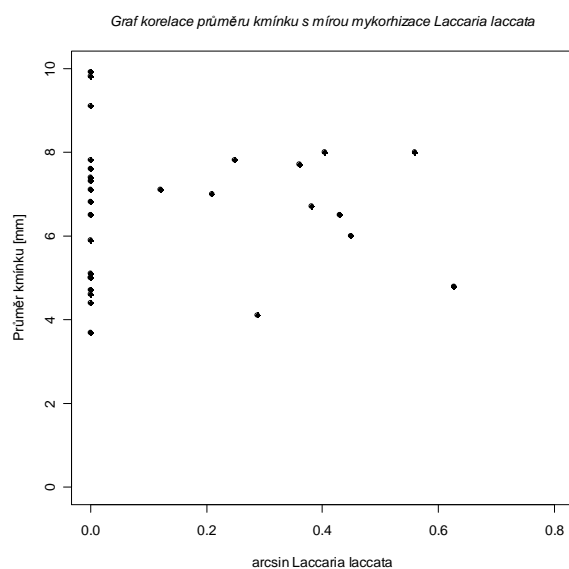
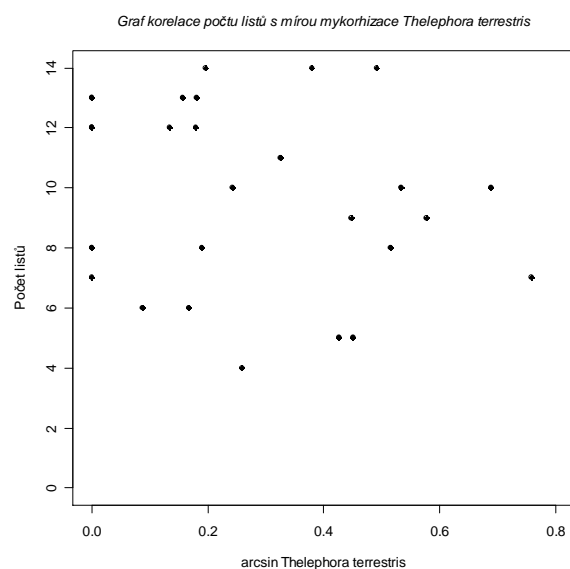
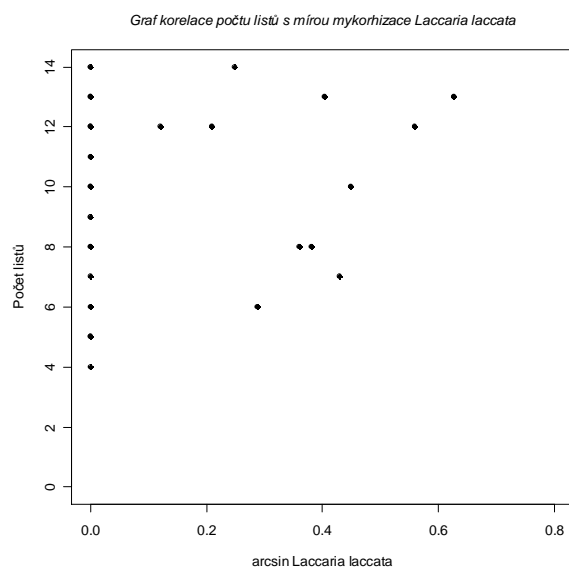
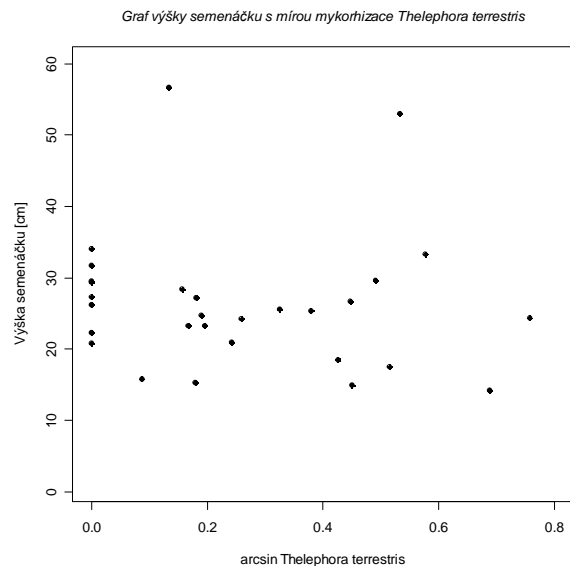
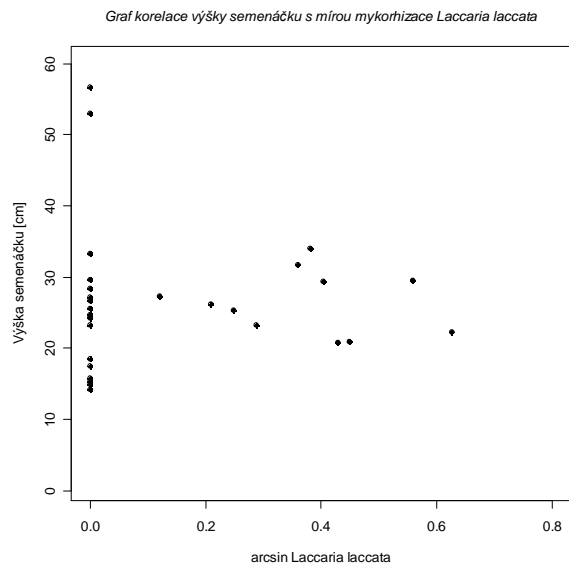
Obr. P1.5: Box and Whisker diagram pro vertikální distribuci všech mykorrhiz dohromady v Pokusu 2 (Legenda: up - do 5cm, down - pod 5cm)



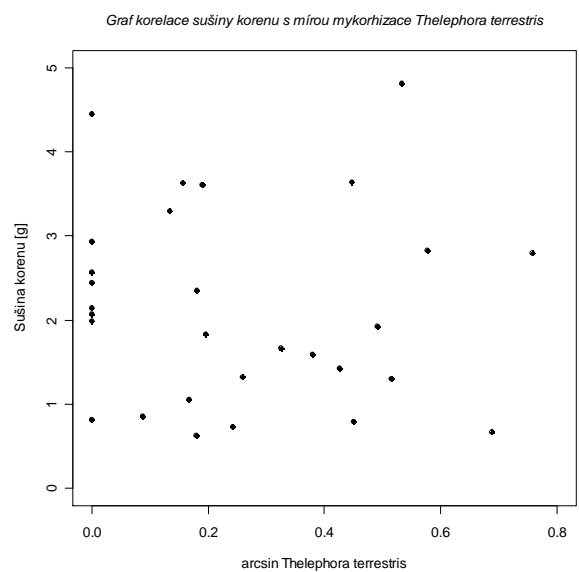
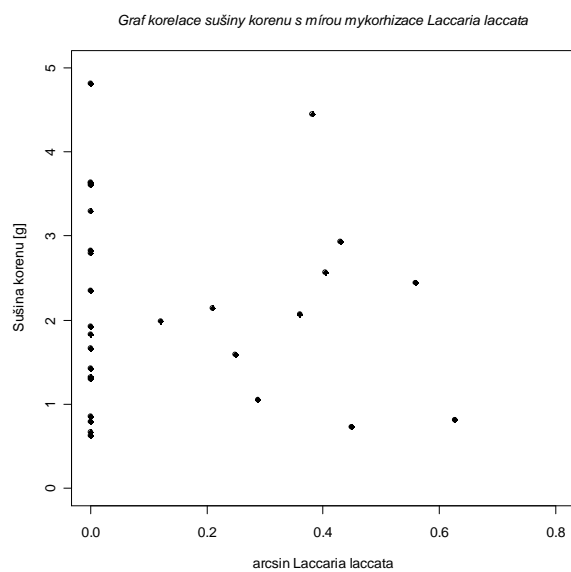
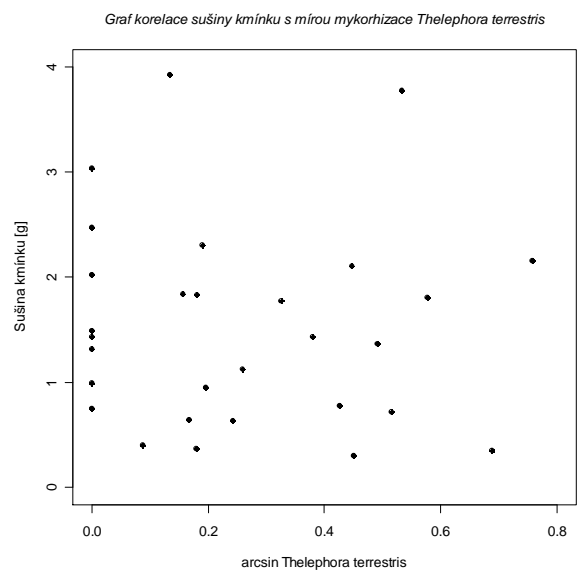
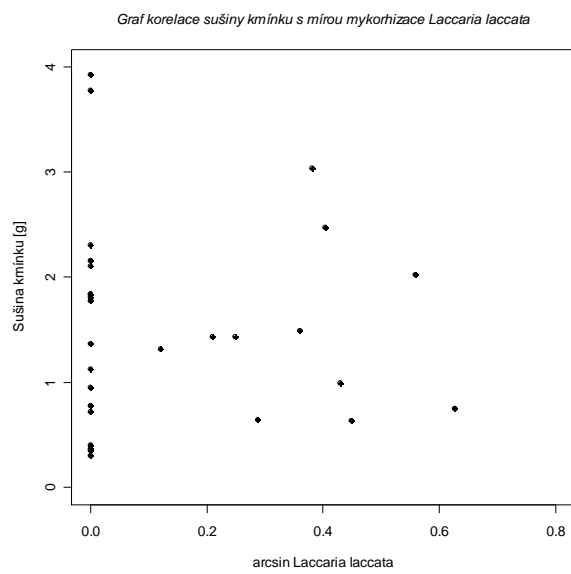
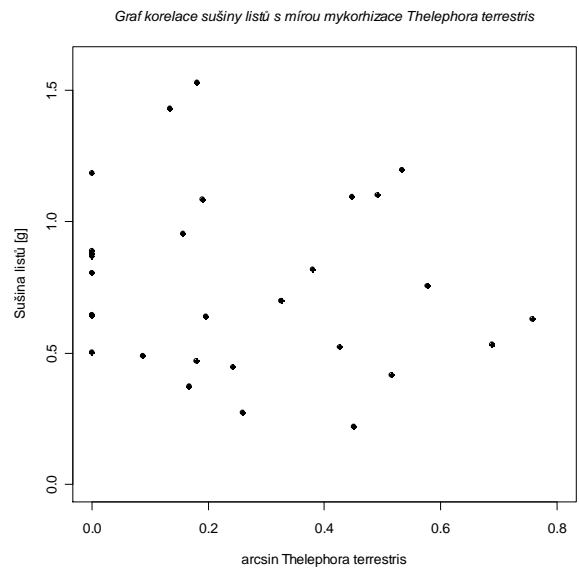
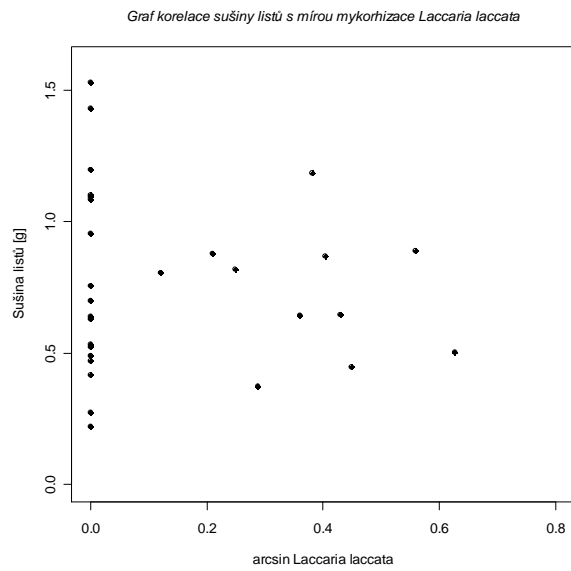
Obr P1.6a: Box and Whisker diagrams pro růstové charakteristiky semenáčků v Pokusu 2, rozdělené na základě přítomnosti (1) nebo nepřítomnosti (0) fruktifikace *Laccaria laccata*



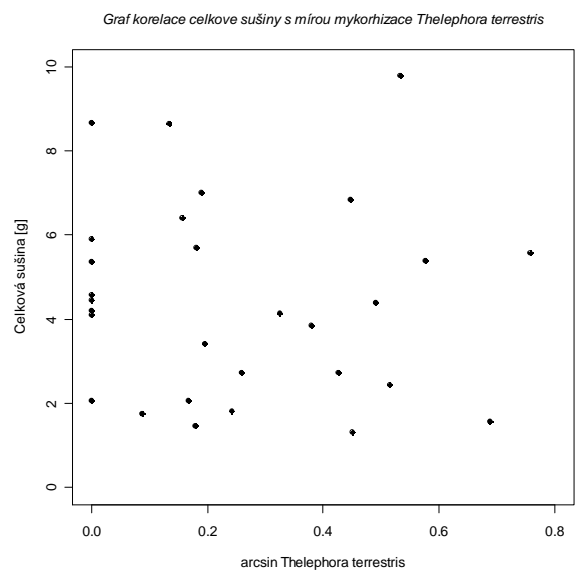
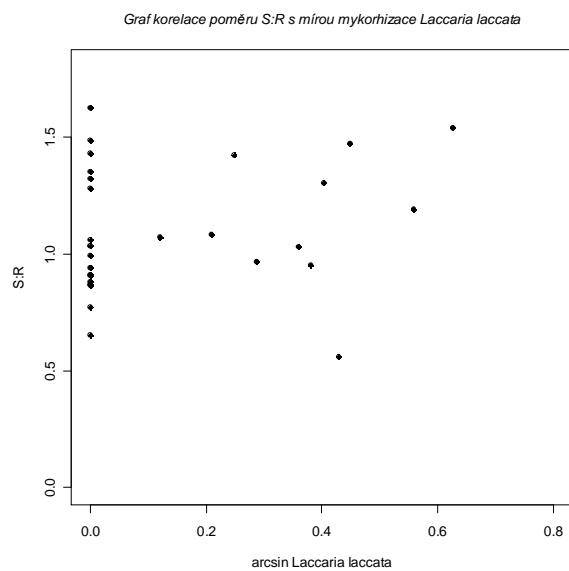
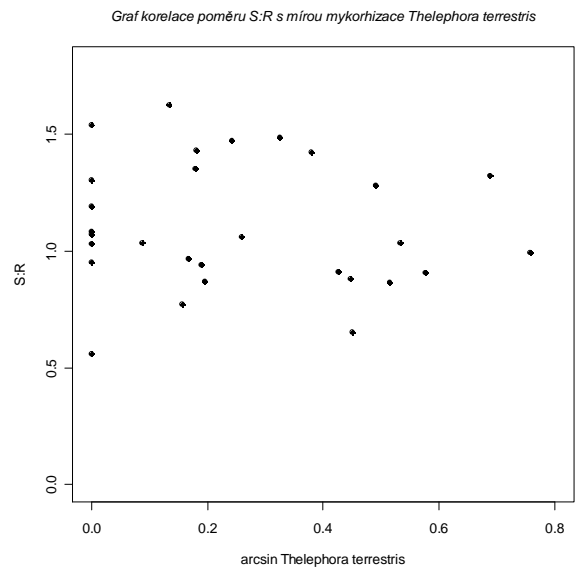
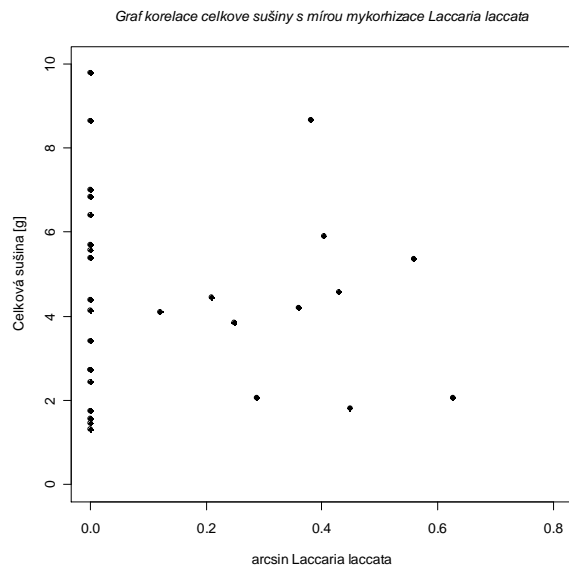
Obr P1.6b: Box and Whisker diagramy pro růstové charakteristiky semenáčků v Pokusu 2, rozdělené na základě přítomnosti (1) nebo nepřítomnosti (0) fruktifikace *Laccaria laccata*)



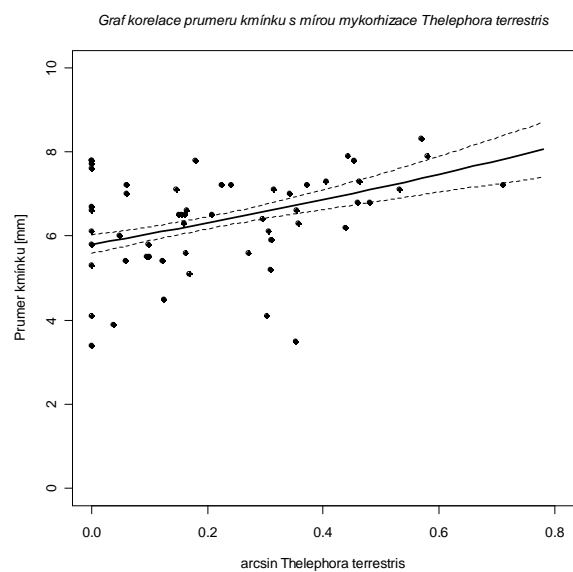
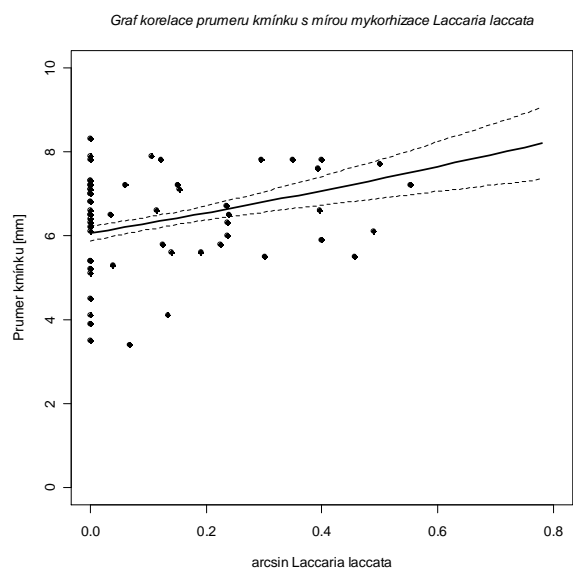
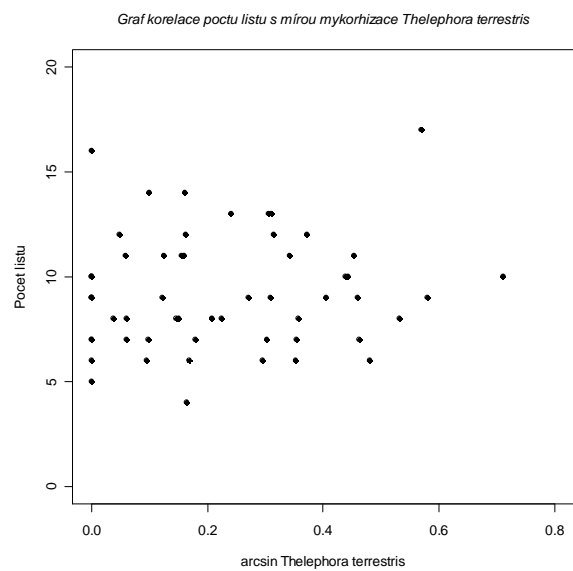
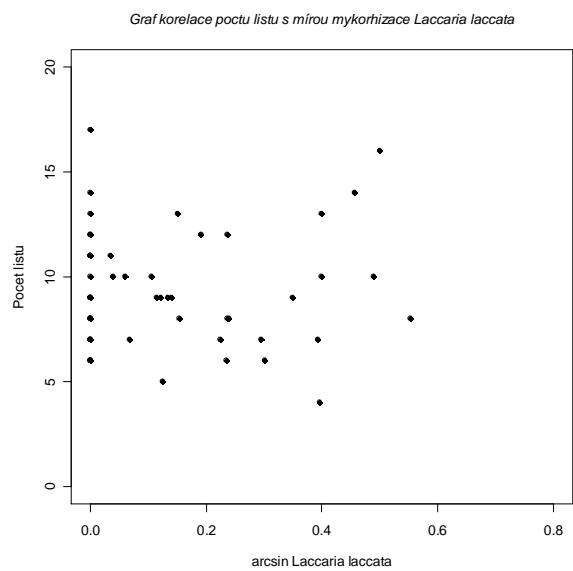
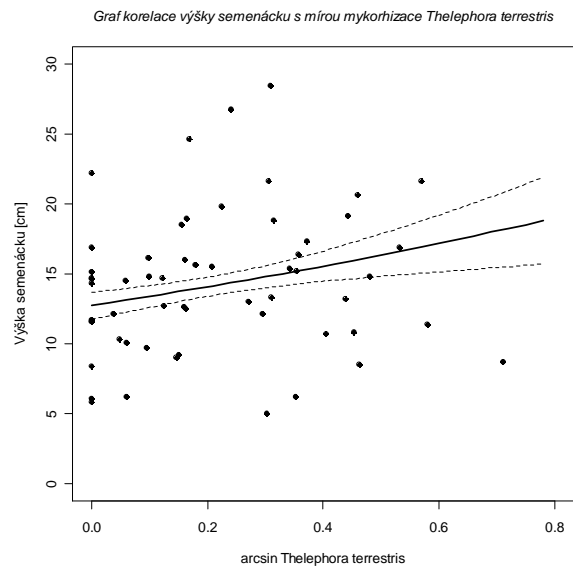
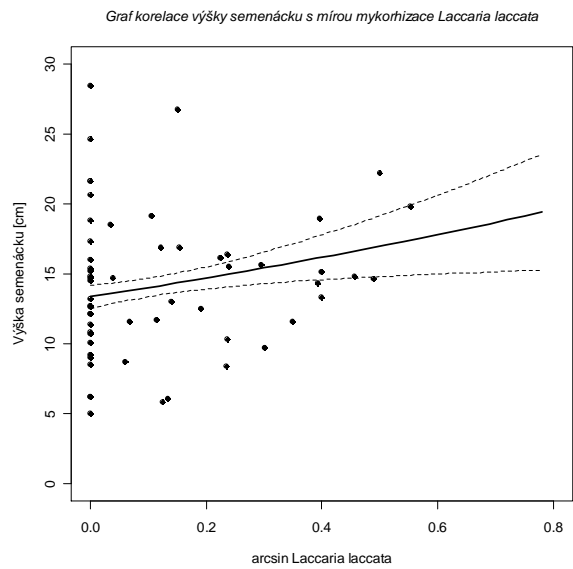
Obr. P1.7a: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami mírou kolonizace určitým dominantním morfotypem v Pokusu 1



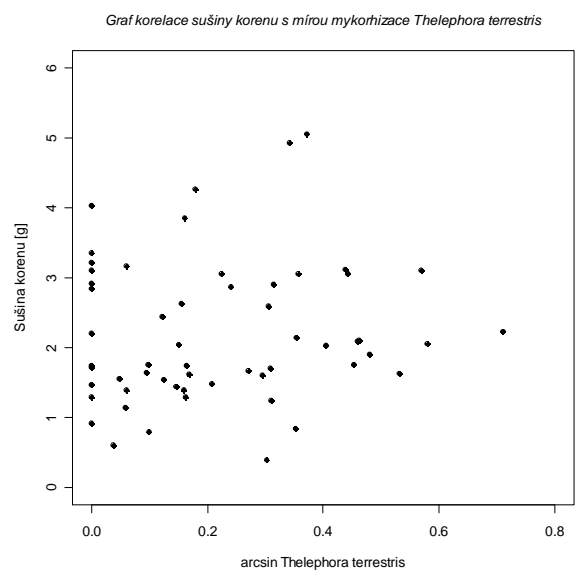
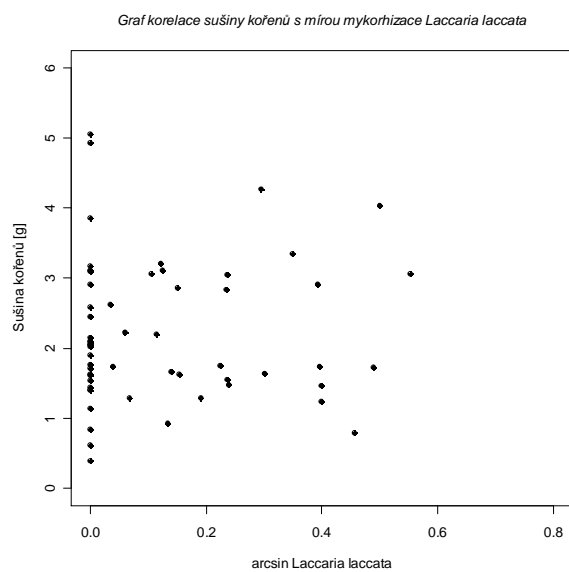
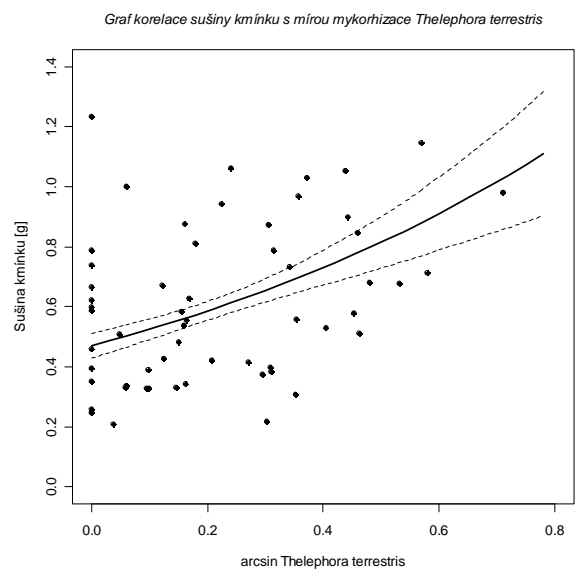
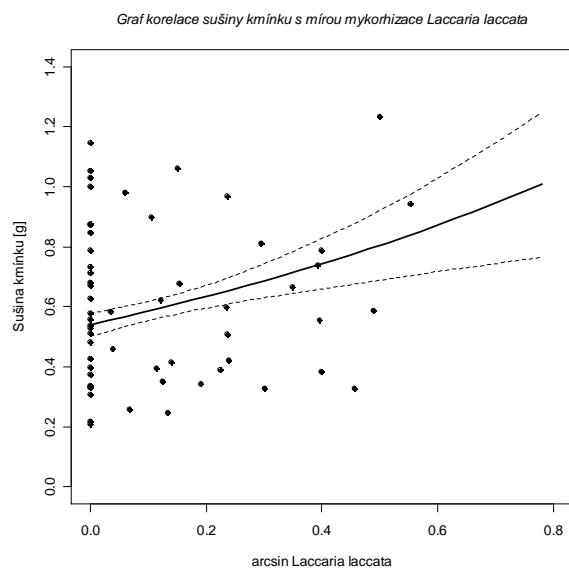
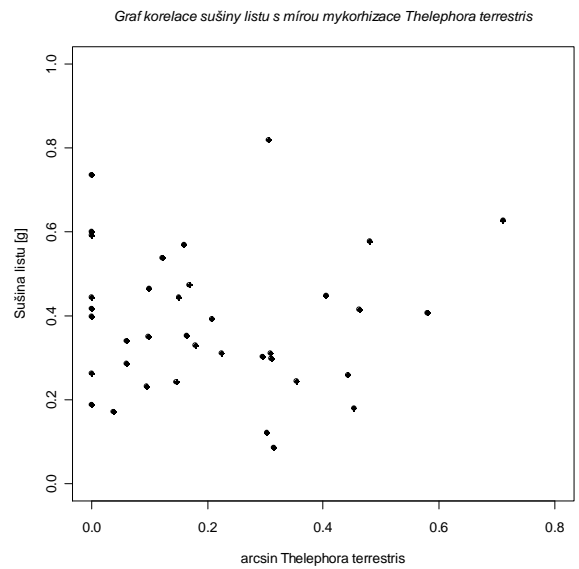
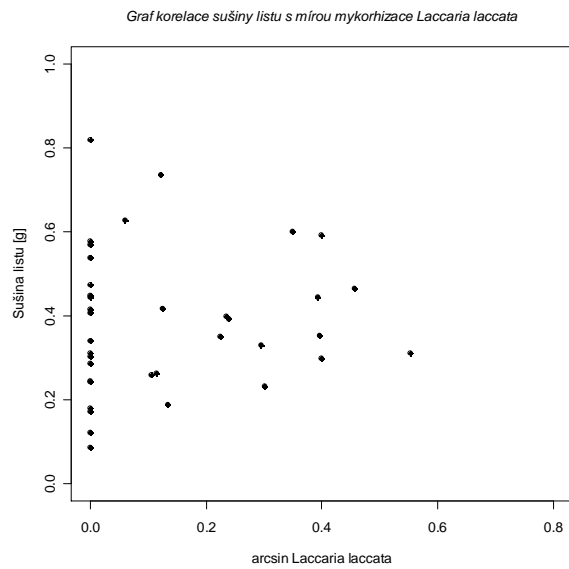
Obr. P1.7b: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami mírou kolonizace určitým dominantním morfotypem v Pokusu 1



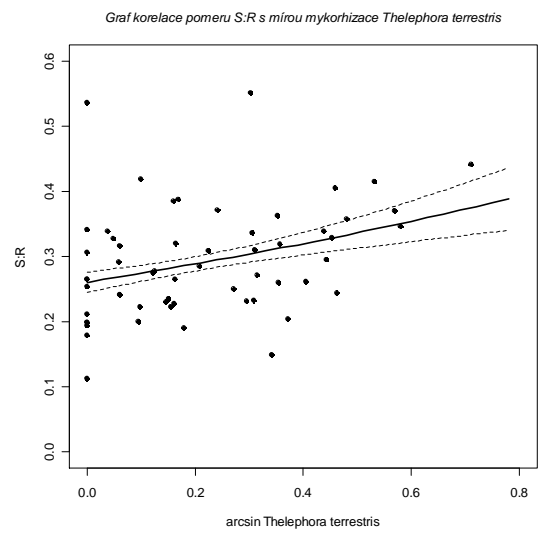
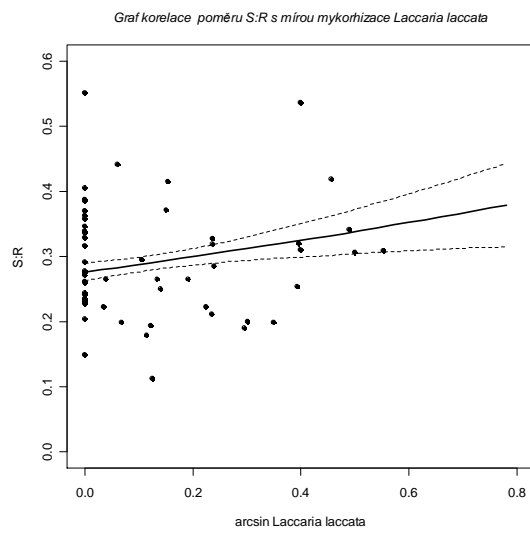
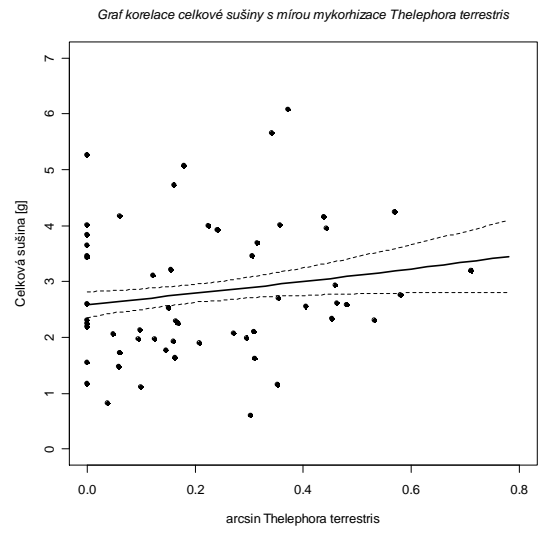
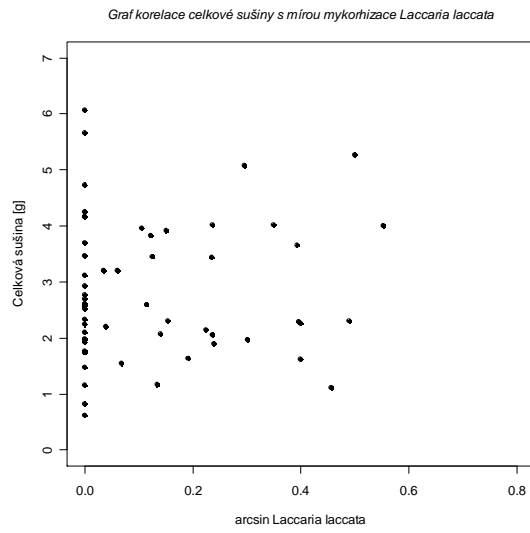
Obr. P1.7c: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami mírou kolonizace určitým dominantním morfotypem v Pokusu 1



Obr. P1.8a: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami a mírou kolonizace určitým dominantním morforem v Pokusu 2



Obr. P1.8b: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami mírou kolonizace určitým dominantním morfotypem v Pokusu 2



Obr. P1.8c: Grafy korelace mezi růstovými charakteristikami mírou kolonizace určitým dominantním morfotypem v Pokusu 2

	Listy [g]	Kmínek [g]	Kořeny [g]	Celk. suš. [g]
K	0.77	1.49	2.19	4.44
SD	0.32	0.94	1.24	2.43
RO	0.80	1.04	1.95	3.79
SD	0.44	0.51	1.22	1.81
LL	0.76	1.59	1.88	4.24
SD	0.34	0.99	0.81	2.01
RO+LL	0.64	1.20	2.00	3.84
SD	0.33	0.82	1.40	2.48
Celkem	0.74	1.33	2.01	4.09
SD	0.35	0.84	1.15	2.15

Tab. TP1.1: Průměrná hmotnost sušiny jednotlivých částí semenáčků a celková sušina pro jednotlivé zásahy v Pokusu 1. Hodnoty hmotnosti sušiny v prvním řádku, její směrodatná odchylka v druhém.

	Prům.km.[mm]	Počet listů	Výška [cm]	S:R
K	6.84	9.00	25.60	1.07
SD	1.74	2.76	10.13	0.20
RO	5.95	10.55	23.43	1.06
SD	1.20	3.33	6.83	0.34
LL	6.39	9.27	27.87	1.26
SD	1.76	3.35	10.71	0.31
RO+LL	6.84	9.00	25.60	1.07
SD	1.74	2.76	10.13	0.20
Celkem	6.27	9.33	25.27	1.12
SD	1.52	3.07	8.61	0.33

Tab. TP1.2: Průměrné růstové charakteristiky pro jednotlivé zásahy v Pokusu 1. Hodnoty Růstových charakteristik v prvním řádku, jejich směrodatné odchylky v druhém.

	AIC(LL)	AIC(TT)	AIC(ALL)
Sušina listů [g]	10.9	11.5	12.9
Sušina kmínku [g]	77.4	77.4	79.2
Sušina kořenů [g]	91.2	91.3	92.9
Celková sušina [g]	131.9	131.9	133.4
Průměr kmínku [mm]	115.9	116.5	117.6
Počet listů	149.2	149.9	151.2
Výška [cm]	210.3	210.6	212.2
S:R	20.7	21.1	21.1

Tab. TP1.3: Tabulka hodnot AIC pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 1 v modelech korelace mezi růstovými charakteristikami a mykorhizní kolonizací. AIC(LL) je AIC modelu s mírou kolonizace *Laccaria laccata* jako kovariátou, AIC(TT) je AIC modelu s mírou kolonizace *Thelephora terrestris* jako kovariátou, AIC(ALL) je AIC modelu s oběma zahrnutými proměnnými. Tučně jsou vyznačeny hodnoty AIC nižší než AIC odpovídajícího modelu zahrnujícího obě proměnné.

	Listy [g]	Kmínek [g]	Kořeny [g]	Celk. suš. [g]
LLQ	0,40	0,64	2,38	3,03
SD	0,12	0,26	1,05	1,23
LLF	0,41	0,51	1,71	2,22
SD	0,11	0,24	0,62	0,85
ROQ	0,39	0,55	2,26	2,82
SD	0,18	0,22	0,80	0,99
ROF	0,26	0,39	1,40	1,79
SD	0,14	0,32	1,12	1,42
K	0,39	0,63	2,38	3,02
SD	0,23	0,27	1,19	0,10
Celkem	0,37	0,55	2,05	2,60
SD	0,16	0,27	1,05	1,28

Tab. TP1.4: Průměrná hmotnost sušiny jednotlivých částí semenáčků a celková sušina pro jednotlivé zásahy v Pokusu 2. Hodnoty hmotnosti sušiny v prvním řádku, její směrodatná odchylka v druhém.

	Prům.km.[mm]	Poč. list.	Výška [cm]	S:R	S:R extr.
LLQ	6,72	9,07	14,33	0,30	0,42
SD	0,88	3,47	4,70	0,11	0,22
LLF	5,80	8,85	15,67	0,30	0,54
SD	1,14	2,23	7,11	0,07	0,13
ROQ	6,37	8,85	13,72	0,25	0,37
SD	1,08	1,52	6,08	0,05	0,10
ROF	5,35	8,36	10,33	0,31	0,66
SD	1,82	3,52	4,85	0,13	0,45
K	5,99	9,19	13,91	0,29	0,48
SD	1,31	2,44	3,61	0,10	0,18
Celkem	6,07	8,91	13,58	0,29	0,52
SD	1,34	2,72	5,47	0,10	1,86

Tab. TP1.5: Průměrné růstové charakteristiky pro jednotlivé zásahy v Pokusu 2. Hodnoty Růstových charakteristik v prvním řádku, jejich směrodatné odchylky v druhém.

	AIC(LL)	AIC(TT)	AIC(ALL)
Sušina listů [g]	-24.9	-24.7	-22.9
Sušina kmínku [g]	7.4	0.9	-1.9
Sušina kořenů [g]	161.4	161.0	162.3
Celková sušina [g]	183.3	184.4	184.0
Průměr kmínku [mm]	190.2	187.4	183.6
Počet listů	277.3	276.9	278.5
Výška [cm]	348.4	348.7	348.3
S:R	-123.5	-117.1	-124.2

Tab. TP1.6: Tabulka hodnot AIC pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 2 v modelech korelace mezi růstovými charakteristikami a mykorhizní kolonizací. AIC(LL) je AIC modelu s mírou kolonizace *Laccaria laccata* jako kovariátou, AIC(TT) je AIC modelu s mírou kolonizace *Thelephora terrestris* jako kovariátou, AIC(ALL) je AIC modelu s oběma zahrnutými proměnnými. Tučně jsou vyznačeny hodnoty AIC nižší než AIC odpovídajícího modelu zahrnujícího obě proměnné.

	Var(LL)	Var(TT)	Var(LL+TT)	Var(ALL)
Sušina listů [g]	-	-	-	-
Sušina kmínku [g]	0.92	11.33	6.88	19.13
Kořeny [g]	-	-	-	-
Celková sušina [g]	-	2.32	-	2.32
Průměr kmínku [mm]	2.42	6.96	6.30	15.67
Počet listů	-	-	-	-
Výška [cm]	1.48	2.22	2.52	6.22
S:R	0.38	10.80	4.24	15.42

Tab. TP1.7: Tabulka vysvětlené variability (procentický podíl modelem vysvětlené variability z celkové variability v datech, vyjádřená jako deviance) jednotlivými proměnnými v regresních modelech pro různé růstové charakteristiky v Pokusu 2. Var(LL): variabilita vysvětlená pouze mírou kolonizace *Laccaria laccata*, Var(TT): variabilita vysvětlená pouze mírou kolonizace *Thelephora terrestris*, Var(LL+TT): vysvětlená variabilita kterou nelze jednoznačně připsat ani jedné z obou proměnných, Var(ALL): celková variabilita vysvětlená modelem.

	Fruktifikace		p
	Ano	Ne	
Sušina listů [g]	0.46	0.39	0.53
SD	0.19	0.15	
Sušina kmínku [g]	0.87	0.54	0.01
SD	0.24	0.04	
Sušina kořenů [g]	3.26	2.01	0.01
SD	1.03	0.76	
Celková sušina [g]	4.13	2.56	0.01
SD	1.17	0.92	
Průměr kmínku [mm]	7.34	6.26	<10⁻⁶
SD	0.65	1.12	
Počet listů	9.60	9.13	0.76
SD	3.64	2.61	
Výška [cm]	16.55	14.40	0.24
SD	3.79	4.75	
S:R	0.29	0.28	0.93
SD	0.09	0.09	
<i>Laccaria laccata</i> [%]	10.21	7.31	0.20
SD	7.98	7.97	
<i>Thelephora terrestris</i> [%]	8.21	4.30	0.47
SD	9.19	10.90	

Tab. TP1.8: Tabulka průměrných, směrodatných odchylek hodnot míry kolonizace jednotlivými morfotypy a růstových charakteristik v závislosti na přítomnosti fruktifikace. Ve třetím sloupci jsou hladiny významnosti dosažené v statistických testech rozdílů mezi skupinami (ANOVA pro růstové charakteristiky, Kruskal-Wallisův test pro míru mykorrhizace).

	Průměr m.	Tl. Pláště	Tl. Pokožky	Tl. Prim Kůry	Průměr s.válce.	1. řada kor b.
LLF	98.88	21.88	19.19	36.94	25.01	17.22
SD	2.47	1.91	1.95	2.61	1.72	0.47
LLQ	96.92	21.55	19.34	36.21	24.72	17.13
SD	3.74	1.55	2.83	1.79	1.70	1.12

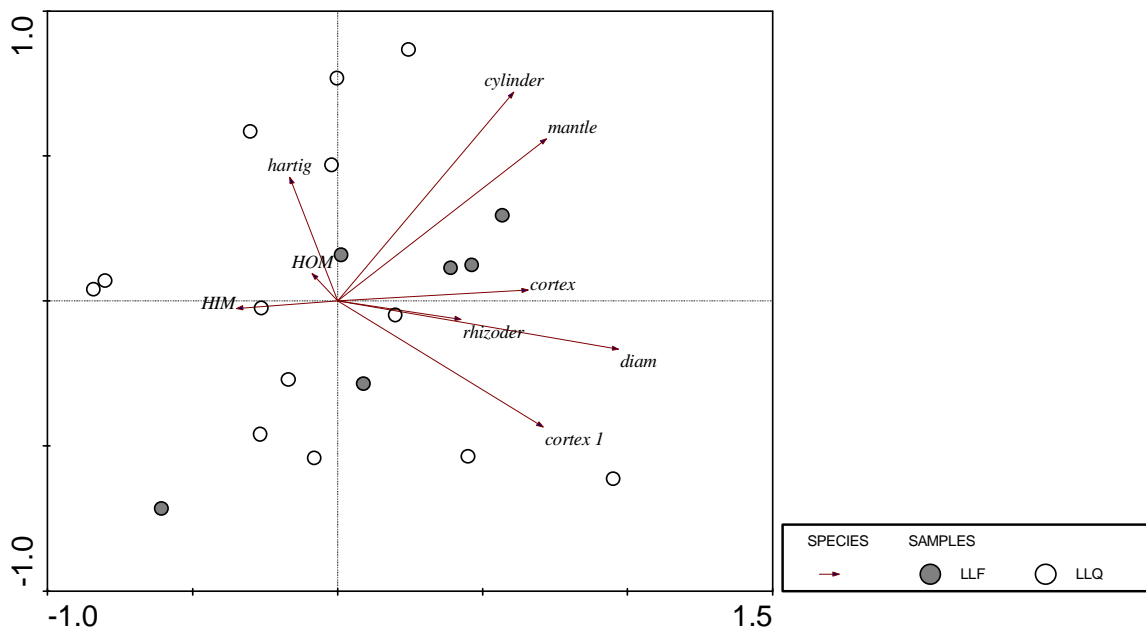
Tab. TP1.9: Průměrné anatomické charakteristiky mykorrhiz naměřené v Pokusu 2 (Průměr mykorrhizy, tloušťka pláště, tloušťka rhizodermis, tloušťka primární kůry, průměr středního válce, radiální rozměr první řady korových buněk), SD značí směrodatnou odchylku.

	H. síť	Hyfy vnějšího pláště	Hyfy vnitřního pláště
LLF	1.04	3.27	4.14
SD	0.10	0.10	0.10
LLQ	1.17	3.34	4.21
SD	0.22	0.15	0.25

Tab. TP1.10: Průměrné anatomické charakteristiky mykorrhiz naměřené v Pokusu 2 (Míra pronikání Hartigovy sítě do primární kůry (viz tab. XX), průměr hyf vnitřního pláště, průměr hyf vnějšího pláště), SD značí směrodatnou odchylku.

	var	F	p	%var
Hartig	0.092	1.726	0.277	14.26357
diam	0.074	1.349	0.291	11.47287
HOM	0.063	1.141	0.331	9.767442
cortex	0.029	0.504	0.465	4.496124
HIM	0.018	0.317	0.574	2.790698
mantle	0.009	0.155	0.731	1.395349
cylinder	0.007	0.122	0.712	1.085271
cortex 1	0.002	0.036	0.853	0.310078
rhizoder	0.001	0.014	0.909	0.155039

Tab. TP1.11: Výsledky postupného výběru (Monte-Carlo permutační test s 999 permutacemi) v LDA analýze anatomických rozdílů mezi mykorhizami kmenů LLF a LLQ. var: množství vysvětlené variability, F: hodnota testovacího kritéria, p: dosažená hladina významnosti, %var: podíl vysvětlené variability z celkové. (Legenda: *cortex*: radální rozměr prim. kůry, *cortex 1*: rad. rozměr 1. řady buněk prim kůry, *cylinder*: průměr cezrálního válce, *diam*: průměr mykorhizy, *hartig*: hloubka pronikání H. sítě, *HIM/HOM*: průměr hyf vnitřního/vnějšího pláště, *mantle*: tloušťka pláště, *rhizoder*: radiální rozměr rhizodermis)



Obr. P1.9: PCA ordinační diagram v prostoru první a třetí kanonické osy. Body odpovídají jednotlivým semenáčkům (rozlišeny podle zásahu), šipky korelacím měřených charakteristik. Vlastní čísla os: 0.588 a 0.097 (Legenda: *cortex*: radální rozměr prim. kůry, *cortex 1*: rad. rozměr 1. řady buněk prim kůry, *cylinder*: průměr cezrálního válce, *diam*: průměr mykorhizy, *hartig*: hloubka pronikání H. sítě, *HIM/HOM*: průměr hyf vnitřního/vnějšího pláště, *mantle*: tloušťka pláště, *rhizoder*: radiální rozměr rhizodermis)

Kmen	konc. inokula	Výška [cm]	Průměr km. [mm]	Délka děloh [cm]	Šířka děloh [cm]	Počet listů
LLQ	1:50	23.77	3.89	2.71	1.49	4.62
	SD	6.92	0.56	0.29	0.17	1.98
	1:25	21.59	3.62	2.66	1.46	4.38
	SD	6.52	0.57	0.33	0.21	1.98
	1:12.5	21.86	3.58	2.61	1.44	5.00
	SD	7.17	0.57	0.26	0.27	1.71
	celkem	22.16	3.68	2.66	1.46	4.59
	SD	6.71	0.58	0.30	0.20	1.85
LLF	1:50	22.69	3.70	2.68	1.45	5.69
	SD	4.40	0.84	0.33	0.14	1.44
	1:25	21.55	3.95	2.69	1.49	4.21
	SD	8.08	0.92	0.33	0.15	2.37
	1:12.5	20.92	3.40	2.75	1.53	3.92
	SD	5.91	0.50	0.32	0.39	1.98
	celkem	21.67	3.76	2.70	1.49	4.49
	SD	6.80	0.84	0.32	0.22	2.17
K		23.01	3.80	2.72	1.46	4.46
	SD	5.91	0.65	0.25	0.20	1.85
Celkem		22.28	3.74	2.69	1.47	4.52
	SD	6.48	0.69	0.29	0.21	1.95

Tabulka TP1.12: Tabulka průměrů a směrodatných odchylek (SD) růstových charakteristik změřených na začátku Pokusu 4

Kmen	konc. inokula	Průměr km. [mm]	Poč. list.	Výška [cm]	S:R
LLQ	1:50	3.66	7.38	21.87	0.70
	SD	1.84	2.26	11.39	0.41
	1:25	4.14	7.96	24.41	0.75
	SD	0.73	1.64	5.62	0.27
	1:12.5	4.27	6.86	24.76	0.83
	SD	0.68	1.41	7.20	0.22
	celkem	4.06	7.55	23.91	0.76
	SD	1.08	1.78	7.61	0.30
LLF	1:50	4.57	8.00	25.09	0.66
	SD	0.38	1.84	3.96	0.32
	1:25	4.26	8.07	23.22	0.73
	SD	1.11	1.82	9.01	0.35
	1:12.5	4.10	8.85	22.52	0.63
	SD	1.55	1.72	8.64	0.34
	celkem	4.29	8.25	23.50	0.69
	SD	1.11	1.80	7.94	0.33
K		4.24	8.45	24.46	0.69
	SD	1.31	2.44	7.96	0.29
Celkem		4.20	8.07	23.95	0.71
	SD	1.17	2.05	7.80	0.31

Tabulka TP1.13: Tabulka průměrů a směrodatných odchylek (SD) růstových charakteristik změřených na konci Pokusu 4

Kmen	konc. inokula	Suš. list [g]	Suš. kmínku [g]	Suš. koř. [g]	Celk. suš. [g]
LLQ	1:50	0.30	0.41	0.58	0.99
		SD 0.10	0.27	0.46	0.70
	1:25	0.32	0.44	0.66	1.10
		SD 0.11	0.20	0.38	0.56
	1:12.5	0.28	0.44	0.57	1.01
		SD 0.10	0.16	0.27	0.41
	celkem	0.30	0.43	0.62	1.05
		SD 0.10	0.21	0.37	0.55
LLF	1:50	0.32	0.53	1.01	1.54
		SD 0.10	0.27	0.97	1.12
	1:25	0.34	0.50	0.81	1.31
		SD 0.11	0.32	0.57	0.79
	1:12.5	0.37	0.46	0.86	1.32
		SD 0.10	0.32	0.88	1.17
	celkem	0.34	0.50	0.87	1.36
		SD 0.11	0.30	0.74	0.96
K		0.35	0.51	0.76	1.27
	SD	0.11	0.26	0.46	0.68
Celkem		0.33	0.48	0.75	1.23
	SD	0.11	0.26	0.55	0.76

Tabulka TP1.14: Tabulka průměrů a směrodatných odchylek (SD) růstových charakteristik změřených na konci Pokusu 4

	inokulum		množství inokula	
	F	p	F	p
Sušina listů [g]	2.36	0.10	1.11	0.35
Sušina kmínku [g]	0.49	0.82	1.05	0.35
Sušina kořenů [g]	1.04	0.40	2.16	0.12
Celková sušina [g]	0.93	0.48	2.10	0.13
Průměr kmínku [mm]	0.66	0.68	0.31	0.73
Počet listů	2.01	0.14	1.18	0.32
Výška [cm]	0.34	0.91	1.05	0.35
S:R	1.07	0.38	0.75	0.47

Tabulka TP1.15: Hodnoty testovacího kritéria a dosažené hladiny významnosti při testování vlivu typu inokula (LLF, LLQ, K) a množství inokula (1:50, 1:25, 1:12.5) pro jednotlivé růstové charakteristiky v Pokusu 4

Příloha 2 (Design experimentů)

RO	LL	LL	RO
RO+LL	K	K	RO+LL
LL	RO	RO	LL
K	RO+LL	RO+LL	K
RO	LL	LL	RO
RO+LL	K	K	RO+LL
LL	RO	RO	LL
K	RO+LL	RO+LL	K
RO	LL	LL	RO
RO+LL	K	K	RO+LL
LL	RO	RO	LL
K	RO+LL	RO+LL	K

Obr. P2.1: Design Pokusu 1

Legenda: RO: inokulace *Russula ochroleuca*, LL: inokulace *Laccaria laccata*, RO+LL: koinokulace *Russula ochroleuca* a *Laccaria laccata*, K: neinokulovaná kontrola

Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
RO	K	RO	K	RO	K	RO	K	RO
1. rok	1. rok	2. rok	2. rok	1.rok	1. rok	2. rok	2.rok	1. rok
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
K	RO	K	RO	K	RO	K	RO	K
2. rok	2. rok	1. rok	1. rok	2. rok	2.rok	1. rok	1. rok	2. rok

Obr. P2.2 Design Pokusu 5.

Legenda: RO: inokulace *Russula ochroleuca*, K: neinokulovaná kontrola, 1. semnáčky vyklíčené 2007, 2. rok semenáčky vyklíčené 2006

Příloha 3 (Popisy hlavních morfotypů mykorhiz)

Mykorhizy *Thelephora terrestris* (M3)

Typ větvení: monopodiální/nevětvené

Řád větvení: 0, vz. 1

Tvar špiček: rovný až ohnutý

Barva špiček: bělavá

Barva pláště: bělavá, u starších okrovým nádechem

Povrch pláště: hladký

Rhizomorfy: nehojné, nediferenciované

Připojení: v jednom bodě

Svrchní vrstva pláště

Struktura: volně plektenchymatická, nepravidelná

Cystidy: tlustostěnné, (2-)3-4(-7)x130-200 μ m

Přezky: přítomné

Sek. septa: přítomné, nehojné

Průměr hyf pláště: 2-3(-4), (pr. 2.7) μ m

Spodní vrstva pláště

Struktura: hustě plektenchymatická, nepravidelná

Průměr hyf: 3-4, (pr. 3.4) μ m

Příčný řez

Struktura pláště: plektenchymatický, bez rozpoznatelných vrstev

Tloušťka pláště: 10-25 (pr. 18.3) μ m

Počet řad Hartigovy sítě: 0.5(-1.5)

Počet řad korových buněk: 4-6

Počet řad taninových buněk: 0

Morfologické a anatomické znaky v zásadě odpovídají publikovaným popisům (Ingleby et al. 1990, Agerer 1996-2002, Agerer et Weiss 1989), s některými drobnými rozdíly. Agerer et Weiss (1989) udávají větší průměr hyf pláště, mnou naměřené hodnoty však odpovídají těm v Ingleby et al. (1990). Naopak struktura pláště v Ingleby et al. (1990) udávaná jako synenchymatická spolu s vyobrazeními (str. 40-41), neodpovídá zcela mnou pozorované, plášť byl sice, zvláště v hlubších vrstvách, poměrně kompaktní, nicméně jednotlivé hyfy byly stále rozpoznatelné. Příčinnou může být odlišná metodika (Ingleby et al. pozorovali roztlakové preparáty mykorhiz). Odlišnosti v hloubce, do které zasahuje Hartigova síť, jsou zjevně způsobeny rozdílnými hostiteli, charakter Hartigovy sítě je rozdílný mezi naho- a krytosemennými rostlinami (Smith & Read 1997). I přes tyto rozdíly považuji učení této mykorhizy za celkem spolehlivé, hlavně pro přítomnost nápadných tlustostěnných cystid. Tento typ mykorhizy byl navíc jediný, který jsem našel u semenáčku, kde *Thelephora terrestris* fruktifikovala.

Při morfologickém vyšetření jsem zjistil, že morfotypy M1 a M6 vykazují stejné anatomické znaky jako mykorhizy morfotypu M3. Morfotyp M1 představuje krátké čistě bílé nevětvené mykorhizy, bez rhizomorf. Tento morfotyp se vyskytoval sporadicky, zpravidla

spolu s morforem M3. V daném případě se jedná nejspíše o mladá vývojová stadia mykorhiz *Thelephora terrestris*. V případě morforem M6 jsem pozoroval mykorhizy s oranžovými až červenohnědými odstíny. Tento morforem byl velmi vzácný, pozoroval jsem ho pouze u dvou semenáčků, kde kolonizoval jen zanedbatelný počet kořenových špiček. Mykorhizy podobného charakteru jsou popsány v Ingleby et al. (1990) jako forma mykorhiz *Thelephora terrestris*. Tento morforem může být aberantní formou *Thelephora terrestris*, nebo příbuzným druhem. Pro vzácný výskyt jsem v analýzách tyto mykorhizy zahrnul pod *Thelephora terrestris*.

Běžný kontaminant v pokusech i školkách, pravděpodobně šířený vzduchem v formě spor.

Mykorhizy *Coenococcum geophilum* (M4)

Typ větvení: nevětvené

Řád větvení: 0, vz. 1

Tvar špiček: rovný

Barva špiček: černá až černohnědá

Barva pláště: černá

Povrch pláště: zrnitý

Rhizomorfy: -

Připojení: -

Svrchní vrstva pláště

Struktura: pseudoparenchymatická

Cystidy: -

Přezky: ?

Sek. septa: ?

Průměr hyf pláště: (3-)4-7(-9) μm

Spodní vrstva pláště

Struktura: pseudoparenchymatická, ztlustlé stěny hyf

Průměr hyf: (3-)4-6(-9) μm

Příčný řez

Struktura pláště: pseudoparenchymatický, bez rozpoznatelných vrstev

Tloušťka pláště: 15-25 μm

Počet řad Hartigovy sítě: 0.5

Počet řad korových buněk: 4-6

Počet řad taninových buněk: 0

Morfologické a anatomické znaky mykorhiz *Coenococcum geophilum* jsou natolik charakteristické, že jejich jednoznačná identifikace je poměrně snadná (Agerer et al. 1987-2002, Ingleby et al. 1990).

Mykorhizy *Laccaria laccata* (M5)

Typ větvení: monopodiální/nevětvené

Řád větvení: 0 - 1, vz. 2

Tvar špiček: rovný, vz. ohnutý

Barva špiček: bělavá až světle okrová

Barva pláště: světle okrový, u starších až hnědavý

Povrch pláště: hladký

Rhizomorfy: vzácné, nediferencoivané

Připojení: široké, vějířovité

Svrchní vrstva pláště

Struktura: volně plektenchymatická, nepravidelná, vz. s prstencovitou strukturou

Cystidy: nepřítomné

Přezky: přítomné

Sek. septa: přítomné, nehojné

Průměr hyf pláště: 3-4(-5), (pr. 3.32) μm

Spodní vrstva pláště

Struktura: hustě plektenchymatická, nepravidelná

Průměr hyf: 3-5(-6), (pr. 4.19) μm

Příčný řez

Struktura pláště: plektenchymatický, bez rozpoznatelných vrstev

Tloušťka pláště: 6-42 (pr. 21.7) μm

Počet řad Hartigovy sítě: 0.5(-1)

Počet řad korových buněk: 4-6

Počet řad taninových buněk: 0

Mykorhiza celkově odpovídá popisům a vyobrazením mykorrhiz u rodu *Laccaria* (Weiss 1991, Cuvellier 1991, Agerer 1987-2002, Ingleby et al. 1990). Odlišnosti lze přičíst tomu, že v uvedených pracích jsou zpracovány příbuzné druhy. Je pozoruhodné, že v tento běžný druh není zpracován v atlasech ektomykorrhiz (Ingleby et al. 1990, Agerer et al. 1987-2002), což zřejmě souvisí s nejednoznačným druhovým vymezením (Fries 1983, Mueller 1991). Nápadným rozdílem oproti mykorhizám druhů *Laccaria bicolor* a *L. amethystea* je absence fialového zbarvení špiček pozorovaného u mladých mykorrhiz těchto druhů, což zřejmě souvisí přítomností fialové barvy na bázi plodnic u těchto druhů. U mykorhizy *Laccaria amethystea-Betula pendula* je popisovaná tloušťka pláště udávána o mnoho vyšší (36-93 μm , až 140 μm v místě napojení vystupujících hyf), mykorhizy však byly izolovány z kořenů dospělých dřevin, které se odlišují od mykorrhiz u semenáčků (Ingleby et al. 1990).



Obr. P3.1 Neidentifikovaný morfortyp (M1)



Obr. P3.2: Mykorhizy *Thelephora terrestris* (M3)



Obr. P3.3 Morfotyp M2 (mladé mykorhizy *Thlephora terrestris*)



Obr. P3.4: Mykorhizy *Coenococum geophilum* (M4)



Obr. P3.5: Mykorhizy *Laccaria laccata* (M5)

Příloha 4 (Měřené anatomické charakteristiky)

Svrchní pohled na plášť

Průměr hyf ve svrchní části pláště(25 hyf)

Průměr hyf ve spodní části pláště (25 hyf)

Příčný řez

Průměr kořínku (2 kolmá měření)

Radiální rozměr pláště (2x2 kolmá měření)

Minimální tloušťka pláště

Maximální tloušťka pláště

Radiální rozměr kůry (2x2 kolmá měření)

Radiální rozměr buněk epidermis (12 buněk)

Radiální rozměr buněk 1 řady primární kůry (12 buněk)

Průměr středního válce (2 kolmá měření)

Počet rad buněk primární kůry

Hloubka pronikání Hartigovy sítě

Měřená charakteristka	Počet měření / preparát
Svrchní pohled na plášť	
Průměr hyf ve svrchní části pláště [μm]	25
Průměr hyf ve spodní části pláště [μm]	25
Příčný řez	
Průměr kořínku [μm]	2**
Radiální rozměr pláště [μm]	2x2**
Minimální tloušťka pláště [μm]	1
Maximální tloušťka pláště [μm]	1
Radiální rozměr buněk epidermis [μm]	12
Hloubka pronikání Hartigovy sítě [*]	1
Radiální rozměr kůry [μm]	2x2**
Počet rad buněk primární kůry	1
Radiální rozměr buněk 1. řady primární kůry [μm]	12
Průměr středního válce [μm]	2**

Tab. TP4.1: Měřené anatomické charakteristiky. (* semikvantitativní charakteristka – 0: hyfy nepronikají mez buňky epidermis, 1-hyfy pronikají mezi radiální stěny, 2-hyfy obklopují celou buňku epidermis, 3-hyfy pronikají do primární kůry)(** měření ve dvou na sobě kolmých rovinách)